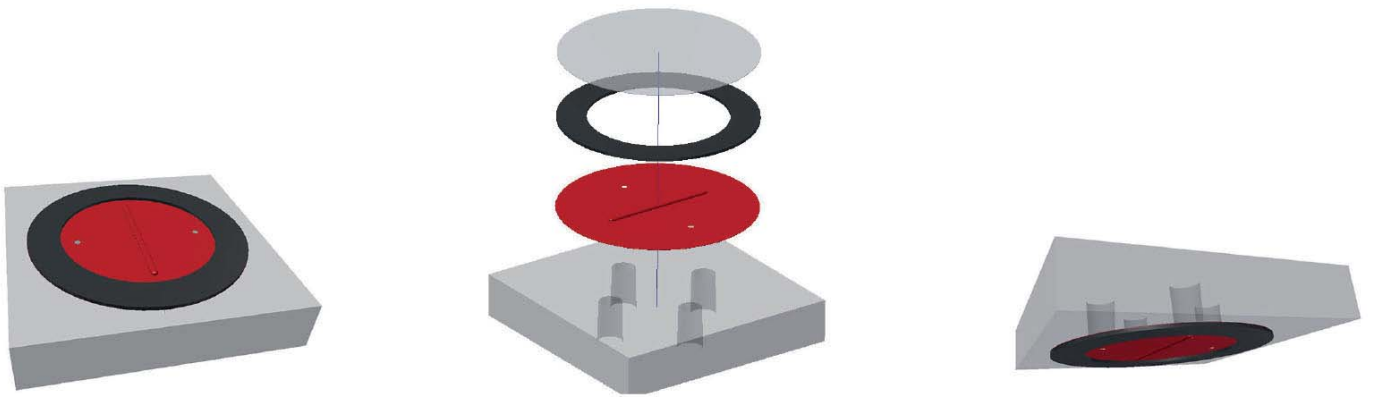


Darja Ivannikov

In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren





In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Darja Ivannikov

aus Nowosibirsk

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem M. Klopper

Referent: Prof. Dr. Ute Schepers

Korreferent: Prof. Dr. Christof Niemeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 2015



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2016

Zugl.: Karlsruhe (KIT), Univ., Diss., 2015

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2016

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2016

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9205-4

eISBN 978-3-7369-8205-5



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Schepers vom 01. Januar 2013 bis zum 04. November 2015 am Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie, angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Christof Niemeyer danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

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

Linkenheim, 04.11.2015

Darja Ivannikov





MEINEN GROßELTERN

Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt, sondern durch Arbeit und eigene Leistung.

Albert Einstein





INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch.....	3
2.2 Biologische Barrieren	5
2.2.1 Blut-Hirn-Schranke	6
2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....	6
2.2.1.2 Hirnendothel.....	7
2.2.1.3 Astrozyten.....	9
2.2.1.4 Perizyten	9
2.2.1.5 Efflux-Pumpen	10
2.2.1.6 Scherkräfte.....	12
2.2.1.7 <i>In vitro</i> Rekonstruktion der BBB.....	13
2.2.2 Darm	14
2.2.3 Leber	16
2.2.3.1 Stammzellen der Leber	17
3. ZIEL DER ARBEIT	17
4. ERGEBNISSE.....	18
4.1 Aufbau des μ3DVasc Biorektors.....	18
4.2 SMART-Technologie	19
4.3 Herstellung des μ3DVasc Bioreaktors	20
4.4 Biologische Validierung des endothelialen Zelllayers	23
4.4.1 Langzeitkultivierung	23
4.4.2 Konfluenztest.....	23
4.4.3 Proliferationstest	25
4.4.4 Funktionstests	29
4.4.4.1 Transmigration von Blutzellen	29
4.4.4.2 Permeabilitätsmessungen	32
4.4.5 Versorgung des unteren Kompartiments	44
4.5 Blut-Hirn-Schranke	46
4.5.1 Bestimmung geeigneter Nährmedien	46
4.5.1.1 Konditioniertes Nährmedium	46
4.5.1.2 Wachstumskurven	47
4.5.2 Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten.....	49
4.5.3 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten	50
4.5.3.1 Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in 2D	50



4.5.3.2	Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor.....	51
4.5.4	Nachweis zellspezifischer Marker	53
4.5.5	Proliferationstest.....	56
4.5.6	Test der metabolischen Zellaktivität	59
4.5.7	Lebend/tot-Nachweis.....	61
4.5.8	Untersuchung der Hypoxie.....	62
4.5.9	Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen	66
4.5.10	P-gp Transport Assay	69
4.6	Darm.....	72
4.6.1	Nachweis der Schleimbildung	73
4.6.2	Nachweis von Tight Junctions	74
4.6.3	Nachweis der Zotten-ähnlichen Strukturen	75
4.7	Leber.....	76
4.7.1	Isolation von fetalen, murinen Leber-Vorläuferzellen	77
4.7.2	Ausdifferenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen	77
4.7.3	Generierung von HPPL-Zellen	82
4.7.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen	83
4.7.5	Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten.....	84
4.7.6	Ausdifferenzierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor	87
4.7.7	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten	88
5.	DISKUSSION	90
6.	MATERIAL UND METHODEN	102
6.1	Material	102
6.2	Methoden	112
6.2.1	Herstellung von $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren	112
6.2.2	Zellkultivierung.....	113
6.2.2.1	Beschichtung der Kultivierungsmaterialien.....	113
6.2.2.2	Passagieren der Zellen.....	113
6.2.3	Handhabung des mikrofluidischen $\mu 3DVasc$ Bioreaktors	114
6.2.3.1	Beschichtung des PC-Mikrokanals.....	114
6.2.3.2	Beschichtung des unteren Kompartiments	114
6.2.3.3	Einbringen der Endothelzellen in den PC-Mikrokanal.....	115
6.2.3.4	Einbringen der Zellen in das untere Kompartiment	116
6.2.4	Visualisierung von Zellen.....	116
6.2.4.1	Vitale Zellen	116
6.2.4.2	Fixierte Zellen	117
6.2.5	EdU Nachweis.....	117
6.2.6	Adhäsion und Migration von Blutzellen	118
6.2.7	Permeabilitätsassay	118
6.2.7.1	Standardkurven	118
6.2.7.2	Widerstandseinheiten	118
6.2.7.3	Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen.....	119



6.2.7.4	Einfluss der Beschichtung	119
6.2.7.5	Permeabilitätsassay im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor	119
6.2.8	Versorgung des unteren Kompartiments	120
6.2.9	Etablierung der Kokultur aus Perizyten und Astrozyten.....	120
6.2.10	Präparation des Astrozyten-konditionierten Mediums	120
6.2.10.1	Untersuchung der Expression von Tight Junctions	120
6.2.10.2	Wachstumskurven	121
6.2.11	XTT Nachweis	121
6.2.12	Lebend/tot-Nachweis.....	121
6.2.13	Nachweis der Hypoxie.....	122
6.2.14	P-gp Transport Assay.....	122
6.2.15	REM	122
6.2.16	Isolierung der fetalen, murinen Leberzellen	122
6.2.16.1	Isolierung der DLK ⁺ Hepatoblasten	124
6.2.16.2	Generierung von HPPL-Zellen aus DLK ⁺ Hepatoblasten.....	124
6.2.16.3	Ausdifferenzierung von DLK ⁺ Hepatoblasten zu HLC.....	124
6.2.16.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu HLC.....	126
6.2.16.5	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten	127
6.2.16.6	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten	128
6.2.17	Statistische Auswertung.....	129
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130
8.	LITERATUR	134
9.	ANHANG	145
10.	LEBENS LAUF	157
11.	DANKSAGUNG	161





1. Zusammenfassung

Zurzeit steht bei vielen Forschungsgruppen das Tissue Engineering als Ersatzverfahren für Tierversuche im Fokus. Ziel des Tissue Engineerings ist es, biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, um organospezifische Experimente *in vitro* durchzuführen. Diese *in vitro* Systeme sind zumeist billiger, schneller und besser sowohl für das High Throughput Screening (HTS) von Substanzen, als auch für die Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene geeignet. Eine spezielle Klasse von *in vitro* Systemen beruht auf der Kultivierung von Zellen in miniaturisierten Systemen. Dank ihres Ursprungs in der Halbleiterforschung und des Einsatzes zur Rekonstruktion organotypischer Zellkulturen werden solche Systeme als „Organs-on-Chips“ bezeichnet. Das Ziel dieses Konzepts ist die Gestaltung einer Mikroumgebung, welche in ihrer Architektur, chemischen Zusammensetzung und ihren mechanischen Reizen der Mikroumgebung eines echten humanen oder tierischen Organs ähnelt. Der spezielle Aufbau solcher Systeme erlaubt eine genaue Kontrolle über die eingesetzten Parameter: Beispielsweise lassen sich die Verhältnisse zwischen den Zellen und den Nährmedien genau skalieren, während dies in konventionellen zweidimensionalen (2D)-Modellen nicht möglich ist. Der Anschluss solcher Systeme an mikrofluidische Pumpen simuliert die dynamische Versorgung der Zellen und lässt die Generierung der *in vivo* relevanten, chemischen Gradienten zu. Aufgrund der Lichtdurchlässigkeit dieser Systeme ist die Echtzeituntersuchung des Zellwachstums und -verhaltens möglich. Auf diese Weise gewährleisten die „Organs-on-Chips“ im Vergleich zu den *in vivo* und anderen *in vitro* Modellen eine zuverlässigere Untersuchung der Physiologie und Pathophysiologie.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die *in vitro* Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren. Als *in vitro* Modell für ein vaskularisiertes, dreidimensionales (3D)-Gewebe wurde in der vorliegenden Dissertation der mikrofluidische μ 3DVasc Bioreaktor eingesetzt. Dieser auf der SMART-Technologie basierende Bioreaktor besteht aus einer porösen Mikrokapillare zur Kultivierung von Gefäßendothel und einer darunter liegenden, die Kapillare umgebenden, Kammer für ein 3D-Gewebe. Drei Barrieren wurden ausgesucht: die Blut-Hirn-Schranke (BBB), das Darmepithel und die Leber. Alle Modelle sollten 3D etabliert und im Vergleich zu den 2D-Modellen und den natürlichen *in vivo* Barrieren validiert werden.

Ausgangspunkt war zunächst die Charakterisierung der im Kanal angesiedelten endothelialen Zellkultur. Eine Langzeitkultivierung der Zellen konnte durch Anwendung von *in vivo* Bedingungen in Form von Scherstress und Krümmung der Membran erreicht werden. Dabei wurde eine sehr geringe, *in vivo* ähnliche Proliferationsrate der Zellen verzeichnet. Die Ausbildung einer dichten Barriere durch diese Zellen konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Permeabilitätsuntersuchungen waren insbesondere in Hinsicht auf die spätere Etablierung der BBB von Bedeutung. Dabei wurde der Fokus auf die Simulation eines dynamischen Assays in Annäherung an physiologische Bedingungen gelegt. Eine geringe Permeabilität der endothelialen Schicht konnte in Übereinstimmung zu den bisher publizierten Werten in 2D-Systemen gemessen werden.

Eine der dichtesten Barrieren in Vertebraten ist die BBB. Sie besteht aus einem Endothel, das neben der erhöhten Expression von Tight Junctions zur Stärkung der Zell-Zell-Kontakte, auch eine erhöhte Expression von Efflux-Pumpen zeigt, die für die Ausschleusung von Gift- und Wirkstoffen zuständig sind. Die Dichtigkeit der BBB ist auf ein Zusammenspiel von Endothel und den umgebenden Perizyten und



Astrozyten zurückzuführen. Durch die Etablierung von Perizyten und Astrozyten als 3D-Kokultur in dem den mikrofluidischen Kanal umgebenden Kompartiment konnte in dieser Arbeit das erste *in vitro* Modell entwickelt werden, das auf drei humanen, primären Hauptzelltypen der BBB basiert. Eine erfolgreiche Langzeitkultivierung der Zellen konnte mittels Untersuchung der Zellvitalität gezeigt werden. Dabei wurden verschiedene Reaktionen der Perizyten und Astrozyten auf die Kultivierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor analysiert: Es zeigte sich eine Verringerung der metabolischen Aktivität und der Zellteilung im Gegensatz zu den Zellen, die in konventionellen Multiwellplatten kultiviert wurden. Assays zur Detektion von Hypoxie zeigten, dass die Perizyten und Astrozyten gut mit Nährstoffen durch den porösen Mikrokanal versorgt werden können. Neben der erhöhten Expression der wichtigsten Tight Junction Proteine in Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass durch die 3D-Kokultur mit Astrozyten und Perizyten im Gegensatz zu den bisherigen Modellen funktionelle Efflux-Pumpen exprimiert werden. Zur Bestätigung der Einsatzmöglichkeit des etablierten mikrofluidischen Modells wurden Efflux-Assays durchgeführt. Durch die Inhibierung einer wichtigen Efflux-Pumpe, P-Glykoprotein (P-gp), konnte in den *in vitro* Kapillaren analog zu *ex vivo* Bedingungen die Anreicherung der P-gp-Substrate in Endothelzellen detektiert werden, was bisher noch nicht in anderen mikrofluidischen BBB-Modellen reproduziert werden konnte.

Das nächste Ziel der vorliegenden Dissertation war die Etablierung eines „durchbluteten“ Darmepithels. Hierzu konnte die Kokultur aus Endothelzellen auf der luminalen Seite der PC-Membran und humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen (Caco-2) auf der Rückseite erzielt werden. Weiterhin wurde eine deutliche Reaktion der Caco-2 Zellen auf die Kultivierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor beobachtet: Die normalerweise unter 2D-Bedingungen planar wachsenden Caco-2 Zellen arrangierten sich in 3D-Gebilden, die eine morphologische Ähnlichkeit zu *in vivo* Darmzotten aufwiesen. Des Weiteren wurden eine schnellere Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte und die Schleim-Produktion beobachtet.

Als drittes Barriere-Modell wurde die Leber ausgewählt. Diese ist das zentrale Organ des Metabolismus toxischer Substanzen und ist für deren Entgiftung verantwortlich. Die *in vivo* Toxizität ist die Ursache, warum 90% aller neu entwickelten Wirkstoffe nach der klinischen Phase I nicht weiter verfolgt werden. Somit wird deutlich, dass die Entwicklung von *in vitro* Modellen zur besseren Vorhersage der Toxizität die Vorauswahl der Wirkstoffe beschleunigen kann. Für die Generierung eines relevanten *in vitro* Lebermodells ist die Herkunft des Zellmaterials von großer Bedeutung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Leber-Stammzellen aus einem Maus-Embryo zur anschließenden Ausdifferenzierung in zwei Leber-Zelltypen, Hepatozyten und Cholangiozyten, isoliert. Die isolierten Leber-Stammzellen konnten über mehrere Wochen in Kultur ohne Verlust der spezifischen Stammzell-Charakteristika gehalten werden. Die Ausdifferenzierung dieser Zellen in Hepatozyten und Cholangiozyten wurde mittels Generierung von 3D-Zellkulturen erreicht. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Ausdifferenzierung der isolierten Stammzellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor zur Ausbildung von Gallengang-ähnlichen Strukturen führt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten 3D-Modelle im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor bieten somit in Zukunft eine geeignete Plattform zur Untersuchung der Wirkstoffaufnahme sowie der Verteilung und der Anreicherung der applizierten Substanzen in Geweben. Die Verknüpfung der drei Modelle untereinander würde zahlreiche innovative Untersuchungsmöglichkeiten schaffen, wie z.B. neu entwickelte Substanzen effizient und kostengünstig in einem HTS Format zu testen, um geeignete Kandidaten schneller zu bestimmen, weiter zu optimieren und letztendlich auf den Markt zu bringen.



2. Einleitung

Die Aufklärung des Penetrationsverhaltens von Chemikalien, aber auch von Kosmetika oder möglichen pharmakologisch aktiven Wirkstoffen zur Entwicklung und Erprobung neuer Therapiemöglichkeiten in der Medizin, stellt einen wichtigen Bereich in der Medikamentenentwicklung und in der Grundlagenforschung dar. Heutzutage wird die Arzneimittelsicherheit für gewöhnlich an Tieren überprüft und die erzielten Daten auf Menschen übertragen. Obwohl die Übertragung dieser Daten durch die Einführung der Untersuchungspflicht der Toxizität an Nichtnagern erheblich verbessert wurde, reflektieren die in Hunden und Ratten erzielten Ergebnisse nur bedingt den Reaktionsablauf eines Wirkstoffs im Menschen.^[1-3] Die Erfahrungen der letzten Jahre lehrten, dass Erkenntnisse aus Tierversuchen aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden nur begrenzt auf den Menschen übertragbar sind, was eine große Diskussion über die Einführung von Alternativmethoden entfachte. Zudem sind Tierversuche ethisch fraglich sowie kosten- und zeitaufwendig. Vor allem Tierschützer fordern deshalb Alternativmethoden, die einen Großteil der Tierversuche ersetzen.

2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch

Zurzeit steht bei vielen Forschungsgruppen das Tissue Engineering als Ersatzverfahren für Tierversuche im Fokus. Ziel des Tissue Engineerings ist es, biologische Ersatzgewebe zu entwickeln, um organospezifische Experimente *in vitro* durchzuführen. Diese *in vitro* Systeme sind zumeist billiger, schneller und besser sowohl für das Hochdurchsatz-Screening (engl. High Throughput Screening (HTS)) von Substanzen, als auch für die Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene geeignet. Des Weiteren erlauben diese Systeme eine genaue Kontrolle der eingesetzten Parameter, während im Tiermodell eine exakte Modulation von z.B. Blutfaktoren oder die Analyse von Aufnahmeprozessen verschiedener Wirkstoffe nicht möglich ist.^[4] Organotypische Gewebekulturen haben in einigen wenigen Bereichen der regenerativen Medizin bereits Anwendung gefunden. Insbesondere auf menschlichem Material basierende *in vitro* Systeme haben großen Anklang in Wissenschaftskreisen erlangt. Im Vergleich zu Tierversuchen reflektieren diese Systeme die Physiologie des menschlichen Körpers besser und können demzufolge verlässlichere Vorhersagen über die Toxizität eines Medikaments liefern. Aufgrund einer einfacheren und schnelleren Bedienung können diese Systeme in den Anfangsphasen der Medikamentenentwicklung eingesetzt werden und somit die pharmazeutische Wirkstoffgenerierung erheblich beschleunigen.^[5] Daher wurden die ersten konventionellen zweidimensionalen (2D) *in vitro* Modelle bereits im letzten Jahrhundert entwickelt.^[6] Das Grundprinzip für die Generierung eines derartigen Gewebes ist dabei die Entnahme einer Biopsie. In der Regel werden hierfür zunächst kleine Proben des entsprechenden Gewebes entnommen und primäre Zellen isoliert. Diese sogenannten Vorläuferzellen werden dann *in vitro* durch bekannte Zellkulturtechniken vermehrt bis genügend vermehrungsfähige Zellen zur Verfügung stehen. Dabei stellt sich das Problem, dass viele Zellen zwar im Körper hochregenerativ sind, sich *in vitro* jedoch kaum noch teilen. Zudem kommt es in einer Monolayer-Kultur meist bereits nach wenigen Tagen während der Vermehrungsphase zu einer Dedifferenzierung, d.h. zu einer Veränderung der Morphologie und des Stoffwechsels. Die Zellen verlieren dabei einen Teil ihrer gewebetypischen Eigenschaften. Für den Erhalt der *in vitro* Zellfunktionalität ist deshalb die Nachbildung einer möglichst gewebeähnlichen Mikroumgebung wichtig.^[7] Denn Organe bestehen aus einer Vielzahl verschiedener Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung und sind durch eine kontinuierliche Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion



gekennzeichnet. Somit sind die 2D-Modelle, trotz ihres erheblichen Beitrags in der Biomedizin, zur Rekonstruktion von organspezifischen und ausdifferenzierten Zellkulturen sowie zur akkuraten Vorhersage der *in vivo* Funktion ungeeignet.^[8] Diese Limitierung führte vor 50 Jahren zur Etablierung neuer, auf 3D-Architektur basierender Modelle, der sogenannten Organoiden, bestehend aus Hydrogelen aus einer natürlichen Extrazellulärmatrix (EZM) oder synthetischen Polymeren und darin wachsenden Zellen.^[9] Zahlreiche Publikationen belegen den Nutzen dieser Systeme in der Aufklärung molekularer Vorgänge, Signalkaskaden und Arzneimittelwirkung.^[10-12] Allerdings variieren die Organoiden sehr stark in ihrer Form und Größe.^[13] Auch die oft unzureichende Versorgung der Zellen im Inneren der 3D-Modelle stellt eine große Herausforderung dar und führt häufig zum Absterben dieser Zellen. Demzufolge sind diese *in vitro* Modelle auch mit einer Vielzahl von Limitierungen verbunden. Denn neben dem Aufbau der Mikroumgebung tragen ebenfalls mechanische Stimuli, wie z.B. Erzeugung von Scherkräften durch den kontinuierlichen Blutfluss sowie Dehnungen, wie etwa in der Lunge durch Atembewegungen oder im Darm durch die Verdauung, zur korrekten Ausbildung eines Organs bei. Das Vorhandensein chemischer Gradienten und deren zeitliche und räumliche Trennung sind gleichermaßen wichtige Komponenten in der Aufrechterhaltung einer physiologischen Organfunktion.^[14] Aus diesen Überlegungen heraus, wird der Fokus der heutigen Wissenschaft auf Mikrosysteme namens „Organs-on-Chips“ verlagert. Das zugrunde liegende Konzept wurde aus der Mikrochipindustrie entnommen und mit weiteren Bausteinen, wie z.B. einer Mikrofluidik, verknüpft. So wachsen die Zellen in kleinen Chips, hergestellt mit Hilfe von Mikrofabrikationstechnik, oft unter Anwendung von Pumpensystemen zur Erzeugung von Scherkräften und artifiziellen Blutströmen. Dieses Design gewährleistet eine genaue Kontrolle der Mikroumgebung sowie deren gezielte Manipulation. In den letzten Jahren wurden viele Fortschritte auf diesem Gebiet gemacht. Es wurden Chips entwickelt, die künstlich hergestellte Organe darstellen, wie z.B. Lunge, Niere oder Leber.^[15-17] Zudem wurden Versuche unternommen, die einzelnen Modelle untereinander zu verknüpfen.^[18] Der Vorteil an diesem Konzept liegt in der Möglichkeit, nicht nur die Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben eines einzigen Organs, sondern die Interaktionen der Organe untereinander zu untersuchen. Die Nachbildung verschiedener Krankheitsbilder in solchen Systemen würde einen Fortschritt für die Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungsmethoden bedeuten.^[19]



2.2 Biologische Barrieren

Der menschliche Körper kann als eine Ansammlung verschiedener, mit Gas und Flüssigkeiten gefüllter Kompartimente betrachtet werden. Dazu zählen z.B. Lunge, Magen, Darm, Schilddrüse und Brustdrüsen. Für eine physiologisch korrekte Funktion dieser Organe ist eine gegenseitige Abgrenzung durch biologische Barrieren von enormer Bedeutung. Diese biologischen Barrieren, wie z.B. Blutgefäße, Blut-Hirn-Schranke (BBB, engl. Blood-Brain-Barrier), Epidermis und Darmschleimhaut, trennen die einzelnen Organe voneinander und sorgen für einen gegenseitigen, kontrollierten Austausch von Substanzen.^[20] Je nach Organ kann der Stofftransport zwischen Blut und Gewebe unterschiedlich stark eingeschränkt sein. Dieser kontrollierte Stofftransport erfolgt dank vieler Zell-Zell-Kontakte, die je nach Organ unterschiedlich stark ausgeprägt sind und eine unterschiedlich starke Durchlässigkeit für die im Blut transportierten Stoffe bewirken (Abbildung 1). Zum Beispiel besitzen Leber, Milz und Knochenmark sehr durchlässige Blutgefäße mit einem sogenannten diskontinuierlichen Endothel. Sein Zelllayer ist durch viele Öffnungen gekennzeichnet und für polare Substanzen permeabel. Andere Organe, wie z.B. Hormondrüsen, Gastrointestinaltrakt oder Niere, verfügen dagegen über fenestrierte Endothelien, die kleine Löcher aufweisen und nur für einige wenige lipophile Substanzen durchlässig sind. Noch weniger durchlässige Barrieren sind in unserem Zentralnervensystem (ZNS), Lymphknoten oder Muskeln vorzufinden. Ihr sogenanntes kontinuierliches Endothel wird nur durch lipophile Stoffe penetriert. Das kontinuierliche Endothel der BBB wird zusätzlich durch Perizyten und Gliazellen unterstützt und stellt somit die dichteste Barriere des menschlichen Körpers dar (Abbildung 2).^[21-23]

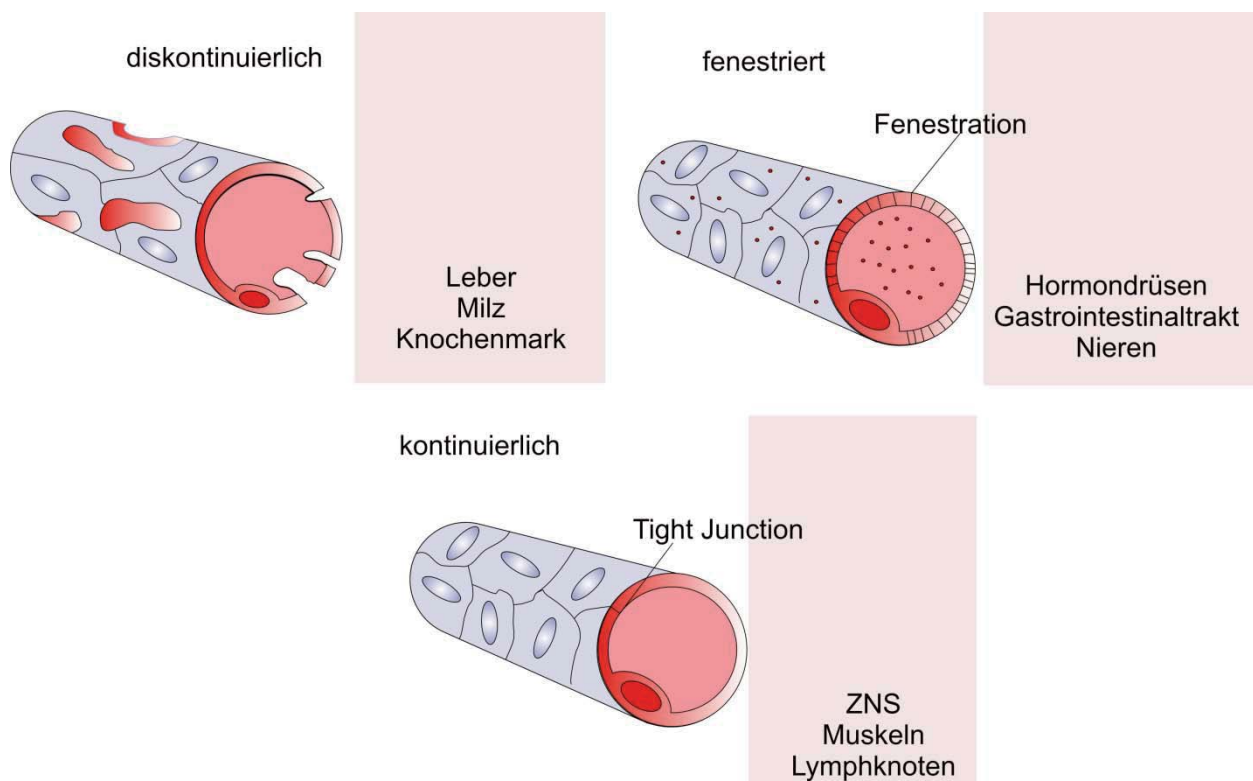


Abbildung 1: Die Blutgefäße unterscheiden sich je nach der Lokalisation im Körper in ihrer Permeabilität und Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Es wird zwischen (a) diskontinuierlichen, (b) fenestrierten und (c) kontinuierlichen Blutgefäßen unterschieden (modifiziert nach Hoffmann et al., 2014).^[21]



2.2.1 Blut-Hirn-Schranke

2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

Das Gehirn ist das zentrale Organ des ZNS und dient als Hauptintegrationsort für alle Prozesse, die in einem Organismus stattfinden. Etwa 20% aller metabolischen Vorgänge erfolgen im Gehirn.^[24] Folglich sind die Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase sowie dessen Schutz vor Toxinen und Entzündungen von enormer Bedeutung. Die BBB stellt eine dichte metabolische und biochemische Barriere des Gehirns dar, deren Aufgabe im selektiven Stofftransport zwischen der Blutzirkulation und dem umgebenden Nervengewebe besteht. Zum einen versorgt sie das Gehirn mit den wichtigen Nährstoffen und ist gleichzeitig für den Rücktransport von Abfallprodukten in das Blut zuständig. Zum anderen schützt sie das Gehirn vor Schwankungen der Ionenkonzentrationen, die z.B. infolge von Mahlzeiten oder körperlichen Anstrengungen zustande kommen und in der Lage sind, synaptische und axonale Wechselwirkungen zu stören.^[25] Des Weiteren grenzt sie die Neurotransmitter und neuroaktiven Moleküle des ZNS von denen der peripheren Organe und Blutströme ab, so dass gleiche Moleküle innerhalb eines Organismus in unterschiedlichen Konzentrationen und ohne Interaktion wirken können. Die BBB ist aus Endothelzellen und einer darunter liegenden, neurovaskulären Einheit aufgebaut. Die Letztere besteht aus Perizyten, Astrozyten, Neuronen, Oligodendroglia und Mikrogliazellen (Abbildung 2).^[26] Während die Neuronen an der Synapsen-Ausbildung und demzufolge an der Signalübertragung beteiligt sind, liegt die Hauptaufgabe der Gefäß- und Gliazellen in der Angiogenese, Remodellierung, Immunfunktion und Zwischenspeicherung von Ionen.^[27]

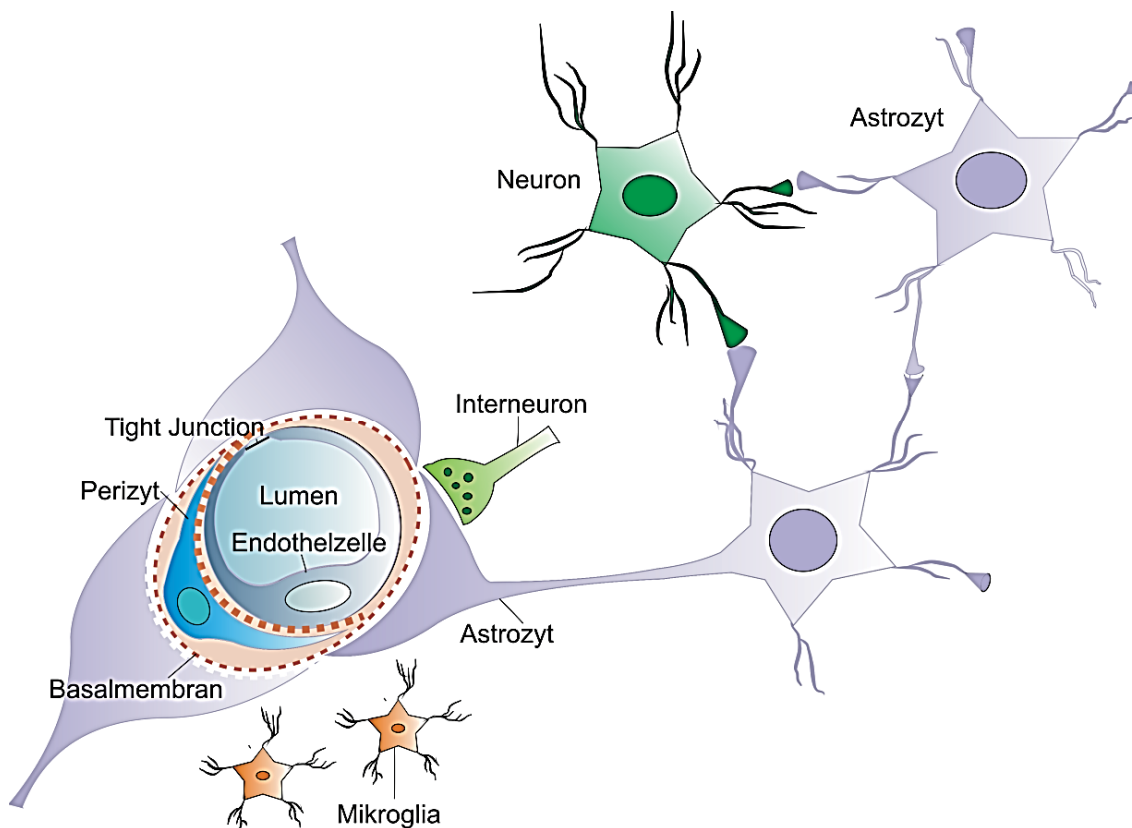


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der BBB. Die BBB besteht aus den Endothelzellen und der umgebenden neurovaskulären Einheit, die sich aus Perizyten, Astrozyten und Neuronen zusammensetzt (modifiziert nach Abbott et al., 2006).^[26]

2.2.1.2 Hirnendothel

Aufgrund der großen Oberfläche (ca. 20 m² pro 1,3 kg Gehirn) und einer kleinen Diffusionsstrecke zwischen den Neuronen und Kapillaren, repräsentiert das Hirnendothel eine sehr wichtige Komponente der BBB.^[26] Im Vergleich zu den peripheren Blutgefäßen sind die Hirnkapillaren durch eine geringe Pinozytose, Abwesenheit der Fenestration und asymmetrische Expression der Membrantransporter charakterisiert.^[28] Außerdem sind die Hirnkapillaren dank einem eng ineinander verflochtenen Netzwerk aus Tight Junctions und Adherens Junctions 50- bis 100-fach undurchlässiger im Vergleich zu peripheren Mikrogefäßen, in denen die Endothelzellen durch 50 nm große Gap Junctions voneinander getrennt werden (Abbildung 3).^[29, 30]

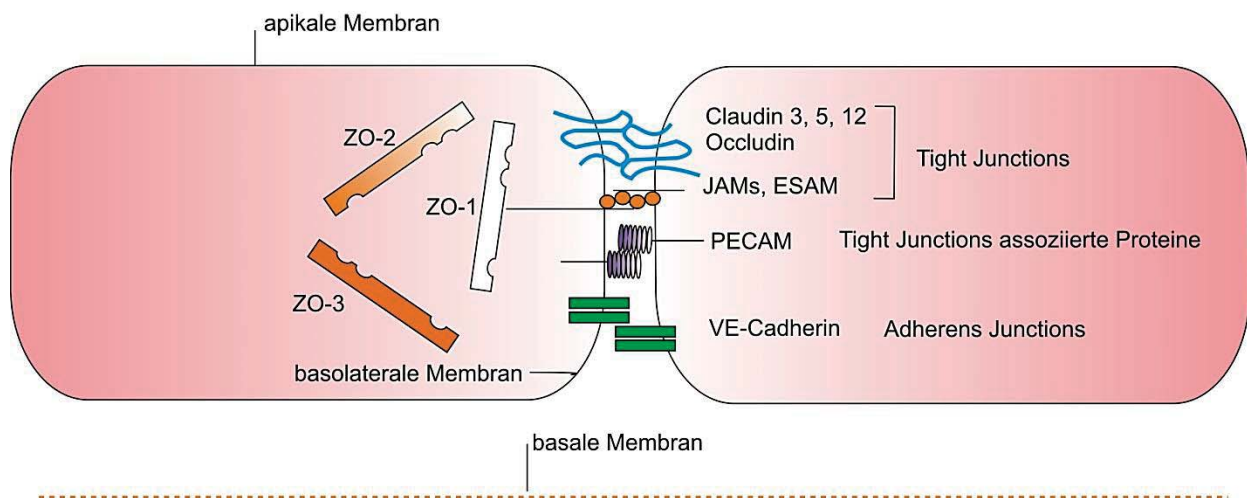


Abbildung 3: Molekulare Zusammensetzung endothelialer Tight Junctions: Zu den wichtigsten Komponenten der Tight Junctions gehören die Transmembranproteine Occludin und Claudin (-3, -5, -12). Weitere Transmembranproteine, die für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Tight Junctions verantwortlich sind, sind die junktionalen Adhäsionsmoleküle JAM (engl. junctional adhesion molecule) und die endothelialen selektiven Adhäsionsmoleküle ESAM (engl. endothelial selective adhesion molecule). Die Transmembranproteine bilden Kontakte zu den peripheren Proteinen, welche ihrerseits große Proteinkomplexe bilden. Die wichtigsten Bestandteile dieser Proteinkomplexe sind ZO-Proteine (engl. zonula occludens), die mit ihren zahlreichen Protein-Protein-Domänen als Adapterproteine dienen. VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin) gehört zu den bedeutendsten endothelialen Adhäsionsproteinen. PECAM-1 (engl. platelet/endothelial cell adhesion molecule) vermittelt die homophile Adhäsion zwischen den Zellen (modifiziert nach Abbott et al., 2006).^[26]

Auf diesem Weg kontrolliert das Hirnendothel die Permeabilität und reguliert den Transport durch die BBB. Nur manche kleinen lipophilen Moleküle, wie z.B. der medikamentös eingesetzte Stoff Barbiturat (Abbildung 5), und manche polaren Verbindungen, wie z.B. Ethanol, sind in der Lage die BBB passiv zu überwinden. Der Transport der restlichen Moleküle wird durch zahlreiche Rezeptoren gewährleistet. Beispielweise werden Insulin und Transferrin aktiv ins Hirngewebe aufgenommen. Aber auch essentielle Moleküle, wie z.B. Glukose und Aminosäuren, unterliegen dem aktiven Transport. Die Aufnahme von Peptiden und Lipoproteinen findet über adsorptive Transzytose statt (Abbildung 4).

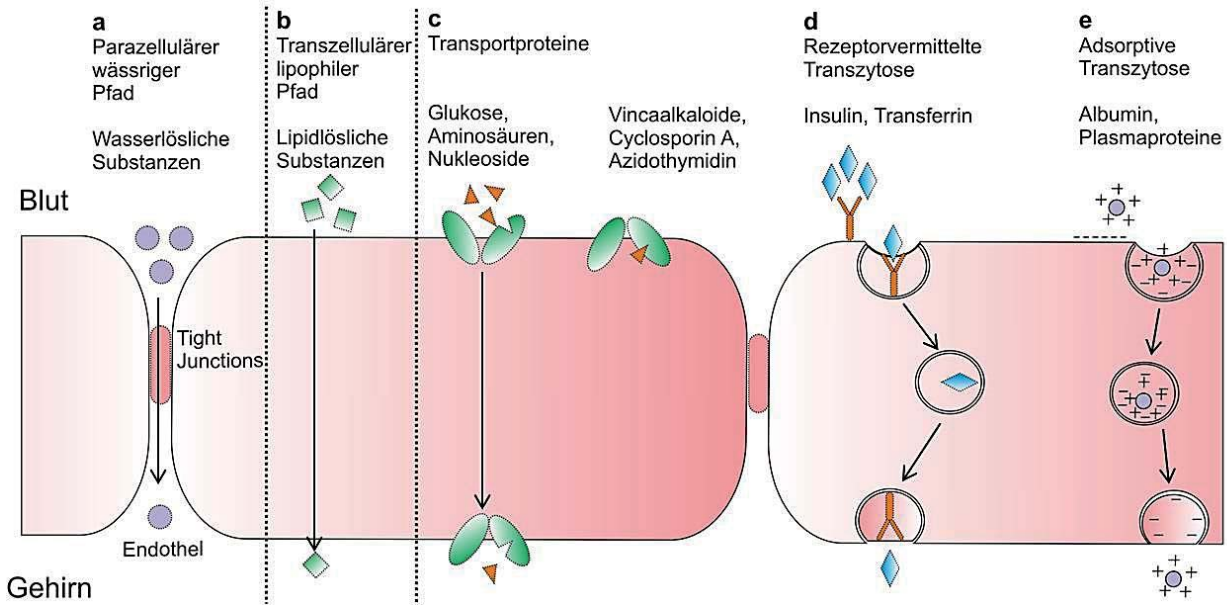


Abbildung 4: Molekültransport entlang der Endothelzellen der BBB. (a) Die Tight Junctions verhindern den Transport von wasserlöslichen Substanzen und polaren Medikamenten. (b) Lipidlösliche Substanzen können hingegen aufgrund der großen aktiven endothelialen Oberfläche die Zellmembran passieren. (c) Die Transportproteine können Moleküle wie Glukose, Aminosäuren, Nucleinbasen, Nucleoside und Cholin durch die Zellmembran befördern. Einige solcher Transportproteine sind energieabhängig und fungieren als Efflux-Pumpen, wie z.B. das P-Glykoprotein (P-gp). (d) Spezifische Proteine, wie z.B. Insulin und Transferrin, werden mit Hilfe von Rezeptorvermittelter Transzytose oder Endozytose transportiert. (e) Große Plasmaproteine werden in der Regel nicht durch die Membranen transportiert. Allerdings kann die Kationisierung dieser Moleküle zur einer adsorptionsvermittelten Transzytose oder Endozytose führen (modifiziert nach Abbott et al., 1996).^[31]

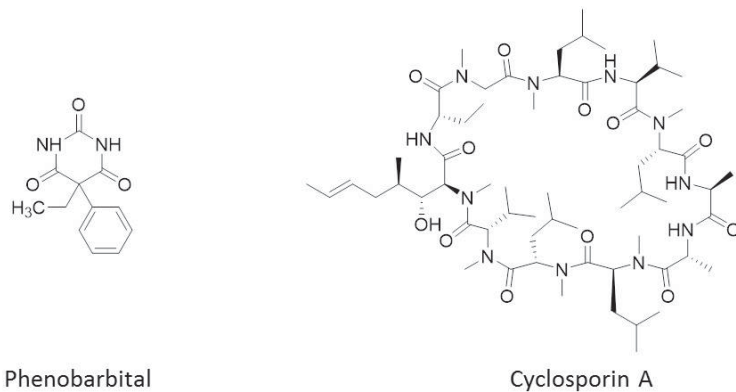


Abbildung 5: Beispiel der Substanzen, welche die BBB passiv überwinden (Phenobarbital) und nicht kreuzen (Cyclosporin A).

Bemerkenswert ist ebenfalls, dass manche aufgenommenen Moleküle durch eine spezielle Rezeptorklasse namens ABC Transporter (engl. adenosine triphosphate-binding cassette transporter), auch Efflux-Pumpen genannten, zurück in den Blutkreislauf ausgeschleust werden können (Abbildung 7).^[32] In Kombination mit den Phase II Enzymen und Cytochrom P450 schützen diese Efflux-Pumpen das ZNS vor dem Einfluss schädlicher wasser- und fettlöslicher Substanzen. Gleichzeitig ist diese starke Barriereintegrität eine Ursache für die Resistenz gegen Wirkstoffe. Folglich stellt die BBB ein großes Hindernis für die medikamentöse Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer, Epilepsie und Hirntumoren, dar.^[33]

In der Literatur wird die Barriereintegrität des Endothels oft als TEER (engl. transendothelial electrical resistance) Wert angegeben, welcher den elektrischen Widerstand des Zelllayers beschreibt. Der TEER Wert der BBB beträgt *in vivo* ca. $1800 \Omega \text{ cm}^2$.^[34, 35]

2.2.1.3 Astrozyten

Es gibt viele *in vitro* und *in vivo* Indizien, dass Astrozyten eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Barriere-Funktion innerhalb des Hirnendothels spielen.^[36, 37] Astrozyten sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Ionen, Aminosäuren, Neurotransmittern und Wasser verantwortlich.^[26] Die Morphologie der Astrozyten umfasst elf verschiedene Typen, abhängig von der Lokalisation im Körper und der Interaktionen mit anderen Zellen. Dabei bilden acht Astrozyten-Typen einen direkten Kontakt zu Blutgefäßen.^[38] Die Kommunikation zwischen BBB und Astrozyten erfolgt über einen langen Fortsatz des Astrozyten-Zellkörpers, das Astrozyten-Endfüßchen. Zahlreiche *in vitro* Experimente zeigten, dass diese Zellen einen Einfluss auf verstärkte Ausbildung von Tight Junctions sowie die Expression und Lokalisation von Membrantransportern (P-gp und Glut1 (engl. Glucose transporter 1)) und Enzymsystemen haben.^[39-42] Die Kokultur von Endothelzellen und Astrozyten führte zu einem höheren TEER Wert und zu einer verringerten Barriere-Permeabilität.^[43-45] Außerdem sind sie für eine richtige Anordnung der Endothelzellen und Perizyten in röhrenförmige Strukturen *in vitro* verantwortlich, was auf ein Zusammenspiel dieser drei Zelltypen hindeutet.^[46] Des Weiteren bilden diese Zellen einen Verknüpfungspunkt zwischen der BBB und den Neuronen. Umgekehrt üben Endothelzellen ebenfalls eine Wirkung auf das Wachstum und die Differenzierung der Astrozyten aus. Die Untersuchungen an der BBB beweisen, dass Endothelzellen Mediatoren, wie z.B. den Leukämieinhibitionsfaktor (LIF), sekretieren, die die Ausdifferenzierung der Astrozyten induzieren.^[47] Die Kokultur dieser Zellen führt zur Hochregulierung von antioxidativen Enzymen in beiden Zelltypen.^[48]

2.2.1.4 Perizyten

Perizyten sind murale Zellen und sitzen direkt neben den Endothelzellen.^[49] Die beiden Zelltypen teilen sich eine gemeinsame Basalmembran, wobei die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Perizyten über Tight Junctions, Gap Junctions und Adhäsionskontakte an basalmembran-freien Stellen stattfindet. Diese Stellen werden als „peg-socket“ Kontakte bezeichnet und sind durch die Membraneinstülpung der beiden Zellen charakterisiert.^[50-52] Perizyten des ZNS sind flach, langgestreckt und haben dank multipler zytoplasmatischer Ausstülpungen eine sternartige Morphologie. Auf diese Art schließen sie Blutgefäße ein und bedecken eine große abluminale Fläche.^[49] Das quantitative Verhältnis zwischen den Endothelzellen und Perizyten variiert sehr stark innerhalb des Körpers: es beträgt 1:100 in Skelettmuskeln und kann 1:1 in der Retina sein.^[53] Ein Perizyt innerhalb der BBB umgibt zwischen drei bis vier Endothelzellen und kann demzufolge der Informationsübertragung zwischen diesen Zellen dienen.^[49, 54]

Obwohl zahlreiche Publikationen belegen, dass Astrozyten eine große Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barriere-Funktion der BBB spielen, konnten *in vitro* Kokultur-Modelle aus Endothelzellen und Astrozyten bisher keine physiologischen TEER Werte reproduzieren.^[55-58] Die BBB ist ein komplexes System und besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, die miteinander über verschiedene Wege interagieren. Dazu zählen sowohl direkte Zell-Zell-Kontakte als auch Interaktion über andere Zellen, elektrische Signalübertragung, mechanische Kräfte oder parakrine Stoffsekretion.^[59]



Laut Literatur können Perizyten ebenfalls einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung und Aufrechterhaltung der BBB haben.^[44, 49, 56, 60, 61]

2.2.1.5 Efflux-Pumpen

Die Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase, eine der wichtigsten Aufgaben der BBB, wird unter anderem durch bestimmte Efflux-Pumpen kontrolliert. Zu den bedeutendsten dieser Efflux-Pumpen gehört die Gruppe der ABC Transporter. Sie schützen das Gehirn vor den eingedrungenen lipophilen Substanzen, toxischen Metaboliten, Bakterien und Xenobiotika, indem sie sie aus dem Gehirn zurück in den Blutkreislauf transportieren.^[61] Die ABC Transporter sind aus mehreren Domänen bestehende, integrale Proteine und werden hauptsächlich auf der luminalen Membranseite der Endothelzellen exprimiert. Sie nutzen die Energie der ATP-Hydrolyse, um eine Konformationsänderung zu durchlaufen und auf diese Weise den Stofftransport durchzuführen.^[62] Sie stellen eine hochkonservierte Super-Proteinfamilie dar und werden in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren exprimiert. Weiterhin sind sie für viele bekannte biomedizinische Phänomene verantwortlich, wie etwa die Resistenz von Krebszellen oder krankheitserregenden Bakterien gegen medikamentöse Behandlung.^[63] Bisher konnten über 200 verschiedene Proteine innerhalb der ABC Superfamilie identifiziert werden, davon wurden 48 im Menschen nachgewiesen.^[64]

Momentan gehört das P-gp, auch ABCB1 (engl. ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1) genannt, zu den am besten charakterisierten Proteinen dieser Gruppe. Es handelt sich um eine 170 kDa große, membrangebundene Efflux-Pumpe und eine wichtige selektive Komponente der BBB.^[65, 66] Es wird vom Gen MDR1 kodiert.^[67, 68] Die Entdeckung von P-gp geht auf die Untersuchung von Krebszellen Anfang der 60er Jahre zurück, wo die Überexpression dieses Proteins zu einer Multiresistenz der Zellen führte.^[69] Eine beachtliche Anzahl an Stoffen gehört zu den von P-gp transportierten Substraten, wie z.B. organische Kationen, schwache organische Basen, einige organische Anionen und ungeladene Moleküle. Des Weiteren werden auch einige Medikamente von P-gp aus dem Gehirn zurück ins Blut befördert, wie z.B. Chemotherapeutika, Immunsuppressiva, Antibiotika, anti-HIV-Medikamente, Opioide und Kalzium-Kanal-Blocker (Abbildung 6).^[30] Daher repräsentiert diese Efflux-Pumpe ein großes Hindernis in der Behandlung von ZNS Krankheiten, wie etwa Gehirntumoren.^[70, 71]

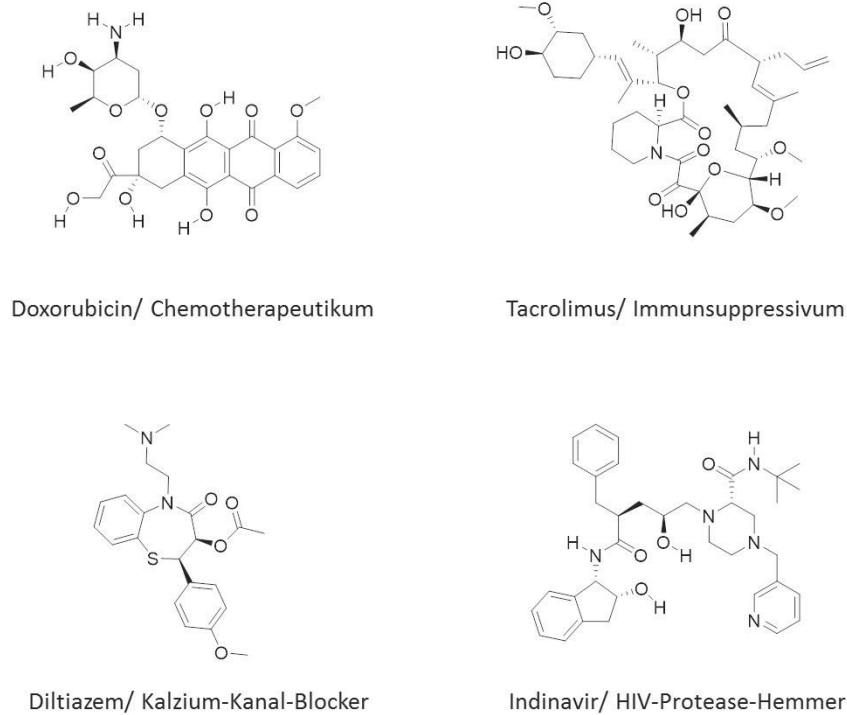


Abbildung 6: Medikamentös eingesetzte Substrate von P-gp.

Folglich ist das P-gp von großem Interesse als ein potenzielles Ziel für den Medikamententransport ins ZNS. Die Verabreichung von Wirkstoffen in Kombination mit P-gp-Inhibitoren wird als eine neuartige Methode in der Forschung eingesetzt und kann zu einer erhöhten Penetration der BBB und somit zu einer höheren Anreicherung des Wirkstoffs im Hirngewebe führen. Weitere Mitglieder der ABC Transporter sind die MRPs (engl. multidrug resistance proteins) und das BCRP (engl. breast cancer resistance protein) (Abbildung 7).^[30] Während BCRP ebenfalls auf der luminalen Seite der mikrovaskulären Endothelzellen vorzufinden ist, bleiben die Lokalisation und Funktion von MRPs unbestimmt.^[72] Dies liegt zum größten Teil an der Abwesenheit spezifischer Antikörper zum Nachweis dieser Proteine aber auch an den zahlreichen Spezies-spezifischen Unterschieden.^[73] Bisher konnten im Menschen nur drei Isoformen, MRP1, MRP4 und MRP5, nachgewiesen werden.^[74, 75]

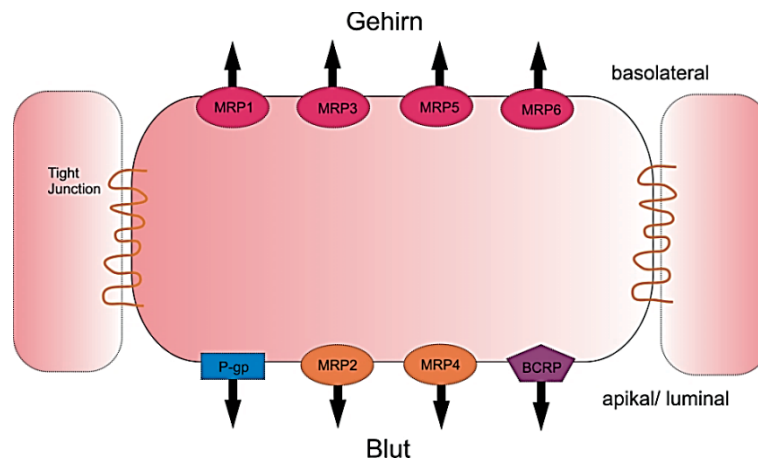


Abbildung 7: Lokalisation und Funktion von ABC Transportern (modifiziert nach Loscher et al., 2005).^[62]



2.2.1.6 Scherkräfte

Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung verschiedener Faktoren der Mikroumgebung auf die Ausbildung und die Aufrechterhaltung des korrekten Phänotyps des Hirnendothels.^[4] Neben den oben beschriebenen Einflüssen, wie Zell-Zell-Interaktionen mit den Gliazellen und Perizyten, spielt der Scherstress eine bedeutende Rolle.^[28, 76, 77] Der Scherstress wird aufgrund des in den Blutgefäßen strömenden Bluts erzeugt und wirkt konstant auf das Endothel.^[78] Dabei beeinflusst er unter anderem die Zellmorphologie: die unter mikrofluidischen Bedingungen kultivierten Zellen weisen im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen ein höheres Zellvolumen auf, haben eine flachere Form, richten sich in Richtung des angelegten Flusses aus und sind durch eine erhöhte Anzahl an Mikrofilamenten sowie Clathrin umhüllten und endozytotischen Vesikeln gekennzeichnet.^[79-81] Außerdem wurden viele Unterschiede in Funktion und Physiologie der Zellen berichtet.^[82-84] Aufgrund der vielen Mechanosensoren auf der Oberfläche von Endothelzellen, wie z.B. Ionenkanälen, Integrinen, G-Proteinen oder Caveolae, können die vom Scherstress erzeugten, physikalischen Signale in biochemische Signale umgewandelt werden.^[85-88] Diese Signale führen zur Aktivierung von Signalwegen, wie etwa dem MAP-Kinase-Weg (engl. mitogen-activated protein) oder PKB/Akt (engl. protein kinase B), die ihrerseits zelluläre Vorgänge, wie z.B. Apoptose, Proliferation, Inflammation, Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts und Energiestoffwechsel, regulieren.^[89-93] Des Weiteren wird hiervon die Expression von Tight Junctions (ZO-1, Occludin) und von Efflux-Pumpen (P-gp) angeregt, was eine wichtige Rolle beim Erhalt der Barriereintegrität der BBB spielt (Abbildung 8).^[92, 94, 95] Gemäß der Literatur findet außerdem der Influx von Ca^{2+} Ionen aus dem extrazellulären Raum oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) statt.^[96, 97]

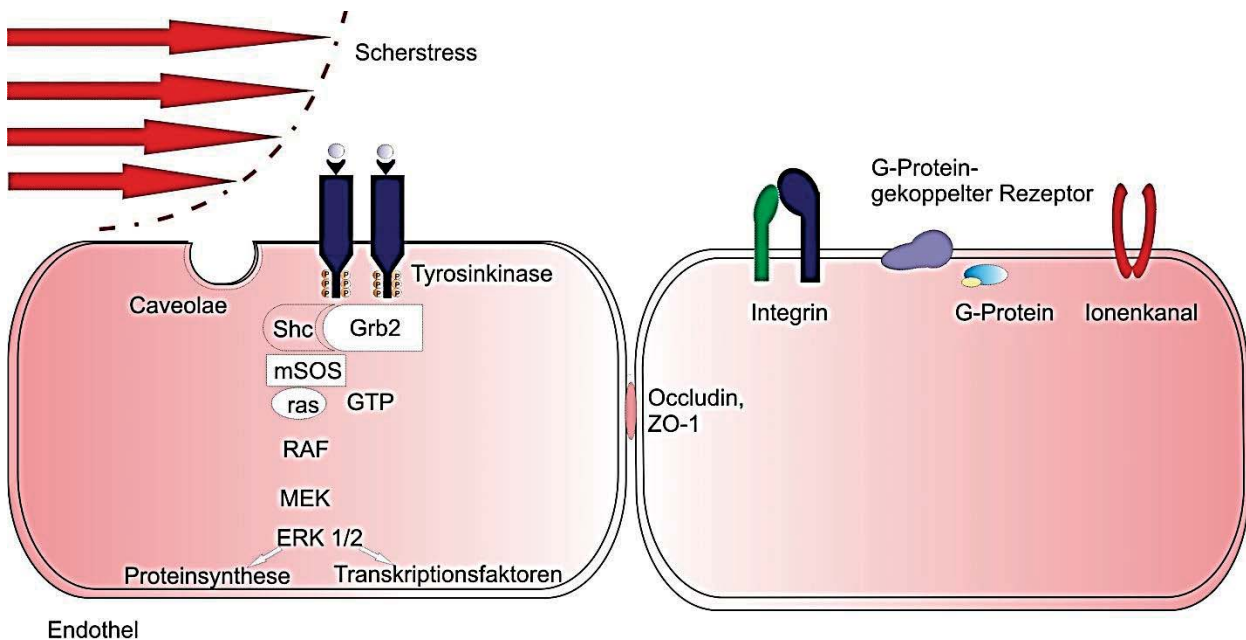


Abbildung 8: Schematische Übersicht der Scherstress-induzierten, funktionalen und physiologischen Änderungen im Endothel. Endothelzellen verfügen über eine Vielzahl an Sensoren (G-Proteine, Integrine, Ionenkanäle), welche in der Lage sind, die vom Scherstress erzeugten, physikalischen Signale in biochemische Signale umzuwandeln. Letztere führen zur Aktivierung von Signalkaskaden wie z.B. MAP-Kinase-Weg: Grb2 (engl. growth factor receptor-bound protein 2)/mSOS (engl. son of sevenless) → ras plus GTP (Guanosintriphosphat) → RAF → MEK → ERK1/2 (engl. extracellular-signal regulated kinases). Dieser Vorgang kann zu Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung durch die Aktivierung von Proteinsynthesen und bestimmter Transkriptionsfaktoren führen (modifiziert nach Palmiotti et al., 2014).^[4]

2.2.1.7 *In vitro* Rekonstruktion der BBB

Die geringe Durchlässigkeit des Hirndothels und der damit verbundene, eingeschränkte Transport von Molekülen durch die BBB stellen eine große Herausforderung für Mediziner und Pharmaunternehmen dar. So wurden z.B. in den letzten Jahren viele Antikörper-basierende Therapien zur Heilung von Alzheimer entwickelt, bei denen aber nur 0,1 - 0,2% aller getesteten Antikörper ins Hirngewebe aufgenommen werden konnten und somit eine Wirkung gezeigt haben.^[98] Die Erfindung neuer, effektiver Strategien zum Transport von großen Molekülen durch die BBB könnte den Fortschritt in der Erforschung von neurologischen und psychiatrischen Krankheiten beschleunigen.^[99] Die Generierung neuer Systeme zur Untersuchung der Funktion und Eigenschaften der BBB sind somit für die pharmazeutische Forschung von enormer Bedeutung.

Die meisten zurzeit existierenden *in vitro* BBB Modelle basieren auf einer 2D-Anordnung von Zellen in Transwell-Systemen. Diese Transwell-Systeme repräsentieren eine durch einen Insert in zwei Kompartimente unterteilte Kammer. Die Grundlage für das Insert bildet eine poröse Membran, auf der Zellen als Monolayer kultiviert werden. Eine Kokultur ist durch die Aussaat von Zellen auf dem Boden des unteren Kompartiments oder auf der Unterseite der Membran möglich. Meistens stellt das obere Kompartiment das Innere des Blutgefäßes und das untere Kompartiment das Hirngewebe dar. Viele solcher Systeme haben sehr gute Erkenntnisse auf dem Gebiet der BBB Forschung geliefert. Auch die Untersuchung der Barriereintegrität, wie etwa durch die Messung des TEER Wertes oder der Permeabilität von Molekülen, ergab eine gute Übereinstimmung mit den physiologischen Werten.^[44, 56, 100, 101]

Auch unter „Organs-on-Chips“ wurden in den letzten Jahren einige wenige Modelle zur Rekonstruktion der BBB präsentiert.^[27, 43, 102-104] Ähnlich den Transwell-Systemen, beruhen diese Modelle auf einer Anordnung aus zwei Kompartimenten, getrennt durch eine poröse Membran. Ein klarer Vorteil dieser Systeme liegt in der Anwendung von Mikrofluidik. Denn im Gegensatz zu statischen Modellen spiegeln mikrofluidische Systeme eher die *in vivo* Situation wider.^[79, 80, 105] Die Scherkräfte, die aufgrund der Flussströme an die Zellwände angreifen, beeinflussen die Erhöhung des Zellvolumens durch die Anreicherung an Mikrofilamenten sowie Clathrin- und anderer endozytotischen Vesikeln. Außerdem ist in solchen Systemen die Anwendung von eingebauten Elektroden zur Messung von TEER Werten über eine längere Zeitspanne möglich.^[43, 102] Jedoch weisen diese Modelle rechteckige Querschnitte auf und somit wachsen die darauf kultivierten Zellen auf planaren Oberflächen, was nicht den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Die Bedeutung der Dreidimensionalität auf die korrekte Ausbildung des Zytoskeletts und der Adhäsionskontakte wurde bereits bewiesen und in der Literatur beschrieben.^[106-108] Die Endothelzellen auf gekrümmten Oberflächen haben im Gegensatz zu statisch kultivierten Zellen eine verringerte Anzahl an Aktinbündeln und Fokalkontakten, welche sich in Kanalrichtung orientieren.^[108] Zudem wurden nur in wenigen „Organs-on-Chips“ Perizyten inkorporiert. Lediglich ein mikrofluidisches Modell der BBB zeigte eine Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten.^[109] Des Weiteren wurden ausschließlich in einer Studie Zellen menschlichen Ursprungs benutzt.^[102]

Trotz zahlreicher Vorteile von „Organs-on-Chips“ wurde bisher kein realistisches BBB-Modell, bestehend aus Zellen menschlichen Ursprungs mit einer korrekten Nachahmung der BBB-Morphologie, entwickelt. Aufgrund der Interaktionen einzelner Zelltypen der BBB untereinander ist es von enormer Bedeutung, diese physiologischen Gegebenheiten naturgetreu in mikrofluidischen „Organs-on-Chips“ nachzubilden.



2.2.2 Darm

Neben der BBB sind im menschlichen Körper zahlreiche andere biologische Barrieren vorhanden, wie z.B. das adsorbierende und weniger dichte Darmepithel. Das humane intestinale Epithel bildet eine Einzelschicht, die aus fragilen, hochprismatischen Epithelzellen besteht und durch eine genau definierte Organisation gekennzeichnet ist: Es bildet 2D-Einstülpungen, die sich aus teilungsfähigen Krypten und ausdifferenzierten Zotten zusammensetzen (Abbildung 9). Aufgrund der Ausbildung dieser Faltungen und des Besatzes der Epithelzellen mit Mikrovilli, kommt es zu einer erheblichen Vergrößerung der Darmoberfläche, wodurch ein effizienter Nährstofftransport aus dem Darmlumen gewährleistet wird.^[110, 111] Des Weiteren ist das Epithel des Gastrointestinaltraktes durch eine stark ausgeprägte Polarität gekennzeichnet. Neue Zellen wandern nach Ihrer Entstehung aus Stammzellen in der Darmkrypte Richtung Darmzottenspitze, wo sie ihre spezifische Funktion ausüben und nach fünf bis sieben Tagen vom Gewebe abgestoßen und durch andere Darmzellen ausgetauscht werden.^[112] Diese Zellerneuerung findet infolge der Stammzellen-Proliferation statt, wobei die Stammzellen im Dünndarm in der Kryptenbasis lokalisiert sind. Der Dünndarm ist der längste Teil des menschlichen Gastrointestinaltraktes, welcher sich zwischen Magen und Dickdarm befindet.^[113] Über die Anzahl der an der Erneuerung des Darmepithels beteiligten Stammzellen wird in der Literatur oft diskutiert. Dennoch basieren viele Hypothesen auf der Existenz von vier bis sechs Zellen pro Krypte, welche nach den Paneth-Zellen die vierte Zellposition in der Darmkrypte besetzen.^[111, 114, 115] Die Abkömmlinge dieser Stammzellen können sich in potenzielle klonogene Zellen (PSC, engl. potential clonogenic stem cells) entwickeln, die ebenfalls eine gute regenerative Fähigkeit aufweisen, diese jedoch mit jeder weiteren Teilung verlieren. Die Teilung der dritten potenziellen klonogenen Tochtergeneration führt zum kompletten Verlust der Stammzeleigenschaften und zur Entstehung der proliferierenden Transitzellen (DTC, engl. dividing transit cells). Letztendlich differenzieren diese DTC in vier funktionelle Zelltypen aus: Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth-Zellen.^[111] Enterozyten sind prädominant und für die Bildung von Hydrolasen und die Absorption von Nährstoffen verantwortlich. Die anderen drei Zellgruppen gehören zu den sekretorischen Zellen. Becherzellen sekretieren abwehrende Mucine, während enteroendokrine Zellen Sekretin, Substanz P bzw. Serotonine bilden und mit 1% die kleinste Zellpopulation im Dünndarm darstellen.^[110, 116, 117] Paneth-Zellen sitzen in der Kryptenbasis, wo sie antimikrobielle Substanzen, wie z.B. Cryptidine, Defensine und Lysozyme, zum Schutz der Stammzellen sekretieren.^[118, 119]

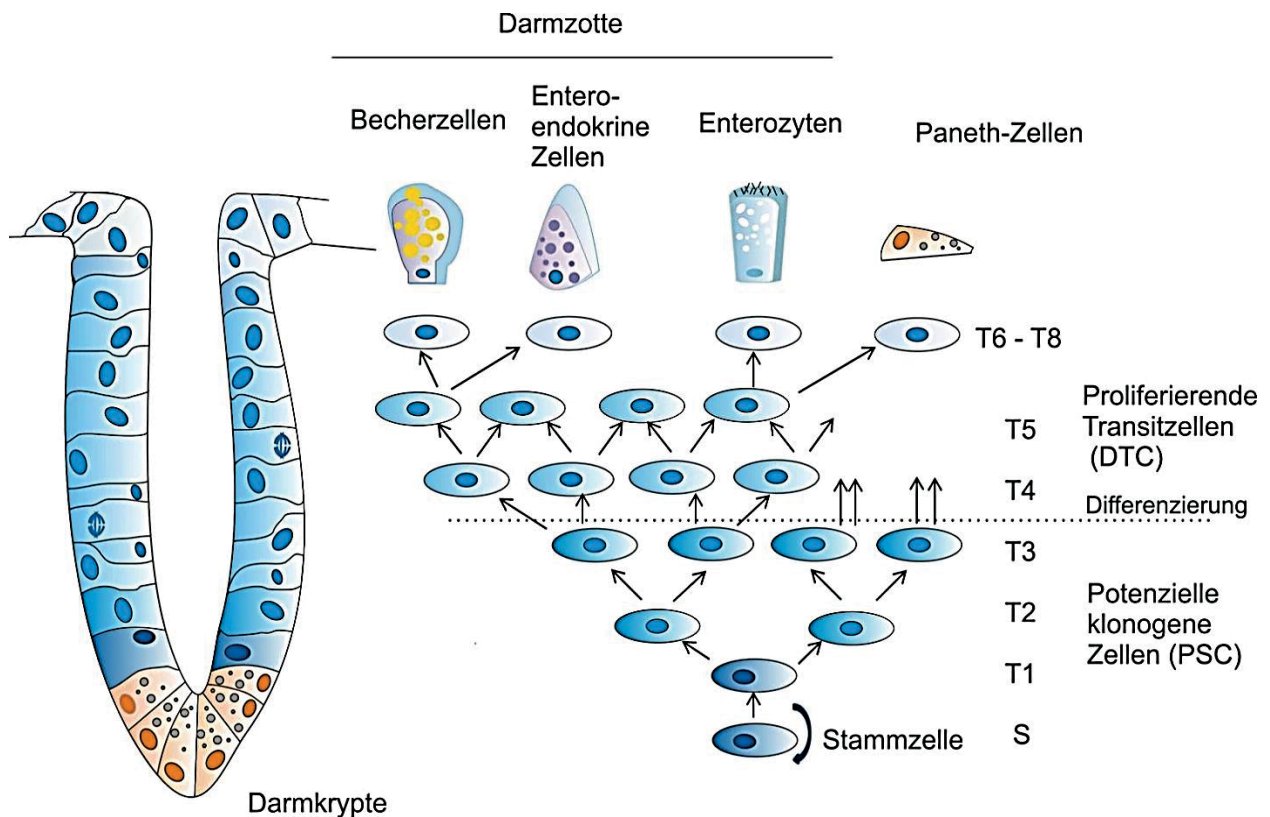


Abbildung 9: Anatomischer Aufbau des Dünndarmepithels. Der Dünndarm ist in Krypten und Zotten aufgebaut. Die Stammzellen (S) sitzen an der vierten Position in der Darmkrypte (links). Die Abkömmlinge der Stammzellen entwickeln sich zu PSC (potenziellen klonogenen Zellen), welche mit jeder Tochtergeneration (T) ihre Stammzell-Funktion verlieren. Ab der dritten Tochtergeneration zählen diese Zellen zu DTC (proliferierenden Transitzellen), die schließlich zu Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen und Paneth-Zellen ausdifferenzieren (modifiziert nach Marshman et al., 2002 und Radtke et al., 2005).^[110, 111]

Aufgrund der schützenden Funktion des Darmepithels, wie etwa dem Schutz vor dem Eintritt schädlicher Stoffe und Krankheitserregern, stellt diese Barriere eine Herausforderung in der Medikamentenverabreichung dar. Gleichzeitig verbleibt die Applikation von Arzneimitteln durch den Gastrointestinaltrakt als die meist angewandte Methode, da sie zum einen durch ihre Bequemlichkeit der Verabreichung und zum anderen durch die hohe Absorption von vielen Wirkstoffkomponenten über das Darmepithel und gute Konzentrations-Zeit-Profile charakterisiert ist.^[120] Aus diesen Gründen besteht ein sehr großes Interesse daran *in vitro* Darmschleimhaut-Modelle zu etablieren, um die Absorption, die Verteilung, den Metabolismus und die Ausscheidung von Medikamenten zu untersuchen. Dabei wird heutzutage sehr oft die humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie Caco-2 für die Nachbildung des humanen Darmtraktes eingesetzt.^[121-123] Diese von Fogh et al. im Jahr 1977 aus menschlichem Dickdarm isolierte Zelllinie besitzt das Merkmal, sich spontan in andere Zelltypen, wie z.B. Enterozyten, auszudifferenzieren.^[124-127] Dabei bilden Caco-2 Zellen innerhalb von 15 bis 20 Tagen einen konfluenten Monolayer aus polarisierten, säulenförmigen Zellen, die Tight Junctions exprimieren.^[120, 123] Des Weiteren besitzen Caco-2 Zellen auf ihrer apikalen Zellseite zahlreiche Mikrovilli und exprimieren die für den Dünndarm charakteristischen Mikrovillus-Hydrolasen und Nährstofftransporter, weshalb diese Zellen sehr häufig für die Untersuchung des Wirkstofftransports und Metabolismus verwendet werden.^[128-131]



2.2.3 Leber

Die Leber ist nach der Haut das zweitgrößte menschliche Organ und ist im Vergleich zu der BBB und der Darmschleimhaut die am meisten durchlässige biologische Barriere. Sie befindet sich im rechten Oberbauch direkt unterhalb des Zwerchfells.^[132] Zwei große Lappen, der rechte (Lobus hepatis dexter) und der linke Leberlappen (Lobus hepatis sinister) sowie zwei kleinere Lappen, der Lobus kaudatus und der Lobus quadratus, sind die Bestandteile der Leber.^[133] Diese Leberlappen sind wiederum in nahezu sechseckige Leberläppchen unterteilt, die durch Bindegewebszüge voneinander getrennt sind.^[134] An den Stellen, an denen diese Leberläppchen miteinander überlappen, verlaufen die Äste der Pfortader (Abbildung 10).^[135] Die Leberläppchen bestehen aus Leberzellen und einem intrahepatischen Gefäßsystem sowie den kleinen dünnwandigen Blutgefäßen, den Sinusoiden.^[136] Den Hauptanteil an Leberzellen (60 - 65%) bilden die Hepatozyten, polarisierte, sekretorische Epithelzellen. Der Raum zwischen den Lebersinusoiden und den Hepatozyten wird als Disséscher Raum bezeichnet und ist nach dem deutschen Wissenschaftler Joseph Dissé benannt.^[137] Die Tight Junctions zwischen benachbarten Hepatozyten bilden Gallenkanälchen, auch Canaliculi genannt. Sie dienen als Auffangbehälter für die durch Transmembrantransport abgegebene Galle aus Hepatozyten und sind mit dem Gallengang der Lebertrias verbunden. Die basolateralen Seiten der Hepatozyten grenzen an die sinusoidalen Endothelzellen, was die Abgabe von Stoffen aus Hepatozyten ins Blut erleichtert.^[138] Die Wände der Sinusoide bestehen aus Endothel-, Kupfer-, Stern- und Pit Zellen. Während die Kupfer-Zellen an den Endothelzellen im Lumen der Sinusoiden haften und zusammen mit den Pit Zellen bei der Immunabwehr eine Rolle spielen, befinden sich die Sternzellen im Disséschen Raum und sind für die Produktion extrazellulärer Matrix verantwortlich. In geringer Anzahl sind in der Leber zudem die Cholangiozyten und Oval Cells vertreten. Während die Ersten an der Ausbildung der Gallengänge beteiligt sind, stellen die Letzteren bipotente, adulte Vorläufer- oder Stammzellen der Leberzellen dar.^[134, 139] Die Blutversorgung der Leber erfolgt sowohl durch die Pfortader, als auch die Leberarterie. Das venöse Blut aus Bauchspeicheldrüse, Darm und Milz wird über die Pfortader zur Leber transportiert, die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt über die Leberarterie.^[138]

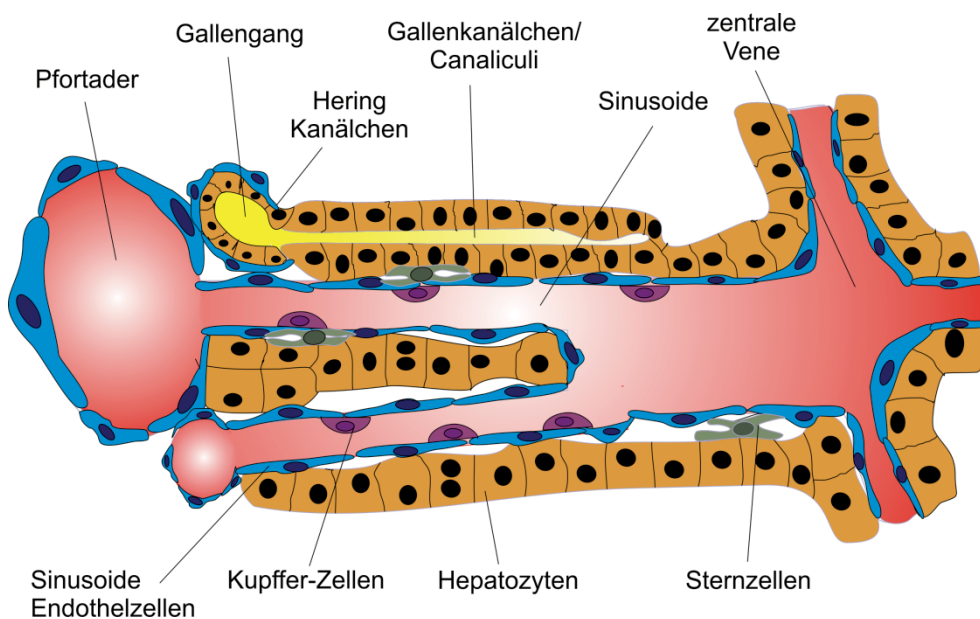


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der Leber (modifiziert nach Tanaka et al., 2011).^[140]

Zu den Aufgaben der Leber zählt die Homöostase, die Aufrechterhaltung des Konzentrationsgleichgewichts verschiedener Stoffe im Blutplasma, was die konstante Versorgung der umgebenden Gewebe sicherstellt. Außerdem ist die Leber an verschiedenen Stoffwechselfvorgängen beteiligt: Sie spielt eine wichtige Rolle beim Kohlenhydrat-, Lipid-, Protein- und Aminosäurestoffwechsel. Des Weiteren dient sie als Speicher für Energiebaustoffe, Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine (vor allem Vitamin A). Darüber hinaus ist die Leber ein wichtiges Entgiftungsorgan: Durch die Biotransformation werden regelmäßig giftige Substanzen, die z.B. durch den Phase-I-Metabolismus anfallen, durch den Phase-II-Metabolismus unschädlich gemacht.

2.2.3.1 Stammzellen der Leber

Der Beginn der Leber-Organogenese einer Maus findet am Embryonaltag (E) 8.5 infolge der Signale des kardialen Mesoderms statt. Als Folge entwickelt sich das Leberdivertikel aus dem Endoderm des Vorderdarms.^[138, 141] Die Teilung der Endodermzellen bewirkt deren Einwanderung in das Septum Transversum Mesenchym (STM). Während das fetale Leberparenchym hauptsächlich aus Hepatoblasten, den fetalen Leber-Stammzellen, besteht, machen die Hepatozyten und biliäre Epithelzellen (BECs) den Hauptanteil an Zellen der postnatalen bzw. adulten Leber aus.^[142] Dabei gibt es in der adulten Leber ebenfalls Stammzellen, die in den Hering Kanälchen lokalisiert sind.^[143-145] Diese Zellen besitzen ein hohes Zellkern/Zytoplasma Verhältnis und werden aufgrund ihres ovalen Aussehens als Oval Cells bezeichnet.^[146] Außerdem können Hepatozyten infolge einer Leberverletzung zu Cholangiozyten ausdifferenzieren und besitzen demzufolge, zumindest während der neonatalen Phase, einen Stammzellcharakter. Die Leber besitzt eine hohe Regenerationskapazität: Selbst nach einer 70%igen Hepatektomie findet eine vollständige Wiederherstellung der ursprünglichen Organmasse durch die Vermehrung der Hepatozyten statt. Dennoch müssen infolge bestimmter Verletzungen, die zur Störung der Hepatozyten-Proliferation führen, Oval Cells aktiviert werden, welche als adulte Leber-Stammzellen ebenfalls zur Regeneration beitragen können.^[138, 147]

3. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren *in vitro*. Hierzu sollte der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor parallel zu der Etablierung und Validierung des Endothels mit verschiedenen organotypischen Kulturen versehen werden, da diese die biologischen Barrieren charakterisieren und zu deren Bildung beitragen. Drei Barrieren wurden ausgesucht: die Blut-Hirn-Schranke (BBB), das Darmepithel und die Leber. Alle Modelle sollten etabliert und gegenüber 2D-Modellen und den natürlichen Barrieren *in vivo* charakterisiert werden.

Die Verknüpfung aller drei Modelle zur Untersuchung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik neuer synthetisierter Substanzen zur anschließenden Identifizierung potenzieller Wirkstoffe kann in weiterführenden Studien zukünftig realisiert werden.

4. Ergebnisse

4.1 Aufbau des $\mu 3DVasc$ Biorektors

Obwohl „Organs-on-Chips“ eine Innovation auf dem Gebiet des Tissue Engineerings darstellen, gibt es auch in diesem Bereich einige Nachteile. So bestehen die meisten Chips aus zwei aufeinander liegenden, viereckigen Kompartimenten, die durch eine dünne Folie, meistens aus Polycarbonat (PC) oder PDMS (Polydimethylsiloxan), voneinander getrennt werden. Huh et al. (2012) haben beispielweise ein Lungenmodell vorgestellt, bei dem Epithel- und Endothelzellen auf gegenüberliegenden Seiten einer porösen PDMS-Membran unter mikrofluidischen Bedingungen kultiviert wurden und dabei physiologisch korrekte Reaktionen auf die Behandlung mit Cytokinen und Bakterien zeigten.^[148] Nichtsdestotrotz wurde das artifizielle Blutgefäßsystem durch eine planare Anordnung der Endothelzellen gekennzeichnet. Demzufolge repräsentierte dieses System weder eine Krümmung, noch die damit verbundene Dreidimensionalität eines *in vivo* Blutgefäßes. Um diese Limitierungen zu überwinden, wurde ein 3D-organotypisches, mikrofluidisches System namens $\mu 3DVasc$ Bioreaktor auf Basis des Thermoformens von Dr. Isabella Hebeiss (2012) entwickelt (Abbildung 11).^[105]

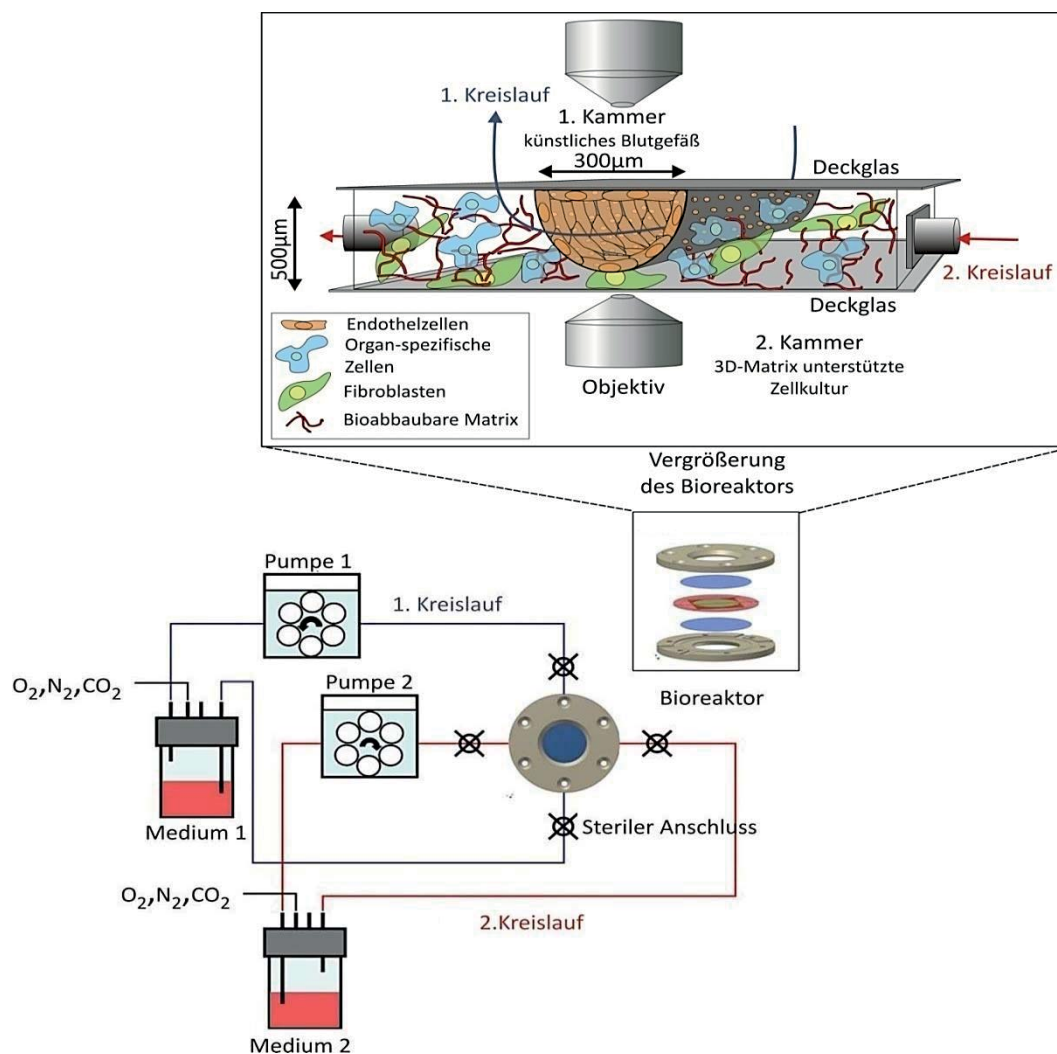


Abbildung 11: Schematische Darstellung des $\mu 3DVasc$ Biorektors, aufgebaut aus zwei Kompartimenten, und dessen Versorgung mit Medium.^[105]



Das zentrale Element des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors bildet ein gekrümmter, poröser Mikrokanal aus einer PC-Membran. Dieser PC-Mikrokanal bietet Platz für die Kultivierung von Endothelzellen und stellt somit das artifizielle Blutgefäßsystem dar. Durch den Anschluss eines Pumpensystems können Blutströme simuliert werden. Außerdem wird dadurch die Versorgung der Zellen mit frischen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren gewährleistet. Unter dem PC-Mikrokanal befindet sich ein zweites Kompartiment zur Generierung eines anliegenden 3D-Gewebes, dessen Versorgung durch die Porosität der PC-Membran gewährleistet wird.

4.2 SMART-Technologie

Die Herstellung der $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren basiert auf der SMART (engl. Substrate Modification and Replication by Thermoforming)-Technologie, die in der Arbeitsgruppe um Dr. Alex Welle, Dr. Stefan Giselbrecht und Dr. Roman Truckenmüller am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) entwickelt wurde.^[149] Im Vergleich zur Mikro-Spritzguss-Methode wird hierbei der Schmelzpunkt der Polymere nicht erreicht, sondern diese im thermoelastischen Zustand unter permanenter Materialkohäsion geformt. Dies hat den Vorteil, dass eine Modifizierung der Polymeroberfläche, wie etwa durch Beschuss mit Schwerionen zur Formung von kleinen Poren oder durch Oberflächenstrukturierung, vor dem Thermoformen durchgeführt werden kann. Dadurch ist die Modifikation der gesamten Oberfläche ausführbar. Des Weiteren können Modifizierungen vorgenommen werden, die auf 2D-Oberflächen beschränkt sind, wie z.B. weiche Lithographie.^[150] Ein weiterer Vorteil dieser Technologie liegt in der verkürzten Anwendungszeit beim Thermoformen, was eine Massenproduktion von Strukturen zum späteren Einsatz im HTS Format ermöglicht. Außerdem ist eine Modifizierung beider Polymerseiten möglich, wodurch eine Kokultur aus verschiedenen Zellen in einem direkten Kontakt zueinander realisierbar ist. Demzufolge stellt die SMART-Technologie eine geeignete Methode zur Produktion von dünnwandigen, flexiblen und hohlen Mikrokanälen dar.^[151]

Der Prozess ist in drei Schritten aufgebaut (Abbildung 12). Der Vorprozess (pre-process) wird als erster Schritt ausgeführt und kann zur Oberflächenmodifikation genutzt werden, welche sich nach dem Verstrecken des Materials im Hauptprozess, dem Thermoformen (core-process), 3D-angeordnet wiederfindet. Abschließend folgt der Nachprozess (post-process), z.B. das nasschemische Ätzen zur Öffnung der Poren oder das Anbringen verschiedener Funktionalisierungen.

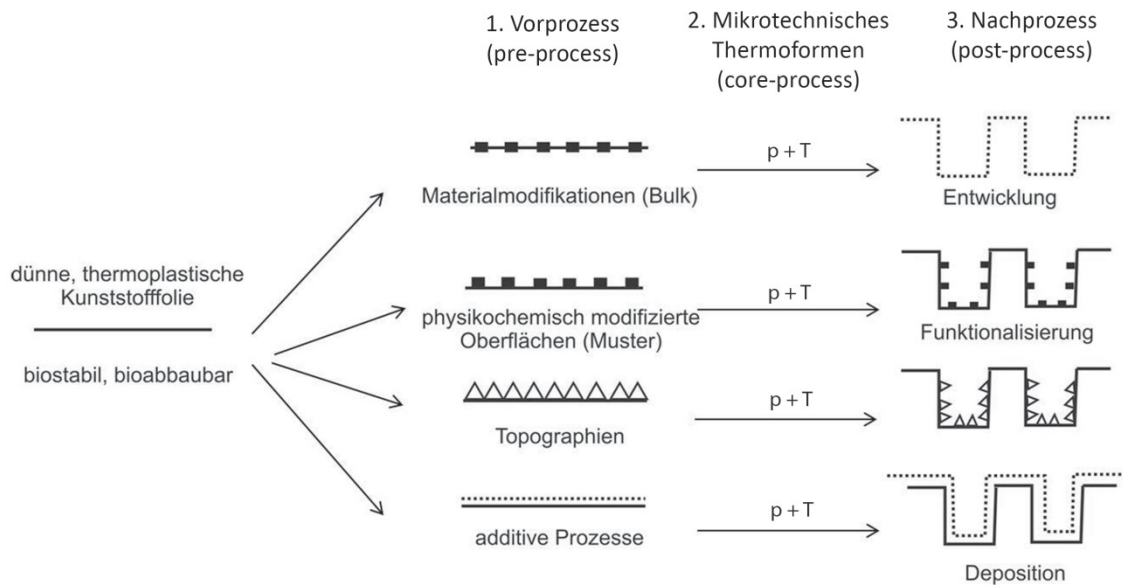


Abbildung 12: Der dreistufige Prozess der SMART-Technologie. Im Vorprozess können Oberflächenmodifikationen, wie z.B. Bulk-Modifikation, physikalische Modifizierung, Topographien oder additive Prozesse, auf die Membranen gebracht werden, die sich nach dem Thermoformen (Hauptprozess) und dem damit verbundenen Verstrecken der Membranen 3D-angeordnet wiederfinden und im Nachprozess weiterverarbeitet werden. p steht für Druck und T steht für Temperatur (modifiziert nach Gottwald et al., 2015).^[151]

4.3 Herstellung des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors

Die für die nachfolgenden Untersuchungen verwendeten $\mu 3D Vasc$ Bioreaktoren wurden in Kollaboration mit dem Institut für Biologische Grenzflächen (IBG 1) am KIT hergestellt. Für die Produktion der Mikrokanäle wurden die mit Schwerionenbeschuss physikalisch modifizierten PC-Membranen (50 μm Dicke, 10^6 Ionen/ cm^2 , it4ip, Belgien) mit Hilfe einer Thermoformanlage zu 3D-Strukturen mit den Dimensionen 1 mm \times 20 mm \times 300 μm (Breite \times Länge \times Tiefe) unter Einwirkung von 4 bar und 147 $^\circ\text{C}$ geformt.^[105, 149, 152, 153] Der Schmelzpunkt von PC wurde unter diesen Bedingungen nicht erreicht, wodurch die Modifikationen der PC-Membranen erhalten wurden.^[150] Die Öffnung der latenten Ionenspuren in den PC-Membranen erfolgte infolge einer Behandlung mit 5 N NaOH-Lösung unter Zusatz von DowfaxTM. Zur Untersuchung der Porenöffnung wurden unterschiedliche Ätzbedingungen getestet. Hierzu wurden die geformten PC-Membranen für vier bis viereinhalb Stunden mit 5 N NaOH-Lösung unter Zusatz unterschiedlicher DowfaxTM Konzentrationen (0,01% und 0,1%) behandelt und anschließend mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) untersucht. Die prinzipielle Wirkungsweise von REM beruht auf dem Abrastern der zu untersuchenden Oberfläche mit einer Elektronenstrahlsonde. Dabei wird der Elektronenstrahldurchmesser durch Linsen in der Mikroskopsäule elektronenoptisch verkleinert. Somit können Sondendurchmesser von 200 bis 50 Å , in Einzelfällen bis zu 2 Å , erreicht werden. Die emittierten Sekundärelektronen oder rückgestreuten Elektronen werden von geeigneten Detektoren registriert.^[154] Die Wechselwirkung mit der Luft wird durch die Erzeugung eines Vakuums vermieden. Bei der Untersuchung der PC-Membranen war eine Vorbehandlung durch Überziehen mit einer Silberschicht nötig, um ein Aufladen der Oberfläche durch die Elektronen zu vermeiden. Abbildung 13 zeigt REM Aufnahmen der geformten PC-Membranen im Bereich des Kanalbodens. Auffallend sind die Unterschiede des äußeren und inneren

Porendurchmessers. Während der äußere Porendurchmesser nach vier Stunden Ätzzeit unter Zusatz von 0,01% Dowfax™ 5,6 µm (Abbildung 13 a) groß war, betrug der innere Durchmesser lediglich 0,7 µm (Abbildung 13 b). Die Verlängerung der Ätzzeit um eine halbe Stunde führte zur Vergrößerung des äußeren Porendurchmessers von 5,6 µm auf 6,35 µm (Abbildung 13 c). Beim inneren Porendurchmesser wurde eine Änderungen von 0,7 µm auf 2,4 µm (Abbildung 13 d) verzeichnet. Außerdem konnten Unterschiede zwischen den Behandlungen mit 0,01% (Abbildung 13 a – d) und 0,1% (Abbildung 13 e – h) Dowfax™ beobachtet werden: Die Letztere führte nicht zu einer Öffnung der Poren bei vier Stunden Ätzzeit und ergab einen inneren Porendurchmesser von 0,28 µm bei viereinhalb Stunden. Die äußeren Porendurchmesser variierten dagegen (Abbildung 13 a, e bzw. c, g) bei unterschiedlichen Dowfax™ Konzentrationen nur geringfügig. Es wird angenommen, dass sich Dowfax™ um die Pore einlagert und somit eine schützende Wirkung auf das Poreninnere vor dem Ätzen mit der 5 N NaOH-Lösung ausübt. Die Erniedrigung seiner Konzentration führt somit zum stärkeren Ätzeffekt.^[155, 156] Diese physikalischen Eigenschaften waren für die nachfolgenden Experimente zu berücksichtigen, denn es wurde schon in mehreren Studien verdeutlicht, dass die Porengröße von Membranen einen Einfluss auf das Zellwachstum sowie die Proliferation und Migration nimmt.^[157, 158]

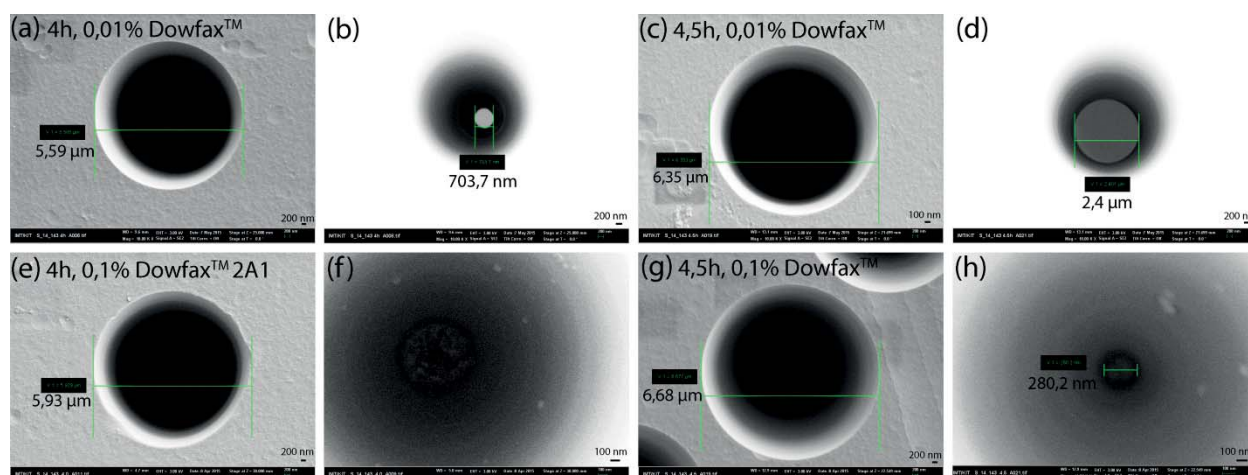


Abbildung 13: REM Aufnahmen der PC-Membranen nach dem Schwerionenbeschuss, behandelt nach der SMART-Technologie. (a) Äußerer Porendurchmesser, 4 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,01% Dowfax™. (b) Innerer Porendurchmesser, 4 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,01% Dowfax™. (c) Äußerer Porendurchmesser, 4,5 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,01% Dowfax™. (d) Innerer Porendurchmesser, 4,5 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung unter Zusatz von 0,01% Dowfax™. (e) Äußerer Porendurchmesser, 4 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,1% Dowfax™. (f) Innerer Porendurchmesser, 4 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,1% Dowfax™. (g) Äußerer Porendurchmesser, 4,5 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,1% Dowfax™. (h) Innerer Porendurchmesser, 4,5 Stunden Ätzzeit, 5 N NaOH-Lösung, 0,1% Dowfax™. Maßstab = 200 nm (a, b, d, e, g) bzw. 100 nm (c, f, h).

Nach der Öffnung der Poren wurde die geformte PC-Membran durch eine zweite, nicht poröse PC-Membran zum fertigen PC-Mikrokanal mittels Bonden in der Thermoformanlage bei 145 °C und 20 MPa geschlossen. Im nächsten Schritt wurde der Membranstapel mit vier Öffnungen zum Anschluss an die Mikrofluidik versehen. Um der Konstruktion eine Stabilität zu verleihen und die Handhabung zu erleichtern, wurde der PC-Mikrokanal an einen PMMA (Polymethylmethacrylat)-Block befestigt. Dabei wurden die Öffnungen im Membranstapel direkt unter die Luer-Anschlüsse des PMMA-Blocks

platziert. Zur Generierung des unteren Kompartiments wurde der PC-Mikrokanal mit einem Deckgläschen von unten verschlossen. Der fertige $\mu 3DVasc$ Bioreaktor ist in Abbildung 14 dargestellt.

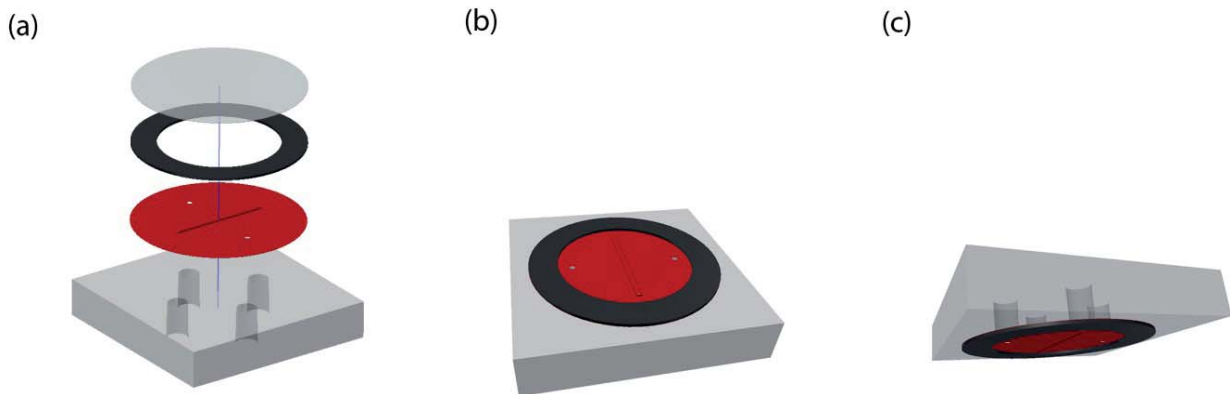


Abbildung 14: Schematische Darstellung des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors. (a) Der thermogeformte, poröse, gebondete PC-Mikrokanal (rot) wird mit einem Deckgläschen (grau, oben) zur Generierung des unteren Kompartiments abgegrenzt. Auf der gegenüberliegenden Seite wird der PMMA-Block (grau, unten) mit vier Luer-Anschlüssen über die Löcher im Membranstapel befestigt. (b) Der fertig gebaute $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Projektion von unten. (c) Der fertig gebaute $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Projektion von oben.

Der schnelle Herstellungsprozess, die niedrigen Produktionskosten sowie leichte Handhabung sind klare Vorteile, welche den $\mu 3DVasc$ Bioreaktor zu einem innovativen *in vitro* Modell in der Kategorie „Organ-on-Chips“ machen. Die Anpassung des Designs an die physiologische Situation, wie etwa die Krümmung des Mikrokanals und der Anschluss an die Mikrofluidik zur Nachahmung der Blutgefäße, machen die Untersuchungen unter realitätsnahen Bedingungen möglich. Das Vorhandensein des zweiten Kompartiments schafft die Voraussetzung zur Generierung von durchbluteten, organotypischen Kulturen. Die Transparenz der Konstruktion erlaubt die mikroskopische Nachverfolgung des Zellwachstums. Abbildung 15 zeigt den $\mu 3DVasc$ Bioreaktor: Zur Veranschaulichung der Anordnung der beiden Kompartimente wurde der PC-Mikrokanal mit Rhodamin 123 (rot) und das untere Kompartiment mit Trypanblau (blau) gefüllt.

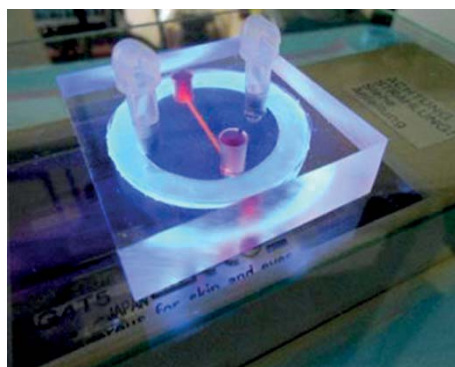


Abbildung 15: Der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Zur Visualisierung des PC-Mikrokanals wurde Rhodamin 123 (rot) verwendet. Das untere Kompartiment wurde mit Trypanblau (blau) gefüllt.



4.4 Biologische Validierung des endothelialen Zelllayers

4.4.1 Langzeitkultivierung

In Hinblick auf die Etablierung der organotypischen Zellkultur im unteren Kompartiment des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors war es wichtig, eine Langzeitkultivierung der Endothelzellen im porösen PC-Mikrokanal durchzuführen, da das Einbringen der Zellen für die organotypische Kultur in der Regel erst einige Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals stattfindet. Des Weiteren sollten die Zellen der organotypischen Kultur über den PC-Mikrokanal und die darin kultivierten Endothelzellen versorgt werden, sodass die Integrität und Funktionalität des Endothels über einen längeren Zeitraum gewährleistet werden mussten. Zur Überprüfung der endothelialen Zellkultur auf ihr Wachstum über einen längeren Zeitraum wurden $1,25 \times 10^6$ humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC, engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells) im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, mikrofluidischen PC-Mikrokanal sieben Tage lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Fibronectin ist ein Glykoprotein der EZM und wurde zum Anhaften der Zellen auf der PC-Membran verwendet. Zur Visualisierung der Zellen wurden die Aktinfilamente mit einem rot fluoreszierenden Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml) und die Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Hoechst 33342 (2 µg/ml) markiert (Abbildung 16). Nach sieben Tagen Inkubation unter fluidischen Bedingungen besiedelten die HUVEC vollständig den PC-Mikrokanal und bildeten einen dichten Zellrasen.

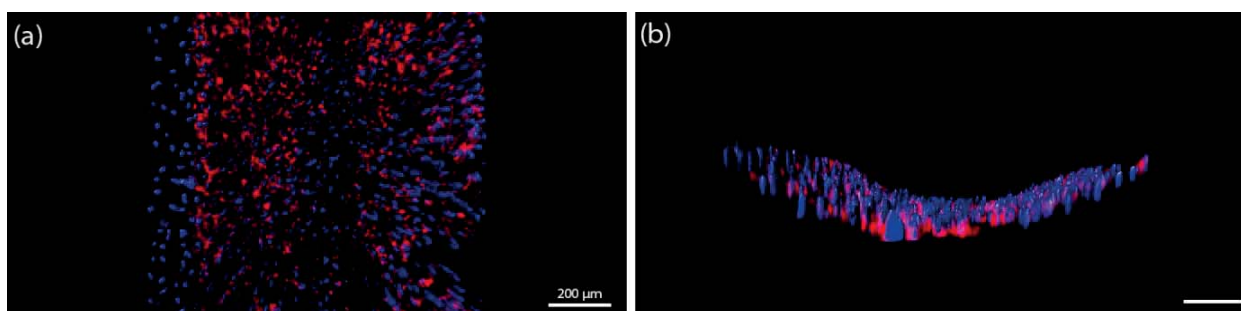


Abbildung 16: HUVEC unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 7 (z-Stapel). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 350 µl/min. Zur Visualisierung der Aktinfilamente in den Zellen wurde Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml, rot) verwendet. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (2 µg/ml, blau). Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurde ein z-Stapel von 150 µm (61 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (b) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. Maßstab = 200 µm.

4.4.2 Konfluenztest

Nach der Langzeitstudie war der Nachweis der Tight Junctions assoziierten Proteine bei den HUVEC im mikrofluidischen PC-Mikrokanal von großer Bedeutung. Bei den Tight Junctions handelt es sich um durchgehende Zell-Zell-Kontakte, die die Zellen sehr eng miteinander verbinden, für den kontrollierten Stofftransport zwischen den Zellen sorgen und die Aufrechterhaltung der Zellpolarität durch Trennung der apikalen und der basolateralen Plasmamembran gewährleisten.^[159] Die Expression von Tight Junctions assoziierten Proteinen liefert somit Rückschlüsse über die Konfluenz und Funktionalität des

etablierten Zellschichten. PECAM-1 (engl. platelet/endothelial cell adhesion molecule) ist ein Tight Junctions assoziiertes Protein und wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert.^[160] PECAM-1 hat ein Molekulargewicht von 130 kDa, gehört zur Immunoglobulin (Ig) Superfamilie und ist ein Typ I Transmembran-Glykoprotein. In Abbildung 17 wurde die endotheliale Zellkultur aus HUVEC auf die Expression von PECAM-1 nach drei Tagen Kultivierung unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor untersucht. Die Mikroskopieaufnahmen zeigen deutlich die Expression von PECAM-1 (Abbildung 17 b) und dessen Lokalisation an den Zell-Zell-Kontakten. Die Zellen wiesen eine kopfsteinpflasterartige Morphologie auf.

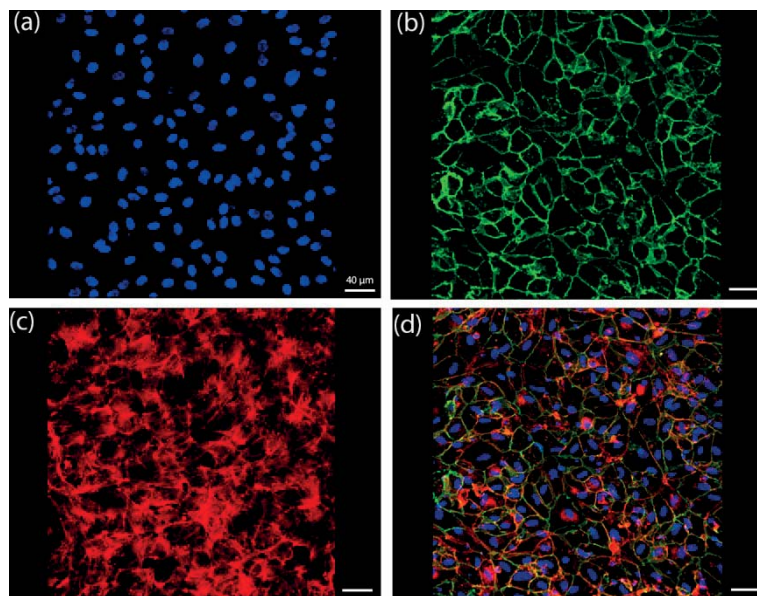


Abbildung 17: Expression von PECAM-1 in HUVEC, kultiviert unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 3 (z-Stapel). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 μ l/h. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurde ein z-Stapel von 6 μ m (9 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) DAPI-Färbung der DNA in HUVEC-Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 488-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (c) Alexa Fluor® 647 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (d) Überlagerung. Maßstab = 40 μ m.

Die Anwendung höherer Flussraten sowie eine längere Kultivierung unter fluidischen Bedingungen bewirkte die Ausrichtung der Zellen entlang des Mediumflusses, die anhand der PECAM-1-Expression in Zell-Zell-Kontakten sichtbar war (Abbildung 18). Der Effekt der Zellausrichtung wurde bereits von I. Hebeiß (2012) beschrieben.^[108]

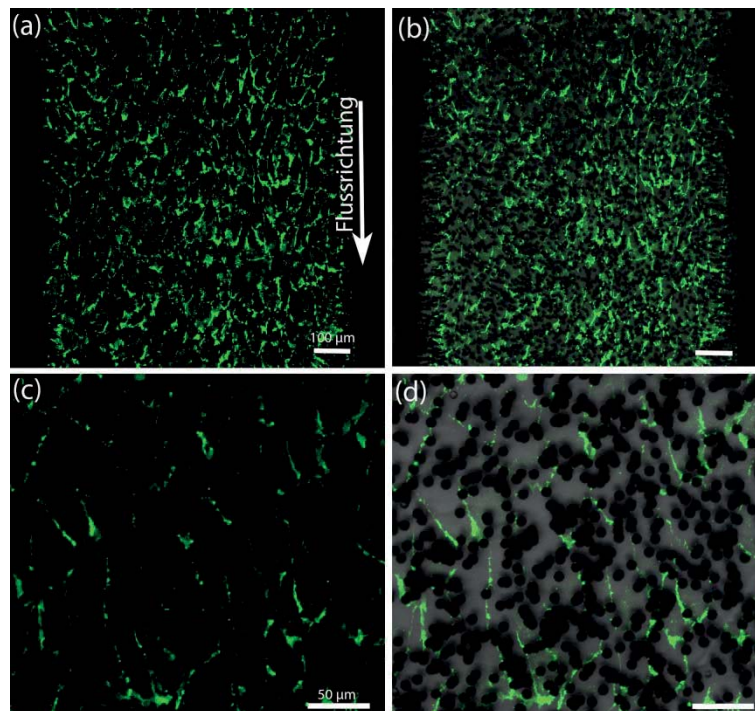


Abbildung 18: Expression von PECAM-1 in HUVEC unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D V a s c$ Bioreaktor, Tag 5 (konfokale Aufnahmen). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronektin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 500 μ l/min. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen, FITC-gekuppelten anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite–Software. (a, c) FITC-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (b, d) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. Maßstab = 100 μ m (a, b) bzw. 50 μ m (c, d).

4.4.3 Proliferationstest

Es ist bekannt, dass die Proliferationsrate des vaskulären Endothels *in vivo* sehr gering ist. Lediglich 0,1% aller Zellen eines gesunden Endothels sind in der Lage sich zu teilen, wodurch der Zellaustausch bis zu mehreren Monaten andauern kann.^[161, 162] Erst im Falle einer Verletzung oder bei der Entstehung neuer Blutgefäße kommt es zur Vermehrung von Endothelzellen. Der Prozess der Entstehung von neuen Blutgefäßen wird Angiogenese genannt und findet bei Erwachsenen unter physiologischen Bedingungen nur selten statt.^[161] Dies hängt unter anderem mit der Erhaltung der Barriereintegrität zusammen, weil Angiogenese die Auflösung von Tight Junctions als Folge hat.^[163] Dagegen teilen sich die Zellen unter konventionellen 2D-Bedingungen sehr oft und benötigen ein häufiges Passagieren. Aus diesem Grund wurde hier folgende Fragestellung untersucht: Ob die HUVEC nach der Aussaat in den PC-Mikrokanal ihre hohe Proliferationsrate beibehalten oder ob sie durch die Bedingungen im $\mu 3D V a s c$ Bioreaktor, wie etwa die Krümmung des PC-Mikrokanals und die Scherkräfte, einer Änderung unterzogen werden und eine *in vivo*-ähnliche Proliferationsrate erlangen. Um das zu testen, wurde das Click-iT® EdU Imaging Kit von Invitrogen™ verwendet, welches auf einer Click Reaktion beruht.^[164] Dabei wurden die HUVEC mit dem Alkin-modifizierten Thymidinanalogon EdU inkubiert, wobei das Nucleotid während der Replikation in die DNA der Zellen eingebaut wurde. In einer bioorthogonalen 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen (1963) mit einem Azid-modifizierten Fluorophor (Alexa Fluor® 488-Azid) konnten die DNA-

Stränge mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Ein Einbau geschieht nur in Zellen, die eine Zellteilung und somit eine Replikation der DNA durchlaufen (Abbildung 19).^[165]

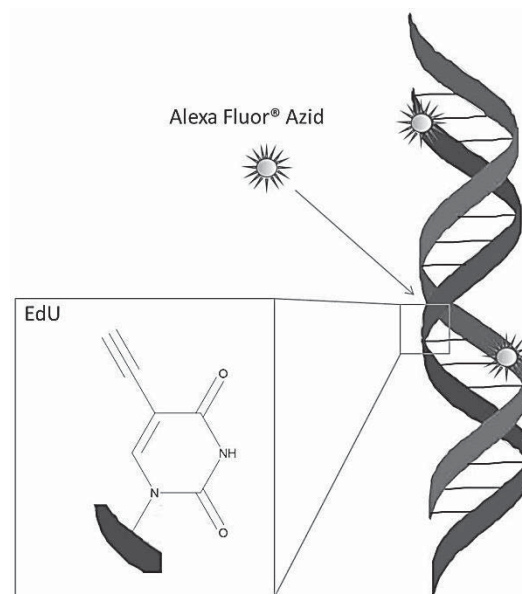


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Detektion des Thymidinanalogons EdU durch ein Azid, das an den grün fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor® 488 gekuppelt ist.^[164]

In Abbildung 20 ist die Replikation von HUVEC am vierten bzw. am siebten Tag nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals dargestellt. Die Kerne aller HUVEC wurden mit Hilfe des blau fluoreszierenden Hoechst 33342 (2 µg/ml) visualisiert (Abbildung 20 a, e, i, m). Falls eine Zellteilung stattgefunden hat, zeigte der Zellkern der Tochterzelle neben der blauen Fluoreszenz eine grüne Fluoreszenz, die auf den an Azide gekuppelten Farbstoff Alexa Fluor® 488 zurückzuführen war (Abbildung 20 b, f, j, n). Im Vergleich zum Boden des PC-Mikrokanals (Abbildung 20 a–d) wurde auf der PC-Kanaldecke (Abbildung 20 e–h) nach vier Tagen ein erhöhter Anteil proliferierender Zellen detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Decke des PC-Mikrokanals nach vier Inkubationstagen unter fluidischen Bedingungen keine vollständige Konfluenz aufwies. Die HUVEC proliferierten, um die Lücken im Zellrasen zu schließen. Dies entspricht auch der natürlichen Situation *in vivo*, in der der Zellumsatz des vaskulären Endothels sehr gering ist und nur dann stattfindet, wenn absterbende Zellen durch benachbarte, sich teilende Endothelzellen oder durch Endothel-Vorläuferzellen, die sogenannten EPCs (engl. bone marrow-derived endothelial progenitor cells), ersetzt werden.^[166] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Proliferation im Laufe weiterer Kultivierungstage konstant blieb. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass am siebten Kultivierungstag (Abbildung 20 i–p) lediglich einige wenige HUVEC an der Wand (Abbildung 20 m–p) des porösen PC-Mikrokanals proliferierten. Für die Visualisierung von HUVEC im mikrofluidischen PC-Mikrokanal wurden außerdem Intermediärfilamente mit Hilfe von Immunhistochemie gefärbt (Abbildung 20 c, g, k, o). Die Intermediärfilamente bestehen aus α -helikalen filamentösen Proteinen und gehören wie Mikrotubuli und Aktinfilamente zu den Zytoskelettfilamenten. Sie werden in sechs Typen eingeteilt. Das hier untersuchte Protein Vimentin gehört zum Typ III aus der Gruppe der Desmine und ist für Blutgefäße, einige Epithelzellen und mesenchymale Zellen spezifisch. Die Intermediärfilamente besitzen einen Durchmesser von etwa 10 nm, wodurch sie mikroskopisch sichtbar sind.^[167]

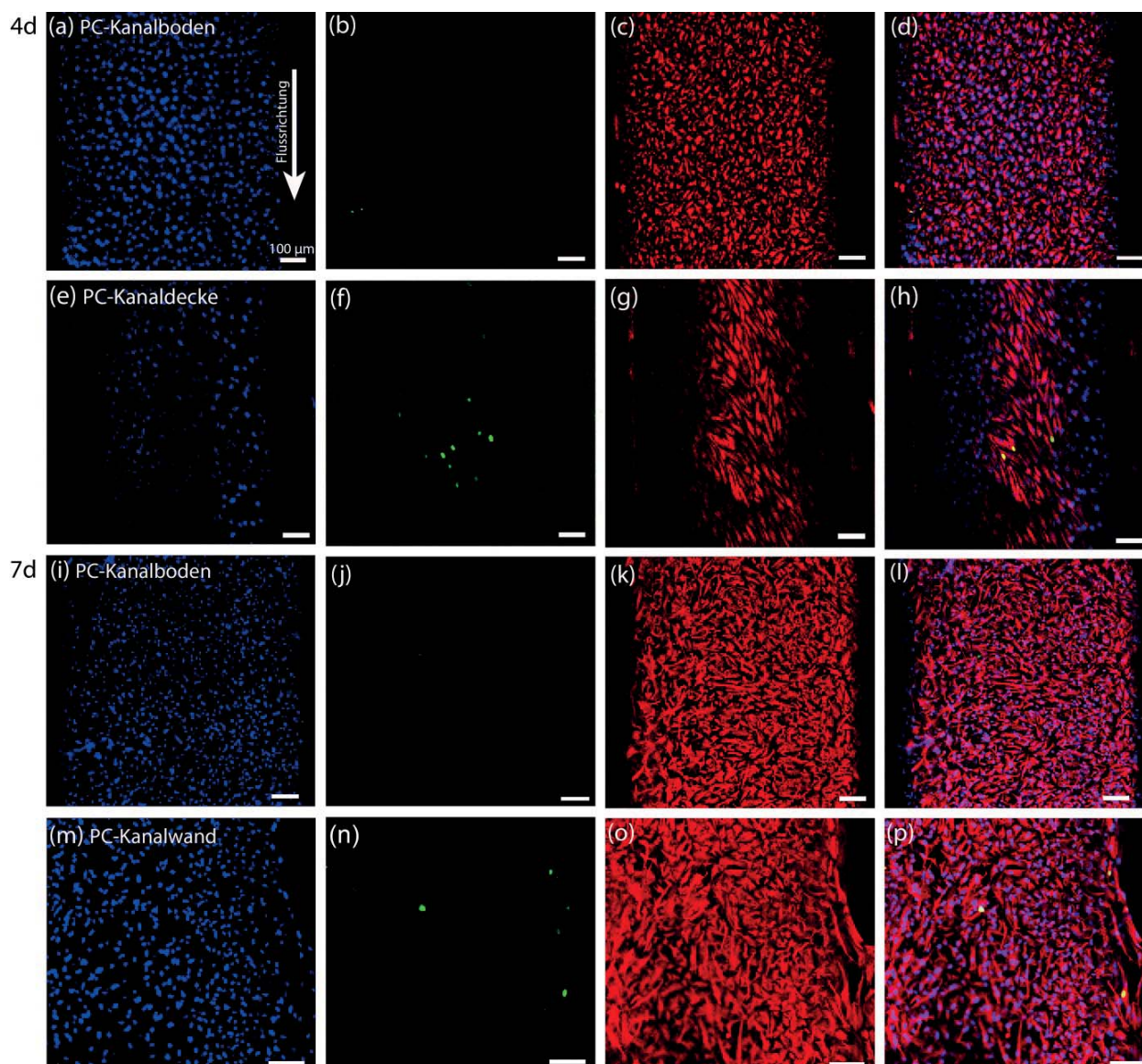


Abbildung 20: EdU Nachweis der Proliferation von HUVEC unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 4 bzw. Tag 7 (konfokale Aufnahmen). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 400 $\mu l/min$. 24 Stunden vor der Zugabe der Click-it® Reaktionsmischung mit Alexa Fluor® 488 Azid wurde das EdU-Reagenz (10 μM) zu den Zellen hinzugegeben. Die Visualisierung der Intermediärfilamente in den Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-Vimentin-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 546-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, e, i, m) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, f, j, n) Alexa Fluor® 488-Färbung der Replikation der HUVEC, grün. (c, g, k, o) Alexa Fluor® 546-Färbung der Intermediärfilamente, rot. (d, h, l, p) Überlagerung. (a – d) PC-Mikrokanalboden nach 4 Tagen. (e – h) PC-Mikrokanaldecke nach 4 Tagen. (i – l) PC-Mikrokanalboden nach 7 Tagen. (m – p) PC-Mikrokanalwand nach 7 Tagen. Maßstab = 100 μm .

Die 3D-Rekonstruktion des Zellwachstums in Abbildung 21 bewies erneut, dass die HUVEC am siebten Kultivierungstag unter fluidischen Bedingungen den PC-Mikrokanal vollständig besiedelten. Die Zellen teilten sich nur in Randbereichen des PC-Mikrokanals (Abbildung 21 a, b) oder in den Bereichen mit Lücken im Zellrasen (Abbildung 21 c, d).

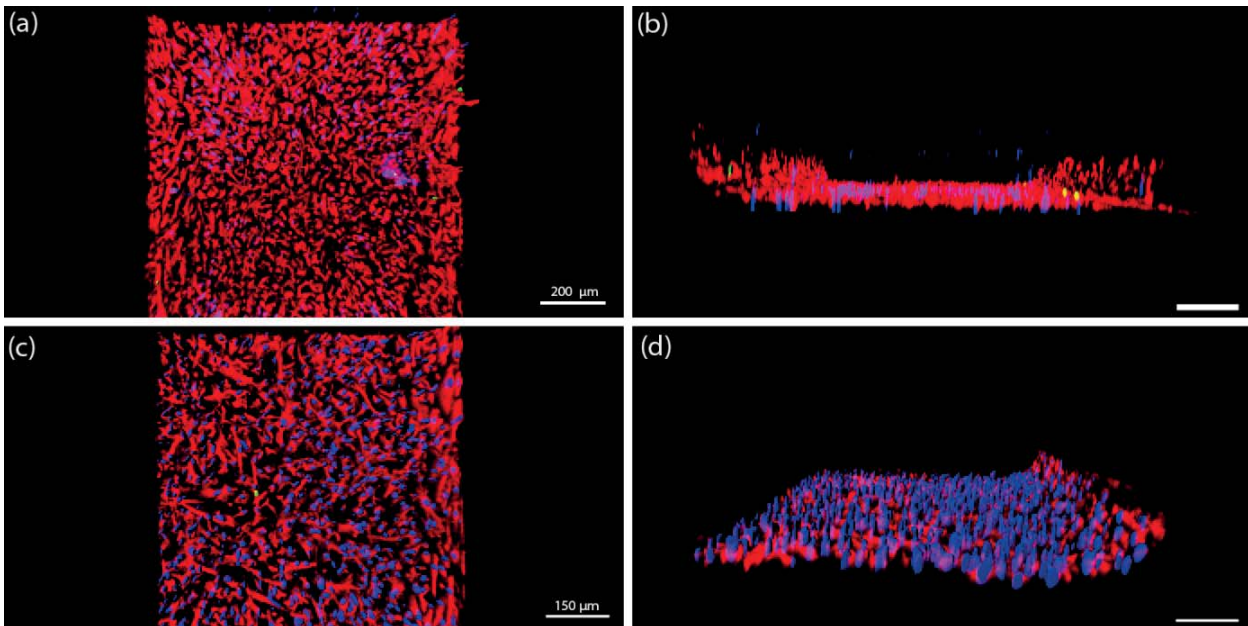


Abbildung 21: HUVEC unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 7 (z-Stapel). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 400 μ l/min. Die proliferierenden Zellen wurden mit Hilfe des Alexa Fluor® 488 Azids markiert. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml, blau). Zur Visualisierung der Intermediärfilamente in den Zellen wurden der monoklonale anti-human-Vimentin-Maus IgG Antikörper und der polyklonale, Alexa Fluor® 546-gekoppelte anti-Maus-Ziege IgG Antikörper verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurden ein z-Stapel von 190 μ m (124 Bilder; a, b) bzw. ein z-Stapel von 150 μ m (98 Bilder; c, d) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a, c) Projektionen des Lumens des PC-Mikrokanals. (b, d) Seitliche Projektionen des PC-Mikrokanals. Maßstab = 200 μ m bzw. 150 μ m.

Abbildung 22 verdeutlicht die beobachteten Ergebnisse und stellt eine schematische Darstellung der zeitabhängigen Proliferation der HUVEC im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor dar.

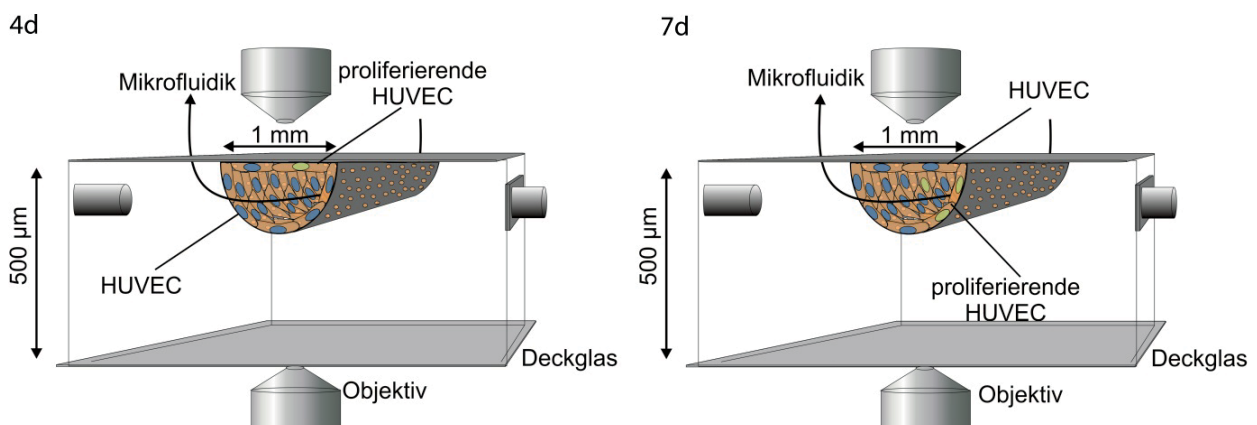


Abbildung 22: Schematische Darstellung der visualisierten Endothelproliferation nach vier und sieben Tagen Kultivierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor unter mikrofluidischen Bedingungen. Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des EdU Nachweises und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert.



4.4.4 Funktionstests

4.4.4.1 Transmigration von Blutzellen

Eine der Aufgaben des Endothels der Blutgefäße *in vivo* ist die Beteiligung an der Immunreaktion des Körpers z.B. infolge einer Verletzung oder einer Infektion. Tritt eines dieser Ereignisse im Körper auf, so werden Leukozyten zu der Entzündungsstelle rekrutiert, wobei sie nach mehreren aufeinanderfolgenden Schritten, wie Rolling, Aktivierung und Arrest, das Endothel und die subendotheliale Basalmembran passieren und anschließend durch das Zwischengewebe in das entzündete Gewebe migrieren.^[160] Während die ersten der oben genannten Schritte reversibel sind, stellt die Transmigration, auch Diapedese genannt, einen irreversiblen Vorgang dar.^[168] Obwohl in der letzten Zeit viele Moleküle und die Kontrollmechanismen, die bei der Diapedese eine Rolle spielen, identifiziert werden konnten, muss der genaue Prozess der Leukozyten-Migration durch das Endothel noch analysiert werden.^[160] Folglich war die Simulation und Untersuchung immunologischer und entzündlicher Prozesse im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor eine der Möglichkeiten für den Funktionstest des etablierten artifiziiellen Blutgefäßsystems (Abbildung 23).

Zur Untersuchung der Transmigration der Monozyten *in vitro* wurde eine Immunantwort im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor simuliert (Abbildung 23 $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor). Dafür wurde die im PC-Mikrokanal angesiedelte endotheliale Zellkultur aus HUVEC mit 25 ng/ml Zytokin TNF- α (engl. tumor necrosis factor) stimuliert. TNF- α spielt bei der Abwehrreaktion des Körpers eine wichtige Rolle.^[169] Er sorgt bei Blutgefäßen, besonders bei den Venen und Venolen, für die Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen der Selectin- und Integrin-Familie.^[170] Selectine bewirken das Anhaften der Monozyten an der Endotheloberfläche. Dieser Prozess wird als Tethering bezeichnet und erfolgt in der Rolling Phase der Monozyten. Die Monozyten wandern anschließend durch das Endothel und entlang eines weiteren Chemokin- oder Zytokingradienten.^[105]

Ein weiteres wichtiges Molekül bei der Migration von Blutzellen ist PECAM-1.^[171] Neben seiner Aufgabe als ein Bestandteil von endothelialen Tight Junctions ist PECAM-1 an der homophilen Interaktion zwischen den Leukozyten und Endothelzellen beteiligt.^[172, 173] Es wird aus einer extrazellulären Domäne, bestehend aus 6 Ig-ähnlichen homologen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne zusammengesetzt.^[174] Dabei ist die extrazelluläre Ig1 Domäne für die Ausbildung von homophilen PECAM-1/PECAM-1 Interaktionen zuständig.^[175, 176] Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Experimenten ein monoklonaler, gegen die extrazelluläre Ig2 Domäne des humanen PECAM-1 gerichteter Antikörper aus der Maus eingesetzt. Ein Vorteil dieses Antikörpers ist seine Kompatibilität mit der Lebendfärbung der Zellen. Aufgrund der Bindung an die extrazelluläre Domäne und der Kupplung des Antikörpers an den Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) Farbstoff war eine Fixierung der Zellen nicht nötig.^[171] Außerdem bleibt die Ig1 homologe Domäne intakt, wodurch die homologe Interaktion von endothelialen PECAM-1 Molekülen sowohl untereinander bei der Ausbildung von Tight Junctions, als auch mit Monozyten-PECAM-1 bei der Transmigration von Blutzellen sichergestellt wurde. Außerdem erlaubte dieser Antikörper den Nachweis der Konfluenz der endothelialen Zellkultur im PC-Mikrokanal, um die unkontrollierte Transmigration durch den Zelllayer auszuschließen.

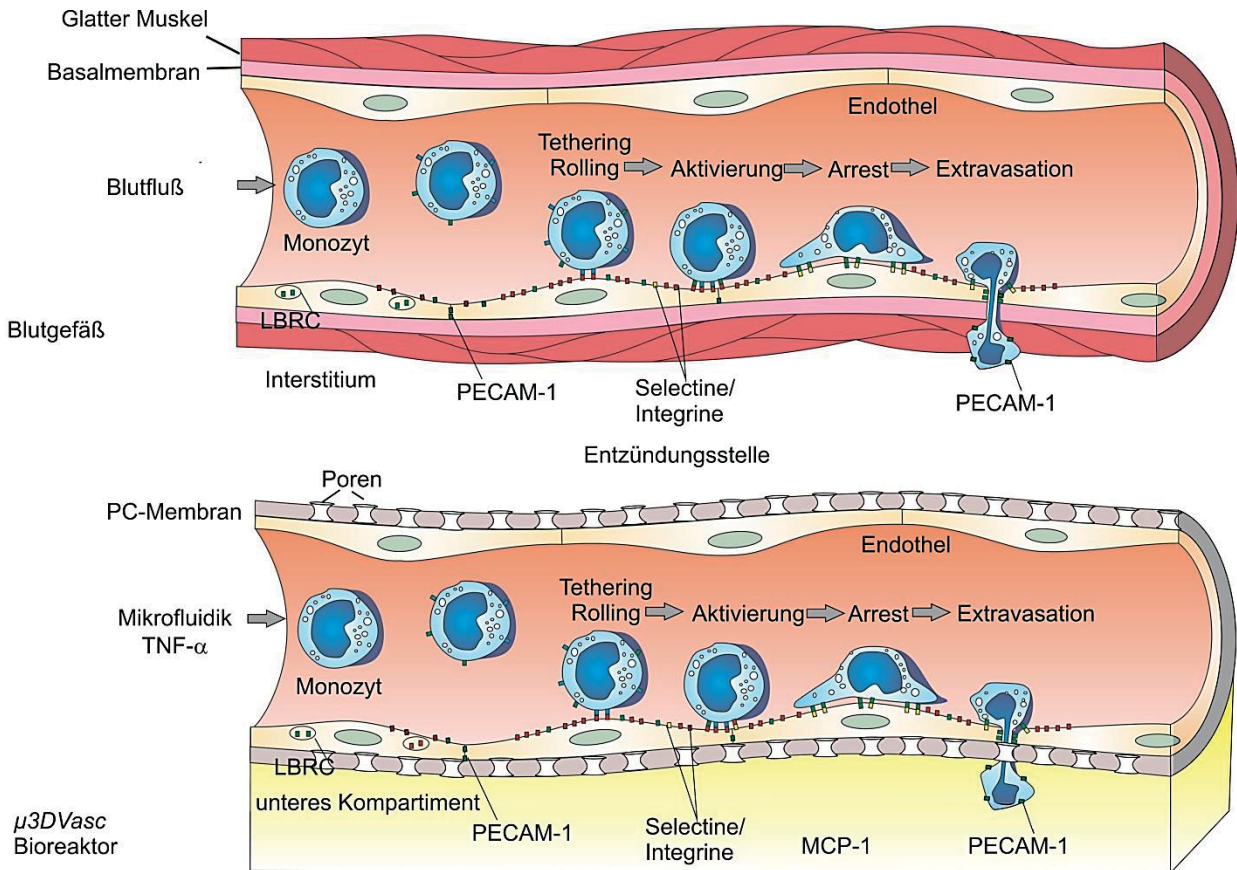


Abbildung 23: Ablauf der Immunreaktion der Monozyten im Blutgefäß und die entsprechende Simulation im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor: Tethering während der Rolling Phase der Monozyten, Arrest und Extravasation ins entzündete Gewebe bzw. in das untere Kompartiment (modifiziert nach Hebeiß, 2012).^[105]

Die Aktivierung von HUVEC mit dem Zytokin $TNF-\alpha$ (25 ng/ml) bewirkte die Adhäsion der Monozyten (1×10^7 THP-1 Zellen) auf ihrer Oberfläche, welche dem PC-Mikrokanal zugeführt und für vier Stunden unter fluidischen Bedingungen inkubiert wurden (Abbildung 24 a - c). Um die Transmigration der Monozyten in das untere Kompartiment zu begünstigen, wurde 500 ng/ml MCP-1 (engl. monocyte chemoattractant protein-1) im unteren Kompartiment vorgelegt. Dies ist ein Chemokin, welches das Rolling und den Arrest der Monozyten auf dem vaskulären Endothelgewebe unter den fluidischen Bedingungen bewirkt.^[177] Infolge dieser Behandlung migrierten einige Monozyten aus dem fluidischen PC-Mikrokanal in das untere Kompartiment. Auffallend war die grüne Färbung der Membran der Hoechst 33342-gefärbten Monozyten (Abbildung 24 d - f).

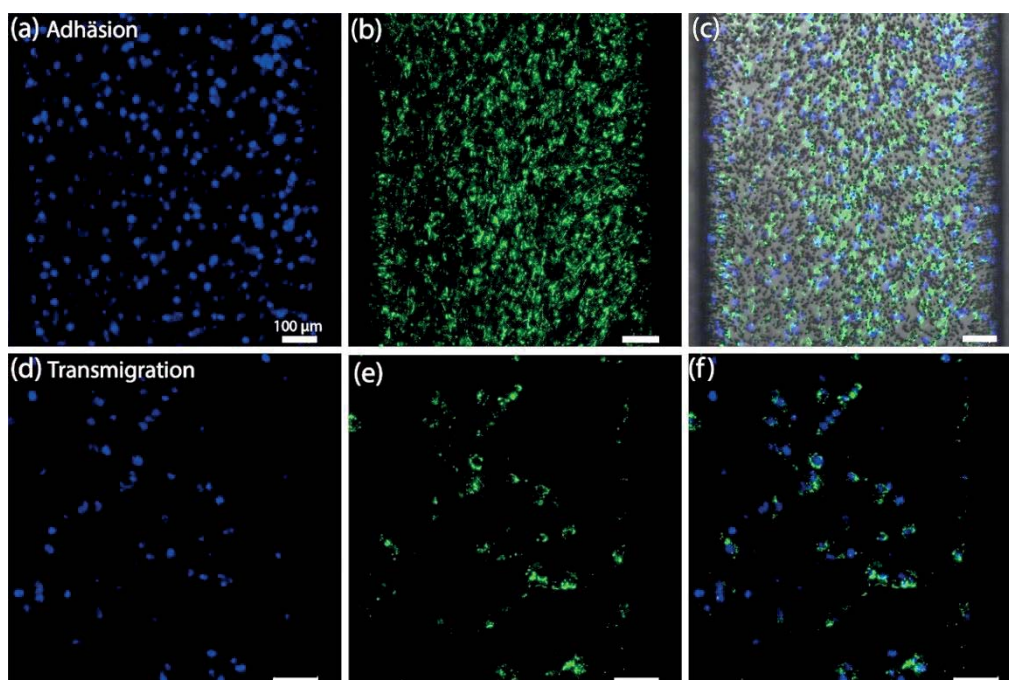


Abbildung 24: THP-1 Adhäsion und Transmigration nach 4 Stunden Inkubation im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 6 (konfokale Aufnahmen). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, μ porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 500 μ l/min. Am 5. Tag wurden HUVEC vor der Inkubation mit den THP-1 Zellen über Nacht mit TNF- α (25 ng/ml) behandelt. THP-1 (1×10^7) Zellen wurden in die Mediumreservoirs überführt und für 4 Stunden bei einer Flussgeschwindigkeit von 500 μ l/min inkubiert. Zusätzlich wurde das untere Kompartiment mit MCP-1 (500 ng/ml in EGM-2) befüllt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die THP-1 Zellen zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml) gefärbt. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen, FITC-gekoppelten anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, d) Hoechst 33342-Färbung der DNA in THP-1 Zellkernen, blau. (b) FITC-Färbung der PECAM-1-Expression in HUVEC, grün. (c) Überlagerung von (a) und (b) mit Hellfeldaufnahme. (e) FITC-Färbung in THP-1 Zellen, grün. (f) Überlagerung von (d) und (e). (a – c) Adhäsion von THP-1 Zellen. (d – f) Transmigration von THP-1 Zellen. Maßstab = 100 μ m.

Ähnliche Untersuchungen der Monozyten-Transmigration im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurden bereits von Dr. I. Hebeiß (2012) durchgeführt.^[105] Hierzu wurden die Membranen der Endothelzellen im PC-Mikrokanal mit dem roten Farbstoff CellMask™ Deep Red (Life Technologies™) markiert. Wie auch hier beobachtet, wurde in diesen Experimenten ein Austausch des Endothelzellen-markierenden Farbstoffs zwischen Endothelzellen und Monozyten visualisiert. Die Möglichkeit des Abfärbens dieses Farbstoffs durch die Akkumulation in den Poren des PC-Mikrokanals wurde jedoch nicht näher untersucht. Um die Interaktionen der Monozyten mit dem nicht gebundenen anti-PECAM-1-Antikörper auszuschließen, wurde ein Kontroll-Bioreaktor unter fluidischen Bedingungen mit dem Antikörper inkubiert. Dieser $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurde zwar mit 0,9 mg/ml Fibronectin im PC-Mikrokanal und 0,6 mg/ml Kollagen im unteren Kompartiment beschichtet, wurde jedoch nicht mit HUVEC im PC-Mikrokanal besiedelt. Die anschließende Inkubation mit den Monozyten und die darauffolgende mikroskopische Untersuchung des unteren Kompartiments bewiesen, dass keine Akkumulation des anti-PECAM-1-Antikörpers in den Poren des PC-Mikrokanals stattgefunden hat (Abbildung 25). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen

Hoechst 33342-gefärbte transmigrierte Monozyten, die keine FITC-PECAM-1-Membranfärbung aufweisen.

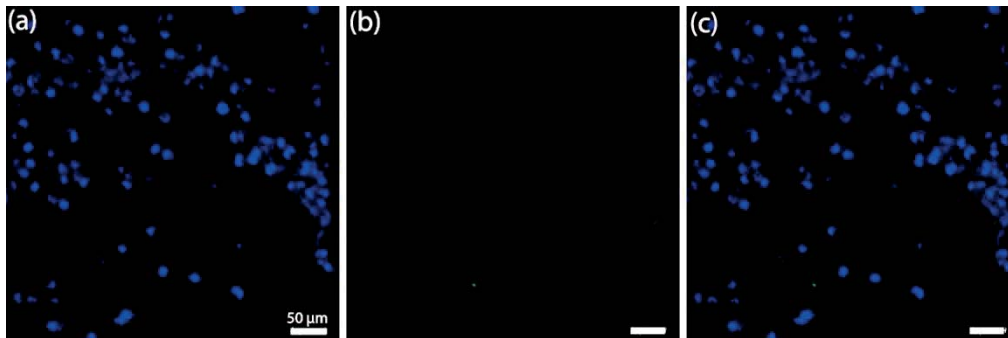


Abbildung 25: THP-1 Transmigration ins untere Kompartiment nach 4 Stunden Inkubation im $\mu 3DVasc$ Kontroll-Bioreaktor (konfokale Aufnahmen). Der poröse PC-Mikrokanal wurde mit Fibronectin (0,9 mg/ml) beschichtet und mit dem monoklonalen, FITC-gekuppelten anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper unter fluidischen Bedingungen (500 $\mu\text{l}/\text{min}$) behandelt. THP-1 (1×10^7) Zellen wurden in die Mediumreservoirs überführt und für 4 Stunden bei einer Flussgeschwindigkeit von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ inkubiert. Zusätzlich wurde das untere Kompartiment mit MCP-1 (500 ng/ml in EGM-2) befüllt. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die THP-1 Zellen zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in THP-1 Zellkernen, blau. (b) FITC-Färbung in THP-1 Zellen, grün. (c) Überlagerung. Maßstab = 50 μm .

4.4.4.2 Permeabilitätsmessungen

In Zusammenarbeit mit Dr. Anthony Bahinski und Ass. Prof. Andries van der Meer vom Wyss Institut an der Harvard Universität, Boston, USA und Dr. Bastian E. Rapp am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) am KIT wurden verschiedene Untersuchungen zur transendothelialen Permeabilität durchgeführt.

Es wurden zahlreiche Methoden zur Permeabilitätsmessung von biologischen Barrieren in der Literatur beschrieben, unter anderem TEER oder der Permeabilitätsassay. TEER Messungen gehören zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Überprüfung der Barriereintegrität *in vitro*, insbesondere bei Transwell-Systemen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Anlegen eines bekannten elektrischen Potentials über den endothelialen Zelllayer und der anschließenden Messung des Stroms, der über die Ionen in parazellulären Räumen transportiert wird. Die Angaben erfolgen in der Größe des elektrischen Widerstands über eine bestimmte Fläche des Endothels. Vorteil der TEER Methode ist, dass sie unter Erhalt des *in vitro* Systems durchgeführt werden kann. Dementsprechend stellt diese Methode eine schnelle und effektive Möglichkeit dar, die Änderungen in der Barrierequalität in Echtzeit zu dokumentieren. Allerdings fand diese Methode bisher keine breite Anwendung in den „Organs-on-Chips“. Die Ursache dafür liegt in den kleinen Volumina und der limitierten Größe der eingesetzten Elektroden, die mit den insgesamt kleinen Dimensionen der „Organs-on-Chips“ in Verbindung stehen.^[32] Außerdem können bei Kanalstrukturen mit einer Auskleidung aller Kanalwände mit Endothelzellen, wie es beim $\mu 3DVasc$ Bioreaktor der Fall ist, keine Elektroden ohne Zerstörung des physiologischen Zellwachstums eingebaut werden. Auch die Platzierung der zweiten Elektrode im unteren Kompartiment ist mit Limitierungen verbunden, weil dieser Schritt eine Behandlung der Elektrode mit Zell-abweisenden Reagenzien zur Messung des elektrischen Widerstands benötigt.



Des Weiteren zeigt diese Methode eine sehr hohe Varianz zwischen den erzielten Werten, nicht nur im Vergleich zu unterschiedlichen *in vitro* Systemen, sondern auch im Vergleich zu den verschiedenen Messungen innerhalb eines Systems. Die Ursache dafür bilden kleine Löcher im Zellrasen, wobei schon kleine Änderungen in der Barriereintegrität (0,4%) eine signifikante Änderung des gemessenen TEER Wertes (80%) verursachen können.^[178]

Der Permeabilitätsassay ist eine weitere Möglichkeit zur Validierung der Barriereintegrität. Das zugrunde liegende Prinzip beruht auf dem Transport eines mit einem Fluorophor oder radioaktiv-markierten Stoffes durch das Endothel. Bei der Auswahl des Transportmoleküls ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es nicht ins Zellinnere aufgenommen oder von endothelialen Enzymen abgebaut werden kann. Ebenfalls sollte es sich nicht um Substrate der endothelialen Rezeptoren oder Efflux-Pumpen handeln.^[32, 179] Für diese Zwecke eignen sich kleine Moleküle wie Saccharose oder größere Polysaccharide wie Dextrane oder Albumin. Die Analyse der Permeabilität erfolgt durch die Bestimmung der durch die Barriere transportierten Molekülmenge innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls.^[180, 181] Da viele *in vitro* Modelle auf den Transwell-Systemen basieren, wurde das Prinzip des Permeabilitätsassays für diese Systeme konzipiert. In Transwell-Systemen erfolgt dies durch die Applikation des Stoffes auf der oberen Seite des Filters und die Probenentnahme aus dem unteren Kompartiment und der anschließenden Messung der Fluoreszenz bzw. der Radioaktivität des transportierten Stoffes. Die Formel 1 beschreibt die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} ^[182-184].

$$P_{app} = \frac{J_s}{S * \Delta C} \quad (1)$$

P_{app} = Permeabilitätskoeffizient in cm/s

J_s = Transport durch die Barriere (Membran und Zelllayer) in $\mu\text{g/s}$

S = Grenzfläche (Fläche des Wells) in cm^2

ΔC = Anfangskonzentration im apikalen Kompartiment in $\mu\text{g/cm}^3$

Dabei ist zu beachten, dass die in den Transwell-Systemen eingebauten Membranen ebenfalls einen Einfluss auf die Transporteigenschaften des untersuchten Stoffes haben. Die Formel 2 beschreibt die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten der Zellen P_{Zellen} ohne Membraneinfluss $P_{Membran}$:

$$\frac{1}{P_{Zellen}} = \frac{1}{P_{Total}} - \frac{1}{P_{Membran}} \quad (2)$$

Unter „Organs-on-Chips“ fand diese Methode allerdings bisher wenig Anwendung. Lediglich bei einem System von Booth und Kim (2012) wurden die Permeabilitätswerte bestimmt.^[43] Folglich muss eine entsprechende Methode für mikrofluidische Modelle erst etabliert werden. Dabei galt es festzustellen, ob das oben beschriebene Verfahren für Transwell-Systeme auf dynamische „Organs-on-Chips“ übertragbar bzw. ob ein Vergleich zwischen den beiden Modelltypen möglich ist. Dies war insbesondere in Hinblick auf die Messdaten wichtig, denn die meisten Richtwerte für die Permeabilität biologischer Barrieren wurden mit Hilfe von Transwell-Systemen erzielt.

Daher fand im Rahmen dieser Arbeit eine Entwicklung der Methode zur dynamischen Permeabilitätsmessung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor statt. Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 26 dargestellt. Das 3 kDa Dextran-FITC wurde in einer Spritze im zellspezifischen Medium vorgelegt und mit einer Flussrate von 1 ml/h in den PC-Mikrokanal mit Hilfe eines Pumpensystems (Fusion 200, Chemyx) über drei Stunden injiziert. Eine weitere Spritze mit zellspezifischem Medium wurde mit einem Einlass des unteren Kompartiments verbunden. Die Flussrate im unteren Kompartiment betrug ebenfalls 1 ml/h. Um den Größenunterschied der beiden Kompartimente auszugleichen bzw. den Druckabfall aufgrund der akkumulierenden Luftblasen zu minimieren, wurden beide an eine Widerstandseinheit angeschlossen. Aufgrund eines kleinen osmotischen Drucks des 3 kDa Dextran-FITCs ($10 \mu\text{g/ml}$: $8,591 \text{ Pa} = 0,08157 \text{ cm H}_2\text{O}$) und eines größeren von Albumin (50 mg/ml im Serum (2% im EGM-2): $39 \text{ Pa} = 0,3977 \text{ cm H}_2\text{O}$), konnte Albumin bei der Bestimmung der Diffusion von 3 kDa Dextran-FITC vernachlässigt werden.^[185] Unter diesen Bedingungen wurde ein konstanter Mediumausfluss aus beiden Kompartimenten gewährleistet. Die Probenentnahme erfolgte alle 30 Minuten. Die Detektion der Fluoreszenz wurde mittels SpectraMax Microplate Reader durchgeführt.

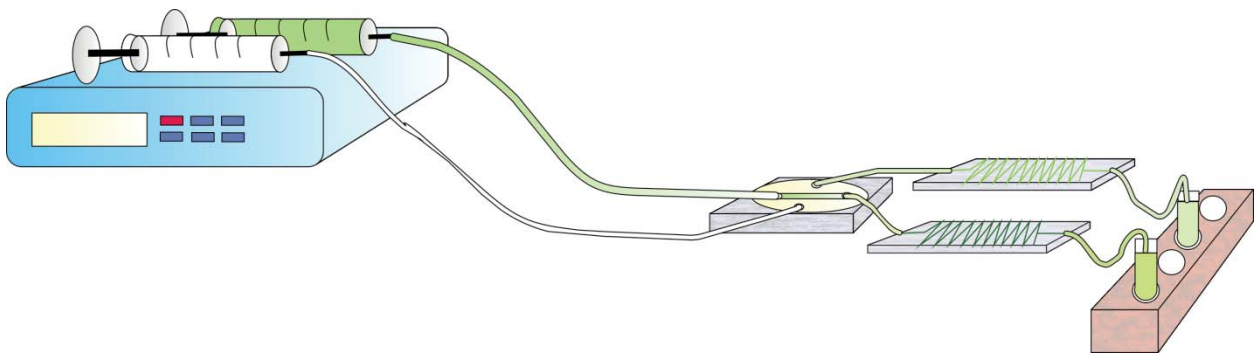


Abbildung 26: Schematische Darstellung des experimentellen Versuchsaufbaues zur Permeabilitätsuntersuchung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Um den Druckunterschied zwischen den beiden mikrofluidischen Kompartimenten infolge der Luftblasenaggregation zu verhindern bzw. den Größenunterschied auszugleichen, wurden diese jeweils an eine Widerstandseinheit angeschlossen. Das 3 kDa Dextran-FITC (grün) wurde in den PC-Mikrokanal mit Hilfe einer Spritze mit einer Flussrate von 1 ml/h über 3 Stunden injiziert. Gleichzeitig wurde das untere Kompartiment mit zellspezifischem Medium mit der gleichen Flussgeschwindigkeit durchströmt. Proben wurden im Abstand von 30 Minuten aus beiden Kompartimenten gesammelt und die Fluoreszenzintensität mittels SpectraMax Microplate Reader gemessen.

Mikrofluidische Widerstandseinheiten

Der PC-Mikrokanal und das untere Kompartiment unterscheiden sich sehr in ihrer Größe und liefern somit unterschiedliche Widerstände. Dieser Unterschied im Widerstand würde beim Anlegen des Flusses der gleichen Geschwindigkeit in den beiden Kompartimenten im konvektiven Flussprofil resultieren und die Diffusion von 3 kDa Dextran-FITC beeinflussen. Um den Größenunterschied der beiden Kompartimente des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors zu kompensieren und lediglich die Diffusion des 3 kDa Dextran-FITCs aus dem PC-Mikrokanal ins untere Kompartiment zu untersuchen, wurden diese an zwei mikrofluidische Widerstandseinheiten angeschlossen, welche im Vergleich zu dem größten Eigenwiderstand des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors, dem PC-Mikrokanal, einen viel größeren Widerstand besitzen. Hierzu wurden drei unterschiedliche Typen der Widerstandseinheiten getestet, die mit Hilfe eines Mikroformverfahrens aus PDMS hergestellt und vom Wyss Institut bereitgestellt wurden. Basierend auf den Dimensionen der Widerstandseinheiten (Tabelle 1) wurden Flussraten berechnet, die

durch das Anlegen von 30 cm H₂O zustande kommen würden. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Widerstandseinheiten als „100 µl/h“, „1 ml/h“ und „2 ml/h“ bezeichnet.

Tabelle 1: Dimensionen der mikrofluidischen Widerstandseinheiten.

Widerstandseinheit	„100 µl/h“	„1 ml/h“	„2 ml/h“
Weite in µm	70	130-160	350
Höhe in µm	45	50	50
Länge in cm	2	2	2

Von jedem dieser Typen wurden jeweils zwei Widerstandseinheiten hergestellt und durch das Anlegen von 25 cm H₂O (2451 Pa) getestet (Abbildung 27). Für jedes Paar wurde der hydraulische Widerstand durch Wiegen der ausfließenden Flüssigkeit (kg/h) bestimmt und untereinander verglichen. Die Handhabung der „100 µl/h“ Widerstandseinheit erwies sich aufgrund der darin akkumulierenden Luftblasen als schwierig. Die Geometrie des Kanals war sehr klein, woraufhin die Ansammlung von Staubkörnern darin zur sofortigen Blockade des Flusses führte. Des Weiteren wiesen die beiden Widerstandseinheiten dieses Typs die größten Differenzen untereinander auf. Die besten Übereinstimmungen konnten mit den „1 ml/h“ Widerstandseinheiten erzielt werden. Die „2 ml/h“ Widerstandseinheiten hatten ebenfalls eine gute Übereinstimmung, allerdings geringer als bei „1 ml/h“.

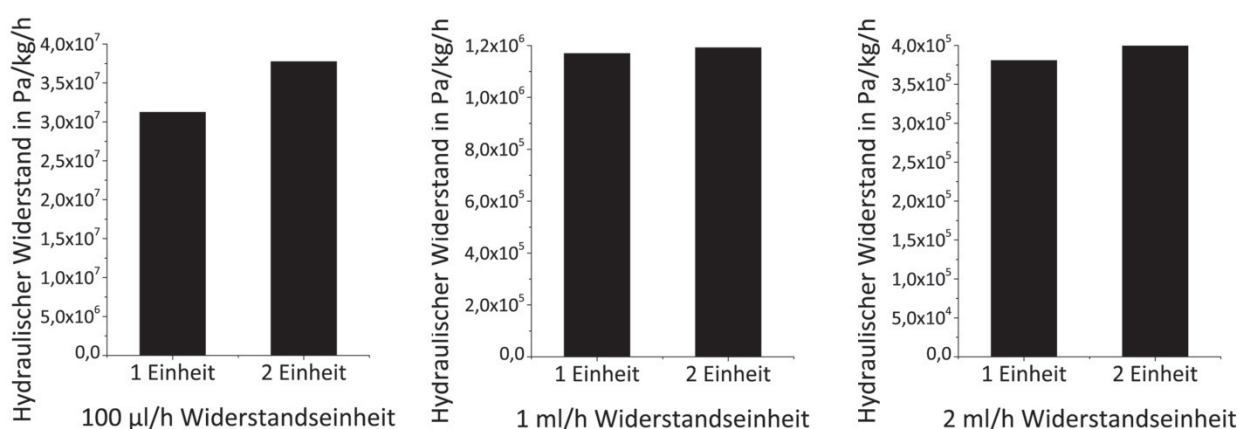


Abbildung 27: Vergleich der Widerstandseinheiten des gleichen Typs anhand ihres hydraulischen Widerstands. Der hydraulische Widerstand wurde durch das Anlegen von 25 cm H₂O (2451 Pa) und Wiegen der ausströmenden Flüssigkeit in kg/h berechnet.

Im nächsten Schritt galt es herauszufinden, welches Widerstandseinheitenpaar den größten Widerstand im Vergleich zum PC-Mikrokanal des μ 3D V_{asc} Bioreaktors liefert. Aufgrund der Tatsache, dass der Druckunterschied variabel sein kann und einen direkten Einfluss auf die Flussrate Q hat, wurde das Verhältnis $\Delta p/Q$ für jedes Paar bestimmt. Der Druckunterschied Δp zwischen den beiden Enden einer Widerstandseinheit, die einen rechteckigen mikrofluidischen Kanal darstellt, wurde mit Formel 3 ermittelt. Dabei stehen L für die Kanallänge, Q für die volumetrische Flussrate, h für die Kanalhöhe,



w für die Kanalweite und η für die dynamische Viskosität des Wassers.^[186] Die Berechnung der Viskosität des Wassers η bei 37 °C erfolgte mittels Vogel-Fulcher-Gleichung (Formel 4).^[187]

$$\Delta p = \frac{12\eta L Q}{wh^3} / [1 - 0,63 \tanh\left(\frac{h}{w}\right)] \quad (3)$$

$$\log \eta = A + \frac{B}{T(K) - C} \quad (4)$$

$$A = 2,14 \times 10^{-5} \text{ Pa} \times \text{s}$$

$$B = 247,8 \text{ K}$$

$$C = 140 \text{ K}$$

Der PC-Mikrokanal des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors besitzt eine gekrümmte Oberfläche, weshalb seine Geometrie als ein runder Kanal angenommen wird. Der Druckunterschied Δp zwischen den beiden Enden eines runden mikrofluidischen Kanals kann nach der Hagen-Poiseuille Gleichung berechnet werden (Formel 5). Dabei stehen L für die Kanallänge, Q für die volumetrische Flussrate, r für den Kanalradius, D für den Kanaldurchmesser, η für die dynamische Viskosität des Wassers, v für die durchschnittliche Flussrate durch den Kanalquerschnitt.^[188]

$$\Delta p = \frac{8\eta L Q}{\pi r^4} = \frac{8\eta L v}{r^2} = \frac{32\eta L v}{D^2} \quad (5)$$

Anschließend wurde ein Mittelwert aus den berechneten $\Delta p/Q$ Werten für jedes Widerstandseinheitenpaar gebildet und das Verhältnis $\Delta p/Q_{\text{Widerstandseinheit}}$ durch $\Delta p/Q_{\text{PC-Mikrokanal}}$ bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammenfassung der jeweiligen Unterschiede der mikrofluidischen Widerstandseinheiten im Vergleich zum PC-Mikrokanal des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors.

	100 $\mu\text{l/h}$	1 ml/h	2 ml/h	PC-Mikrokanal
$\Delta p/Q$ in $\text{Pa} \cdot \text{s}/\text{m}^3$	$26,1 \times 10^{12}$	$9,25 \times 10^{12}$	$3,8 \times 10^{12}$	$4,3 \times 10^9$
$\Delta p/Q_{\text{Widerstandseinheit}}$	6070	2151	883	1
$\Delta p/Q_{\text{PC-Mikrokanal}}$				

Die „1 ml/h“ Widerstandseinheiten boten einen ca. 2000-fach höheren Widerstand als der mikrofluidische PC-Mikrokanal des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors (Tabelle 2). Die „2 ml/h“ Widerstandseinheiten wiesen einen geringeren Widerstand (883-fach) und zeigten größere Unterschiede untereinander auf (Abbildung 27), weshalb „1 ml/h“ Widerstandseinheiten für die nachfolgenden Untersuchungen benutzt wurden. Die Benutzung der „100 $\mu\text{l/h}$ “ Widerstandseinheiten wurde aufgrund der schwierigen Handhabung ausgeschlossen, wenngleich sie den höchsten Widerstandsunterschied zum PC-Mikrokanal aufwiesen.



Zur Veranschaulichung der Notwendigkeit der Widerstandseinheiten zwischen den beiden Kompartimenten eines $\mu 3DVasc$ Bioreaktors und den Auffangbehältern, wurde ein Experiment mit dem offenen unteren Kompartiment durchgeführt (Abbildung 28). Dafür wurden die beiden Öffnungen des unteren Kompartiments jeweils mit einem kurzen Schlauch der gleichen Länge mit Auffangbehältern verbunden. Der Flüssigkeitsstrom von 5 ml/h erfolgte durch beide Kompartimente. Das ausfließende Medium wurde gesammelt und durch Wiegen der Flüssigkeit analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass der Mediumausfluss nicht konstant war. Der Flüssigkeitsgehalt variierte zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

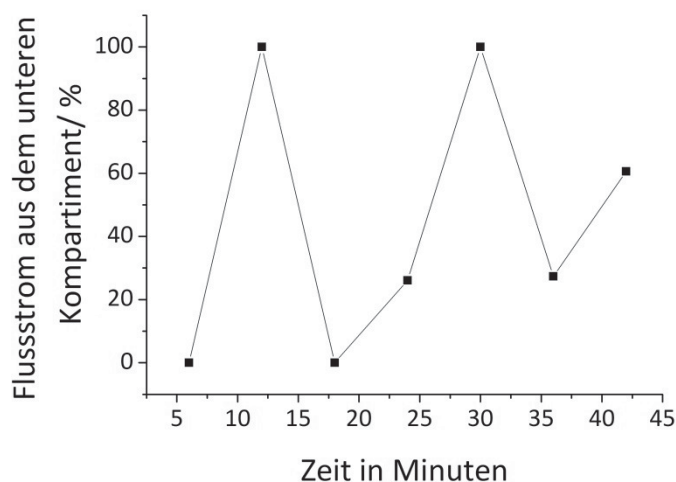


Abbildung 28: Test der Notwendigkeit der Benutzung der Widerstandseinheiten beim Permeabilitätsassay. Der PC-Mikrokanal wurde mit 0,9 mg/ml Fibronectin und das untere Kompartiment mit 0,6 mg/ml Kollagen in $1 \times \text{PBS}^{-/}$ beschichtet. Um den Flüssigkeitsstrom aus beiden Kompartimenten ohne Zwischenschaltung von mikrofluidischen Widerstandseinheiten zu untersuchen, wurde eine Flussrate von 5 ml/h in beiden Kompartimenten des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors angelegt. Proben wurden im Abstand von 6 Minuten gesammelt und durch Wiegen des Flüssigkeitsgehalts ($500 \mu\text{l} = 100\%$) analysiert. Jedes Experiment wurde wiederholt durchgeführt ($n = 2$).

Untersuchung des Einflusses der Beschichtung mit EZM

Um zu testen, ob die Beschichtung mit verschiedenen Komponenten der EZM einen Einfluss auf die Permeabilität des 3 kDa Dextran-FITCs hat, wurde ein Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden PC-Membranen ($5 \mu\text{m}$ Porengröße, 4×10^5 Poren/ cm^2) mit 0,9 mg/ml Fibronectin auf der oberen Seite, sowie mit 0,6 mg/ml Kollagen, 3,5 mg/ml Hyaluronsäure, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Matrigel und einem Gemisch aus 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen und 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Matrigel auf der Rückseite beschichtet. Als Kontrolle diente eine nicht beschichtete PC-Membran. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 zusammengefasst. Es wurde deutlich, dass verschiedene Komponenten der EZM einen unterschiedlich starken Einfluss auf den Permeabilitätskoeffizienten P_{app} ausüben. Der Vergleich zur nicht beschichteten PC-Membran zeigte, dass alle Komponenten die Permeabilität des 3 kDa Dextran-FITCs verringerten, wobei das Matrigel die stärkste Wirkung zeigte.

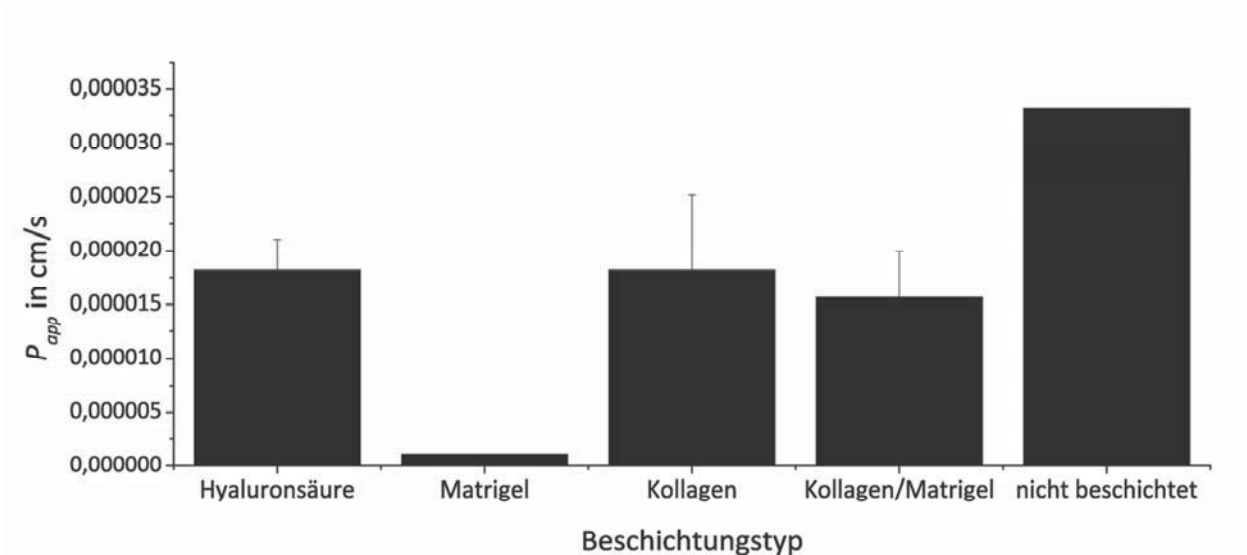


Abbildung 29: Gegenüberstellung der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) des 3 kDa Dextran-FITCs für PC-Membranen ($5 \mu\text{m}$ Porengröße, 4×10^5 Poren/ cm^2) in einem Transwell-System ($n = 2$). Die PC-Membranen wurden mit $0,9 \text{ mg/ml}$ Fibronectin auf der oberen Seite und entweder mit $3,5 \text{ mg/ml}$ Hyaluronsäure, $300 \mu\text{g/ml}$ Matrigel, $0,6 \text{ mg/ml}$ Kollagen oder mit $50 \mu\text{g/ml}$ Kollagen plus $300 \mu\text{g/ml}$ Matrigel auf der Rückseite beschichtet. Als Kontrolle diente eine nicht beschichtete PC-Membran. Um die Permeabilität des 3 kDa Dextran-FITCs ($10 \mu\text{g/ml}$) zu testen, wurde dieses Molekül in EGM-2 auf der oberen Membranseite appliziert. Proben wurden im Abstand von 15 Minuten aus dem unteren Kompartiment gesammelt und die Fluoreszenzintensität mittels SpectraMax Microplate Reader gemessen.

Im nächsten Schritt wurden PC-Membranen ($5 \mu\text{m}$ Porengröße, 4×10^5 Poren/ cm^2) mit den oben genannten EZM-Komponenten beschichtet und mit 3×10^4 HUVEC besiedelt, woraufhin der Permeabilitätsassay erneut durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 zusammengefasst. Dargestellt sind die P_{app} Werte von HUVEC-Layern, d.h. nach Abzug der P_{app} Werte der PC-Membranen. Es konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung mit EZM-Komponenten das Wachstum der Zellen beeinflusst. Während die Beschichtungen mit Matrigel bzw. mit Matrigel/Kollagen einen Layer mit der niedrigsten Permeabilität zur Folge hatten, wies der HUVEC-Layer auf mit Kollagen beschichteten Membranen die höchste Permeabilität auf.

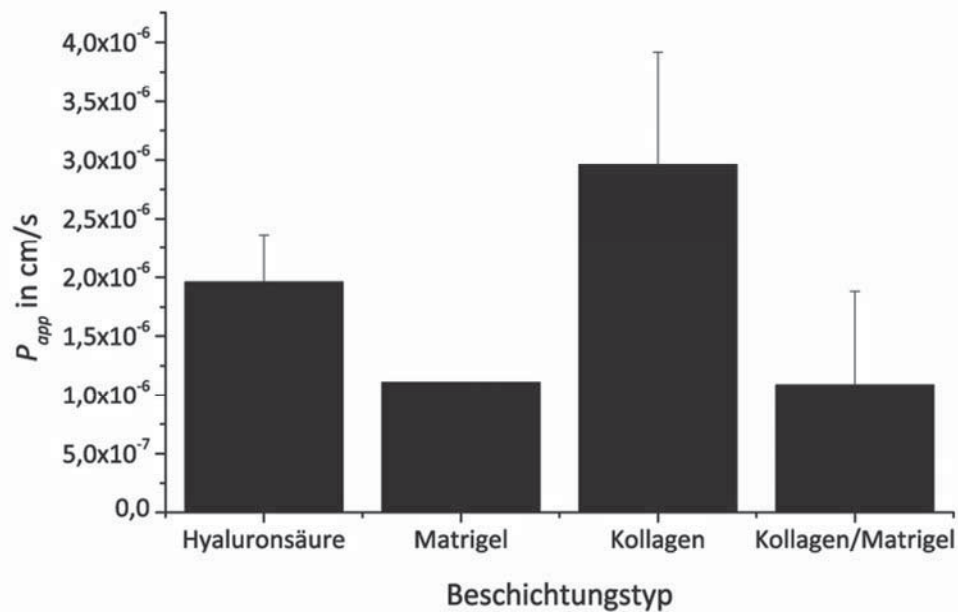


Abbildung 30: Gegenüberstellung der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) des 3 kDa Dextran-FITCs für HUVEC-Layer, kultiviert auf einer PC-Membran (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 4×10^5 Poren/ cm^2) in einem Transwell-System, Tag 5 ($n = 2$). Die Beschichtung der PC-Membranen erfolgte mit $0,9 \text{ mg/ml}$ Fibronectin auf der oberen Seite und entweder mit $3,5 \text{ mg/ml}$ Hyaluronsäure, $300 \mu\text{g/ml}$ Matrigel, $0,6 \text{ mg/ml}$ Kollagen oder mit $50 \mu\text{g/ml}$ Kollagen plus $300 \mu\text{g/ml}$ Matrigel auf der Rückseite. HUVEC (3×10^4) wurden auf der oberen Seite der PC-Membranen bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ kultiviert. Um die Permeabilität des 3 kDa Dextran-FITCs ($10 \mu\text{g/ml}$) durch die HUVEC-Layer zu untersuchen, wurde dieses Molekül in EGM-2 auf die obere Membranseite gegeben. Proben wurden im Abstand von 15 Minuten aus dem unteren Kompartiment gesammelt und die Fluoreszenzintensität mittels SpectraMax Microplate Reader gemessen. Die P_{app} Werte der PC-Membranen wurden abgezogen.

Zur Überprüfung der Unversehrtheit der HUVEC-Layer wurde ein immunhistochemischer Nachweis der PECAM-1-Expression in allen Transwell-Systemen durchgeführt (siehe 9 II). Hier zeigt sich, dass PECAM-1 an den Zell-Zell-Kontakten exprimiert wurde und somit ein dichter Layer mit ausgeprägten Tight Junctions vorlag. Die 3D-Rekonstruktion zeigte jedoch, dass die HUVEC auf PC-Membranen (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 4×10^5 Poren/ cm^2) einen Doppellayer bilden. Der Abstand zwischen den beiden Zell Layern deutet darauf hin, dass die HUVEC durch die Poren aus der oberen Membranseite auf die Rückseite der Membran wandern konnten (Abbildung 31, Beispiel der Hyaluronsäure).

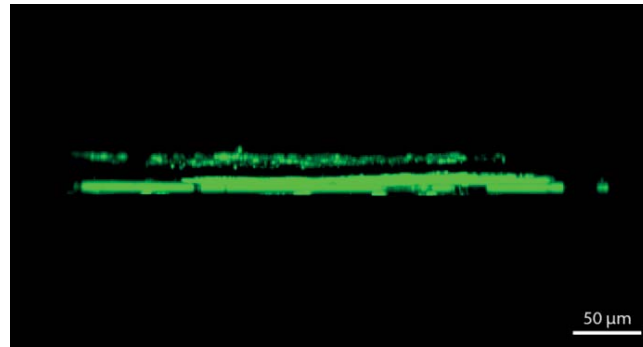


Abbildung 31: HUVEC in einem Transwell-System, Tag 7 (z-Stapel). HUVEC (3×10^4) wurden auf der oberen Seite einer mit Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten PC-Membran (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 4×10^5 Poren/ cm^2) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ kultiviert. Die Rückseite der PC-Membran wurde mit Hyaluronsäure (3,5 mg/ml) beschichtet. Die Versorgung der Zellen erfolgte mit EGM-2. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums auf der PC-Membran wurde ein z-Stapel von $27 \mu\text{m}$ (10 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. Maßstab = $50 \mu\text{m}$.

Zur Aufklärung des beobachteten HUVEC-Wachstums in Doppellayern in Transwell-Systemen wurde eine Charakterisierung der verwendeten PC-Membranen (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 4×10^5 Poren/ cm^2 , Dicke $10 \mu\text{m}$) mit Hilfe von REM durchgeführt. In Abbildung 32 (a – c) ist eine solche PC-Membran dargestellt. Die gemessene Porengröße von $4,9 \mu\text{m}$ entsprach den Angaben des Herstellers, Corning Life Science, (Abbildung 32 b). Die Poren werden nach einer „Track-Etch-Methode“ hergestellt, wobei die Membranen mit radioaktiven Teilchen beschossen werden, die kleine Spuren formen. Diese Spuren werden anschließend durch nasschemisches Ätzen zu Poren geöffnet.^[189] Diese Technik ist der SMART-Technologie (Abbildung 32 d – f) sehr ähnlich, jedoch werden dabei die Poren mit Hilfe von Schwerionenbeschuss in hohen Energiebereichen (MeV – GeV) erzeugt. Hierbei kommt es zu einem physikochemischen Abbau von Polymerketten an den entsprechenden Stellen entlang der Ionenspur. Je nach Ätzzeit und Ätztemperatur, sowie der Konzentration der Ätzlösung kann die Porengröße variiert werden. Anhand der REM Aufnahmen wurde deutlich, dass die Poren der PC-Membranen in Transwell-Systemen oft keine vollständige Öffnung aufwiesen (Abbildung 32 b). Außerdem wurden häufig kleinere Poren horizontal zu großen Poren beobachtet (Abbildung 32 c). Diese Oberflächenbeschaffenheit unterschied sich somit, trotz eines ähnlichen Herstellungsprozesses, in der Anordnung und Qualität der Poren, die mit der SMART-Technologie erzeugt wurden (Abbildung 32 d – f).

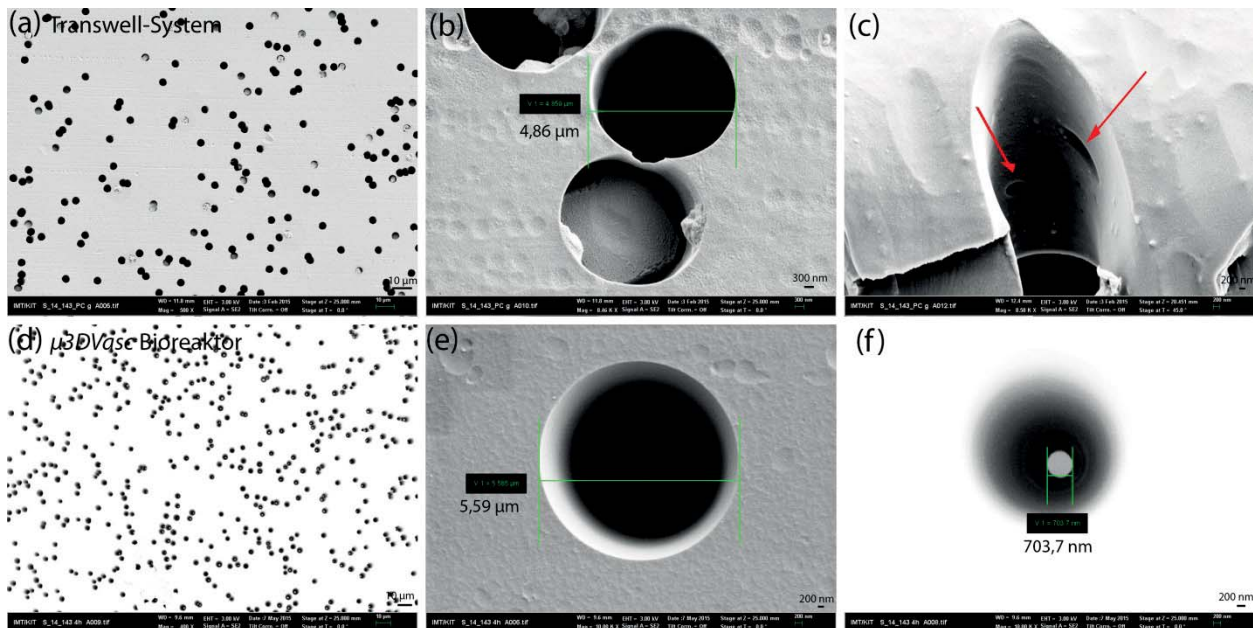


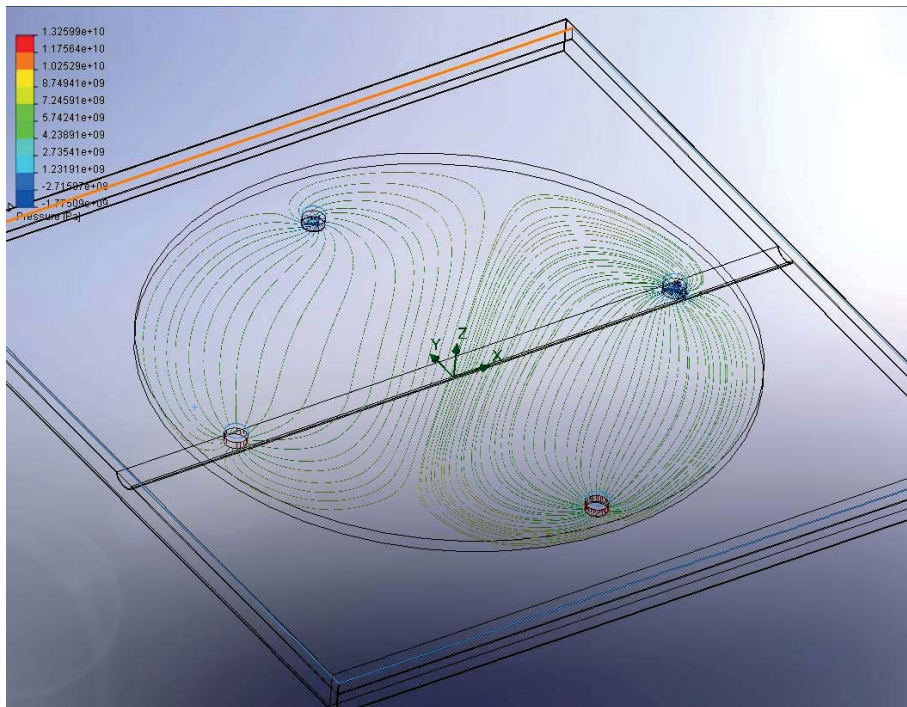
Abbildung 32: REM Aufnahmen einer PC-Membran (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 4×10^5 Poren/ cm^2 , Dicke $10 \mu\text{m}$, Corning Life Science) eines Transwell-Systems (a – c) und einer geformten PC-Membran (Porengröße $5 \mu\text{m}$, 1×10^6 Ionen/ cm^2 , $50 \mu\text{m}$ Dicke, it4ip, Belgien) des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors (d – f). Die PC-Membranen in Transwell-Systemen wurden nach „Track-Etch-Methode“ hergestellt. Die mit Schwerionenbeschuss physikalisch modifizierten PC-Membranen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurden nach der SMART-Technologie (4 Stunden Ätzzeit mit 5 N NaOH unter Zusatz von $0,01\%$ Dowfax™) hergestellt. (a) PC-Membranausschnitt eines Transwell-Systems. (b) Äußerer Porendurchmesser eines Transwell-Systems. (c) Innerer Porendurchmesser eines Transwell-Systems mit kleineren, horizontalen Poren (Pfeile). (d) PC-Membranausschnitt eines geformten, nicht verschlossenen PC-Mikrokanales im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. (e) Äußerer Porendurchmesser im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. (f) Innerer Porendurchmesser im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Maßstab = $10 \mu\text{m}$ (a, d) bzw. 300 nm (b) bzw. 200 nm (c, e, f).

Permeabilität im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor

Zur Untersuchung der Permeabilität des HUVEC-Layers im porösen PC-Mikrokanal wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Bastian E. Rapp (IMT) eine Simulation der Partikelbewegung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor mittels FlowWorks, dem Simulationsmodul der SolidWorks-Software, durchgeführt. Basierend auf den Dimensionen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors (Tabelle 3) und auf dem Aufbau des Permeabilitätsassays wurde der Weg eines Partikels, welcher mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/h injiziert wurde, simuliert. In Abbildung 33 sind die Streamlines dargestellt, welche den Weg eines am Einlass eingesetzten Partikels durch den $\mu 3DVasc$ Bioreaktor darstellen. Die Ergebnisse der Simulation zeigen, dass der Weg des Partikels im leeren PC-Mikrokanal aufgrund der großen Poren und der senkrechten Anordnung der Luer-Anschlüsse der beiden Kompartimente durch den Mediumfluss im unteren Kompartiment abgelenkt wird.

Tabelle 3: Dimensionen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors.

PC-Mikrokanal	<p>300 μm \times 1 mm \times 20 mm (h \times w \times l)</p> <p>Membrandicke 50 μm, an der Wand 23,5 μm wegen der Verstreckung nach dem Thermoformen</p> <p>1 \times 10⁶ Poren/cm², Porengröße außen zwischen 1,6 μm und 5 μm</p> <p>Einlass/Auslass in der PC-Membran: 0,9 mm</p> <p>PMMA-Block mit Luer-Anschlüssen</p>
Unteres Kompartiment	<p>500 μm (h)</p> <p>Innerer Durchmesser 2,4 cm</p> <p>Distanz vom Zentrum bis zur Mitte eines Einlasses/Auslasses 1,9 cm</p> <p>Distanz vom Rand bis zum Zentrum des Einlasses/Auslasses in der PC-Membran 2,05 mm</p>

**Abbildung 33: Gesamtübersicht der Streamlines der Partikelbewegung im leeren $\mu 3DVasc$ Bioreaktor.**

Da der PC-Mikrokanal somit einen sehr geringen Widerstand liefert, war eine akkurate Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) leerer PC-Mikrokanäle, wie es bei Transwell-Systemen gemacht wird, im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor nicht ausführbar. Die Erhöhung des Widerstands des porösen PC-Mikrokanals kann jedoch durch die Besiedlung mit Zellen erreicht werden, da diese eine natürliche dichte Barriere darstellen. Folglich wurden die P_{app} Werte von HUVEC-Layern ohne vorherige Messung leerer PC-Membranen bestimmt (Abbildung 34 $\mu 3DVasc$). Um trotzdem einen Vergleich zu Transwell-Systemen zu ermöglichen, wurden die P_{app} Werte von HUVEC, kultiviert auf Transwell-Filtern, mit (Abbildung 34 Transwell (-PC)) und ohne Abzug (Abbildung 34 Transwell (+PC)) der P_{app} Werte der PC-Membranen experimentell ermittelt. Es wurde eine höhere Permeabilität des HUVEC-Layers im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor im Vergleich zum Transwell-System gemessen.

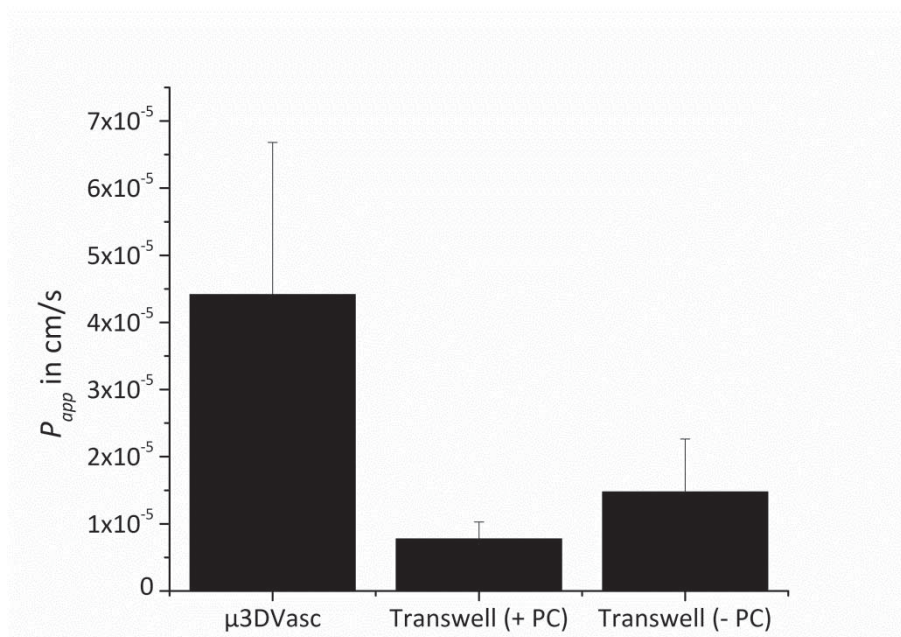


Abbildung 34: Gegenüberstellung der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) der mit HUVEC besiedelten $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren ($n = 5$) und der Transwell-Systeme ($n = 3$), Tag 3. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. Um die Permeabilität des 3 kDa Dextran-FITCs (10 μ g/ml) aus dem mikrofluidischen PC-Mikrokanal in das untere Kompartiment zu untersuchen, wurden beide Kompartimente des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit dem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) verbunden und eine Flussrate von 1 ml/h angelegt. Proben wurden im Abstand von 30 Minuten gesammelt und die Fluoreszenzintensität mittels SpectraMax Microplate Reader gemessen. Die Beschichtung der PC-Membran, Besiedlung und Kultivierung von HUVEC (3×10^4) in Transwell-Systemen sowie die Auswertung erfolgten analog zum $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, allerdings unter statischen Bedingungen. Die Proben wurden im Abstand von 15 Minuten gesammelt.

Wenngleich der im Rahmen dieser Arbeit gemessene Permeabilitätskoeffizient P_{app} für Transwell-Systeme ($7,7 \times 10^{-6}$ cm/s (+PC) bzw. $1,47 \times 10^{-5}$ cm/s (-PC)) niedriger war als der des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors ($4,4 \times 10^{-5}$ cm/s), haben beispielsweise Horiuchi et al. (2009) über einen um 50-fach höheren Permeabilitätswert P_{app} ($2,3 \times 10^{-4}$ cm/s) des 4 kDa Dextrans für einen HUVEC-Layer berichtet.^[190] Darüber hinaus wurden in der Studie von Weksler et al. (2005) auch höhere Permeabilitätswerte des 4 kDa Dextrans für Endothelzellen, welche aus dem Gehirn isoliert wurden, gemessen.^[100] Es handelte sich dabei um die hCMEC/D3 (engl. Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells) mit einem P_{app} von $3,5 \times 10^{-4}$ cm/s, eine immortalisierte Zelllinie GPNT aus einem Rattenhirn mit einem P_{app} von $9,75 \times 10^{-4}$ cm/s und Endothelzellen aus einem Kalbshirn mit P_{app} von $4,34 \times 10^{-4}$ cm/s. Es ist nun von Bedeutung, die dynamischen Modelle unter den „Organs-on-Chips“ in Zukunft miteinander zu vergleichen, weil sie mehr strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, und einen Standard für diese Modelle festzulegen.



4.4.5 Versorgung des unteren Kompartiments

Die Etablierung eines „durchbluteten“ Barriremodells benötigt eine gute Versorgung des organotypischen Gewebes im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors. Es ist bekannt, dass der Abstand zwischen den Blutgefäßen *in vivo* zwischen 100 μm und 400 μm beträgt.^[191] Somit war es von Interesse, die Versorgung des unteren Kompartiments durch den porösen PC-Mikrokanal des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors zu analysieren. Hierzu wurde die Penetrationsfähigkeit des Fibringels mit den darin in 3D-Anordnung wachsenden humanen Fibroblasten ($4,4 \times 10^6$ Zellen) untersucht. Dazu wurde ein Fibringel nach dem Protokoll von Nakatsu et. al (2007) hergestellt, indem Fibrinogen-1 \times PBS^{-/-}-Lösung mit Aprotinin (0,15 Units/ml) gegen den vorzeitigen Abbau und Thrombin (0,625 Units/ml) zur Quervernetzung gemischt wurde.^[192] Das Kollagen (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) diente der besseren Vernetzung der humanen Fibroblasten. Der grün fluoreszierende Farbstoff CellTrackerTM Green (20 μM) wurde dem fluidischen PC-Mikrokanal zugeführt. CellTrackerTM Green kann ungehindert die Zellmembran passieren und markiert das Zytosol. Des Weiteren kann der Farbstoff an die Tochtergeneration weitergegeben werden.^[193] Um das Ausmaß der Fluorophor-Penetration zu untersuchen, wurde ein z-Stapel in der Höhe von 100 μm , was der Höhe zwischen dem porösen PC-Mikrokanal und dem Boden des unteren Kompartiments entspricht, mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Abbildung 35). Es konnte gezeigt werden, dass die Versorgung der 3D-Zellkultur im Fibringel über den porösen PC-Mikrokanal bis zum Boden des unteren Kompartiments stattfindet (Abbildung 35 b, e). Außerdem konnte anhand der Zellfärbung gefolgert werden, dass die Fibroblasten in der Nähe des porösen PC-Mikrokanals oder direkt darunter mit dem Medium und dem darin enthaltenen Farbstoff besser versorgt waren, als die weiter entfernten Zellen. Dabei betrug die Penetrationsweite von CellTrackerTM Green seitlich des PC-Mikrokanals maximal 750 μm (Abbildung 35 a, d, c, f).

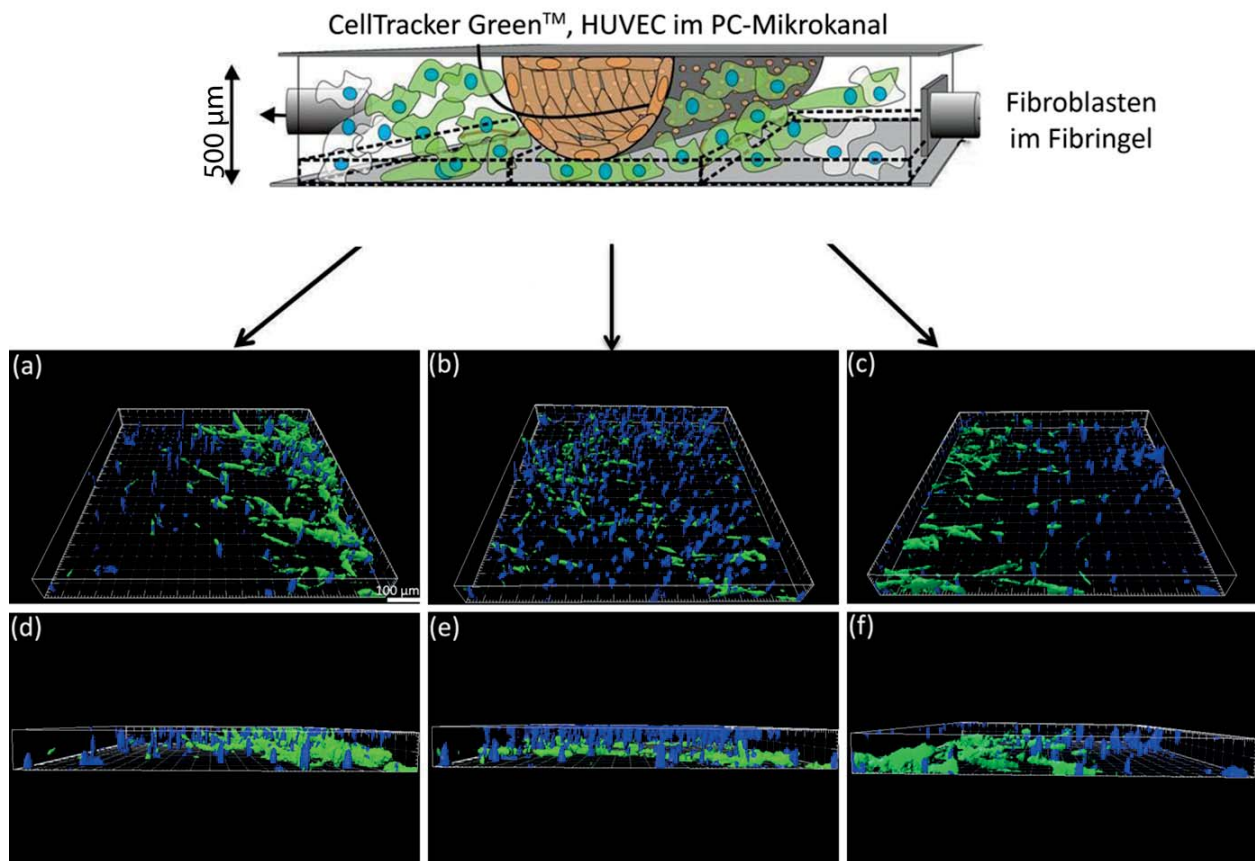


Abbildung 35: Untersuchung der Versorgung der Fibroblasten im Fibringel im unteren Kompartiment des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors, Tag 5 (z-Stapel). Fibroblasten ($4,4 \times 10^6$) wurden mit Fibrinlösung (4 mg/ml in $1 \times PBS^{-}$), Aprotinin (0,15 Units/ml), Thrombin (0,625 Units/ml) und Kollagen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vermischt und im unteren Kompartiment des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors als 3D-Zellkultur im Fibringel bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte über den porösen, mit HUVEC ($1,25 \times 10^6$) besiedelten PC-Mikrokanal mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von $150 \mu\text{l}/\text{min}$. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die Fibroblasten zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt. Zur Untersuchung der Versorgung der 3D-Zellkultur mit Medium durch den porösen PC-Mikrokanal wurde der grüne Farbstoff CellTracker™ Green ($20 \mu\text{M}$) in den PC-Mikrokanal gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Um die Verteilung der Fibroblasten im Fibringel zu untersuchen, wurde ein z-Stapel von $100 \mu\text{m}$ (78 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a, c, d, f) Projektionen seitlich des porösen PC-Mikrokanals. (b, e) Projektionen unter dem porösen PC-Mikrokanal. Maßstab = $100 \mu\text{m}$.

4.5 Blut-Hirn-Schranke

Nach der qualitativen Analyse des artifiziellen Blutgefäßes, wurde der Fokus auf die Etablierung eines „durchbluteten“ Barrieremodells gelegt. Hierzu dienten drei Organe als Ausgangspunkt: die Blut-Hirn-Schranke (BBB) als die dichteste Barriere, der Darm als eine durchlässige Barriere und die Leber als ein Modell für ein fenestriertes Organ.^[21, 22]

Zur Etablierung der BBB im mikrofluidischen $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurden zunächst drei Zelltypen humanen Ursprungs verwendet: HUVEC, Perizyten aus der Plazenta (hPC-PL, engl. Human Pericytes from Placenta) und Astrozyten aus der Hirnrinde (HA, engl. Human Astrocytes) (Abbildung 36). Um das Wachstum aller drei Zelllinien im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor zu gewährleisten, war es notwendig, die dafür geeigneten Bedingungen zu definieren. Dazu zählten z.B. die Wahl des Mediums, Bestandteile der EZM zum Anhaften der Zellen auf der PC-Membran, Zellzahlen, Kultivierungszeiträume und Flussraten. Die Bestimmung dieser Parameter wird in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

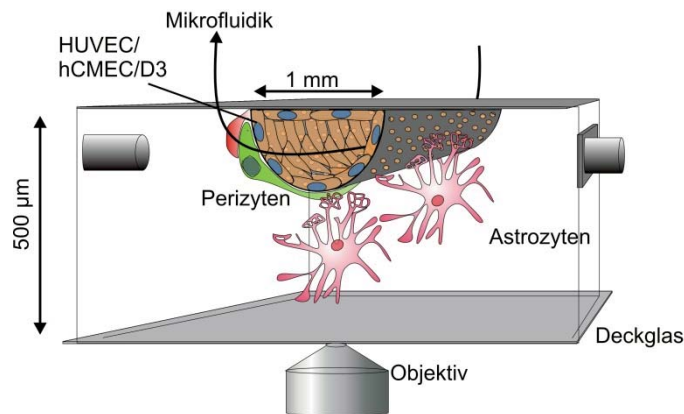


Abbildung 36: Schematischer Aufbau der BBB im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Das Modell besteht aus einem artifiziellen Blutgefäß aus einer Endothelschicht auf einer porösen PC-Membran, umgeben von einer organotypischen Kultur aus Perizyten und Astrozyten.

4.5.1 Bestimmung geeigneter Nährmedien

Die Ergebnisse in Kapiteln 4.5.1.1 und 4.5.1.2 entstanden in Zusammenarbeit mit M.Sc. Vanessa Kappings am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) am KIT.^[194]

4.5.1.1 Konditioniertes Nährmedium

Astrozyten stehen mit ihren langen Ausläufern in direktem Kontakt mit Endothelzellen und Neuronen und stellen somit eine Verbindung zwischen diesen beiden Zelltypen dar. Astrozyten-Endfüßchen bedecken ca. 80% der Oberfläche von Gehirnmikrokapillaren, weshalb vermutet wird, dass die spezifischen Eigenschaften des Hirnendothels, wie z.B. verstärkte Expression von Tight Junctions und die damit verbundene geringe Permeabilität, maßgeblich von Astrozyten beeinflusst werden.^[26] Der Literatur zufolge ist es noch unklar, ob ein direkter Kontakt zwischen Astrozyten und Endothelzellen oder die Sekretion von spezifischen Faktoren durch die Astrozyten die Eigenschaften der BBB induziert und beeinflusst.^[195-197] Aus diesem Grund wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, wobei HUVEC mit

Astrozyten-konditioniertem Medium für fünf Tage behandelt wurden. Bei diesem Medium handelte es sich um den EGM-2 (engl. Endothelial Growth Medium)-Überstand von konfluenten Astrozyten, das im Laufe von zwei Wochen alle drei Tage gesammelt und mit dem gleichen Volumen an frischem EGM-2 verdünnt wurde, im Folgenden als ECM-2 bezeichnet.^[56, 198] Die Expression von Claudin-5, PECAM-1 und Vinculin in statisch kultivierten HUVEC wurde nach der Behandlung mit ECM-2 im Vergleich zu EGM-2 untersucht. Claudin-5 ist ein wichtiger Bestandteil der Tight Junctions in der BBB, während Vinculin am Aufbau von Adherens Junctions beteiligt ist.^[199, 200] Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie und der anschließenden Konfokalmikroskopie, wobei die Anzahl der 10% hellsten Pixel des FITC-Signals quantifiziert wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Claudin-5 signifikant hochreguliert war. Im Gegensatz dazu war die Expression von PECAM-1 und Vinculin signifikant verringert.

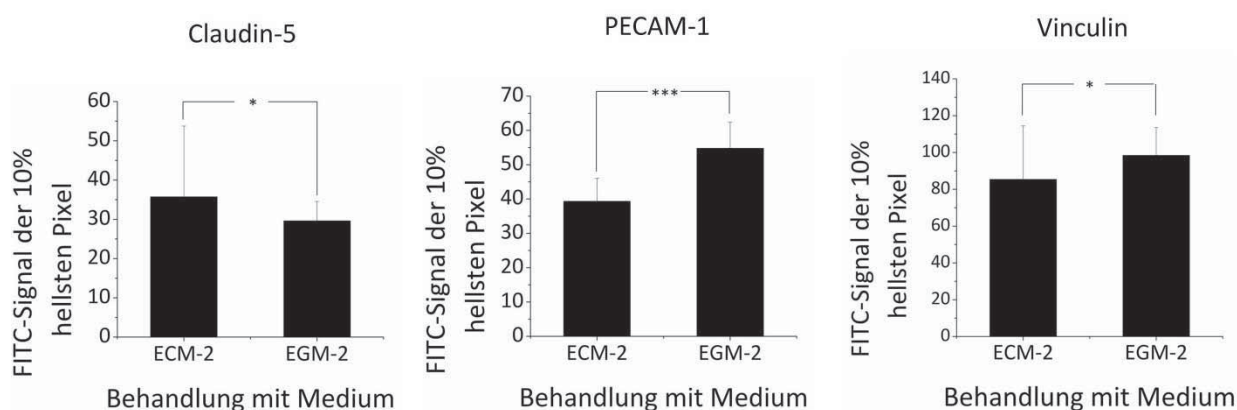


Abbildung 37: Expression von Claudin-5, PECAM-1 und Vinculin in HUVEC, behandelt mit ECM-2 und EGM-2, Tag 5 (n = 30). HUVEC ($1,6 \times 10^4$) wurden in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Der Nachweis der Expression von Claudin-5 erfolgte mit dem monoklonalen, Alexa Fluor®488 gekoppelten anti-human-Claudin-5-Maus IgG Antikörper. Zum Nachweis der PECAM-1-Expression wurde der monoklonale, FITC-gekoppelte anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper verwendet. Der Nachweis der Vinculin-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-Vinculin-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Quantifizierung der 10% hellsten Pixel des FITC-Signals zeigte, dass die Expression von Claudin-5 nach der fünftägigen Behandlung mit ECM-2 im Vergleich zur Behandlung mit EGM-2 signifikant hochreguliert war. Die Expression von PECAM-1 bzw. Vinculin war signifikant verringert. *P ≤ 0,05, ***P ≤ 0,01.

4.5.1.2 Wachstumskurven

Im menschlichen Körper werden alle Zellen durch den Blutfluss versorgt. Im Labor dagegen werden Nährmedien zum Aufrechterhalten der Zellkultur benutzt. Diese werden nach bestimmter Rezeptur hergestellt und an verschiedene Zelltypen angepasst. Bei der simultanen Kultivierung verschiedener Zelltypen ist es notwendig, eine neue Kombination an Nährmedien zu bestimmen, die für das Wachstum aller verwendeten Zellen geeignet ist. Zur Bestimmung des passenden Nährmediums für die Applikation im μ 3D*Vasc* Bioreaktor wurden drei zellspezifische, kommerziell erhältliche Medien getestet: EGM-2 für HUVEC, Perizyten-Medium für Perizyten, AM (engl. Astrocyte Medium) für Astrozyten, sowie zusätzlich das ECM-2. Die Wachstumskurven der drei Zelltypen in den verschiedenen Medien zeigten, dass das EGM-2 für die Kultivierung aller drei Zelllinien am besten geeignet war (Abbildung 38 – Abbildung 40).

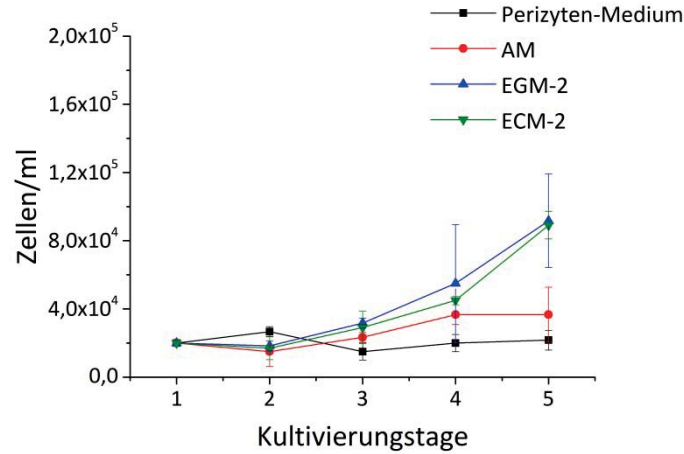


Abbildung 38: Wachstumskurve der HUVEC. HUVEC (2×10^4) wurden im Perizyten-Medium, EGM-2, ECM-2 und AM bei 37 °C und 5% CO₂ über 5 Tage kultiviert. Die Daten stellen die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus den gezählten Werten dar (n = 3).

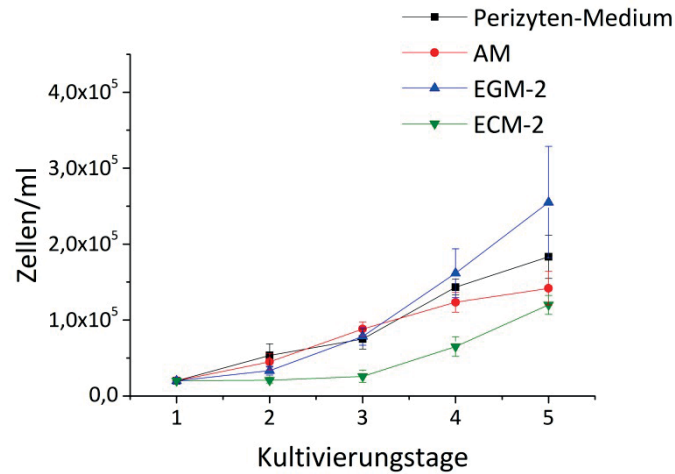


Abbildung 39: Wachstumskurve der hPC-PL (Perizyten). hPC-PL (2×10^4) wurden im Perizyten-Medium, EGM-2, ECM-2 und AM bei 37 °C und 5% CO₂ über 5 Tage kultiviert. Die Daten stellen die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus den gezählten Werten dar (n = 3).

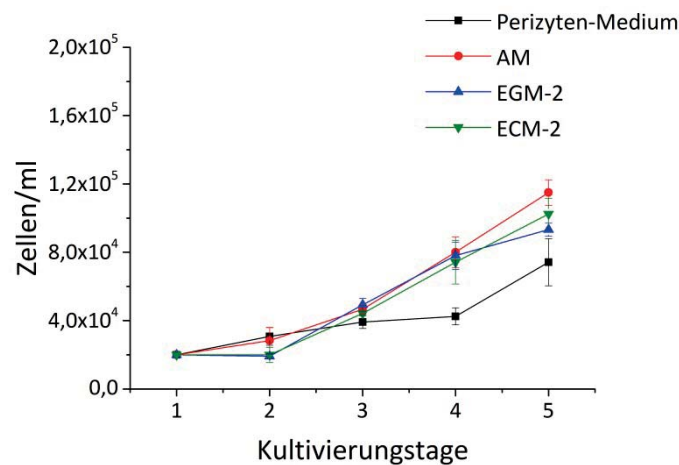


Abbildung 40: Wachstumskurve der HA (Astrozyten). HA (2×10^4) wurden im Perizyten-Medium, EGM-2, ECM-2 und AM bei 37 °C und 5% CO₂ über 5 Tage kultiviert. Die Daten stellen die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen aus den gezählten Werten dar (n = 3).



4.5.2 Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten

Der mikroskopische Nachweis gehört zu den gängigsten Methoden zur Untersuchung der Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit von *in vitro* BBB-Modellen. Dabei wird am häufigsten die Konfokalmikroskopie durchgeführt, da diese Methode im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie eine höhere Auflösung bietet. Durch die Kombination verschiedener Ebenen erlaubt diese Methode die 3D-Aufnahme eines Präparats. Außerdem eignet sich die Konfokalmikroskopie für die Verfolgung der Zellkultivierung. Beispielsweise lassen sich zellspezifische Marker, wie z.B. der Von-Willebrand-Faktor (vWF) oder PECAM-1 für das Endothel, GFAP (engl. glial fibrillary acidic protein) für Astrozyten und α -SMA (engl. alpha-smooth muscle actin) für Perizyten, durch spezifische Antikörper nachweisen, was eine Untersuchung des räumlichen Wachstums der Zellen ermöglicht. Auch Tight Junctions Moleküle, Efflux-Pumpen und das Zytoskelett lassen sich auf diese Weise visualisieren.

Zur Etablierung der „Hirnseite“ im unteren Kompartiment des μ 3DVasc Bioreaktors wurden zunächst 1×10^6 Perizyten auf der Rückseite des PC-Mikrokanals, in direkter Nachbarschaft zu den HUVEC, über mehrere Tage kultiviert und anschließend mikroskopiert (Abbildung 41). Hierzu wurde die Zellsuspension in das untere Kompartiment durch den Einlass pipettiert und der Bioreaktor daraufhin sofort um 180° gedreht. In dieser Position wurde der Bioreaktor über Nacht bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Dies ermöglichte das Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran. Die erhöhte Zellzahl im Vergleich zu 2D-Experimenten ist durch die Geometrie des μ 3DVasc Bioreaktors zu erklären. Laut Thanabalasundaram et al. (2011) ist die Kultivierung von Perizyten in Kollagen-beschichteten ($0,54 \text{ mg/ml}$), porösen Transwell-Systemen gut möglich, weshalb das untere Kompartiment des μ 3DVasc Bioreaktors mit $0,6 \text{ mg/ml}$ Kollagen in $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ beschichtet wurde.^[201] Einen Tag später erfolgte die Innokulation des Lumens des porösen PC-Mikrokanals mit HUVEC. Hierzu wurden $1,25 \times 10^6$ Zellen schrittweise in den PC-Mikrokanal gegeben. Nach jedem Innokulationsschritt wurde der μ 3DVasc Bioreaktor um 90° gedreht, um eine vollständige Besiedlung aller Seiten zu gewährleisten (Abbildung 43).^[105] Das Experiment wurde zunächst unter statischen Bedingungen durchgeführt, um den möglichen Einfluss von Scherkräften auf das Wachstumsverhalten von Perizyten auszuschließen. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Kokultur aus beiden Zelllinien über mehrere Tage möglich war. Die Perizyten umspannten den PC-Mikrokanal.

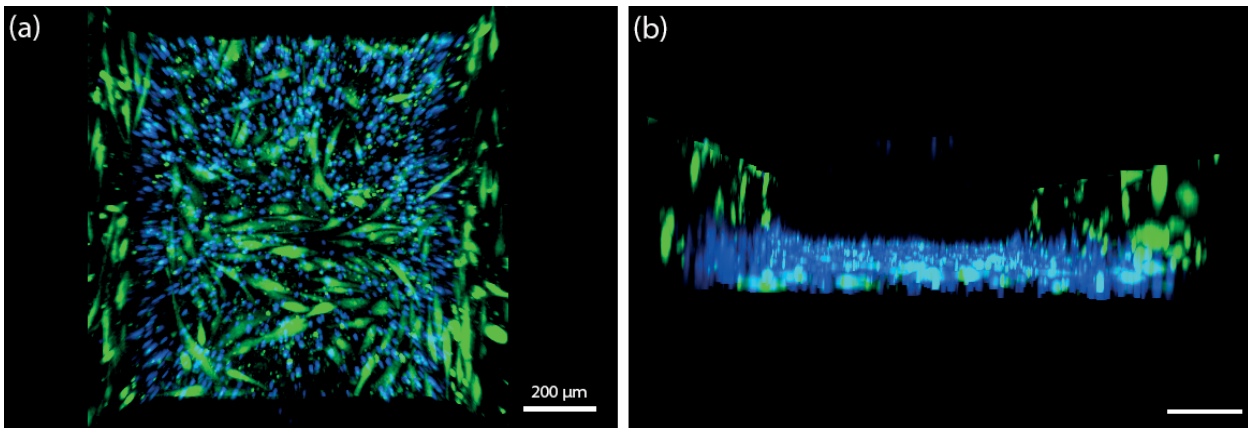


Abbildung 41: Kultivierung der HUVEC im porösen PC-Mikrokanal und hPC-PL (Perizyten) auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 8 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von hPC-PL erfolgte die ersten 2 Tage mit zellspezifischem Medium und die anderen Tage mit EGM-2. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit CellTracker™ Green (10 μ M) durchgeführt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 2 Tage nach dem Beimpfen des Bioreaktors mit hPC-PL (1×10^6) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Visualisierung der HUVEC-Zellkerne wurde mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml, blau) erreicht. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurde ein z-Stapel von 280 μ m (117 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (b) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. Maßstab = 200 μ m.

4.5.3 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten

4.5.3.1 Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in 2D

Die HUVEC sollten im Lumen des porösen, fluidischen PC-Mikrokanals zur Nachbildung der „Gefäßseite“ kultiviert werden, während Perizyten und Astrozyten im unteren Kompartiment zur Nachbildung der „Hirnseite“ ausplattiert wurden. Um die verschiedenen Kokultur-Bedingungen zu testen, wurden zunächst Vorversuche in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte durchgeführt. Diese Platte erlaubt eine Zellkultivierung unter statischen 2D-Bedingungen. Abbildung 42 (a – d) zeigt die Kokultur aus Perizyten und Astrozyten, wobei Letztere direkt auf einen konfluenten Perizyten-Layer ausgesät und kultiviert wurden. Abbildung 42 (e – h) zeigt die Kokultur aus beiden Zelllinien mit dem Unterschied, dass hier eine Matrigel-Beschichtung des Perizyten-Layers unternommen wurde, bevor die Astrozyten auf den Perizyten ausplattiert wurden. Beide Methoden erzielten gute Ergebnisse und zeigten, dass die *in vitro* Kokultur aus beiden Zelllinien möglich ist.

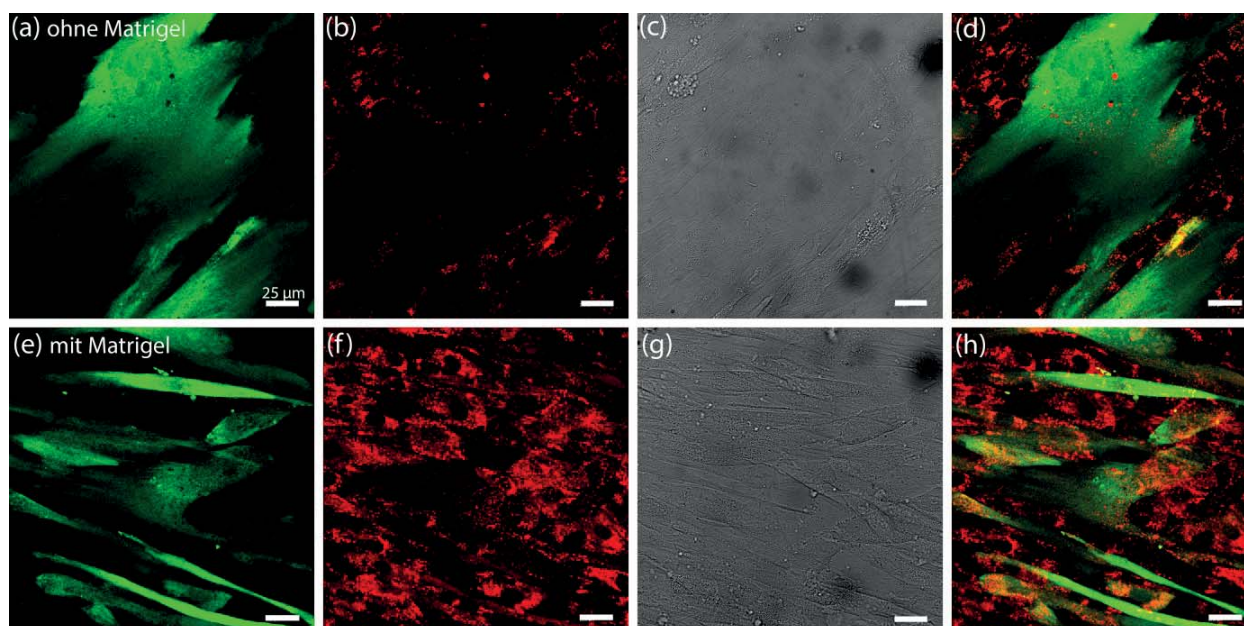


Abbildung 42: Kokultivierung der hPC-PL (Perizyten) und HA (Astrozyten) in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte, Tag 7 (konfokale Aufnahmen). hPC-PL (5×10^3) wurden bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ kultiviert. Die Versorgung erfolgte am ersten Tag mit zellspezifischem Medium und die anderen Tage mit EGM-2. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit CellTracker™ Green ($10 \mu\text{M}$) durchgeführt. (a – d) Die mit CellTracker™ Red ($10 \mu\text{M}$) markierten HA (1×10^4) wurden 6 Tage später in die μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte überführt und auf dem hPC-PL-Layer kultiviert. (e – h) Am 6. Tag wurde der hPC-PL-Layer mit einem Gemisch aus Kollagen ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) und Matrigel ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) in EGM-2 beschichtet. Die mit CellTracker™ Red ($10 \mu\text{M}$) markierten HA (1×10^4) wurden 2 Stunden später in die μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte überführt. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) CellTracker™ Green-Färbung des hPC-PL-Zytosols, grün. (b) CellTracker™ Red-Färbung des HA-Zytosols, rot. (c) Hellfeldaufnahme. (d) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = $25 \mu\text{m}$.

4.5.3.2 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3D\text{Vasc}$ Bioreaktor

Im nächsten Schritt wurde eine Kokultur aus HUVEC, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3D\text{Vasc}$ Bioreaktor etabliert. Da die vorherigen Ergebnisse der Kokultivierung von Perizyten und Astrozyten unter 2D-Bedingungen keinen Einfluss der Beschichtung des Perizyten-Layers mit dem Matrigel auf das Wachstum des Astrozyten-Layers zeigten, wurden die beiden Zelltypen hier direkt aufeinander ausgesät. Des Weiteren wurde die Anzahl an verwendeten Perizyten im Vergleich zu den bisher untersuchten Bedingungen (s. 4.5.2) aufgrund der zusätzlich verwendeten Astrozyten auf die Hälfte reduziert, so dass die Gesamtzahl an Zellen im $\mu 3D\text{Vasc}$ Bioreaktor unverändert blieb. Gleichzeitig wurde der Einfluss der an den porösen PC-Mikrokanal angelegten Mikrofluidik auf das Wachstum der beiden Zelltypen im unteren Kompartiment untersucht. Wie in 4.5.2 bereits beschrieben, erfolgte zuerst die Besiedlung des unteren Kompartiments mit den Perizyten (5×10^5). Der PC-Mikrokanal wurde einen Tag später mit den HUVEC ($1,25 \times 10^6$) beimpft. Die anschließende Kultivierung erfolgte unter mikrofluidischen Bedingungen. Am vierten Tag wurden die Astrozyten (5×10^5) in das untere Kompartiment eingebracht. Analog zum Einbringen der Perizyten wurde das untere Kompartiment mit der Astrozyten-Zellsuspension durch die Luer-Anschlüsse beimpft. Anschließend wurde der Bioreaktor um 180° gedreht und für drei Stunden unter statischen Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der

Bioreaktor in die Ausgangsposition gebracht. Der PC-Mikrokanal wurde wieder an das Pumpensystem mit Mediumreservoirs angeschlossen, um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Kultivierung über mehrere Tage (Abbildung 43).

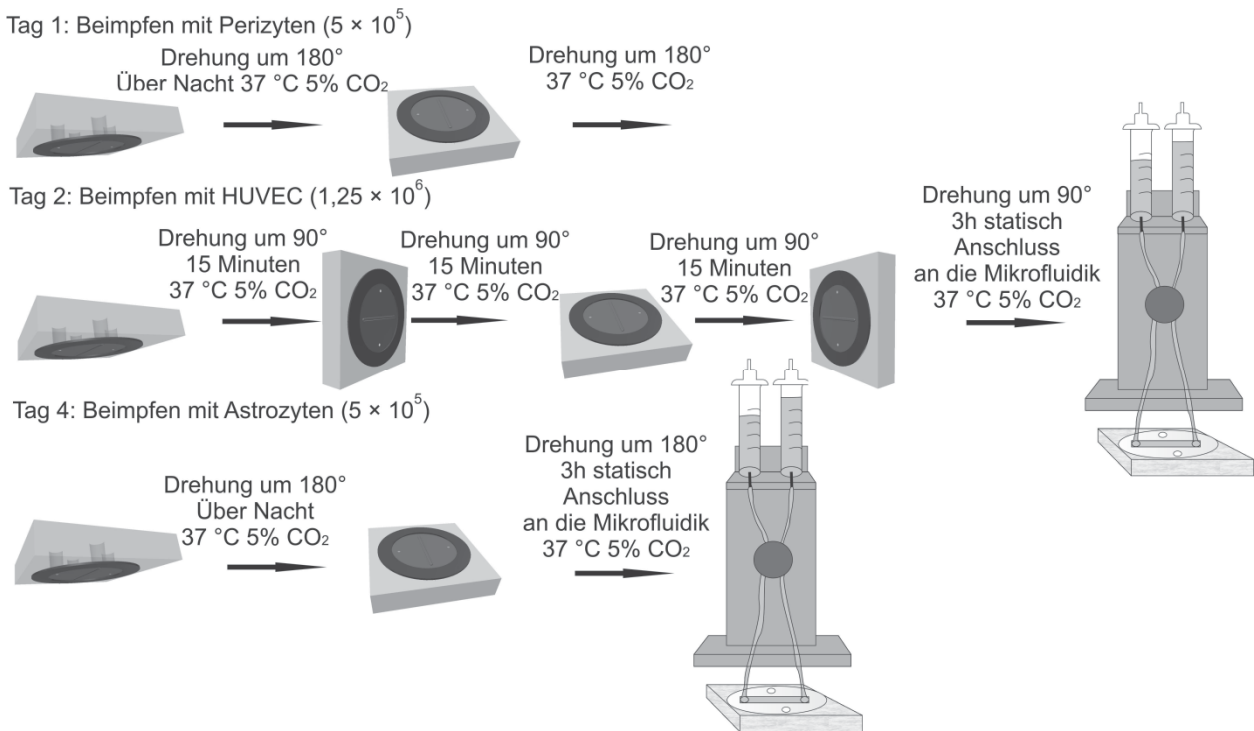


Abbildung 43: Schematische Darstellung der Innokulation des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit HUVEC, hPC-PL (Perizyten) und HA (Astrozyten) zur Etablierung der BBB.

Zur Visualisierung der Zellen wurden die HUVEC mit $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33342 (Abbildung 44 c) zur Markierung der Zellkerne, die Perizyten mit $10\ \mu\text{M}$ CellTrackerTM Green (Abbildung 44 d) und die Astrozyten mit $10\ \mu\text{M}$ CellTrackerTM Red (Abbildung 44 e) zur Markierung des Zytosols angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Morphologie der Perizyten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor deutlich von den Perizyten in einer konventionellen 2D- μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte unterschied (Abbildung 42). Die Perizyten unterhalb des HUVEC-Layers besaßen eine sternförmige Morphologie und zeichneten sich durch viele zytoplasmatische Fortsätze aus. Diese Morphologie der Perizyten innerhalb der BBB wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[49] Anhand dieses Experiments wurde gezeigt, dass eine Kokultur aus HUVEC, Perizyten und Astrozyten im mikrofluidischen $\mu 3DVasc$ Bioreaktor für sieben Tage möglich ist und dass die Zellen eine *in vivo* typische Morphologie erlangen.

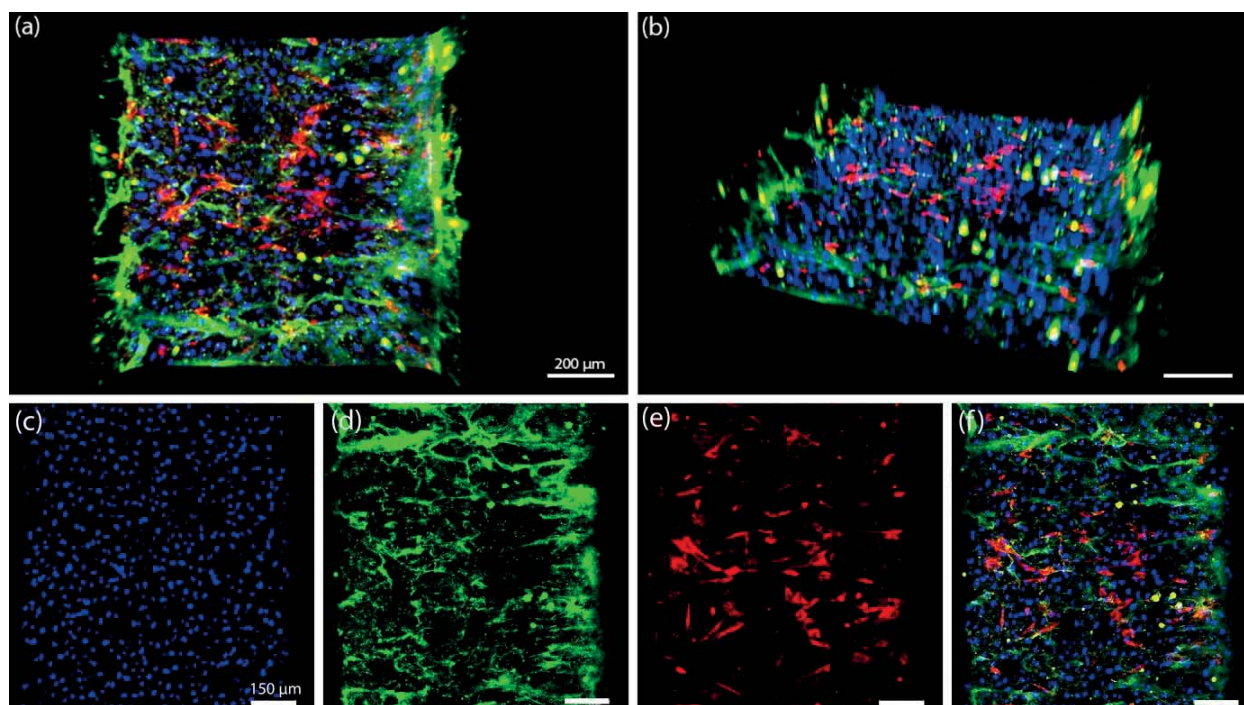


Abbildung 44: Kultivierung der HUVEC im Lumen des porösen PC-Mikrokanals bzw. der hPC-PL und HA auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 7 (z-Stapel (a, b), sequentielle konfokale Aufnahmen (c - f)). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von hPC-PL erfolgte am ersten Tag mit zellspezifischem Medium und die anderen Tage mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit CellTracker™ Green (10 μ M) durchgeführt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 1 Tag nach dem Beimpfen des Bioreaktors mit hPC-PL (5×10^5) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. Die Visualisierung der HUVEC-Zellkerne wurde mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml) erreicht. Die mit CellTracker™ Red (10 μ M) markierten HA (5×10^5) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des Bioreaktors mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt und auf dem hPC-PL-Layer kultiviert. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software (c-f). Zur Visualisierung des Wachstums der Zellkulturen wurde ein z-Stapel von 240 μ m (100 Bilder) aufgenommen (a, b). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (b) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. (c) Hoechst 33342-Färbung der DNA in HUVEC-Zellkernen, blau. (d) CellTracker™ Green-Färbung des hPC-PL-Zytosols, grün. (e) CellTracker™ Red-Färbung des HA-Zytosols, rot. (f) Überlagerung. Maßstab = 200 μ m (a, b) bzw. 150 μ m (c - f).

4.5.4 Nachweis zellspezifischer Marker

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor über zellspezifische Marker-Proteine immunhistochemisch detektiert. Zum visuellen Nachweis des Zellwachstums wurden die zellspezifischen Marker PECAM-1 für HUVEC, α -SMA für Perizyten und GFAP für Astrozyten gewählt (Abbildung 45 - Abbildung 47). Bei α -SMA handelt es sich um eine Aktin-Isoform, die überwiegend in vaskulären, glatten Muskelzellen exprimiert wird (Abbildung 45 c).^[202] GFAP ist ein Intermediärfilament in reifen Astrozyten (Abbildung 45 d).

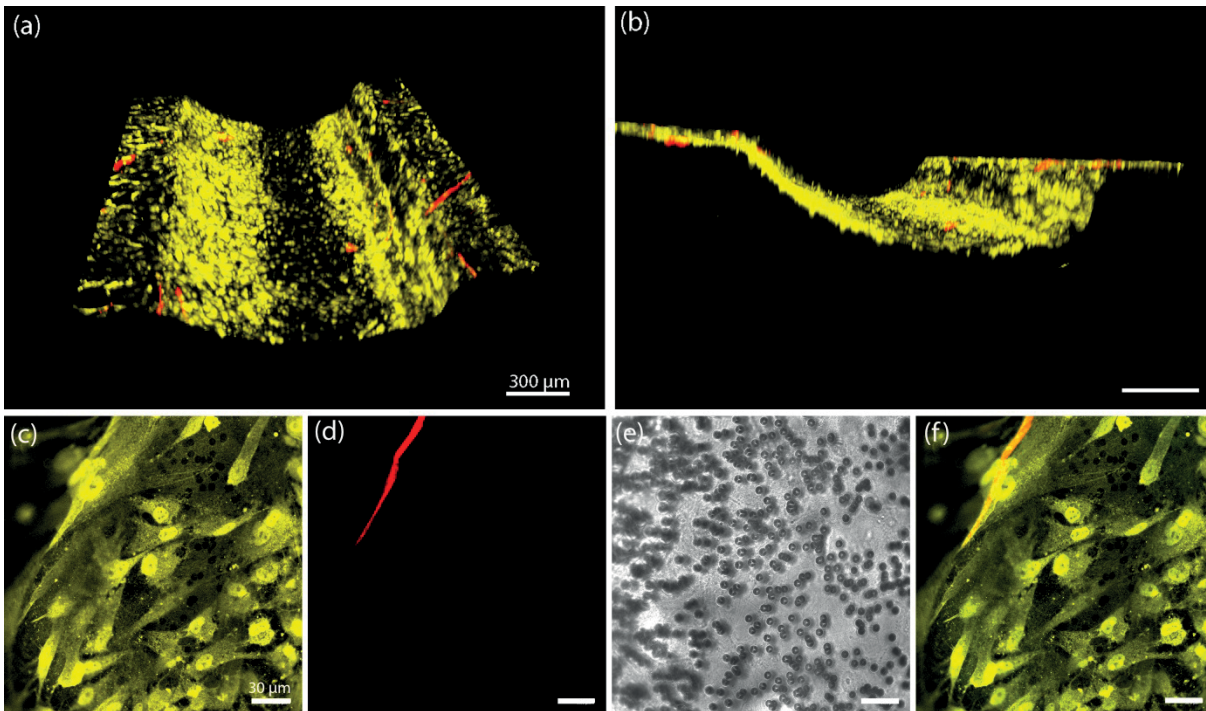


Abbildung 45: Expression von α -SMA in hPC-PL und GFAP in HA im μ 3DVasc Bioreaktor, Tag 7 (z-Stapel (a, b), konfokale Aufnahmen (c – f)). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 1 Tag nach dem Beimpfen des unteren Kompartiments mit hPC-PL (5×10^5) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit dem monoklonalen anti-human- α -SMA-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 568-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper durchgeführt. HA (5×10^5) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Visualisierung von HA erfolgte mit dem polyklonalen anti-human-GFAP-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 647-gekoppelten anti-Kaninchen-Huhn IgY Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software (c – f). Zur Visualisierung des Zellwachstums wurde ein z-Stapel von 470 μ m (100 Bilder) aufgenommen (a, b). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (b) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. (c) Alexa Fluor® 568-Färbung der α -SMA-Expression in hPC-PL, gelb. (d) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression in HA, rot. (e) Hellfeldaufnahme. (f) Überlagerungen ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 300 μ m (a, b) bzw. 30 μ m (c – f).

Eine hohe Expressionsrate an GFAP wird insbesondere bei Verletzungen des ZNS beobachtet. Eine gesunde Zellpopulation an Astrozyten exprimiert dagegen weniger GFAP, so dass das Signal der Expression bei einigen immunhistochemischen Experimenten unterhalb der Detektionsgrenze liegt.^[203] Abbildung 46 verdeutlicht diese Tatsache.

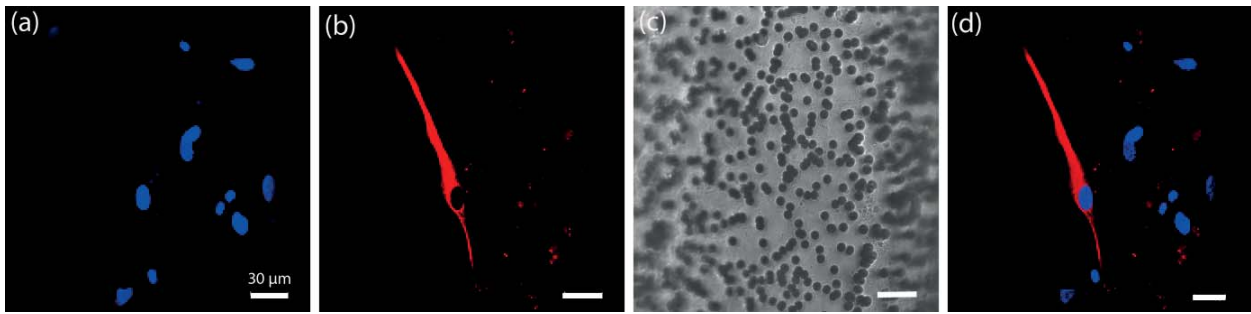


Abbildung 46: Expression von GFAP in HA, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 3 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. GFAP wurde mit dem polyklonalen anti-human-GFAP-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 647-gekoppelten anti-Kaninchen-Huhn IgY Antikörper nachgewiesen. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression, rot. (c) Hellfeldaufnahme. (d) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 30 μ m.

Wie bereits im Kapitel 4.4.2 beschrieben, ist PECAM-1 ein spezifischer Marker für Endothelzellen und ein Tight Junctions assoziiertes Ig-Protein.^[204] Abbildung 47 zeigt den Nachweis der PECAM-1-Expression in HUVEC. Die Zellen kleideten den PC-Mikrokanal lückenlos aus, so wie es einem natürlichen Blutgefäß entspricht.

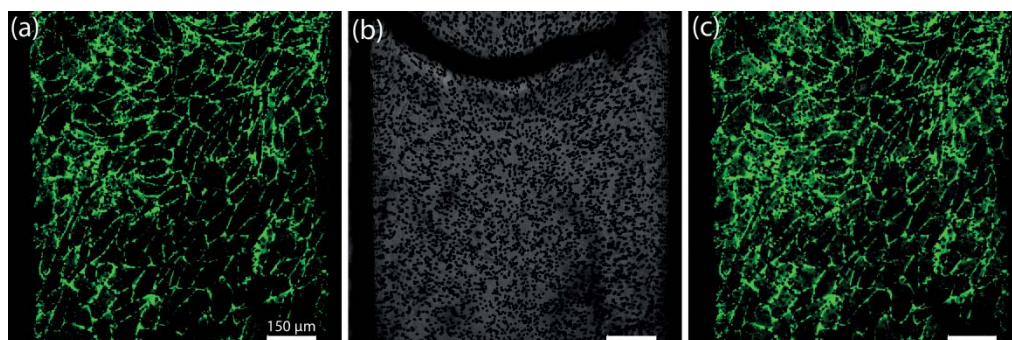


Abbildung 47: Expression von PECAM-1 in HUVEC im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 14 (konfokale Aufnahmen). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 400 μ l/min. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Alexa Fluor® 488-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (b) Hellfeldaufnahme. (c) Überlagerung. Maßstab = 150 μ m.



4.5.5 Proliferationstest

Analog zum gesunden Endothel der Blutgefäße zeichnen sich Perizyten und Astrozyten durch eine geringe Proliferationsrate *in vivo* aus. Erst infolge einer Verletzung oder der Entstehung neuer Blutgefäße wird die Teilung dieser Zellen aktiviert.^[205-207] Die Zellen unter konventionellen 2D-Bedingungen weisen dagegen eine hohe Proliferationsrate auf.^[208] Um zu testen, ob das Verhalten von Astrozyten und Perizyten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor den 2D-Bedingungen entspricht oder eher mit einer *in vivo* Situation vergleichbar ist, wurde ein Proliferationstest mit Hilfe eines Click-iT® EdU Imaging Kits durchgeführt. Das Prinzip des Tests wurde in Kapitel 4.4.3 näher erläutert. Kurz zusammengefasst, beruht dieser Test auf dem Einbau des Alkin-modifizierten Thymidinanalogs EdU in die replizierende DNA. Die mikroskopische Visualisierung der replizierten DNA-Stränge erfolgt mit Hilfe einer bioorthogonalen 1,3-dipolaren Cycloaddition nach Huisgen (1963) mit einem Azid-modifizierten Fluorophor (Alexa Fluor® 488-Azid, grün).^[165] Zusätzlich wurden die Zellkerne aller Zellen mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g/ml}$, blau) angefärbt. Während die proliferationsaktiven Zellen eine Doppelfärbung aufwiesen, erschienen die nicht proliferierenden Zellen blau. Die Anzahl an proliferierenden Zellen wurde hier im Verhältnis zu den nicht proliferierenden Zellen anhand mikroskopischer Daten bestimmt und in Prozent angegeben. Während 13 Tage nach Beimpfen des unteren Kompartiments mit den Perizyten die Zellen eine sehr hohe Proliferationsrate von 38% zeigten, sank diese nach weiteren zwei Kultivierungstagen auf 5%. Am 20. Tag waren lediglich 2,5% aller Zellen teilungsaktiv. Parallel zu Experimenten in $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren wurden Experimente mit 2D-Zellkulturen aus Perizyten und Astrozyten in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte durchgeführt. Im Vergleich zu den Zellen, die im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor kultiviert wurden, lag die Proliferationsrate dieser Zellen unter 2D-Bedingungen am 13. Tag nach der Aussaat von Perizyten 15% niedriger. Am 15. Kultivierungstag blieb die Proliferationsrate der statischen Kokultur unverändert. Nach fünf weiteren Tagen wurde sie jedoch auf 2% reduziert (Abbildung 48).

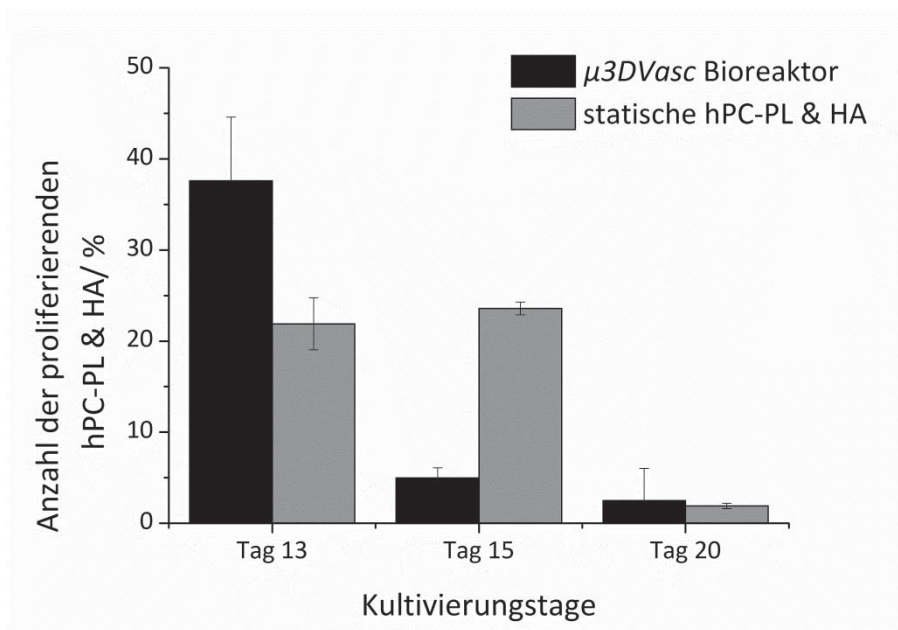


Abbildung 48: Anzahl der proliferierenden hPC-PL und HA im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors im Vergleich zur statischen Kokultur der hPC-PL und HA in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 1 Tag nach dem Beimpfen des unteren Kompartiments des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit hPC-PL (5×10^5) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. HA (5×10^5) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung von hPC-PL und HA erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Jeweils 13, 15 und 20 Tage nach Beimpfen des unteren Kompartiments mit den hPC-PL wurden Mikroskopieaufnahmen gemacht. Die Anzahl der proliferierenden Zellen wurde als Verhältnis von Alexa Fluor® 488 positiven Zellkernen zu nur mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml) markierten Zellkernen in Prozent angegeben. Parallel dazu wurden hPC-PL (1×10^4) und HA (1×10^4) in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte entsprechend den Inkubationszeiten in $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferationsraten aus zwei $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren bzw. zwei Wells einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte, wobei mindestens fünf verschiedene Stellen im unteren Kompartiment bzw. innerhalb eines Wells untersucht wurden (n = 5).

Abbildung 49 zeigt einen repräsentativen mikroskopischen Nachweis der Proliferation von Perizyten und Astrozyten im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors, kultiviert in direkter Nachbarschaft zu HUVEC im porösen PC-Mikrokanal, nach 13 Kultivierungstagen. Die entsprechenden repräsentativen Daten zu den Messtagen 15 und 20 sind im Anhang (siehe 9 IV) zu finden.

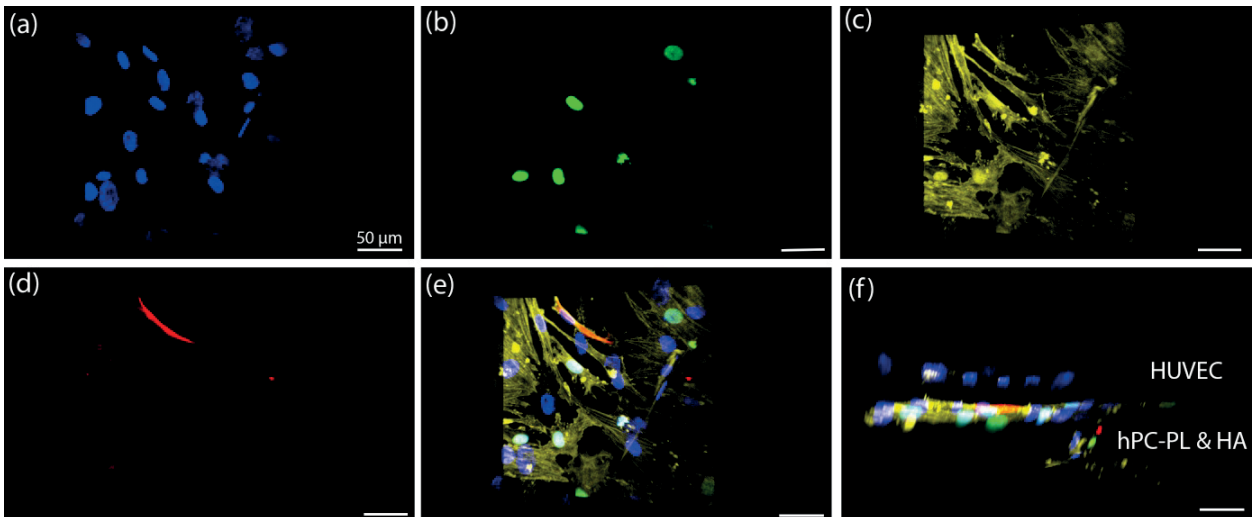
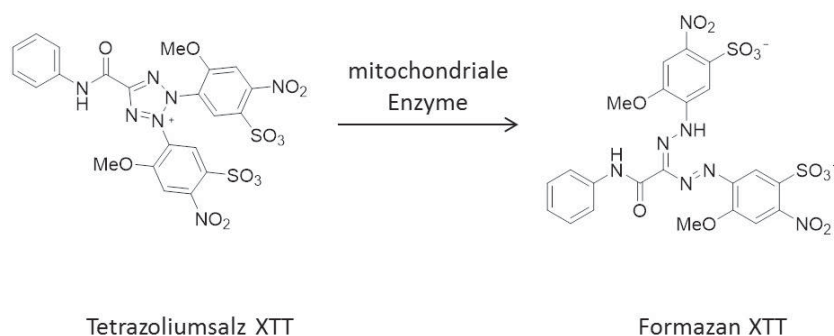


Abbildung 49: EdU Nachweis der Proliferation von hPC-PL und HA, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 13 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HUVEC ($1,25 \times 10^6$) mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit dem monoklonalen anti-human- α -SMA-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 568-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper durchgeführt. Die Visualisierung von HA erfolgte mit dem polyklonalen anti-human-GFAP-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 647-gekoppelten anti-Kaninchen-Huhn IgY Antikörper. 48 Stunden vor der Zugabe der Click-iT® Reaktionsmischung mit Alexa Fluor® 488 Azid wurde das EdU-Reagenz (10 μM) zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums wurde ein z-Stapel von 110 μm (40 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen der hPC-PL und HA, blau. (b) Alexa Fluor® 488-Färbung der hPC-PL- & HA-Replikation, grün. (c) Alexa Fluor® 568-Färbung der α -SMA-Expression in hPC-PL, gelb. (d) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression in HA, rot. (e, f) Überlagerung. (e) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (f) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. Maßstab = 50 μm .



4.5.6 Test der metabolischen Zellaktivität

Parallel zu den Proliferationstests wurde die metabolische Aktivität von Perizyten und Astrozyten im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor untersucht. Hierzu wurde eine kolorimetrische Methode, basierend auf dem Tetrazoliumsalz XTT, verwendet. Diese Methode wurde erstmalig von Scudiero et al. (1988) beschrieben.^[209] Sie beruht auf einer Redoxreaktion des Tetrazoliumsalzes XTT, einem farblosen Redox-Indikator, in farbiges Formazan, dessen Absorption gemessen werden kann (Schema 1). Dieser Vorgang kommt durch die metabolische Aktivität mitochondrialer Enzyme zustande, die nur in lebenden Zellen aktiv sind.



Schema 1: Umsetzung des farblosen Tetrazoliumsalzes XTT durch mitochondriale Enzyme in farbiges Formazan.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Redoxreaktion von XTT im Vergleich zu MTT, einem gebräuchlichen Tetrazoliumsalz, zur Entstehung eines löslichen Formazans führt, während im Falle von MTT ein unlösliches Formazan entsteht, das für die Auswertung erst noch in Lösung gebracht werden muss. Zur Durchführung des XTT-Assays ist somit keine Lysierung der Zellen notwendig und die Vitalität der Zellkultur bleibt unbeeinflusst. Des Weiteren erspart diese Methode den Umgang mit radioaktiven Substanzen und ist durch einen schnellen Ablauf gekennzeichnet, was weitere Vorteile gegenüber anderen gängigen Proliferationsassays, wie z.B. radioaktiven Thymidin oder EdU Assays, darstellt.^[210]

Im Zuge der Durchführung des Experiments wurde der $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor von der Mikrofluidik getrennt. Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Perizyten und Astrozyten wurde das XTT Reagenz ausschließlich in das untere Kompartiment gegeben. Um den Vorgang zeitlich zu verfolgen, wurde der Assay über 20 Tage durchgeführt. Die Inkubationszeit beschränkte sich auf jeweils fünf Stunden pro Tag unter statischen Bedingungen. Die Auswertung wurde mit dem SpectraMax Microplate Reader durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 zusammengefasst. Als Kontrolle zum $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor diente eine statisch kultivierte Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in einer 24 Well-Zellkulturplatte. Der gemessene Wert der Absorption zu Beginn des Experiments am Tag 5 wurde als 100% Wert gesetzt. Es zeigte sich eine kontinuierliche Verringerung der metabolischen Zellaktivität im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, welche am 20. Tag um ca. 50% im Vergleich zum Beginn des Experiments gesunken war. Die metabolische Aktivität der statisch kultivierten Zellen variierte dagegen zwischen Tag 5 und Tag 15 gering und ist lediglich am 20. Tag auf 80% gesunken.

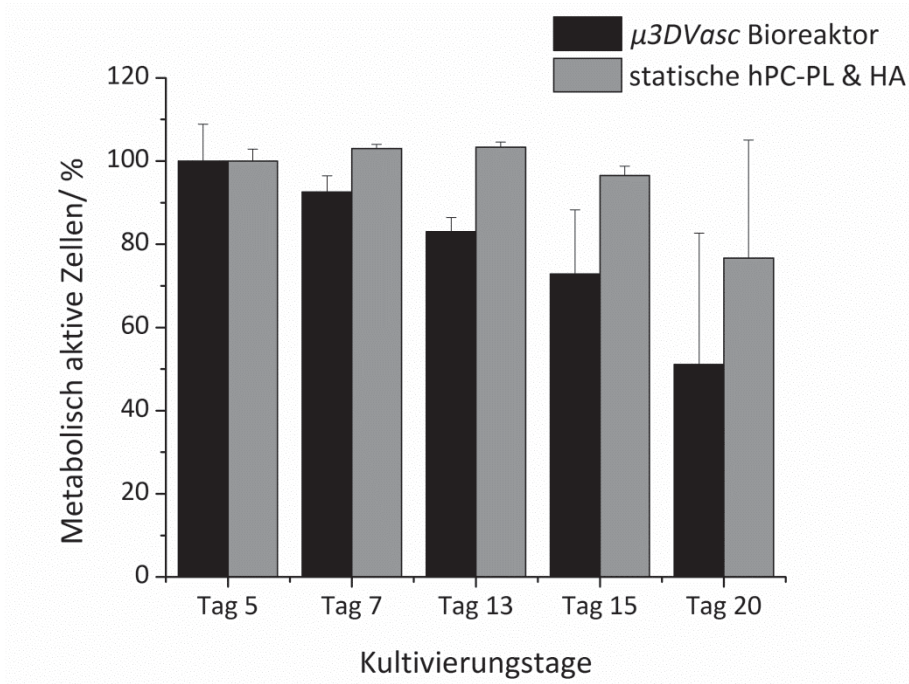


Abbildung 50: XTT Nachweis der metabolischen Aktivität von hPC-PL und HA im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors im Vergleich zur statischen Kokultur der hPC-PL und HA in einer 24 Well-Zellkulturplatte. Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 1 Tag nach dem Beimpfen des unteren Kompartiments des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit hPC-PL (5×10^5) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. HA (5×10^5) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung von hPC-PL und HA erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Jeweils 5, 7, 13, 15 und 20 Tage nach Beimpfen des unteren Kompartiments mit den hPC-PL wurde der XTT Nachweis gemacht. Die Inkubation mit dem XTT Reagenz (1:2 Verdünnung) vollzog sich 5 Stunden unter statischen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂. Die Auswertung wurde mit dem SpectraMax Microplate Reader durchgeführt. hPC-PL (1×10^4) und HA (1×10^4) wurden in einer 24 Well-Zellkulturplatte den Inkubationsbedingungen in Bioreaktoren entsprechend kultiviert. Die Versorgung der Zellen erfolgte mit EGM-2. Der XTT Nachweis und die Auswertung erfolgten analog zum $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Dargestellt sind die Mittelwerte der Absorptionsintensitäten aus drei $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren bzw. 3 Wells, wobei jeweils zwei Proben pro Messpunkt eines $\mu 3DVasc$ Bioreaktors/Wells untersucht wurden (n = 3).

4.5.7 Lebend/tot-Nachweis

Zur Untersuchung der Vitalität der Zellen wurde ein lebend/tot-Nachweis mit Hilfe von Calcein-AM (Calcein Acetoxymethyl) und PI (Propidiumiodid) durchgeführt.

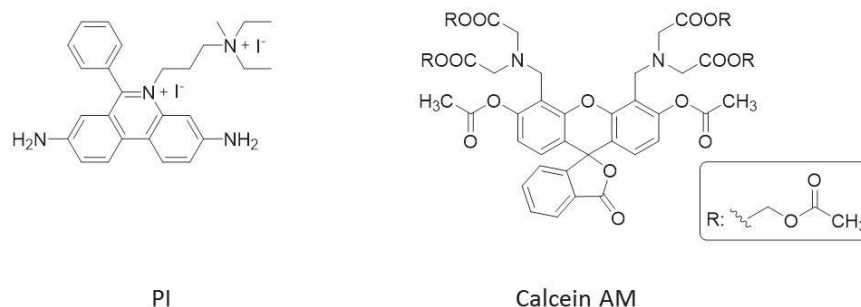


Abbildung 51: PI und Calcein AM zur Durchführung des lebend/tot-Nachweises.

Calcein-AM ist ein nicht fluoreszierender, lipophiler Ester, der schnell durch die Diffusion in lebende Zellen gelangt. Dort wird es durch die Hydrolyse der Esterbindungen durch aktive Esterasen in hydrophiles, fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Die resultierende grüne, intrazelluläre Fluoreszenz kann z.B. mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Abbildung 52 a).^[64, 211] Dagegen markiert PI nur tote Zellen, weil es die Zellmembran lebender Zellen nicht penetrieren kann.^[212] Es interkaliert in die DNA toter Zellen und färbt sie dabei rot an (Abbildung 52 b). Es war eine geringe Anzahl nekrotischer Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor zu beobachten. Durch die Überlappung des roten Signals mit den vielen lebenden, grün fluoreszierenden Zellen erscheinen diese gelb (Abbildung 52 c).

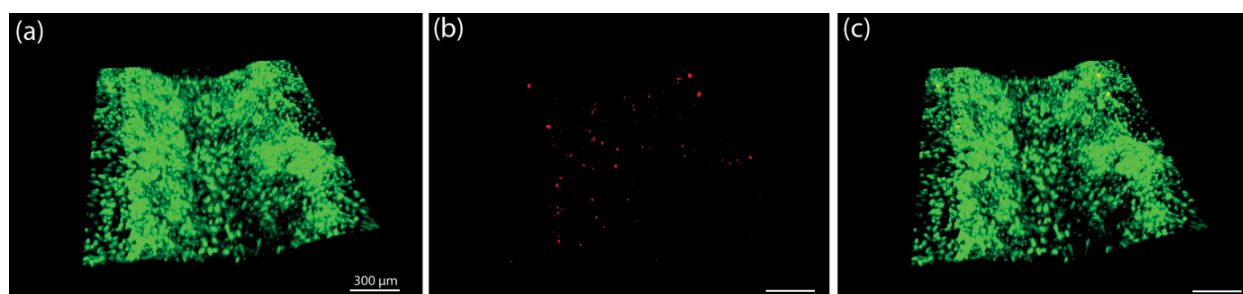


Abbildung 52: Lebend/tot-Nachweis der HUVEC, hPC-PL und HA im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 20 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 1 Tag nach dem Beimpfen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit hPC-PL (5×10^5) in den Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 µl/min. HA (5×10^5) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung von hPC-PL und HA erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Zum Nachweis lebender Zellen wurde der Farbstoff Calcein-AM (1 µM) und zum Nachweis nekrotischer Zellen PI (1 µM) eingesetzt. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums wurde ein z-Stapel von 360 µm (80 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Calcein im Zytosol, grün. (b) PI in Zellkernen, rot. (c) Überlagerung. Maßstab = 300 µm.

Als Kontrolle wurde ein lebend/tot-Nachweis in einer statischen Kokultur aus Perizyten und Astrozyten durchgeführt (Abbildung 53). Hierzu wurden 1×10^4 Zellen/cm² in einer 24 Well-Zellkulturplatte ausplattiert und für 20 Tage kultiviert. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Kokultur durch eine höhere Anzahl an PI-markierten (Abbildung 53 b) und somit nekrotischen Zellen gekennzeichnet war.

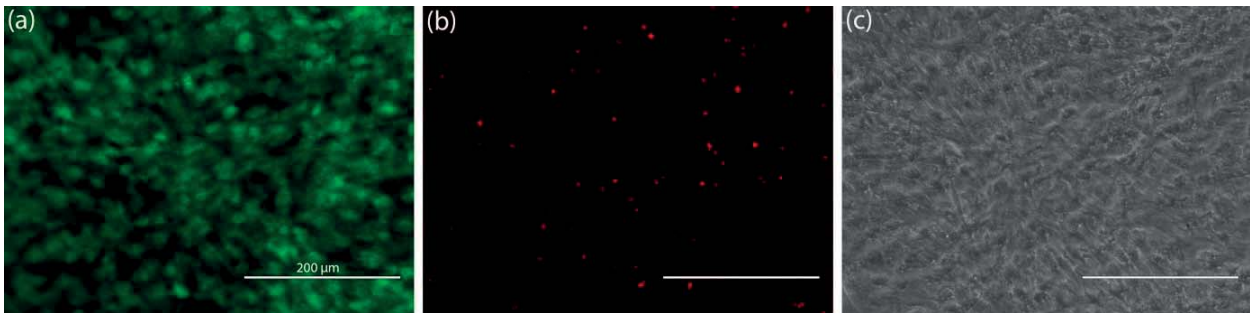
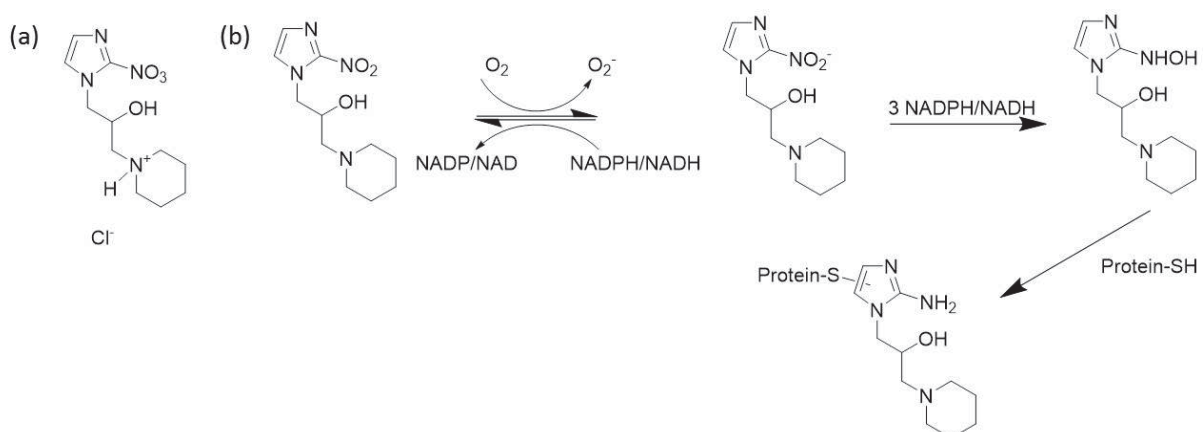


Abbildung 53: Lebend/tot-Nachweis der hPC-PL (1×10^4) und HA (1×10^4) in einer 24 Well-Zellkulturplatte, Tag 20 (fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen). Die Zellen wurden im EGM-2 bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Nachweis lebender Zellen wurde der Farbstoff Calcein-AM (1 µM) und zum Nachweis nekrotischer Zellen PI (1 µM) eingesetzt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Spezifikationen siehe 6.1). (a) Calcein im Zytosol, grün. (b) PI in Zellkernen, rot. (c) Hellfeldaufnahme. Maßstab = 200 µm.

4.5.8 Untersuchung der Hypoxie

Aufgrund der großen Wachstumsfläche im unteren Kompartiment des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors, die jedoch nur bis zu 750 µm seitlich des artifiziellen Blutgefäßes mit Medium durch die Poren im PC-Mikrokanal versorgt wird (siehe 4.4.5), wurde getestet, ob die Zellen im untersuchten System hypoxisch sind. Für die Ausführung des Experiments wurde HypoxyprobeTM-1 (20 mM) verwendet.^[213] Dabei handelte es sich um ein Pimonidazol-Hydrochlorid, welches in hypoxischen Zellen bei einem Sauerstoffpartialdruck von weniger als 10 mmHg durch Sauerstoff aktiviert wird. Das aktivierte Intermediat formt anschließend stabile Addukte mit Thiol(Sulfhydryl)-Gruppen in Proteinen, Peptiden und Aminosäuren, welche immunhistochemisch nachgewiesen werden können (Schema 2).



Schema 2: (a) Pimonidazol-Hydrochlorid (Hypoxyprobe-1). (b) Umsetzung von Pimonidazol zu Pimonidazol-Addukten.^[213]



Der mikroskopische Nachweis der Pimonidazol-Addukte in den Zellen zeigte, dass die Perizyten und Astrozyten unter dem porösen PC-Mikrokanal keine Pimonidazol-Addukte in ihren Zellkörpern aufwiesen (Abbildung 54 a - f). Diese Zellen erhielten durch die kontinuierliche Mediumzufuhr ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe, wodurch eine langfristige Aufrechterhaltung der Kokultur im porösen $\mu 3DVasc$ Bioreaktor über mehrere Tage möglich war. In HUVEC wurde ebenfalls keine Ausbildung von Pimonidazol-Addukten beobachtet (Abbildung 54 g - l).

Als Negativkontrolle diente ein nicht-poröser $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, bei welchem keine kontinuierliche Nährstoffzufuhr durch den PC-Mikrokanal in das untere Kompartiment erfolgte. Folglich wurde die Kokultur aus Perizyten und Astrozyten unter statischen Bedingungen über mehrere Tage gehalten. Im Vergleich zum porösen $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, bei dem die Nährstoffe in das untere Kompartiment diffundierten, bildeten die Perizyten und Astrozyten im nicht-porösen $\mu 3DVasc$ Bioreaktor viele Pimonidazol-Addukte, was auf hypoxische Bedingungen im unteren Kompartiment zurückzuführen ist (Abbildung 55 a - f). Die HUVEC im nicht-porösen PC-Mikrokanal wiesen aufgrund der kontinuierlichen Mediumzufuhr durch die an den PC-Mikrokanal angeschlossene Mikrofluidik keine Hypoxie auf (Abbildung 55 g - l).

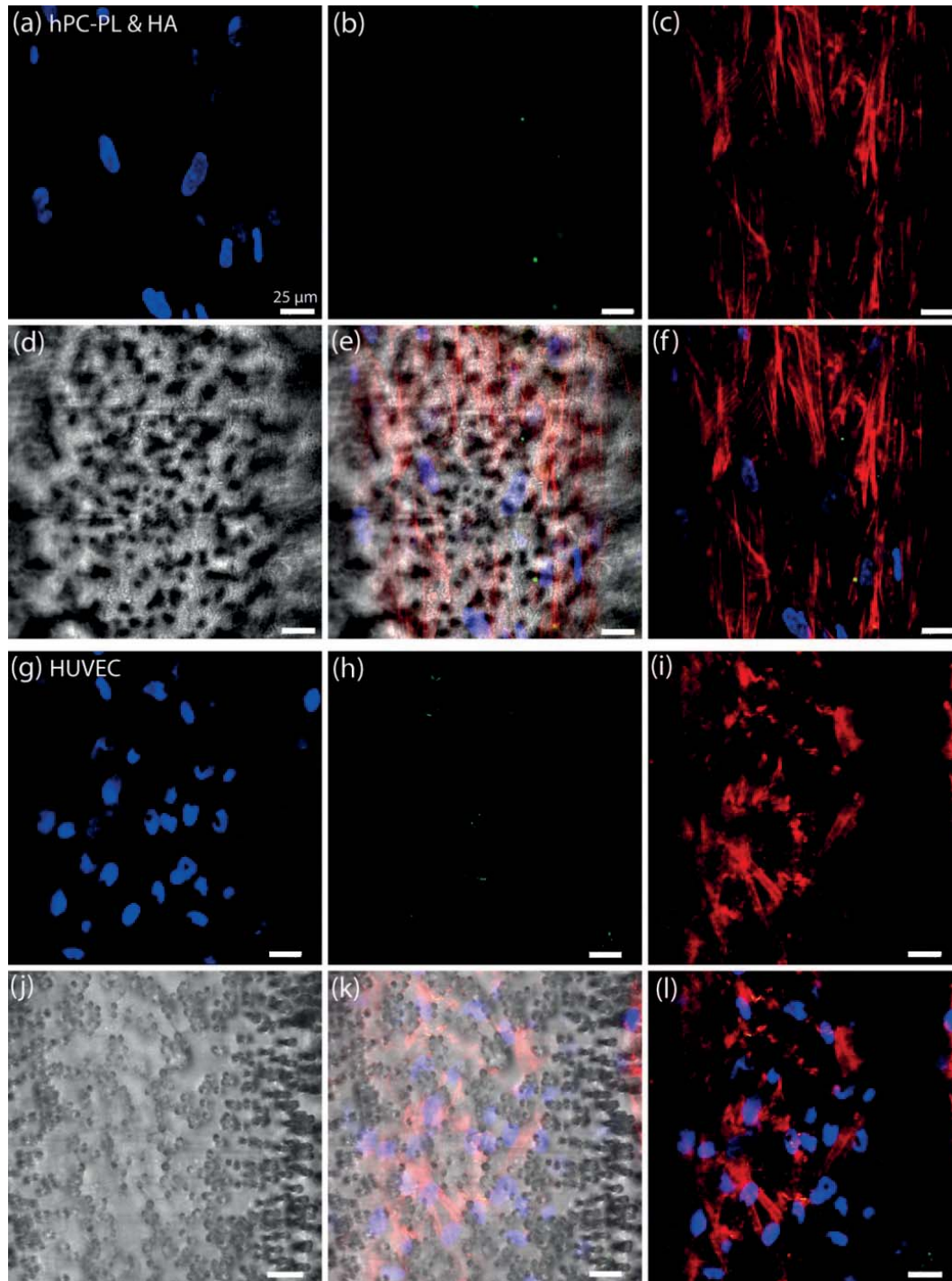


Abbildung 54: Pimonidazol-Addukte in Kokultur aus HUVEC, hPC-PL und HA im porösen $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 14 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HUVEC ($1,25 \times 10^6$) mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Inkubation mit der HypoxyprobeTM-1 (20 mM) dauerte 24 Stunden. Der Nachweis der Pimonidazol-Addukte in den Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-Pimonidazol-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, g) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, h) Alexa Fluor® 488-Färbung der Pimonidazol-Addukte, grün. (c, i) Alexa Fluor® 546 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (d, j) Hellfeldaufnahme. (e, k) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (f, l) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 25 μm .

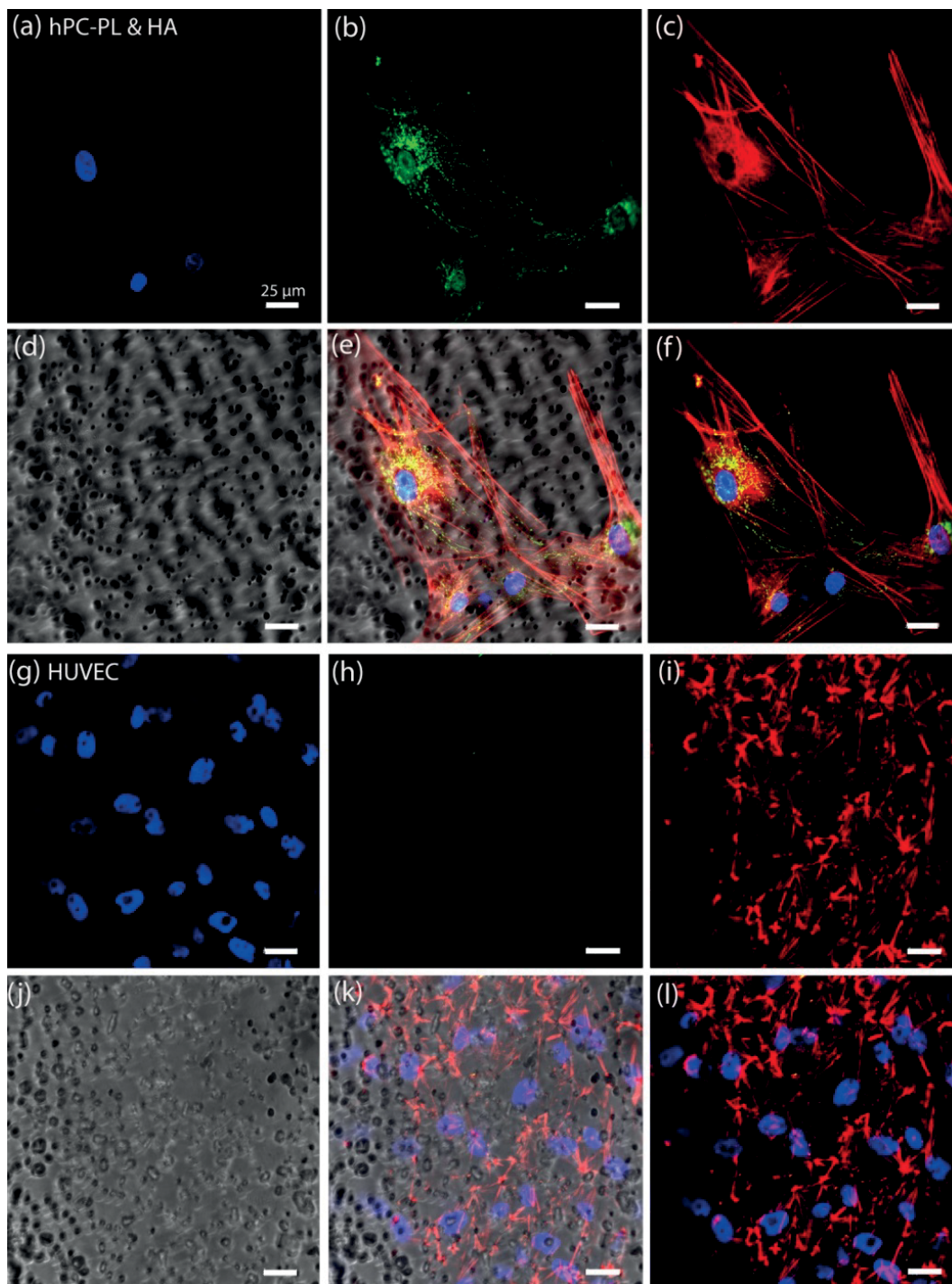


Abbildung 55: Pimonidazol-Addukte in Kokultur aus HUVEC, hPC-PL und HA im nicht-porösen $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 14 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HUVEC ($1,25 \times 10^6$) mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 µl/min. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 unter statischen Bedingungen. Die Inkubation mit der HypoxyprobeTM-1 (20 mM) dauerte 24 Stunden. Der Nachweis der Pimonidazol-Addukte in den Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-Pimonidazol-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, g) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, h) Alexa Fluor® 488-Färbung der Pimonidazol-Addukte, grün. (c, i) Alexa Fluor® 546 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (d, j) Hellfeldaufnahme. (e, k) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (f, l) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 25 µm.

4.5.9 Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen

Die mikrovaskulären Endothelzellen der BBB sind im Vergleich zum peripheren Endothel durch eine erhöhte Expression von Tight Junctions und spezifische Efflux-Pumpen gekennzeichnet.^[31] Für die Durchführung von Transportstudien als „Proof of Principle“ des etablierten BBB-Modells war es folglich notwendig, HUVEC mit mikrovaskulären Endothelzellen zu ersetzen. Hierzu wurden $1,25 \times 10^6$ humane, zerebrale, mikrovaskuläre Endothelzellen hCMEC/D3 (engl. Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells) im PC-Mikrokanal des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors etabliert. Diese immortalisierte Zelllinie wurde erstmals 2005 von Weksler et al. vorgestellt und ist seitdem bezüglich ihrer Expression von wichtigen endothelialen Markern, Tight Junction Proteinen und Efflux-Pumpen charakterisiert worden.^[100, 214] Zur Kultivierung von hCMEC/D3 im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurden die Flussraten auf $100 \mu\text{l/h}$ reduziert, da laut Literatur die mikrovaskulären Endothelzellen im ZNS Scherkräften zwischen $5 - 23 \text{ dyn/cm}^2$ ausgesetzt sind.^[215] Zur Erzeugung niedriger Flussraten wurde eine Spritzenpumpe (Fusion 200 Pumpensystem, Chemyx) eingesetzt (Abbildung 56).

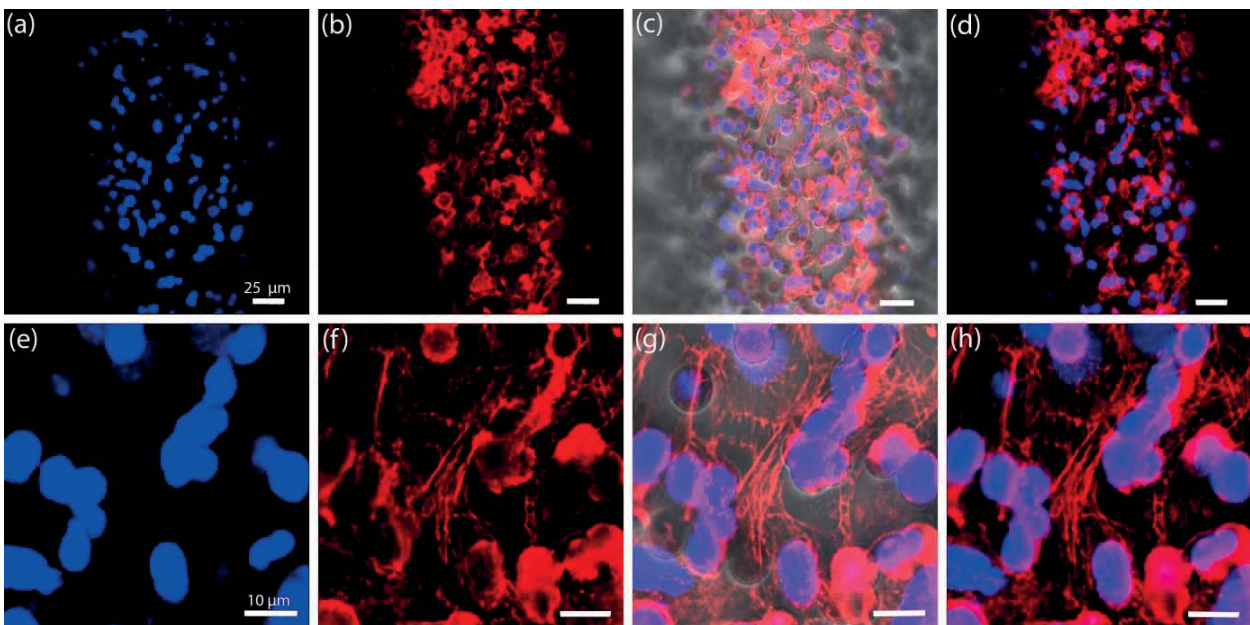


Abbildung 56: hCMEC/D3 unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 8 (konfokale Aufnahmen). hCMEC/D3 ($1,25 \times 10^6$) wurden im Kollagen ($0,1 \text{ mg/ml}$)-beschichteten porösen PC-Mikrokanal bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von $100 \mu\text{l/h}$. Zur Markierung der Aktinfilamente wurde Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml) verwendet. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 ($2 \mu\text{g/ml}$) visualisiert. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, e) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, f) Alexa Fluor® 546 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (c, g) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (d, h) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = $25 \mu\text{m}$ (a – d) bzw. $10 \mu\text{m}$ (e – h).

Ein immunhistochemischer Nachweis der Proteine Claudin-5 (Abbildung 57 a - d) und PECAM-1 (Abbildung 57 e - h) zeigte, dass die hCMEC/D3 im porösen PC-Mikrokanal beide Proteine exprimierten. Bei der Claudin-Proteinfamilie handelt es sich um insgesamt 20 Transmembranproteine. Claudin-5 wird ausschließlich im Endothel exprimiert. Zusammen mit Claudin-3 und -12 ist es ein wichtiger Bestandteil der Tight Junctions in der BBB.^[200]

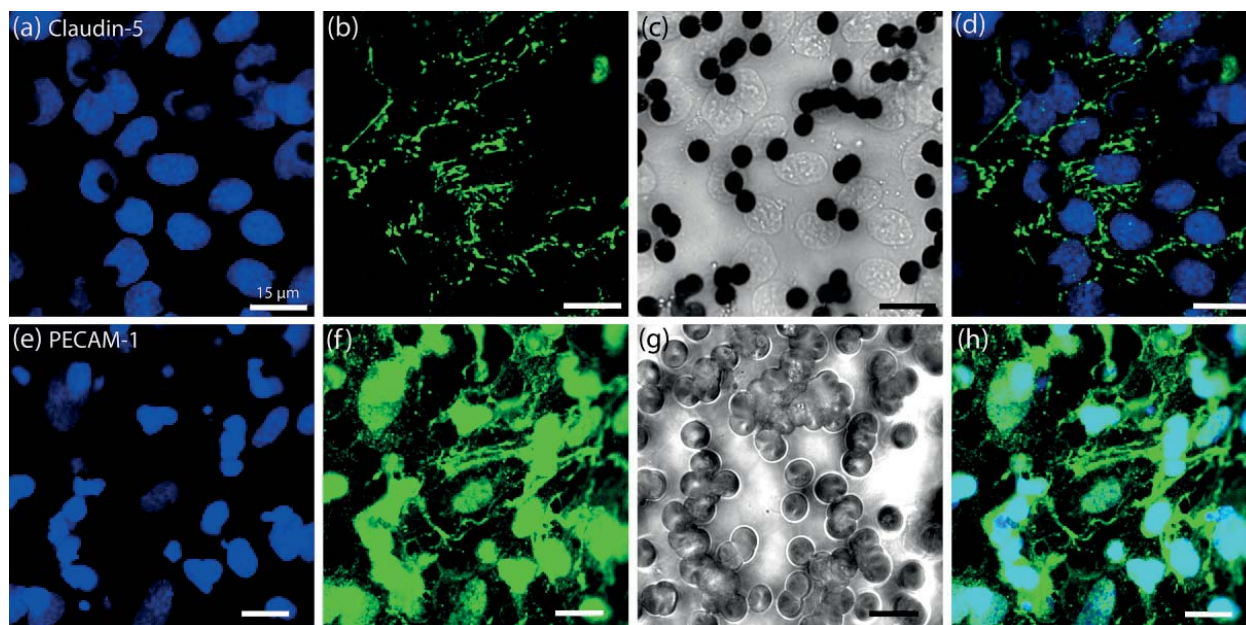


Abbildung 57: Expression von Claudin-5 (a - d) und PECAM-1 (e - h) in hCMEC/D3, kultiviert unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 6 (a – d) bzw. Tag 7 (e – h), (sequentielle konfokale Aufnahmen). hCMEC/D3 ($1,25 \times 10^6$) wurden im Kollagen (0,1 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/h. Der Nachweis der Claudin-5-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-Claudin-5-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, e) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 488-Färbung der Claudin-5-Expression, grün. (f) Alexa Fluor® 488-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (c, g) Hellfeldaufnahme. (d, h) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 15 µm.

Die mikroskopischen Aufnahmen der Signale aus der Expression der P-gp Efflux-Pumpe in hCMEC/D3 sind in Abbildung 58 zu sehen. Die P-gp Efflux-Pumpe ist der am häufigsten charakterisierte Vertreter der ABC Protein-Superfamilie und ist für den Rücktransport von Schadstoffen aus dem Gehirn ins Blutgefäßlumen zuständig. Gleichzeitig sind einige Medikamente Substrate von P-gp.^[65, 66] Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass P-gp sowohl in der Plasmamembran, als auch in Vesikeln lokalisiert war. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Tai et al. (2009) und Mahringer et al. (2010) gemacht.^[66, 216]

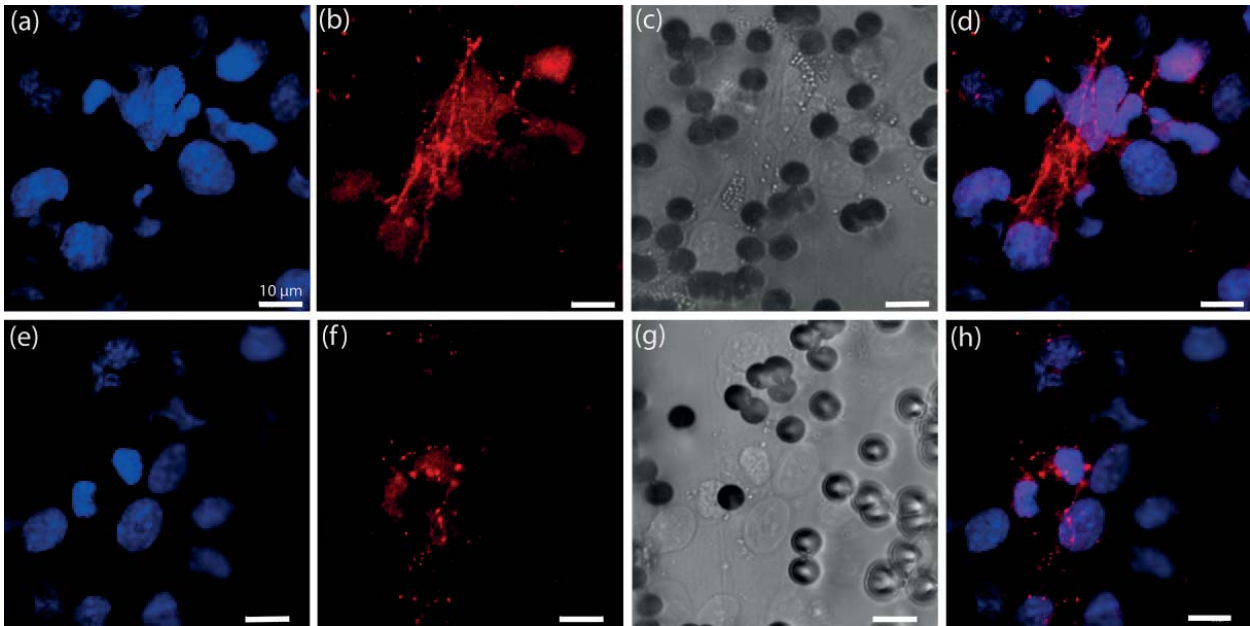


Abbildung 58: Expression von P-gp in hCMEC/D3, kultiviert unter fluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 7 (konfokale Aufnahmen). hCMEC/D3 ($1,25 \times 10^6$) wurden im Kollagen (0,1 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/h. Der Nachweis der P-gp-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-P-gp-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 546-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, e) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, f) Alexa Fluor® 546-Färbung der P-gp-Expression, rot. (c, g) Hellfeldaufnahme. (d, h) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 10 µm.



4.5.10 P-gp Transport Assay

Die nachfolgenden Ergebnisse sind im Rahmen des HEIKA Projekts in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis um Prof. Dr. Gert Fricker am Institut für Pharmazie & Molekulare Biotechnologie an der Universität Heidelberg entstanden.

Die Bestimmung der Barriereintegrität kann neben den TEER Messungen und der Permeabilitätsbestimmung mittels der Untersuchung der Aktivität der Efflux-Pumpen erfolgen.^[32] Wie in Kapitel 4.5.9 bereits erwähnt, gehört P-gp zu den am häufigsten untersuchten Efflux-Pumpen der ABC Protein-Superfamilie.^[217] Aufgrund der vielseitigen Wechselwirkungen von P-gp mit zahlreichen Arzneimitteln *in vivo*, wie z.B. die Inhibition des Transports vieler ZNS-Therapeutika, die Erschwerung der interstinalen Absorption oder die Erhöhung der renalen und biliären Exkretion, steht die Erforschung der P-gp Inhibitoren im Fokus vieler Untersuchungen.^[64, 218-223] Zudem würde die Identifikation neuer, mit P-gp interagierender Substanzen in der präklinischen Phase die Medikamentenentwicklung beschleunigen und die damit verbundenen Kosten reduzieren. Daher besteht ein zunehmendes Interesse in der medizinischen Forschung an Untersuchungssystemen, welche die Wechselwirkungen zwischen P-gp und anderen Substanzen aufklären würden. Bisher wurden zu diesem Zweck oft Modelle mit einer Überexpression von P-gp Efflux-Pumpen verwendet, welche auf krankhafte Veränderungen oder eine Transfektion zurückzuführen ist und somit keinen aussagekräftigen Vergleich zu physiologischen *in vivo* Bedingungen ermöglicht.^[64, 224-227] Zur Untersuchung der Interaktionen mit P-gp wurden in den letzten Jahren oft autofluoreszierende, Fluoreszenz- oder radioaktiv markierte Substanzen eingesetzt.^[228-231] Allerdings haben sich viele von diesen Testmethoden als sehr teuer, in ihrer Handhabung aufwendig und deshalb für ein HTS ungeeignet bewirkt. Zudem waren viele Testsubstanzen zytotoxisch oder wurden in Zellkompartimenten angelagert.^[64] Aus diesem Grund wird heutzutage oft ein Calcein-AM-Assay durchgeführt.^[232-234] Wie bereits in Kapitel 4.5.7 beschrieben, ist Calcein-AM ein nicht fluoreszierender, lipidlöslicher Stoff, welcher in der Lage ist, Zellmembranen lebender Zellen zu penetrieren. Im Zytosol wird Calcein-AM durch Esterasen zum hydrophilen und stark fluoreszierenden Calcein umgewandelt.^[64] Zelllinien mit einer Überexpression an P-gp Efflux-Pumpen, wie etwa hCMEC/D3, sind durch eine geringe Durchlässigkeit für Calcein-AM gekennzeichnet: Calcein-AM wird durch P-gp aus den Endothelzellen zurück ins Gefäßlumen transportiert, ohne dass die Spaltung durch Esterasen stattfindet (Abbildung 59 a).^[234, 235] In den letzten Jahren wurden viele Inhibitoren von P-gp erforscht, um die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln zu erhöhen.^[236] Diese Inhibitoren blockieren das P-gp, sodass Calcein AM in der Zelle verbleibt und von Esterasen zum grün fluoreszierenden Calcein umgesetzt wird. Auf diese Weise lassen sich die Zellen mikroskopisch visualisieren (Abbildung 59 b).

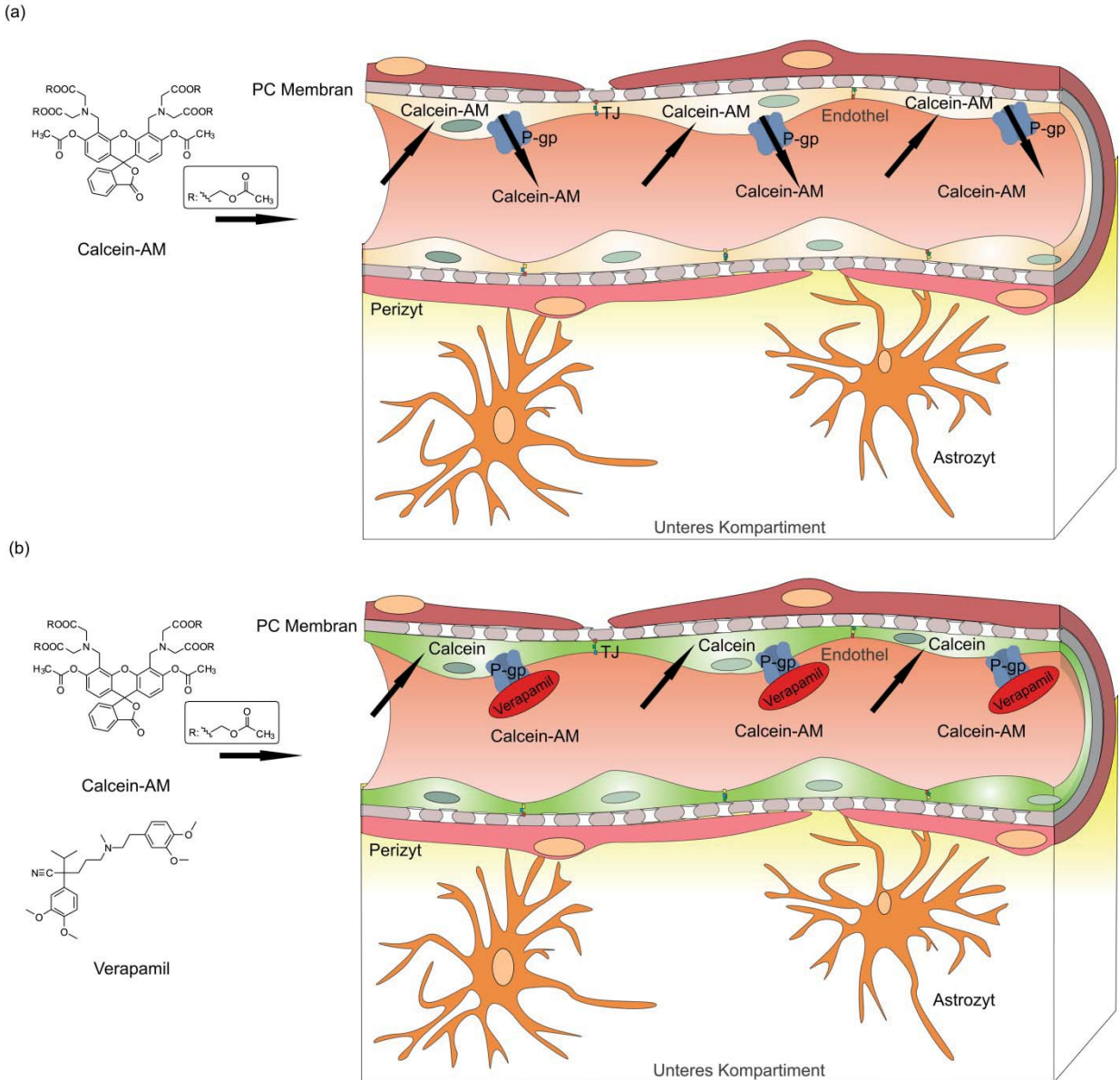


Abbildung 59: (a) Funktionsprinzip des P-gp Transport Assays. Calcein-AM ist ein farbloser, Zell-penetrierender Stoff, welcher von P-gp aus dem Zellinneren zurück ins Lumen transportiert wird. (b) Blockierung von P-gp durch den P-gp Inhibitor Verapamil führt zur Akkumulation von Calcein-AM im Zellinneren und zu seiner anschließenden Umsetzung zu Calcein durch Esterasen. Calcein ist ein grün fluoreszierender, hydrophiler Stoff, der das Zytosol markiert.



Schema 3: Umsetzung des farblosen Calcein-AM durch Esterasen im Zellinneren in grün fluoreszierendes Calcein.

Im nachfolgenden Experiment wurde Calcein-AM mit und ohne Zusatz des P-gp Inhibitors Verapamil im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor appliziert. Hierzu wurde der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor mit der Kokultur aus hCMEC/D3, Perizyten und Astrozyten besiedelt und über mehrere Tage unter fluidischen Bedingungen bis zur Durchführung des Experiments kultiviert. Die Ergebnisse in Abbildung 60 zeigen die Akkumulation von Calcein in hCMEC/D3. Es wird deutlich, dass die Anwendung von Verapamil zur Blockierung von P-gp Efflux-Pumpen in diesen Zellen führte, wodurch es zur Spaltung von Calcein AM durch Esterasen kam (Abbildung 60 a - d). In Abwesenheit von Verapamil kam es zum Rücktransport von Calcein-AM aus dem Zellinneren, wodurch die hCMEC/D3 Zellen keine grüne Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 60 e - h).

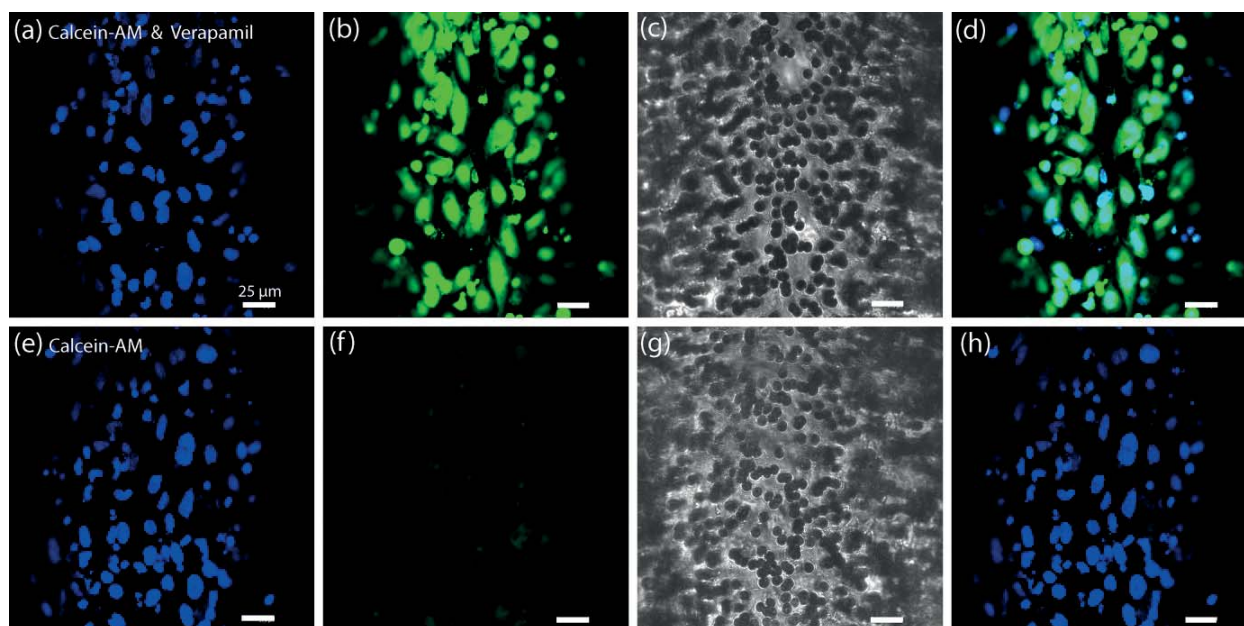


Abbildung 60: P-gp Transport Assay in hCMEC/D3 im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 7 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. hCMEC/D3 ($1,25 \times 10^6$) wurden im Kollagen (0,1 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/h. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Efflux-Pumpen P-gp wurden mit Verapamil (100 µg/ml) blockiert (a – d). Die $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren wurden mit Calcein-AM (1 µg/ml) inkubiert (a – h). Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, e) Hoechst 33342-Färbung der DNA in hCMEC/D3-Zellkernen, blau. (b, f) Calcein in hCMEC/D3, grün. (c, g) Hellfeldaufnahme. (d, h) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 25 µm.

Obwohl dieser Assay bisher eine breite Anwendung *ex vivo* und *in vitro* fand, wurden in der Literatur keine solchen Ergebnisse unter „BBB-on-a-Chip“ vorgestellt.^[237-239] Ein ähnlicher Effekt wurde aber in isolierten Blutkapillaren beobachtet. Fricker et al. (2002) untersuchten in ihrer Studie an Schweine-Bloodkapillaren die Akkumulation des fluoreszierenden Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol (NBD)-Octreotids im Gefäßlumen. Es zeigte sich, dass die Zugabe der P-gp Modulatoren Verapamil, PSC-833 und Cyclosporin A den Transport des NBD-Octreotids aus den Zellen ins Gefäßlumen signifikant reduziert.^[240] Als Modulatoren werden hierbei Substrate mit einer kompetitiven oder Inhibitoren mit einer non-kompetitiven Wirkung bezeichnet. Auch Mahringer et al. (2010) machten eine ähnliche Beobachtung mit dem fluoreszierenden P-gp Substrat NBD-Cyclosporin A: Die Zugabe von PSC-833 resultierte hier in einem vom Farbstoff freien Lumen. Lediglich in den Endothelzellen konnte die Fluoreszenz detektiert

werden.^[66] Ebenfalls in isolierten Endothelzellen aus Schweine-Kapillaren, die durch eine physiologische Expression von P-gp Efflux-Pumpen charakterisiert sind, wurde eine Akkumulation von Calcein infolge der Anwendung von P-gp Inhibitoren verzeichnet.^[64] Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor ein geeignetes Untersuchungssystem für P-gp Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln darstellt und mit etablierten *ex vivo* und *in vitro* Modellen vergleichbar ist. Die Vorteile des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors liegen in der Anwendung von Zellen menschlicher Abstammung und im Design des Systems mit der Krümmung des artifiziellen Blutgefäßes und den Anschlüssen an die Mikrofluidik.

4.6 Darm

Heutzutage stellt die Applikation von Arzneimitteln über den Gastrointestinaltrakt aufgrund der schnellen Absorption und des guten Plasmakonzentrations-Zeit-Profiles die beliebteste Methode der Medikamentenverabreichung dar. Angesichts dieser Tatsache hat die pharmazeutisch-medizinische Forschung ein großes Interesse an den Modellen zur Untersuchung der Stoffaufnahme durch das Darmepithel entwickelt. Aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands der Tierversuche und aufgrund von ethischen Bedenken wurde der Fokus zunehmend auf die alternativen *in vitro* Modelle gelegt. Deshalb wurden in den letzten Jahren viele *in vitro* Systeme zur Rekonstruktion des Darmepithels in der Literatur vorgestellt. Beispielsweise wurden Transwell-basierte Modelle zur Untersuchung der Barriereintegrität entwickelt.^[241-243] Zudem unternahm Esch et al. (2012) einen Versuch, die 3D-Anordnung des Darmepithels zu rekonstruieren.^[122] Kim et al. (2013) verdeutlichten, dass die Nachahmung der dynamischen Mikroumgebung, wie z.B. die Zerrungen der Darmwand während der Verdauung und der intraluminale Fluss, für die physiologische Organfunktion sowie die Entwicklung mancher Krankheiten, wie z.B. der Morbus Crohn, von Bedeutung sind. Daher entwickelten sie ein Modell, welches die mechanischen und fluidischen Stimuli inkorporiert.^[121] Abgesehen von seiner wichtigen Aufgabe in der Absorption von Wirkstoffen repräsentiert das Darmepithel, analog zur Haut, eine wichtige Schutzbarriere zwischen unserem Körper und der äußeren Umwelt. Es ist an der Aufnahme von Nährstoffen beteiligt, schützt aber gleichzeitig den Körper vor dem Eintritt schädlicher Stoffe und hält unverdaute Bestandteile und Darmflora zurück. Ungleich der Haut, welche aus multiplen, mit Keratin vernetzten Zellschichten besteht, setzt sich das Darmepithel aus einer einzigen, fragilen Zellschicht zusammen. Dabei werden die vielfältigen biologischen Aufgaben ausschließlich von vier Zelltypen bewerkstelligt: Enterozyten, Becherzellen, enteroendokrinen Zellen und Paneth-Zellen. Im Falle des Kolorektalkrebses ist eine Läsion im Darmendothel das erste identifizierbare Zeichen.^[110] Diese Tatsache verdeutlicht die Bedeutung der Erforschung der Darmfunktion zum besseren Verständnis von Krankheiten und zur Entwicklung der Vorbeugungsmöglichkeiten.

Angetrieben von dem Ziel, die Barrierefunktion des Darmepithels zu reproduzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein dynamisches Darmmodell im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor entwickelt. Wie bereits im Fall der BBB sollte der Einfluss des artifiziellen Blutgefäßes auf das Verhalten von Darmzellen untersucht werden. Durch Verwendung der humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinie (Caco-2) konnte Darmgewebe im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor nachgebildet werden. Diese Zelllinie wurde ursprünglich von Fogh et al. (1977) aus einem Tumor isoliert und hat sich als ein sehr vielversprechendes *in vitro* Modell zur Charakterisierung des Substanztransports, der Barriereintegrität und der Feststellung der Substanztoxizität bewährt.^[120, 124] Wie bereits von Kim et al. (2012) beschrieben, kann ein Monolayer aus



Caco-2 Zellen in einem *in vitro* Darmmodell mittels Einbringen von mechanischem Stress durch die Kombination von periodischer Dehnung und Scherspannung, in Abwesenheit eines Hydrogels, eine 3D-Kultur von Darmzotten und Villistrukturen ausbilden.^[121] Dagegen sind Zellen unter 2D-Bedingungen durch eine flache, säulenförmige Morphologie charakterisiert. Dieses Modell basiert jedoch auf einem Caco-2-Monolayer, der in einer planaren Anordnung ohne die Anwesenheit der angrenzenden Blutgefäße ausplattiert wurde. Aus diesem Grund ist es unklar, ob auch die Endothelzellen einen Einfluss auf die 3D-Differenzierung der Caco-2 Zellen haben. Daher war eine Besiedlung der Caco-2 Zellen als ein Monolayer im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors in direktem Kontakt zu der porösen Membran, welche auf der Rückseite mit Endothel ausgekleidet ist, von Interesse.

Caco-2 Zellen ($3,6 \times 10^5$) wurden über mehrere Tage auf der Rückseite des PC-Mikrokanals in direkter Nähe zu HUVEC kultiviert. Abbildung 61 verdeutlicht, dass Caco-2 Zellen unter diesen Bedingungen Zotten-ähnliche Faltungen ausbildeten. Auch in der Literatur wird die Dauer der Ausbildung bzw. Erneuerung der Villistrukturen in Wochen angegeben.^[110, 111] Zur Beurteilung der Konfluenz der endothelialen Zellkultur wurden die über neun Tage unter fluidischen Bedingungen in direkter Nähe zum intestinalen Zelllayer kultivierten HUVEC ($1,25 \times 10^6$) mit CellTracker™ Green (10 μ M) zur Markierung des Zytosols angefärbt.

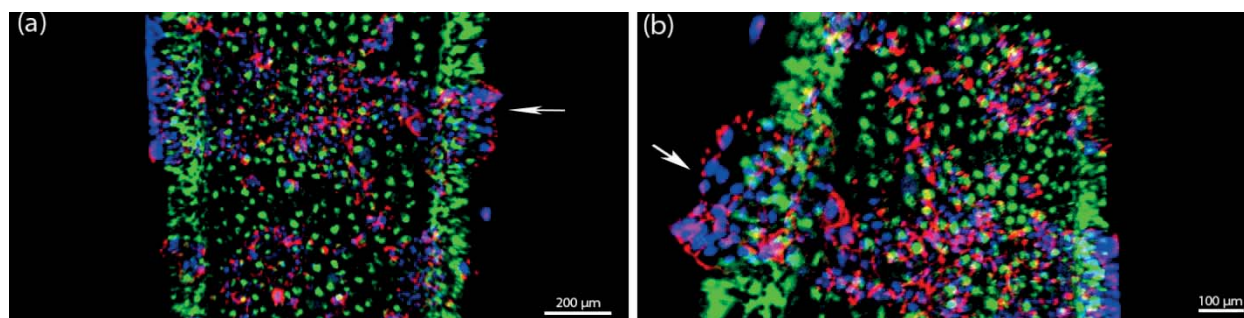


Abbildung 61: Ausbildung der Zotten-ähnlichen Strukturen aus Caco-2 Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 9 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. Die Visualisierung von HUVEC wurde mit CellTracker™ Green (10 μ M) erreicht. Caco-2 Zellen ($3,6 \times 10^5$) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung der Caco-2 Zellen mit EGM-2 erfolgte über den porösen PC-Mikrokanal. Die Visualisierung der Caco-2-Zellkerne wurde mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml) durchgeführt. Zur Markierung der Aktinfilamente wurde Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml) verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Wachstums beider Zellkulturen wurde ein z-Stapel von 70 μ m (22 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Projektion der Rückseite des PC-Mikrokanals. (b) Seitliche Projektion der Rückseite des PC-Mikrokanals. Zotten-ähnliche Strukturen wurden mit Pfeilen markiert. Maßstab = 200 μ m (a) bzw. 100 μ m (b).

4.6.1 Nachweis der Schleimbildung

Zahlreiche Studien belegen, dass Caco-2 Zellen keinen Schleim produzieren.^[244, 245] Ihre Physiologie und Morphologie entspricht eher der der Enterozyten, während der Schleim von sekretorischen Epithelzellen abgesondert wird.^[246, 247] Mucine bilden den Hauptbestandteil der intestinalen Schleimschicht. Dies sind Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht, die entweder als membrangebundene (Mucin-1) oder sekretorische (Mucin-2 und Mucin-3) Proteine gebildet

werden.^[248, 249] Sie sind durch Polysaccharide, die durch O-glykosidische Bindungen an Serin oder Threonin-Reste der Proteinkette gebunden sind, charakterisiert. Nichtsdestotrotz gibt es Hinweise, dass die Differenzierung der Caco-2 Zellen in alle vier Zelltypen durch die Anpassung der Kultivierungsbedingungen möglich ist.^[250]

Zur Beurteilung der Mucin-2 Expression in Caco-2 Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt (Abbildung 62 c). Um die Konfluenz des Caco-2 Zellrasens und somit die Morphologie der Zellen zu beurteilen, wurden zusätzlich die Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Abbildung 67 a) und die Aktinfilamente mit Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml) (Abbildung 62 b) in den Zellen visualisiert. Die im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor kultivierten Caco-2 Zellen exprimierten Mucin-2 und wiesen hochorganisierte Aktinfilamente auf.

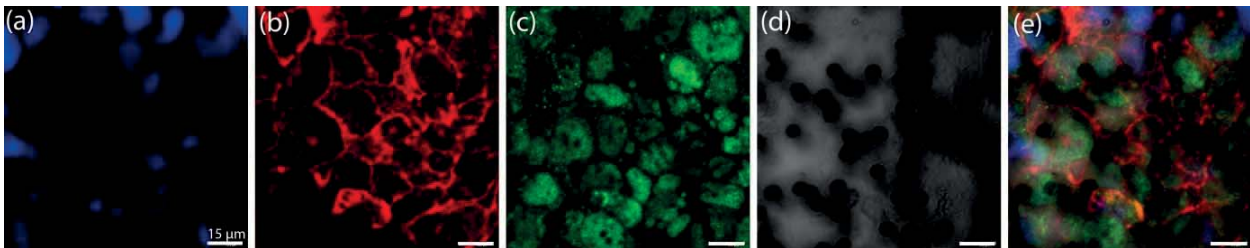


Abbildung 62: Expression von Mucin-2 in den Caco-2 Zellen, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 6 (sequentielle konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 $\mu\text{l}/\text{min}$. Caco-2 Zellen ($3,6 \times 10^5$) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte über den porösen PC-Mikrokanal. Der Nachweis der Mucin-2-Expression in den Caco-2 Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-Mucin-2-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Caco-2 Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 546 Phalloidin-Färbung der Caco-2 Aktinfilamente, rot. (c) Alexa Fluor® 488-Färbung der Mucin-2-Expression, grün. (d) Hellfeldaufnahme. (e) Überlagerung. Maßstab = 15 μm .

4.6.2 Nachweis von Tight Junctions

Zur Überprüfung der Konfluenz der intestinalen Zellkultur wurden die Zellen einer Immunfärbung der Tight Junctions unterzogen. Dabei wurde die Expression von Occludin nachgewiesen. Occludin wurde erst im Jahr 1993 im Huhn entdeckt. Es ist ein Transmembranprotein und weist eine Molekulargröße von 65 kDa auf.^[251] Occludin wird von allen gastrointestinalen Zelltypen exprimiert. Seine Aufgabe besteht neben dem Zusammenhalt des gastrointestinalen Gewebes in dem kontrollierten Stofftransport durch den interzellulären Raum.^[122] Des Weiteren grenzen Tight Junctions die Darmzellen in einen apikalen und basalen Bereich ein.^[252]

Die Ergebnisse zeigten, dass die Darmzellen nach achttägiger Kultivierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor einen konfluenten Zellrasen mit klar definierten Tight Junctions formten (Abbildung 63). Es wurden bereits zahlreiche Publikationen veröffentlicht, die darauf hinweisen, dass die Ausbildung von Tight Junctions in Caco-2 Zellen, kultiviert in konventionellen Transwell-Systemen, zwischen 15 und 20 Tagen dauert.^[120, 123] Somit wurde nachgewiesen, dass Caco-2 Zellen, die in direkter Nähe zum Endothel auf



der porösen PC-Membran im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor kultiviert wurden, schneller eine differenzierte Barrierefunktion etablieren.

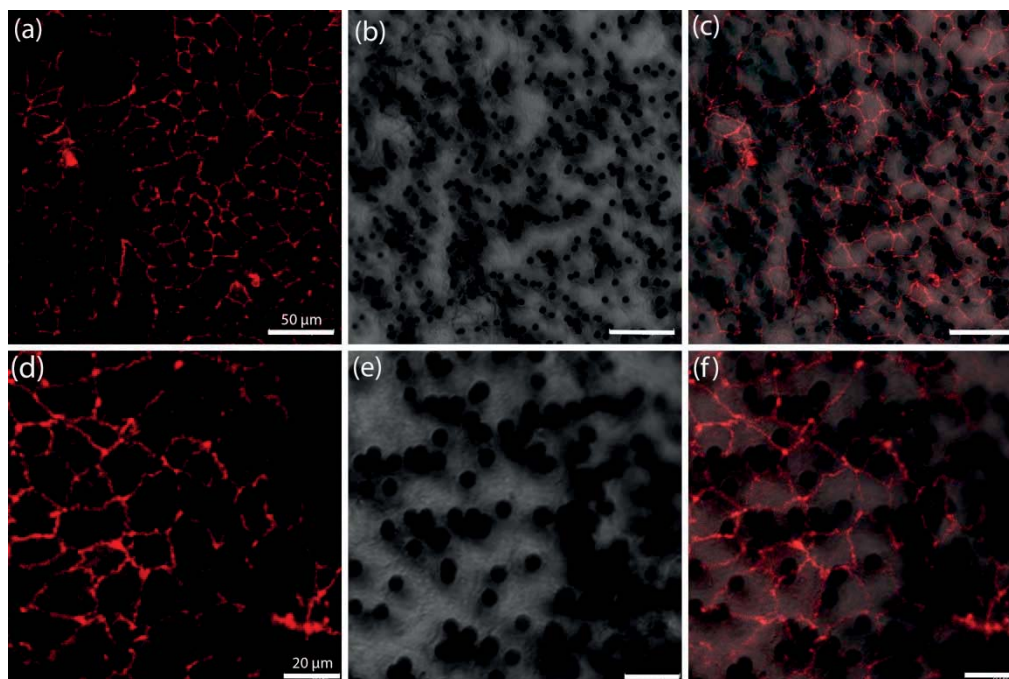


Abbildung 63: Expression von Occludin in Caco-2 Zellen, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 8 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronektin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 µl/min. Caco-2 ($3,6 \times 10^5$) Zellen wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte über den porösen PC-Mikrokanal. Der Nachweis der Occludin-Expression erfolgte mit dem monoklonalen, Alexa Fluor® 594-gekoppelten anti-human-Occludin-Maus IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a, d) Alexa Fluor® 594-Färbung der Occludin-Expression in Caco-2 Zellen, rot. (b, e) Hellfeldaufnahme. (c, f) Überlagerung. Maßstab = 50 µm (a – c) bzw. 20 µm (d – f).

4.6.3 Nachweis der Zotten-ähnlichen Strukturen

Weiterhin wurde die Entstehung von Zotten-ähnlichen 3D-Strukturen aus Caco-2 Zellen, insbesondere an den Wänden des PC-Mikrokanals, beobachtet. Caco-2 Zellen, die während der Kultivierung in konventionellen 2D-Zellkulturmodellen eine flache, säulenförmige Morphologie zeigen, bildeten in direkter Nähe zur endothelialen Zellkultur im porösen PC-Mikrokanal spontan Faltungen und zeigten ein 3D-Wachstum. Die Zellen in diesen Zotten-ähnlichen Strukturen wurden durch ausgeprägte Tight Junctions zusammengehalten, die insbesondere an der Grenze zur PC-Mikrokanalwand mikroskopisch deutlich sichtbar waren (Abbildung 64).

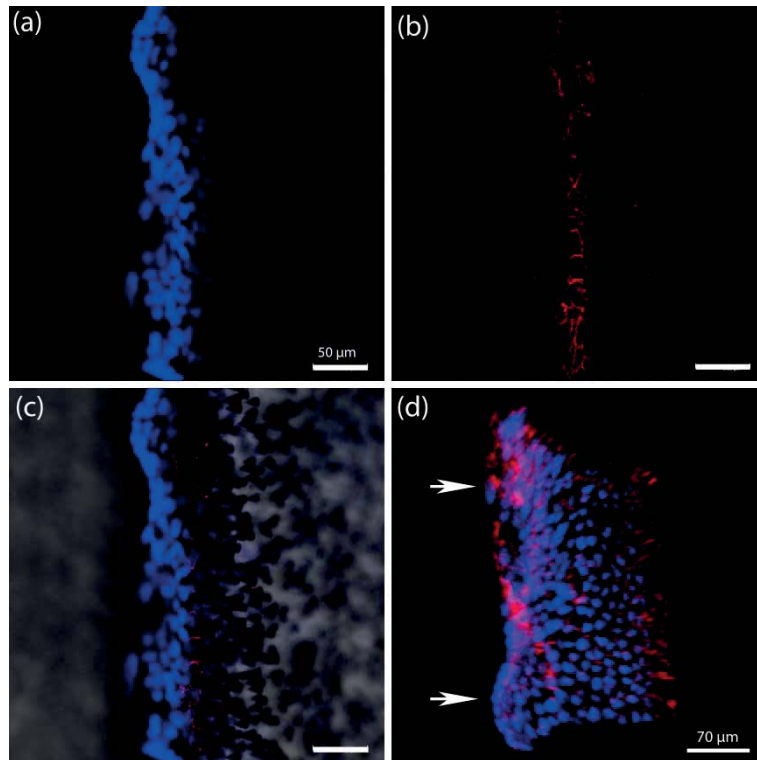


Abbildung 64: Ausbildung der Zotten-ähnlichen Strukturen aus Caco-2 Zellen, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 8 (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (0,9 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 µl/min. Caco-2 Zellen ($3,6 \times 10^5$) wurden 3 Tage nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte über den porösen PC-Mikrokanal. Der Nachweis der Occludin-Expression erfolgte mit dem monoklonalen, Alexa Fluor® 594-gekoppelten anti-human-Occludin-Maus IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. Zur Visualisierung des Zellwachstums wurde ein z-Stapel von 115 µm (40 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Caco-2 Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 594-Färbung der Occludin-Expression in Caco-2 Zellen, rot. (c) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (d) 3D-Rekonstruktion der PC-Mikrokanalwand. Maßstab = 50 µm (a – c) bzw. 70 µm (d).

4.7 Leber

Als drittes Barrieremodell wurde ein vaskularisiertes Lebermodell etabliert. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. Atsushi Miyajima an der Universität Tokyo in Japan fetale, murine Stammzellen isoliert, ausdifferenziert und als eine stabile Zelllinie etabliert. Zudem wurden 3D-Techniken zur Ausdifferenzierung von adulten, murinen Stammzellen getestet.

Die Leber ist, nach der Haut, das zweitgrößte Organ des Menschen und ein zentrales Organ der Homöostase.^[253] Sie ist an zahlreichen Prozessen beteiligt, wie z.B. dem Kohlenhydratstoffwechsel, der Glukogenspeicherung, der Biosynthese von Aminosäuren und Nukleotiden, dem Lipidmetabolismus, der Harnstoffsynthese, der Detoxifikation von Medikamenten und der Hormonproduktion.^[254] Da in der Leber zudem Galle produziert wird, ist sie auch die größte exokrine Drüse.^[253] Aufgrund dieser vielfältigen Funktionen, haben Lebererkrankungen, wie z.B. die Hepatitis, Leberfibrose, Zirrhose und der



Krebs, sehr oft fatale Folgen. Andererseits ist die Leber durch eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit gekennzeichnet, weshalb sie oft als ein Transplantationsorgan benutzt wird. Dennoch sind die molekularen Mechanismen der Organogenese, Pathogenese und der Regeneration der Leber nicht genau identifiziert.^[140] Aus diesem Grund ist die Erforschung dieser Mechanismen von hoher Bedeutung für den medizinischen Sektor. Wie im Fall der BBB und des Darmepithels wurden in den letzten Jahrzehnten viele *in vitro* Modelle dafür entwickelt.^[255-258] Insbesondere in Hinblick auf die Toxizitätsscreenings von Wirkstoffen fanden diese Modelle einen breiten Einsatz in der industriellen Forschung. Dies ist unter anderem damit zu erklären, dass die unerwünschten Nebenwirkungen die häufigste Ursache für den Abbruch der kostenintensiven klinischen Studien und den Rückzug von bereits zugelassenen Medikamenten darstellen.^[259] Als Grundlage zur Etablierung von diesen *in vitro* Modellen werden häufig primäre Hepatozyten verwendet, weil sie im Gegensatz zu immortalisierten Zelllinien eine unveränderte Morphologie und Physiologie haben. Dennoch verlieren sie diese Eigenschaften bereits nach wenigen Tagen und weisen eine veränderte Transkription und Translation auf.^[260] Hinzu kommt, dass humane Hepatozyten *in vitro* nicht proliferieren. Außerdem ist die Isolation dieser Zellen limitiert, weil das gesunde Gewebe oft zum Zweck der Transplantation benutzt wird und die von den Operationen anfallenden Biopsien oft Isolation nur einer geringen Zellzahl ermöglichen.^[139] Aus diesem Grund wurden Leber-Vorläuferzellen als eine alternative Materialquelle zur Etablierung von *in vitro* Modellen in Betracht gezogen und untersucht.^[260] Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit fetale, murine Leber-Vorläuferzellen zum Einsatz im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor isoliert und in zwei Leber-Zelltypen, Hepatozyten und Cholangiozyten, ausdifferenziert.

4.7.1 Isolation von fetalen, murinen Leber-Vorläuferzellen

Tanimizu et al. (2003) beschrieben eine Methode zur Isolation der murinen, fetalen, hepatischen Stammzellen durch Identifizierung bestimmter Oberflächenproteine und anschließender Sortierung dieser Zellen durch Durchflusszytometrie. Es wurde nachgewiesen, dass das Protein DLK (engl. Delta-like protein) in den Leberzellen einer Maus zwischen E10.5 (Embryonalstadium 10,5 Tage) und E16.5 stark exprimiert wird. Im Gegensatz dazu findet in der neonatalen oder adulten Leber keine DLK Expression statt. Die Kultivierung der DLK⁺ Zellen auf Kollagen Typ IV einer E14.5 Leber zeigte, dass sich diese Zellen in Hepatozyten (Albumin⁺) und Cholangiozyten (CK19⁺) ausdifferenzieren und dass manche Zellen eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Folglich bestehen die DLK⁺ Zellen hauptsächlich aus Hepatoblasten.^[142] Das Isolationsprotokoll von DLK⁺ Hepatoblasten befindet sich im Anhang (siehe 9 VI).

4.7.2 Ausdifferenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen

Laut Kamiya et al. (2002) begünstigen Oncostatin M (OSM) und EHS (engl. Engelbreth-Holm-Swarm Sarcoma)-Gel die Ausdifferenzierung der Hepatoblasten in Hepatozyten.^[261, 262] OSM gehört zur IL-6 Familie und wird von proliferierenden hämatopoetischen Zellen sekretiert. Die Wirkung von OSM liegt in der Induktion der Ausdifferenzierung der Hepatoblasten in Hepatozyten.^[263] Hepatozyten sind Leberparenchym-Zellen, bilden mit 80% der Gesamtzellpopulation den Hauptanteil und sind für zahlreiche Metabolismus-Prozesse, wie z.B. Glykogenese, Glukoneogenese, Harnstoffsynthese und Lipidsynthese, verantwortlich.^[254, 264] Außerdem fördert OSM die Ausbildung von Tight Junctions und hemmt den Zellzyklus.^[265, 266]

Die Zellkultur aus DLK⁺ Hepatoblasten erreichte am sechsten Kultivierungstag mit 10 ng/ml OSM eine vollständige Konfluenz (Abbildung 65 c). Des Weiteren wurden nur einige wenige Lipidtröpfchen in der Zellkultur beobachtet (Abbildung 65 a - d). Die Hepatozyten-ähnlichen Zellen, im Folgenden als HLC (eng. hepatic-like cells) bezeichnet, waren durch eine kleine Zellform, dunkle Farbe und in einigen Fällen durch zwei Zellkerne erkennbar (Abbildung 65 d). Laut Literatur sind etwa 15 - 30% der Hepatozyten binukleär.^[267] Neben den HLC enthielt die Probe auch andere Zelltypen. Die genaue Charakterisierung anderer Zelltypen konnte nach der Kultivierung der Zellkultur mit EHS-Gel (Matrigel) durch RNA-Extraktion und anschließender RT-PCR durchgeführt werden.

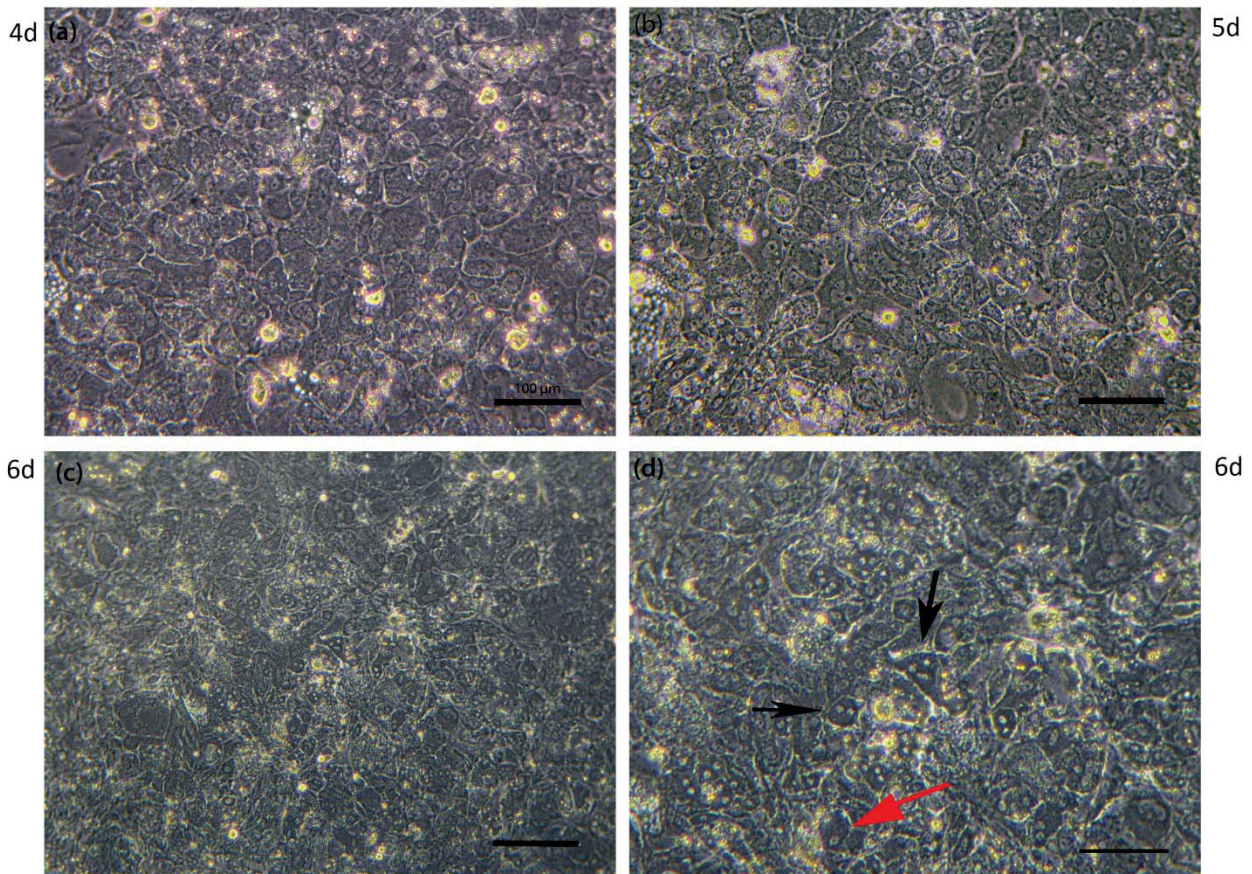


Abbildung 65: Kultivierung isolierter DLK⁺ Hepatoblasten nach Zugabe von OSM (10 ng/ml), Tag 4 bis Tag 6 (lichtmikroskopische Aufnahmen). DLK⁺ Hepatoblasten (ca. 6×10^6) wurden aus fetaler Maus-Leber (E14.5) isoliert und mit Hilfe von dem monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper und Zellsortierer von anderen Zellen getrennt. Kultivierung erfolgte in einer mit 0,1% Gelatine-Lösung beschichteten 6 Well Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO₂. (a) Kultivierungstag 4. (b) Kultivierungstag 5. (c, d) Kultivierungstag 6. (d) Vergrößerung von (c). Der rote Pfeil deutet auf eine ausdifferenzierte mononukleäre HLC. Die schwarzen Pfeile markieren ausdifferenzierte polyploide HLC. Maßstab = 100 µm.

Die Zugabe von Matrigel (1,4 mg/ml) bewirkte eine Ausbildung von Zellclustern, die ein granuliertes Zytoplasma und einen runden Nucleus aufwiesen, was ein charakteristisches Aussehen der reifen Hepatozyten darstellt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls von Tanimizu et al. (2004) beobachtet.^[268] Außerdem waren die Gallenkanälchen zwischen den Zellgrenzen zu sehen, die ohne Zugabe von Matrigel nicht sichtbar waren (Abbildung 66 a).

8d OSM + 2d Matrigel

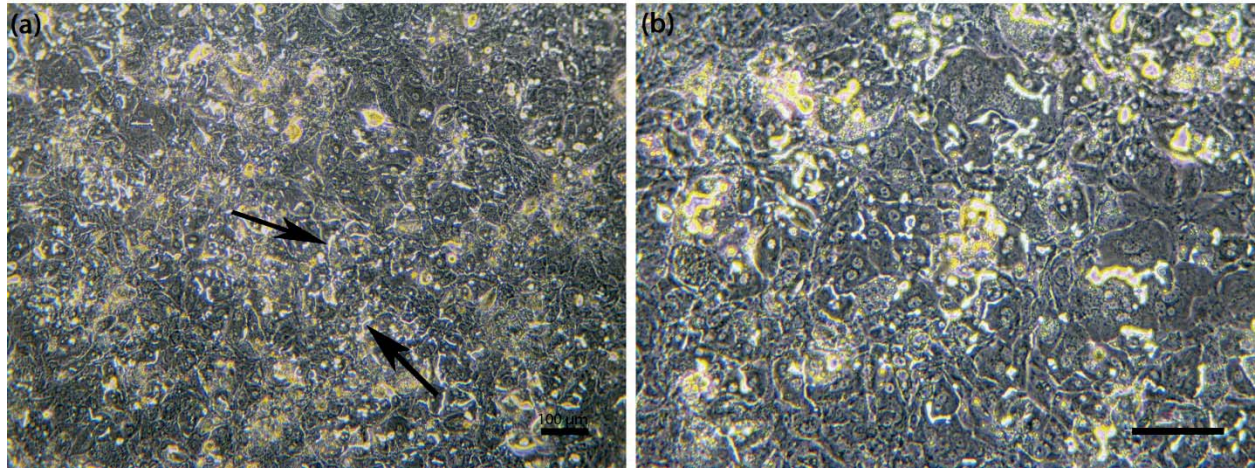


Abbildung 66: Kultivierung isolierter DLK⁺ Hepatoblasten nach Zugabe von OSM und Matrigel (EHS Gel), Tag 8 (lichtmikroskopische Aufnahmen). DLK⁺ Hepatoblasten (ca. 6×10^6) wurden aus fetaler Maus-Leber (E14.5) isoliert und mit Hilfe von dem monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper und Zellsortierer von anderen Zellen getrennt. Die Kultivierung erfolgte in einer mit 0,1% Gelatine-Lösung beschichteten 6 Well Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO₂. Die ersten 6 Tage wurden die Zellen unter Zugabe von OSM (10 ng/ml) kultiviert, woraufhin sie am 6. Tag für 2 weitere Tage mit Matrigel (1,4 mg/ml) überschichtet wurden. (a) Die Pfeile markieren Gallenkanälchen. Maßstab = 100 µm.

Als Kontrolle wurde die Leber-Mischkultur (6×10^5 Zellen), bestehend aus vielen adhärennten Zellen der Leber (Hepatoblasten, Hepatozyten, Cholangiozyten, hepatischen Sternzellen und sinusoidalen Endothelzellen), isoliert und in Kultur gebracht. Die Mischkultur ohne Zusatz von OSM zeichnete sich durch eine höhere Anzahl an Lipidtröpfchen aus, die durch eine gelbliche Farbe charakterisiert waren (Abbildung 67 b). Außerdem waren insbesondere am sechsten Kultivierungstag in dieser Mischkultur viele Zellen mit einer langgezogenen Form zu sehen (Abbildung 67 d). Diese Zellform ist charakteristisch für sinusoidale Endothelzellen. Am achten Kultivierungstag hatten die Zellen eine sehr hohe Konfluenz erreicht und wuchsen teilweise übereinander (Abbildung 67 e, f). Auch an diesem Tag zeichnete sich die Leber-Mischzellkultur, die ohne Zusatz von OSM kultiviert wurde, durch eine höhere Anzahl an Lipidtröpfchen (Abbildung 67 f) als die Mischkultur mit Zusatz von OSM (10 ng/ml) (Abbildung 67 e) aus.

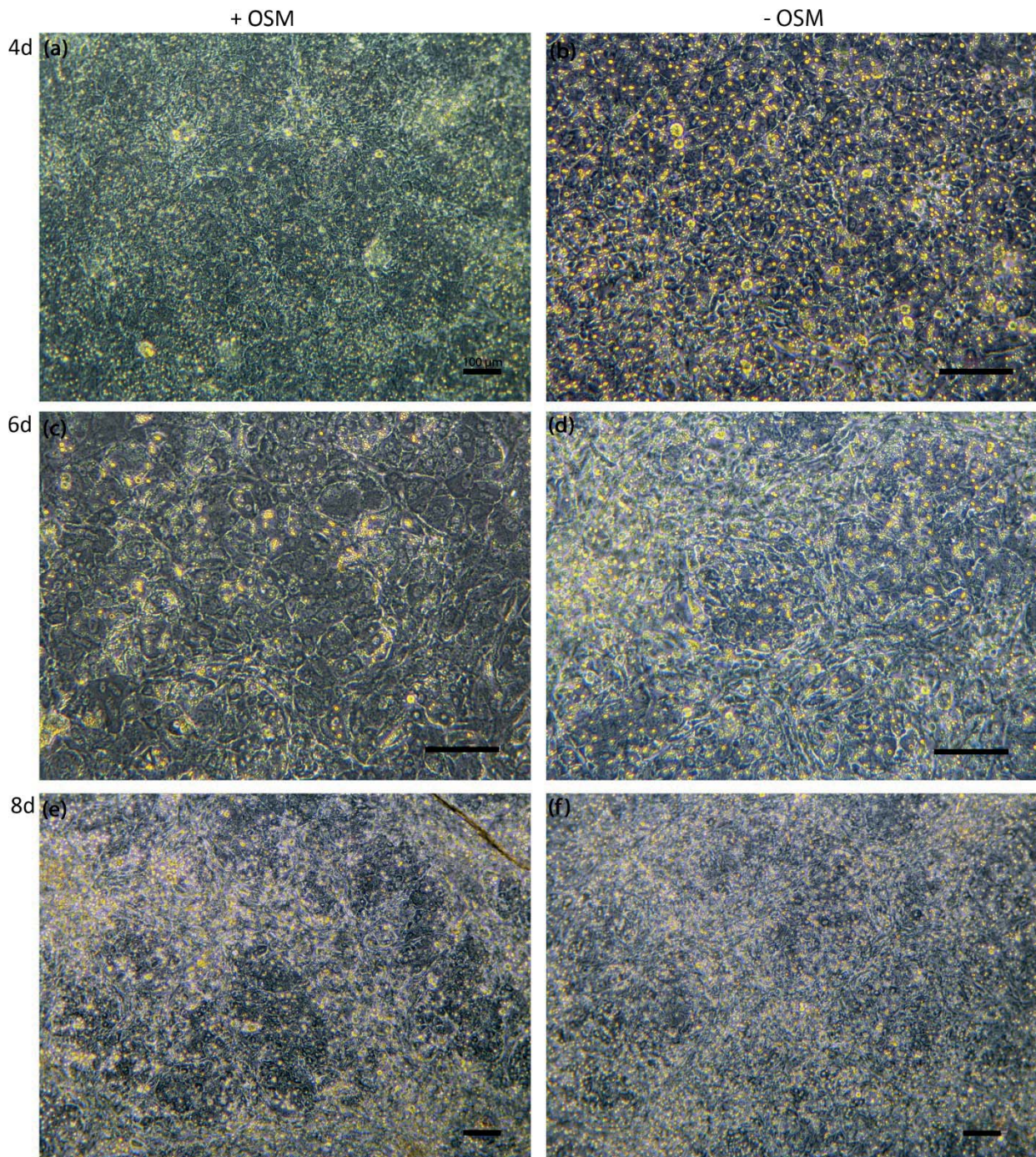


Abbildung 67: Kultivierung isolierter Mischzellkultur aus einer Maus-Leber mit (a, c, e) oder ohne (b, d, f) Zugabe von OSM (10 ng/ml), Tag 4, Tag 6 bzw. Tag 8 (lichtmikroskopische Aufnahmen). Die Mischzellkultur (6×10^5) wurde aus fetaler Maus-Leber (E14.5) isoliert. Die Kultivierung erfolgte in einer mit 0,1% Gelatine-Lösung beschichteten 6 Well Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO₂. (a, b) Kultivierungstag 4. (c, d) Kultivierungstag 6. (e, f) Kultivierungstag 8. Maßstab = 100 μm.

Es ist bekannt, dass die Kombination aus OSM und EHS-Gel die Differenzierung und Reifung der Hepatozyten durch die Erhöhung der Expression von TAT (Tyrosin-Aminotransferase) und Tdo2 (Tryptophan-2,3-dioxygenase) beschleunigt.^[261, 268, 269] Um die Expression der Tdo2 und TAT Enzyme in den Mischzellkulturen und DLK⁺ Hepatoblasten zu untersuchen, wurde eine TaqMan RT-PCR (engl. reverse transcription polymerase chain reaction) durchgeführt. Dieses Verfahren der DNA



Vervielfältigung basiert auf einer von Holland et al. (1991) beschriebenen und im Laufe der Jahre modifizierten PCR Methode, bei der das PCR Produkt mit Hilfe einer TaqMan Sonde in „real time“ bestimmt wird.^[270-272] Dabei ist die TaqMan Sonde eine mit zwei Fluorophoren markierte DNA-Sequenz, die während des PCR Prozesses mit einer komplementären Target-Sequenz hybridisiert. Während sich der Reporter-Fluorophor am 5' Ende der TaqMan Sonde befindet, liegt der Quencher-Fluorophor am 3' Ende vor. Die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors ist bei einer intakten Probe durch den Quencher-Fluorophor inhibiert. Wird die PCR gestartet, so wird die TaqMan Sonde durch die endogene 5' - 3' Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten und der Reporter-Fluorophor wird freigesetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erlaubt die quantitative DNA Analyse.^[273, 274] Für die Normierung der Proben wurde das Haushaltgen β -Actin verwendet.^[272] Dies ist ein nicht-reguliertes Gen, welches in allen Zellen unabhängig von äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird.^[275]

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR zeigten, dass die Mischzellkultur mit und ohne Zugabe von OSM (10 ng/ml) nach acht Tagen eine geringe Expression an TAT aufwies. Die Ursache dafür war eine hohe Konfluenz des Zellrasens und die Ausbildung vieler Zell-Zell-Kontakte, die die Expression dieses Gens unterdrücken. Dabei war die TAT Expression der OSM-behandelten Leber-Mischzellkultur doppelt so hoch wie in den unbehandelten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass OSM die TAT Expression beeinflusst. Allerdings war die Expression in DLK⁺ Hepatoblasten, die im Gegensatz zu den Mischzellen nicht nur unter der Einwirkung von OSM (10 ng/ml), sondern auch von Matrigel (2,1 mg/ml) kultiviert wurden, um den Faktor sieben erhöht. Die frisch isolierten Zellen einer E14 Leber dienten als Kontrolle und zeigten keine TAT Expression (Abbildung 68).

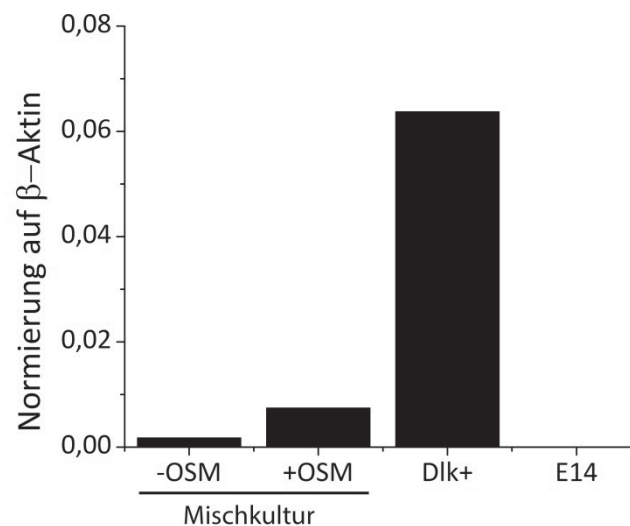


Abbildung 68: Relative Quantifizierung der TAT Expression in Mischzellkultur, mit oder ohne Zugabe von OSM (10 ng/ml), und DLK⁺ Hepatoblasten. Die Zellen wurden aus einer fetalen Leber (E14.5) isoliert. Als Kontrolle wurde RNA aus frisch isolierter Leber-Mischkultur (E14) eingesetzt.

Sowohl die für acht Tage kultivierten Leber-Mischzellen (E14.5), mit und ohne Zugabe von OSM, als auch die frisch isolierten Leberzellen (E14) wiesen eine sehr niedrige Expression von Tdo2 auf. Durch die Einwirkung von OSM und Matrigel auf die DLK⁺ Hepatoblasten wurde die Expression von Tdo2 in diesen Zellen erheblich erhöht. Im Vergleich zur Expression von TAT jedoch war diese Expression sehr gering (Abbildung 69).

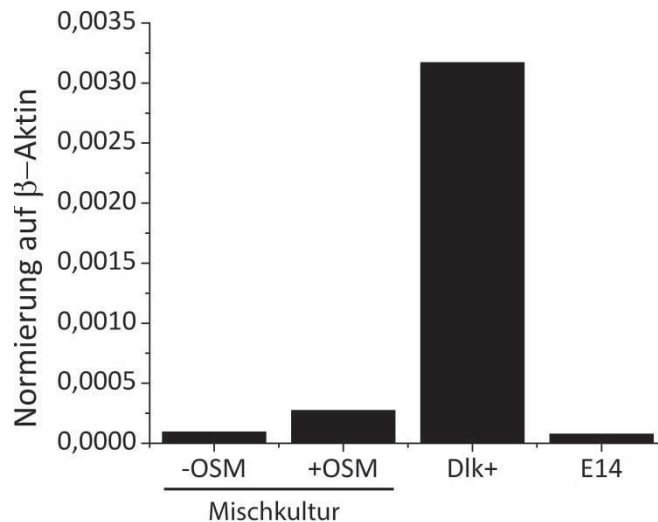


Abbildung 69: Relative Quantifizierung der Tdo2 Expression in Mischzellkultur, mit oder ohne Zugabe von OSM (10 ng/ml), und DLK⁺ Hepatoblasten. Die Zellen wurden aus einer fetalen Leber (E14.5) isoliert. Als Kontrolle wurde RNA aus frisch isolierter Leber-Mischkultur (E14) eingesetzt.

4.7.3 Generierung von HPPL-Zellen

Eine weitere Studie von Tanimizu et al. (2004) zeigte, dass die Verwendung der EZM für die Kultivierung der DLK⁺ Hepatoblasten eine entscheidende Rolle spielt.^[268] Es ist bekannt, dass Laminin ein Bestandteil der Basalmembran ist, welche um die periportalen Gallengänge lokalisiert ist. In der adulten Leber ist Laminin um die Oval Cells konzentriert, wobei kein Laminin in den Regionen mit reifen Hepatozyten beobachtet werden konnte.^[145] Die auf Laminin kultivierten DLK⁺ Hepatoblasten proliferierten im Gegensatz zu den auf Kollagen IV kultivierten DLK⁺ Hepatoblasten mehrere Wochen und teilten sich selbst nach dem Passagieren der Zellkultur weiter. Dieser Zelltyp wird HPPL (engl. hepatic progenitor cells proliferating on laminin) genannt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die HPPL-Zellen nach fünf Tagen Kultivierung auf Laminin, so wie die DLK⁺ Hepatoblasten auf Kollagen IV, kein DLK Protein mehr exprimieren. Die HPPL-Zellen waren zum größten Teil DLK⁻ CK19⁺ Albumin⁺ Zellen, wobei Hepatoblasten DLK⁺ CK19⁻ Albumin⁺ Zellen sind. Eine Langzeitkultivierung der HPPL-Zellen über drei Wochen hatte die Expression der hepatischen Marker G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) und CPS (Carbamoylphosphat-Synthetase I), als auch der cholangiozytischen Marker CK7, CK19 und Integrin β4 zur Folge.^[268]

Die aussortierten DLK⁺ Hepatoblasten ($1,1 \times 10^4$) wurden anschließend auf einer mit Laminin (10 µg/ml)-beschichteten Zellkulturplatte ausgesät und für mehrere Tage zur Generierung von HPPL-Zellen kultiviert (Abbildung 70).

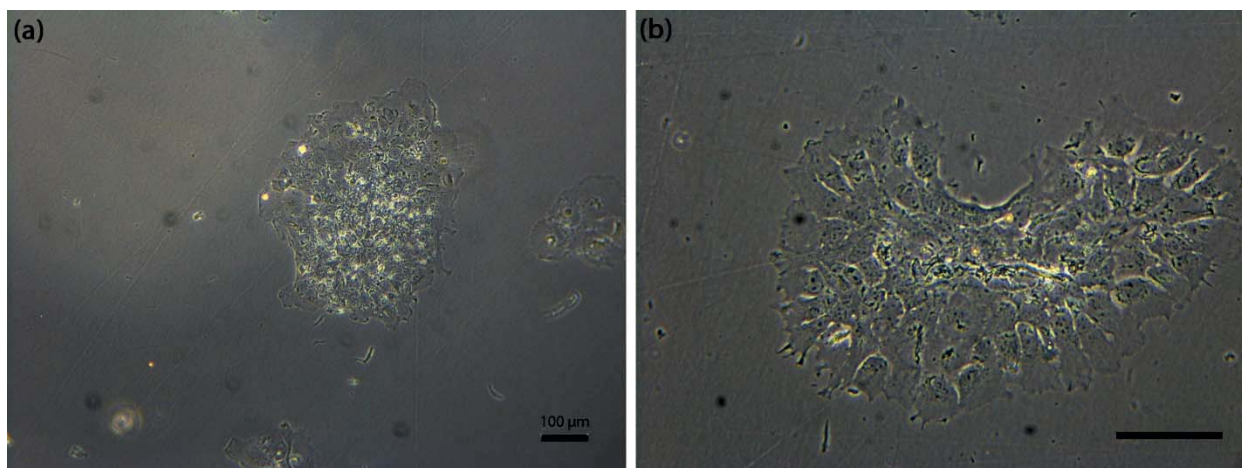


Abbildung 70: Isolierte DLK⁺ Hepatoblasten auf Laminin, HPPL-Zellen, Tag 4 (lichtmikroskopische Aufnahmen). DLK⁺ Hepatoblasten ($1,1 \times 10^4$) wurden aus fetaler Maus-Leber (E14.5) isoliert und mit Hilfe von dem monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper und Zellsortierer von anderen Zellen getrennt. Die Kultivierung erfolgte auf einer mit Laminin (10 µg/ml)-beschichteten Zellkulturschale bei 37 °C und 5% CO₂. (a) und (b) stellen zwei verschiedene Zellkolonien aus isolierten DLK⁺ Hepatoblasten dar. Maßstab = 100 µm.

4.7.4 Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt entstanden in Zusammenarbeit mit B.Sc. Christoph Grün am ITG, KIT und dem Arbeitskreis von Dr. Dirk Grimm am BioQuant an der Universität Heidelberg.^[276]

Nach der Differenzierung von DLK⁺ Hepatoblasten in Hepatozyten war es von Bedeutung, ein Protokoll zur Differenzierung von HPPL-Zellen zu etablieren. Diese Zellen lassen sich über einen längeren Zeitraum expandieren und sollen in Zukunft als Zellmaterial für die Etablierung eines Lebermodells im μ 3D*Vasc* Bioreaktor genutzt werden. Hierzu wurden die HPPL-Zellen (2×10^5) nach dem oben beschriebenen Protokoll mit OSM (20 ng/ml) und Matrigel behandelt. Aufgrund unterschiedlicher Angaben der Matrigelkonzentration in der Literatur wurden hier drei verschiedene Bedingungen (1,46 mg/ml, 0,73 mg/ml und 0,37 mg/ml) für die Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen in HLC getestet.^[262, 277] Nach der Differenzierung wurde die Expression verschiedener Hepatozyten- und Cholangiozyten-spezifischer Marker mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Als Hepatozyten-spezifische Marker dienten G6Pase, Tdo2, Albumin, TAT und TTR (Transthyretin).^[278] Als Cholangiozyten-spezifischer Marker wurde CK19 genutzt (Abbildung 71 a). CK19 wird in HPPL-Zellen ebenfalls exprimiert, jedoch nicht in Hepatozyten.^[142] Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von G6Pase, TO und TAT in HLC bei allen getesteten Matrigel-Konzentrationen im Vergleich zu den HPPL-Zellen durch einen Anstieg gekennzeichnet war. Bei Albumin war ebenfalls eine stärkere Bande zu sehen. Die Expression dieser vier Marker war bei den HLC mit den Kontrollen aus der Leber bzw. den primären Hepatozyten vergleichbar. Die Behandlung mit 0,73 mg/ml konzentriertem Matrigel ergab im Vergleich zu den anderen Konzentrationen ein stärkeres Signal beim Enzym G6Pase, was auf eine bessere Differenzierung von HPPL-Zellen infolge dieser Behandlung schließen lässt. Die Expression von TTR war in allen untersuchten Proben ähnlich. CK19 wurde in HLC im Vergleich zu HPPL-Zellen etwas weniger exprimiert. In der Gesamt-Leber-Kontrolle wurde bei CK19 eine schwache Bande detektiert, bei der Hepatozyten-Kontrolle nicht. Da nicht quantifiziert wurde, können keine genaueren Angaben gemacht werden.

Weiterhin wurde eine zeitabhängige Differenzierung untersucht (Abbildung 71 b). Als Kontrolle dienten primäre, murine Hepatozyten, welche entweder sofort nach der Zellisolierung oder nach einer einwöchigen Kultivierung verwendet wurden. Nach einer viertägigen Behandlung mit OSM (20 ng/ml) war bereits eine schwache Bande bei G6Pase erkennbar. Mit zunehmender Dauer der Differenzierung wurde das Signal intensiver und erreichte in etwa den Expressionslevel der primären, murinen Hepatozyten, die nach der Isolation eine Woche in Kultur gehalten wurden. Die Expression von Tdo2 startete erst nach Abschluss der Differenzierung (Abbildung 71, b, ab 11d).

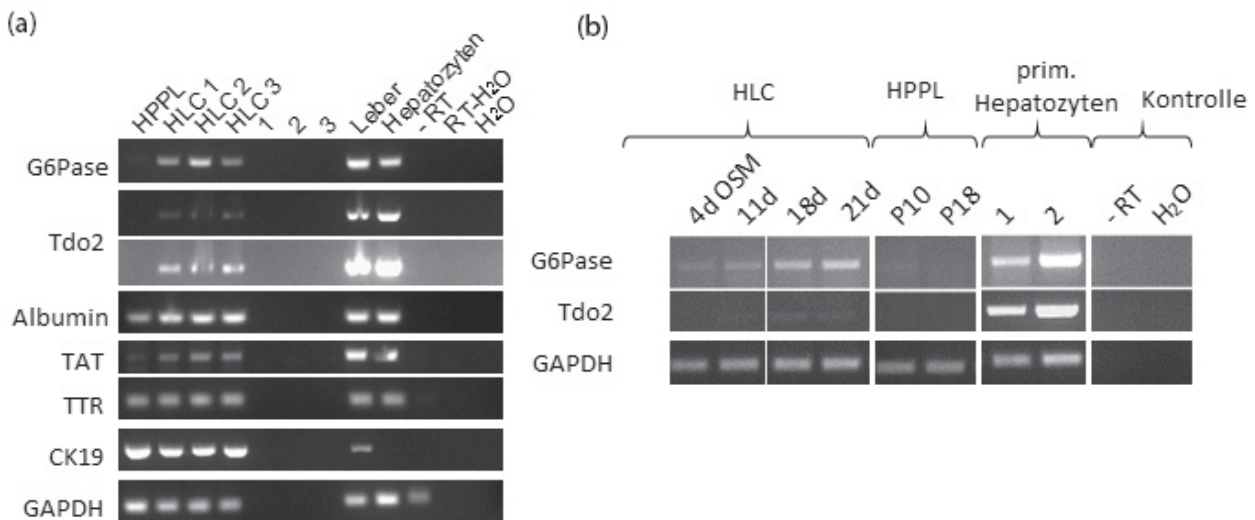


Abbildung 71: (a) RT-PCR verschiedener Hepatozyten- und Cholangiozyten-spezifischer Marker nach der Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen mit 1,46 mg/ml (HLC 1), 0,73 mg/ml (HLC 2) und 0,37 mg/ml (HLC 3) Matrigel und OSM (20 ng/ml). Als Haushaltsgen diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Nummern 1, 2, 3 stellen Kontrollen ohne Zellen nach der Behandlung mit 1,46 mg/ml (1), 0,73 mg/ml (2) und 0,37 mg/ml (3) Matrigel dar. Die HPPL-Zellen, isolierte RNA aus muriner Leber und primäre, murine Hepatozyten dienten als Kontrollen. Die –RT Kontrolle ist RNA verschiedener Proben ohne Reverse Transkriptase. (b) RT-PCR der Hepatozyten-spezifischer Marker G6Pase und Tdo2. 11d, 18d und 21d bezeichnen die Zeitpunkte nach Abschluss der Differenzierung. Zum Vergleich dienten HPPL-Zellen der Passagen 10 (P10) und 18 (P18). Die primären Hepatozyten (1) wurden vor der RNA-Isolation eine Woche in Kultur gehalten, bei primären Hepatozyten (2) erfolgte die RNA Isolation direkt nach der Entnahme.

4.7.5 Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten

Cholangiozyten bilden die zweite Gruppe endodermaler Epithelzellen der Leber, die neben Hepatozyten aus Hepatoblasten differenziert werden. Diese Zellen bilden Gallengänge, deren Aufgabe im Transport der Galle aus den Hepatozyten zum Darm besteht. Die Aufgabe der Cholangiozyten liegt dabei in der Kontrolle des Gallenflusses und dessen pH Wertes durch die Sekretion von Wasser und Bicarbonationen. Für das Erfüllen dieser Funktion ist die Polarität der Zellen von großer Wichtigkeit. Die basale Zellseite ist mit der Basalmembran verbunden, während die apikale Seite dem Lumen zugewandt ist. Die Differenzierung der Hepatoblasten zu Cholangiozyten findet in der mittleren Gestation statt, während die Ausbildung der tubulären Strukturen in der späten Gestation bzw. während der neonatalen Tage geschieht. Um die Ausdifferenzierung der HPPL-Zellen in Cholangiozyten bzw. die Entstehung der Gallengänge aus diesen Zellen *in vitro* einzuleiten, wurde eine 3D-Kultur mit Hilfe von 40% Matrigel nach Tanimizu et al. (2007) generiert.^[264] Dabei wurde Matrigel, das eine ähnliche Zusammensetzung aus EZM Proteinen wie die Basalmembran aufweist, mit einem Kollagenmix gemischt und zur Kultivierung



verwendet. Laminin ist einer der Hauptbestandteile des Matrigels und für die Polarisation der Zellen von Bedeutung. Die HPPL-Zellen vermehrten sich rasch innerhalb des 40% Matrigels (Abbildung 72). Die Proliferation der Zellen war für die Ausbildung der Zysten mit großem Lumen notwendig.^[264]

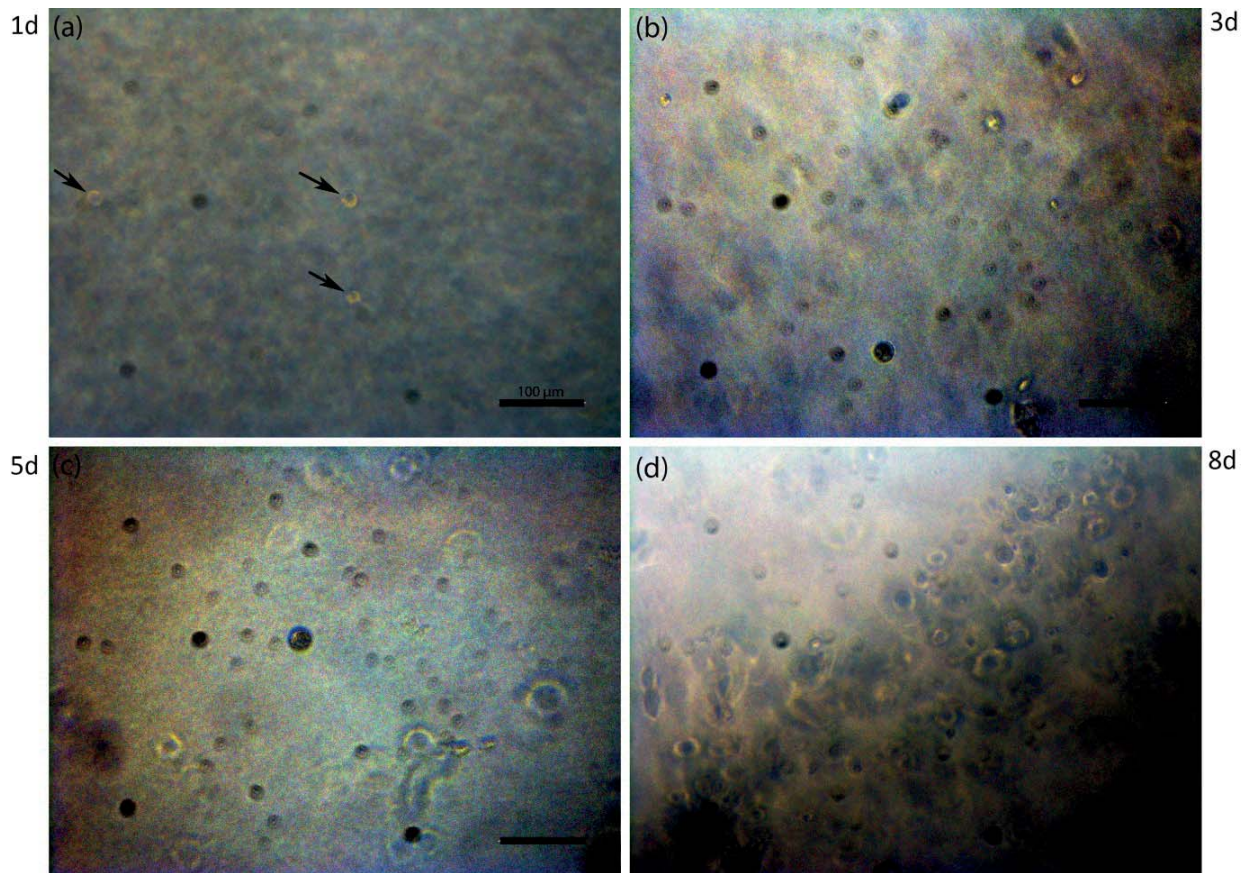
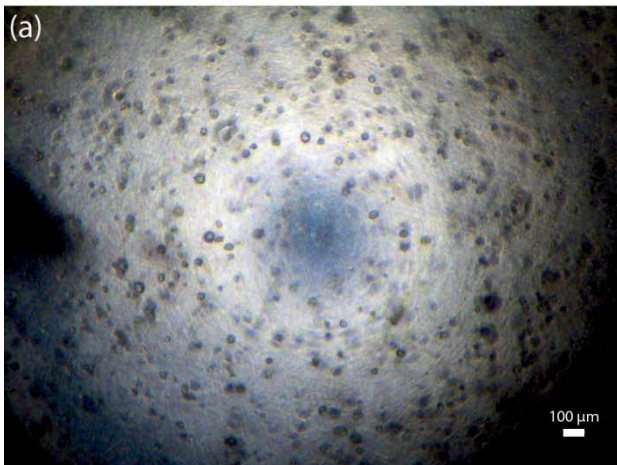


Abbildung 72: 3D-Zellkultur aus isolierten DLK⁺ Hepatoblasten, kultiviert auf Laminin, zur Ausdifferenzierung in Cholangiozyten, Tag 1, 3, 5 und 8 (lichtmikroskopische Aufnahmen). HPPL-Zellen ($0,8 \times 10^4$) wurden mit 40% Matrigel gemischt und in Transwell-Systemen bei 37 °C und 5% CO₂ über mehrere Tage kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte von apikaler und basaler Seite der 3D-Zellkultur. (a) Kultivierungstag 1. Die Pfeile markieren 3D-Strukturen. (b) Kultivierungstag 3. (c) Kultivierungstag 5. (d) Kultivierungstag 8. Maßstab = 100 μm.

Der Vergleich der 3D-Zellkultur aus etablierten HPPL-Zellen (Abbildung 73 a) und primären HPPL-Zellen (Abbildung 73 b) zeigte, dass die etablierten HPPL-Zellen ein schnelleres Wachstum innerhalb des 40% Matrigels aufwiesen. Außerdem bildeten die Cholangiozyten, die aus etablierten HPPL-Zellen hervorgingen, Zysten im Vergleich zu den Zellen aus primärer HPPL-Zellkultur.

Etablierte HPPL-Zellen



Primäre HPPL-Zellen

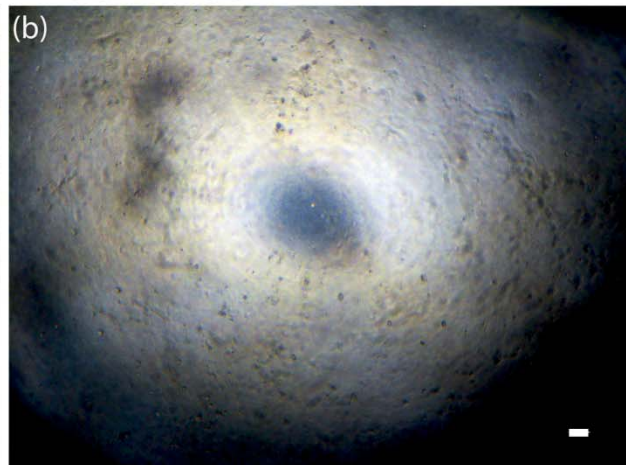


Abbildung 73: 3D-Zellkultur aus (a) etablierten HPPL-Zellen bzw. (b) isolierten DLK⁺ Hepatoblasten, kultiviert auf Laminin, primäre HPPL-Zellen, zur Ausdifferenzierung in Cholangiozyten (lichtmikroskopische Aufnahmen). HPPL-Zellen ($0,8 \times 10^4$) wurden mit 40% Matrigel vermischt und in einem Transwell-System bei 37 °C und 5% CO₂ über mehrere Tage kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte von apikaler und basaler Seite der 3D-Zellkultur. Maßstab = 100 μm.

Um die Ergebnisse der Zystenbildung aus etablierten HPPL-Zellen und isolierten DLK⁺ Hepatoblasten, kultiviert auf Laminin, zu vergleichen, wurde ein immunhistochemischer Nachweis von β -Catenin und CK19 am achten Kultivierungstag der 3D-Zellkultur durchgeführt. Laut Tanimizu et al. (2007) bilden die HPPL-Zellen am siebten Kultivierungstag in 40% Matrigel Zysten mit zentralem Lumen.^[264] CK19 ist ein Marker für die Cholangiozyten und wird entlang der Plasmamembran und im Zytosol exprimiert. β -Catenin soll sich zu diesem Zeitpunkt entsprechend der *in vivo* Situation auf der basalen Zellseite befinden. Außerdem wurde die Lokalisation der F-Aktinfilamente in den HPPL-Zellen untersucht, welche am achten Kultivierungstag an der apikalen Zellseite lokalisiert sein sollten. Die Mikroskopieaufnahmen (Ergebnisse werden hier nicht dargestellt) zeigten, dass die frisch isolierten und auf Laminin kultivierten DLK⁺ Hepatoblasten keine Zysten bildeten. Es ist möglich, dass diese Zellen erst etabliert werden müssen, bevor die Ausdifferenzierungsversuche durchgeführt werden können. Die etablierten HPPL-Zellen bildeten dagegen Zysten (Abbildung 74). Die Polarisationsmarker waren bei der Zyste (Abbildung 74 f - j) deutlich zu sehen: F-Aktin war auf der apikalen (Abbildung 74 g) und β -Catenin auf der basalen Zellseite (Abbildung 74 h) lokalisiert. Allerdings bildeten die Zellen innerhalb dieser Zyste keinen eindeutigen Monolayer (Abbildung 74 j). Außerdem wurde hier kein CK19 detektiert (Abbildung 74 i). CK19 konnte innerhalb einer anderen Zyste (Abbildung 74 a - e) detektiert werden (Abbildung 74 d). Hier war CK19 sowohl im Zytoplasma, als auch entlang des Zellcortexes sichtbar. Diese Zyste bestand aus einem Zellmonolayer (Abbildung 74 e), jedoch wurde β -Catenin nicht nur auf der basalen Seite, sondern auch im Zytosol detektiert (Abbildung 74 c).

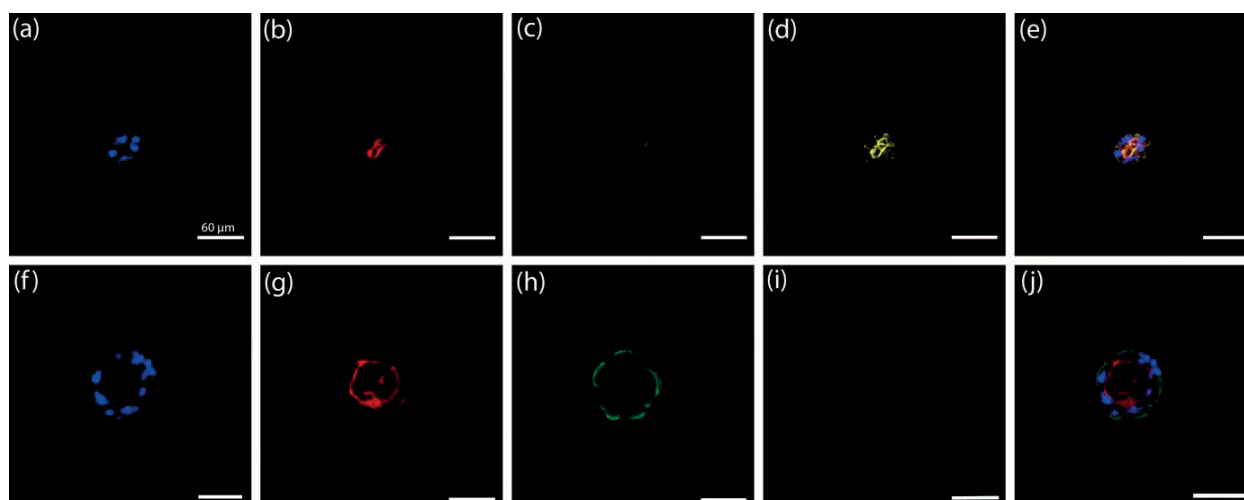


Abbildung 74: Zystenbildung von etablierten HPPL-Zellen (konfokale Aufnahmen). HPPL-Zellen ($0,8 \times 10^4$) wurden mit 40% Matrigel vermischt und in einem Transwell-System bei 37 °C und 5% CO₂ über 8 Tage kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte von apikaler und basaler Seite der 3D-Zellkultur. Der Nachweis der β -Catenin-Expression in HPPL-Zellen erfolgte mit dem monoklonalen anti-Maus- β -Catenin-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Fluorescein-gekoppelten anti-Kaninchen-Ziege IgG Antikörper. Der Nachweis der CK19 Expression erfolgte mit dem polyklonalen anti-Maus-CK19-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 555-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Olympus Fluoview Ver. 3.1-Software. (a, f) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, g) Alexa Fluor® 633 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (c, h) Fluorescein-Färbung der β -Catenin-Expression, grün. (d, i) Alexa Fluor® 555-Färbung der CK19-Expression, gelb. (e) Überlagerung von (a - d). (j) Überlagerung von (f - i). Maßstab = 60 μ m.

4.7.6 Ausdifferenzierung im μ 3D_{Vasc} Bioreaktor

Im nächsten Schritt wurde die Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen im μ 3D_{Vasc} Bioreaktor gestartet. Hierzu wurden die etablierten HPPL-Zellen (5×10^5) auf der Rückseite des PC-Mikrokanals ausgesät, mit OSM (20 ng/ml) behandelt und mit Matrigel (0,76 mg/ml) überschichtet. Zur Visualisierung der Zellen erfolgte eine Transduktion mit YFP (engl. yellow fluorescent protein)-Adeno-assoziierten Viren (AAVs).^[279] AAVs gehören zur Gattung *Dependovirus* der Familie der *Parvoviridae* und werden häufig als molekularbiologisches Hilfsmittel für das Einbringen von Genen in Zellen verwendet.^[280] Es handelt sich dabei um kleine, DNA-haltige, hexagonale Partikel mit der durchschnittlichen Größe von 24 nm, welche im Jahr 1965 bei der Präparation von Adenoviren entdeckt wurden.^[281, 282] Das Genom der AAVs besteht aus Einzelstrang-DNA einer Größe von 4,7 kb mit invertierten terminalen Wiederholungen (ITR, engl. inverted terminal repeats) an beiden Enden, die durch Haarnadelstrukturen als Primer für die Replikation dienen^[283]. Aufgrund der apathogenen Eigenschaften der AAVs und der Möglichkeit ihrer schnellen genetischen Modifikation gehören sie zu den beliebten Hilfsmitteln der humanen Gentherapie.^[280, 284] Zur Etablierung einer endothelialen-hepatischen Grenzfläche wurden HUVEC ($1,25 \times 10^6$) im PC-Mikrokanal ausgesät. Die Bedeutung der Kokultur aus Endothelzellen und Hepatozyten für die Ausbildung des korrekten Phänotyps und die Expression hepatischer Marker wurde in der Literatur beschrieben.^[285, 286] Der für uns interessante Ansatz war nun, den möglichen Einfluss der Endothelzellen auf die Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse der Differenzierung von DLK⁺ Hepatoblasten (4.7.2) verdeutlichen, dass die Behandlung mit OSM und

Matrigel einen Hepatozyten-ähnlichen Phänotyp zur Folge hat. Außerdem bildeten die im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor kultivierten Zellen Zysten-ähnliche Strukturen (Abbildung 75), die für Cholangiozyten charakteristisch sind. Eventuell führte die Ausdifferenzierung der HPPL-Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor zur Entstehung von beiden adulten Zelltypen der Leber, Hepatozyten und Cholangiozyten.

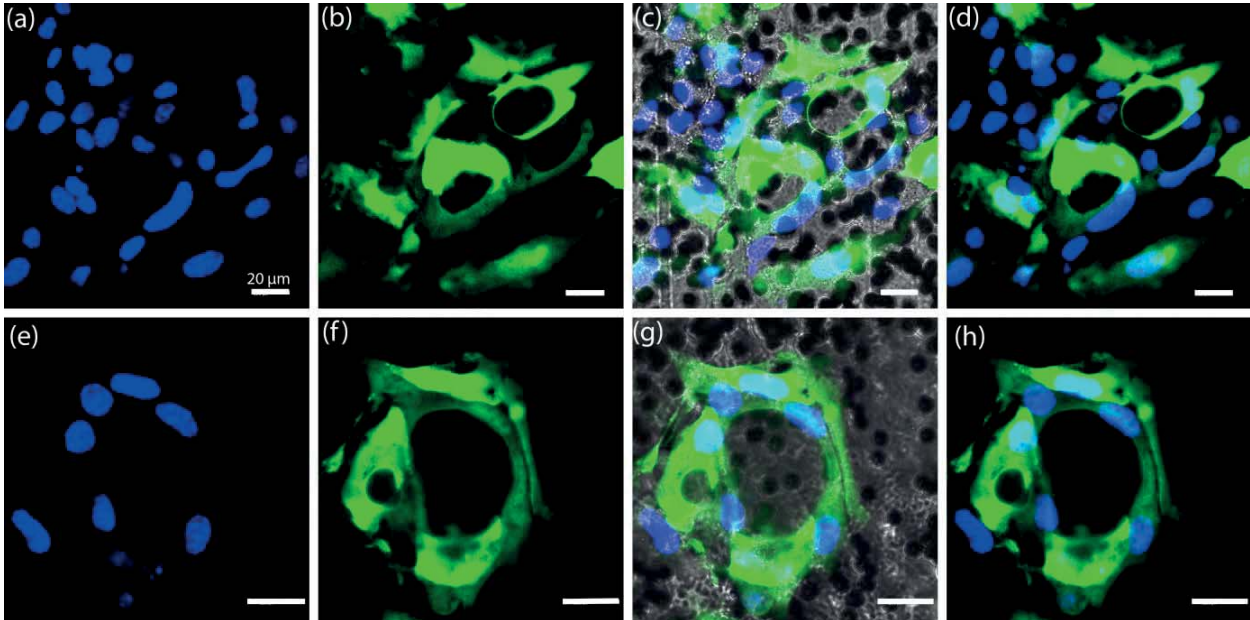


Abbildung 75: Differenzierung von HPPL-Zellen im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 12 (sequentielle konfokale Aufnahmen). HPPL-Zellen (5×10^5) wurden auf der Laminin ($10 \mu\text{g/ml}$)-beschichteten Rückseite des PC-Mikrokanals bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ kultiviert. Zwei Tage nach der Aussaat erfolgte die Behandlung mit OSM (20ng/ml). Am 7. Tag wurden die Zellen mit Matrigel ($0,76 \text{mg/ml}$) im Differenzierungsmedium plus HGF (engl. hepatocyte growth factor) (5ng/ml) überschichtet. Am 8. Tag erfolgte die Transduktion mit AAV-DJ-YFP über den porösen PC-Mikrokanal zur Markierung von HPPL-Zellen. HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden 9 Tage nach dem Beimpfen des unteren Kompartiments mit HPPL-Zellen in den Fibronectin ($0,9 \text{mg/ml}$)-beschichteten porösen PC-Mikrokanal überführt. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von $100 \mu\text{l/h}$. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung fand mit der Leica LAS AF Lite-Software statt. (a, e) Hoechst 33342-Färbung der DNA in HPPL-Zellkernen, blau. (b, f) YFP-Detektion durch Transduktion der HPPL-Zellen mit AAVs, grün. (c, g) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (c, g) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = $20 \mu\text{m}$.

4.7.7 Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten

Tritt eine Verletzung der Leber infolge bestimmter Medikamente oder Toxine ein, die nicht durch Vermehrung der Hepatozyten behoben werden kann, kommt es zur Aktivierung der adulten Leber-Stammzellen (LPCs, engl. adult liver progenitor cells). Als Folge migrieren LPCs aus der periportalen Region in die Leberläppchen, proliferieren und differenzieren sich in Hepatozyten und biliäre Zellen.^[287-290] Diese LPCs werden in Nagetieren aufgrund ihres ovalen Aussehens als Oval Cells bezeichnet.^[146] Ähnliche Zellen in Menschen wurden bereits in Verbindung mit diversen Erkrankungen und Tumorgenese beschrieben.^[287, 291]

Zur Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten, wurden Oval Cells verwendet, die als nicht parenchymale Zellen (NPCs, engl. non parenchymal cells) aus der Leber einer mit DDC Diät behandelten Maus isoliert wurden.^[292] Die EpCAM⁺ Zellen wurden mit Hilfe einer Zell Sortiereinrichtung gewonnen.



EpCAM ist ein Oberflächen-gebundenes Glykoprotein, welches sowohl in einigen gesunden, als auch in krebsartigen Epithelzellen exprimiert wird.^[293, 294] Die EpCAM⁺ Zellen sind potenzielle Leber-Stammzellen und können sich sowohl in Hepatozyten, als auch in Cholangiozyten differenzieren.^[269] Um die Ausdifferenzierung der Oval Cells (5×10^4) *in vitro* durchzuführen, wurde eine 3D-Zellkultur nach Okabe et al. (2009) aus diesen Zellen generiert. Als Zellmatrix wurde ein Kollagen Typ I Gel (0,3% Cellmatrix Typ I-A) benutzt, welches sich als ein effektives System zur Induktion der röhrenförmigen Strukturen erwiesen hat. Außerdem wurde 20 ng/ml HGF (engl. hepatocyte growth factor) in das Kultivierungsmedium der Zellen gegeben, da dieser Wachstumsfaktor ebenfalls Tubulogenese induziert.^[268, 295] Die Zellen proliferierten rasch innerhalb der 3D-Zellkultur und bildeten bereits am fünften Kultivierungstag sternartige Gebilde (Abbildung 76 a), die sich im Laufe der Kultivierungszeit vergrößerten (Abbildung 76 f). Bereits am siebten Kultivierungstag (Abbildung 76 c) war die röhrenförmige und verzweigte Morphologie deutlich sichtbar.

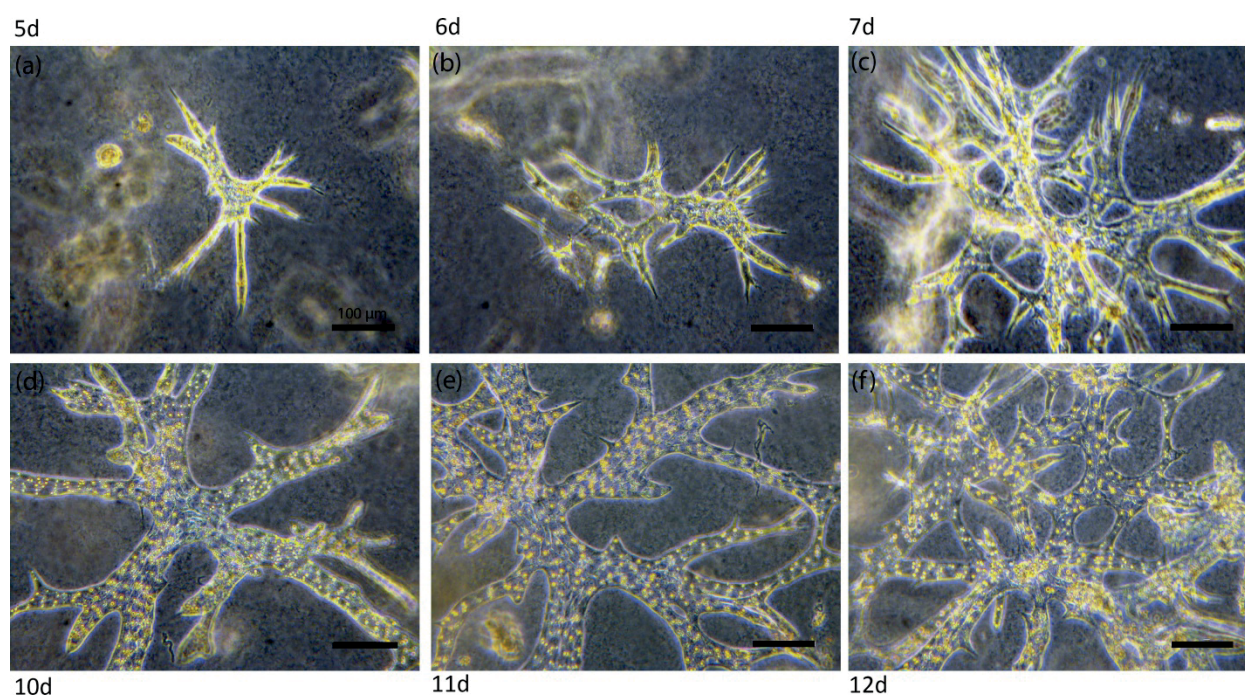


Abbildung 76: 3D-Zellkultur aus Oval Cells zur Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten, Tag 5 bis Tag 7 (a – c) bzw. Tag 10 bis Tag 12 (d – f) (lichtmikroskopische Aufnahmen). Oval Cells (5×10^4) wurden mit 0,3% Cellmatrix Typ I-A, 5 × DMEM und 10× Puffer A vermischt und in einem Well einer 6 Well Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO₂ über mehrere Tage kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte von apikaler Seite der 3D-Zellkultur. Maßstab = 100 µm.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die adulten, murinen Stammzellen, wie auch die fetalen, murinen Stammzellen, ein geeignetes Zellmaterial zur Generierung eines durchbluteten Lebermodells, inklusive Gallengänge, im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor darstellen. Ein solches Modell wird in Zukunft nicht nur die Analyse der Interaktion zwischen den Endothelzellen und den ausdifferenzierten Cholangiozyten ermöglichen, sondern auch erlauben, physiologische Vorgänge, wie etwa die Sekretion von Wasser und Hydrogencarbonat-Ionen durch die Cholangiozyten, zu testen.



5. Diskussion

Eine spezielle Klasse von *in vitro* Systemen beruht auf der Kultivierung von Zellen in miniaturisierten Systemen. Dank ihres Ursprungs in der Halbleiterforschung und des Einsatzes zur Rekonstruktion organotypischer Zellkulturen werden solche Systeme als „Organs-on-Chips“ bezeichnet. Das Ziel dieses Konzepts ist die Gestaltung einer Mikroumgebung, welche in ihrer Architektur, chemischen Zusammensetzung und ihren mechanischen Reizen der Mikroumgebung eines echten humanen oder tierischen Organs ähnelt. Der spezielle Aufbau solcher Systeme erlaubt eine genaue Kontrolle über die eingesetzten Parameter: Beispielsweise lassen sich die Verhältnisse zwischen den Zellen und den Nährmedien genau skalieren, während dies in konventionellen 2D-Modellen nicht möglich ist.^[296] Der Anschluss solcher Systeme an mikrofluidische Pumpen simuliert die dynamische Versorgung der Zellen und lässt die Generierung der *in vivo* relevanten, chemischen Gradienten zu. Aufgrund der Lichtdurchlässigkeit dieser Systeme ist die Echtzeituntersuchung des Zellwachstums und -verhaltens möglich. Auf diese Weise gewährleisten die „Organs-on-Chips“ im Vergleich zu den *in vivo* und anderen *in vitro* Modellen eine zuverlässigere Untersuchung der Physiologie und Pathophysiologie.

Die *in vitro* Rekonstruktion der Blut-Hirn-Schranke (BBB) bildet einen großen Sektor im Tissue Engineering. Aufgrund ihrer wichtigen Funktion in der Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase, aber auch ihrer Beteiligung an zahlreichen Krankheiten, wie z.B. Alzheimer oder multipler Sklerose, steht die Erforschung der BBB im Fokus vieler Studien. Zahlreiche „BBB-on-Chip“ Modelle wurden in den letzten Jahren entwickelt, welche die Untersuchung der Barriereintegrität und des damit verbundenen Transports der Moleküle durch die BBB ermöglichen sollen. Prabhakarparandian et al. (2013) entwickelten ein synthetisches mikrovaskuläres Modell (SyM-BBB) mit einer parallelen Anordnung der Kompartimente.^[103] Diese Konstruktion hat einen Vorteil bei den mikroskopischen Untersuchungen, da beide Zelllayer die gleiche Orientierung zum Objektiv haben. Andere Arbeitsgruppen demonstrierten dagegen eine seitliche Anordnung der Kompartimente in ihren Modellen, welche eine große Austauschfläche zwischen den einzelnen Zellschichten bietet.^[27, 43, 102] Achyuta et al. (2013) entwickelten z.B. ein System aus PDMS zur Kultivierung von Endothelzellen auf einer PC-Membran in einem direkten Kontakt zu Astrozyten, Neuronen und Mikrogliazellen. Diese Anordnung führte zu einer hohen Barriereintegrität durch die Ausbildung einer physiologisch aktiven Endothelschicht mit Expression der wichtigen endothelialen Marker vWF und ZO-1. Auch Ma et al. (2004) beschrieben einen Chip zur Kokultivierung von Endothelzellen und Astrozyten, bestehend aus einer Siliciumnitrid-Membran, welche im Vergleich zu anderen Modellen eine geringe Membrandicke aufweist und dadurch eine stärkere Interaktion zwischen den Zellen fördert.^[57] Außerdem wurden hier Elektroden zur TEER Messung integriert. Der Nachteil der beiden letzten Systeme lag in der Abwesenheit mikrofluidischer Einflüsse auf die Endothelzellen.^[27] Scherkräfte sind jedoch für die Aufrechterhaltung des korrekten BBB Phänotyps erforderlich.^[79, 297, 298] Im Jahr 2013 entwickelten Griep et al. schließlich ein PDMS Modell, welches durch den Anschluss an Mikrofluidik den oben genannten Modellen überlegen war. Allerdings bestand dieses System lediglich aus einer endothelialen Monokultur. Der Einfluss anderer Zellkulturen auf die Ausbildung der BBB wurde in der Literatur diskutiert.^[197, 201, 299, 300] Yeon et al. (2012) entwickelten ebenfalls ein PDMS System zur Rekonstruktion einer *in vitro* BBB mittels HUVEC und zeigte den Einfluss des konditionierten Mediums reifer Astrozyten auf die Hochregulierung der ZO-1-Expression.^[104] Booth et al. (2012) berichteten über einen mikrofluidischen PDMS Chip mit eingebauten Silberchlorid-Elektroden zur Durchführung der TEER Messungen. Die hier eingesetzten Hirnendothelzellen und



Astrozyten wurden jedoch aus einer Maus isoliert, wodurch die Ergebnisse aufgrund der Spezies-spezifischen Unterschiede erst auf die Übertragbarkeit auf die humane Physiologie überprüft werden müssen.^[43] Ähnlich dazu demonstrierten Siddharthan et al. (2007) den Einfluss der Astrozyten und der Scherkräfte auf die Ausbildung einer dichten endothelialen Barriere anhand der erhöhten TEER Werte und der Tight Junction Expression.^[301] Wenngleich dieses System eine Kultivierung von Zellen humanen Ursprungs demonstrierte, wichen die hier angewandten Scherkräfte von nur $1 - 2 \text{ dyn/cm}^2$ deutlich von den physiologisch korrekten *in vivo* Werten in Gehirnkapillaren (ca. $5 - 20 \text{ dyn/cm}^2$) ab.^[215] Allen beschriebenen Systemen ist gemein, dass die Zellen auf flachen Oberflächen kultiviert wurden, die dementsprechend die gekrümmte *in vivo* Form der Blutgefäße nicht korrekt widerspiegelten. Cucullo et al. (2002) entwickelten dagegen ein *in vitro* BBB Modell namens DIV-BBB, bestehend aus vielen Hohlfasern, eingespannt in einem Steckmodul, welches an eine mikrofluidische Pumpe angeschlossen war. Die kultivierten Zellen bildeten hierbei eine undurchlässige Barriere für den parazellulären Transport und zeigten eine asymmetrische Verteilung von Efflux-Pumpen und anderen Transportern, die für die BBB charakteristisch ist. Dennoch hatte dieses Modell viele Nachteile: Durch den komplexen Aufbau war die Visualisierung der Zellen mittels gängiger mikroskopischer Methoden unmöglich. Des Weiteren war Polypropylen als Material, welches die Hohlfasern bildet, für Transportstudien von lipophilen Wirkstoffen ungeeignet.^[302]

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse weisen die *in vitro* BBB Modelle im Vergleich zu Transwell-Systemen eine schlechtere Barriereintegrität auf. Es wird daher deutlich, dass die bestehenden BBB Modelle auf unterschiedliche Weise funktionalisiert und somit verbessert werden können, wie etwa durch eine Integration von dynamischen Änderungen der Mikroumgebung, eine Kokultur mit Zelltypen der neurovaskulären Einheit und die Verwendung von Materialien, welche für Echtzeituntersuchungen geeignet sind.^[32]

Als *in vitro* Modell für ein vaskularisiertes 3D-Gewebe wurde in der vorliegenden Dissertation der mikrofluidische $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor eingesetzt. Dieser auf der SMART-Technologie basierende Bioreaktor besteht aus einer porösen Mikrokapillare zur Kultivierung von Gefäßendothel und einer darunter liegenden, die Kapillare umgebenden Kammer für ein 3D-Gewebe. Dank der SMART-Technologie können dünnwandige, gekrümmte Kanäle hergestellt werden. Die seitlichen Anschlüsse beider Kompartimente erlauben eine konstante Versorgung des darin kultivierten Zellmaterials mit Nährstoffen und Gasen durch die angeschlossenen Pumpensysteme. Des Weiteren wird die Entsorgung der Abfallprodukte auf dem gleichen Weg erreicht. Der transparente Aufbau des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors ermöglicht, auch unter Echtzeitbedingungen, den Einsatz zahlreicher mikroskopischer Techniken zur Verfolgung des Zellwachstums. Diese Eigenschaften heben den $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor von allen anderen auf dem Markt vorhandenen Mikrosystemen ab, die mittels Mikrogussverfahren oder Heißprägen hergestellt werden. Die Bedeutung der Krümmung auf die korrekte Ausbildung der Zellmorphologie wurde durch zahlreiche Studien bewiesen.^[106, 107] Die Nachahmung der korrekten Gestalt der Blutgefäße führt zur Verringerung der Adhäsionskontakte und der Stressfilamente im Gegensatz zu den auf flachen Oberflächen kultivierten Zellen.^[106, 108] Dünne Membranen sind für die Rekonstruktion der *in vivo* Bedingungen ebenfalls von großer Bedeutung, beispielsweise teilen sich die Endothelzellen und Perizyten der BBB eine gemeinsame Basalmembran. Eine Trennung dieser Zellen durch eine dicke Polymerschicht würde ihre Interaktion stören und zu verfälschten Ergebnissen führen. Weiterhin spielt die Porosität der Membranen eine wichtige Rolle, durch die eine kontinuierliche Versorgung der



3D-Gewebe durch den Mikrokanal gewährleistet wird. Die Anpassung der Porendurchmesser durch die Variation der Ätzbedingungen erlaubt es, die experimentellen Bedingungen an den zu untersuchenden Ansatz anzupassen. Zum Beispiel verlangt die Untersuchung der transendothelialen Immunzellmigration große Durchmesser, die in etwa der Größe der Monozyten entsprechen, welche zwischen 8 und 19 μm liegt.^[303] Die Kokultur aus Endothelzellen und Astrozyten lässt sich dagegen auf Membranen mit kleinen Poren von 400 nm besser etablieren, weil dieser Porendurchmesser die Migration der Astrozyten durch die Poren auf die Membranseite mit Endothelzellen verhindert. Gleichzeitig bietet dieser Porendurchmesser aber genug Platz für die Astrozyten-Endfüßchen, die einen starken Einfluss auf die Morphologie und Physiologie des Endothels ausüben.^[57]

Die ersten Arbeiten bei der Etablierung einer organotypischen 3D-Kultur im $\mu\text{3D}Vasc$ Bioreaktor gingen auf die Validierung der endothelialen Zellschicht im porösen Mikrokanal zurück. Dr. Isabella Hebeiß (2012) konnte in ihrer Dissertation die Kultivierung der Endothelzellen erfolgreich etablieren: Die Reaktion der Zellen auf die Geometrie des Mikrokanals sowie an die angewandten Scherstress-Bedingungen wurden durch den Nachweis der verringerten Expression von Adhäsionskontakten sowie die Ausrichtung der Zellen und deren Stressfilamente entlang des Flusses nachgewiesen.^[105] Für die Etablierung einer Zellkultur im unteren Kompartiment war jedoch eine Langzeitkultivierung des Endothels nötig. HUVEC konnten im Mikrokanal sieben Tage lang erfolgreich aufrechterhalten werden. Die nachfolgenden Studien zur Rekonstruktion der BBB haben sogar bewiesen, dass eine Langzeitkultivierung dieser Zellen bis zu 19 Tage möglich war. Im Gegensatz dazu werden HUVEC unter konventionellen 2D-Bedingungen zweimal pro Woche passagiert.^[304] Im weiteren Verlauf wurde die Regenerationsfähigkeit der HUVEC untersucht. Hobson et al. (1984) zeigten anhand von *in vivo* Untersuchungen an Mäusen, dass eine geringe Teilungsfähigkeit für Endothelzellen charakteristisch ist. Die Endothelzellen proliferieren lediglich im Fall der Angiogenese, d.h. Bildung neuer Blutgefäße, wobei dieser Prozess sehr selten im ausgewachsenen Körper unter physiologischen Bedingungen stattfindet.^[161] Des Weiteren zeichnet sich das Endothel der BBB durch ein geringeres Wachstum aus, welches durch die Scherkräfte induziert wird. Dies korreliert ebenfalls mit dem niedrigen Sauerstoff- und Nährstoffkonsum dieser Zellen: Eine Eigenschaft, durch die sie sich zum Transport von Molekülen ins Gehirn eignen.^[4] Die Untersuchungen im $\mu\text{3D}Vasc$ Bioreaktor zeigten, dass sich die in den Mikrokanal eingebrachten HUVEC innerhalb weniger Tage bis zu einer vollständigen Konfluenz vermehrten, woraufhin der Vermehrungsprozess eingestellt wurde. Im Falle des Absterbens einiger Zellen wurden die entstandenen Lücken im Zellrasen durch ein paar wenige proliferierende Zellen geschlossen. Weiterhin wiesen die HUVEC im Mikrokanal eine deutliche Expression des Tight Junction assoziierten Proteins PECAM-1 auf. Dieses Molekül ist nicht nur ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zell-Kontakte und beeinflusst die Membranpermeabilität, sondern spielt auch eine Rolle bei Entzündungsreaktionen.^[305] Im Falle einer Verletzung im Körper werden Leukozyten zu der Entzündungsstelle rekrutiert, wobei sie nach mehreren aufeinanderfolgenden Schritten wie Rolling, Aktivierung und Arrest das Endothel und die subendotheliale Basalmembran passieren und anschließend durch das Zwischengewebe zum Ort der Entzündung migrieren.^[160] Obwohl in der letzten Zeit viele Moleküle und die Kontrollmechanismen, die bei der Transmigration eine Rolle spielen, identifiziert werden konnten, muss der genaue Prozess der Leukozyten-Migration, auch Diapedese genannt, durch das endotheliale Gewebe noch analysiert werden. Es ist bekannt, dass die Diapedese am häufigsten zwischen Zell-Zell-Verbindungen stattfindet (parazelluläre Migration).^[160] Allerdings gibt es heutzutage Hinweise darauf, dass die Leukozyten ebenfalls den endothelialen Zellkörper passieren können (transzelluläre Migration).^[306] Insbesondere

findet die transzelluläre Migration in Folge einer starken Aktivierung von Leukozyten oder an den Barrieren mit einer hohen Integrität, wie etwa bei der BBB, statt.^[160] Dennoch wurde es auch für weniger dichte Barrieren, wie z.B. HUVEC-Monolayer, demonstriert, dass periphere mononukleäre Blutzellen unter mikrofluidischen Bedingungen *in vitro* hauptsächlich transzellulär migrieren.^[307] Untersuchungen anhand statisch kultivierter HUVEC zeigten, dass 7% der Monozyten die transzelluläre Route bevorzugen.^[308] PECAM-1 spielt bei beiden Migrationsprozessen eine entscheidende Rolle. Wenngleich der größte Teil an PECAM-1 auf der endothelialen Zelloberfläche für die homophilen Interaktionen mit Leukozyten und der Aufrechterhaltung der Tight Junctions benötigt wird, bleibt die Zellmembran höchst dynamisch, was in der Internalisierung vieler Membranproteine in tubulovesikuläre Strukturen und anschließendes Recycling zurück in die Membran resultiert.^[160] Diese Strukturen werden LBRC (engl. lateral border recycling compartments) genannt, sind 50 nm groß und bilden ein Netzwerk direkt unter der Plasmamembran der Endothelzellen in der Nähe der Zell-Zell-Kontakte.^[173, 305] Ungefähr 30% des gesamten PECAM-1 Proteinbestands sind in LBRC lokalisiert.^[173] Im Falle einer Diapedese werden LBRC von Kinesin-Molekularmotoren entlang der Mikrotubuli zum Ort der Leukozyten-Transmigration transportiert, wo sie die migrierende Zelle umrunden.^[305] Die darin enthaltenden, nicht gebundenen PECAM-1-Moleküle dienen der Interaktion mit den PECAM-1-Molekülen auf der Oberfläche der Leukozyten. Es ist wahrscheinlich, dass die gezielt rekrutierten LBRC auf diese Weise mehr Interaktionsraum für Leukozyten bieten. Außerdem wird angenommen, dass diese Komplexe die Bereiche mit den homophilen Zell-Zell-Verbindungen, bestehend aus PECAM-1-Molekülen, VE-Cadherinen oder CD99-Molekülen, während der Leukozyten-Transmigration beiseite drängen. Nach der abgeschlossenen Diapedese werden die LBRC zurück zur basalen Zellmembran transportiert, wodurch die Bereiche mit den Zell-Zell-Verbindungen ihre ursprüngliche Lokalisation einnehmen können.^[160] Die in dieser Arbeit simulierte Entzündung im μ 3D*Vasc* Bioreaktor lieferte außerdem Hinweise darauf, dass ein Austausch an fluoreszierenden Molekülen zwischen Endothel und Monozyten stattfindet. Die grüne Markierung der Endothelmembranen konnte nach der Transmigration von Monozyten ebenfalls auf deren Membranen mittels Konfokalmikroskopie visualisiert werden. Das Ereignis der Membranfusion während der Immunantwort wurde bereits von mehreren Studien belegt.^[160, 309-313] Beispielsweise kommt es bei der Initiierung der transzellulären Migration zur Membranfusion zwischen der apikalen Membranseite einer Endothelzelle und des LBRCs. Beim Erreichen der basalen Membranseite des Endothels findet eine zweite Fusion statt.^[160, 309] Ebenfalls werden vesikuläre, vakuolare Organellen und fusogene Proteine SNAREs (engl. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor), VAMP2 (engl. vesicle-associated membrane protein) und VAMP3, am Ort der transzellulären Migration angereichert, vermutlich um die Membranfusion zwischen der apikalen und der basalen Seite der Endothelzelle zu gewährleisten und eine Pore für den transmigrierenden Leukozyten zu bilden.^[310] Weiterhin zeigten Millan et al. (2006), dass Lymphozyten während der transzellulären Migration eine Aktivierung der Clusterbildung von ICAM-1 (engl. intercellular adhesion molecule-1) in Bereichen mit zahlreichen Aktinfilamenten und Caveolae hervorrufen.^[311] Als Folge werden ICAM-1 Moleküle in die Caveolae internalisiert. Die anschließende Verschmelzung der Caveolae führt zur Entstehungen einer Pore mit ICAM-1 Molekülen, die als Leitstrukturen für die Migrationen dienen. Rautou et al. (2011) beschrieben den Transfer von ICAM-1 mittels Membranfusion von Mikropartikeln aus arteriosklerotischen Plaques und Endothelzellen zur Förderung der Monozyten-Adhäsion und Transmigration.^[312] Lozito et al. (2014) demonstrierten ebenfalls den Transport von Molekülen aus fluoreszenz-markierten Mikropartikeln, isoliert aus dem Mediumüberstand humaner, mikrovaskulärer Endothelzellen und einer humanen Fibrosarkom-Zelllinie,



in humane mesenchymale Stammzellen.^[313] Folglich ist es denkbar, dass der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Austausch an Fluoreszenzmolekülen infolge der Migration der Monozyten stattfand. Nichtsdestotrotz ist es unklar, ob lediglich der FITC-gekuppelte anti-PECAM-1-IgG Antikörper oder der ganze Komplex mit dem daran gebundenen PECAM-1-Molekül ausgetauscht wurde. Zur Überprüfung dieser Tatsache würde sich z.B. die CRISPR/Cas9 Methode eignen, mit deren Hilfe fluoreszierende Fusionsproteine mit einer endogenen Expressionsrate generiert werden können.^[314] Somit könnte die Membran der Endothelzellen markiert und der mögliche Membranaustausch visualisiert werden.

Als Überprüfung der Einsetzbarkeit des etablierten Endothels im Mikrokanal wurde ein Permeabilitätsassay durchgeführt. Dieser Test basiert auf dem Transport eines mit Fluorophor oder radioaktiv markierten Stoffes durch die konfluente Zellschicht. Die Quantifizierung erfolgt mittels Analyse der Fluoreszenz oder der Radioaktivität im Auffangbehälter.^[315] Somit lässt sich die Barriereintegrität der Zellen bestimmen, welche insbesondere für die Etablierung der BBB im weiteren Verlauf dieser Arbeit von Bedeutung war. Dabei stand die Etablierung eines mikrofluidischen Tests, in Anlehnung an die *in vivo* Gegebenheiten, im Fokus dieses Experiments. Der Transport von Substanzen aus dem Blut ins Gewebe unterliegt dynamischen Vorgängen. Die bisher gängige Methode zur Untersuchung der Permeabilität in Transwell-Systemen unter statischen Bedingungen entspricht somit nicht der Realität und ermöglicht keinen guten Vergleich zu *in vivo* Untersuchungen. Weiterhin zeigte die elektronenmikroskopische Analyse der Transwell-Membranen, dass zumindest die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PC-Membranen viele quervernetzte Poren aufweisen. Diese Membranbeschaffenheit führte vermutlich zum hier beobachteten Wachstum der HUVEC in Doppellayern, was zur Verfälschung der erzielten Resultate in diesen Systemen führen kann. Außerdem zeichnen sich die Doppellayer vermutlich durch eine niedrigere Permeabilität aus. Booth et al. (2012) entwickelten ein mikrofluidisches System, welches ebenfalls die Messung der Permeabilität von Substanzen unter mikrofluidischen Bedingungen erlaubt.^[43] Der in dieser Studie gemessene Permeabilitätswert für 4 kDa Dextran-FITC ($4,5 \times 10^{-6}$ cm/s) ergab eine zehnfach bessere Integrität der Zellen im Vergleich zum hier erzielten Ergebnis ($4,4 \times 10^{-5}$ cm/s). Dieser Unterschied ist vermutlich auf den Ursprung der Zellen zurückzuführen. Die von Booth et al. verwendeten Endothelzellen entstammen einem Mäusehirn, wobei im Rahmen dieser Arbeit HUVEC verwendet wurden, welche im Vergleich zum Hirnendothel eine viel höhere Permeabilität besitzen. Zudem konnte der Vergleich zwischen diesen beiden Messungen aufgrund Spezies-spezifischer Unterschiede nicht durchgeführt werden. Obwohl der von Booth et al. erzielte Wert dem *in vivo* Permeabilitätswert vom Rattenhirn ($0,92 (+/- 0,46, n = 10) \times 10^{-6}$) viel näher kommt, konnten bisher keine Untersuchungen an der menschlichen BBB durchgeführt werden.^[316] Eine Gegenüberstellung der humanen *in vivo* Werte und der in dieser Arbeit präsentierten Resultate wäre von großer Bedeutung und würde einen näheren Hinweis auf ihre Zuverlässigkeit liefern. Die Benutzung humaner, primärer, mikrovaskulärer Endothelzellen aus Gehirn ist allerdings aufgrund deren Herkunft sehr limitiert und wurde erst im Laufe der letzten Jahre durch die Kommerzialisierung dieser Zellen ermöglicht, wodurch die Untersuchungen der Permeabilität in dieser Arbeit auf HUVEC beschränkt werden mussten. Zudem lehrten die Erfahrungen aus Bypass-Operationen koronarer Herzerkrankungen, dass eine Reprogrammierung der Endothelzellen möglich ist. Die klinische Studie von Dohmen et al. (2013) zeigte, dass eine Transplantation von Polytetrafluorethylen-Bypässen, besiedelt mit den Endothelzellen aus Vorderarmvenen, in die Herzarterie erfolgreich durchgeführt werden kann.^[317] Die Endothelzellen der Arterien unterscheiden sich jedoch von den Endothelzellen der Venen, z.B. durch eine höhere Freisetzung von Vasodilatoren.^[318] Auch die Studien an Tieren, welche



einen Schlaganfall erlitten, demonstrierten ähnliche Ergebnisse: Die Xenotransplantationen von Stromazellen des Knochenmarks aus Mäusen in Rattenhirne führte zur Wiederherstellung der Hirndurchblutung und der Integrität der BBB.^[319] Auch *in vitro* Untersuchungen ergaben ähnliche Resultate. Hurst et al. (1996) beobachteten eine Induktion der Barriereintegrität von immortalisierten HUVEC in Folge einer Kokultur mit Gliomzellen.^[320] Shivers et al. (1988) wiesen ebenfalls darauf hin, dass die lokale Umgebung von Zellen, hervorgerufen durch EZM Komponenten und benachbarte Zellen, zur Erlangung differenzierter Eigenschaften beiträgt.^[321] Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein leichter Einfluss der Beschichtung mit Komponenten der EZM auf die Permeabilität verzeichnet werden: Die Beschichtung mit Matrigel bzw. der Mischung aus Matrigel und Kollagen führte zu einer Erhöhung der Barriereintegrität von HUVEC. Wenngleich eine Veröffentlichung über den negativen Einfluss der Matrigel-Beschichtung in Form der erhöhten Permeabilität des etablierten *in vitro* BBB Modells im Vergleich zur Beschichtung aus Kollagen I und Kollagen IV berichtete, sollten solche Tatsachen beim Vergleich unterschiedlicher Studien ebenfalls bedacht werden.^[322] Eine Analyse der EZM-Zusammensetzung des Isolationsortes der Zellen zur weiteren Verwendung für *in vitro* Studien würde die Relevanz solcher Untersuchungen erhöhen und die Versuchsbedingungen besser an die *in vivo* Situation anpassen.^[35]

Für die Etablierung des BBB Modells im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor war die Bestimmung des geeigneten Nährmediums für die Zellen relevant. Sehr viele *in vitro* Modelle basieren auf der Anwendung des Astrozyten-konditionierten Mediums anstelle einer Kokultur aus Endothelzellen und Astrozyten.^[321, 323, 324] Es ist bekannt, dass die Faktoren im Astrozyten-konditionierten Medium die Expression mancher Enzyme und Transporter in Endothelzellen, wie z.B. der γ -Glutamyltranspeptidase (γ GTP) und des Na-K-2Cl-Cotransporters, verstärken.^[325, 326] Weiterhin sekretieren Astrozyten eine Reihe an Botenstoffen, welche zur Etablierung der starken Barriereintegrität von Endothelzellen beitragen. Raub et al. (1992) zeigten, dass die Behandlung der mikrovaskulären Endothelzellen mit dem Astrozyten-konditionierten Medium aus Astrogliomzellen in der Erhöhung des TEER Wertes um 200 - 440% und in der Erniedrigung der Permeabilität von Saccharose und 70 kDa Dextran um 50% resultiert.^[327] Ebenfalls führt die Behandlung der Endothelzellen mit dem Sekretionsfaktor GDNF (engl. glial cell line-derived neurotrophic factor) zu einer geringeren Permeabilität und erhöhten TEER Werten.^[328] Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF (engl. fibroblast growth factor-basic) im Astrozyten-konditionierten Medium verstärkt die Aktivität des Enzyms alkalische Phosphatase, welches für mikrovaskuläre Endothelzellen charakteristisch ist und den Reifezustand dieser Zellen während der Gehirn-Entwicklung widerspiegelt.^[329] Des Weiteren sekretieren Astrozyten den transformierenden Wachstumsfaktor-beta (TGF- β), welcher die Reduktion der Expression von Gerinnungshemmern in Endothelzellen bewirkt.^[330] Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reduktion von zwei untersuchten Tight Junction Proteinen, PECAM-1 und Vinculin, infolge der Behandlung der Endothelzellen mit dem Astrozyten-konditionierten Medium mittels Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie nachgewiesen. Dagegen erhöhte sich die Anzahl der Claudin-5 Moleküle nach dieser Behandlung. Diese Unterschiede könnten daher kommen, dass lediglich ein Subset an Tight Junction Proteinen durch die im Astrozyten-konditionierten Medium enthaltenden Sekretionsfaktoren getriggert wird. Es ist auch denkbar, dass ein direkter Kontakt zwischen Endothelzellen und Astrozyten für die erhöhte Expression dieser Proteine notwendig ist. Beispielsweise demonstrierten Tao-Cheng et al. (1987), dass das Astrozyten-konditionierte Medium im Gegensatz zur Kokultur keine Verstärkung der Tight Junctions auslöst.^[331] Auch Hayachi et al. (1997) zeigten, dass der direkte Kontakt zwischen Endothelzellen und



Astrozyten eine erhöhte Expression von γ GTP, Glut1, P-gp und dem Transferrin Rezeptor zur Folge hat. Außerdem wurde in dieser Studie eine erhöhte Anzahl an Mitochondrien, die Ausbildung von ZO-1 und eine niedrigere Permeabilität für Inulin im Vergleich zu Modellen ohne Kontakt der beiden Zelltypen beobachtet.^[332] Aus diesen Überlegungen heraus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Kokultur aus Endothelzellen und Astrozyten im μ 3D*Vasc* Bioreaktor etabliert. Außerdem wurden Perizyten in das System inkorporiert, um die Physiologie der BBB besser nachzuahmen. Dank der Porosität der PC-Membran konnte ein Kontakt zwischen Endothel und diesen Zellen gewährleistet werden. Dies ahmte die natürliche Situation nach: Die Endothelzellen und Perizyten teilen *in vivo* dieselbe Basallamina, während die Astrozyten durch die Astrozyten-Endfüßchen mit Endothel in Kontakt sind.^[333] Die Kultivierung von Perizyten erfolgte auf der Rückseite der PC-Membran. In der Nähe des Endothels erlangten die Perizyten eine irreguläre, verzweigte Morphologie, die *in vivo* charakteristisch ist.^[56, 334] Im Gegensatz dazu besitzen diese Zellen unter 2D-Bedingungen eine spindelförmige Form.^[335] Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Perizyten keine dichte Zellschicht bildeten. Dieses Zellverhalten wurde bis zum Abschluss der Experimente am Tag 20 verzeichnet. Dieses Ergebnis spiegelt ebenfalls die *in vivo* Gegebenheiten wider: Die Perizyten des ZNS bedecken nur 22 - 32% der Mikrokapillaren-Oberfläche.^[336] Die Bedeckung der Blutgefäße mit Perizyten variiert sehr stark zwischen den einzelnen Organen: In Ratten beispielsweise beträgt sie 11% im Herzmuskel und 41% in der Retina.^[337] Die genaue Ursache dafür ist jedoch unklar. Es ist bekannt, dass in der Choroidea und in der Haut die Stellen der Blutkapillare, an denen der Gas- und Nährstoffaustausch stattfindet, frei von Perizyten sind. Weiterhin sind die Perizyten meist an den Abzweigungen der Gefäße vorzufinden. Aufgrund der starken Bedeckung der BBB mit Perizyten wird vermutet, dass Perizyten an der Ausbildung und der Erhaltung der Barriereintegrität beteiligt sind.^[52] Die statisch kultivierten Perizyten weisen jedoch unter 2D-Kulturbedingungen keine Zell-Zell-Inhibition auf und wachsen bei langen Kultivierungszeiten in mehreren Schichten.^[333] Im nächsten Zwischenschritt konnten die Astrozyten direkt auf den Perizyten-Monolayer im μ 3D*Vasc* Bioreaktor ausgesät werden. Die Beschichtung der Perizyten mit Matrigel im Vorversuch ergab keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zum direkten Ausplattieren der Astrozyten auf Perizyten. Die Literatur liefert sehr wenige Hinweise auf die Interaktion zwischen diesen beiden Zelltypen.^[205] Es ist bekannt, dass der Perizyten-Zellkörper vollständig von der Basallamina umhüllt ist.^[338] Gleichzeitig synthetisieren die Perizyten Komponenten der Basalmembran, wie z.B. Kollagen Typ IV, Glykosaminoglykane und Laminin.^[338, 339] Folglich wurden die Perizyten vier Tage vor dem Einbringen der Astrozyten im μ 3D*Vasc* Bioreaktor ausgesät, um das Anwachsen dieser Zellen und die mögliche Sekretion der EZM zu gewährleisten. Die Vorbehandlung der Astrozyten mit dem roten Farbstoff CellTracker™ Red, welcher das Zytosol markiert, ermöglichte die Echtzeitverfolgung des Wachstums dieser Zellen im μ 3D*Vasc* Bioreaktor mittels Konfokalmikroskopie und zeigte, dass sie erfolgreich auf dem Perizyten-Layer kultiviert werden konnten. Die Markierung der zellspezifischen Marker aller drei Zelltypen konnte mittels Immunhistochemie erfolgreich durchgeführt werden. Der für Astrozyten spezifische Marker GFAP wird jedoch nur von einer Subpopulation an Astrozyten exprimiert.^[203] Aus diesem Grund ist die Gegenfärbung für das Erfassen des Wachstums aller Astrozyten nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beispielsweise die Zellkernfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. Bei Perizyten wurden bisher keine eindeutigen Marker identifiziert, die ausschließlich für diese Zellen charakteristisch sind.^[32, 338] Laut Literatur exprimieren 60 - 80% der Perizyten α -SMA *in vitro*, während lediglich 1 - 10% der Perizyten des ZNS dieses Protein *in vivo* exprimieren.^[333, 340, 341] Diese Abnahme an α -SMA-Expression wurde im μ 3D*Vasc* Bioreaktor allerdings nicht beobachtet. Die Ursache dafür kann in der Zusammensetzung des verwendeten



Kultivierungsmediums liegen. Es wurde berichtet, dass der Zusatz des TGF- β eine Hochregulierung der α -SMA-Expression bewirkt, wohingegen der Zusatz von FGF-2 sie herunterreguliert.^[342] Angesichts der unbekanntem Zusammensetzung kommerziell erhältlicher Medien ist es möglich, dass TGF- β im eingesetzten Medium vorhanden war. Außerdem sekretieren Astrozyten TGF- β .^[330] Insgesamt ist nach dem heutigen Stand der Wissenschaft das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte BBB Modell das erste *in vitro* Modell, das die *in vivo* Anordnung der Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten korrekt wiedergibt.

Als Nächstes wurden die Perizyten und Astrozyten auf ihre physiologischen Eigenschaften im μ 3D V_{asc} Bioreaktor im Vergleich zu statisch kultivierten Kontrollen untersucht. Die Proliferation und das Wachstum der Astrozyten wird *in vivo* durch den Transkriptionsfaktor GATA4 herunterreguliert.^[343] Lediglich im Falle einer Verletzung des ZNS werden diese Zellen aktiviert, um die Wunde zu verschließen und eine sogenannte Glianarbe zu bilden.^[206, 207] Ein ähnliches Verhalten zeigen die Perizyten *in vivo*: Die Bedeckung der ausgewachsenen Blutgefäße mit Perizyten ändert sich unter physiologischen Bedingungen kaum.^[205] Die Proliferation und Wanderung der Perizyten findet ausschließlich während der Entstehung neuer Blutgefäße statt.^[57] Die kommerziell erhältlichen Astrozyten und Perizyten für *in vitro* Untersuchungen sind dagegen durch eine schnelle Teilung gekennzeichnet.^[344] Daher war es interessant zu prüfen, ob die Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten unter physiologisch relevanten Bedingungen im μ 3D V_{asc} Bioreaktor die Proliferation der letzten beiden Zelltypen beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Reduktion der Proliferation von Perizyten und Astrozyten im Vergleich zu statischen Kontrollen demonstriert werden. Des Weiteren konnte eine kontinuierliche Reduktion der metabolischen Aktivität von Perizyten und Astrozyten nachgewiesen werden, während die statisch kultivierten Zellen eine konstante metabolische Aktivität aufwiesen, welche erst gegen Ende des Experiments auf 77% sank. Der lebend/tot-Nachweis zeigte, dass die Zellen im μ 3D V_{asc} Bioreaktor vital sind und nur wenige tote Zellen vorhanden waren. Eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung dieser Zellen spielte die Porosität der PC-Membran. Die Untersuchung der etablierten Zellkultur auf die Mangelversorgung mit Sauerstoff, auch Hypoxie genannt, bestätigte, dass die kontinuierliche Versorgung mit Kultivierungsmedium den hypoxischen Zustand in diesen Zellen verhinderte. Im Gegensatz dazu zeichnen sich statische *in vitro* Modelle durch eine unregelmäßige Proliferation infolge einer schlechten Sauerstoffversorgung aus.^[345] Außerdem beeinflusst eine Hypoxie die Genexpression und bestimmte Eigenschaften der Zellen, wie z.B. die Absonderung von EZM Komponenten.^[346]

Die Herausforderung des „Organs-on-Chips“ Konzepts ist es, die *in vivo* Mikroumgebung des zu untersuchenden Gewebes oder Organs physiologisch korrekt nachzuahmen. Im Falle der *in vitro* BBB ist es von Bedeutung, die dichte Barriere und den selektiven Molekültransport zu reproduzieren, um ein relevantes Untersuchungssystem zu erschaffen. Bisher wurde hauptsächlich die TEER Methode zur Messung der Barriereintegrität verwendet. Hierzu werden Elektroden in die Vorrichtungen eingebaut oder manuell bei der Messung eingeführt, um den elektrischen Widerstand der Zellschicht zu messen. Die erhöhte Expression an Tight Junction Proteinen hat eine dichtere Barriere zur Folge und spiegelt sich im TEER Wert wider. Der Nachteil an dieser Methode ist allerdings, dass bereits minimale Löcher im Zellrasen zu signifikanten Schwankungen der ermittelten Ergebnisse führen können.^[178] Dies erklärt auch die hohe Varianz der bisher publizierten TEER Werte für „Organs-on-Chips“ und verdeutlicht, dass alternative Methoden zur Feststellung der Ähnlichkeiten zwischen den etablierten *in vitro* Modellen und



der *in vivo* BBB notwendig sind. Hierzu eignet sich z.B. der P-gp Transport Assay, mit Hilfe dessen die für die BBB charakteristische Transport-Selektivität überprüft werden kann. P-gp ist eine Efflux-Pumpe, welche den Eintritt von Toxinen und Schadstoffen aus dem Blut ins Gehirn verhindert. Gleichzeitig sind viele Antiepileptika, HIV-Proteaseinhibitoren und Krebsmedikamente ebenfalls Substrate von P-gp.^[40, 347] Somit ist die Erforschung neuer Inhibitoren von P-gp für den effizienten Transport von Medikamenten von Bedeutung. Hierzu ist es wichtig, dass die *in vitro* verwendeten Endothelzellen eine *in vivo* ähnliche Expression dieser Efflux-Pumpe aufweisen. Viele primäre Hirnendothelzellen verlieren allerdings nach der Isolation ihre *in vivo* Eigenschaften und sind durch eine niedrigere Expression an Efflux-Pumpen gekennzeichnet. Endothelzellen aus anderen Organen, wie z.B. HUVEC aus der Nabelschnur, sind ebenfalls ungeeignet für solche Studien, weil sie kein P-gp exprimieren.^[214, 348] Aus diesem Grund wurden hCMEC/D3 Zellen für die P-gp Transport Assays erfolgreich im porösen Mikrokanal unter fluidischen Bedingungen etabliert. Die immunhistochemische Analyse zeigte in den hCMEC/D3 Zellen im porösen Mikrokanal eine deutliche Expression des Tight Junction Proteins Claudin-5, welches ein wichtiger Bestandteil der Endothelzellen der BBB ist. Weiterhin konnte die Expression von P-gp mittels Konfokalmikroskopie deutlich visualisiert werden. Tai et al. (2009) demonstrierten ebenfalls die P-gp Expression in hCMEC/D3 Zellen, die auf mit Kollagen beschichteten Deckgläschen kultiviert wurden.^[216] Dabei war das Protein in vesikulären Strukturen sowie in der Zellmembran lokalisiert. Eine vesikuläre bzw. membrangebundene Lokalisation von P-gp konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Durch Zusatz von Calcein-AM, eines P-gp Substrats, konnte diese Efflux-Pumpe auf ihre Funktion getestet werden. Dabei wurde ein deutlicher Efflux von Calcein-AM aus den Endothelzellen gezeigt. Die Ergänzung der Versuchsbedingungen durch den P-gp Inhibitor Verapamil führte zur Akkumulation von Calcein-AM in den Endothelzellen und dessen anschließender Umsetzung durch Esterasen zum grün fluoreszierenden Calcein. Somit war es möglich, den selektiven Transport der etablierten endothelialen Schicht im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor nachzuweisen. Ähnliche Studien wurden von Jang et al. (2013) mit proximalen Tubuluszellen in einem mikrofluidischen System durchgeführt.^[349] Weitere Publikationen demonstrierten ebenfalls den erfolgreichen Transport von P-gp Substraten aus Hirnendothelzellen.^[216, 350] Allerdings erfolgte die Zellkultivierung in diesen Studien in Monokulturen und unter statischen Bedingungen in Transwell-Systemen. Im Gegensatz dazu basiert das in dieser Arbeit präsentierte Modell der *in vitro* BBB auf der dynamischen Versorgung der Endothelzellen und deren Kultivierung auf einer gekrümmten Oberfläche in der Nähe von Perizyten und Astrozyten. Somit ahmt das hier etablierte BBB Modell die *in vivo* Situation besser nach. Fricker et al. (2002) untersuchten die Funktion von P-gp in Schweine-Blutkapillaren.^[240] Gemäß der Literatur entsprechen die isolierten Blutkapillaren mehr der *in vivo* Situation als primäre oder immortalisierte Hirnendothelzellen.^[351-353] Allerdings wurden die Substrate und Inhibitoren von P-gp in dieser Studie aufgrund der geringen Größe des Lumens der Blutkapillaren durch die basale Seite appliziert, obwohl die P-gp Efflux-Pumpen hauptsächlich auf der luminalen Seite der Hirnendothelzellen exprimiert werden und der Transport *in vivo* über das Lumen stattfindet.^[353-355] Die Ergebnisse dieser Studien glichen den im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor erzielten Ergebnissen. Somit kann gefolgert werden, dass der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor mit den Blutkapillaren vergleichbar ist und eine vielversprechende, auf menschlichem Material basierende Alternative darstellt.

Das nächste Ziel der vorliegenden Dissertation war die Etablierung eines „durchbluteten“ Darmepithels. Hierzu konnte die Kokultur aus Endothelzellen auf der luminalen Seite der PC-Membran und humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen (Caco-2) auf der Rückseite erzielt werden. Weiterhin wurde eine

deutliche Reaktion der Caco-2 Zellen auf die Kultivierung im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor beobachtet: Die normalerweise unter 2D-Bedingungen planar wachsenden Caco-2 Zellen arrangierten sich in 3D-Gebilden, die eine morphologische Ähnlichkeit zu *in vivo* Darmzotten aufwiesen. Der gleiche Effekt wurde bereits von Kim et al. (2012) beschrieben.^[121] Allerdings wurde im Rahmen dieser Studie die oben beschriebene Reaktion von Caco-2 Zellen von anderen Stimuli hervorgerufen: In diesem Fall wurden die natürlichen Kontraktionen des Darms sowie die Scherkräfte, welche am Darmepithel wirken, durch mechanische Dehnungen der Membran und einen mikrofluidischen Fluss simuliert und hatten eine spontane Reorganisation dieser Zellen zu *in vitro* Darmzotten zur Folge. Im Vergleich dazu wurde es im Rahmen dieser Dissertation erfolgreich nachgewiesen, dass auch andere Stimuli, wie etwa die Kokultur mit Endothelzellen, in einem ähnlichen Zellverhalten resultieren können. Sung et al. (2011) präsentierten ebenfalls ein Modell zur Rekonstruktion von Darmzotten *in vitro*.^[356] Hier wurde die 3D-Organisation von Caco-2 Zellen mittels einer 3D-geformten Kollagen-Matrix erreicht, welche die Form der *in vivo* Darmzotten exakt imitierte. Eine weitere Veränderung des Verhaltens der Caco-2 Zellen konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit durch den mikroskopischen Nachweis des Tight Junction Proteins Occludin nachgewiesen werden. Eine deutliche Expression von Occludin wurde bereits nach acht Kultivierungstagen erzielt, während bei Transwell Systemen dieser Prozess erst nach 15 bis 20 Tagen einsetzt.^[120, 123] Esch et al. (2012) entwickelten ein physiologisch relevanteres Modell auf der Basis von 3D-Silikon-Säulen und einer darüber gespannten porösen Membran, wenngleich auch hier die Expression von Occludin erst nach 21 Tagen nachgewiesen wurde.^[122] Weiterhin konnte die Expression von Mucin-2, einem wichtigen Bestandteil des Darmschleims, in Caco-2 gezeigt werden. Dagegen produzieren Caco-2 Zellen in Transwell-Systemen sehr selten Schleim.^[244, 245] In der Literatur werden Caco-2 Zellen mit den Enterozyten verglichen.^[246] Allerdings wird Mucin-2 *in vivo* von Becherzellen sekretiert.^[247] Dies deutet darauf hin, dass die im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor etablierten Caco-2 Zellen eventuell eine Differenzierung in zwei verschiedene Zelltypen vollzogen haben. Kim et al. (2013) haben darüber hinaus bewiesen, dass eine Differenzierung von Caco-2 Zellen in alle vier Zelltypen des Darmepithels, Becherzellen, enteroendokrine Zellen, Enterozyten und Paneth-Zellen, möglich ist.^[247]

Als drittes Barrieremodell wurde im Rahmen dieser Dissertation die Leber ausgewählt. Diese ist das zentrale Organ des Metabolismus toxischer Substanzen und ist für deren Entgiftung verantwortlich.^[296] Die *in vivo* Toxizität ist die Ursache, warum 90% aller neu entwickelten Wirkstoffe nach der klinischen Phase I nicht weiter verfolgt werden.^[357] Somit wird deutlich, dass die Entwicklung von *in vitro* Modellen zur besseren Vorhersage der Toxizität im Rahmen präklinischer Studien die Vorauswahl der Wirkstoffe beschleunigen kann. Für die Generierung eines relevanten *in vitro* Lebermodells ist die Herkunft des Zellmaterials von großer Bedeutung. Heutzutage werden immortalisierte Zelllinien, primäre Zellen oder Gewebeschnitte für diese Zwecke eingesetzt.^[358-360] Die primären Zellen ähneln in ihrer Physiologie am meisten den *in vivo* Gegebenheiten, weil sie durch die gleichen Expressionsmuster von Enzymen und Transportern wie die *in vivo* Leberzellen gekennzeichnet sind.^[361] Dennoch verlieren diese Zellen durch die Kultivierung unter 2D-Bedingungen schnell diese Eigenschaften.^[358] Bereits während der ersten 24 Stunden nach der Isolation der Hepatozyten kommt es zu einer Hoch- oder Herunterregulierung von etwa 3000 Genen in diesen Zellen.^[260] Wenngleich viele Gene herunterreguliert werden, kommt es zur Hochregulierung der Gene des MAP-Kinase-Signalweges: Während der ersten 48 Stunden findet eine Aktivierung der Phosphorylierung von ERK1/2 statt.^[362] Dies führt zur Dedifferenzierung der Hepatozyten, die sich im Verlust der Zellpolarität und der Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) widerspiegelt. Die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) wird, ähnlich dem



ERK1/2, hochreguliert und hat eine Resistenz gegen Apoptose zur Folge.^[260] Aufgrund dieser Limitierungen haben embryonale Stammzellen einen breiten Einsatz in der Zellersatztherapie und der Wirkstoffforschung gefunden, denn diese Zellen zeichnen sich durch eine Fähigkeit zur Selbstregeneration und eine starke Proliferationsrate aus. Duan et al. (2007) zeigten, dass ausdifferenzierte, embryonale Stammzellen Leber-spezifische Gene auf physiologischem Niveau exprimieren und über dieselben Funktionen verfügen wie primäre Hepatozyten.^[363] Cai et al. (2007) entwickelten ein Protokoll zur Ausdifferenzierung von Leber-Stammzellen und konnten nachweisen, dass ausdifferenzierte Zellen adulte Leber-Marker, wie z.B. TAT, Tdo2 und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) exprimierten. Außerdem waren die Zellen in der Lage, Albumin zu produzieren, Glykogen zu speichern und Lipoproteine niedriger Dichte (LDL, engl. low density lipoprotein) aufzunehmen.^[364] Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit fetale Leber-Stammzellen aus einer Maus zur anschließenden Ausdifferenzierung in zwei Leber-Zelltypen, Hepatozyten und Cholangiozyten, nach dem Protokoll von Tanimizu et al. (2003) isoliert.^[142] Die Oberflächenmarker, die für einen bestimmten Zelltyp charakteristisch sind, eignen sich sehr gut für die Zellisolation mit Hilfe von FACS. Im Falle der hier isolierten embryonalen Leber-Stammzellen diente dafür das Protein DLK zur spezifischen Markierung.^[142] Die isolierten DLK⁺ Hepatoblasten konnten im weiteren Verlauf als eine stabile Zelllinie HPPL über mehrere Wochen in Kultur ohne Verlust der spezifischen Stammzell-Charakteristika gehalten werden. Die Ausdifferenzierung der DLK⁺ Hepatoblasten bzw. der HPPL-Zellen in Hepatozyten und Cholangiozyten wurde mittels Generierung von 3D-Zellkulturen und durch die Interaktion der Zellen mit EZM Komponenten erreicht. Die Bedeutung der Überschichtung der Leberzellen mit EZM wurde in der Literatur beschrieben: Der Kontakt zur EZM führt bei Hepatozyten zur Reorganisation des Zytoskeletts und zur Erlangung der *in vivo* charakteristischen Zellpolarität.^[365] Die Expression der hepatischen, adulten Marker G6Pase, Tdo2, TAT, Albumin und TTR wurde in ausdifferenzierten Zellen mittels RT-PCR quantifiziert. Weiterhin bildeten die ausdifferenzierten Zellen Zysten-ähnliche Strukturen, welche *in vivo* durch Cholangiozyten ausgekleidet sind. Der Cholangiozyten-Marker CK19 konnte in einigen von diesen Strukturen nachgewiesen werden. Die ausdifferenzierten Zellen bildeten somit ein vielversprechendes Material zur Etablierung eines Lebermodells im μ 3D*Vasc* Bioreaktor. Die Kultivierung dieser Zellen in der Nähe von Endothelzellen würde den *in vivo* Aufbau der Leber besser wiedergeben. Salerno et al. (2011) beschrieben den positiven Einfluss der HUVEC auf die Morphologie der primären Hepatozyten in einem organotypischen System.^[285] Weiterhin konnte der Einfluss der Kokultur auf die Albumin-Produktion und die Harnstoff-Synthese in dieser Studie demonstriert werden. Bale et al. (2015) untermauerten diese Ergebnisse, indem sie die Bedeutung der Kokultur aus sinusoidalen Endothelzellen der Leber und Hepatozyten auf die Albumin-Produktion und die Enzym-Aktivität demonstrierten.^[286] Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Ausdifferenzierung der isolierten Stammzellen im μ 3D*Vasc* Bioreaktor zur Ausbildung Zysten-ähnlicher Strukturen führt. Vermutlich erlangten diese Zellen einen Cholangiozyten-Phänotyp, obwohl das Differenzierungsprotokoll an die Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen in Hepatozyten angepasst war. Eventuell können die Krümmung der PC-Membran und die Kokultur mit Endothelzellen eine Ursache für das unterschiedliche Differenzierungsstadium der HPPL-Zellen im Vergleich zu Vorversuchen mit 3D-Zellkulturen sein. Somit repräsentiert der μ 3D*Vasc* Bioreaktor ein innovatives *in vitro* Modell zur Untersuchung der Differenzierung und Kultivierung von Leber-Vorläuferzellen und gibt zudem die physiologischen Charakteristiken der *in vivo* Leber wieder.

Mit Hilfe des μ 3D*Vasc* Bioreaktors lassen sich organotypische Kulturen etablieren, die eine natürliche *in vivo* Umgebung der Blutgefäße widerspiegeln und damit eine genauere Untersuchung von



transendothelialen Transportprozessen ermöglichen. Die Verknüpfung der einzelnen, in dieser Arbeit vorgestellten Barrieremodelle untereinander würde es ermöglichen, den Metabolismus der applizierten Wirkstoffe genau zu simulieren und zu erforschen. Dies würde gewährleisten, das Verhalten der eingesetzten Substanzen nicht nur am Zielort, sondern auch deren mögliche toxische Einwirkung auf andere Organe aufzuklären. Somit wird deutlich, dass der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor eine Vielzahl an innovativen Anwendungsmöglichkeiten bietet. Die vielversprechenden Barrieremodelle konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden und in weiterführenden Studien ihren Einsatz finden.



6. Material und Methoden

6.1 Material

Zellen

- Adulte hepatische Stammzellen, isoliert aus der Leber einer mit DDC Diät behandelten C57BL/6 Maus (Oval Cells), von AG Prof. A. Miyajima, Universität Tokio, bereitgestellt^[292]
- Caco-2 (Human Colon Carcinoma Cells, humane kolorektale Adenokarzinomzellen)
- hCMEC/D3 (Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells, humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen)^[100], von Prof. G. Fricker, Universität Heidelberg, bereitgestellt
- HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humane Nabelschnurendothelzellen, C-12200, Promocell)
- HA (Human Astrocytes, humane Astrozyten, SC-1800, Provitro)
- Humane Fibroblasten
- hPC-PL (Human Pericytes from Placenta, humane Perizyten aus Plazenta, C-12980, Promocell)
- HPPL (Hepatic Progenitor Cells Proliferating on Laminin, auf Laminin proliferierende Leber-Vorläuferzellen)
- Isolierte fetale, murine DLK⁺ Hepatoblasten aus einer C57BL/6 Maus (Nihon SLC, Japan)
- Isolierte fetale, murine Leberzellen/Mischzellkultur aus einer C57BL/6 Maus (Nihon SLC, Japan)
- Primäre, murine Hepatozyten (von X. Huang (AG Prof. U. Klingmüller, DKFZ) isoliert und bereitgestellt)^[276]
- THP-1 (Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line, humane Monozyten-Leukämie-Zelllinie)

Viren

- AAV-DJ-YFP (von AG Dr. D. Grimm, Universität Heidelberg, bereitgestellt)^[279]

Verbrauchsmaterialien

- Countess[®] Cell Counting Chamber Slides (C10228, Life Technologies[™])
- Deckgläschen Neo micro cover glass (C024601, Matsunami Glass); 30 mm #1, 34 mm #2 (Menzel-Gläser)
- Safe-Lock Tubes 1,5 ml (0030 120.086, Eppendorf[®]), 2 ml (0030 120. 094)
- Falcon-Tubes (BD Biosciences), 15 ml (352097), 50 ml (352098)
- Klebefolie, VHB[™] (Scotch[™])
- LightCycler[®] 480 Sealing Foil (04729757001, Roche Applied Science)
- Mr. Frosty[™] Freezing Container (Thermo Scientific)
- PCR-Tubes, 0,2 ml 8 strip tubes + domed caps, 120 pcs. (FG-028DC, Nippon Genetics), 0,2 ml 8-strip (I1402-2900, STARLAB), Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (981103, Qiagen)
- Perfusion Set yellow, 15 cm, ID 0,5 mm, 2 ml (10965, ibidi[®])
- Polycarbonatfolie, Belgium, Fluenz 10⁶ Ionen/cm² (it4ip)
- Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf[®] (0030 120.086), 2 ml (0030 120. 094)
- μ -Slide 8 Well, ibiTreat: #1,5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized (80826, ibidi[®])
- Spritzen, Luer-Lok[™] with BD Luer-Lok[™] tip (BD Biosciences), 3 ml (309657), 5 ml (309657), 10 ml (309604)
- Sterilfilter, 0,2 μ m (FP 30/0,2, Whatman[®] Schleicher&Schuell[®])

- Superfrost Microslide Glass (S8441, Matsunami Glass)
- Transwell® Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, 6,5 mm with 5 µm Pore (3421, Corning Incorporated)
- Tygon® Sanitary Silicone Tubing, Formulation 3350 (63009-252, VWR)
- Zellkultur Multiwellplatten, Corning®, sterile cell culture plates, 6 Well (3516, Sigma-Aldrich®); (CellStar® greiner bio-one), sterile, F-bottom, with lid 6 Well (657160), 12 Well (665180), 24 Well (662160), 96 Well (655180)
- Zellkulturflaschen, PS, steril, 75 cm² (353136, BD Biosciences)
- Zellkulturschalen (BD Biosciences), 100 × 20 mm (353003); BioCoat™ Dish 100 mm, Collagen I, 10 pac (354450)
- Zellschaber (99002, TPP)

Chemikalien

- Agarose, (840001, Biozym)
- AGS (SC-1852, Provitro)
- AM (SC-1800, Provitro)
- Ammoniumchlorid (K298.1, Carl Roth®)
- Aqua ad iniectabilia (13327, B.Braun Petzold GmbH)
- Basement Membrane Matrix (BD Biosciences™), 5 ml *LDEV-Free (356234), GFR, Phenol Red-free (356231)
- BLC-1, Cellbanker® 1 (Zenoag, Fukushima)
- BSA, Bovine Serum Albumin, Fraction V (K41-001, PAA)
- Calcein-AM (C1430, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
- Calciumchlorid (CN93.1, Carl Roth®)
- CasBlock™ (008120, Invitrogen™)
- Cellmatrix Type I-A (collagen, Type I, 3mg/ml, pH 3.0), (631-00651, Alpha Laboratories)
- Cell Proliferation Kit XTT (A8088, 1000, AppliChem)
- CellTracker™ Green CMFDA (C7025, Molecular Probes®, Life Technologies™)
- CellTracker™ Red CMTPX (C34552, Molecular Probes®, Life Technologies™)
- Chloroform (038-02606, Wako)
- Collagen Type I Rat Tail High Concentration (354249, BD Biosciences)
- Collagenase/Dispase medium/Liver Digest Medium (17703-034, Gibco®, Life Technologies™)
- Collagenase from Clostridium histolyticum (C2799, Sigma-Aldrich®)
- DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) (D3571, Molecular Probes®, Life Technologies™)
- Desoxyribonuclease I, Amplification Grade (18068-015, Invitrogen™, Life Technologies™)
- DNA Ladder plus, 1 Kb, (10787-018, Life Technologies™)
- DNA Gel Loading Dye (6×), (R0611, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
- DEPC treated water (4387937, Ambion®, Life Technologies™)
- Dexamethason (D4902-25MG, Sigma-Aldrich®)
- Dextran Alexa Fluor® 488, 3000 MW, anionic (D34682, Molecular Probes®, Life Technologies™)
- Diethyl pyrocarbonate (D5758-100ML, Sigma-Aldrich®)
- DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (D5796, Sigma-Aldrich®), (41966-029, Gibco®, Life Technologies™), Powder, High Glucose, Pyruvate (12800-082, Gibco®, Life Technologies™)
- DMEM/F12, Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D8062, Sigma-Aldrich®)
- DNA-free™ DNA Removal Kit (AM 1906, Ambion®, Life Technologies™)
- Dowfax™ 2A1, (A000080, Ezkem)



- DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-CaCl₂, -MgCl₂) (14040-091, Gibco®, Life Technologies™), (+CaCl₂, +MgCl₂) (14190-091, Gibco®, Life Technologies™)
- EGF, recombinant murine (315-09, PeproTech)
- EBM[®]-2 Endothelial Cell Basal Medium-2 (CC-3156, Lonza)
- EGM[®]-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors (CC-4176, Lonza)
- EmbryoMax[®] 0.1% Gelatin Solution (ES-006-B, Merck Millipore)
- Essigsäure (Eisessig), 100%, 1 l (1.00063, Merck)
- Ethanol 99,8% AnalaR NORMAPUR (20821.296, VWR Chemicals)
- FBS, Fetal Bovine Serum (F4135-500ML, Sigma-Aldrich[®])
- Fibronectin (P/N 42805, Invitrogen™)
- Fluoromount™ (K024, Diagnostic Biosystems)
- Gelatin from cold water fish skin (G7765, Sigma-Aldrich[®])
- Gentamicin Sulfate (077-02974, Wako)
- Glukose (041-00595, Wako)
- Ham's F12 medium (Nitta Gelatin Inc.)
- HBBS (10×), no calcium, no magnesium, no phenol red (14185-052, Gibco®, Life Technologies™)
- HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, (1 M) (15630-080, Gibco®, Life Technologies™); Pufferlösung 1 M (50×) (L1613, Merck Millipore)
- HGF, recombinant human (100-39, PeproTech)
- Hoechst 33342, bisBenzimide H 33342 Trihydrochloride (B2261, Sigma-Aldrich[®])
- Hydrocortison (H0888-1G, Sigma-Aldrich[®])
- Hypoxyprobe Kit (HP1-200Kit, Hypoxyprobe, Inc.)
- IPC-30 (Aterocollagen), (KOU-IPC-30, Koken)
- Isopropanol (6752.1, Carl Roth[®])
- ITS, Insulin-Transferrin-Selenium-X (51500-056, Gibco®, Life Technologies™)
- Laminin, mouse (354232, Becton Dickinson)
- L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (A8960-5G, Sigma-Aldrich[®])
- L-Glutamine-200 mM (100×), liquid (25030-149/081, Gibco®, Life Technologies™)
- LightCycler[®] 480 Probes Master (04887301001, Roche Applied Science)
- Liver perfusion medium (17701-038, Gibco®, Life Technologies™)
- MCP-1, Monocyte Chemoattractant Protein-1, Recombinant Mouse (554590, BD Biosciences)
- Magnesiumchlorid (208337-1KG, Sigma-Aldrich[®])
- 2-Mercaptoethanol (4227.3, Carl Roth[®])
- miScript II RT Kit (218160, Qiagen)
- Myco-3 (A5240,0100, Applichem)
- Natriumazid (197-11091, Wako)
- Natriumhydrogencarbonat (191-01305, Wako)
- Natriumpyruvat (100 mM) (L0473, Merck Millipore)
- Nicotinsäureamid, Nicotinamide (N0636-100G, Sigma-Aldrich[®])
- Non-essential amino acids (11140-050, Gibco®, Life Technologies™)
- Nuklease-freies Wasser (4387936, Ambion[®], Life Technologies™)
- Oncostatin M (AG Prof. A. Miyajima^[366] aber auch bei R & D Systems[®], 495-MO-025)
- Paraformaldehyd (formaldehyde) aqueous solution, 4% (157-4, Electron Microscopy Sciences)
- Penicillin/Streptomycin (P/S) (15140-122, Gibco®, Life Technologies™)
- Pericyte Growth Medium (Ready-to-use) (C-28040, Promocell)

- Phalloidin (Molecular Probes®, Life Technologies™), Alexa Fluor® 546 (A22283), Alexa Fluor®633 (A22284), Alexa Fluor® 647 (A22287)
- Phusion Hot Start II DNA Polymerase (F549S, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
- Propidiumiodid (81845-25MG, Fluka)
- PrimeScript™ RT Master Mix, Perfect Real Time (RR036A, Takara)
- QIAzol Lysis Reagent (79306, Qiagen)
- RNase AWAY® (83931, Sigma-Aldrich®)
- RNaseZap® (AM9780, Ambion®, Life Technologies™)
- RNase-Free DNase Set (79254, Qiagen)
- RNeasy Plus Mini Kit (50), (74134, Qiagen)
- RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, HEPES (72400-047, Gibco®, Life Technologies™)
- Saponin (558255-100MG, Merck Millipore)
- Sodium pyruvate solution (S8636, Sigma-Aldrich®)
- Tetro cDNA Synthesis Kit (65042, Bionline)
- TNF- α , human, recombinant (C-63719, Promokine)
- Tris (4855.2, Carl Roth®)
- Triton™ X-100 (T9284-100ML, Sigma-Aldrich®)
- TRIzol® Reagent (15596018, Ambion®, Life Technologies™)
- Trypanblau, 0,4% (15250-061, Gibco®, Life Technologies™)
- Trypsin (Gibco®, Life Technologies™), 0,25%, 1 \times , Phenol Red (15050-065), 2,5%, 10 \times , no Phenol Red (15090-046), 0,25% (25200-056)
- Universal Probe Library Mouse ACTB Gene Assay (05046190001, Roche Applied Science)
- Universal Probe Library Set, Mouse, 1 set (04683641001, Roche Applied Science), Probe #82 (04689054001), Probe #100 (04692187001)
- (\pm)-Verapamil hydrochloride (V4629, Sigma-Aldrich®)
- William's E Medium, no Glutamine (12551-032, Gibco®, Life Technologies™)

Zusammengesetzte Medien

• Caco-2 Zellen	Kultivierungsmedium	500 ml DMEM 20% FBS 25 mM HEPES 1% Myco-3 1% P/S
• DLK ⁺ Zellen	Kultivierungsmedium	500 ml DMEM 10% FBS 50 μ g/ml Gentamicin 2 mM Glutamin 50 μ M 2-Mercaptoethanol 1 \times non-essential amino acids
• HA	Kultivierungsmedium	500 ml AM plus AGS Zusätze
• hCMEC/D3	Kultivierungsmedium	500 ml EBM®-2 125 μ l Ascorbinsäure (EGM®-2 Zusatz) 500 μ l bFGF (EGM®-2 Zusatz) 125 μ l EGF (EGM®-2 Zusatz) 2,5% FBS 0,55 μ M Hydrocortison



		125 µl IGF-1 (EGM [®] -2 Zusatz) 5 ml P/S 125 µl VEGF (EGM [®] -2 Zusatz)
• hcMEC/D3	Differenzierungsmedium	500 ml EBM [®] -2 125 µl Ascorbinsäure (EGM [®] -2 Zusätze) 0,25% FBS 0,55 µM Hydrocortison 5 ml P/S
• HPPL-Zellen	Kultivierungsmedium	500 ml DMEM/F12 10% FBS 50 µg/ml Gentamicin 5 mM L-Glutamin 10 mM Nicotinamid
• HPPL-Zellen	Kultivierungsmedium mit Zusätzen	Kultivierungsmedium 0,1 µM Dexamethason 5 ng/ml EGF 5 ng/ml HGF 1× ITS
• HPPL-Zellen	Differenzierungsmedium	500 ml DMEM/F12 0,1 µM Dexamethason 50 µg/ml Gentamicin 1× IST
• humane Fibroblasten	Kultivierungsmedium	500 ml DMEM 10% FBS 1% Myco-3 1% P/S
• HUVEC	Kultivierungsmedium	EBM [®] -2 EGM [®] -2 Zusätze
• Leber-Mischzellkultur	Kultivierungsmedium	500 ml DMEM 10% FBS 50 µg/ml Gentamicin 2 mM Glutamin 50 µM 2-Mercaptoethanol 1× non-essential amino acids
• Oval Cells	Kultivierungsmedium	500 ml William's E Medium 0,2 mM Ascorbinsäure-2-phosphat 0,1 µM Dexamethason 10 ng/ml EGF 10% FBS 50 µg/ml Gentamicin 14 mM Glukose 2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES 10 ng/ml HGF 1× ITS 0,15% Natriumhydrogencarbonat 1 mM Natriumpyruvat 10 mM Nicotinsäureamid

<ul style="list-style-type: none"> Oval Cells 	Kultivierungsmedium mit Zusätzen	Kultivierungsmedium 0,1 µM Dexamethason 10 ng/ml EGF 10 ng/ml HGF 1× IST
<ul style="list-style-type: none"> Oval Cells 	Differenzierungsmedium	William's E Medium 0,2 mM Ascorbinsäure-2-phosphat 10% FBS 50 µg/ml Gentamicin 14 mM Glukose 2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES 0,15% Natriumhydrogencarbonat 1 mM Natriumpyruvat
<ul style="list-style-type: none"> Primäre, murine Hepatozyten 	Kultivierungsmedium	DMEM/F12 0,1 µM Dexamethason 50 µg/ml Gentamicin 1× ITS
<ul style="list-style-type: none"> THP-1 Zellen 	Kultivierungsmedium	500 ml RPMI 1640 Medium 10% FBS 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
<ul style="list-style-type: none"> Caco-2 Zellen HA hCMEC/D3 HPPL-Zellen Oval Cells 	Einfriermedium	10% DMSO 90% FBS
<ul style="list-style-type: none"> hPC-PL, HUVEC 	Einfriermedium	10% DMSO 50% FBS 40% zellspezifisches Medium

Zusammengesetzte Chemikalien

<ul style="list-style-type: none"> Collagenase Type CVII Lösung: 	100 U/ml in 1× PBS ^{+/+} gelöst bei -80 °C gelagert bei Verwendung 1:10 in 1× PBS ^{+/+} gelöst
<ul style="list-style-type: none"> DEPC treated water 	500 µl Diethylpyrocarbonat 500 µl Milli-Q Wasser über Nacht bei RT inkubiert autoklaviert (40 Minuten), bei RT gelagert
<ul style="list-style-type: none"> Gentamicin-Lösung 	5 g Gentamicinsulfat 100 ml ddH ₂ O filtriert, bei -20 °C gelagert
<ul style="list-style-type: none"> Glukose-Lösung (14 mM) 	9 g 1 M Glukose 50 ml ddH ₂ O, filtriert
<ul style="list-style-type: none"> Hämolyse Puffer 	1 g Tris 2,8 g Ammoniumchlorid 500 ml ddH ₂ O, pH 7,2 – 7,6



• HBBS-P	5 ml Natriumpyruvat (100 mM) 5 ml HEPES Pufferlösung (1 M) 49 ml HBSS (10×) 441 ml Aqua ad iniectabilia
• L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Lösung (0,1 M)	0,26 g L-Ascorbinsäure-2-phosphat 10 ml ddH ₂ O, filtriert
• Natriumhydrogencarbonat-Lösung (7,5%)	3,8 g Natriumhydrogencarbonat 50 ml ddH ₂ O, filtriert
• Nicotinsäureamid-Lösung (1 M)	6,1 g Nicotinsäureamid 50 ml ddH ₂ O, filtriert
• 1× PBS ^{+/+}	1× PBS ^{-/-} 0,9 mM Calciumchlorid 0,5 mM Magnesiumchlorid
• PFS	7 ml Gelatin from cold water fish skin 1 g Saponin 0,2 g Natriumazid 1 l 1× PBS ^{+/+}
• 10× Puffer A	2,2 g Natriumhydrogencarbonat 100 ml ddH ₂ O 0,05 M NaOH-Lösung 200 mM HEPES
• 0,05% Trypsin-0,5 mM EDTA	10 ml 2,5% Trypsin 500 µl EDTA 489,5 ml mit 1× PBS ^{-/-} filtriert, bei -80 °C gelagert
• Trypsininhibitor für Caco-2 Zellen, hPC-PL, HUVEC	90% 1× PBS ^{-/-} 10% FBS
• Trypsininhibitor für HA	RPMI 1640 Medium 10% FBS 1% P/S

Antikörper

- Primärantikörper
 - Anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ab54723, abcam®), 10 µg/ml
 - Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Antibody (AB5804, Merck Millipore), 1:100 Verdünnung
 - Anti-pimonidazole mouse IgG1 monoclonal antibody (MAb1), Hypoxyprobe Kit (HP1-200Kit, Hypoxyprobe, Inc.), 1:50 Verdünnung
 - Claudin-5 Monoclonal Antibody, Mouse (4C3C2), Alexa Fluor®488 (352588, Life Technologies™), 10 µg/ml
 - Monoclonal Anti-CD31 (PECAM-1)-FITC antibody produced in mouse (F8402, Sigma-Aldrich®), 1:100 Verdünnung
 - Monoclonal Anti-Vinculin antibody produced in mouse (V9131-2ML, VWR International), 1:100 Verdünnung
 - Mouse Anti Human Mucin 2 (MCA1743, AbD Serotec), 1:100 Verdünnung
 - Mouse Anti-Mouse β-Catenin (610154, BD Pharmingen™), 1:300 Verdünnung

- Occludin Mouse Monoclonal Antibody (clone OC-3F10), Alexa Fluor® 594 Conjugate, (331594, Life Technologies™), 1:100 Verdünnung
 - P-glycoprotein, mAb (C219) (ALX-801-002-C100, Enzo®), 1:100 Verdünnung
 - Rabbit Anti-Mouse Cytokeratin 19 (CK19), pAb, against C-Termin peptide HYNLPTPKAI (AG Prof. A. Miyajima), 1:3000 Verdünnung
 - Rabbit Anti-Mouse IgG (Z0412, Dako), 1:300 Verdünnung
 - Rat Anti-Mouse Anti-DLK mAb (AG Prof. A. Miyajima, aber auch D187-4, MBL International), 5 µg/ml
 - Rat Anti-Mouse CD16/32 (Fc gamma receptor III, FcR) mAb (553141 oder 553142, BD Pharmingen™), 5 µg/ml
 - Rabbit IgG (I-1000, Vector), 1:300 Verdünnung
 - Rat IgG2A, k, FITC (553929, BD Pharmingen™), 5 µg/ml
 - Vimentin (Mouse, Anti-Human, Rat, Pig, Klon V9), (sc-6260, Santa Cruz Biotechnology), 1:100 Verdünnung
- Sekundäantikörper (1:500 Verdünnung)
 - Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Rabbit IgG (H+L) (A-21443, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
 - Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (A-11001, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
 - Alexa Fluor® 546 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (A11030, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
 - Alexa Fluor® 555 Goat Anti-Mouse IgG (H+L), highly cross-adsorbed (A-21424, Molecular Probes®, Life Technologies™)
 - Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, highly cross-adsorbed (A-11031, Thermo Fisher Scientific, Life Technologies™)
 - Donkey Anti-Sheep IgG (H+L) Antibody, Fluorescein (FITC) Conjugate, highly cross-adsorbed (A16049, Novex®, Life Technologies™)
 - Fluorescein Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (F-2765, Molecular Probes®, Life Technologies™)

Mikroskope

- Inverses Phasenkontrastmikroskop Primo Vert ZEISS mit Objektiven
 - Plan-Achromat ZEISS, 4 × /0,10 Ph 0, ∞/0,1
 - Plan-Achromat 10 × 0,25 Ph 1, 415500-1605-001
 - Primo LD Plan-Achromat 20 × /0,30 Ph 1, 415500-1614
- Fluoreszenzmikroskop EVOS fl mit 4 Objektiven (peqlab)
 - 20×, LED Light Cube GFP, RFP
- Konfokalmikroskop Fluoview 1000 (Olympus)
- Leica SP5 (DMI600 inverses Mikroskop) mit Objektiven
 - HC PL FLUOTAR 10.0×0.30 DRY
 - HCX PL Apo CS 20.0×0.70 DRY UV
 - HCX PL APO CS 40.0×1.10 WATER UV
 - HCX APO LU-V-I 63.0×0.90 WATER UV
 - HCX PL APO CS 63.0×1.20 WATER UV
- Lichtmikroskop (Olympus)



Einstellungen am Mikroskop

Leica SP5 XMP Inverted Confocal Microscope:

Pinhole

- | | |
|-------------------------------------|----------------------|
| • HC PL FLUOTAR 10.0×0.30 DRY | 1 Airy (70,7 µm) |
| • HCX PL Apo CS 20.0×0.70 DRY UV | 1 Airy (60,7 µm) |
| • HCX PL APO CS 40.0×1.10 WATER UV | 1,65 Airy (127,3 µm) |
| • HCX APO LU-V-I 63.0×0.90 WATER UV | 1 Airy (148,6 µm) |
| • HCX PL APO CS 63.0×1.20 WATER UV | 1 Airy (111,5 µm) |

Resolution 8 bit

Format 1024 × 1024 pixels

Speed 200 Hz (konfokale Aufnahmen) bzw. 400 Hz (z-Stapel)

Laser

UV (351 nm)

UV (364 nm)

Argon (488 nm) (30% Vorlage)

DPSS (561 nm)

HeNe (633 nm)

Emission

Bandwidth PMT1 (UV) 406 nm – 458 nm

Bandwidth PMT2 (Argon) 495 nm – 519 nm

Bandwidth PMT3 (DPSS) 578 nm – 603 nm

Bandwidth PMT4 (HeNe) 650 nm – 668 nm

Weitere Geräte

- Automatic sanitization module (Merck Millipore)
- Ex Demo Units Incubator (Binder)
- Fusion 200 Classic Syringe Pump (Chemyx)
- Labofuge 400 mit Zubehör Heraeus (SEPATECH)
- Lichtmikroskop (Olympus)
- LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Science)
- Mini-Zentrifuge GmClab® (Gilson®)
- Mastercycler® pro (Eppendorf®)
- PCR-Maschine, Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700
- Power Supply Unit U-RFT-T (Plympus)
- Pump System (10902, ibidi®)
- Rasterelektronenmikroskop SUPRA 60 VP (Carl Zeiss SMT), EDX-Detektor (XFlash 5010, Bruker)
- Schüttler Labo Shaker Model BC-740 (Bio Craft)
- SpectraMax M2 Microplate Reader (Molecular Devices)
- Spektrometer NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)
- Sterilbank, 1300 Series Biological Safety Cabinet 138 (Thermo Scientific)
- γ -Strahlungsquelle, Cobalt 60 (Atomic Energy Ltd.)
- Symphony Incubator (VWR)

- Thermoformanlage (Institut für Biologische Grenzflächen (IBG-1), Karlsruher Institut für Technologie)
- UVO-Cleaner Unit 342 (Jelight Company Inc.)
- Vakuum-Apparatur (Bel-Art-Products)
- Zellsortierer MoFlo™ XDP SmartSampler (Beckman Coulter®)
- Zentrifuge, Sorvall Legend™ XTR (Thermo Scientific), Himac CF7D2 (HITACHI), Sigma 4-15C (Qiagen)

Emission PCR

Target: 483 nm - 533 nm

β-Actin: 523 nm - 568 nm

Primer

Ausdifferenzierung von DLK⁺ Hepatoblasten (AG Prof. A. Miyajima):

TAT	forward	5'-GGAGGAGGTCGCTTCCTATT-3'
TAT	reverse	5'-GCCACTCGTCAGAATGACATC-3'
Tdo2	forward	5'-GGGGATCCTCAGGCTATCAT-3'
Tdo2	reverse	5'-AATCCACAAAAACCTTGTACCTG -3'

Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen (Sigma-Aldrich®):

Albumin	forward	5'-TCAACTGTCAGAGCAGAGAAGC-3'
Albumin	reverse	5'-AGACTGCCTTGTGTGGAAGACT-3'
CK19	forward	5'-GTCCTACAGATTGACAATGC-3'
CK19	reverse	5'-CACGCTCTGGATCTGTGACAG-3'
GAPDH	forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH	reverse	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
G6Pase	forward	5'-TGCATTCCTGTATGGTAGTGG-3'
G6Pase	reverse	5'-GAATGAGAGCTCTTGGCTGG-3'
TAT	forward	5'-TCCAGGAGTTCTGTGAACAGC-3'
TAT	reverse	5'-AGTATATGGTGCCTGCCTGC-3'
Tdo2	forward	5'-GCTCAAGGTGATAGCTCGGA-3'
Tdo2	reverse	5'-GGAActCTGCCATCTGTTCC-3'
TTR	forward	5'-TCTCTCAATTCTGGGGTTG-3'
TTR	reverse	5'-TTTCACAGCCAACGACTCTG-3'

Data base

Universal Probe Library, Assay Design Center, Roche Applied Science

Software

- Adobe Photoshop CS 6 Extended
- Axiovision Rel. 4.8 (ZEISS)
- Imaris 6.4.2 (Bitplane)
- Leica Application Suite (LAS-AF) Version: 2.6.0 build 7266 (Auswertung)
- Light Cycler® 480 Software release 1.5.0 SP4
- ND-1000 V.3.8.0

- OriginPro 9.1G
- Olympus Fluoview Ver. 3.1
- PumpControl Version: 1.5.0, ibidi®
- SoftMax Pro 4.7.1

6.2 Methoden

6.2.1 Herstellung von $\mu 3D Vasc$ Bioreaktoren

Für die Produktion der PC-Mikrokanäle wurde die mit Schwerionenbeschuss physikalisch modifizierte PC-Membran (50 μm Dicke, 10^6 Ionen/ cm^2 , it4ip, Belgien) und die mit ihr verbundene Formkulisse in ein rundes Formwerkzeug, bestehend aus einer Basisplatte und einer Gegenplatte, eingespannt. Das zentrale Element der Formkulisse stellt ein gerader Durchbruch mit den Dimensionen 1 mm \times 20 mm dar, welcher durch mechanische Mikrobearbeitung der 300 μm Scheibe gefertigt wurde. Bei der Basisplatte handelte es sich um eine hochglatte, unstrukturierte Messingplatte, während die Gegenplatte mit Kanälen und einer zentralen Öffnung zur Erzeugung des Drucks versehen war. Zunächst wurde die Formkulisse mit der darauf befestigten Membran mittels Vakuum zwischen Basis- und Gegenplatte fixiert.^[105, 149, 152, 153] Anschließend wurde das Formwerkzeug auf eine Temperatur von 147 °C aufgeheizt. Bei dieser Temperatur wird der Schmelzpunkt des Polycarbonats (PC) nicht erreicht, sodass die durch den Schwerionenbeschuss entstandenen latenten Ionenspuren erhalten blieben.^[150] Um die Kanäle mit einer Tiefe von 300 μm zu formen, wurde die Membran im nächsten Schritt mit einem einseitigen Druck von 4 bar mit Stickstoff behandelt. Nach dem anschließenden Abkühlen der Anlage auf 40 °C wurde das Formwerkzeug herausgeholt und die umgeformte Membran manuell entnommen. Zur Öffnung der latenten Ionenspuren wurden die Membranen einer Behandlung mit 5 N NaOH-Lösung unter Zusatz von 0,01% Dowfax™ unterzogen. Hierzu wurden die geformten Membranen in einen für den Vorgang hergestellten Rahmen eingelegt und unter Rühren bei 70 ± 2 °C für vier Stunden in der basischen Lösung geätzt. Die entnommenen Membranen wurden dreimal mit VE-Wasser gewaschen und anschließend für zwei Stunde bei 40 °C getrocknet.^[105]

Der Ablauf des Thermoformverfahrens von PC-Membranen nach SMART-Technologie ist in Abbildung 77 dargestellt.

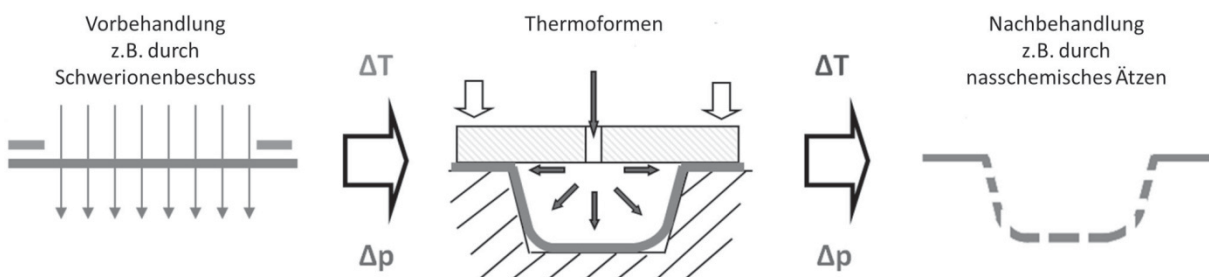


Abbildung 77: Dreistufiger Prozess der SMART-Technologie zur Herstellung des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors (modifiziert nach Giselbrecht et al., 2008).^[149]

Zur Kontrolle der Porenöffnung wurden Druckabfalltests durchgeführt. Hierzu wurden die Membranen im Thermoformwerkzeug auf den Druckabfall unter der Einwirkung von 1 MPa Gasdruck untersucht.^[105] Die genaue Porengröße wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (SUPRA 60 VP Mikroskop) von Carl Zeiss SMT, ausgestattet mit einem EDX-Detektor (XFlash 5010) der Firma Bruker, bestimmt.

Nach dem Freiätzen der Poren wurden die umgeformten PC-Membranen mit nicht porösen Membranen verschlossen. Dazu wurden die beiden Membranen in der Thermoformanlage bei 145 °C und 20 MPa zwei Minuten lang aufeinander gebondet. Die obere, nicht poröse Membran wurde zuvor außerdem mit zwei kleinen Öffnungen versehen, um den Anschluss an die Mikrofluidik zu ermöglichen. Zusätzlich wurden zwei weitere Öffnungen in die verbundenen Membranen 9,5 mm seitlich des PC-Mikrokanals gestanzt. Diese ermöglichten den Anschluss des unteren Kompartiments des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors an ein Pumpensystem. Nach der Fertigung der PC-Mikrokanäle wurden diese auf einen PMMA-Block mit Hilfe einer Klebefolie (VHBTM, ScotchTM) befestigt. Dabei wurden die vier eingefrästen Luer-Öffnungen im PMMA-Block direkt über die gestanzten Öffnungen in der Membran für den PC-Mikrokanal und das untere Kompartiment platziert. Das untere Kompartiment wurde aus einem auf der Membran befestigten hohlen Ring aus einer 500 μm dicken Klebefolie gebaut, der von unten mit einem Deckgläschen (\varnothing 34 mm) mit der Schichtdicke # 2 (0,19 – 0,23 mm) verschlossen wurde.^[105]

Der $\mu 3DVasc$ Bioreaktor ist im Europäischen Raum unter der Nummer EP 2679666 B1 patentiert und ist Teil einer geplanten Ausgründung.

6.2.2 Zellkultivierung

6.2.2.1 Beschichtung der Kultivierungsmaterialien

hCMEC/D3

Für die Kultivierung der hCMEC/D3 wurde eine T75 Zellkulturflasche mit 5 ml 0,1 mg/ml Kollagen in ddH₂O für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ beschichtet. Anschließend wurde die Zellkulturflasche zweimal mit HBSS-P gespült.

Leber-Stammzellen

Für die Kultivierung der Mischzellkultur bzw. der isolierten DLK⁺ Hepatoblasten wurde eine 6 Well Zellkulturplatte mit 0,1% Gelatine (in 1× PBS^{-/-}) beschichtet. Dazu wurde jedes Well mit 5 ml Lösung befüllt und bei RT mindestens 30 Minuten inkubiert. Für die Kultivierung der HPPL-Zellen wurde eine 55 cm² große Petrischale mit 5 ml Laminin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 1× PBS^{-/-}) überschichtet und ebenso für mindestens 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Laminin für die Wiederverwendung gesammelt. Die 6 Well Zellkulturplatte und die Petrischale wurden dreimal mit 1× PBS^{-/-} gewaschen.

6.2.2.2 Passagieren der Zellen

Adhärente Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte im Stickstofftank bei -196 °C. Nach dem Auftauen der Zellen erfolgte frühestens nach drei Stunden, spätestens am nächsten Tag ein Mediumwechsel. Beim Erreichen von



90% Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden sie zweimal mit $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,25% hCMEC-D3-, Caco-2 Zellen und humane Fibroblasten, 0,125% HUVEC und hPC-PL, 0,05% HA) vom Boden der Zellkulturschale oder -flasche abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit dem doppelten Volumen an Trypsininhibitor abgestoppt. Bei Bedarf wurde die Zellkulturschale/-flasche mehrmals mit zellspezifischem Medium abgespült, um die restlichen Zellen zu sammeln. Anschließend erfolgte der Zentrifugationsschritt drei Minuten bei 1200 rpm. Als Nächstes wurde das Zellpellet im benötigten Volumen Medium resuspendiert und auf die Zellkulturschalen/-flaschen aufgeteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte mit einem Einfriermedium zunächst in einer „Mister-Frosty“-Box bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, woraufhin die Zellen nach einem Tag in den Stickstofftank überführt wurden.

Suspensionszellen

Die Lagerung der THP-1 Zellen und der Einfrierprozess erfolgten analog zu den adhären Zellen. Nach dem Auftauen der THP-1 Zellen erfolgte nach 24 Stunden ein Mediumwechsel. Beim Erreichen einer Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden sie einmal mit $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ bei 1200 rpm für 3 Minuten gewaschen und ins frische zellspezifische Medium in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche aufgenommen.

6.2.3 Handhabung des mikrofluidischen $\mu 3\text{DVasc}$ Bioreaktors

Vor dem Gebrauch wurde der mikrofluidische $\mu 3\text{DVasc}$ Bioreaktor in der γ -Strahlungsquelle über Nacht sterilisiert. Nach dem Abschluss der Experimente wurden die verwendeten $\mu 3\text{DVasc}$ Bioreaktoren mit 70% Isopropanol gespült. Daraufhin wurden sie zur Wiederverwendung umgebaut. Die Mediumreservoirs mit den verbundenen Schläuchen und Sterilfiltern wurden ebenfalls mit 70% Isopropanol gespült, mit N_2 getrocknet und in die γ -Strahlungsquelle gegeben. Dies ermöglichte ihre Wiederverwendung bei den weiteren Versuchen.

6.2.3.1 Beschichtung des PC-Mikrokanals

Für das Anhaften der Zellen wurde der poröse PC-Mikrokanal (20 mm Länge, 1 mm Breite und $300\text{ }\mu\text{m}$ Tiefe, 10^6 Poren/ cm^2) mit Fibronectin (0,9 mg/ml) beschichtet. Dabei wurden $45\text{ }\mu\text{l}$ Fibronectin-Stocklösung (1 mg/ml) mit $5\text{ }\mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ gemischt und in den PC-Mikrokanal pipettiert, woraufhin der $\mu 3\text{DVasc}$ Bioreaktor vier Stunden bei RT inkubiert wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der PC-Mikrokanal zweimal mit jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ und danach mit Medium durchgespült. Um das Austrocknen des PC-Mikrokanals zu vermeiden, wurden die Anschlüsse mit Medium gefüllt. Die Inkubation erfolgte bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 über Nacht im Brutschrank.

Die Beschichtung der Mikrokanäle für die Kultivierung von hCMEC/D3-Zellen erfolgte mit Kollagen (0,1 mg/ml) in ddH₂O wie oben beschrieben. Die Inkubationszeit wurde auf eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 verkürzt.

6.2.3.2 Beschichtung des unteren Kompartiments

Für die Beschichtung des unteren Kompartiments wurde Kollagen (0,6 mg/ml in $1 \times \text{PBS}^{-/-}$) herangezogen. Dafür wurden unter Vermeidung von Luftblasen $500\text{ }\mu\text{l}$ vorsichtig in das untere Kompartiment pipettiert. Die Inkubation vollzog sich für eine Stunde bei RT. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten zwei aufeinanderfolgende Waschschrte mit jeweils $500\text{ }\mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ bzw. Medium woraufhin die Anschlüsse mit EGM-2 gefüllt wurden. Die Inkubation vollzog sich bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 5% CO_2 über Nacht im Brutschrank.

Im Fall der Caco-2-Zellen wurde Kollagen (50 µg/ml) zusammen mit Matrigel (300 µg/ml) im serumfreien DMEM verdünnt. Die Inkubation vollzog sich für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂. Die anschließenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

Bei der Etablierung des Lebermodells wurde das untere Kompartiment mit 500 µl Laminin (10 µg/ml in 1× PBS^{-/-}) für eine Stunde bei 37 °C und 5% CO₂ beschichtet. Das Aussäen der Zellen erfolgte ohne vorherige Waschschriffe.

6.2.3.3 Einbringen der Endothelzellen in den PC-Mikrokanal

Für die Auskleidung des porösen PC-Mikrokanals im mikrofluidischen *µ3DVasc* Bioreaktor wurden 5×10^6 HUVEC (Passage 3 bis 8) bzw. hCMEC/D3 (Passage 32 bis 35) pro ml Medium eingesetzt. Falls die Zellen in Kokultur mit den Zellen der BBB kultiviert wurden, erfolgte die Inokulation einen Tag nach der Besiedlung des unteren Kompartiments mit den hPC-PL. Als Erstes wurde der PC-Mikrokanal mit zellspezifischem Endothel-Kultivierungsmedium gespült. Im Anschluss daran wurde der PC-Mikrokanal von Mediumresten geleert, um das Einbringen der Zellsuspension zu vollziehen. Um eine vollständige Auskleidung des PC-Mikrokanals zu ermöglichen, wurden sowohl der Boden, als auch die Seitenwände und die Decke des PC-Mikrokanals mit den Zellen behandelt. Die Behandlung des Bodens bestand aus zwei aufeinanderfolgenden gleichen Behandlungsschritten: Es wurden jeweils 50 µl der Zellsuspension in den PC-Mikrokanal pipettiert, die überschüssige Lösung auf der anderen Seite abgenommen und der *µ3DVasc* Bioreaktor nach jeder Injektion zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die beiden Seitenwände jeweils einmal nach dem gleichen Prinzip behandelt, wobei die Inkubation des *µ3DVasc* Bioreaktors im Brutschrank in einem 90° Winkel erfolgte. Als Nächstes wurde eine Behandlung der Decke unternommen. Um den Zellen eine Regenerationszeit zu ermöglichen, wurde der *µ3DVasc* Bioreaktor anschließend drei Stunden statisch im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser drei Stunden erfolgte der Anschluss des *µ3DVasc* Bioreaktors an die ibidi®-Pumpe mit Mediumreservoir (HUVEC) bzw. an das Pumpensystem Fusion 200 Chemyx (hCMEC/D3).

ibidi®-Pumpe: Die Schläuche wurden mit den Anschlüssen des PC-Mikrokanals luftblasenfrei verbunden. Es erfolgte eine weitere Inkubationsstunde im Brutschrank unter statischen Bedingungen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Druck für eine Stunde auf -5 mbar (8,54 dyn/cm²) eingestellt, so dass das Medium mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 150 µl/min durch den PC-Mikrokanal gepumpt wurde, um das Ablösen und Wegspülen der Zellen aus dem PC-Mikrokanal zu vermeiden. Als Nächstes wurde der Druck auf -8 mbar (13,8 dyn/cm²) erhöht, was einer Fließgeschwindigkeit von etwa 200 µl/min entsprach. Nach einer weiteren Stunde wurde der Druck von -12 mbar (20,92 dyn/cm², 250 µl/min) eingestellt und unter diesen Bedingungen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Erhöhung des Drucks auf -14 mbar (350 µl/min, 24,55 dyn/cm²) und -16 mbar (450 µl/min, 27,75 dyn/cm²) unternommen. Der Mediumwechsel in den Spritzen erfolgte jeden zweiten Tag.

Pumpensystem Fusion 200 Chemyx: Die Schläuche wurden mit den Anschlüssen des PC-Mikrokanals luftblasenfrei verbunden, so dass ein Anschluss des Bioreaktors mit einer 3 ml (Ø 8,33 cm) Spritze verbunden war und der zweite Anschluss in einen Abfallbehälter führte. Dabei wurde die Flussgeschwindigkeit auf 0,1 ml/h und die Pumpe auf den „Infusion“-Modus eingestellt. 72 Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das Kultivierungsmedium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht wurde. Der Wechsel des Differenzierungsmediums in den Spritzen erfolgte jeden zweiten Tag



6.2.3.4 Einbringen der Zellen in das untere Kompartiment

hPC-PL und HA

Für die Kultivierung der hPC-PL auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im unteren Kompartiment wurden 5×10^5 Zellen (Passage 3 bis 8) im zellspezifischen Endothel-Kultivierungsmedium (500 μ l) in das untere Kompartiment überführt. Für die anschließende Inkubation unter statischen Bedingungen über Nacht im Brutschrank wurde der Bioreaktor um 180° gedreht, um das Anwachsen der Zellen auf der Rückseite des PC-Mikrokanals zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde das untere Kompartiment mit Medium gespült und wieder in die aufrechte Position gebracht. Für die Kultivierung der HA auf der Rückseite des porösen PC-Mikrokanals im unteren Kompartiment wurden 5×10^5 Zellen (Passage 3 bis 8) im zellspezifischen Endothel-Kultivierungsmedium in das untere Kompartiment überführt. Die Inokulation des μ 3D V asc Bioreaktors mit den HA erfolgte vier Tage nach dem Beimpfen mit den hPC-PL. Für die anschließende Inkubation unter statischen Bedingungen über drei Stunden im Brutschrank wurde der μ 3D V asc Bioreaktor um 180° gedreht, um das Anwachsen der Zellen auf der hPC-PL-Zellschicht zu gewährleisten. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das untere Kompartiment mit dem Endothel-Kultivierungsmedium gespült und in die aufrechte Position gebracht. Der Mediumwechsel in dem unteren Kompartiment erfolgte jeden zweiten Tag.

Caco-2 Zellen

Für die Kultivierung der Caco-2 Zellen auf der Rückseite des PC-Mikrokanals wurden $3,6 \times 10^5$ Zellen in EGM-2 am dritten Tag nach dem Beimpfen des PC-Mikrokanals mit den HUVEC in das untere Kompartiment überführt. Die anschließenden Schritte erfolgten wie bei den HA oben beschrieben.

HPPL-Zellen

Zur Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen wurden 5×10^5 Zellen in das untere Kompartiment im Kultivierungsmedium ausgesät. Als Nächstes wurde der μ 3D V asc Bioreaktor um 180° gedreht und unter diesen Bedingungen 48 Stunden im Brutschrank gehalten, um das Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der μ 3D V asc Bioreaktor in die aufrechte Position gebracht. Daraufhin wurden die Zellen mit $1 \times \text{PBS}^{-/}$ gewaschen und das Kultivierungsmedium gegen das Differenzierungsmedium mit OSM (20 ng/ml) ausgetauscht. Sieben Tage nach dem Experimentstart erfolgte die Überschichtung mit dem Matrigel (0,73 mg/ml im Differenzierungsmedium plus 5 ng/ml HGF). Zwei Tage später wurden HUVEC in den PC-Mikrokanal ausgesät und der μ 3D V asc Bioreaktor an das Pumpensystem Fusion 200 Chemyx angeschlossen (6.2.3.3).

6.2.4 Visualisierung von Zellen

6.2.4.1 Vitale Zellen

Visualisierung der Zellkerne und des Zytoplasmas

Zur Visualisierung lebender Zellen wurde Hoechst 33342 (2 μ g/ml, gelöst im frischen Kultivierungsmedium) zur Markierung der Zellkerne verwendet. Dafür wurden die Zellen mit dem Reagenz für 15 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 behandelt, anschließend mit $1 \times \text{PBS}^{-/}$ gewaschen und mikroskopiert. Des Weiteren wurden CellTracker™ Green und CellTracker™ Red zur Markierung des

Zytosols benutzt. Hierzu wurden die Zellen 15 Minuten mit 10 μM Reagenz im Brutschrank angefärbt und im Anschluss mit $1\times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen.

Visualisierung der Tight Junctions in HUVEC

Um die Konfluenz der HUVEC im porösen PC-Mikrokanal zu überprüfen, sollte PECAM-1 in den Tight Junctions visualisiert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit $1\times \text{PBS}^{-/-}$ gespült. Der monoklonale Maus-anti-human-FITC-PECAM-1-Antikörper wurde in 2 ml frischem EGM-2 gelöst (1:300) und für 16 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 unter fluidischen Bedingungen (-18 mbar, 30,95 dyn/cm^2 , 400 $\mu\text{l}/\text{min}$) im $\mu\text{3D}V\text{asc}$ Bioreaktor inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit $1\times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen und mikroskopiert.

Visualisierung der HPPL-Zellen

Die Transduktion von HPPL-Zellen erfolgte acht Tage nach dem Aussäen der Zellen im $\mu\text{3D}V\text{asc}$ Bioreaktor mit AAV-DJ-YFP, welche von AG Dirk Grimm (Universität Heidelberg) bereitgestellt wurden.^[279] Hierzu wurden die AAVs über den PC-Mikrokanal appliziert. Die Behandlung fand unter statischen Bedingungen für acht Stunden statt. Dabei wurden nach Ablauf der ersten vier Stunden erneut AAVs hinzugefügt. Abschließend wurde der $\mu\text{3D}V\text{asc}$ Bioreaktor an das Pumpensystem Fusion 200 Chemyx angeschlossen und über Nacht unter fluidischen Bedingungen (0,1 ml/h) inkubiert, um die AAVs aus dem PC-Mikrokanal zu entfernen. Hierzu wurde das Kultivierungsmedium für HPPL-Zellen mit Zusätzen benutzt.

6.2.4.2 Fixierte Zellen

Zur Visualisierung der Proteinexpression, wurden die Zellen zunächst mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ gewaschen, woraufhin sie mit 4% PFA, gelöst in $1\times \text{PBS}^{+/+}$, bei RT fixiert wurden. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ wurden die Zellen mit 0,5% Triton-X für zwei bis vier Minuten behandelt. Als Nächstes wurden die Zellen erneut zweimal mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ gewaschen und für zehn bis 30 Minuten mit CasBlock™ zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen behandelt. Der Primärantikörper wurde in CasBlock™ verdünnt (s. 6.1) und auf die Zellen für zwei Stunden bei RT gegeben. Im Fall der BBB dauerte die Inkubation 24 Stunden bei 4 °C. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen zweimal mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ gewaschen, woraufhin der entsprechende Sekundärantikörper (1:500 in CasBlock™ verdünnt) zu den Zellen gegeben wurde. Die Inkubation wurde bei RT eine Stunde lang oder bei den Zellen der BBB 24 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Nach zwei Waschschritten mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ wurden Phalloidin (20 Units/ml) zur Markierung von Aktinfilamenten und Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu Markierung der Zellkerne in $1\times \text{PBS}^{-/-}$ verdünnt und für 30 Minuten auf den Zellen inkubiert. Anschließend wurden sowohl der PC-Mikrokanal, als auch das untere Kompartiment mehrmals mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ gespült, um das Hintergrundsignal zu beseitigen.

6.2.5 EdU Nachweis

Um die Proliferationsfähigkeit der Zellen im $\mu\text{3D}V\text{asc}$ Bioreaktor nachzuweisen, wurden 24 Stunden (HUVEC) bzw. 48 Stunden (hPC-PL und HA) vor dem Ende des Experiments 2 ml des EdU-Reagenzes (10 μM), gelöst in EGM-2, in die Mediumreservoirs (1 ml pro Spritze) hinzugegeben. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte ein Waschschriff mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$, woraufhin die Zellen mit 4% PFA, gelöst in $1\times \text{PBS}^{+/+}$, für 15 Minuten auf Eis fixiert wurden. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschriffen mit $1\times \text{PBS}^{+/+}$ und



einem Waschschrift mit 1% BSA wurden die Zellen mit 0,5% Triton-X für 20 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit $1 \times \text{PBS}^{+/+}$ gewaschen. Als Nächstes wurde der Replikationstest nach Angaben des Herstellers durchgeführt.^[164]

Parallel zu den Experimenten im $\mu 3D\text{Vasc}$ Bioreaktor wurden 1×10^4 hPC-PL und HA pro cm^2 einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte in EGM-2 ausgesät und den Inkubationszeiten in den Bioreaktoren entsprechend inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach dem oben aufgeführten Protokoll.

6.2.6 Adhäsion und Migration von Blutzellen

Zur Untersuchung der Adhäsion und Migration der THP-1 Zellen im fluidischen PC-Mikrokanal wurden die HUVEC am fünften Tag für vier Stunden mit TNF- α (25 ng/ml in EGM-2) behandelt. Dabei wurden 30 ng TNF- α in 1,2 ml EGM-2 gelöst und auf zwei Mediumreservoirire aufgeteilt. Die THP-1 Zellen (Passage 3) wurden zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 behandelt, in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/2 ml in EGM-2 suspendiert und in die Mediumreservoirire überführt. Zusätzlich wurde in die untere Kammer MCP-1 (500 ng/ml in EGM-2) vorgelegt. Die Inkubation erfolgte 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 unter fluidischen Bedingungen (-18 mbar, $30,95 \text{ dyn/cm}^2$, $400 \mu\text{l/min}$). Die Mikroskopie wurde vier bzw. 24 Stunden nach Zugabe der THP-1 Zellen durchgeführt.

6.2.7 Permeabilitätsassay

6.2.7.1 Standardkurven

Zur Aufstellung von Standardkurven wurde $10 \mu\text{g/ml}$ 3 kDa Dextran-FITC-Lösung verwendet. Dafür wurden zwei Verdünnungsreihen aufgestellt und die Fluoreszenzintensität einzelner Verdünnungen mit dem SpectraMax Microplate Reader gemessen.

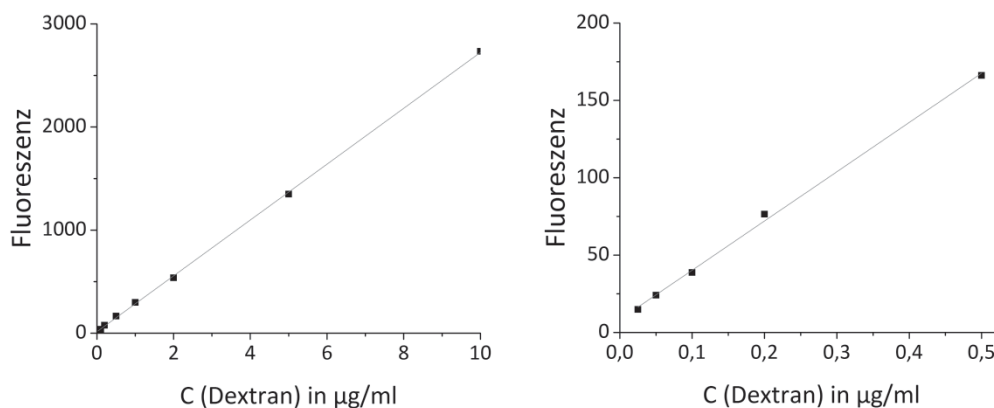


Abbildung 78: Standardkurve des 3 kDa Dextran-FITCs. Die Fluoreszenzintensitäten der Dextran-FITC-Verdünnungsreihen wurden mit einem SpectraMax Microplate Reader gemessen.

6.2.7.2 Widerstandseinheiten

Die Widerstandseinheiten „100 $\mu\text{l/h}$ “, „1 ml/h“ und „2 ml/h“ wurden vom Wyss Institut an der Harvard Universität zur Verfügung gestellt. Um das geeignete Set an Widerstandseinheiten für den Permeabilitätsassay im $\mu 3D\text{Vasc}$ Bioreaktor zu bestimmen, wurden diese jeweils an eine mit ddH_2O



gefüllte 10 ml Spritze angeschlossen. Anschließend wurden die Spritzen in eine vertikale Lage 25 cm über der Arbeitsfläche gebracht. Das ausfließende Medium wurde einmal stündlich gesammelt und abgewogen. Es wurde im Falle vom EGM-2 von einer Wasserdichte von 1 kg/l ausgegangen.

Um die Wirkung der Widerstandseinheiten auf den Permeabilitätsassay im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor festzustellen, wurde der Tracer Flux Assay mit 3 kDa Dextran mit und ohne Widerstandseinheiten durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in 6.2.7.5 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Tygon® Schläuche von den Auslässen direkt mit den Sammelbehältern verbunden waren.

6.2.7.3 Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen

Die Beschichtung mit EZM sowie die Inkubationszeiten erfolgten in Transwell-Systemen ($5 \mu\text{m}$ Porengröße, 4×10^5 Poren/ cm^2) analog zu den Experimenten mit dem $\mu 3DVasc$ Bioreaktor. Es wurden 3×10^4 HUVEC in $100 \mu\text{l}$ EGM-2 pro Well auf die apikale Membranseite ausplattiert. Anschließend wurden die Transwell-Systeme für drei Tage im Brutschrank inkubiert, woraufhin der Permeabilitätsassay mit 3 kDa Dextran-FITC durchgeführt wurde. Hierzu wurde das EGM-2 in der apikalen Kammer gegen das 3 kDa Dextran-FITC ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) enthaltende EGM-2 ausgetauscht. Nach Ablauf der 15 Minuten wurden jeweils $50 \mu\text{l}$ Probe aus dem unteren Kompartiment entnommen und gegen $50 \mu\text{l}$ frisches EGM-2 ausgetauscht. Es wurden acht Proben innerhalb von 2 Stunden gesammelt.

6.2.7.4 Einfluss der Beschichtung

Die PC-Membranen einer 8 Well-Transwellkammer wurden mit Fibronectin ($0,9 \text{ mg}/\text{ml}$) auf der oberen Seite und entweder mit Hyaluronsäure ($3,5 \text{ mg}/\text{ml}$), Kollagen ($0,6 \text{ mg}/\text{ml}$), Kollagen ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)/ Matrigel ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) oder Matrigel ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) auf der Rückseite beschichtet. Die Inkubationsschritte erfolgten analog zum $\mu 3DVasc$ Bioreaktor (6.2.3.2). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells mit $1 \times \text{PBS}^{-/}$ gewaschen und über Nacht im EGM-2 bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ gelagert. Die verbliebenen, unbeschichteten Wells wurden ebenfalls mit EGM-2 befüllt. Abschließend wurde der Permeabilitätsassay mit 3 kDa Dextran-FITC durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in 6.2.7.3 beschrieben.

6.2.7.5 Permeabilitätsassay im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor

Die volumetrische Flussrate wurde auf $1 \text{ ml}/\text{h}$ eingestellt. Es wurden $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 3 kDa Dextran-FITC für die HUVEC-enthaltenden $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren verwendet. Dafür wurde die Stocklösung des 3 kDa Dextran-FITCs in EGM-2 verdünnt und in 5 ml Spritzen überführt. Es wurde jeweils eine Spritze mit Hilfe eines Tygon® Schlauchs mit einem Einlass des fluidischen PC-Mikrokanals und des unteren Kompartiments verknüpft. Die mit Auslass verbundenen Schläuche ermöglichten das Auffangen der ausfließenden Flüssigkeit. Zwischen die Auslässe und die Sammelbehälter wurden außerdem jeweils zwei Widerstandseinheiten geschaltet, um die Druckunterschiede zwischen den beiden Kompartimenten auszugleichen. Die Proben aus den beiden Kompartimenten wurden alle 30 Minuten innerhalb der drei Stunden gesammelt und die Fluoreszenzintensität mit dem SpectraMax Microplate Reader gemessen.



6.2.8 Versorgung des unteren Kompartiments

Die Herstellung der Fibringele wurde nach Nakatsu et. al (2007) durchgeführt.^[192] Allerdings wurde eine doppelte Konzentration an Fibrinogen (4 mg/ml) benutzt, da das in 1× PBS^{-/-} gelöste Fibrinogen anschließend steril filtriert und durch die Zellen verdünnt wurde. Zur Herstellung des Fibringels wurde das Fibrinogen (4 mg/ml) abgewogen, in 600 µl 1× PBS^{-/-} gelöst, steril filtriert und im Wasserbad so lange erhitzt, bis sich der Feststoff in 1× PBS^{-/-} zu ca. 70% gelöst hat. Um den Abbau von Fibringelen zu vermeiden, wurde Aprotinin (0,15 Units/ml) dazugegeben. Die Verwendung von 10 µg/cm² Kollagen hatte eine bessere Vernetzung der Zellen im Gel zum Zweck. Die Fibroblasten wurden mit Hoechst 33342 (2 µg/ml) zur Visualisierung der Zellkerne gefärbt, trypsinisiert, abzentrifugiert und in 100 µl EGM-2 gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit der Fibrinlösung zu einem Gesamtvolumen von 500 µl vermischt (1:4 Verdünnung). Die Polymerisation des Fibrinogens wurde mit Hilfe des Thrombins (0,625 Units/ml) vollzogen. Unverzöglich danach erfolgte das Einbringen des Fibringels in das untere Kompartiment des µ3D_{Vasc} Bioreaktors. Die Versorgung der Zellen mit frischem Medium fand über den porösen PC-Mikrokanal statt, der mit einer Flussgeschwindigkeit von 150 µl/min durchströmt wurde. Zur Untersuchung der Versorgung der 3D-Kultur im Fibringel wurde der Farbstoff CellTrackerTM Green (20 µM) in EGM-2 zur Markierung des Zytoplasmas in den PC-Mikrokanal gegeben. Anschließend fand der Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Durch die Diffusion des Farbstoffs durch den porösen PC-Mikrokanal und die HUVEC ins Fibringel wurden Rückschlüsse auf die Versorgung der 3D-Zellkultur gezogen.

6.2.9 Etablierung der Kokultur aus Perizyten und Astrozyten

Zur Etablierung einer Kokultur aus hPC-PL und HA, wurden 5 × 10³ mit CellTrackerTM Green (10 µM) markierte hPC-PL im hPC-PL-Medium in einer µ-Slide 8 Well ibiTreat-Platte im zellspezifischen Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der Mediumwechsel, wobei die Zellen ab diesem Zeitpunkt in EGM-2 kultiviert wurden. Am sechsten Tag wurden 1 × 10⁴ mit CellTrackerTM Red (10 µM) markierte HA entweder direkt auf hPC-PL-Zelllayer oder auf einen Matrigel, der die hPC-PL bedeckte, ausgesät. Um die hPC-PL mit Matrigel zu beschichten, wurde ein Gemisch aus Kollagen (50 µg/ml) und Matrigel (300 µg/ml) im EGM-2 hergestellt, woraufhin 240 µl des Gemisches vorsichtig in jedes Well der µ-Slide 8 Well ibiTreat-Platte pipettiert wurden. Die Inkubation vollzog sich für zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO₂, woraufhin die Wells mit 1× PBS^{-/-} gewaschen und mit frischem EGM-2 gefüllt wurden.

6.2.10 Präparation des Astrozyten-konditionierten Mediums

Für die Präparation des konditionierten Mediums wurde das EGM-2 für insgesamt 14 Tage auf die konfluenten HA (Passage 6) gegeben. Jeden dritten Tag wurde der Mediumüberstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen an frischem EGM-2 verdünnt. Anschließend wurden die HA in frischem EGM-2 weiterkultiviert.

6.2.10.1 Untersuchung der Expression von Tight Junctions

HUVEC (Passage 5, 1,6 × 10⁴ Zellen/Well) wurden im ECM-2 oder EGM-2 in einer µ-Slide 8 Well ibiTreat-Platte für fünf Tage kultiviert. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden die Proteine Claudin-5, PECAM-1 und Vinculin immunhistochemisch visualisiert. Das Protokoll hierzu ist in Abschnitt 6.2.4.2 dokumentiert. Die 10% hellsten Pixel des FITC-



Signals wurden aus 30 Mikroskopieaufnahmen, welche aus vier Wells stammten, pro untersuchtem Protein quantifiziert.

6.2.10.2 Wachstumskurven

Für die Wachstumskurven wurden 2×10^4 HUVEC, hPC-PL und HA in jeweils 15 Wells einer 24 Well-Zellkulturplatte in 1 ml des zu untersuchenden Mediums ausgesät und bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert, bis die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht hatten. Anschließend wurden jeden Tag die Zellen aus jeweils drei Wells zunächst einmal mit 500 µl 1× PBS^{-/-} gewaschen und dann mit 1 ml 0,25% Trypsin/EDTA von der Oberfläche gelöst. Als Nächstes wurden die Zellen mit 0,4% Trypanblau (1:1 in Medium gelöst) behandelt, um den Anteil an toten Zellen zu bestimmen, und anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer gezählt. Für das Erstellen der Wachstumskurve wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt. Nach 48 Stunden erfolgte ein Medienwechsel in den verbliebenen Wells.

6.2.11 XTT Nachweis

Um die metabolische Aktivität der Perizyten und Astrozyten im unteren Kompartiment des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors zu untersuchen, wurde ein XTT Nachweis durchgeführt.^[210] Als Erstes wurde das untere Kompartiment mit Hilfe einer Spritze geleert. Anschließend wurde das Reaktionsreagenz 1:2 mit EGM-2 vermischt, wovon 400 µl des Gemisches in das untere Kompartiment überführt wurden. Die Inkubation vollzog sich fünf Stunden bei 37 °C und 5% CO₂. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit aus dem unteren Kompartiment gesammelt und die Absorption mit dem SpectraMax Microplate Reader gemessen. Dabei wurde die Probe bei den Wellenlängen 450 nm – 500 nm untersucht. Die Kontrolle, die aus einem 1:2 Gemisch aus dem Reaktionsreagenz und dem EGM-2 bestand, wurde ebenfalls fünf Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend bei den Wellenlängen 630 nm – 690 nm mit dem SpectraMax Microplate Reader analysiert. Der Mittelwert der gemessenen Kontrollwerte wurde vom Mittelwert der gemessenen Probenwerte abgezogen. Abschließend wurden beide Kompartimente des $\mu 3DVasc$ Bioreaktors mit 1× PBS^{-/-} gewaschen, mit EGM-2 gefüllt und der PC-Mikrokanal wieder an die Mikrofluidik angeschlossen. Die Auswertung erfolgte in Duplikaten.

Parallel zu den Experimenten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor wurden 1×10^4 hPC-PL und HA pro cm² einer 24 Well-Platte im EGM-2 ausgesät und den Inkubationszeiten in Bioreaktoren entsprechend inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach oben aufgeführtem Protokoll.

6.2.12 Lebend/tot-Nachweis

Am Tag 20 wurden die HUVEC, hPC-PL und HA im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor mit Calcein-AM und PI (jeweils 1 µM) zur Durchführung des lebend/tot-Nachweises behandelt. Dafür wurden die Substanzen in EGM-2 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer anschließenden Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen gewaschen und mikroskopisch untersucht.

Parallel dazu wurden 1×10^4 hPC-PL und HA pro cm² einer 24 Well-Platte im EGM-2 ausgesät und den Inkubationszeiten in Bioreaktoren entsprechend inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach oben aufgeführtem Protokoll.

6.2.13 Nachweis der Hypoxie

Für den Test auf Pimonidazol-Addukte wurden die HUVEC, hPC-PL und HA mit HydroxyprobeTM-1 (20 mM) behandelt. Dafür wurde das Reagenz in 2,5 ml EGM-2 gelöst, woraufhin je 1 ml in die Mediumreservoirs und die restlichen 500 µl in das untere Kompartiment pipettiert wurden. Die Inkubation dauerte 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und visualisiert (6.2.4).

6.2.14 P-gp Transport Assay

Als Erstes wurden die hCMEC/D3, hPC-PL und HA mit HBSS-P gewaschen. Anschließend erfolgte eine Vorinkubation des Proben-Bioreaktors mit Verapamil (100 µg/ml in HBSS-P) für 30 Minuten bei 37 °C unter statischen Bedingungen. Im nächsten Schritt wurde die Calcein AM-Lösung (1 µg/ml in HBSS-P) zusammen mit Verapamil (100 µg/ml in HBSS-P) im Proben-Bioreaktor sowie ausschließlich Calcein AM-Lösung (1 µg/ml in HBSS-P) im Kontroll-Bioreaktor für 30 Minuten bei 37°C statisch inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein mikroskopischer Nachweis durchgeführt.

6.2.15 REM

Mit Hilfe des REM wurden die PC-Mikrokanalstrukturen nach Überziehen mit einer Silberschicht mikroskopiert.

6.2.16 Isolierung der fetalen, murinen Leberzellen

Die Isolierung der fetalen Maus-Leber erfolgte im E14.5 Stadium, nachdem das Tier (C57BL/6 Maus, Nihon SLC, Japan) durch zervikale Dislokation geopfert wurde. Zwischenlagerung der isolierten Lebern erfolgte in 1× PBS^{-/-} (Abbildung 79).

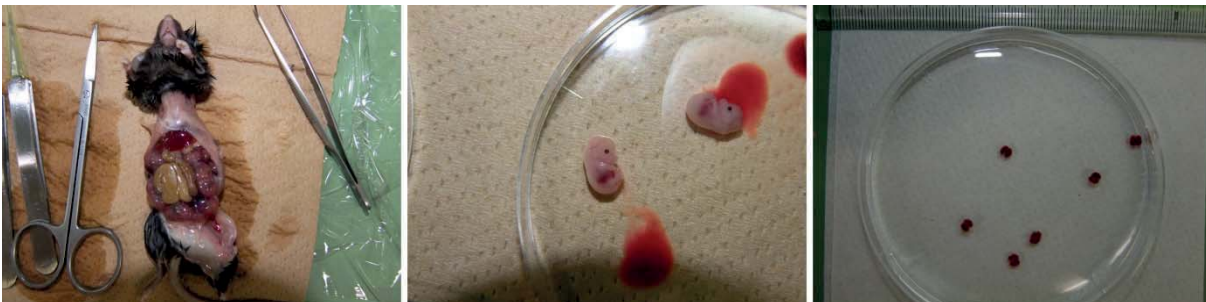


Abbildung 79: Präparation der murinen fetalen Leber (E14.5) zur anschließenden Zellisolierung und Sortierung mit Zellsortierer.

Die anschließenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Erstes wurden die Lebern in eine neue sterile Petrischale mit 12 ml vorgewärmtem Perfusionsmedium überführt und in ca. 1 mm große Stücke zerteilt. Die zerkleinerten Lebern wurden zusammen mit dem Perfusionsmedium mittels einer Plastikpipette in ein Falcon Röhrchen überführt und für sieben Minuten im Wasserbad inkubiert. Als Nächstes erfolgte ein Zentrifugationsschritt für drei Minuten bei 800 rpm, woraufhin der Überstand abgesaugt, 12 ml vorgewärmte Kollagenase/Dispase Lösung hinzugegeben und die Lebern 15 Minuten im Wasserbad erneut inkubiert wurden. Dabei wurde das Falcon-Röhrchen jede fünf Minuten rotiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lebergewebe zur Gewinnung von einzelnen Zellen

durch einen Filter (70 μm Porengröße) passiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 1200 rpm, 4 °C) bestand das Pellet sowohl aus roten Erythrozyten, als auch aus weißen Leberzellen. Um die Erythrozyten zu beseitigen, wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 7 ml Hämolyse Puffer resuspendiert. Die Inkubation vollzog sich sieben Minuten auf Eis. Danach wurden die Zellen drei Minuten bei 1200 rpm und RT zentrifugiert und in 10 ml Kultivierungsmedium für isolierte Hepatoblasten resuspendiert. Um die Reste aus extrazellulärer Matrix bzw. Bindegewebsfasern (Kollagen Typ III) zu beseitigen, wurde die Zellsuspension erneut durch einen Filter (Porengröße 70 μm) passiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt. Die isolierten Hepatoblasten besitzen eine undefinierte Zellform, sind durch kleine Bläschen im Zellinneren gekennzeichnet und bilden in der Regel Zellaggregate, wodurch sie von anderen Zellen unterschieden werden konnten. Der Anteil an Hepatoblasten machte ca. 10% der Gesamtzellzahl aus (Abbildung 80).

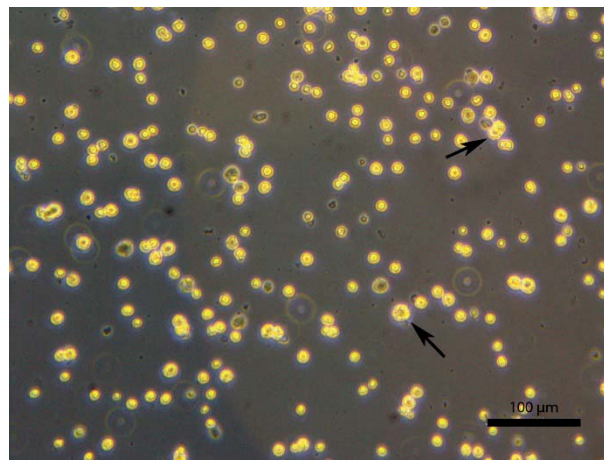


Abbildung 80: Isolierte Zellen aus murinen, fetalen Lebern (E14.5). Hepatoblasten sind mit Pfeilen markiert und bilden ca. 10% der Gesamtzellzahl. Maßstab = 100 μm

Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension aufgeteilt: Ein Teil wurde für die Kultivierung und der andere Teil für die Isolierung der DLK^+ Zellen und die anschließende Kultivierung der HPPL-Zellen verwendet. Die beiden Fraktionen wurden zuerst bei 1200 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Fraktion mit nicht isolierter Zellsuspension wurde abgesaugt, woraufhin die Zellen in 4 ml DMEM aufgenommen und auf zwei Wells (6×10^5 Hepatoblasten/Well) einer 6 Well-Zellkulturplatte aufgeteilt wurden. Dabei wurden zu jedem Well $1 \times \text{ITS}$, $0,1 \mu\text{M}$ Dexamethason und zu nur einem Well OSM (10 ng/ml) hinzugegeben, um die Ausdifferenzierung in Hepatozyten zu begünstigen. Die andere Fraktion wurde für die anschließende Isolierung der DLK^+ Zellen genutzt.

Kultivierung der isolierten Leber-Mischzellkultur

Um die Blutzellen aus der nicht aufgetrennten Zellkultur zu beseitigen, erfolgte dreieinhalb Stunden nach der Zellaussaat ein Mediumwechsel. Dafür wurden die Wells viermal mit je 5 ml $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen, woraufhin das frische Kultivierungsmedium plus $1 \times \text{ITS}$, $0,1 \mu\text{M}$ Dexamethason auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen, die vor dem Mediumwechsel mit OSM kultiviert wurden, wurden erneut mit 10 ng/ml OSM behandelt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden bis eine vollständige Konfluenz erreicht wurde.



6.2.16.1 Isolierung der DLK⁺ Hepatoblasten

Um die Fc- γ -Rezeptoren zu blockieren, wurde ein Fc γ receptor III mAb (5 μ g/ml), gelöst in 500 μ l DMEM, zum Zellpellet gegeben und auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Die Probe wurde mit dem monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper (5 μ g/ml) für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein anti-rat IgG_{2A} FITC- Antikörper (5 μ g/ml) angewandt. Dazu wurden 10 μ l der Zellsuspension mit 90 μ l frischem DMEM vermischt, woraufhin der Antikörper hinzugegeben und die Probe für 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert (drei Minuten, 1200 rpm, 4 °C), mit 20 \times Volumen an kaltem 1 \times PBS^{-/-} gewaschen, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 3% FBS in 1 \times PBS^{-/-} Lösung (2 ml bei der Negativkontrolle und 10 ml bei der Probe) resuspendiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellkonzentration 1 \times 10⁷ Zellen/ml nicht überschreitet.

6.2.16.2 Generierung von HPPL-Zellen aus DLK⁺ Hepatoblasten

Als Erstes wurden 1,1 \times 10⁴ DLK⁺ Hepatoblasten mittels Zell-Sortiereinrichtung gewonnen. Diese Zellen sollten für die Langzeitkultivierung als HPPL-Zellen in einer mit Laminin-beschichteten Petrischale (200 Zellen/cm²) verwendet werden. Es wurden höchstens 4 ml jeder Zellsuspension (2 ml Kontrolle und 4 ml Probe) in jeweils ein FACS Röhrchen überführt, welches mit einem Filter (Porengröße 35 μ m) ausgestattet wurde. Zur Markierung toter Zellen wurde PI (1 μ g/ml) hinzugefügt. Für die Sammlung aufgetrennter Zellen wurde ein Falcon-Röhrchen mit 10 ml DMEM vorbereitet. Nach der Sortierung wurden die Zellen zunächst fünf Minuten bei 1200 rpm RT abzentrifugiert, der Überstand bis zu einem Rest von ca. 500 μ l abgesaugt und bis zur weiteren Durchführung des Experiments im Kühlschrank bei 4 °C zwischengelagert. Abschließend wurden die Zellen in 10 ml DMEM/F12 mit Zusätzen resuspendiert und in der mit Laminin beschichteten Petrischale ausgesät. Die Zugabe von 1 \times ITS, 0,1 μ M Dexamethason, 20 ng/ml HGF und 20 ng/ml EGF erfolgte direkt ins Medium. Ein Mediumwechsel sollte bei dieser Zelllinie in der Regel jeden vierten Tag, bis die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht haben, erfolgen.

6.2.16.3 Ausdifferenzierung von DLK⁺ Hepatoblasten zu HLC

Um die Sortierung der DLK⁺ Hepatoblasten zu beschleunigen, wurden die restlichen 6 ml Probenlösung aufkonzentriert. Dazu wurden die Zellen für fünf Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, in 4 ml 3% FBS in 1 \times PBS^{-/-} resuspendiert und in ein FACS Röhrchen mit einem Filter (Porengröße 35 μ m) überführt. Die Zugabe von PI (1 μ g/ml) diente zur Markierung toter Zellen. Die aufgefangenen Zellen wurden für fünf Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, mit 10 ml DMEM gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 5 ml DMEM aufgenommen und in einem Well einer 6 Well-Zellkulturplatte ausplattiert. Die Zugabe von 10 ng/ml OSM sollte die Ausdifferenzierung von Hepatoblasten in Hepatozyten begünstigen. Außerdem wurden 1 \times ITS und 0,1 μ M Dexamethason direkt ins Well hinzugegeben. Die aufgetrennten DLK⁺ Hepatoblasten demonstrierten ca. 14 Stunden nach ihrer Isolierung eine Konfluenz von etwa 40%. Nach Ablauf weiterer 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel ohne vorherige Waschschriffe. Die Zugabe von 1 \times ITS, 0,1 μ M Dexamethason und 10 ng/ml OSM erfolgte direkt ins Well. Dieser Schritt wurde nach Ablauf der nächsten 48 Stunden wiederholt. Am sechsten Tag nach der Zellisolierung wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 2,1 ml Matrigel in Kultivierungsmedium (1:7 Verdünnung, 1,4 mg/ml) unter Zusatz von 1 \times ITS und 0,1 μ M Dexamethason überschichtet.

RNA Isolierung

Zur Bestimmung der Genexpression in den Zellen der Mischkultur bzw. der isolierten DLK⁺ Hepatoblasten wurde am achten Kultivierungstag RNA aus diesen Zellen isoliert. Die RNA Isolation wurde unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Als Erstes wurden die Mischzellkulturen dreimal mit je 4 ml 1× PBS^{-/-} gewaschen und mit 1 ml Trizol[®]-Lösung benetzt. Durch starkes Durchmischen und anschließende Verwendung des Zellschabers wurden die Zellen vom Boden des Wells gelöst. Die DLK⁺ Hepatoblasten wurden mit 5 ml 1× PBS^{-/-} gewaschen, um das Matrigel aufzulösen und zu entfernen. Im Anschluss daran wurden die Zellen viermal mit je 5 ml 1× PBS^{-/-} gewaschen und mit Hilfe von Trizol-Lösung und Zellschaber gesammelt. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten bei RT inkubiert und bis Fortsetzung des Experiments bei -80 °C eingefroren. Im ersten Schritt wurden die Proben für 15 Minuten bei RT aufgetaut. Anschließend wurden pro Probe 200 µl Chloroform zugegeben und die Proben für 15 Sekunden gevortext. Nach anschließender Inkubation von zwei Minuten bei RT wurden die Proben für 15 Minuten bei 12000× g und 4 °C zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugationszeit waren drei Phasen sichtbar: die obere, durchschichtige Phase enthielt RNA und einen kleinen Anteil an DNA. Es wurden ca. 500 µl der oberen Phase abgenommen. Um die RNA zu fällen, wurden je 500 µl 100% Isopropanol zu den 500 µl der oberen Phase hinzugefügt und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Als Nächstes wurden die Proben für zehn Minuten bei 1200× g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Isopropanols wurden die RNA-Pellets mit je 1 ml 75% Ethanol zum Waschen überschichtet und für fünf Minuten bei 1200× g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand komplett abgenommen und die Pellets für 30 Minuten bei RT getrocknet bis die Pelletfarbe von weiß nach durchsichtig umschlug. Im nächsten Schritt wurden die Pellets in je 18 µl DEPC behandeltem ddH₂O resuspendiert, wovon 2 µl für die Konzentrationsbestimmung verwendet wurden. Für die RNA Transkription wurden 1 µg/µl Probe in DEPC behandeltem ddH₂O (8 µl Gesamtvolumen) angesetzt. Um die DNA zu inaktivieren, wurde Desoxyribonuclease I, Amplification Grade Kit verwendet. Als Erstes wurden 1 µl des 10× DNase I Reaktionspuffers und 1 µl DNase I zu 8 µl Probe hinzugegeben und für zehn Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl EDTA (25 mM) für zehn Minuten bei 65 °C in der PCR-Maschine abgestoppt. Das Programm wurde so eingestellt, dass die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit auf 4 °C abgekühlt wurden (weitere zehn Minuten).

RT-PCR

Als Erstes wurden je 5 µl des DEPC behandelten ddH₂O und 4 µl 5× PrimeScript[™] RT Master Mix mit den Proben gemischt und die RNA mittels reverser PCR in cDNA umgeschrieben (Programmeinstellungen der PCR-Maschine: 37 °C 15 Minuten, 85 °C, 0:05 Minuten, 4 °C ∞). Als Kontrolle wurde die RNA aus frisch isolierter Leber-Mischkultur (E14) eingesetzt und analog verarbeitet. Nach Beendigung des Vorgangs wurde der Inhalt der Proben aus PCR Tubes in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80 °C bis zur Fortsetzung des Experiments gelagert. Später wurden die Proben für 15 Minuten bei RT aufgetaut. Anschließend wurden die Proben (1 µM) auf die Konzentration von 0,1 µg/ml mit ddH₂O verdünnt. Im nächsten Schritt wurde jede Probe (25 nM, 25% Gesamtvolumen) mit Reverse und Forward Primern (jeweils 0,4 µM), LightCycler[®] 480 Probes Master Mix (50% Gesamtvolumen), TaqMan Probe (0,2 µM) und ddH₂O (15% Gesamtvolumen) in einer 96 Well-PCR-Platte auf einem Kühlblock vermischt, mit LightCycler[®] 480 Folie abgedeckt und für zwei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Pro untersuchtem Gen wurde jeweils ein Duplikat angesetzt. Der Temperaturzyklus wurde folgendermaßen eingestellt:



Denaturierung bei 95 °C für zehn Sekunden, Primer-Annealing bei 60 °C für 30 Sekunden und Extension bei 72 °C für eine Sekunde. Insgesamt wurden 45 Temperaturzyklen eingestellt.

6.2.16.4 Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu HLC

2×10^5 HPPL-Zellen wurden pro Well einer Laminin-beschichteten 6 Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach zwei Tagen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen und das Differenzierungsmedium mit OSM (20 ng/ml) hinzugefügt. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach insgesamt fünf Tagen Behandlung mit OSM wurde das Medium abgenommen und durch das Differenzierungsmedium mit 0,37 mg/ml, 0,73 mg/ml bzw. 1,46 mg/ml Matrigel ersetzt. Für das Ansetzen des Mediums wurde mit gekühltem Material gearbeitet, weil Matrigel bei höheren Temperaturen ein Gel bildet. Die Differenzierung war nach fünf Tagen Behandlung mit Matrigel abgeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der RT-PCR.

RNA Isolierung

Zur Bestimmung der Genexpression in den HLC, etablierten HPPL-Zellen und primären Hepatozyten wurde am achten Kultivierungstag RNA aus diesen Zellen isoliert. Im ersten Schritt wurde das Medium entfernt und die Proben wurden mit je 1 ml $1 \times \text{PBS}^{-/-}$ gewaschen. Danach wurden die Zellen in 700 μl QIAzol durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren aufgenommen. Das Lysat wurde gevortext und für fünf Minuten bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen aufgereinigt (Abbildung 71 a). Das Zelllysate in QIAzol wurde mit 700 μl 70% Ethanol versetzt und gemischt. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Kits (Protocol: Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology) ab Schritt fünf. Das Zell-Lysat in QIAzol wurde auf eine Säule (RNeasy spin column) gegeben und für 15 Sekunden bei 10000 rpm abzentrifugiert. Im nächsten Schritt folgte ein DNase-Verdau direkt auf der Säule. Hierzu wurde die Säule mit dem Puffer RW1 gewaschen. Als Nächstes wurden 10 μl DNase I stock solution zu 70 μl RDD Puffer gegeben, gevortext und direkt auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei RT wurde erneut mit Puffer RW1 gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit je 500 μl RPE Puffer. Es wurde noch einmal trocken zentrifugiert, um restliches Ethanol zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (RNase-frei) überführt. Der Inhalt wurde mit 40 μl RNase-freiem Wasser eluiert.

Die RNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Abbildung 71 b). Als Erstes wurde das Zell-Lysat in QIAzol mit 140 μl Chloroform versetzt und mehrmals durch invertieren gemischt und für drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Probe bei $12000 \times g$ für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen. Die obere wässrige, farblose Phase mit einem Volumen von ca. 420 μl enthielt die RNA. Sie wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 350 μl Isopropanol versetzt und für zehn Minuten bei $12000 \times g$, RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 700 μl Ethanol (75%) gewaschen. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei $7500 \times g$, 4 °C. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die RNA in 50 μl RNase-freiem Wasser gelöst. Als Nächstes wurde ein DNase-Verdau mit DNA-free™ DNA-removal Kit durchgeführt. Dazu wurden 10 μg RNA, 5 μl Puffer und 1 μl DNase vermischt und mit Wasser auf 50 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden 5 μl Inhibitor aus dem Kit zu der Probe gegeben, gevortext und für zwei

Minuten bei RT inkubiert. Zur Entfernung des Inhibitors erfolgte ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 10000 rpm, woraufhin 45 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurden. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung der RNA.

RT-PCR

Die cDNA-Synthese wurde mittels Tetro cDNA Synthesis Kit durchgeführt (Abbildung 71 a). Hierzu wurden 300 ng RNA mit 1 µl 10 mM dNTPmix (Desoxyribonukleosidtriphosphat), 1 µl Ribosafe RNase Inhibitor, 1 µl Tetro Reverse Transkriptase, 4 µl 5x RT-Puffer und 1 µl Random Hexamer gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. In einem Thermocycler wurde zunächst für 10 Minuten auf 25 °C erhitzt, danach für 30 Minuten auf 45 °C und zuletzt für fünf Minuten auf 85 °C. Um die Effizienz des DNase-Verdau zu überprüfen, wurde neben einer Wasser Kontrolle auch eine Kontrolle mit einer Mischung verschiedener RNAs ohne Reverse Transkriptase verwendet. Außerdem wurde die RNA aus muriner Leber, welche von AG Dirk Grimm mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und bereitgestellt wurde, benutzt und analog verarbeitet.

Für die cDNA-Synthese in Abbildung 71 b wurde 1 µg RNA mit 2 µl reverse Transkriptase, 4 µl HiFlex Puffer und 2 µl 10x miScript Nucleic-Mix gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C und einem anschließenden Erhitzen für fünf Minuten auf 95 °C. Als Kontrollen wurden eine Wasser Kontrolle und eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase verwendet. Die Proben wurden 1:5 in Wasser verdünnt.

Die PCR wurde mit den Primern für GAPDH, G6Pase, Albumin, Tdo2, TAT, TTR und CK19 durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 30 ng cDNA (2 µl der cDNA-Synthese mit dem Tetro cDNA-Synthesis Kit bzw. 3 µl der 1:5 Verdünnung der cDNA-Synthese mittels miScript II RT Kit), 4 µl 5x Phusion HF Puffer, 1 µl forward Primer (1:10), 1 µl reverse Primer (1:10), 1,6 µl 2,5 nM dNTP, 0,6 µl DMSO, 0,2 µl Phusion Hot Start II Polymerase sowie 8,6 bzw. 9,6 µl Nuclease-freies Wasser gemischt. Programmeinstellungen der PCR-Maschine waren: 98 °C, 5 Minuten; 98 °C, 0:10 Minuten; 58 °C, 0:15 Minuten; 72 °C, 0:30 Minuten; 72 °C, 8 Minuten; 4 °C, ∞). Nach Abschluss der PCR wurde der Reaktionsansatz mit 5 µl 6x Loading-Dye gemischt und 15 µl auf ein 2%-iges Agarose-Gel aufgetragen.

6.2.16.5 Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten

Um 40% Matrigel herzustellen, wurde ein Kollagenmix zusammen mit 100% Matrigel im Verhältnis 3:2 gemischt. Bei dem Kollagenmix handelte es sich um eine Mischung aus 1x PBS^{-/-} (0,108 Anteile), 10x Puffer A (0,1 Anteile), 10x DF12 (0,1 Anteile) und IPC-30 (0,692 Anteile) (hierbei ist die Reihenfolge zu beachten). Alle Komponenten wurden eiskalt verwendet und während des Experiments auf Eis gehalten. Im ersten Schritt wurden 25 µl der Matrigel-Lösung auf den Boden der porösen PC-Membran eines Transwell-Systems mittels zugeschnittener Spitze pipettiert. Danach wurde die Transwell-Platte für mindestens 30 Minuten in den Brutschrank überführt. In der Zwischenzeit wurden die HPPL-Zellen trypsinisiert und gezählt. Pro Well wurden $0,8 \times 10^4$ Zellen verwendet. Dafür wurden die Zellen für drei Minuten bei 1200 rpm 4 °C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 180 µl 40% Matrigel unter Vermeidung von Luftblasen resuspendiert. Anschließend wurde die Zell-Matrigel-Lösung in ein mit 40% Matrigel beschichtetes Well der Transwell-Platte überführt. Als Nächstes erfolgte die Inkubation im Brutschrank für zwei Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 400 µl HPPL-Medium mit Zusätzen (1x ITS, 0,1 µM Dexamethason, 5 ng/ml HGF, 5 ng/ml EGF) auf den Boden und 100 µl auf die



PC-Membran des Transwell-Systems pipettiert. Laut Tanimizu et al. (2007) begünstigt die Kombination aus HGF und EGF die Ausbildung tubulärer Strukturen. Obwohl OSM bei der Kultivierung der HPPL-Zellen verwendet wurde, wurde dieses Reagenz den Zellen hier nicht hinzugegeben, da es die Wirkung von HGF und EGF inhibiert.

Immunhistochemie

Im ersten Schritt wurden die Transwell-Systeme mit ca. 400 μ l 1 \times PBS^{+/+} dreimal bei RT gewaschen. Danach wurden insgesamt 400 μ l Kollagenase Typ CVII auf das untere und obere Kompartiment eines Transwell-Systems verteilt. Daraufhin wurde die Platte für zehn Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die 3D-Gele mit 1 \times PBS^{-/-} gewaschen. Als Nächstes wurden 400 μ l 4% PFA Lösung den Transwell-Systemen hinzugefügt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Wells mit je 400 μ l 1 \times PBS^{-/-} dreimal schnell und zweimal für fünf Minuten bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 400 μ l PFS Lösung für 30 Minuten bei RT blockiert. Der monoklonale anti-Maus- β -Catenin-Maus IgG Antikörper (1:300) und der polyklonale anti-Maus-CK19-Kaninchen IgG Antikörper (1:3000) wurden ebenfalls in PFS gelöst, wovon 400 μ l in die Transwell-Systeme pipettiert wurden. Als Negativkontrollen wurden anti-Maus-Kaninchen IgG Antikörper (1:300) und Kaninchen IgG (1:300) zu den beiden anderen Proben (400 μ l pro Well) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 400 μ l PFS einmal schnell und dreimal für jeweils zehn Minuten gewaschen. Der polyklonale anti-Maus-CK19-Kaninchen IgG Antikörper (1:500) und der polyklonale, Fluorescein-gekoppelte anti-Kaninchen-Ziege IgG Antikörper (1:500) wurden zusammen mit Alexa Fluor® 633 Phalloidin (1:500) zur Markierung der Aktinfilamente und Hoechst 33342 (10 μ g/ml) zur Markierung der Zellkerne gemischt und je 400 μ l des Gemisches pro Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte 26 Stunden bei 4 °C. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Transwell-Systeme mit ca. je 400 μ l 1 \times PBS^{+/+} einmal schnell und dreimal für jeweils zehn Minuten schüttelnd gewaschen. Anschließend wurden die Gele mit der gelben Pipettenspitze aus den Transwell-Systemen gelöst, auf die Objektträger überführt, mit Fluoromount™ fixiert und mit Deckgläschen verschlossen. Die Proben wurden konfokalmikroskopisch untersucht. Da sowohl Alexa Fluor® 488, als auch Alexa Fluor® 555 grüne Fluoreszenz aufweisen, wurde die Farbe des CK19 Signals nachträglich mit Olympus Fluoview Ver. 3.1 zu gelb geändert.

6.2.16.6 Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten

Zur Vorbereitung der Gellösung wurden 0,3% Cellmatrix Typ I-A, 5 \times DMEM mit 250 μ g/ml Gentamicin und 10 \times Puffer A in einem Verhältnis 7:2:1 gemischt, wobei je 1 ml dieser Gellösung für die Beschichtung eines Wells einer 6 Well-Zellkulturplatte verwendet wurde. Die Aushärtung des Gels dauerte ca. zehn Minuten bei RT. Währenddessen wurden die Zellen mit 10 ml 1 \times PBS^{-/-} gewaschen und für 15 Minuten mit 1 ml 0,25% Trypsin-Lösung im Brutschrank trypsinisiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abzentrifugiert und im entsprechenden Volumen 3D-Versuchsmedium (plus 1 \times ITS und 20 ng/ml HGF) resuspendiert, sodass die Zellzahl 5 \times 10⁴ Zellen/ml betrug. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension mit 1 ml frisch vorbereiteter Gellösung gemischt und auf den Boden des beschichteten Wells pipettiert. Nach Aushärtung des Gels im Brutschrank (ca. zehn Minuten) wurde die 3D-Zellkultur mit 2 ml Versuchsmedium überschichtet. Abschließend wurden 1 \times ITS und 20 ng/ml HGF ins Medium pipettiert und die Zellkulturplatte bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Am sechsten Tag erfolgte der Mediumwechsel.



6.2.17 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Bestimmung der Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Student's t-Tests. Alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ waren statistisch signifikant.



7. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
η	Dynamische Viskosität
u	Durchschnittliche Flussrate durch den Kanalquerschnitt
γ	Gamma
°C	Grad Celsius
AAVs	Adeno-assoziierte Viren
AG	Arbeitsgruppe
ALP	Alkalische Phosphatase
AM	Acetoxymethyl
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
AGS	Astrocyte Growth Supplement, Astrozyten-Wachstumsfaktoren
AM	Astrocyte medium, Astrozytenmedium
BBB	Blood-Brain-Barrier, Blut-Hirn-Schranke
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BECs	Biliary Epithelial Cells, biliäre Epithelzellen
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
C	Concentration, Konzentration
Ca.	Circa
Caco	Human Colon Carcinoma Cell, humane kolorektale Adenokarzinomzellen
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNS
CK	Cytokeratin
cm	Zentimeter
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPS	Carbamoylphosphat-Synthetase
d	Day, Tag
D	Diameter, Durchmesser
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DDC	3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	Double-distilled Water, demineralisiertes Wasser
DLK	Delta-like protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline
DTC	Dividing Transit Cells
E	Embryonalstadium
EBM	Endothelial Cell Basal Medium

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EGM	Endothelial Growth Medium
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Sarcoma
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
ESAM	Endothelial Selective Adhesion Molecule, endotheliale selektive Adhäsionsmoleküle
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötales Kälberserum
Fc	Fragment, crystallizable
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FGF	Fibroblast growth factors, Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FSC	Forward Scatter
g	Gravity, Erdbeschleunigung
G6Pase	Glucose-6-Phosphotase
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, saures Gliafaserprotein
GFP	Green Fluorescent Protein, grün fluoreszierendes Protein
GFR	Growth Factor Reduced
GLUT1	Glucose Transporter 1
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
γGTP	γ-Glutamyltranspeptidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Hour, Stunde
h	Height, Höhe
HA	Human Astrocytes, humane Astrozyten
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hCMEC	Human Cerebral Microvascular Endothelial Cells, humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor, Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLC	Hepatic-like Cells, Hepatozyten-ähnliche Zellen
hPC-PL	Human Pericytes from Placenta, humane Perizyten aus Plazenta
HPPL	Hepatic Progenitor cells Proliferating on Laminin, Leber-Vorläuferzellen, die auf Laminin proliferieren
HTS	High Throughput Screening, Hochdurchsatz-Screening
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells, humane Nabelschnurendothelzellen
Hz	Hertz



ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
Ig	Immunoglobulin
ITR	inverted terminal repeats, invertierte terminale Wiederholungen
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium-X
J_s	Flux durch die Membran/Zelllayer in cm^2
JAM	Junctional Adhesion Molecule, junktionales Adhäsionsmolekül
K	Kelvin
kb	Kilobasen
L	Länge
LDEV	Lactose Dehydrogenase-Elevating Virus
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoprotein niederer Dichte
LIF	Leukämieinhibitionsfaktor
LPCs	Adult liver Progenitor Cells, adulte Leber-Stammzellen
m	Meter
μm	Mikrometer
mAb	Monoclonal Antibody, monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-activated Protein, Mitogen-aktiviertes Protein
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MRP	Multidrug Resistance Protein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Number, Anzahl
N_2	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
NBD	Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
O_2	Sauerstoff
OSM	Oncostatin M
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Q	Flussrate
p	Druck
Δp	Druckunterschied
P_{app}	Permeability Coefficient, Permeabilitätskoeffizient
Pa	Pascal
PC	Polycarbonat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFS	PBS, Fish skin gelatin, Saponin
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Propidiumiodid
PKB	Protein Kinase B
PMMA	Polymethylmethacrylat

P/S	Penicillin/Streptomycin
PSC	Potential Clonogenic Stem Cells, potenzielle klonogene Zellen
r	Radius
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma oder Rat Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFP	Red fluorescent protein, rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions Per Minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S	Surface area, Oberfläche
s	Sekunde
α -SMA	Alpha-Smooth Muscle Actin, alpha-Glattmuskelaktin
SMART	Substrate Modification and Replication by Thermoforming
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Receptor
SOS	Son of Sevenless
SSC	Side scatter
STM	Septum Transversum Mesenchym
T	Temperatur
TAT	Tyrosin-Aminotransferase
Tdo2	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TEER	Transendothelial Electrical Resistance, transendothelialer elektrischer Widerstand
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta, Transformierender Wachstumsfaktor-beta
THP-1	Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line, humane Monozyten
TJ	Tight Junctions
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α , Tumornekrosefaktor
TO	Tryptophan-Oxygenase
TTR	Transthyretin
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin
w	Width, Weite
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
Y	Yellow Fluorescent Protein, gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	Zentralnervensystem
ZO	Zonula Occluden



8. Literatur

- [1] H. Olson, G. Betton, D. Robinson, K. Thomas, A. Monro, G. Kolaja, P. Lilly, J. Sanders, G. Sipes, W. Bracken, M. Dorato, K. Van Deun, P. Smith, B. Berger, A. Heller, *Regul Toxicol Pharmacol* **2000**, *32*, 56-67.
- [2] N. Shanks, R. Greek, J. Greek, *Philos Ethics Humanit Med* **2009**, *4*, 2.
- [3] R. A. Ettlin, J. Kuroda, S. Plassmann, M. Hayashi, D. E. Prentice, *J Toxicol Pathol* **2010**, *23*, 213-234.
- [4] C. A. Palmiotti, S. Prasad, P. Naik, K. M. Abul, R. K. Sajja, A. H. Achyuta, L. Cucullo, *Pharm Res* **2014**, *31*, 3229-3250.
- [5] A. S. Bass, M. E. Cartwright, C. Mahon, R. Morrison, R. Snyder, P. McNamara, P. Bradley, Y. Y. Zhou, J. Hunter, *J Pharmacol Toxicol Methods* **2009**, *60*, 69-78.
- [6] R. G. Harisson, *J. Exp. Zool.* **1910**, *9*, 787-846.
- [7] P. D. Benya, J. D. Shaffer, *Cell* **1982**, *30*, 215-224.
- [8] R. Greek, A. Menache, *Int J Med Sci* **2013**, *10*, 206-221.
- [9] R. L. Ehrmann, G. O. Gey, *J Natl Cancer Inst* **1956**, *16*, 1375-1403.
- [10] R. Mroue, M. J. Bissell, *Methods Mol Biol* **2013**, *945*, 221-250.
- [11] T. Sato, H. Clevers, *Science* **2013**, *340*, 1190-1194.
- [12] M. A. Lancaster, M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson, J. A. Knoblich, *Nature* **2013**, *501*, 373-379.
- [13] S. N. Bhatia, D. E. Ingber, *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 760-772.
- [14] D. Huh, G. A. Hamilton, D. E. Ingber, *Trends Cell Biol* **2011**, *21*, 745-754.
- [15] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, D. E. Ingber, *Science* **2010**, *328*, 1662-1668.
- [16] K. J. Jang, K. Y. Suh, *Lab Chip* **2010**, *10*, 36-42.
- [17] Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii, *Biomicrofluidics* **2011**, *5*, 22212.
- [18] E. M. Materne, I. Maschmeyer, A. K. Lorenz, R. Horland, K. M. Schimek, M. Busek, F. Sonntag, R. Lauster, U. Marx, *J Vis Exp* **2015**, e52526.
- [19] D. Huh, Y. S. Torisawa, G. A. Hamilton, H. J. Kim, D. E. Ingber, *Lab Chip* **2012**, *12*, 2156-2164.
- [20] J. M. Mullin, N. Agostino, E. Rendon-Huerta, J. J. Thornton, *Drug Discov Today* **2005**, *10*, 395-408.
- [21] G. S. Hoffman, L. H. Calabrese, *Nat Rev Rheumatol* **2014**, *10*, 454-462.
- [22] G. J. Tortora, B. H. Derrickson, *Anatomie und Physiologie*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2006**.
- [23] G. Eisenbrand, M. Metzler, F. J. Hennecke, *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
- [24] J. W. Mink, R. J. Blumenshine, D. B. Adams, *Am J Physiol* **1981**, *241*, R203-212.
- [25] H. F. Cserr, M. Bundgaard, *Am J Physiol* **1984**, *246*, R277-288.
- [26] N. J. Abbott, L. Ronnback, E. Hansson, *Nat Rev Neurosci* **2006**, *7*, 41-53.
- [27] A. K. Achyuta, A. J. Conway, R. B. Crouse, E. C. Bannister, R. N. Lee, C. P. Katnik, A. A. Behensky, J. Cuevas, S. S. Sundaram, *Lab Chip* **2013**, *13*, 542-553.
- [28] N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof, D. J. Begley, *Neurobiol Dis* **2010**, *37*, 13-25.
- [29] N. J. Abbott, *J Anat* **2002**, *200*, 629-638.
- [30] G. Fricker, D. S. Miller, *Pharmacology* **2004**, *70*, 169-176.
- [31] N. J. Abbott, I. A. Romero, *Mol Med Today* **1996**, *2*, 106-113.
- [32] A. D. van der Meer, F. Wolbers, I. Vermes, A. van der Berg, in *Microfluidics for medical applications* (Eds.: A. van der Berg, L. Segerink), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2015**, pp. 40-56.
- [33] W. Loscher, H. Potschka, *Nat Rev Neurosci* **2005**, *6*, 591-602.
- [34] M. Weidner, S. Huwel, F. Ebert, T. Schwerdtle, H. J. Galla, H. U. Humpf, *PLoS One* **2013**, *8*, e60484.

- [35] U. Marx, V. Sandig, *Drug Testing in vitro*, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [36] A. Al Ahmad, M. Gassmann, O. O. Ogunshola, *J Cell Physiol* **2009**, *218*, 612-622.
- [37] R. C. Janzer, M. C. Raff, *Nature* **1987**, *325*, 253-257.
- [38] A. Reichenbach, H. Wolburg, in *Neuroglia* (Eds.: H. Kettenmann, B. Ransom), Oxford University Press, New York, **2005**, pp. 19-35.
- [39] M. P. Dehouck, S. Meresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, *J Neurochem* **1990**, *54*, 1798-1801.
- [40] A. H. Schinkel, *Adv Drug Deliv Rev* **1999**, *36*, 179-194.
- [41] M. S. McAllister, L. Krizanac-Bengez, F. Macchia, R. J. Naftalin, K. C. Pedley, M. R. Mayberg, M. Marroni, S. Leaman, K. A. Stanness, D. Janigro, *Brain Res* **2001**, *904*, 20-30.
- [42] R. F. Haseloff, I. E. Blasig, H. C. Bauer, H. Bauer, *Cell Mol Neurobiol* **2005**, *25*, 25-39.
- [43] R. Booth, H. Kim, *Lab Chip* **2012**, *12*, 1784-1792.
- [44] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka, M. Niwa, *Neurochem Int* **2009**, *54*, 253-263.
- [45] K. C. K. Malina, I. Cooper, V. I. Teichberg, *Brain Res* **2009**, *1284*, 12-21.
- [46] M. Ramsauer, D. Krause, R. Dermietzel, *FASEB J* **2002**, *16*, 1274-1276.
- [47] H. Mi, H. Haeberle, B. A. Barres, *J Neurosci* **2001**, *21*, 1538-1547.
- [48] M. L. Schroeter, K. Mertsch, H. Giese, S. Muller, A. Sporbert, B. Hickel, I. E. Blasig, *FEBS Lett* **1999**, *449*, 241-244.
- [49] A. Armulik, A. Abramsson, C. Betsholtz, *Circ Res* **2005**, *97*, 512-523.
- [50] H. K. Rucker, H. J. Wynder, W. E. Thomas, *Brain Res Bull* **2000**, *51*, 363-369.
- [51] P. Cuevas, J. A. Gutierrez-Diaz, D. Reimers, M. Dujovny, F. G. Diaz, J. I. Ausman, *Anat Embryol (Berl)* **1984**, *170*, 155-159.
- [52] H. Gerhardt, C. Betsholtz, *Cell Tissue Res* **2003**, *314*, 15-23.
- [53] D. Shepro, N. M. Morel, *FASEB J* **1993**, *7*, 1031-1038.
- [54] W. M. Pardridge, in *Introduction to the Blood-Brain Barrier: Methodology, Biology, and Pathology* (Ed.: W. M. Pardridge), Cambridge University Press, Cambridge, **1998**, pp. 1-8.
- [55] C. H. Lai, K. H. Kuo, *Brain Res Brain Res Rev* **2005**, *50*, 258-265.
- [56] P. J. Gaillard, L. H. Voorwinden, J. L. Nielsen, A. Ivanov, R. Atsumi, H. Engman, C. Ringbom, A. G. de Boer, D. D. Breimer, *Eur J Pharm Sci* **2001**, *12*, 215-222.
- [57] S. H. Ma, L. A. Lepak, R. J. Hussain, W. Shain, M. L. Shuler, *Lab Chip* **2005**, *5*, 74-85.
- [58] V. V. Jeliaskova-Mecheva, D. J. Bobilya, *Brain Res Brain Res Protoc* **2003**, *12*, 91-98.
- [59] I. K. Zervantonakis, C. R. Kothapalli, S. Chung, R. Sudo, R. D. Kamm, *Biomicrofluidics* **2011**, *5*, 13406.
- [60] D. E. Sims, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2000**, *27*, 842-846.
- [61] D. S. Miller, *Trends Pharmacol Sci* **2010**, *31*, 246-254.
- [62] W. Loscher, H. Potschka, *NeuroRx* **2005**, *2*, 86-98.
- [63] M. I. Borges-Walmsley, K. S. McKeegan, A. R. Walmsley, *Biochem J* **2003**, *376*, 313-338.
- [64] B. Bauer, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (Heidelberg), **2002**.
- [65] A. H. Schinkel, E. Wagenaar, C. A. Mol, L. van Deemter, *J Clin Invest* **1996**, *97*, 2517-2524.
- [66] A. Mahringer, S. Karamustafa, D. Klotz, S. Kahl, V. B. Konkimalla, Y. Wang, J. Wang, H. Y. Liu, H. Boechzelt, X. Hao, R. Bauer, G. Fricker, T. Efferth, *Cancer Genomics Proteomics* **2010**, *7*, 191-205.
- [67] R. Cecchelli, V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M. P. Dehouck, L. Fenart, *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 650-661.
- [68] A. M. Hartz, B. Bauer, G. Fricker, D. S. Miller, *Mol Pharmacol* **2004**, *66*, 387-394.
- [69] R. L. Juliano, V. Ling, *Biochim Biophys Acta* **1976**, *455*, 152-162.
- [70] J. Bart, H. J. Groen, N. H. Hendrikse, W. T. van der Graaf, W. Vaalburg, E. G. de Vries, *Cancer Treat Rev* **2000**, *26*, 449-462.
- [71] D. M. Hermann, E. Kilic, A. Spudich, S. D. Kramer, H. Wunderli-Allenspach, C. L. Bassetti, *Ann Neurol* **2006**, *60*, 489-498.
- [72] H. C. Cooray, C. G. Blackmore, L. Maskell, M. A. Barrand, *Neuroreport* **2002**, *13*, 2059-2063.



- [73] S. Dauchy, F. Miller, P. O. Couraud, R. J. Weaver, B. Weksler, I. A. Romero, J. M. Scherrmann, I. De Waziers, X. Declèves, *Biochem Pharmacol* **2009**, *77*, 897-909.
- [74] H. Bronger, J. König, K. Kopplow, H. H. Steiner, R. Ahmadi, C. Herold-Mende, D. Keppler, A. T. Nies, *Cancer Res* **2005**, *65*, 11419-11428.
- [75] A. T. Nies, *Cancer Lett* **2007**, *254*, 11-29.
- [76] A. Armulik, G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson, C. Betsholtz, *Nature* **2010**, *468*, 557-561.
- [77] S. Chien, S. Li, Y. J. Shyy, *Hypertension* **1998**, *31*, 162-169.
- [78] A. D. van der Meer, M. M. Kamphuis, A. A. Poot, J. Feijen, I. Vermes, *Int J Cell Biol* **2009**, *2009*, 532432.
- [79] B. J. Ballermann, M. J. Ott, *Blood Purif* **1995**, *13*, 125-134.
- [80] A. D. van der Meer, A. A. Poot, J. Feijen, I. Vermes, *Biomicrofluidics* **2010**, *4*, 11103.
- [81] A. D. van der Meer, A. A. Poot, M. H. Duits, J. Feijen, I. Vermes, *J Biomed Biotechnol* **2009**, *2009*, 823148.
- [82] S. Chien, *Biorheology* **2006**, *43*, 95-116.
- [83] A. D. Acevedo, S. S. Bowser, M. E. Gerritsen, R. Bizios, *J Cell Physiol* **1993**, *157*, 603-614.
- [84] O. Thoumine, R. M. Nerem, P. R. Girard, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **1995**, *31*, 45-54.
- [85] J. Ando, K. Yamamoto, *Circ J* **2009**, *73*, 1983-1992.
- [86] Y. S. Li, J. H. Haga, S. Chien, *J Biomech* **2005**, *38*, 1949-1971.
- [87] S. Gudi, I. Huvar, C. R. White, N. L. McKnight, N. Dusserre, G. R. Boss, J. A. Frangos, *Arterioscl Throm Vas* **2003**, *23*, 994-1000.
- [88] C. Urbich, D. H. Walter, A. M. Zeiher, S. Dimmeler, *Circ Res* **2000**, *87*, 683-689.
- [89] D. Kaiser, M. A. Freyberg, P. Friedl, *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *231*, 586-590.
- [90] S. Sheikh, G. E. Rainger, Z. Gale, M. Rahman, G. B. Nash, *blood* **2003**, *102*, 2828-2834.
- [91] E. A. Osborn, A. Rabodzey, C. F. Dewey, Jr., J. H. Hartwig, *Am J Physiol Cell Physiol* **2006**, *290*, C444-452.
- [92] L. Cucullo, M. Hossain, V. Puvenna, N. Marchi, D. Janigro, *BMC Neurosci* **2011**, *12*, 40.
- [93] M. J. Levesque, R. M. Nerem, E. A. Sprague, *Biomaterials* **1990**, *11*, 702-707.
- [94] T. G. Walsh, R. P. Murphy, P. Fitzpatrick, K. D. Rochfort, A. F. Guinan, A. Murphy, P. M. Cummins, *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 3053-3063.
- [95] O. C. Colgan, G. Ferguson, N. T. Collins, R. P. Murphy, G. Meade, P. A. Cahill, P. M. Cummins, *Am J Physiol-Heart C* **2007**, *292*, H3190-H3197.
- [96] J. Ando, T. Komatsuda, A. Kamiya, *In Vitro Cell Dev Biol* **1988**, *24*, 871-877.
- [97] K. Yamamoto, R. Korenaga, A. Kamiya, J. Ando, *Circ Res* **2000**, *87*, 385-391.
- [98] J. F. Poduslo, G. L. Curran, C. T. Berg, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 5705-5709.
- [99] J. Niewoehner, B. Bohrmann, L. Collin, E. Urich, H. Sade, P. Maier, P. Rueger, J. O. Stracke, W. Lau, A. C. Tissot, H. Loetscher, A. Ghosh, P. O. Freskgard, *Neuron* **2014**, *81*, 49-60.
- [100] B. B. Weksler, E. A. Subileau, N. Perriere, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, D. K. Male, F. Roux, J. Greenwood, I. A. Romero, P. O. Couraud, *Faseb J* **2005**, *19*, 1872-1874.
- [101] C. Coisne, L. Dehouck, C. Faveeuw, Y. Delplace, F. Miller, C. Landry, C. Morissette, L. Fenart, R. Cecchelli, P. Tremblay, B. Dehouck, *Lab Invest* **2005**, *85*, 734-746.
- [102] L. M. Griep, F. Wolbers, B. de Wagenaar, P. M. ter Braak, B. B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud, I. Vermes, A. D. van der Meer, A. van den Berg, *Biomed Microdevices* **2013**, *15*, 145-150.
- [103] B. Prabhakarandian, M. C. Shen, J. B. Nichols, I. R. Mills, M. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. Aschner, K. Pant, *Lab Chip* **2013**, *13*, 1093-1101.
- [104] J. H. Yeon, D. Na, K. Choi, S. W. Ryu, C. Choi, J. K. Park, *Biomed Microdevices* **2012**, *14*, 1141-1148.
- [105] I. Hebeiß, Karlsruhe Institute of Technology (Karlsruhe), **2012**.
- [106] M. D. Frame, I. H. Sarelius, *Microcirculation* **2000**, *7*, 419-427.
- [107] M. B. Esch, D. J. Post, M. L. Shuler, T. Stokol, *Tissue Eng Part A* **2011**, *17*, 2965-2971.
- [108] I. Hebeiß, R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, U. Schepers, *Lab Chip* **2012**, *12*, 829-834.

- [109] A. D. van der Meer, V. V. Orlova, P. ten Dijke, A. van den Berg, C. L. Mummery, *Lab Chip* **2013**, *13*, 3562-3568.
- [110] F. Radtke, H. Clevers, *Science* **2005**, *307*, 1904-1909.
- [111] E. Marshman, C. Booth, C. S. Potten, *Bioessays* **2002**, *24*, 91-98.
- [112] C. S. Potten, in *Radiation and Gut* (Eds.: C. S. Potten, J. N. Hendry), The Netherlands: Elsevier Science, Amsterdam, **1995**, pp. 1-31.
- [113] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie, Vol. 2*, Georg Thieme Verlag, **2006**.
- [114] C. S. Potten, *Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death Vol. B: Biological Sciences*, *353*, Phil. Trans. R. Soc., London, **1998**.
- [115] M. Bjerknes, H. Cheng, *Gastroenterology* **1999**, *116*, 7-14.
- [116] G. S. Evans, C. S. Potten, *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **1988**, *56*, 191-199.
- [117] M. Hocker, B. Wiedenmann, *Ann N Y Acad Sci* **1998**, *859*, 160-174.
- [118] E. M. Porter, C. L. Bevins, D. Ghosh, T. Ganz, *Cell Mol Life Sci* **2002**, *59*, 156-170.
- [119] T. Ayabe, D. P. Satchell, C. L. Wilson, W. C. Parks, M. E. Selsted, A. J. Ouellette, *Nat Immunol* **2000**, *1*, 113-118.
- [120] V. Meunier, M. Bourrie, Y. Berger, G. Fabre, *Cell Biol Toxicol* **1995**, *11*, 187-194.
- [121] H. J. Kim, D. Huh, G. Hamilton, D. E. Ingber, *Lab Chip* **2012**, *12*, 2165-2174.
- [122] M. B. Esch, J. H. Sung, J. Yang, C. Yu, J. Yu, J. C. March, M. L. Shuler, *Biomed Microdevices* **2012**, *14*, 895-906.
- [123] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, R. T. Borchardt, *Gastroenterology* **1989**, *96*, 736-749.
- [124] J. Fogh, J. M. Fogh, T. Orfeo, *J Natl Cancer Inst* **1977**, *59*, 221-226.
- [125] A. Leibovitz, J. C. Stinson, W. B. McCombs, 3rd, C. E. McCoy, K. C. Mazur, N. D. Mabry, *Cancer Res* **1976**, *36*, 4562-4569.
- [126] M. Pinto, M. D. Appay, P. Simon-Assmann, G. Chevalier, N. Dracopoli, J. Fogh, *Biol Cell* **1982**, *44*, 193-196.
- [127] M. Pinto, S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Kedinger, N. Triadou, E. Dussaulx, *Biol Cell* **1983**, *47*, 323-330.
- [128] H. P. Hauri, E. E. Sterchi, D. Bienz, J. A. Fransen, A. Marxer, *J Cell Biol* **1985**, *101*, 838-851.
- [129] M. Rousset, I. Chantret, D. Darmoul, G. Trugnan, C. Sapin, F. Green, D. Swallow, A. Zweibaum, *J Cell Physiol* **1989**, *141*, 627-635.
- [130] S. Howell, A. J. Kenny, A. J. Turner, *Biochem J* **1992**, *284 (Pt 2)*, 595-601.
- [131] P. Artursson, K. Palm, K. Luthman, *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46*, 27-43.
- [132] T. H. Schiebler, U. Peiper, F. Schneider, *Histologie, Vol. 1. Auflage*, Springerverlag **1984**.
- [133] S. S. Sternberg, *Histology for Pathologists*, Raven Press, LTD, New York **1992**.
- [134] W. Siegenthaler, H. E. Blum, *Klinische Pathologie*, Thieme Verlag, New York, **2006**.
- [135] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, Vol. 3. Auflage*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart., **1989**.
- [136] J. E. Schanz, Dissertation thesis, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2007**.
- [137] K. I. Mühlenfeld, Dissertation thesis, Humboldt-Universität zu Berlin **1999**.
- [138] M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, A. Miyajima, *J Biochem* **2011**, *149*, 231-239.
- [139] J. Schanz, Fraunhofer IGB (Stuttgart), **2007**.
- [140] M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, A. Miyajima, *J Biochem* **2011**, *149*, 231-239.
- [141] K. S. Zaret, *Mech Dev* **2000**, *92*, 83-88.
- [142] N. Tanimizu, M. Nishikawa, H. Saito, T. Tsujimura, A. Miyajima, *J Cell Sci* **2003**, *116*, 1775-1786.
- [143] N. Fausto, in *The Liver: Biology and Pathobiology* (Eds.: I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, S. D. A., S. D. A.), Raven Press, New York, **1994**, pp. 1501-1518.
- [144] S. Sell, *Mod Pathol* **1994**, *7*, 105-112.
- [145] S. Paku, J. Schnur, P. Nagy, S. S. Thorgeirsson, *Am J Pathol* **2001**, *158*, 1313-1323.
- [146] E. Farber, *Cancer Res* **1956**, *16*, 142-148.
- [147] R. P. Evarts, H. Nakatsukasa, E. R. Marsden, C. C. Hsia, H. A. Dunsford, S. S. Thorgeirsson, *Cancer Res* **1990**, *50*, 3439-3444.



- [148] D. Huh, D. C. Leslie, B. D. Matthews, J. P. Fraser, S. Jurek, G. A. Hamilton, K. S. Thorneloe, M. A. McAlexander, D. E. Ingber, *Sci Transl Med* **2012**, *4*.
- [149] S. Giselbrecht, E. Gottwald, R. Truckenmueller, C. Trautmann, A. Welle, A. Guber, V. Saile, T. Gietzelt, K. F. Weibezahn, *J Vis Exp* **2008**.
- [150] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmuller, K. F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed Microdevices* **2006**, *8*, 191-199.
- [151] E. Gottwald, S. Giselbrecht, R. Truckenmüller, *BIOspektrum* **2015**, *21*, 169-171.
- [152] S. Giselbrecht, R. Truckenmüller, *Vol. DE 102007050976 B4*, Deutschland, **2010**.
- [153] R. Truckenmuller, S. Giselbrecht, N. Rivron, E. Gottwald, V. Saile, A. van den Berg, M. Wessling, C. van Blitterswijk, *Adv Mater* **2011**, *23*, 1311-1329.
- [154] L. Reimer, G. Pfferkorn, *Raster-Elektronenmikroskopie, Vol. 2*, Springer Verlag Berlin Heidelberg **1973**.
- [155] R. Spohr, *Radiation Measurements* **2005**, *40*, 191-202.
- [156] R. Spohr, *Radiation Measurements* **2008**, *43*, 560-570.
- [157] A. Kumar, H. M. Mansour, A. Friedman, E. R. Blough, *Nanomedicine in Drug Delivery*, CRC Press, Boca Raton, **2013**.
- [158] N. Krasteva, B. Seifert, W. Albrecht, T. Weigel, M. Schossig, G. Altankov, T. Groth, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2467-2476.
- [159] J. M. Anderson, M. S. Balda, A. S. Fanning, *Curr Opin Cell Biol* **1993**, *5*, 772-778.
- [160] W. A. Muller, *Annu Rev Pathol* **2011**, *6*, 323-344.
- [161] B. Hobson, J. Denekamp, *Br J Cancer* **1984**, *49*, 405-413.
- [162] A. Eberhard, S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K. H. Plate, H. G. Augustin, *Cancer Res* **2000**, *60*, 1388-1393.
- [163] M. E. Maragoudakis, *Angiogenesis Models Modulators and Clinical Applications*, Springer Science + Business Media New York, **1998**.
- [164] *Invitogen*, **2011**.
- [165] Huisgen R, *Angewandte Chemie* **1963**, *2*, 565-632.
- [166] D. C. Sane, *blood*, *104*, 2615-2616.
- [167] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle, Vol. 5., vollständig überarbeitete Auflage* Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, **2011**.
- [168] W. A. Muller, in *Adhesion Molecules: Function and Inhibition* (Ed.: K. Ley), Birkhauser, Basel, **2007**, pp. 201-220.
- [169] M. Raulf-Heimsoth, *Angeborene und erworbene Immunität*, **2011**.
- [170] D. Faustman, M. Davis, *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 482-493.
- [171] J. Fawcett, C. Buckley, C. L. Holness, I. N. Bird, J. H. Spragg, J. Saunders, A. Harris, D. L. Simmons, *J Cell Biol* **1995**, *128*, 1229-1241.
- [172] W. A. Muller, S. A. Weigl, X. Deng, D. M. Phillips, *J Exp Med* **1993**, *178*, 449-460.
- [173] Z. Mamdouh, X. Chen, L. M. Pierini, F. R. Maxfield, W. A. Muller, *Nature* **2003**, *421*, 748-753.
- [174] P. J. Newman, D. K. Newman, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2003**, *23*, 953-964.
- [175] Q. H. Sun, H. M. DeLisser, M. M. Zukowski, C. Paddock, S. M. Albelda, P. J. Newman, *J Biol Chem* **1996**, *271*, 11090-11098.
- [176] J. P. Newton, C. D. Buckley, E. Y. Jones, D. L. Simmons, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 20555-20563.
- [177] R. E. Gerszten, E. A. Garcia-Zepeda, Y. C. Lim, M. Yoshida, H. A. Ding, M. A. Gimbrone, Jr., A. D. Luster, F. W. Lusinskas, A. Rosenzweig, *Nature* **1999**, *398*, 718-723.
- [178] M. Odijk, A. D. van der Meer, D. Levner, H. J. Kim, M. W. van der Helm, L. I. Segerink, J. P. Frimat, G. A. Hamilton, D. E. Ingber, A. van den Berg, *Lab Chip* **2015**, *15*, 745-752.
- [179] M. A. Deli, C. S. Abraham, Y. Kataoka, M. Niwa, *Cell Mol Neurobiol* **2005**, *25*, 59-127.
- [180] P. D. Bowman, S. R. Ennis, K. E. Rarey, A. L. Betz, G. W. Goldstein, *Ann Neurol* **1983**, *14*, 396-402.
- [181] M. Plateel, E. Teissier, R. Cecchelli, *J Neurochem* **1997**, *68*, 874-877.
- [182] K. L. Audus, R. T. Borchardt, *Pharm Res* **1986**, *3*, 81-87.
- [183] M. P. Dehouck, S. Meresse, B. Dehouck, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, *J Control Release* **1992**, *21*, 81-91.

- [184] M. P. Dehouck, P. Jolliet, F. Bree, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, J. P. Tillement, *J Neurochem* **1992**, *58*, 1790-1797.
- [185] G. L. Francis, *Cytotechnology* **2010**, *62*, 1-16.
- [186] M. Bahrami, M. M. Yovanovich, J. R. Culham, *J Fluids Eng* **2006**, *128*, 1036-1044.
- [187] D. Giordano, J. K. D. Russell, D.B., *Earth and Planetary Science Letters* **2008**, *271*, 123-134.
- [188] B. J. Kirby, *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*, Cambridge University Press, **2010**.
- [189] K. Schroeder, C. A. Carmen, B. D. Neagle, M. I. Ann Arbor, *Vol. US 2012/0315660 A1*, Essen Instruments, Inc., US, **2012**.
- [190] T. Horiuchi, K. Matsunaga, M. Banno, Y. Nakano, K. Nishimura, C. Hanzawa, K. Miyamoto, S. Nomura, Y. Ohta, *Perit Dial Int* **2009**, *29*, 217-226.
- [191] A. Martinez-Gonzalez, G. F. Calvo, L. A. Perez Romasanta, V. M. Perez-Garcia, *Bull Math Biol* **2012**, *74*, 2875-2896.
- [192] M. N. Nakatsu, J. Davis, C. C. Hughes, *J Vis Exp* **2007**, 186.
- [193] invitrogen.com, **2008**.
- [194] V. Kappings, Karlsruher Institut für Toxikologie (Karlsruhe), **2014**.
- [195] M. Nedergaard, *Science* **2013**, *340*, 1529-1530.
- [196] C. T. Beuckmann, K. Dernbach, A. Hakvoort, H. J. Galla, *Cytotechnology* **1997**, *24*, 11-17.
- [197] H. C. Bauer, H. Bauer, *Cell Mol Neurobiol* **2000**, *20*, 13-28.
- [198] L. L. Rubin, D. E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H. C. Horner, M. Janatpour, C. W. Liaw, K. Manning, J. Morales, et al., *J Cell Biol* **1991**, *115*, 1725-1735.
- [199] W. H. Ziegler, R. C. Liddington, D. R. Critchley, *Trends Cell Biol* **2006**, *16*, 453-460.
- [200] I. Cooper, K. Cohen-Kashi-Malina, V. I. Teichberg, *Methods Mol Biol* **2011**, *762*, 347-354.
- [201] G. Thanabalasundaram, J. Schneidewind, C. Pieper, H. J. Galla, *Int J Biochem Cell Biol* **2011**, *43*, 1284-1293.
- [202] Y. Kawasaki, T. Imaizumi, H. Matsuura, S. Ohara, K. Takano, K. Suyama, K. Hashimoto, R. Nozawa, H. Suzuki, M. Hosoya, *Pediatr Nephrol* **2008**, *23*, 913-919.
- [203] M. V. Sofroniew, H. V. Vinters, *Acta Neuropathol* **2010**, *119*, 7-35.
- [204] K. Vu, B. Weksler, I. Romero, P. O. Couraud, A. Gelli, *Eukaryot Cell* **2009**, *8*, 1803-1807.
- [205] D. Bonkowski, V. Katyshev, R. D. Balabanov, A. Borisov, P. Dore-Duffy, *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 8.
- [206] J. L. Ridet, S. K. Malhotra, A. Privat, F. H. Gage, *Trends Neurosci* **1997**, *20*, 570-577.
- [207] M. Eddleston, L. Mucke, *Neuroscience* **1993**, *54*, 15-36.
- [208] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, G. Noel, *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 5517-5527.
- [209] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, *Cancer Res* **1988**, *48*, 4827-4833.
- [210] AppliChem, **2014**.
- [211] Thermo Fischer Scientific, **2015**.
- [212] Thermo Fischer Scientific, **2015**.
- [213] hpi, Burlington, **2012**.
- [214] B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud, *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10*, 16.
- [215] A. G. Koutsiaris, S. V. Tachmitzi, N. Batis, M. G. Kotoula, C. H. Karabatsas, E. Tsironi, D. Z. Chatzoulis, *Biorheology* **2007**, *44*, 375-386.
- [216] L. M. Tai, P. S. Reddy, M. A. Lopez-Ramirez, H. A. Davies, D. K. Male, A. J. Loughlin, I. A. Romero, *Brain Res* **2009**, *1292*, 14-24.
- [217] O. Huber, A. Brunner, P. Maier, R. Kaufmann, P. O. Couraud, C. Cremer, G. Fricker, *PLoS One* **2012**, *7*, e44776.
- [218] A. H. Schinkel, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, P. Borst, *J Clin Invest* **1995**, *96*, 1698-1705.
- [219] H. Kushihara, H. Suzuki, Y. Sugiyama, *J Pharm Sci* **1998**, *87*, 1025-1040.
- [220] W. L. Chiou, S. M. Chung, T. C. Wu, *Pharm Res* **2000**, *17*, 903-905.
- [221] M. F. Fromm, *Int J Clin Pharmacol Ther* **2000**, *38*, 69-74.



- [222] Y. Tanigawara, *Ther Drug Monit* **2000**, *22*, 137-140.
- [223] M. T. Huisman, J. W. Smit, H. R. Wiltshire, R. M. Hoetelmans, J. H. Beijnen, A. H. Schinkel, *Mol Pharmacol* **2001**, *59*, 806-813.
- [224] S. Doppenschmitt, H. Spahn-Langguth, C. G. Regardh, P. Langguth, *J Pharm Sci* **1999**, *88*, 1067-1072.
- [225] A. Noack, S. Noack, A. Hoffmann, K. Maalouf, M. Buettner, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, D. Alms, K. Romermann, H. Y. Naim, W. Loscher, *PLoS One* **2014**, *9*, e88154.
- [226] A. Eneroth, E. Astrom, J. Hoogstraate, D. Schrenk, S. Conrad, H. M. Kauffmann, K. Gjellan, *Eur J Pharm Sci* **2001**, *12*, 205-214.
- [227] M. Yamazaki, W. E. Neway, T. Ohe, I. Chen, J. F. Rowe, J. H. Hochman, M. Chiba, J. H. Lin, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *296*, 723-735.
- [228] L. Fenart, V. Buee-Scherrer, L. Descamps, C. Duhem, M. G. Poullain, R. Cecchelli, M. P. Dehouck, *Pharm Res* **1998**, *15*, 993-1000.
- [229] K. Bogman, A. K. Peyer, M. Torok, E. Kusters, J. Drewe, *Brit J Pharmacol* **2001**, *132*, 1183-1192.
- [230] E. J. Wang, C. N. Casciano, R. P. Clement, W. W. Johnson, *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, *289*, 580-585.
- [231] J. W. Polli, S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster, C. S. Serabjit-Singh, *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *299*, 620-628.
- [232] P. R. Twentyman, T. Rhodes, S. Rayner, *Eur J Cancer* **1994**, *30A*, 1360-1369.
- [233] A. Noack, S. Noack, A. Hoffmann, K. Maalouf, M. Buettner, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, D. Alms, K. Romermann, H. Y. Naim, W. Loscher, *PLoS One* **2014**, *9*.
- [234] K. Eyer, M. Herger, S. D. Kramer, P. S. Dittrich, *Pharm Res* **2014**, *31*, 3415-3425.
- [235] A. Eneroth, E. Astrom, J. Hoogstraate, D. Schrenk, S. Conrad, H. M. Kauffmann, K. Gjellan, *Eur J Pharm Sci* **2001**, *12*, 205-214.
- [236] P. Zagermann-Muncke, *Vol. 50*, Pharmazeutische Zeitung Online, **2006**.
- [237] S. Fellner, B. Bauer, D. S. Miller, M. Schaffrik, M. Fankhanel, T. Spruss, G. Bernhardt, C. Graeff, L. Farber, H. Gschaidmeier, A. Buschauer, G. Fricker, *J Clin Invest* **2002**, *110*, 1309-1318.
- [238] S. Nobmann, B. Bauer, G. Fricker, *Brit J Pharmacol* **2001**, *132*, 722-728.
- [239] A. M. S. Hartz, B. Bauer, G. Fricker, D. S. Miller, *Mol Pharmacol* **2004**, *66*, 387-394.
- [240] G. Fricker, S. Nobmann, D. S. Miller, *Brit J Pharmacol* **2002**, *135*, 1308-1314.
- [241] L. Peng, Z. He, W. Chen, I. R. Holzman, J. Lin, *Pediatr Res* **2007**, *61*, 37-41.
- [242] D. Lambert, C. A. O'Neill, P. J. Padfield, *Biochem J* **2005**, *387*, 553-560.
- [243] W. Cui, L. X. Li, C. M. Sun, Y. Wen, Y. Zhou, Y. L. Dong, P. Liu, *Braz J Med Biol Res* **2010**, *43*, 330-337.
- [244] K. H. Benam, S. Dauth, B. Hassell, A. Herland, A. Jain, K. J. Jang, K. Karalis, H. J. Kim, L. MacQueen, R. Mahmoodian, S. Musah, Y. S. Torisawa, A. D. van der Meer, R. Villenave, M. Yadid, K. K. Parker, D. E. Ingber, *Annu Rev Pathol* **2015**, *10*, 195-262.
- [245] G. Nolleaux, C. Deville, B. El Moulaj, W. Zorzi, P. Deloyer, Y. J. Schneider, O. Peulen, G. Dandrifosse, *BMC Cell Biol* **2006**, *7*, 20.
- [246] B. J. W. VanKlinken, E. Oussoren, J. J. Weenink, G. J. Strous, H. A. Buller, J. Dekker, A. W. C. Einerhand, *Glycoconjugate J* **1996**, *13*, 757-768.
- [247] Y. S. Kim, S. B. Ho, *Curr Gastroenterol Rep* **2010**, *12*, 319-330.
- [248] A. F. Mattar, D. H. Teitelbaum, R. A. Drongowski, F. Yongyi, C. M. Harmon, A. G. Coran, *Pediatr Surg Int* **2002**, *18*, 586-590.
- [249] S. B. Ho, G. A. Niehans, C. Lyftogt, P. S. Yan, D. L. Cherwitz, E. T. Gum, R. Dahiya, Y. S. Kim, *Cancer Res* **1993**, *53*, 641-651.
- [250] H. J. Kim, D. E. Ingber, *Integr Biol (Camb)* **2013**, *5*, 1130-1140.
- [251] M. Furuse, T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, *J Cell Biol* **1993**, *123*, 1777-1788.
- [252] S. C. Kirkland, *Cancer Res* **1985**, *45*, 3790-3795.
- [253] G. Rehner, H. Daniel, *Biochemie und Ernährung*, Spektrum, Heidelberg, **2010**.
- [254] K. Si-Tayeb, F. P. Lemaigre, S. A. Duncan, *Dev Cell* **2010**, *18*, 175-189.
- [255] P. J. Lee, P. J. Hung, L. P. Lee, *Biotechnol Bioeng* **2007**, *97*, 1340-1346.

- [256] M. Jang, P. Neuzil, T. Volk, A. Manz, A. Kleber, *Biomicrofluidics* **2015**, *9*, 034113.
- [257] M. J. Powers, K. Domansky, M. R. Kaazempur-Mofrad, A. Kalezi, A. Capitano, A. Upadhyaya, P. Kurzawski, K. E. Wack, D. B. Stolz, R. Kamm, L. G. Griffith, *Biotechnol Bioeng* **2002**, *78*, 257-269.
- [258] M. J. Powers, D. M. Janigian, K. E. Wack, C. S. Baker, D. Beer Stolz, L. G. Griffith, *Tissue Eng* **2002**, *8*, 499-513.
- [259] E. W. Esch, A. Bahinski, D. Huh, *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 248-260.
- [260] P. Godoy, N. J. Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J. G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Bottger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C. S. Cho, Y. J. Choi, J. C. Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M. T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. P. Goldring, M. J. Gomez-Lechon, G. M. M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Haussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhutter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J. M. Kelm, B. K. Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. B. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. K. Stelzer, B. Stieger, R. Stober, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T. S. Weiss, A. Widera, C. G. Woods, J. J. Xu, K. M. Yarborough, J. G. Hengstler, *Arch Toxicol* **2013**, *87*, 1315-1530.
- [261] A. Kamiya, T. Kinoshita, Y. Ito, T. Matsui, Y. Morikawa, E. Senba, K. Nakashima, T. Taga, K. Yoshida, T. Kishimoto, A. Miyajima, *EMBO J* **1999**, *18*, 2127-2136.
- [262] A. Kamiya, N. Kojima, T. Kinoshita, Y. Sakai, A. Miyajima, *Hepatology* **2002**, *35*, 1351-1359.
- [263] T. Kinoshita, T. Sekiguchi, M. J. Xu, Y. Ito, A. Kamiya, K. Tsuji, T. Nakahata, A. Miyajima, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 7265-7270.
- [264] N. Tanimizu, A. Miyajima, K. E. Mostov, *Mol Biol Cell* **2007**, *18*, 1472-1479.
- [265] M. Imamura, T. Kojima, M. Lan, S. Son, M. Murata, M. Osanai, H. Chiba, K. Hirata, N. Sawada, *Exp Cell Res* **2007**, *313*, 1951-1962.
- [266] P. Klausen, L. Pedersen, J. Jurlander, H. Baumann, *Oncogene* **2000**, *19*, 3675-3683.
- [267] Y. Miyaoka, A. Miyajima, *Cell Div* **2013**, *8*, 8.
- [268] N. Tanimizu, H. Saito, K. Mostov, A. Miyajima, *J Cell Sci* **2004**, *117*, 6425-6434.
- [269] M. Okabe, Y. Tsukahara, M. Tanaka, K. Suzuki, S. Saito, Y. Kamiya, T. Tsujimura, K. Nakamura, A. Miyajima, *Development* **2009**, *136*, 1951-1960.
- [270] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 7276-7280.
- [271] K. J. Livak, S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, *PCR Methods Appl* **1995**, *4*, 357-362.
- [272] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, *Genome Res* **1996**, *6*, 986-994.
- [273] A. D. Medhurst, D. C. Harrison, S. J. Read, C. A. Campbell, M. J. Robbins, M. N. Pangalos, *J Neurosci Methods* **2000**, *98*, 9-20.
- [274] R. Lang, K. Pfeffer, H. Wagner, K. Heeg, *J Immunol Methods* **1997**, *203*, 181-192.
- [275] E. Eisenberg, E. Y. Levanon, *Trends Genet* **2003**, *19*, 362-365.
- [276] C. Grün, Karlsruher Institut für Technologie (Karlsruhe), **2015**.
- [277] N. Tanimizu, H. Saito, K. Mostov, A. Miyajima, *J Cell Sci* **2004**, *117*, 6425-6434.
- [278] R. E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. H. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu, C. M. Verfaillie, *J Clin Invest* **2002**, *109*, 1291-1302.
- [279] D. Grimm, J. S. Lee, L. Wang, T. Desai, B. Akache, T. A. Storm, M. A. Kay, *J Virol* **2008**, *82*, 5887-5911.
- [280] M. A. Goncalves, *Viol J* **2005**, *2*, 43.
- [281] R. W. Atchison, B. C. Casto, W. M. Hammon, *Science* **1965**, *149*, 754-756.
- [282] R. W. Atchison, B. C. Casto, W. M. Hammon, *Virology* **1966**, *29*, 353-357.
- [283] A. Srivastava, E. W. Lusby, K. I. Berns, *J Virol* **1983**, *45*, 555-564.
- [284] N. Muzyczka, K. I. Berns, *Mol Ther* **2015**, *23*, 807-808.



- [285] S. Salerno, C. Campana, S. Morelli, E. Drioli, L. De Bartolo, *Biomaterials* **2011**, *32*, 8848-8859.
- [286] S. S. Bale, I. Golberg, R. Jindal, W. J. McCarty, M. Luitje, M. Hegde, A. Bhushan, O. B. Usta, M. L. Yarmush, *Tissue Eng Part C-Me* **2015**, *21*, 413-422.
- [287] N. Fausto, *Hepatology* **2004**, *39*, 1477-1487.
- [288] B. Knight, B. Akhurst, V. B. Matthews, R. G. Ruddell, G. A. Ramm, L. J. Abraham, J. K. Olynyk, G. C. Yeoh, *J Hepatol* **2007**, *46*, 134-141.
- [289] T. G. Bird, S. Lorenzini, S. J. Forbes, *Cell Tissue Res* **2008**, *331*, 283-300.
- [290] A. W. Duncan, C. Dorrell, M. Grompe, *Gastroenterology* **2009**, *137*, 466-481.
- [291] J. S. Lee, J. Heo, L. Libbrecht, I. S. Chu, P. Kaposi-Novak, D. F. Calvisi, A. Mikaelyan, L. R. Roberts, A. J. Demetris, Z. Sun, F. Nevens, T. Roskams, S. S. Thorgeirsson, *Nat Med* **2006**, *12*, 410-416.
- [292] M. Tanaka, A. Miyajima, *Methods Mol Biol* **2012**, *826*, 25-32.
- [293] A. Armstrong, S. L. Eck, *Cancer Biol Ther* **2003**, *2*, 320-326.
- [294] F. Momburg, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling, P. Moller, *Cancer Res* **1987**, *47*, 2883-2891.
- [295] Y. Nishikawa, Y. Tokusashi, T. Kadohama, H. Nishimori, K. Ogawa, *Exp Cell Res* **1996**, *223*, 357-371.
- [296] A. Polini, L. Prodanov, N. S. Bhise, V. Manoharan, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Expert Opin Drug Discov* **2014**, *9*, 335-352.
- [297] O. C. Colgan, G. Ferguson, N. T. Collins, R. P. Murphy, G. Meade, P. A. Cahill, P. M. Cummins, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**, *292*, H3190-3197.
- [298] J. M. Tarbell, *Cardiovasc Res* **2010**, *87*, 320-330.
- [299] N. J. Abbott, *J Anat* **2002**, *200*, 629-638.
- [300] L. L. Rubin, J. M. Staddon, *Annu Rev Neurosci* **1999**, *22*, 11-28.
- [301] V. Siddharthan, Y. V. Kim, S. Liu, K. S. Kim, *Brain Res* **2007**, *1147*, 39-50.
- [302] L. Cucullo, M. S. McAllister, K. Kight, L. Krizanac-Bengez, M. Marroni, M. R. Mayberg, K. A. Stanness, D. Janigro, *Brain Res* **2002**, *951*, 243-254.
- [303] S. Y. Wang, K. L. Mak, L. Y. Chen, M. P. Chou, C. K. Ho, *Immunology* **1992**, *77*, 298-303.
- [304] PromoCell, Heidelberg, **2015**.
- [305] Z. Mamdouh, G. E. Kreitzer, W. A. Muller, *J Exp Med* **2008**, *205*, 951-966.
- [306] P. T. Sage, C. V. Carman, *Front Biosci* **2009**, *14*, 5066-5083.
- [307] M. Nieminen, T. Henttinen, M. Merinen, F. Marttila-Ichihara, J. E. Eriksson, S. Jalkanen, *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 156-162.
- [308] C. V. Carman, T. A. Springer, *J Cell Biol* **2004**, *167*, 377-388.
- [309] Z. Mamdouh, A. Mikhailov, W. A. Muller, *J Exp Med* **2009**, *206*, 2795-2808.
- [310] C. V. Carman, P. T. Sage, T. E. Sciuto, M. A. de la Fuente, R. S. Geha, H. D. Ochs, H. F. Dvorak, A. M. Dvorak, T. A. Springer, *Immunity* **2007**, *26*, 784-797.
- [311] J. Millan, L. Hewlett, M. Glyn, D. Toomre, P. Clark, A. J. Ridley, *Nat Cell Biol* **2006**, *8*, 113-U115.
- [312] P. E. Rautou, A. S. Leroyer, B. Ramkhalawon, C. Devue, D. Duflaut, A. C. Vion, G. Nalbhone, Y. Castier, G. Leseche, S. Lehoux, A. Tedgui, C. M. Boulanger, *Circ Res* **2011**, *108*, 335-U156.
- [313] T. P. Lozito, R. S. Tuan, *J Cell Mol Med* **2014**, *18*, 2372-2384.
- [314] M. Ratz, I. Testa, S. W. Hell, S. Jakobs, *Sci Rep-Uk* **2015**, *5*.
- [315] A. N. Garcia, S. M. Vogel, Y. A. Komarova, A. B. Malik, *Methods Mol Biol* **2011**, *763*, 333-354.
- [316] W. Yuan, Y. Lv, M. Zeng, B. M. Fu, *Microvasc Res* **2009**, *77*, 166-173.
- [317] P. M. Dohmen, A. Pruss, C. Koch, A. C. Borges, W. Konertz, *J Tissue Eng* **2013**, *4*, 2041731413504777.
- [318] J. M. Gonzalez Santos, J. Lopez Rodriguez, M. J. Dalmau Sorli, *Rev Esp Cardiol* **2005**, *58*, 1207-1223.
- [319] C. V. Borlongan, J. G. Lind, O. Dillon-Carter, G. Yu, M. Hadman, C. Cheng, J. Carroll, D. C. Hess, *Brain Res* **2004**, *1010*, 108-116.
- [320] R. D. Hurst, I. B. Fritz, *J Cell Physiol* **1996**, *167*, 81-88.
- [321] R. R. Shivers, F. E. Arthur, P. D. Bowman, *J Submicrosc Cytol Pathol* **1988**, *20*, 1-14.
- [322] G. Li, M. J. Simon, L. M. Cancel, Z. D. Shi, X. Ji, J. M. Tarbell, B. Morrison, 3rd, B. M. Fu, *Ann Biomed Eng* **2010**, *38*, 2499-2511.

- [323] K. Yamagata, M. Tagami, Y. Nara, M. Mitani, A. Kubota, H. Fujino, F. Numano, T. Kato, Y. Yamori, *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1997**, *24*, 710-713.
- [324] F. E. Arthur, R. R. Shivers, P. D. Bowman, *Brain Res* **1987**, *433*, 155-159.
- [325] K. Maxwell, J. A. Berliner, P. A. Cancilla, *Brain Res* **1987**, *410*, 309-314.
- [326] M. E. O'Donnell, A. Martinez, D. Sun, *Am J Physiol* **1995**, *268*, C747-754.
- [327] T. J. Raub, S. L. Kuentzel, G. A. Sawada, *Exp Cell Res* **1992**, *199*, 330-340.
- [328] Y. Igarashi, H. Utsumi, H. Chiba, Y. Yamada-Sasamori, H. Tobioka, Y. Kamimura, K. Furuuchi, Y. Kokai, T. Nakagawa, M. Mori, N. Sawada, *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *261*, 108-112.
- [329] K. Sobue, N. Yamamoto, K. Yoneda, M. E. Hodgson, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, T. Tsuda, H. Katsuya, Y. Miura, K. Asai, T. Kato, *Neurosci Res* **1999**, *35*, 155-164.
- [330] N. D. Tran, J. Correale, S. S. Schreiber, M. Fisher, *Stroke* **1999**, *30*, 1671-1678.
- [331] J. H. Tao-Cheng, Z. Nagy, M. W. Brightman, *J Neurosci* **1987**, *7*, 3293-3299.
- [332] Y. Hayashi, M. Nomura, S. I. Yamagishi, S. I. Harada, J. Yamashita, H. Yamamoto, *Glia* **1997**, *19*, 13-26.
- [333] R. Balabanov, P. Dore-Duffy, *J Neurosci Res* **1998**, *53*, 637-644.
- [334] C. H. Lai, K. H. Kuo, *Brain Res Brain Res Rev* **2005**, *50*, 258-265.
- [335] PromoCell, Heidelberg, **2015**.
- [336] G. Allt, J. G. Lawrenson, *Cells Tissues Organs* **2001**, *169*, 1-11.
- [337] D. E. Sims, *Can J Cardiol* **1991**, *7*, 431-443.
- [338] M. Fisher, *Stroke* **2009**, *40*, S13-15.
- [339] D. Shepro, N. M. Morel, *Faseb J* **1993**, *7*, 1031-1038.
- [340] D. DeNofrio, T. C. Hoock, I. M. Herman, *J Cell Biol* **1989**, *109*, 191-202.
- [341] V. Nehls, D. Drenckhahn, *Histochemistry* **1993**, *99*, 1-12.
- [342] M. Papetti, J. Shujath, K. N. Riley, I. M. Herman, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003**, *44*, 4994-5005.
- [343] S. Agnihotri, A. Wolf, D. Picard, C. Hawkins, A. Guha, *Oncogene* **2009**, *28*, 3033-3046.
- [344] Science Cell™ Research Laboratories, **2015**.
- [345] M. C. Lewis, B. D. MacArthur, J. Malda, G. Pettet, C. P. Please, *Biotechnol Bioeng* **2005**, *91*, 607-615.
- [346] A. B. Adesida, A. Mulet-Sierra, L. Laouar, N. M. Jomha, *PLoS One* **2012**, *7*.
- [347] W. Loscher, H. Potschka, *Prog Neurobiol* **2005**, *76*, 22-76.
- [348] M. Iwahana, N. Utoguchi, T. Mayumi, M. Goryo, K. Okada, *Anticancer Res* **1998**, *18*, 2977-2980.
- [349] K. J. Jang, A. P. Mehr, G. A. Hamilton, L. A. McPartlin, S. Chung, K. Y. Suh, D. E. Ingber, *Integr Biol (Camb)* **2013**, *5*, 1119-1129.
- [350] L. M. Tai, A. J. Loughlin, D. K. Male, I. A. Romero, *J Cereb Blood Flow Metab* **2009**, *29*, 1079-1083.
- [351] M. A. Barrand, K. J. Robertson, S. F. von Weikersthal, *FEBS Lett* **1995**, *374*, 179-183.
- [352] A. Regina, A. Koman, M. Piciotti, B. El Hafny, M. S. Center, R. Bergmann, P. O. Couraud, F. Roux, *J Neurochem* **1998**, *71*, 705-715.
- [353] S. Seetharaman, M. A. Barrand, L. Maskell, R. J. Scheper, *J Neurochem* **1998**, *70*, 1151-1159.
- [354] D. Virgintino, D. Robertson, M. Errede, V. Benagiano, F. Girolamo, E. Maiorano, L. Roncali, M. Bertossi, *J Histochem Cytochem* **2002**, *50*, 1671-1676.
- [355] D. S. Miller, S. N. Nobmann, H. Gutmann, M. Toeroek, J. Drewe, G. Fricker, *Mol Pharmacol* **2000**, *58*, 1357-1367.
- [356] J. H. Sung, J. Yu, D. Luo, M. L. Shuler, J. C. March, *Lab Chip* **2011**, *11*, 389-392.
- [357] P. M. van Midwoud, E. Verpoorte, G. M. Groothuis, *Integr Biol (Camb)* **2011**, *3*, 509-521.
- [358] Y. Yang, J. Li, X. Pan, P. Zhou, X. Yu, H. Cao, Y. Wang, L. Li, *Biotechnol Bioeng* **2013**, *110*, 958-968.
- [359] A. Sivaraman, J. K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B. J. Hogan, D. B. Stolz, R. Fry, L. D. Samson, S. R. Tannenbaum, L. G. Griffith, *Curr Drug Metab* **2005**, *6*, 569-591.
- [360] I. Wagner, E. M. Materne, S. Brincker, U. Sussbier, C. Fradrich, M. Busek, F. Sonntag, D. A. Sakharov, E. V. Trushkin, A. G. Tonevitsky, R. Lauster, U. Marx, *Lab Chip* **2013**, *13*, 3538-3547.
- [361] M. J. Gomez-Lechon, J. V. Castell, M. T. Donato, *Expert Opin Drug Met* **2008**, *4*, 837-854.



- [362] S. Zellmer, W. Schmidt-Heck, P. Godoy, H. Weng, C. Meyer, T. Lehmann, T. Sparna, W. Schormann, S. Hammad, C. Kreutz, J. Timmer, F. von Weizsacker, P. A. Thurmann, I. Merfort, R. Guthke, S. Dooley, J. G. Hengstler, R. Gebhardt, *Hepatology* **2010**, *52*, 2127-2136.
- [363] Y. Y. Duan, A. Catana, Y. Meng, N. Yamamoto, S. Q. He, S. Gupta, S. S. Gambhir, M. A. Zerna, *Stem Cells* **2007**, *25*, 3058-3068.
- [364] J. Cai, Y. Zhao, Y. X. Liu, F. Ye, Z. H. Song, H. Qin, S. Meng, Y. Z. Chen, R. D. Zhou, X. J. Song, Y. S. Guo, M. X. Ding, H. Deng, *Hepatology* **2007**, *45*, 1229-1239.
- [365] F. Berthiaume, P. V. Moghe, M. Toner, M. L. Yarmush, *Faseb J* **1996**, *10*, 1471-1484.
- [366] Y. Ito, T. Matsui, A. Kamiya, T. Kinoshita, A. Miyajima, *Hepatology* **2000**, *32*, 1370-1376.
- [367] BD, in *Customer Education Vorlesungsskript*, Heidelberg, **2000**.
- [368] BD, in *Training-Handbuch* **2002**.
- [369] D. T. Sasaki, S. E. Dumas, E. G. Engleman, *Cytometry* **1987**, *8*, 413-420.

9. Anhang

I. Adhäsion und Migration von Blutzellen (4.4.4.1)

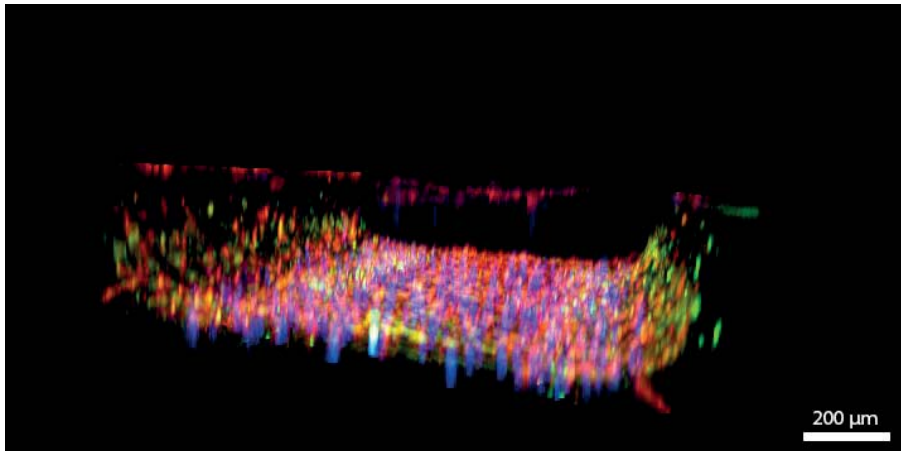


Abbildung 81: THP-1 Adhäsion im porösen PC-Mikroanal des $\mu 3D Vasc$ Bioreaktors, Tag 8 (z-Stapel). HUVEC ($1,25 \times 10^6$) wurden im Fibronectin (1 mg/ml)-beschichteten porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 400 μ l/min. Am 6. Tag wurden die HUVEC vor der Inkubation mit den THP-1 Zellen für 4 Stunden mit TNF- α (25 ng/ml) behandelt. THP-1 Zellen (1×10^7) wurden in die Mediumreservoirs überführt und für 24 Stunden bei einer Flussgeschwindigkeit von 400 μ l/min inkubiert. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die THP-1 Zellen zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml, blau) gefärbt. Der Nachweis der PECAM-1-Expression in HUVEC erfolgte mit dem monoklonalen, FITC-gekoppelten anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper (grün). Nach Abschluss des Experiments wurden die Zellen fixiert. Zur Visualisierung der Aktinfilamente der beiden Zelltypen wurde Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml, rot) verwendet. Die Kerne aller Zellen wurden mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml) markiert. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurde ein z-Stapel von 300 μ m (199 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. Maßstab = 200 μ m.

II. Untersuchung des Einflusses der Beschichtung auf die Permeabilität (4.4.4.2)

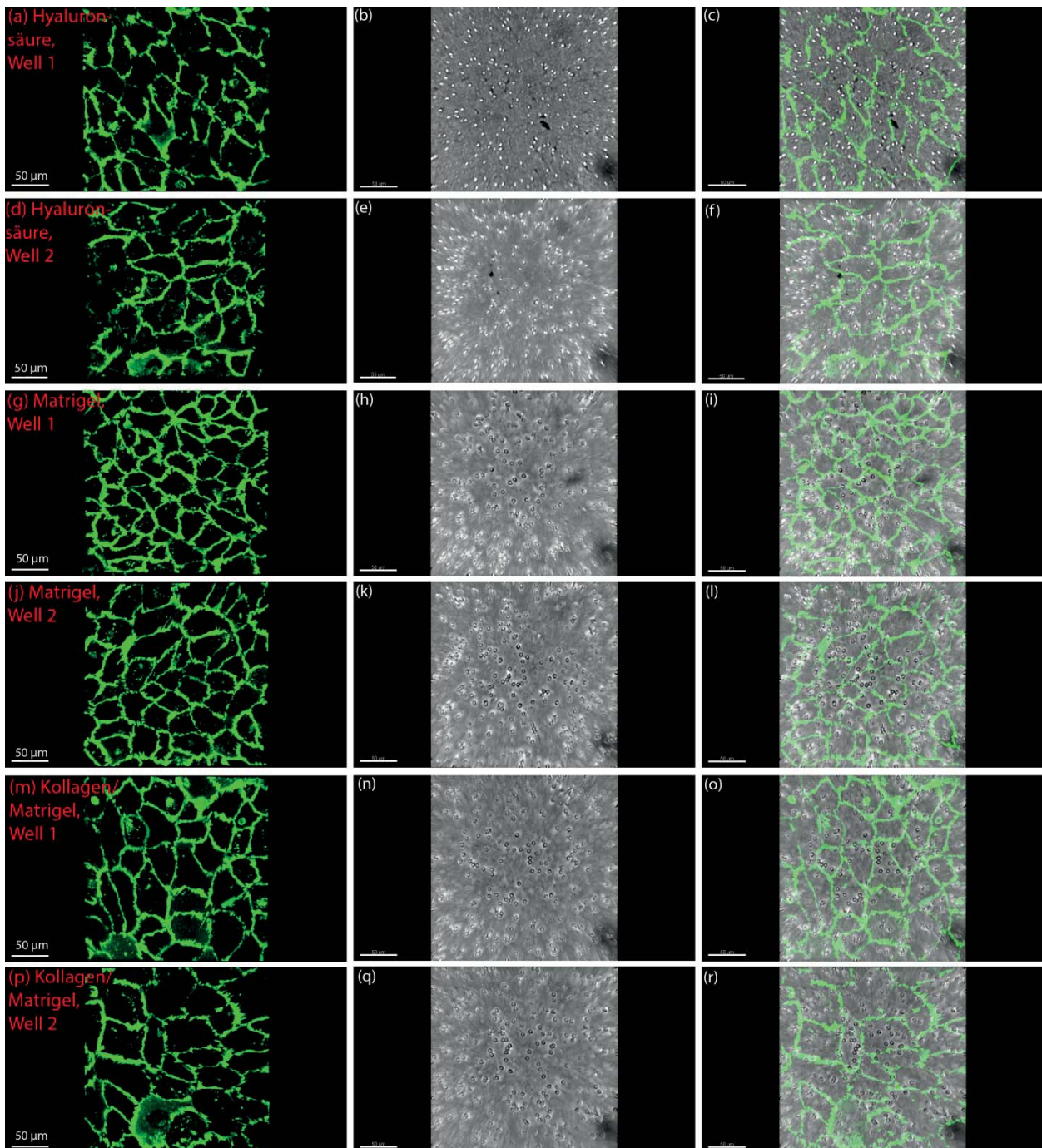


Abbildung 82: Einfluss der verschiedenen Beschichtungsarten auf die Permeabilität eines HUVEC-Layers, Tag 7 (z-Stapel). HUVEC (3×10^4) wurden auf der oberen Seite der mit Fibronectin (1 mg/ml)-beschichteten PC-Membran eines Transwell-Systems bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Rückseite der PC-Membran wurde entweder mit Hyaluronsäure (3,5 mg/ml), Kollagen (0,6 mg/ml), Matrigel (300 µg/ml) bzw. einem Gemisch aus Kollagen/Matrigel (50 µg/ml/300 µg/ml) beschichtet. Die Versorgung der Zellen erfolgte mit EGM-2. Der Nachweis der PECAM-1-Expression in den HUVEC erfolgte mit dem monoklonalen, anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a, d, g, j, m, p) Alexa Fluor® 488-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (b, e, h, k, n, q) Hellfeldaufnahme. (c, f, i, l, o, r) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. Maßstab = 50 µm.

III. Simulation der Partikelbewegung im leeren $\mu 3DVasc$ Bioreaktor (4.4.4.2)

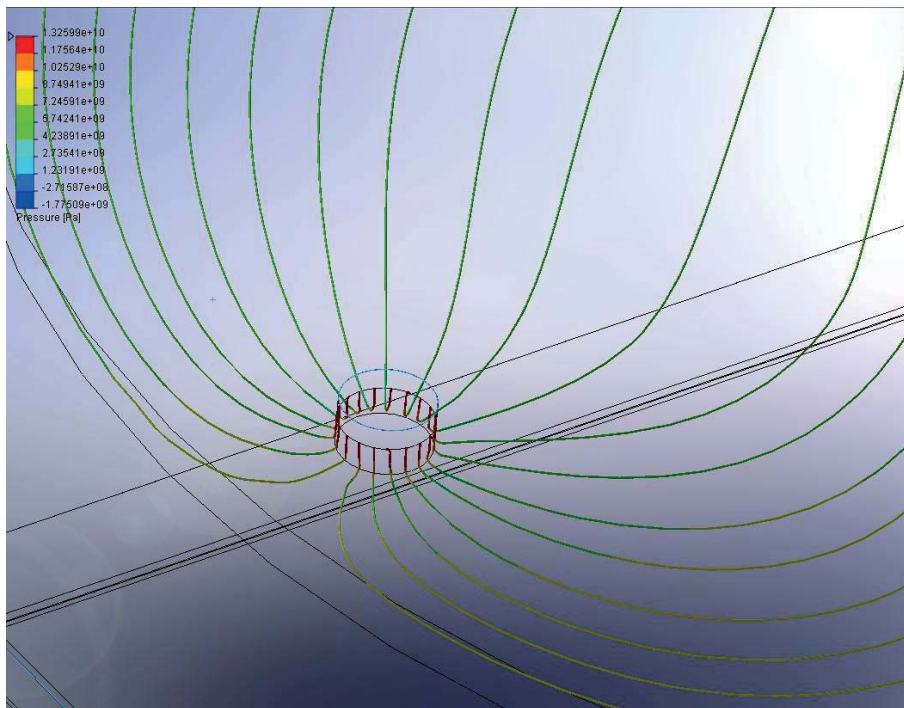


Abbildung 83: Einlass des PC-Mikrokanals.

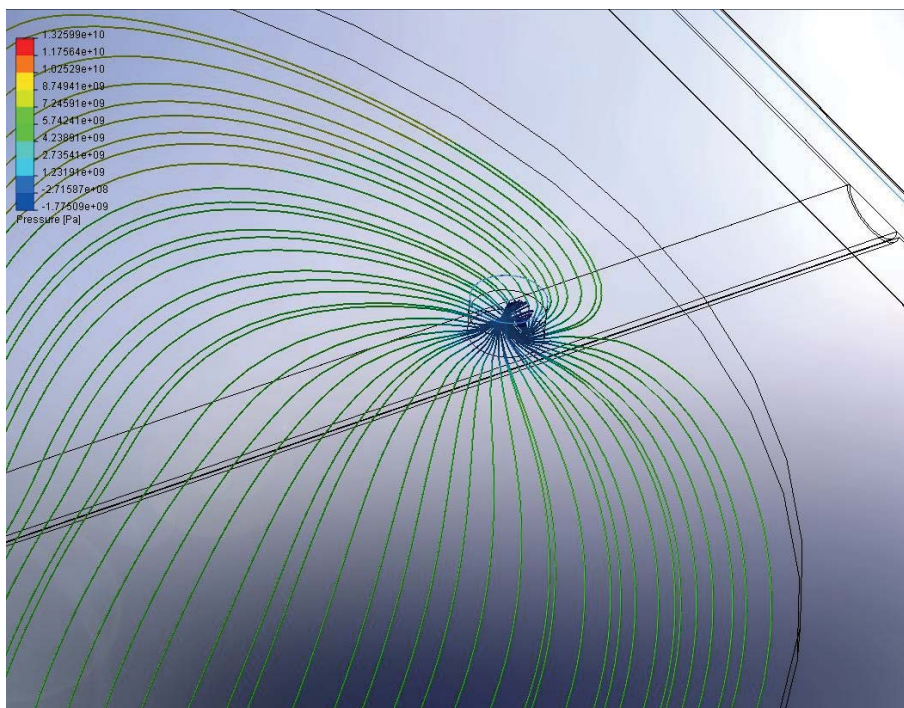


Abbildung 84: Auslass des PC-Mikrokanals.

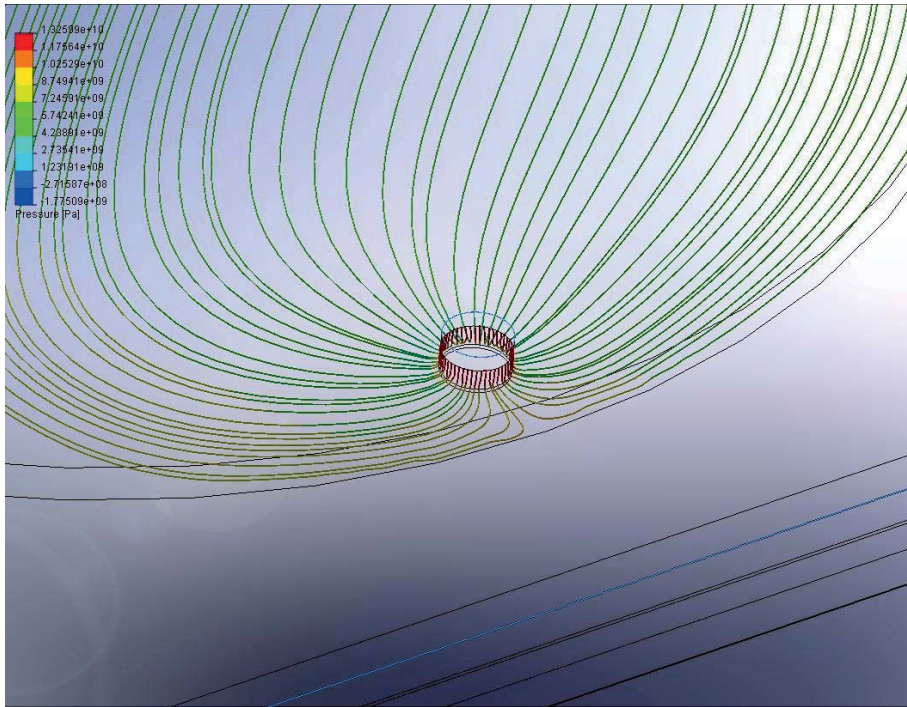


Abbildung 85: Einlass des unteren Kompartiments.

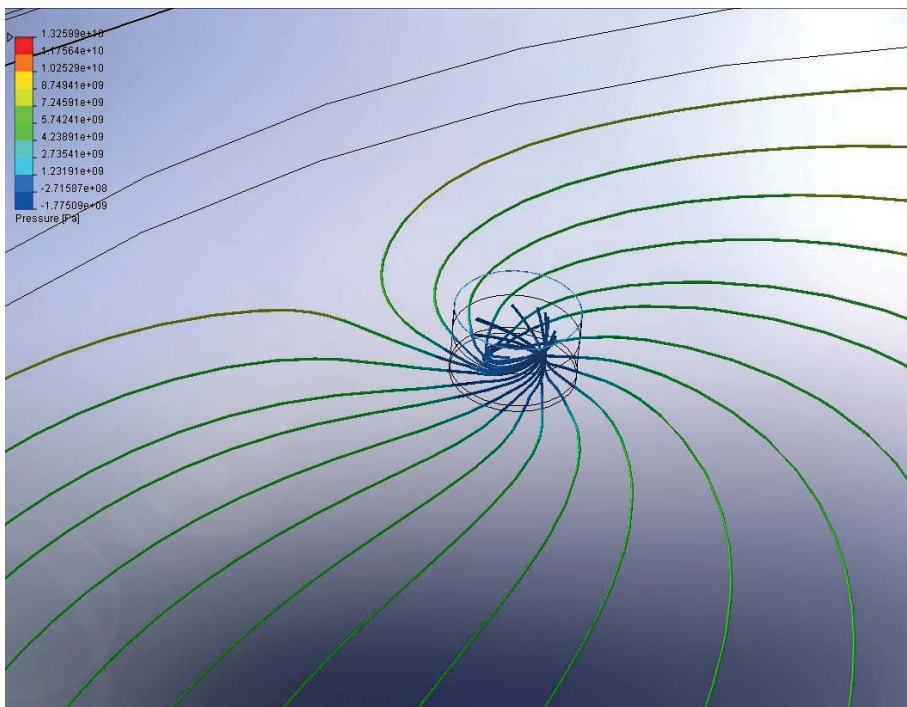


Abbildung 86: Auslass des unteren Kompartiments.

IV. EdU Nachweis der Proliferation von hPC-PL und HA (4.5.5)

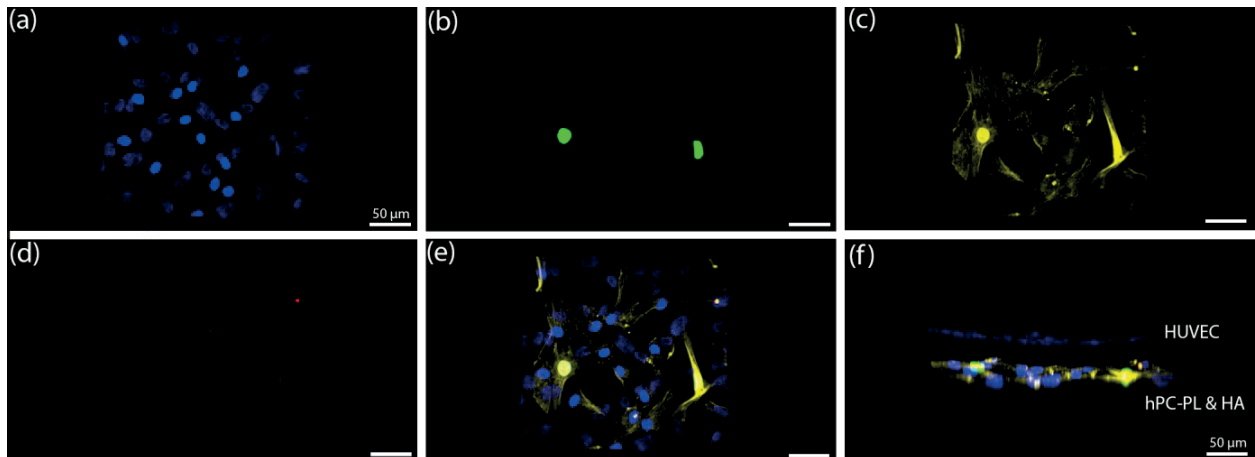


Abbildung 87: EdU Nachweis der Proliferation der hPC-PL und HA, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor, Tag 15 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HUVEC ($1,25 \times 10^5$) mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 µl/min. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit dem monoklonalen anti-human- α -SMA-Maus-IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 568-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper durchgeführt. Die Visualisierung von HA erfolgte mit dem polyklonalen anti-human-GFAP-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 647-gekoppelten anti-Kaninchen-Huhn IgY Antikörper. 48 Stunden vor der Zugabe der Click-iT® Reaktionsmischung mit Alexa Fluor® 488 Azid wurde das EdU-Reagenz (10 µM) zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums wurde ein z-Stapel von 100 µm (60 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Imaris 6.4.2-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen der hPC-PL und HA, blau. (b) Alexa Fluor® 488-Färbung der hPC-PL- & HA-Replikation, grün. (c) Alexa Fluor® 568-Färbung der α -SMA-Expression in hPC-PL, gelb. (d) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression in HA, rot. (e, f) Überlagerung. (e) Projektion des Lumens des PC-Mikrokanals. (f) Seitliche Projektion des PC-Mikrokanals. Maßstab = 50 µm.

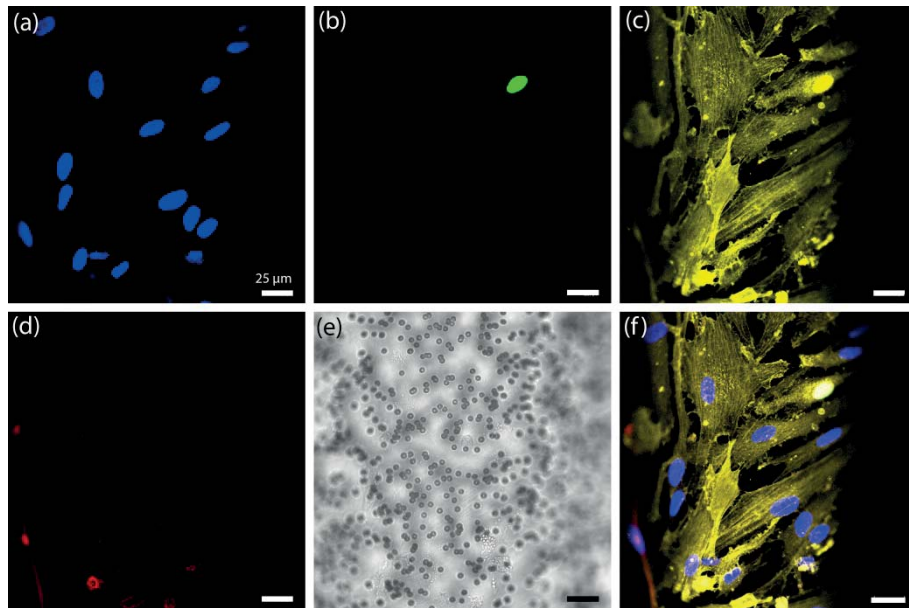


Abbildung 88: EdU Nachweis der Proliferation der hPC-PL und HA, kultiviert auf der Rückseite des PC-Mikrokanals im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 20 (z-Stapel). Die Zellkultivierung fand bei 37 °C und 5% CO₂ statt. Die Versorgung von HUVEC ($1,25 \times 10^6$) mit EGM-2 erfolgte mit einem Pumpensystem (ibidi®) mit einer Flussgeschwindigkeit von 450 μ l/min. Die Versorgung von hPC-PL (5×10^5) und HA (5×10^5) erfolgte mit EGM-2 über den porösen PC-Mikrokanal. Die Visualisierung von hPC-PL wurde mit dem monoklonalen anti-human- α -SMA-Maus-IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 568-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper durchgeführt. Die Visualisierung von HA erfolgte mit dem polyklonalen anti-human-GFAP-Kaninchen IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 647-gekoppelten anti-Kaninchen-Huhn IgY Antikörper. 48 Stunden vor der Zugabe der Click-iT® Reaktionsmischung mit Alexa Fluor® 488 Azid wurde das EdU-Reagenz (10 μ M) zu den Zellen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen von HA und hPC-PL, blau. (b) Alexa Fluor® 488-Färbung der HA- & hPC-PL-Replikation, grün. (c) Alexa Fluor® 568-Färbung der α -SMA-Expression in hPC-PL, gelb. (d) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression in HA, rot. (e) Hellfeldaufnahme. (f) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 25 μ m.

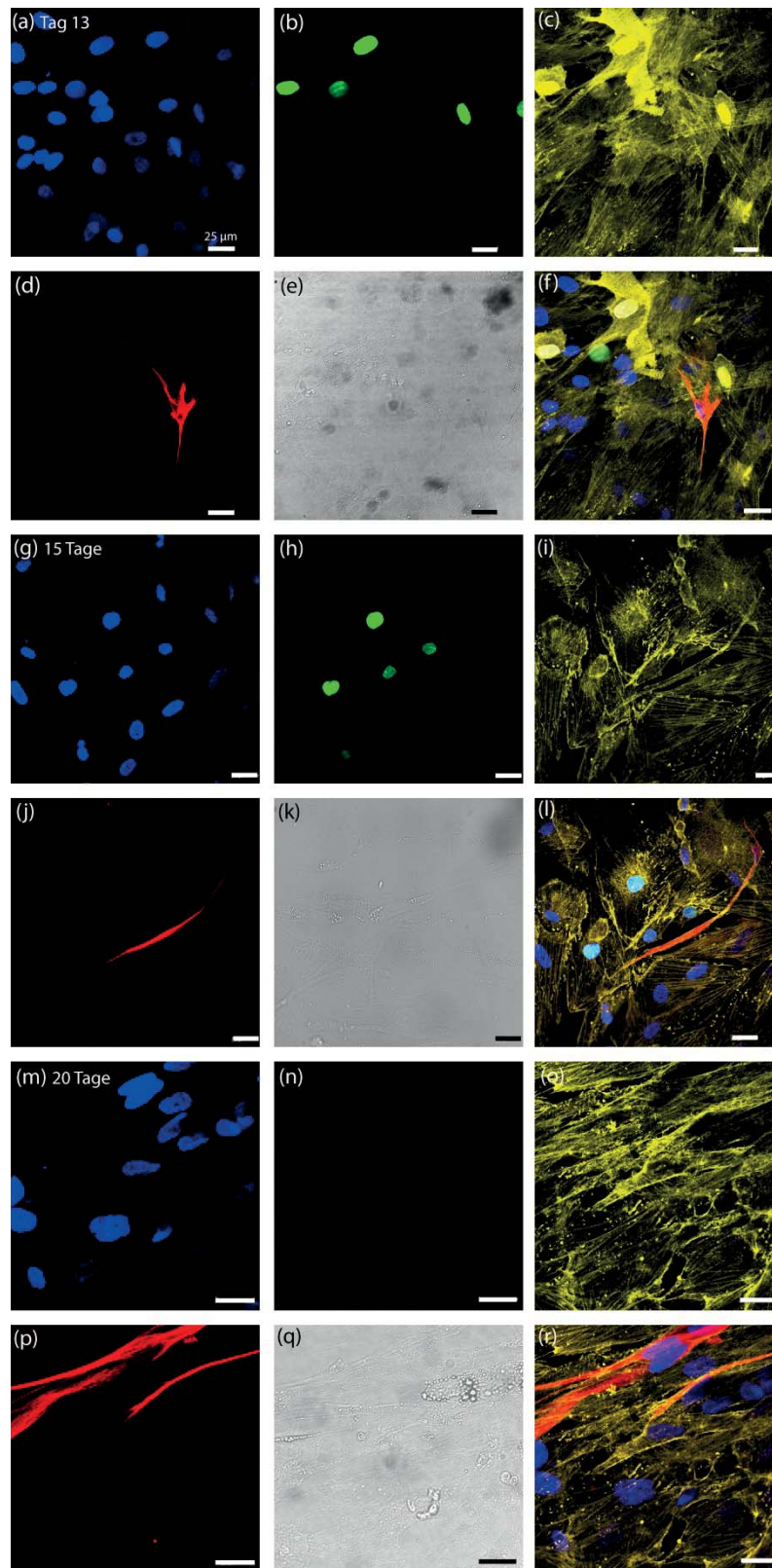


Abbildung 89: EdU Nachweis der Proliferation der hPC-PL (1×10^4) und HA (1×10^4), kultiviert in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte (konfokale Aufnahmen). Die Zellkultivierung, die Durchführung des Assays sowie die Visualisierung der Zellen erfolgten dem Nachweis in Bioreaktoren entsprechend. (a, g, m) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b, h, n) Alexa Fluor® 488-Färbung der HA- & hPC-PL-Zellreplikation, grün. (c, i, o) Alexa Fluor® 568-Färbung der α -SMA-Expression in hPC-PL, gelb. (d, j, p) Alexa Fluor® 647-Färbung der GFAP-Expression in HA, rot. (e, k, q) Hellfeldaufnahme. (f, l, r) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 25 μ m.

V. Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen hCMEC/D3 (4.5.9)

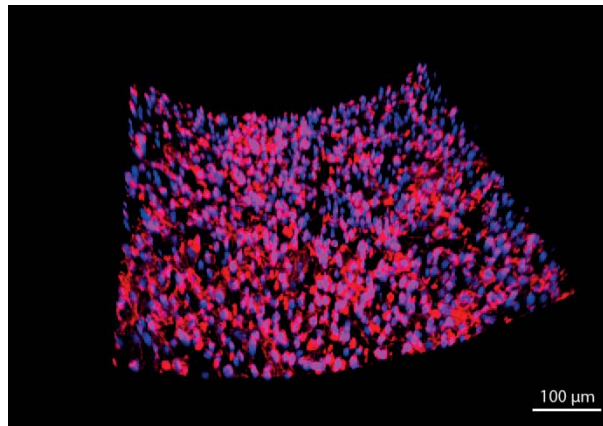


Abbildung 90: hCMEC/D3 im porösen PC-Mikrokanal unter mikrofluidischen Bedingungen im $\mu 3D Vasc$ Bioreaktor, Tag 8 (z-Stapel). hCMEC/D3 ($1,25 \times 10^6$) wurden im Kollagen (0,1 mg/ml)-beschichteten, porösen PC-Mikrokanal bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte mit einem Pumpensystem (Fusion 200, Chemyx) mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 μ l/h. Zur Visualisierung zellulärer Strukturen wurden die hCMEC/D3 zur Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 μ g/ml, blau) gefärbt. Die Aktinfilamente wurden mit dem Alexa Fluor® 546 Phalloidin (20 Units/ml, rot) markiert. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Zur Visualisierung des Zellwachstums im PC-Mikrokanal wurde ein z-Stapel von 130 μ m (50 Bilder) aufgenommen. Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mittels der Imaris 6.4.2-Software. Maßstab = 100 μ m.

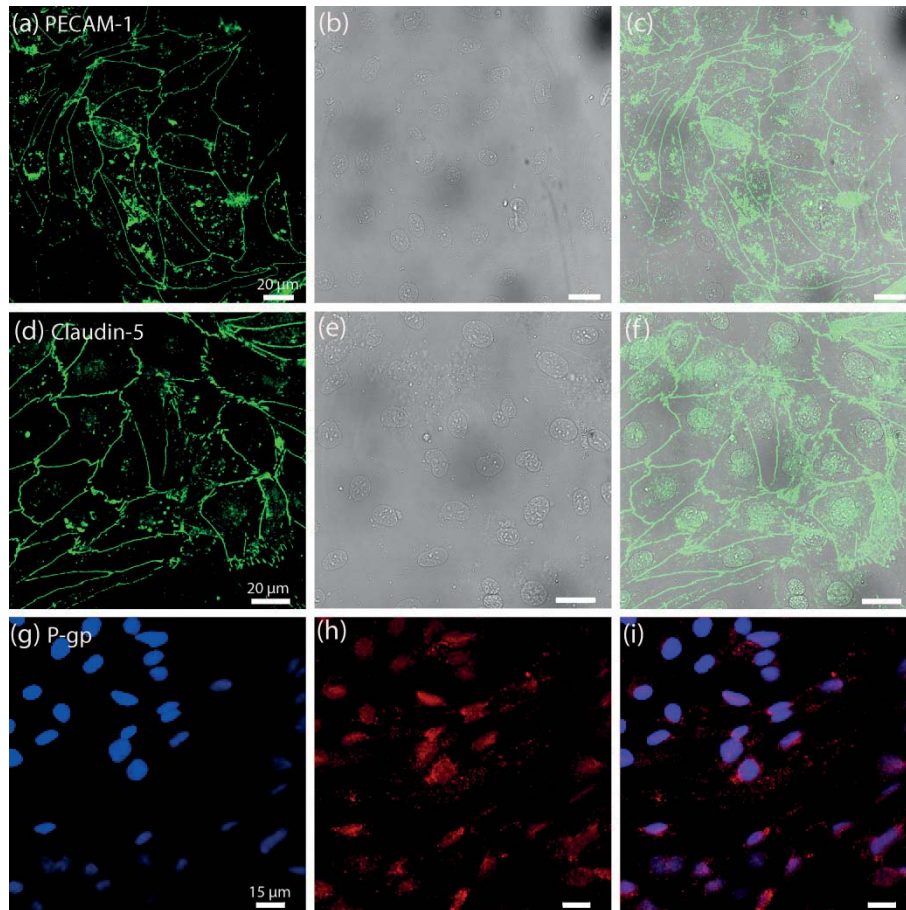


Abbildung 91: Expression von Claudin-5, PECAM-1 und P-gp in hCMEC/D3, kultiviert in einer μ -Slide 8 Well ibiTreat-Platte (konfokale Aufnahmen). Die Kultivierung von hCMEC/D3 (1×10^4) erfolgte unter statischen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ den Inkubationszeiten in Bioreaktoren entsprechend. Der Nachweis der PECAM-1-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-PECAM-1-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Der Nachweis der Claudin-5-Expression erfolgte mit dem monoklonalen anti-human-Claudin-5-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 488 gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper. Die P-gp-Expression wurde mit dem monoklonalen anti-human-P-gp-Maus IgG Antikörper und dem polyklonalen, Alexa Fluor® 546-gekoppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper durchgeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Leica LAS AF Lite-Software. (a) Alexa Fluor® 488-Färbung der PECAM-1-Expression, grün. (b, e) Hellfeldaufnahme. (c, f) Überlagerung mit Hellfeldaufnahme. (d) Alexa Fluor® 488-Färbung der Claudin-5-Expression, grün. (g) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (h) Alexa Fluor® 546-Färbung der P-gp-Expression, rot. (i) Überlagerung ohne Hellfeldaufnahme. Maßstab = 20 μ m (a – f) bzw. 15 μ m (g – i).



VI. Isolierung embryonaler Leber-Stammzellen (4.7.1)

Zur Isolierung der DLK⁺ Zellen wurde ein monoklonaler anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper verwendet. Die anderen Fc Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden blockiert, um ein Hintergrundsignal zu vermeiden. Die Sortierung der DLK⁺ Zellen erfolgte mit Zell Sortiereinrichtung MoFlo™ XDP SmartSampler (Beckman Coulter®). Dabei handelte es sich um die Durchflusszytometrie. Diese Technologie erlaubt es, gleichzeitig mehrere physikalische Parameter einer einzelnen Zelle in einer größeren Zellpopulation zu messen. Dabei werden Absorption, Reflektion und Streuung von Licht durch Zellen erfasst. Die Zellsuspension wird mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit, die eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt, durch die Messküvette transportiert. Die Messküvette hat eine Querschnittsverringering, durch die sowohl der laminare Proben- als auch der Hüllstrom beschleunigt und verjüngt wird, wobei es zu keiner Vermischung beider Strömungen kommt. Dieser Prozess wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Jede Zelle streut entsprechend ihrer Größe und Struktur das auftreffende Licht. Das vorwärts gestreute Licht (FSC = Forward scatter) entspricht der Zellgröße, das seitwärts gestreute Licht (SSC = Side scatter) der Zellgranularität. Enthalten die Zellen fluoreszierende Stoffe, wie z.B. Alexa Fluor® oder Propidiumiodid (PI), so werden diese durch das Laserlicht angeregt und emittieren daraufhin Licht entsprechender Wellenlänge.^[367, 368] PI wird für den Nachweis toter Zellen genutzt. PI ist positiv geladen und kann aus diesem Grund die Membran lebender Zellen nicht passieren, d.h. es kann nur in tote, beschädigte Zellen eindringen.^[369]

Die obere Reihe in Abbildung 92 stellt Leberzellen dar, die mit Hilfe des monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörpers und Zellsortierers MoFlo™ XDP SmartSampler aussortiert wurden. In Abbildung 92 (a) stellt die x-Achse die Zellgröße und die y-Achse das rote Signal des PI dar. Der ausgewählte Bereich R1 repräsentiert vitale Leberzellen. Signale rechts des R1 Bereiches zeigen Zelldebris. Zellen, deren Signal oberhalb des R1 Bereiches liegt, weisen eine hohe PI Fluoreszenz auf und sind damit nicht mehr lebendig. In Abbildung 92 (b) bzw. (e) ist die Zellgröße (FSC) gegen die Zellgranularität (SSC) dargestellt. Die untere Reihe zeigt die Negativkontrolle, bei der isolierte Leberzellen mit rat IgG_{2A}, k, FITC Antikörper inkubiert wurden. Die vitalen Zellen (R4, Abbildung 92 (d)) befinden sich innerhalb des R5 Gates (Abbildung 92 (f)). Die isolierten Leberzellen waren durch Autofluoreszenz gekennzeichnet. Diese Zellpopulation befindet sich im Graph rechts des Gates R5 bzw. R2. Der R2 Bereich in Abbildung 92 (c) enthält die DLK⁺ Zellen. Insgesamt wurden 3×10^5 Zellen aussortiert, wovon $1,1 \times 10^4$ DLK⁺ Hepatoblasten für die Generierung von HPPL-Zellen und der Rest für die Ausdifferenzierung in Hepatoblasten genutzt wurde. Die Anzahl der DLK⁺ Hepatoblasten betrug 10,48% der Gesamtzellzahl, wobei der Rest aus hämatopoetischen und endothelialen Zellen bestand.

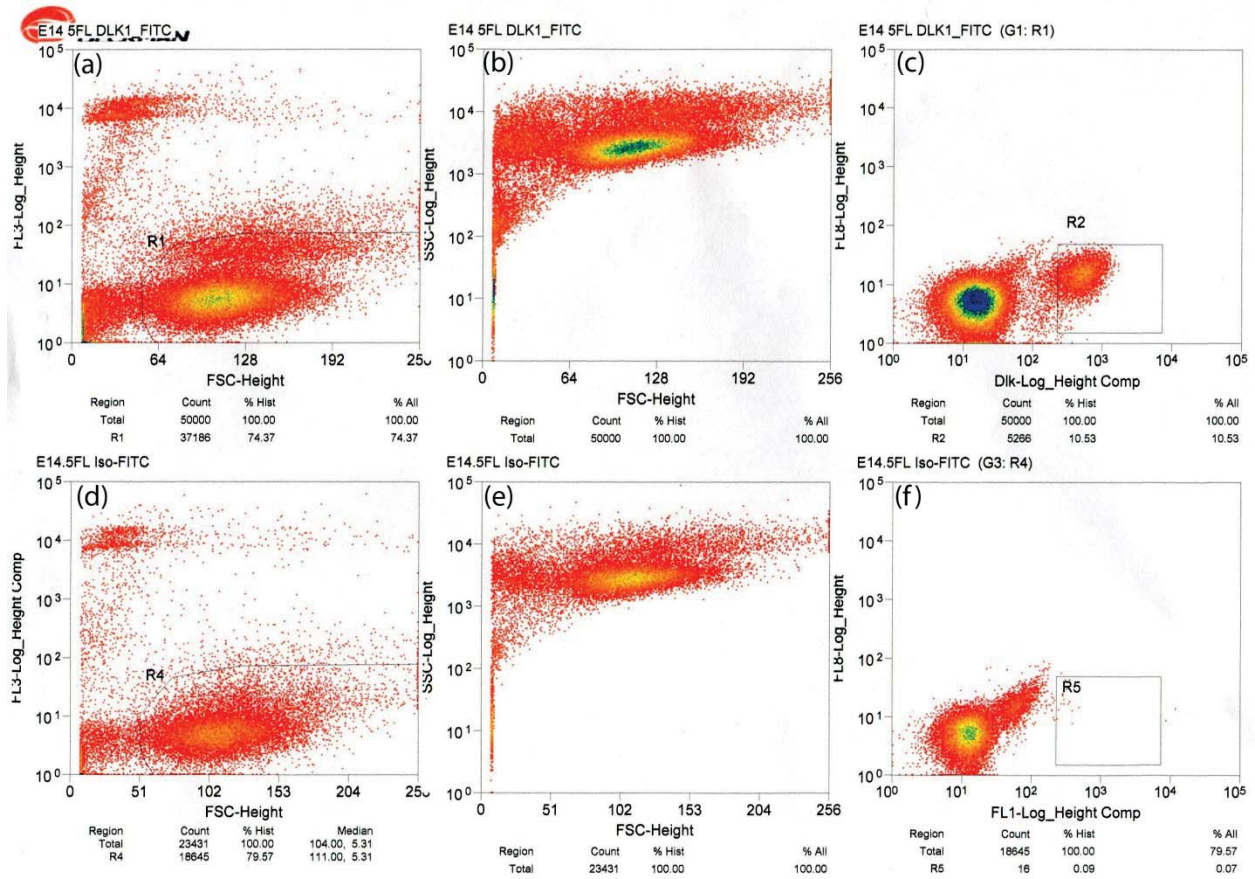


Abbildung 92: Eigenschaften der isolierten DLK⁺ Hepatoblasten. DLK⁺ Hepatoblasten wurden mit Hilfe von Zellsortierer MoFlo™ XDP SmartSampler (Beckman Coulter®) und dem monoklonalen anti-Maus-DLK-Ratte IgG Antikörper aus der murinen E14.5 Leberzellsuspension aussortiert und bildeten ca. 10% der Gesamtzellzahl. Als Negativkontrolle wurden die isolierten Leberzellen mit rat IgG_{2A}, k, FITC Antikörper inkubiert. Zur Bestimmung toter Zellen wurde PI eingesetzt.

VII. 3D-Zellkultur zur Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten (4.7.5)

Um die Spezifität des polyklonalen, Fluorescein-gekuppelten anti-Kaninchen-Ziege IgG Antikörpers bzw. des polyklonalen, Alexa Fluor® 555-gekuppelten anti-Maus-Ziege IgG Antikörper auszutesten, wurde eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt. Dafür wurden zwei Isotyp-Kontrollantikörper anti-Maus-Kaninchen IgG Antikörper bzw. Kaninchen IgG verwendet, die kein Antigen auf der Zelloberfläche binden sollten (Abbildung 93). In dieser Kontrolle wurde weder β -Catenin (Abbildung 93 c) noch CK19 (Abbildung 93 d) detektiert. Die Zellen bildeten eine Zyste, bestehend aus einem Monolayer, mit einer klaren apikalen Lokalisation der F-Aktinfilamente (Abbildung 93 b).

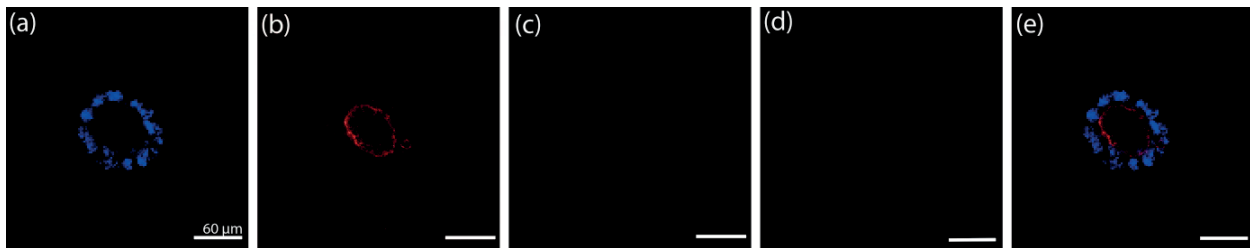


Abbildung 93: Isotyp-Kontrolle der Zystenbildung von etablierten HPPL-Zellen (konfokale Aufnahmen). HPPL-Zellen ($0,8 \times 10^4$) wurden mit 40% Matrigel vermischt und in einem Transwell-System bei 37 °C und 5% CO₂ über 8 Tage kultiviert. Die Versorgung der Zellen mit Medium erfolgte von apikaler und basaler Seite der 3D-Zellkultur. Als Isotyp-Kontrollantikörper wurden der polyklonale anti-Maus-Kaninchen IgG Antikörper und der polyklonale, Fluorescein-gekuppelte anti-Kaninchen-Ziege IgG bzw. der Kaninchen IgG Antikörper und der polyklonale, Alexa Fluor® 555-gekuppelte anti-Maus-Ziege IgG Antikörper verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Spezifikationen siehe 6.1). Die Auswertung erfolgte mit der Olympus Fluoview Ver. 3.1-Software. (a) Hoechst 33342-Färbung der DNA in Zellkernen, blau. (b) Alexa Fluor® 633 Phalloidin-Färbung der Aktinfilamente, rot. (c) Alexa Fluor® 488-Färbung der β -Catenin-Expression, grün. (d) Alexa Fluor® 555-Färbung der CK19-Expression, gelb. (e) Überlagerung. Maßstab = 60 μ m.



10. Lebenslauf

AKADEMISCHE KARRIERE

- 01/13 – 12/15 Promotion im Fach Chemie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT),
 BioInterfaces International Graduate School (BIF-IGS)
 „Simulation dreidimensionaler Gewebe in einem mikrofluidischen System
 (μ 3DVasc)“
 Betreuerin: Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für Toxikologie und Genetik)
- 12/13 – 03/14 Harvard Universität, Wyss Institut, Boston, MA, USA
 Gaststudentin
 Betreuer: Ph.D., MBA, FAHA A. Bahinski, Ass. Prof. A. van der Meer
 • Etablierung einer humanen *in vitro* Blut-Hirn-Schranke
- 08/13 Universität Tokio, Tokio, Japan
 Gaststudentin
 Betreuer: Prof. A. Miyajima, Assoc. Prof. M. Tanaka
 • Isolierung, Charakterisierung und Ausdifferenzierung fetaler und adulter
 Stammzellen der Maus-Leber zur Generierung eines *in vitro* Lebermodells
- 10/10 – 12/12 Masterstudium der chemischen Biologie am Karlsruher Institut für Technologie
 (KIT), Note 1,2
 „Etablierung einer 3D organotypischen Zellkultur für ein mikrovaskuläres
 System“
 Betreuerin: Prof. Dr. Ute Schepers (Institut für Toxikologie und Genetik)
- 10/07 – 07/10 Bachelorstudium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie (KIT),
 Note 1,3
 "Funktionelle Analyse von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen und
 Polysialyltransferasen im Zebrabärbling“
 Betreuer: Prof. Dr. Martin Bastmeyer (Zell- und Neurobiologie)
- 09/03 – 07/07 Abitur am Georgius-Agricola-Gymnasium, Glauchau, Note 1,9

INDUSTRIEERFAHRUNG

- 10/11 – 03/12 Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
 Praktikantin
 Betreuerin: Dipl.-Ing. (FH) S. Bopp
 • Expression, Detektion und Funktionsanalyse von Proteinen nach transienter
 Transfektion in Säugetierzellen



STIPENDIEN

12/14	BIF-IGS, „9th peptoid summit“, Berkeley, CA, USA
07/14	DAAD, Konferenz „WC9 on Alternatives in the Life Sciences“, Prag, Tschechische Republik
06/14	BIF-IGS, Konferenz GRC “Neurobiology of Brain Disorders”, Girona, Spanien
04/14	KHYS (Karlsruhe House of Young Scientists) „Veranstaltungsunterstützung“, Doktoranden-Retreat
12/13	FAZIT Stiftung, Nobelpreisträger-Kongress GYSS@one-north, Singapur, Singapur
12/13 – 03/14	KHYS „Auslandsstipendium“, Wyss Institut, Boston, MA, USA
09/13 – 12/15	e-fellows.net Stipendium
07/13 – 12/15	CARL ZEISS Stiftung, Promotionsförderung
03/13	KHYS „Kontakte knüpfen“, Universität Tokio, Tokio, Japan

PUBLIKATIONEN

[1] van der Meer AD, Ivannikov D, Sleeboom JJF, Barrile R, van der Helm MW, Rapp BE, Hinojosa C, Bahinski A, Schepers U, Ingber DE: Determining permeability coefficients in organs-on-chips. In Vorbereitung.

[2] Hebeiss I*, Nikolov Mitkov P*, Ivannikov D*, Srigunapalan S, Chebotarev O, Leng L, Watson MWL, Belyaev Y, Truckenmüller R, Wheeler A, Guenther A, Simmons C, Giselbrecht S, Schepers U: In Vitro Microvascular Platform for Real-time Monitoring of Transendothelial Migration of Monocytes (*equal author contribution). In Vorbereitung.

KONFERENZBEITRÄGE

08/2015	9th peptoid summit, Berkeley, CA, USA Poster: Ivannikov D., Hebeiß I., Grün C., Bräse S., Schepers U.: $\mu 3DVasc$: A new microfluidic tool for the analysis of transendothelial transport of polycationic peptoid transporters <i>in vitro</i> .
06/2015	4th International Conference Strategies in Tissue Engineering, Würzburg/D Vortrag: “ $\mu 3DVasc$: A blood vessel scaffold for the reconstruction of 3D blood-brain-barrier <i>in vitro</i> ”.
10/2014	Carl Zeiss Stiftung, Kolloquium, Mainz/D Poster: Ivannikov D., Hebeiß I., Nikolov P., Giselbrecht S., Schepers U.: $\mu 3DVasc$: A blood vessel scaffold for the reconstruction of a 3D Blood-Brain-Barrier <i>in vitro</i> .
08/2014	9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag, Tschechische Republik Poster: Ivannikov D., Gruen C., Hebeiß I., Nikolov P., Giselbrecht S., van der Meer A., Bahinski A., Schepers U.: $\mu 3DVasc$: a novel microfluidic bioreactor setup for the reconstruction of vascularized 3D tissues <i>in vitro</i> .



- 07/2014 Gordon Research Conference „Neurobiology of Brain Disorders“, Girona, Spanien
Poster: Ivannikov D., Hebeiß I., Nikolov P., Giselbrecht S., Schepers U.: $\mu 3DVasc$: A blood vessel scaffold for the reconstruction of a 3D Blood-Brain-Barrier *in vitro*.
- 12/2013 International Symposium on Synthetic Biology, Heidelberg/D
Poster: Ivannikov D., Kappings V., Hebeiß I., Nikolov P., Giselbrecht S., Schepers U.: $\mu 3DVasc$: A blood vessel scaffold for the reconstruction of 3D-tissues *in vitro*.
- 11/2013 Carl Zeiss Stiftung, Kolloquium, Oberkochen/D
Poster: Ivannikov D., Nikolov P., Hebeiß I., Gerwald A., Giselbrecht S., Schepers U.: Establishment of a 3D organotypic cell culture for a microvascular system $\mu 3DVasc$.

ZUSATZQUALIFIKATIONEN

- 03/15 Entrepreneurship Training, Manchester Business School, Manchester, England
- 04/15 Gute Laborpraxis (GLP)/ gute Herstellungspraxis (GMP), FTU
(Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt), KIT, Karlsruhe, Deutschland
- 10/14 From Invention to Innovation, KIT, Karlsruhe, Deutschland
- 06/14 – 10/15 X-Ment Mentoring Programm, PEBA (Personalentwicklung und Berufliche Ausbildung), KIT, Karlsruhe, Deutschland
- 05/14 Research Management Training (ReMaT), Brüssel, Belgien
- 05/14 Führung für Promovierende, KIT Career Service, Karlsruhe, Deutschland
- 09/13 – 09/14 Organisation des BIF-IGS Doktoranden-Retreats, KIT, Herrenberg, Deutschland





11. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen ELTERN, GROßELTERN und meiner SCHWESTER, die mich bei meinen Entscheidungen stets unterstützt haben. Außerdem will ich mich bei meinem ONKEL ALEXEJ bedanken, auf den ich mich immer verlassen kann. Nicht zuletzt möchte ich mich bei Euch für die finanzielle Unterstützung im Laufe meines Studiums bedanken, ohne die dieser Abschluss nicht möglich wäre.

Ich danke ganz besonders meinem FREUND ALEX für seine tatkräftige Unterstützung. Danke für Dein geduldiges Zuhören, Deine Aufmunterungen und Dein Verständnis.

UTE SCHEPERS danke ich für die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt arbeiten zu dürfen. Vielen Dank für die Betreuung, zahlreichen Diskussionen, den fachlichen Austausch und Dein ständiges Engagement.

CHRISTOF NIEMEYER danke ich für die Übernahme des Korreferats. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit, am IBG 1 arbeiten zu dürfen, bedanken.

STEFAN BRÄSE danke ich für die Teilnahme am TAC Komitee und die anregenden Diskussionen.

BASTIAN RAPP und STEFAN GISELBRECHT, zwei anderen Vorsitzenden meines TAC Komitees, danke ich für die zahlreichen fachlichen Hilfestellungen. Vielen Dank für Euren ständigen tatkräftigen Einsatz.

ANDRIES VAN DER MEER gilt mein besonderer Dank. Deine fachliche und praktische Betreuung haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

CHRISTIN BEDNAREK danke ich für die unermüdliche Betreuung meiner Arbeit und die aufmunternden Gespräche.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Betreuern im Ausland bedanken. ANTHONY BAHINSKI danke ich für die Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes am Wyss Institut. Ich bedanke mich ebenfalls bei ATSUSHI MIYAJIMA und MINORU TANAKA für eine sehr produktive Zusammenarbeit in Japan. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der beiden Arbeitskreise bedanken, welche mich sehr herzlich aufgenommen und nicht nur im Labor, sondern auch privat unterstützt haben.

GERT FRICKER danke ich für die Kollaboration am HEIKA Projekt und für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Des Weiteren möchte ich mich bei MELANIE OTT, ALEXANDER ZAREMBA und ANNE MAHRINGER für die intensive Unterstützung im Labor bedanken.

PAVEL NIKOLOV danke ich für die vielen Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben. Ohne Dein Wissen und Engagement wäre die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.



Ebenfalls möchte ich mich bei ISABELLA HEBEIB für ihre hilfreichen Ratschläge und die Förderung der Arbeit in ihrer Anfangsphase bedanken. Danke ebenfalls für die spätere private Unterstützung.

Bei allen Mitarbeitern von IBG 1, insbesondere ANKE DECH, TIM SCHARNWEBER, ANN-KATHRIN SCHNEIDER, DAVID THIELE, SIMONE WEIGEL und CORNELIA ZIEGLER, möchte ich mich für die freundliche Aufnahme am Institut bedanken.

MARKUS REISCHL danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der Mikroskopie-Daten.

PAUL ABAFFY möchte ich für die Aufnahme der Elektronenmikroskopie-Daten danken. Bei ELISABETH WILHELM bedanke ich mich für die wertvollen Hilfestellungen auf dem Gebiet der Mikrofluidik.

ALEX GERWALD danke ich für die Produktion von Bioreaktoren in der Anfangsphase des Projekts.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Arbeitskolleginnen und Freundinnen CARMEN SEIDL, FRANZISKA RÖNICKE und MANUELA WALLECH. Ohne Euch wäre die Zeit nur halb so spannend gewesen. Danke für die vielen Gespräche, tolle Erlebnisse und eure große Unterstützung in guten und schlechten Zeiten.

CHRISTOPH GRÜN, VANESSA KAPPINGS, EVA ZITTEL und BETTINA OLSHAUSEN danke ich für ihre Unterstützung auf dem Projekt und die unvergessliche Zeit im Labor 224. Meinen weiteren Arbeitskollegen, JUDITH SELTENREICH, ILONA WEHL und BIANKA GROSSHÄUSER, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Freunde NATALIE, KATRIN, MARINA, SARAH, CHRISTIN und JANINA, die mir immer den Rücken gestärkt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei der Graduiertenschule BIF-IGS und LARISSA KAUFMANN bedanken, die meine Weiterbildung und Konferenzbesuche finanziell unterstützten.

Auslandsaufenthalt wurde von Karlsruhe House of Young Scientists (KHYS) gefördert. Außerdem bedanke ich mich bei KHYS für die Unterstützung bei den Weiterbildungskursen.

FAZIT-Stiftung und DAAD danke ich für die Unterstützung bei den Kongressreisen.

Der Carl-Zeiss-Stiftung danke ich für die finanzielle Förderung der Promotion!



