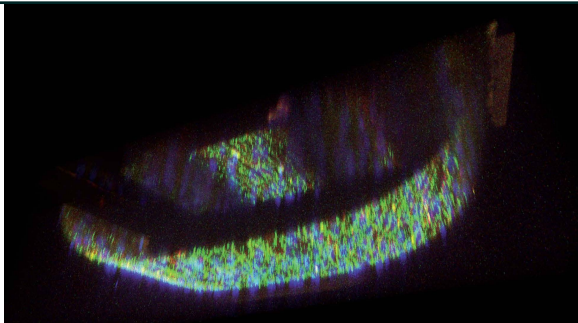




Isabella Hebei (Autor)

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



Isabella Hebei

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



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6156>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>



# INHALTSVERZEICHNIS

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



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



---

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



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