

In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit
auf dem Chip

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
M.Sc. Rebecca Sandra Pfister
aus Müllheim

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referentin: PD Dr. Beate Köberle

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2020

Meiner Familie

The roots of work may be bitter, but the fruit is sweet.

-Frei nach Aristoteles-

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von Oktober 2017 bis Oktober 2020 am Institut für Funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, angefertigt.

Frau PD Dr. Beate Köberle 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 habe. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung wurde beachtet.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	3
2.1. Tissue Engineering	3
2.1.1. 3D-Zellkultur und Nachbildung funktioneller Organeinheiten.....	4
2.1.1.1 Extrazellulärmatrix (EZM) und EZM-imitierende Substanzen	5
2.1.1.2 Organ-on-Chip Systeme.....	7
2.2. Das menschliche Gehirn und die neurovaskuläre Einheit	9
2.2.1. Blut-Hirn-Schranke	10
2.2.2. Hirnendothel.....	10
2.2.2.1 Basalmembran.....	12
2.2.2.2 Wirkung von Scherkräften auf das Endothel.....	13
2.2.3. Perizyten.....	14
2.2.4. Astrozyten.....	14
2.2.5. Neuronen.....	15
2.2.6. EZM im Gehirn	15
2.2.7. <i>In vitro</i> Rekonstruktionen der NVU	15
3. Zielsetzung.....	17
4. Ergebnisse.....	18
4.1. Etablierung des BBB-Endothels	18
4.1.1. Untersuchung verschiedener Beschichtungen.....	19
4.1.1.1 Einfluss der Beschichtung auf Adhäsion, Wachstum und Verteilung.....	20
4.1.1.2 Einfluss der Beschichtung auf die Expression spezifischer Marker	24
4.1.1.3 Einfluss der Beschichtung auf den parazellulären Transport	27
4.1.1.4 Zusammenfassung.....	29
4.1.2. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Barriere-Ausbildung.....	30
4.1.3. Zellzahl zur Kultivierung im vasQchip	31
4.1.4. Fluss und Scherkräfte	34
4.1.4.1 Mikrofluidische Langzeitkultivierung im vasQchip (Spritzenpumpe).....	34
4.1.4.2 Permeabilitätsassay im vasQchip	36
4.1.4.3 Anpassung der Flussrate zur Erzeugung physiologischer Scherkräfte	37
4.1.4.4 Einfluss von Scherkräften und Medium auf die Expression spezifischer Marker ..	44
4.1.4.5 Zusammenfassung.....	46

Inhaltsverzeichnis

4.2. Etablierung der BBB inklusive Perizyten und Astrozyten	47
4.2.1. Bestimmung eines geeigneten Kultivierungsmediums	47
4.2.1.1 Wachstum und Viabilität	47
4.2.1.2 Morphologie und Nachweis zellspezifischer Marker	51
4.2.1.3 Zusammenfassung	54
4.2.2. Ko-Kultur aus Endothelzellen und Perizyten	55
4.2.3. Ko-Kultur aus Perizyten und Astrozyten	60
4.2.4. Ko-Kultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im Chip.....	61
4.2.4.1 Versorgung des umgebenden Kompartiments.....	61
4.2.4.2 Lebend/Tot-Nachweis	63
4.2.4.3 Nachweis zellspezifischer Marker.....	67
4.2.4.4 Einfluss von Perizyten und Astrozyten auf die Expression spezifischer Marker ...	70
4.2.4.5 Funktionalitätstest - Transporterassay.....	71
4.3. Hydrogele als EZM-imitierende Substanz	75
4.3.1. Kollagen	75
4.3.1.1 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel	76
4.3.1.2 Untersuchung der Einwanderung humaner Astrozyten in die Gelmatrix	79
4.3.2. GelMA	81
4.3.2.1 Synthese und Charakterisierung.....	81
4.3.2.2 Untersuchung geeigneter Photoinitiatoren	83
4.3.2.3 Toxizität der Bestrahlung.....	85
4.3.2.4 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel	86
4.3.3. GelNB/Gels	89
4.3.3.1 Synthese und Charakterisierung.....	89
4.3.3.2 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel	90
4.3.4. Zusammenfassung	91
4.4. NVU im Chip inklusive BBB, Neuronen und EZM	92
4.5. 3D-Bioprinting auf dem Chip.....	96
5. Diskussion.....	101
6. Methoden.....	114
6.1. Allgemeine Zellkultur	114
6.1.1. Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen	114
6.1.2. Beschichtung der Kultivierungsmaterialien.....	114

6.1.2.1 hCMEC/D3	114
6.1.2.2 HBVP/HA.....	114
6.1.2.3 HN	114
6.1.3. Passagieren von adhärenten Zellen.....	114
6.1.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	115
6.2. vasQchip	115
6.2.1. Herstellung	115
6.2.2. Handhabung	115
6.2.2.1 Beschichtung	115
6.2.2.2 Besiedlung	116
6.2.2.3 Anschluss an die Fluidik	116
6.2.2.4 BBB	117
6.2.2.5 Einbringung eines Hydrogels	117
6.3. Hydrogele.....	117
6.3.1. Synthesen	117
6.3.1.1 GelMA.....	117
6.3.1.2 GelNB.....	118
6.3.1.3 GelS.....	118
6.3.2. Herstellung von vernetzten Hydrogelen	118
6.3.2.1 GelMA.....	118
6.3.2.2 GelNB/GelS	119
6.3.2.3 Kollagen	119
6.3.3. Absorptionsbestimmung der Photoinitiatoren	119
6.4. Visualisierung von Zellen und Zellstrukturen	120
6.4.1. Fixierung von Zellen.....	120
6.4.2. Visualisierung der Zellkerne	120
6.4.3. Visualisierung des Aktinzytoskeletts	120
6.4.4. Markierung des Zytosols.....	120
6.4.5. Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Strukturen	120
6.4.6. Mengenangaben.....	122
6.5. Molekularbiologische Methoden: PCR.....	122
6.5.1. RNA-Isolation.....	122
6.5.2. DNA-Verdau.....	123

Inhaltsverzeichnis

6.5.3.	RT-PCR.....	123
6.5.4.	Kontroll-PCR.....	124
6.5.5.	qPCR.....	124
6.6.	Wachstums- und Viabilitätsuntersuchungen	125
6.6.1.	Wachstumskurve	125
6.6.1.1	Beschichtungen	125
6.6.2.	Presto Blue-Assay	125
6.6.3.	MTT-Toxizitätsassay.....	126
6.6.4.	Lebend/Tot-Färbung	126
6.6.4.1	Im Chip.....	126
6.6.4.2	Im Hydrogel: statisch im Well.....	127
6.6.4.3	Im Hydrogel: fluidisch im Chip.....	127
6.6.4.4	2D im Well	127
6.6.4.5	Mikroskopeinstellungen	127
6.7.	Funktionalitätstests.....	127
6.7.1.	Beschichtungen mit unterschiedlichen Matrixproteinen.....	127
6.7.2.	Permeabilitätsassay	127
6.7.2.1	Im Transwell	127
6.7.2.2	Im Chip.....	128
6.7.3.	Versorgung des umgebenden Kompartiments.....	128
6.8.	Bioprinting	129
7.	Material.....	130
7.1.	Zellen.....	130
7.2.	Zellkulturmedien.....	130
7.3.	Chemikalien und Reagenzien	131
7.4.	Enzyme	133
7.5.	Puffer	133
7.6.	Antikörper	133
7.7.	Oligonukleotide	134
7.8.	Verbrauchsmaterialien	134
7.9.	Geräte	135
7.10.	Software	136
8.	Abkürzungsverzeichnis	137

Inhaltsverzeichnis

9.	Literaturverzeichnis	139
10.	Anhang	157
11.	Danksagung.....	165

1. Zusammenfassung

Das menschliche Gehirn ist ein hochkomplexes Organ und als Hauptkontrollort für sämtliche Vorgänge im Körper zuständig. Schädigungen des Gehirns nach Verletzungen oder in Folge neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson ziehen daher sehr schwerwiegende Konsequenzen nach sich. Trotz der steigenden Zahl an Menschen, die unter solchen Erkrankungen leiden, ist es bis heute nicht möglich diese zu bekämpfen und den Abbau des neuronalen Gewebes aufzuhalten. Ein großes Problem in der Arzneimittelentwicklung stellt hierbei die Evaluation der Wirksamkeit neuer Medikamente dar. Da die direkte Untersuchung am Patienten nur begrenzt möglich ist, wird hauptsächlich auf Ergebnisse aus Tierstudien zurückgegriffen. Diese sind jedoch teuer, aufwendig, ethisch bedenklich und erlauben zudem aufgrund speziesspezifischer Unterschiede meist keine zuverlässige Übertragbarkeit auf den Menschen. Aus diesem Grund fokussiert sich die Forschung mit dem *Tissue Engineering* heutzutage auf die Entwicklung geeigneterer *in vitro* Modellsysteme. Das Forschungsfeld der *Organs-on-Chips*, also der Nachbildung miniaturisierter, funktioneller Organe auf kleinen Trägermaterialien bietet dabei für die Untersuchung neuer Wirkstoffkandidaten enormes Potential.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit (engl. *Neurovascular Unit*, NVU) auf Basis humaner und hirnspezifischer Zellen. Als zentrales Element wurde hierfür die Blut-Hirn-Schranke (engl. *Blood-Brain-Barrier*, BBB) auf einem miniaturisierten Organchip, dem vasQchip, nachgebildet. Aufgebaut ist dieser aus einem formgebenden, halbrunden, porösen Polycarbonat-Mikrokanal, der durch die Besiedlung mit Endothelzellen der Nachbildung eines Blutgefäßes dient. Die Verknüpfung mit einer Mikrofluidik erlaubt eine artifizielle Durchblutung und die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Eine den Kanal umgebende Kammer dient der Rekonstruktion des organotypischen Gewebes.

Neben den Endothelzellen, die das Blutgefäß und die BBB ausbilden, besteht die NVU auch aus Perizyten, Astrozyten, Neuronen und der umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM). Die BBB zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass sie eine sehr dichte physische Barriere für den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem Gehirn bildet. Dies ist einerseits auf das kontinuierliche Endothel mit stark exprimierten *Tight Junctions* sowie die Expression spezialisierter Transporter, sogenannter Effluxpumpen, zurückzuführen. Obwohl viel über die Barrierefunktion bekannt ist, sind die genauen Faktoren, die bei der Rekonstruktion auf dem Chip eine vergleichbare Barrierefunktion erzielen, nicht im Detail erforscht und es mangelt derzeit an Modellen, die sich durch eine Vollständigkeit aller Komponenten der NVU auszeichnen. In dieser Arbeit wurden insbesondere das Zusammenspiel und die Ko-Kultivierung der korrekten Zelltypen (Hirnendothel, Perizyten und Astrozyten) sowie der Einfluss der Beschichtungen mit verschiedenen Bestandteilen der EZM auf die Ausbildung und Langzeitstabilität der Barrierefintegrität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass neben der Adhäsionsgeschwindigkeit und der Proliferation auch die Expression spezifischer Marker durch verschiedene Beschichtungen begünstigt und der parazelluläre Transport reduziert werden können. Eine zusätzliche Induktion der Barriere konnte durch die Wahl des Nährmediums und die Ko-Kultur mit weiteren Zelltypen gezeigt werden. Die erfolgreiche Ko-Kultivierung von humanen, hirnspezifischen Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im vasQchip wurde durch die Untersuchung der Zellviabilität und den Immunfluoreszenz-Nachweis spezifischer Marker bestätigt. Neben den rein chemischen Einflüssen stand auch die Modulation der physikalischen Parameter im

Zusammenfassung

Vordergrund. Hierbei wurde der Einfluss der Scherkräfte auf die Barrierefunktion untersucht. Eine fluidische Langzeitkultivierung des Endothels im Mikrokanal war dabei unter Erhalt der Viabilität bis zu zwei Wochen möglich. Ein Einfluss der wirkenden Scherkräfte auf die Barriereintegrität wurde durch RT-qPCR analysiert.

Für eine dreidimensionale Kultivierung der Zellen im umgebenden Kompartiment wurden verschiedene EZM-imitierende Substanzen untersucht. Hydrogele eignen sich zur Nachbildung der EZM besonders gut, da sie durch ihre hohe Wasserbindungskapazität dem natürlichen Weichgewebe stark ähneln. Neben dem natürlichen Hydrogel Kollagen wurden die beiden semi-synthetischen Hydrogele GelMA (Gelatine-Methacryloyl) und GelNB/GelS (Norbornen- bzw. Thiolfunktionalisierte Gelatine) am Beispiel humaner Astrozyten untersucht. Durch Variation der Konzentration bzw. des Funktionalisierungsgrades konnten Hydrogele mit unterschiedlichen Festigkeiten hergestellt werden. Eine permanente kovalente Vernetzung der funktionalisierten Gelatinestränge erfolgte dabei durch Photopolymerisation. Die Zellen wurden während dieses Prozesses im Polymernetzwerk eingekapselt. Durch Viabilitätsbestimmungen konnte für alle untersuchten Hydrogele gezeigt werden, dass der Herstellungsprozess inklusive der Einkapselung der Zellen keine negativen Auswirkungen auf die Zellviabilität hatte. In Bezug auf die Ausrichtung und Netzwerkbildung der Zellen sowie die mechanische Stabilität ergaben sich jedoch große Unterschiede zwischen den untersuchten Gelen. Eine besonders schnelle Ausrichtung konnte in den Kollagengelen nachgewiesen werden; diese waren jedoch gleichzeitig durch eine geringe Stabilität und einen schnellen Abbau durch die Zellen gekennzeichnet. Eine ebenfalls geringe Stabilität wiesen niedrig funktionalisierte GelMA- und GelNB/GelS-Hydrogele auf. Die höher funktionalisierten Hydrogele ähnelten dem Hirngewebe in Bezug auf die Festigkeit und wurden daher trotz der geringen Zellausrichtung im statischen Versuch für die Nachbildung des neuronalen Gewebes im vasQchip eingesetzt. Hierbei wurde das BBB-Modell durch einen vierten humanen Zelltyp, die Neuronen inklusive Matrix, ergänzt und fluidisch kultiviert.

In einem letzten Schritt wurde durch Kombination von 3D-Biodruck mit der *Organ-on-Chip*-Technologie erfolgreich ein BBB-Modell aufgebaut, indem zwei separate Schichten aus Perizyten und Astrozyten durch extrusionsbasierten Druck auf den vasQchip gedruckt wurden. Im bedruckten Chip konnten eine hohe Viabilität und Ausrichtung der Zellen nach sieben Tagen beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombination verschiedener Methoden aus dem *Tissue Engineering* großes Potential für die Entwicklung organotypischer, vaskularisierter Gewebe bietet. Durch die gleichzeitige Kultivierung von drei humanen, hirnspezifischen Zelltypen auf dem Chip konnte erfolgreich ein funktionales, durchblutetes BBB-Modell entwickelt werden. Durch den Einsatz verschiedener Hydrogele zur Nachahmung der EZM erfolgte die Nachbildung des dreidimensionalen, vaskularisierten Hirngewebes auf dem Chip. Der Einsatz dieser Organ-Systeme könnte in Zukunft zu einer deutlich beschleunigten und verbesserten Arzneimittelentwicklung beitragen; die Kombination mit zusätzlichen Methoden, wie dem 3D-Biodruck, erlauben darüber hinaus weitere Möglichkeiten zur noch exakteren Nachbildung der funktionellen Organmodelle.

2. Einleitung

Da das Gehirn ein hochkomplexes Organ und Hauptkontrollort für sämtliche Vorgänge im menschlichen Körper ist, ziehen Schädigungen des Gehirns aufgrund neurodegenerativer Erkrankungen sehr schwerwiegende Folgen nach sich. Obwohl die Zahl an Menschen, die unter Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson leiden stetig steigt, ist eine erfolgreiche Behandlung bis heute nicht möglich. Das Problem ist dabei nicht der Mangel an Arzneimittelkandidaten, denn dank der kombinatorischen Synthese ist es heutzutage sehr einfach, schnell eine große Menge potenzieller Wirkstoffe herzustellen.^[1,2] Das Hauptproblem ist vielmehr der Transport dieser Wirkstoffe durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (BBB) zum Wirkort. Da eine direkte Injektion im Gehirn nicht möglich ist, muss die Verabreichung über die Blutbahn erfolgen. Die BBB als dichte physische, enzymatische und metabolische Barriere sorgt dabei für einen geregelten Stoffaustausch zwischen dem Gehirn und der Blutbahn. Was unter physiologischen Bedingungen also essentiell für den Schutz und die Funktionsfähigkeit des Gehirns ist, stellt bei der Behandlung von krankhaften Veränderungen eine besondere Herausforderung dar. Ein weiteres Problem ist die Untersuchung der Wirksamkeit, da die direkte Untersuchung am Patienten nur begrenzt möglich ist. Tiermodelle hingegen liefern aufgrund speziespezifischer Unterschiede nur unzureichende Ergebnisse. Um den Wirkort und -mechanismus eines Wirkstoffes zu untersuchen, sind daher Modelle des Gehirns und der BBB auf der Basis humaner Zellen erforderlich, damit die Krankheiten möglichst exakt abgebildet und die Forschung auf zellulärer Ebene ermöglicht werden kann. Die Entwicklung von geeigneten *in vitro* Modellsystemen ist ein Forschungsschwerpunkt des sogenannten *Tissue Engineering*, ein Forschungsgebiet, das mehr und mehr in den Fokus der Wissenschaft rückt.

2.1. Tissue Engineering

Der Bereich des *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Gebiet, das sich mit der Entwicklung von funktionellem, organotypischem Gewebe *in vitro* befasst. Es vereint dabei Prinzipien der Ingenieur- und der Biowissenschaften, um so Gewebefunktionen durch die Kombination von Gerüst, Zellen und Biomolekülen (wieder-)herzustellen, zu erhalten oder zu verbessern.^[3–5] Vor allem im Bereich der regenerativen Medizin gewinnt dieses Verfahren immer mehr an Bedeutung, um so dem bereits seit Jahren herrschenden Problem des Mangels an Spenderorganen entgegenzuwirken. Verschärft wird das Problem der ohnehin schon mangelnden Anzahl an Spenderorganen durch die mögliche immunologische Abstoßung des gespendeten Gewebes.^[6–8] Mit Hilfe des *Tissue Engineering* konnten in den letzten Jahren bereits in verschiedenen Bereichen vielversprechende Ergebnisse erzielt werden und eine Reihe von FDA-zugelassenen Therapien (*Food and Drug Administration*, US-amerikanische Gesundheitsbehörde) kommerziell verfügbar gemacht werden.^[4,9–11] Hinzu kommt der Einsatz immer neuer Methoden wie beispielsweise das *3D-Bioprinting* oder der Einsatz von Stammzellen.^[4,6,11,12] Ein besonderes Augenmerk liegt auch in der Weiterentwicklung in Richtung der personalisierten Medizin.^[13]

Neben dem Einsatz in der regenerativen Medizin ist die Entwicklung von funktionellen Gewebemodellen und Organen *in vitro* aber auch zum Verständnis verschiedener Erkrankungen und zur Untersuchung geeigneter Behandlungsmethode von Bedeutung. Der Einsatz solcher Gewebemodelle könnte neben den erheblichen zeitlichen und finanziellen Einsparungen bei der

Einleitung

Entwicklung neuer, wirksamer Arzneistoffe zu einer Reduzierung von Tierversuchen und einer Verbesserung der Patientensicherheit beitragen. Aktuell durchläuft ein potenzieller Wirkstoffkandidat verschiedene prä-klinische *in vitro* und *in vivo* Studien, sowie mehrere klinische Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit und möglichen Nebenwirkungen. Dabei können von der Entwicklung bis zur Zulassung für den Gebrauch am Menschen 12-15 Jahre vergehen, die durchschnittlichen Kosten belaufen sich dabei auf eine Milliarde Dollar.^[14] Aus anfänglich mehreren tausend Komponenten erreicht dabei lediglich ein kleiner Prozentsatz die klinische Phase.^[15] Aus einer Analyse zur Erfolgsquote klinischer Studien aus den Jahren 2006-2015 geht hervor, dass hierbei noch einmal rund 90 % aller Wirkstoffkandidaten durch fehlende Wirksamkeit oder starke Nebenwirkungen ausscheiden. Lediglich 9,6 % der getesteten Kandidaten erhielten demnach eine Zulassung.^[16] Dies macht deutlich, dass aus Tierversuchen gewonnene Daten lediglich bedingt auf den Menschen übertragbar sind und zeigt die Notwendigkeit nach Alternativmethoden.

2.1.1. 3D-Zellkultur und Nachbildung funktioneller Organeinheiten

Obwohl die Kultivierung von Zellen in zweidimensionalen Monolayern eine sehr einfache, kostengünstige und reproduzierbare Methode zur *in vitro*-Kultivierung von Zellen ist, spiegelt sie nicht die natürliche Situation eines Organismus wider. Fast alle Zellen sind *in vivo* typischerweise in dreidimensionalen Netzwerken mit zahlreichen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten eingebettet. Ergebnisse die aus 2D-Zellkulturen gewonnen werden, sind daher oftmals nicht auf gesamte Organismen übertragbar.^[17-20] Grund dafür sind die durch Dedifferenzierung verlorenen, gewebetypischen Eigenschaften, die sich durch die Art der Kultivierung in 2D-Monolayern ergibt. Neben einer veränderten Morphologie und dem Verlust der Polarität wird durch diese Art der Kultivierung ebenfalls der Stoffwechsel und die Zellteilung beeinflusst. Eine veränderte Morphologie kann sich darüber hinaus auch auf die Funktion der Zelle auswirken. Weiterhin hat die Interaktion mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix (auch Extrazellulärmatrix, EZM) einen Einfluss auf die Viabilität, das Expressionsmuster verschiedener Gene und Proteine sowie die Reaktion auf Reize.^[20] Für den Erhalt der Zelfunktionalität ist daher eine Nachahmung der gewebetypischen Mikroumgebung von großer Bedeutung.^[21-23] Diese Erkenntnis hat in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung verschiedener Systeme zur dreidimensionalen Kultivierung in EZM-imitierenden Umgebungen und unter *in vivo*-Bedingungen geführt.^[19,20,24] Eine sehr einfache Art der 3D-Kultivierung besteht dabei in der Bildung von Zellaggregaten, sogenannten Sphäroiden. Durch die Kultivierung adhärenter Zellen auf nicht-adhäsiven Oberflächen oder in hängenden Tropfen bilden diese aufgrund der fehlenden Wachstumsfläche vermehrt Kontakte untereinander aus. Als Folge bilden sich solide, kugelförmige Zellaggregate. Diese finden vor allem in der Tumor- und Metastasen-Forschung vielfach Anwendung.^[25,26] Eine weitere Möglichkeit besteht in der Einbringung von Zellen in Gerüststrukturen, welche die EZM im Organismus nachahmen. Beide Methoden berücksichtigen Einflüsse der Mikroumgebung und ähneln damit eher den tatsächlichen strukturellen und funktionellen Gegebenheiten von Geweben als einfache 2D-Kulturen. Dennoch vernachlässigen diese Modelle, dass auch weitere Faktoren eine wichtige Rolle für die korrekte Ausbildung und Funktion eines Gewebes spielen. Zu diesen zählen mechanische Stimuli, wie die durch den Blutfluss erzeugten Scherkräfte oder die Dehnung der Lunge bei der Atmung. Diese, sowie räumlich und zeitlich variierende Gradienten und Grenzflächen zwischen verschiedenen Strukturen, sind für die korrekte Anordnung und Morphologie der Zellen ebenso wichtig wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte.^[27] Einige dieser Limitierungen können durch die Kultivierung in

speziellen Transwell®-Systemen überwunden werden, bei denen die Kultur der Zellen in zwei durch eine poröse Membran getrennten Kompartimenten stattfindet. Da die Kultivierung jedoch lediglich unter statischen Bedingungen erfolgen kann, bleiben weiterhin dynamische Einflüsse unberücksichtigt.^[28] Um diese wichtigen Effekte ebenfalls abbilden zu können, konzentriert sich die Forschung derzeit auf sogenannte *Organ-on-Chip* Systeme. Mithilfe dieser Systeme können Organe oder Krankheitsbilder besser nachgeahmt werden. Dabei werden die Zellen auf kleinen Chips kultiviert, die durch eine Verbindung mit mikrofluidischen Pumpsystemen die Erzeugung artifizieller Blutströme und damit die Vaskularisierung von Geweben ermöglichen.^[29]

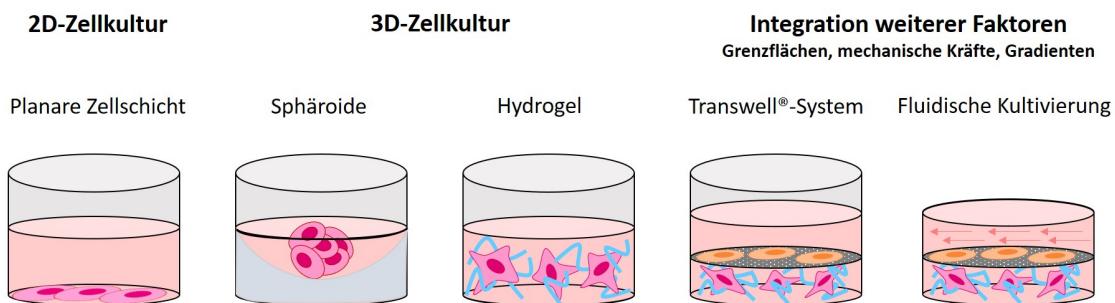


Abbildung 1 Beispiele verschiedener Kultivierungsmethoden mit zunehmender Komplexität. Von links nach rechts: planare Zellkultur, Sphäroide, Zellen in einer EZM-imitierenden Hydrogel-Matrix, Kultivierung im porösen Transwell®-System, fluidische Zellkultivierung.

2.1.1.1 Extrazellulärmatrix (EZM) und EZM-imitierende Substanzen

In vivo sind Zellen typischerweise von einer nicht-zellulären, dynamischen Komponente, der EZM, umgeben und stehen mit dieser entweder permanent oder zu wichtigen Zeitpunkten ihrer Entwicklung in Kontakt.^[30] Die Zelladhäsion an die EZM erfolgt dabei durch die Vermittlung verschiedener Rezeptoren, wie Integrinen, Discoidin-Domänen-Rezeptoren und Syndecanen.^[31–35] Diese in allen Geweben und Organen vorkommende Matrix setzt sich hauptsächlich aus zwei Klassen von Molekülen, den Proteoglykanen und faserartigen Proteinen (z.B. Kollagen) zusammen, wobei die individuelle Zusammensetzung je nach Art des Gewebes variiert und einer kontinuierlichen Umstrukturierung unterliegt. Während die mechanischen Eigenschaften durch ein komplexes Netzwerk aus Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin bestimmt wird, füllen hydratisierte Proteoglykane die Zwischenräume dieses Netzwerks aus.^[31,36]

In vivo übt die EZM eine Reihe wichtiger Funktionen aus. Dazu zählt neben der Stütz- und Gerüstfunktion für die zellulären Komponenten ihre Rolle bei der Morphogenese, Differenzierung und Homöostase einzelner Gewebe. Darüber hinaus bildet sie Adhäsionspfade für zelluläre Migration und ist an pathogenen Zellmigrationsprozessen, wie z.B. der Metastasierung von Tumoren beteiligt.^[31,36,37]

Die Erkenntnis, dass Zellen in ihrer Morphologie, Viabilität und in ihrem Verhalten und Funktionen stark durch die Interaktion mit ihrer Mikroumgebung beeinflusst werden, führte dazu, dass die Entwicklung verschiedener Materialien zur dreidimensionalen Kultivierung in EZM-imitierenden Umgebungen vorangetrieben wurde.^[38–40] Als besonders geeignete Materialien erwiesen sich hierbei Hydrogele, da diese in der Lage sind große Mengen an Wasser aufzunehmen, ohne sich selbst darin zu lösen und damit dem natürlichen Weichgewebe besser ähneln als andere polymere Biomaterialien.^[41,42] Definiert sind diese entsprechend als vernetzte Polymerketten mit hoher Wasserbindungs Kapazität.

Einleitung

Vor allem die Erzeugung unter milden, zytokompatiblen Bedingungen und die einfache Modifizierung, die den Einschluss von Zellen im vernetzten Gel erlauben, haben Hydrogele zu einem attraktiven Forschungsfeld für die Anwendung im *Tissue Engineering* gemacht.^[43] Ihre strukturelle Integrität entsteht durch physikalische oder chemische Vernetzung zwischen Polymerketten, welche synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein können.^[44] Sowohl natürliche Hydrogele, die meist auf Komponenten der EZM basieren oder dieser ähneln, wie auch vollständig synthetische Hydrogele wurden bereits für zahlreiche Anwendungen untersucht und als Stützmatrix zur dreidimensionalen Kultivierung verschiedener Zellen eingesetzt.^[41] Dabei haben natürliche Materialien, wie Kollagen^[45–47], Fibrin^[48–50], Hyaluronsäuren^[51] oder Alginat^[52] den Vorteil, dass sie inhärent biokompatibel und bioaktiv sind. Darüber hinaus weisen sie in Bezug auf ihre Struktur und Eigenschaften eine starke Ähnlichkeit zur physiologischen Umgebung auf, was sie prinzipiell attraktiv für biomedizinische Anwendungen macht. Ein großes Problem ergibt sich jedoch durch die geringe mechanische Stabilität und die schwer kontrollierbaren physikalischen Eigenschaften, die sich durch Batch-zu-Batch-Variationen ergeben.^[41,53] Dieses Problem lässt sich zwar durch den Einsatz rein synthetischer Hydrogele, wie beispielsweise Polyethylenglykol (PEG)^[54,55] umgehen, da diese bei der Herstellung in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften besser kontrollierbar und reproduzierbar sind. Häufig fehlen diesen jedoch wichtige Faktoren zur Beeinflussung des Zellverhaltens. Um den hohen Anforderungen für die Kultivierung von Zellen *in vitro* gerecht zu werden, stellt die Synthese semi-synthetischer Polymere einen Mittelweg dar, der die Vorteile natürlicher und synthetischer Hydrogele kombiniert. Dazu werden natürliche Materialien chemisch so modifiziert, dass sie in ihrer mechanischen Stabilität und physikalischen Eigenschaften gezielt beeinflussbar sind.

Über die Einbringung verschiedener funktioneller Gruppen an Seitenketten des natürlichen Rückgrats, können so beispielsweise kovalente Bindungen zwischen einzelnen Polymersträngen geknüpft werden, um so eine irreversible Vernetzung zu erhalten. Diese verläuft dabei häufig über eine photoinduzierte Polymerisationsreaktion, wobei die Verknüpfung entweder über einen Crosslinker oder eine direkte chemische Bindung der eingeführten funktionellen Gruppen erfolgt. Schematisch ist dies in Abbildung 2 dargestellt. Zu den Vorteilen der photoinitierten Polymerisation zählt der Verzicht auf extreme Temperatur- oder pH-Bedingungen, was den Einschluss von Zellen ins Gel unter milden Bedingungen ermöglicht.

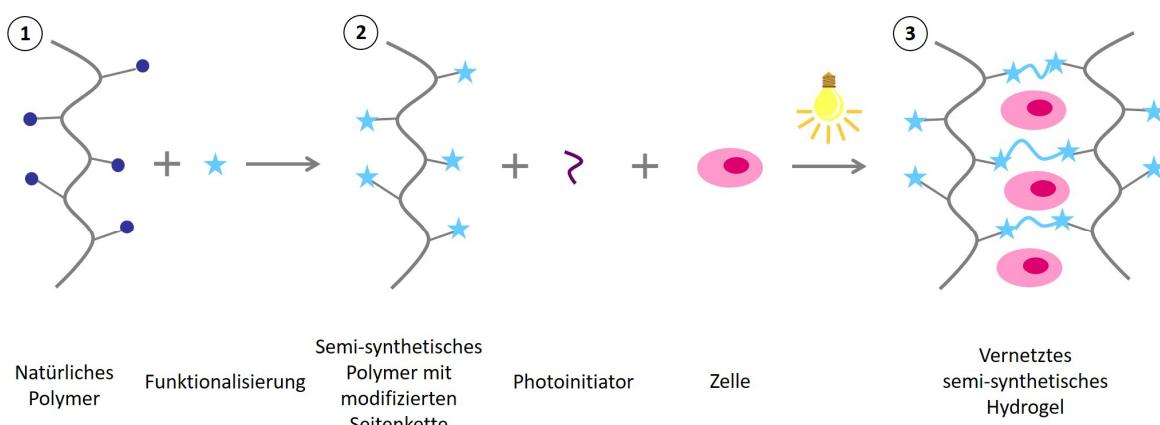


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Herstellung eines semi-synthetischen Polymers und anschließende Vernetzung zum Hydrogel unter Einschluss von Zellen (Modifiziert nach B. Grosshäuser)^[56]

Semi-synthetische Materialien wie Gelatine-Methacryloyl (GelMA) oder methacryliertes Kollagen (ColMA) finden daher bereits vielfach Anwendung im *Tissue Engineering*.^[57–60]

2.1.1.2 *Organ-on-Chip Systeme*

Organs-on-Chips (OoC) stellen seit einigen Jahren eine Innovation im Bereich des *Tissue Engineering* dar und sind ein sich schnell entwickelndes Forschungsgebiet, was sich vor allem in der steigenden Anzahl an Patenten und Publikationen zeigt.^[61] Während sich Patente und Veröffentlichungen Anfang 2000 noch hauptsächlich auf die reine Mikrofluidik und damit verbundene Herstellungsverfahren beschränkten, konnten 2007 bereits 123 Patente und Veröffentlichungen in Bezug auf OoCs verzeichnet werden. Innerhalb der nächsten zehn Jahre zeigte sich eine durchschnittliche jährliche Wachstumsrate von 46 % mit mindestens 390 Patenten und Publikationen im Jahr 2017 in diesem Bereich. Auch die Gründung des zweijährigen Projekts ORCHID (*Organ-on-Chip in Development*) mit dem Ziel ein System aus akademischen, Forschungs-, Industrie- und Regulierungsinstitutionen aufzubauen, das den Einsatz von OoCs vom Labor in die medizinische Versorgung vorantreiben soll, verdeutlicht deren enormes Potenzial.^[62] Im Bereich der Medikamentenentwicklung könnte der Einsatz dieser Systeme zu schnelleren und verbesserten Ergebnissen und zu einer Reduktion von Tierversuchen führen.

Laut ORCHID wird als OoC "ein zweckmäßiges mikrofluidisches System" bezeichnet, „das lebende, künstliche Organsubstrukturen in einer kontrollierten Mikroumgebung enthält, die einen oder mehrere Aspekte der Dynamik, Funktionalität und (patho)physiologischen Reaktion des Organs *in vivo* unter Echtzeitüberwachung rekonstruiert“.^[62] Die Kombination von Verfahren aus dem Mikro-Engineering mit biologischen Methoden erlaubt dabei die Nachbildung von Geweben oder Organen in einer organotypischen, physiologischen 3D-Umgebung auf miniaturisierten Plattformen, welche mit Hilfe von Mikrofertigungstechniken hergestellt werden.^[27] Eine Verbindung mit mikrofluidischen Pumpensystemen erlaubt die Integration einer dynamischen Umgebung. So ist durch die Erzeugung artifizieller Blutströme die Vaskularisierung von Organstrukturen möglich. Diese kleinsten funktionellen Einheiten des entsprechenden Organs erlauben die Untersuchung neuer Wirkstoffkandidaten in der Arzneimittelforschung. Durch den Einsatz von humanen Zellmaterialien kann im Vergleich zu den bisher gängigen Tierstudien, die aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede nur eine limitierte Übertragbarkeit auf den Menschen erlauben, eine bessere Vorhersage über den Wirkungsmechanismus erreicht werden. Potenzielle Wirkstoffkandidaten könnten so bereits in einem frühen Stadium der Medikamentenentwicklung an humanen Geweben hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und möglicher Nebenwirkungen getestet werden. Dadurch könnte nicht nur die Zahl an teuren, zeitlich aufwändigen und überdies ethisch bedenklichen Tierversuchen reduziert werden, sondern auch eine verbesserte Patientensicherheit in klinischen Studien erreicht werden.

Der am KIT entwickelte vasQchip stellt ein solches OoC-System dar. Im Vergleich zu vielen anderen Systemen, die auf rechteckigen Strukturen basieren, zeichnet sich dieses Modell durch einen halbrunden Kanal aus. Neben der genaueren Abbildung der *in vivo* Struktur von Blutgefäßen konnte in Simulationen gezeigt werden, dass hierbei eine gleichmäßige Verteilung von Scherkräften stattfindet, als dies in eckigen Strukturen der Fall ist. Die Etablierung einer Endothellschicht aus HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, Nabelschnurendothelzellen) zeigte typische strukturelle und funktionelle Eigenschaften physiologischer Blutgefäße.^[28,63,64]

Einleitung

Hergestellt wird der vasQchip auf Basis der SMART-Technologie (engl. *Substrate Modification and Replication by Thermoforming*) und besteht neben dem gekrümmten, porösen Polycarbonat-(PC)-Kanal zur dreidimensionalen Kultivierung von Endothelzellen, aus einem darunterliegenden Kompartiment zur Erzeugung eines organotypischen 3D-Gewebes. Beide Kompartimente stehen durch die poröse PC-Membran miteinander in Verbindung. Durch den Anschluss an ein mikrofluidisches Pumpensystem kann ein Blutfluss simuliert werden. Der Aufbau des vasQchips ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

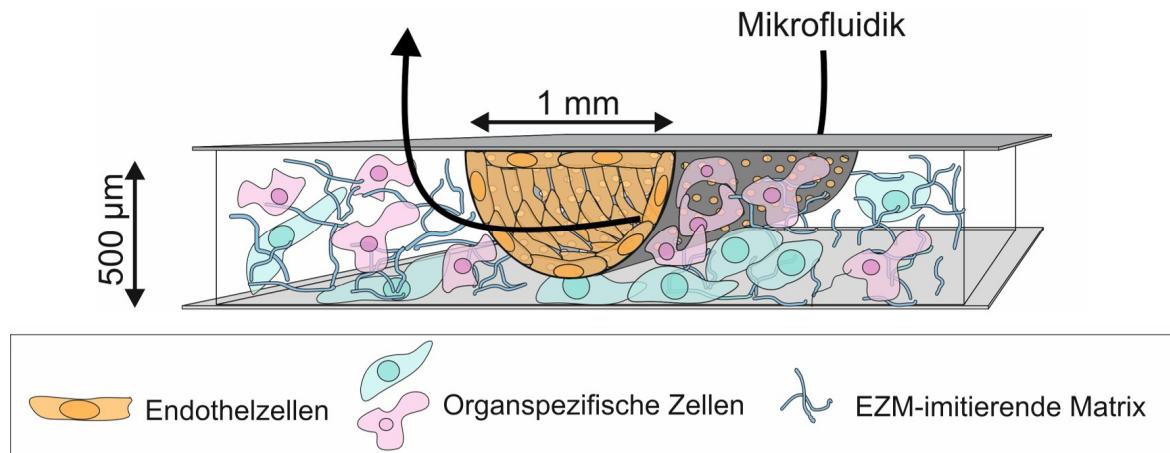


Abbildung 3 Schematische Darstellung des vasQchips. Ein poröser halbrunder Kanal aus PC dient der Nachbildung eines Blutgefäßes, während das umgebende Kompartiment zur dreidimensionalen Kultivierung organotypischer Zellen dient. Beide Kompartimente stehen über die Poren im Mikrokanal miteinander in Kontakt. Der Anschluss an eine Mikrofluidik ermöglicht die Erzeugung eines artifiziellen Blutstroms. (modifiziert nach Grün et al.^[65])

Die zur Herstellung der PC-Membran eingesetzte SMART-Technologie wurde von Giselbrecht *et al.* am Karlsruher Institut für Technologie entwickelt. Aufgebaut ist dieses Verfahren aus drei Schritten. In einem Vorprozess kann eine Oberflächenmodifikation der thermoplastischen Kunststofffolie durchgeführt werden, die durch den Hauptprozess, dem mikrotechnischen Thermoformen, nicht verändert wird. Im Gegensatz zum Mikrospritzgussverfahren findet die Formung des Polymers im thermoelastischen Zustand statt, der Schmelzpunkt wird hierbei nicht erreicht. In einem nachfolgenden Prozess kann eine weitere Bearbeitung des Materials, wie beispielsweise eine Funktionalisierung, stattfinden.^[66]

Für die Herstellung der vasQchip-Mikrokanäle wurden mit Schwerionenbeschuss behandelte PC-Membranen (50 µm Dicke, 10^6 Ionen/cm²) verwendet. Diese werden unter Druck- und Temperatureinwirkung bei 147°C und 4 bar zu Halbkanälen der Dimension 1 mm x 20 mm x 300 µm (Breite x Länge x Tiefe) geformt. Im Anschluss folgt eine Öffnung der latenten Ionenspur durch nasschemisches Ätzen. Durch Variation der Ätzbedingungen können die Poren des Mikrokanals in ihrer Größe an das nachzubildende Endothel angepasst werden. Die so hergestellten Kanäle werden durch Laserschweißen auf einen PC-Block aufgebracht, der anschließend zur Erzeugung des umgebenden Kompartiments mit einem Deckglas verschlossen wird.^[28,65] Die Verwendung ausschließlich transparenter Materialien erlaubt eine Analyse der kultivierten Zellen durch mikroskopische Verfahren. Die Herstellung der porösen PC-Mikrokanäle sowie die Assemblierung des vasQchips und dessen Anwendung sind in Abbildung 4 dargestellt.

Neben der Nachbildung von Einzelorgansystemen^[67–74] besteht ein zweiter Ansatz mittlerweile in der Kombination mehrerer OoCs zu Multiorganplattformen^[75,76], um so noch komplexere Vorgänge und Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Organsystemen untersuchen zu können.^[62]

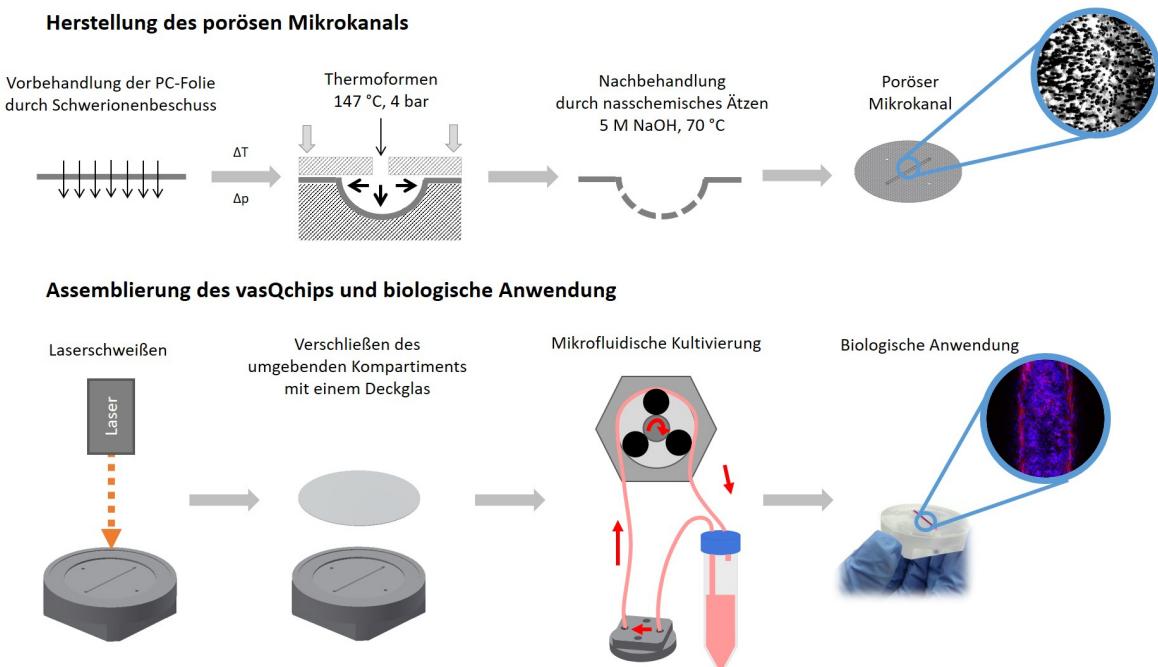


Abbildung 4 Herstellung der porösen Mikrokanäle und Weiterverarbeitung zum kompletten vasQchip. Die Herstellung der Kanäle erfolgt nach dem SMART-Verfahren, indem Schwerionen-beschossenen PC-Folien durch Druck und Temperatur in die gewünschte Form gebracht werden. Durch Ätzen mit NaOH entstehen aus den latenten Ionenspuren Poren, die den Austausch zwischen dem Kanal und dem umgebenden Kompartiment erlauben. Durch Laserschweißen werden die Kanäle auf einen PC-Block aufgebracht und mit einem Deckglas verschlossen. Die so hergestellten vasQchips können an ein mikrofluidisches Pumpensystem angeschlossen werden und zur Erzeugung von vaskularisiertem Gewebe eingesetzt werden. (modifiziert nach Grün *et al.*, 2018) [65]

2.2. Das menschliche Gehirn und die neurovaskuläre Einheit

Als Hauptkontrollort für alle im Körper stattfindenden Vorgänge - über die bewusst steuerbaren, wie beispielsweise Bewegung, bis zu den nicht bewusst steuerbaren Vorgängen, wie etwa der Verdauung - ist das Gehirn zuständig für die zentralisierte Kontrolle über sämtliche Organe. Auch Sinneseindrücke und Emotionen entstehen im Gehirn oder werden zu dem verarbeitet, was letztendlich wahrgenommen wird. Diese Aufgaben führen dazu, dass das Gehirn einen permanent hohen Energiebedarf hat, was sich unter anderem darin widerspiegelt, dass 20 % aller metabolischen Vorgänge des Körpers im Gehirn stattfinden.^[77] Eine Speicherung von Reserven im Gehirn selbst findet jedoch trotz dieses hohen Energiebedarfs kaum statt.^[78] Um dennoch eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicherzustellen, ist eine konstante und an den Energiebedarf adaptierte Versorgung des Gehirns durch den Blutfluss nötig. Neben dem Mechanismus der Autoregulation zur Aufrechterhaltung eines konstanten Blutflusses zum Gehirn unabhängig von äußeren Einflüssen, wie beispielsweise sportlicher Betätigung, sorgt die neurovaskuläre Kopplung (engl. *Neurovascular Coupling*, NVC), auch funktionelle Hyperämie genannt, für die zeitliche und räumliche Anpassung des Blutflusses an den Energiebedarf aktiver Neuronen.^[79] Ermöglicht wird diese gezielte Anpassung der Blutversorgung an den Bedarf durch eine komplexe Kommunikation zwischen neuronalen und vaskulären Zellen, die sogenannte neurovaskuläre Einheit (engl. *Neurovascular Unit*, NVU). Das Konzept der NVU ist ein noch relativ neues Konzept im Bereich der Neurowissenschaften, das 2001 auf der Sitzung der Stroke Progress Review Group des National Institute of Neurological Disorders and Stroke (Bethesda, Maryland, US) offiziell festgelegt wurde.^[80] Es beschreibt die Beziehung zwischen neuronalen und vaskulären

Einleitung

Zellen und umfasst zelluläre sowie extrazelluläre Komponenten, die auf chemischer und anatomischer Ebene eng miteinander interagieren und damit an der Regulierung des zerebralen Blutflusses und der Funktion der Blut-Hirn-Schranke (*engl. Blood-Brain-Barrier, BBB*) beteiligt sind.^[81] Zu den Zellen der NVU zählen Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Neuronen, und Interneuronen.^[82] Der schematische Aufbau ist in Abbildung 5 gezeigt.

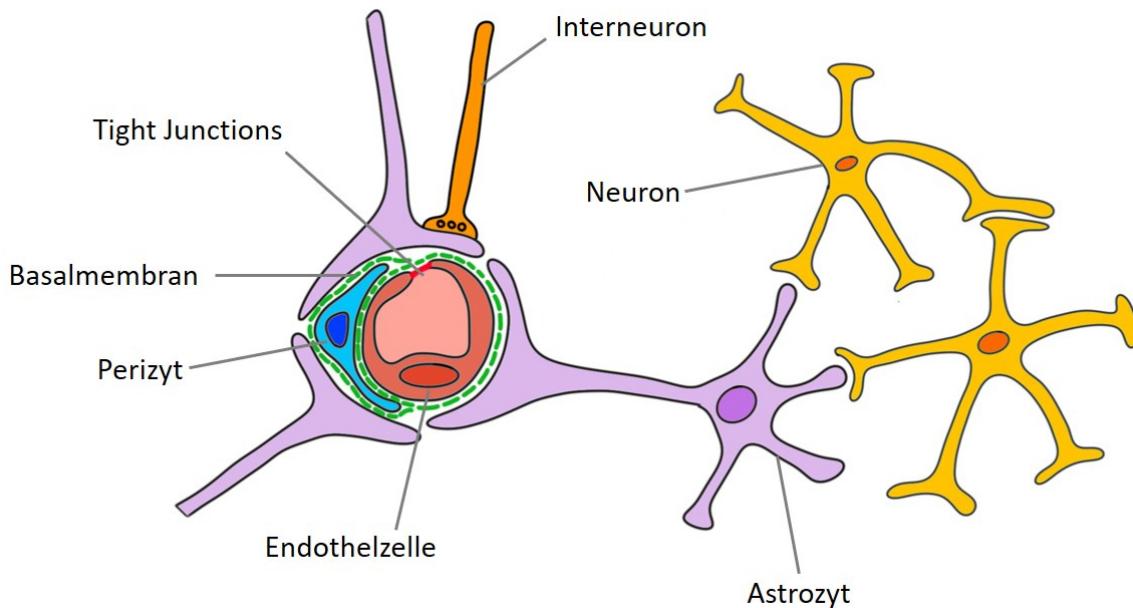


Abbildung 5 Schematischer Aufbau der neurovaskulären Einheit (Modifiziert nach Abbott et al.)^[83]

2.2.1. Blut-Hirn-Schranke

Einen wichtigen Bestandteil der NVU stellt die BBB dar. Aufgrund der hohen Komplexität des Gehirns und dessen Aufgaben ist neben der permanenten und gezielten Versorgung mit Nährstoffen die Aufrechterhaltung der Gehirnhomöostase von großer Bedeutung für die korrekte Funktion neuronaler Signalübertragungen. Für die hierfür benötigte strikt kontrollierte Mikroumgebung sorgt die BBB, die durch eine kontinuierliche und durch *Tight Junctions* verbundene Endothellschicht gebildet wird. Die BBB stellt damit eine selektive Barriere für einen Stoffaustausch zwischen dem Blutstrom und dem Gehirn dar.^[84] Sie reguliert die Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen aus dem Blut, schleust Abfallprodukte aus dem Gehirn zurück in die Blutbahn und sorgt für die Aufrechterhaltung der Ionenkonzentration nach der Aufnahme von Nahrung oder körperlicher Anstrengung. Darüber hinaus besteht ihre Aufgabe vor allem auch im Schutz des Gehirns vor potentiell toxischen Substanzen.^[85] Die sehr geringe und selektive Permeabilität ist dabei auf einige besondere biologische Merkmale des Hirnendothels zurückzuführen, auf welche im Folgenden näher eingegangen wird. Auch die weiteren Zelltypen, wie Perizyten, Astrozyten und Neuronen sowie die Extrazelluläre Matrix werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Bildung der Barriere sowie der Beteiligung an der NVU beleuchtet.

2.2.2. Hirnendothel

Im Gegensatz zu den peripheren Blutgefäßen zeichnen sich die zerebralen, mikrovaskulären Blutgefäße durch die Ausbildung einer kontinuierlichen Endothellschicht aus. Ein komplexes Netzwerk spezieller Membranproteine, sogenannter *Tight Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen verbindet diese zudem sehr eng miteinander und verhindert durch die physische

Barriere einen parazellulären Stofftransport nahezu vollständig. Durch die Abwesenheit von Fenestrationen oder Öffnungen in der Membran des kontinuierlichen Endothels wird zudem effektiv der transzelluläre Transportweg eingeschränkt. Dieser ist auf kleine lipophile Moleküle beschränkt. [86] Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau verschiedener mikrovaskulärer Endothelzelltypen sowie die molekulare Zusammensetzung der für die geringe Permeabilität und hohe Barrierefunktion verantwortlichen *Tight* und *Adherens Junctions*.

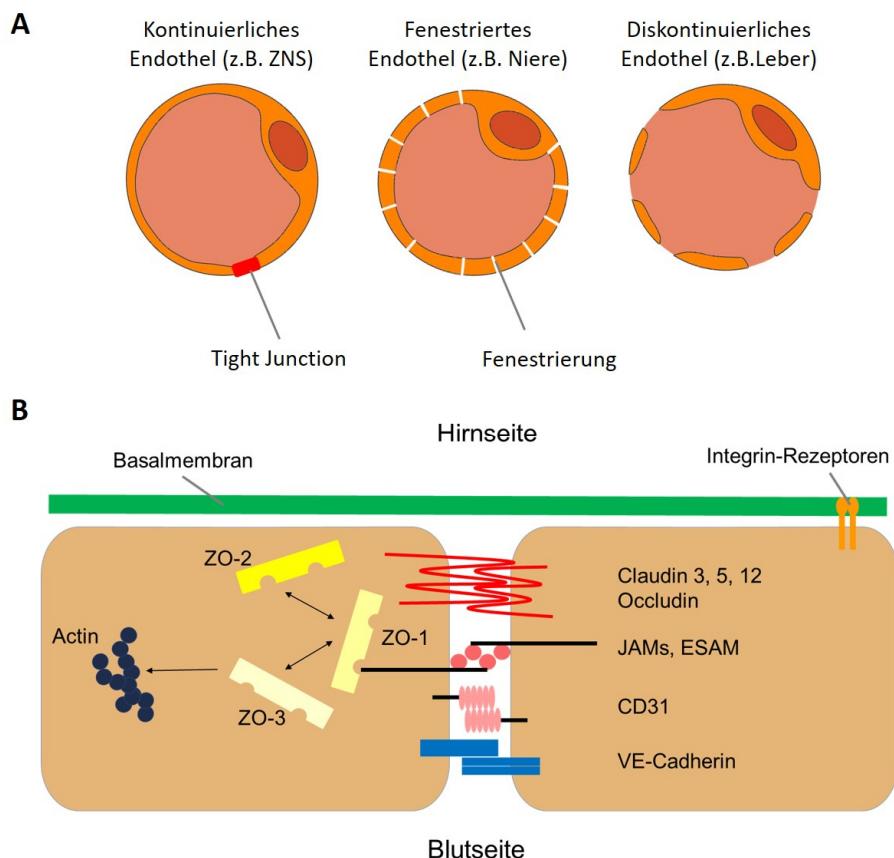


Abbildung 6 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Endothelzelltypen (A) und des molekularen Aufbaus endothelialer *Tight* und *Adherens Junction* (B). (A) Je nach Lokalisation im Körper und der Funktion des entsprechenden Organs unterscheidet man drei Arten mikrovaskulärer Blutgefäße: eine sehr dichte Barriere wird durch eine kontinuierliche Endothellschicht erreicht, während das fenestrierte Endothel kleine Öffnungen und das diskontinuierliche Endothel große Öffnungen für den Stofftransport enthält. (B) Verknüpfung benachbarter Endothelzellen findet über *Tight Junctions* (Claudine, Occludin) und *Adherens Junctions* (VE-Cadherin) statt, deren Verbindung zu Aktin über Proteine der ZO-Familie reguliert wird. (Modifiziert nach Abbott et al., 2006 [83] und Tortora und Derrickson, 2006 [87])

Da durch die dichte physische Barriere, jedoch auch der Transport von für das Gehirn essentiellen Stoffen eingeschränkt ist, während einige toxische Metabolite die BBB gleichzeitig passiv überwinden können, bedarf es spezialisierter Transportsysteme für den Transport ins Gehirn bzw. den Rücktransport in die Blutbahn. Diese steuern die Bewegung von Nährstoffen, Ionen und Toxinen über Stoffwechseltransporter, die sich auf der luminalen (apikal, dem Blut zugewandten) und der abluminalen (basal, dem Hirn zugewandten) Seite der Endothelzellen befinden. Für die Barrierefunktion und damit dem Schutz des Gehirns besonders wichtig sind dabei spezielle Transporter, die sogenannten Efflux-Pumpen, die zur Familie der ABC-Transporter (*engl. ATP-Binding Cassette*) gehören und auf der luminalen Seite endothelialer Zellen lokalisiert sind. Sie

Einleitung

dienen dem aktiven Rücktransport potenziell toxischer Substanzen, um so in das Gehirn eingedrungene Xenobiotika, toxische Metabolite, Bakterien oder kleine lipophile Moleküle, die die BBB passiv überwinden konnten, wieder zurück in den Blutkreislauf zu schleusen.^[88,89] Zwei wichtige und mittlerweile gut erforschte Efflux-Pumpen sind P-Glykoprotein (P-gp) und das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). Eine Übersicht über die verschiedenen Transport- und Stoffwechselwege der BBB ist in Abbildung 7 gezeigt.

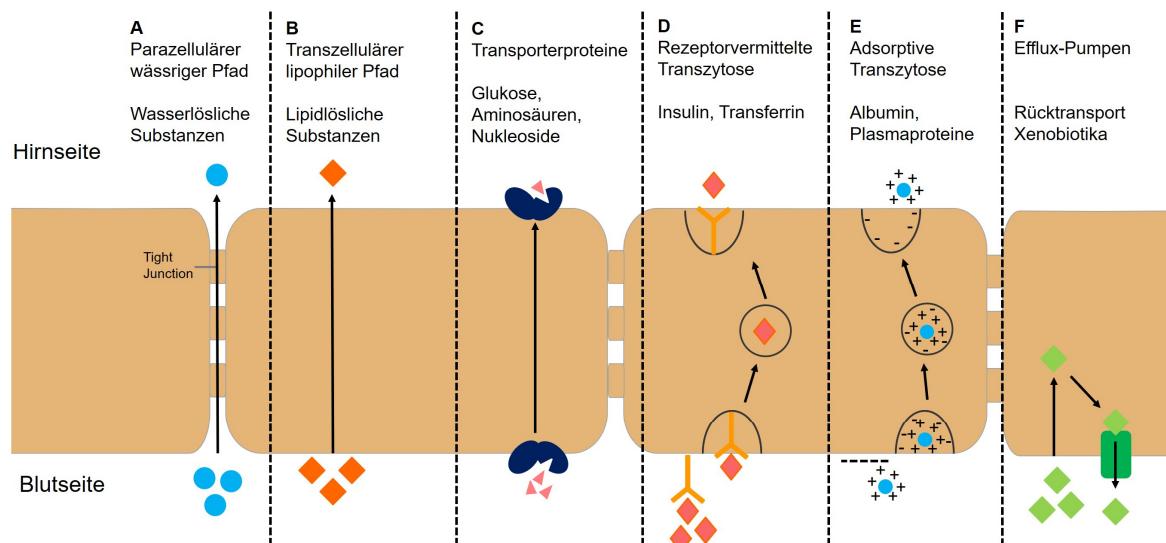


Abbildung 7 Schematische Darstellung der verschiedenen Stoffwechselwege der BBB. A+B: dichte physische Barrierewirkung induziert durch das Zusammenspiel von kontinuierlichem Endothel und *Tight Junctions*, C-E: spezifische Transportwege für essentielle Nährstoffe durch die dichte physische Barriere, F: zusätzliche Efflux-Pumpen erzeugen Barrierefunktion durch aktiven Rücktransport von Xenobiotika ins Blut. (Modifiziert nach Cockerill et al., 2018)^[90]

Durch weitere Interaktionen mit anderen Komponenten der NVU wird die spezifische Barriereeigenschaft zerebraler Endothelzellen unterstützt und reguliert.

Entgegen der lange vorherrschenden Meinung, dass die Endothelzellen lediglich eine passive Komponente der NVU darstellen, spielen diese zudem eine wichtige funktionelle Rolle bei der Kontrolle des Gefäßtonus. Durch die Produktion vasoaktiver Faktoren steuern sie die Dilatation (Stickstoffmonoxid) und Vasokonstriktion (Endothelin, Thromboxan) der Gefäße.^[82]

2.2.2.1 Basalmembran

Umgeben sind die Endothelzellen von einer Basalmembran. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Form der EZM, die vorwiegend unter Endothel- und Epithelzellen vorzufinden ist. Neben ihrer unterstützenden Funktion für die Endothel- und Epithelzellen trennt sie diese gleichzeitig von dem darunter liegenden Gewebe.^[91] An der Grenzfläche zwischen dem Blutstrom und dem Gehirngewebe trennt die vaskuläre Basalmembran die Endothelzellen von den umgebenden Neuronen und Gliazellen. Ebenfalls in die Basalmembran eingebettet befinden sich die Perizyten. Strukturell unterscheidet sich die Basalmembran von der Matrix des Gehirnparenchyms, und ist hauptsächlich aus den vier Matrixproteinen Kollagen IV (Strukturelement), Laminin, Nidogen (spezialisierte Proteine) und Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG: Perlecan, Agrin, Kollagen XVII) aufgebaut. Sie hat eine Dicke von 20-200 nm.^[92,93] Die Interaktion der Zellen mit Proteinen und der Basalmembran erfolgt über spezielle Rezeptoren der Integrin- und Dystroglycan-Rezeptorfamilien.^[94,95] Eine schematische Darstellung der molekularen Zusammensetzung der

Basalmembran und die Interaktion mit der Zelle ist in Abbildung 8 gezeigt. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Basalmembran eine Rolle bei der Funktion und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des BBB spielt. Eine Störung der EZM führt daher häufig zu einer erhöhten Permeabilität der BBB.^[96] Darüber hinaus können Matrixproteine die Expression endothelialer *Tight Junction*-Proteine beeinflussen.^[97]

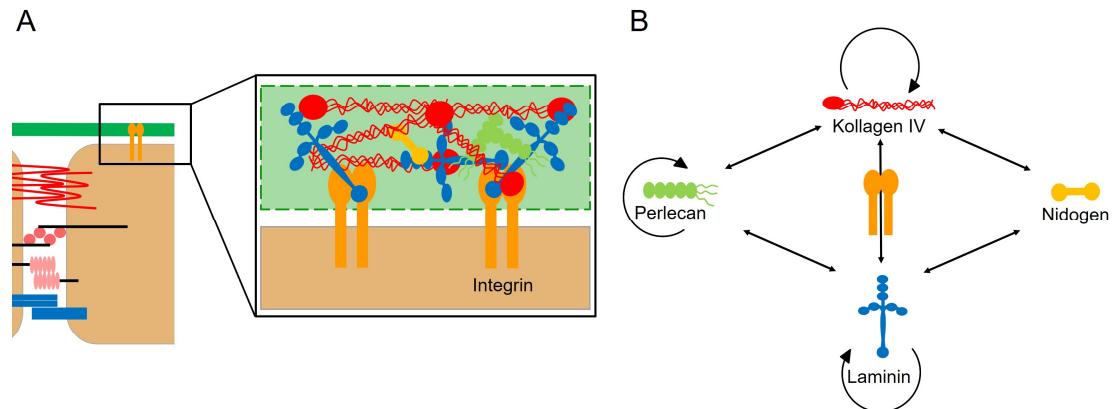


Abbildung 8 Zusammensetzung der Basalmembran und Interaktion mit der Zelle. (A) Schematische Darstellung der Basalmembran aus netzartigem Kollagen IV, Laminin, Perlecan und Nidogen und Verankerung über Integrinrezeptoren mit der Zelle. (B) Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile untereinander. (Modifiziert nach A. Müllner)^[98]

2.2.2.2 Wirkung von Scherkräften auf das Endothel

Durch den kontinuierlichen Blutfluss in Gefäßen wirkt auf die Endothelzellen eine permanente mechanische Kraft, die als Scherkraft oder Scherstress bezeichnet wird. Diese entsteht durch die Reibung zwischen dem fließenden Blut und der apikalen Zellmembran. Sie wirkt parallel zum umliegenden, blutgefäßbildenden Endothel in Richtung des Blutflusses und hat Auswirkungen auf die Morphologie und Funktion einiger Zelltypen. Schematisch ist dies in Abbildung 9 gezeigt.

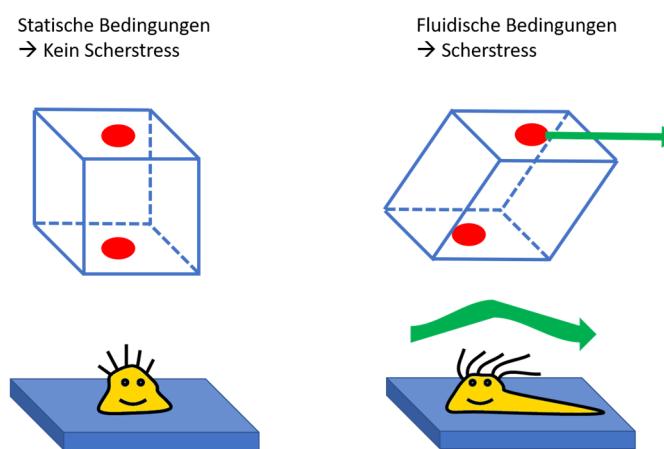


Abbildung 9 Wirkung von Scherkräften auf Zellen (modifiziert nach ibidi®)^[99]

Auf die physiologische Funktion der Zellen kann sich der Scherstress beispielsweise in einer veränderten Ionenkanalaktivierung, einem veränderten Genexpressionsmuster oder einer Reorganisation des Zelllayers auswirken. Auch für die Regulierung der BBB spielen Scherkräfte eine wichtige Rolle.^[100–103]

Angegeben wird der Scherstress in Blutgefäßen und fluidischen *in vitro* Systemen typischerweise in der Einheit dyn/cm^2 , wobei nach SI $1 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 0,1 \text{ kg}/\text{m}\cdot\text{s}^2$ entspricht. Aus Gründen der

Einleitung

Vergleichbarkeit zur Literatur wurde im Rahmen dieser Arbeit die Einheit dyn/cm^2 zur Angabe der Scherkraft verwendet. Physiologische Scherkräfte liegen zwischen 0,5 und 120 dyn/cm^2 und sind abhängig von der Art des Gefäßes (Vene, Arterie, Kapillare), dem Gewebe (Herz, Lunge, Hirn, Darm) und der Größe des Organismus. Die Flussrate in Kapillaren im menschlichen Körper beträgt typischerweise 6 bis 12 nl/min , was bei einer Viskosität von 0,001 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ einem Scherstress von 10-20 dyn/cm^2 in einer 10 μm Kapillare entspricht. Die verringerte Viskosität von 0,001 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ im Vergleich zur Viskosität von Blut mit 0,004 $\text{Pa}\cdot\text{s}$ beruht auf dem sogenannten Fahraeus-Lindqvist Effekt. Dieser beschreibt das Phänomen, dass Blutzellen, die normalerweise für die erhöhte Viskosität verantwortlich sind, dazu tendieren, die Gefäßwand in Kapillaren zu meiden, was dazu führt, dass sich um die Gefäßwand eine etwa 3 μm dicke Zell-freie Schicht bildet, die eine Viskosität ähnlich Wasser (bzw. Zellkulturmedium) hat.^[101]

2.2.3. Perizyten

Perizyten sind kontraktile Zellen des Bindegewebes. Zusammen mit den Endothelzellen bilden sie die Kapillaren und liegen zentral innerhalb der NVU zwischen Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen. Eingebettet sind sie in die Basalmembran, die sie sich mit den Endothelzellen teilen und damit direkten Kontakt zu diesen haben. Das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen im Zentralnervensystem (ZNS) beträgt dabei 1:3-4 und ist damit höher als in peripheren Gefäßen. Perizyten sind polymorphe Zellen, die häufig eine sternförmige Morphologie mit einem kugelförmigen Zellkörper ausweisen. Lange zytoplasmatische Fortsätze, die entlang der Achse von Gefäßzellen orientiert sind, umschließen dabei die Endothelzellen und bilden über *Gap Junctions* (kanalbildende Proteinkomplexe), fokale Adhäsion und *Peg-and-Sockets-Junctions* die Verbindung zu diesen.^[104]

Im Kontext der BBB und der NVU haben Perizyten eine Vielzahl wichtiger Funktionen, was durch verschiedene Studien bestätigt werden konnte.^[105] Neben ihrer Rolle bei der Stabilisierung von Hirnkapillaren *in vivo*^[106] zeigen verschiedene Untersuchungen einen Einfluss auf die Induktion, Aufrechterhaltung und Regulation der BBB.^[107,108] Dabei regulieren sie einerseits die Genexpression benachbarter Endothelzellen durch Hochregulierung bestimmter Marker, die wichtig für die BBB-Funktion sind, andererseits vermitteln sie die Polarisation und Anheftung von Astrozytenendfüßchen an die Blutgefäße.^[81] Auch bei der Regulierung des Blutflusses an den Bedarf aktiver Neuronen spielen Perizyten durch Modulation des Gefäßdurchmessers eine wichtige Rolle. Durch ihren direkten Kontakt zu den Endothelzellen und die Expression einer Reihe kontraktiler Proteine können Perizyten durch Veränderung der Zelllänge den Gefäßdurchmesser beeinflussen. Die Reaktion und Anpassung an den Nährstoffbedarf erfolgt durch die Reaktion vasoaktiver Rezeptoren auf spezifische Signalmoleküle.^[81,82,109]

2.2.4. Astrozyten

Astrozyten gehören zur Gruppe der Gliazellen und sind deren häufigste Vertreter im Gehirn. *In vivo* bilden Astrozyten eine sternförmige Morphologie aus und stellen die Verbindung zwischen den Blutgefäßen und den Neuronen her. Durch Organisation in großen Netzwerken, die anatomisch durch *Gap Junctions* miteinander verbunden sind, können Signale auch über große Entfernung übertragen werden. Der Kontakt zu den Endothelzellen und damit die neurovaskuläre Kommunikation wird über lange Fortsätze, die sogenannten Astrozytenendfüßchen, hergestellt, die das zerebrale Gefäßsystem fast vollständig abdecken. Dieser enge Kontakt ist wichtig für die

Aufrechterhaltung der BBB, indem die Hochregulation komplexer *Tight Junctions* sowie verschiedener Transporter in den Endothelzellen induziert wird. Dies führt zu einer dichteren Barriere mit einer verringerten Permeabilität und erhöhtem transendothelialem elektrischem Widerstand (TEER).^[81,82,110] Durch Ko-Kulturen von Endothelzellen und Astrozyten oder Astrozytenkonditioniertem Medium konnte dies *in vitro* gezeigt werden.^[111,112] Verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Molekularstudien zeigten zudem die Freisetzung von Effektormolekülen, die dazu beitragen, die Dichtigkeit der Barriere aufrechtzuerhalten.^[113] Die Interaktion der Endothelzellen mit den Astrozyten führt weiterhin zu einer Polarität der Endothelzellen durch unterschiedliche Expression verschiedener Transporter in der luminalen und abluminalen Membran.^[114]

Neben der Beteiligung an der Aufrechterhaltung der BBB spielen die Astrozyten durch ihre vermittelnde Position zwischen den Neuronen und den Endothelzellen auch eine wichtige Rolle für die NVC. Durch die Reaktion auf die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat an benachbarten Synapsen werden Veränderungen im Gefäßtonus ermöglicht. Dabei induziert die Freisetzung einen Anstieg von intrazellulärem, freiem Ca²⁺ in den Astrozyten, was wiederum dazu führt, dass an den Astrozytenendfüßchen vasoaktive Arachidonsäuremetaboliten freigesetzt werden. Die Reaktion der Astrozyten auf den Ca²⁺-Anstieg ist dabei abhängig von der Stoffwechselumgebung und kann daher sowohl zu einer Vasodilatation als auch einer Vasokonstriktion führen. Darüber hinaus produzieren und setzen Astrozyten weitere vasoaktive Substanzen wie Prostaglandine, Adenosintriphosphat und Stickstoffmonoxid frei.^[81,82]

2.2.5. Neuronen

Neuronen sind hochspezialisierte Zellen, deren Aufgabe darin besteht Reize zu empfangen, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Dabei werden Signale von den Sinnesorganen zum zentralen Nervensystem übertragen und dort analysiert, interpretiert und weiterverarbeitet.^[115] Alleine das menschliche Gehirn besteht aus etwa 100 Milliarden Neuronen, die komplexe Netzwerke untereinander ausbilden.^[116] Innerhalb der NVU bilden diese das zentrale Element und können als „Schrittmacher“ bezeichnet werden. Schon sehr kleine Schwankungen in der Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff werden erkannt und in elektrische und chemische Signale umgewandelt, die an benachbarte Interneuronen oder Astrozyten weitergegeben werden. Über diese Signale können so Reaktionen aktiviert werden, die zu einer Anpassung des Gefäßtonus und damit der Blutversorgung führen.^[82]

2.2.6. EZM im Gehirn

Durch strukturelle und funktionelle Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Gehirn aus verschiedenen Regionen aufgebaut ist, die sich durch die Anordnung der Zellen und Verschiedenheiten in der EZM unterscheiden. Im Gegensatz zu den meisten Geweben finden sich im Gehirnparenchym nur relativ geringe Mengen fibrillärer Proteine, wie beispielsweise Kollagen oder Fibronektin. Stattdessen zeichnet sich die EZM im Gehirn durch eine Vielzahl von Glykosaminoglykanen aus. Diese kommen entweder gebunden an ein Protein als Proteoglykane vor oder liegen im ungebundenen Zustand in Form von Hyaluronsäure vor.^[93,117]

2.2.7. *In vitro* Rekonstruktionen der NVU

In den vergangenen Jahren wurde bereits eine große Zahl verschiedener Mono- und Ko-Kultur-Modelle zur Rekonstruktion der BBB und der NVU entwickelt. Dabei wird in den letzten Jahren

Einleitung

vermehrt auf die oben beschriebenen Systeme wie Transwells und OoCs zurückgegriffen.^[118–126] Obwohl dadurch bereits gute Barriereeigenschaften erzielt wurden, basieren viele von ihnen auf statischen Modellen^[127,128] oder rechteckigen Kanalstrukturen^[129,130] und spiegeln daher nicht die *in vivo*-Situation eines runden Blutgefäßes wider. Zudem werden häufig Zellen nicht-menschlichen Ursprungs verwendet^[131,132], was ihre Übertragbarkeit auf den Menschen einschränkt. Gegenwärtig mangelt es auch an Modellen, die sich durch die Vollständigkeit aller im Gehirn vorkommenden Zelltypen und anderer nicht-zellulärer Komponenten wie der EZM auszeichnen. Ein Modell, das all diese Anforderungen erfüllt, könnte zu einer beschleunigten und verbesserten Medikamentenentwicklung beitragen.

3. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro* Modells der NVU durch die Kombination verschiedener Methoden aus dem *Tissue Engineering*.

Mithilfe der *Organ-on-Chip*-Technologie sollte so ein auf menschlichen und hirnspezifischen Zellen basierendes, vaskularisiertes *in-vitro*-Modellsystem entwickelt werden, das die *in-vivo*-Situation des Gehirns möglichst genau reproduziert und damit eine schnelle und einfache Untersuchung der Migration von Wirkstoffen ermöglicht. Neben der Nachbildung des Endothels und der dichten BBB durch die Ko-Kultur verschiedener hirnspezifischer Zellen, sollte eine geeignete Matrix zur Erzeugung von dreidimensionalem Hirngewebe entwickelt, untersucht und zusammen mit Neuronen in das Modell integriert werden. Eine schematische Darstellung hierzu ist in Abbildung 10 gezeigt.

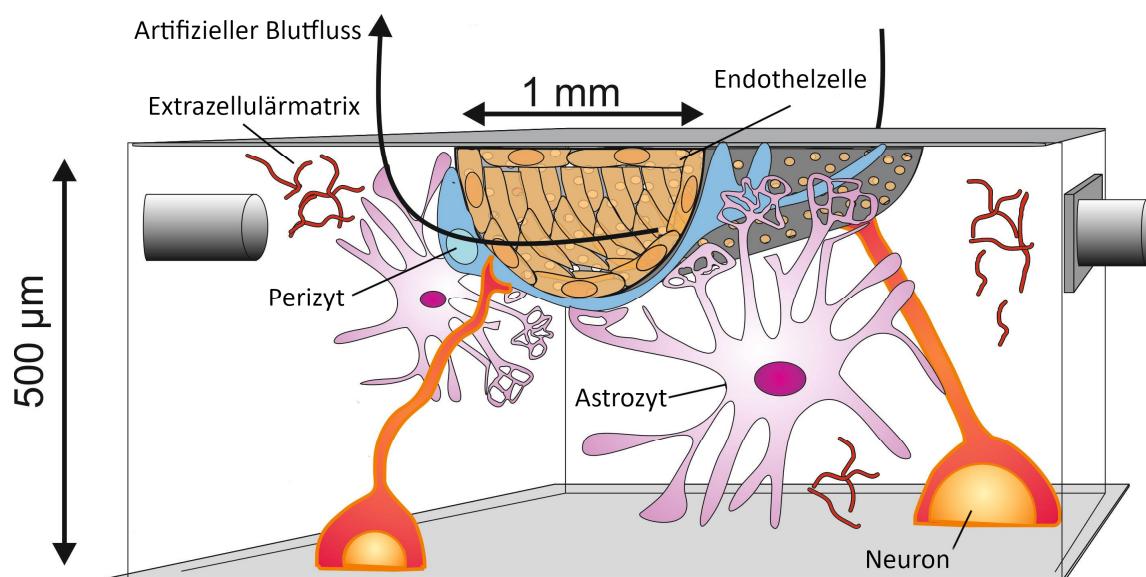


Abbildung 10 Schematische Darstellung der NVU im vasQchip. Der halbrunde poröse Kanal wird mit Endothelzellen ausgekleidet und über eine Mikrofluidik artifiziell durchblutet. Im umgebenden Kompartiment erfolgt die Kultivierung hirnspezifischer Zellen zusammen mit einer Extrazellulären Matrix. Der Austausch von Nährstoffen erfolgt durch Poren in der PC-Membran. (modifiziert nach V. Kappings)^[133]

4. Ergebnisse

Zur Etablierung der NVU wurde in dieser Arbeit das am KIT entwickelte vasQchip-System verwendet und mit hirnspezifischen Zellen besiedelt.^[28,64] Der halbrunde Polycarbonat (PC)-Kanal ermöglichte dabei die Kultivierung von Blutgefäßzellen in einer *in vivo*-artigen Anordnung und die Erzeugung eines artifiziellen Blutstroms. Der Kontakt zu den gewebespezifischen Zellen im umgebenden Kompartiment und der Austausch von Nährstoffen erfolgte durch Poren mit bis zu 1-2 µm Durchmesser. Zunächst wurde hierfür das Endothel etabliert und charakterisiert, anschließend erfolgte die Einbringung weiterer Zellen sowie die Untersuchung und Einbringung einer geeigneten EZM-imitierenden Substanz inklusive Neuronen.

4.1. Etablierung des BBB-Endothels

Da sich die BBB vor allem durch ein besonders dichtes Endothel *in vivo* auszeichnet, war die Etablierung dieses Endothels im vasQchip wichtig. Die Rekonstruktion einer Endothelzellenschicht mit HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) im vasQchip wurde bereits von I. Hebeiß und D. Ivannikov durchgeführt und ausführlich charakterisiert.^[63,64] Hierbei handelt es sich um primäre Endothelzellen aus der Nabelschnur. Da das Hirnendothel jedoch einige spezifische Anforderungen erfüllen muss und sich charakteristisch von anderem Endothel, wie beispielsweise in der Leber, dem Darm oder auch der Nabelschnur unterscheidet, sollte zur Rekonstruktion der NVU Hirnendothelzellen verwendet werden. Für die Rekonstruktion der BBB war es notwendig ein sehr dichtes Endothel nachzubilden, das die spezifischen Eigenschaften der physischen Barriere und der Transportbarriere des Hirnendothels erfüllt. Hierfür stehen Primärzellen, verschiedene Zelllinien sowie Stammzellen zur Verfügung. Primärzellen, zu denen auch die oben erwähnten HUVEC zählen, sind terminal differenzierte Zellen, die meist durch Biopsie aus dem betreffenden Gewebe gewonnen werden. Dadurch spiegeln sie das physiologische Zellverhalten zwar sehr gut wider und wären das geeignete Material zur Nachbildung von Hirnmodellen *in vitro*, sie weisen aber auch einige Nachteile auf. Zunächst ist die Verfügbarkeit von humanem Hirngewebe sehr beschränkt, was primäre Endothelzellen für den Einsatz größerer Studien ungeeignet macht. Primäre Hirnendothelzellen aus tierischen Ressourcen hingegen sind aufgrund der bereits mehrfach erwähnten speziespezifischen Unterschieden sowie aus ethischen Gründen bedenklich.^[134] Ein weiterer Nachteil primärer Zellen ergibt sich durch die Dedifferenzierung und den Verlust morphologisch charakteristischer Eigenschaften *in vitro*. Darüber hinaus handelt es sich oftmals um eine heterogene Population von Zellen des zugrundeliegenden Gewebes und durch unterschiedliche Spender ergeben sich mögliche Varianzen des Zellmaterials. Auch die durch den Alterungsprozess begründete begrenzte Lebensdauer primärer Zellen limitiert deren Verwendung.^[135–137] Zurückzuführen ist die begrenzte Lebensdauer auf die Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung. Haben sie die als Hayflick-Grenze beschriebene Anzahl an Zellteilungen erreicht, wird der programmierte Zelltod eingeleitet.^[138,139] Meist sind primäre Zellen zudem teuer und anspruchsvoll in der Kultivierung.

Um das Problem der begrenzten Lebensdauer primärer Zellen zu umgehen, ist es möglich eine Immortalisierung durchzuführen. Durch die Infektion mit bestimmten Viren (SV40, HTLV), durch Transfektion mit Onkogenen oder fehlerhaften Tumorsuppressorgenen oder durch eine Fusion mit Tumorzellen kann so die begrenzte Anzahl an Zellteilungen aufgehoben werden.^[140–142]

Für die Etablierung einer *in vitro* BBB stehen mittlerweile verschiedene humane immortalisierte Endothelzelllinien, wie hCMEC/D3 (*human cerebral microvascular endothelial cell D3*), hBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*), TY10 oder BB19 zur Verfügung, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen.^[143,144] Unter den publizierten Endothelzelllinien zur Rekonstruktion der BBB ist die humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelllinie hCMEC/D3 die am häufigsten verwendete und am besten charakterisierte Zelllinie.^[128,144–146] 2005 wurde sie durch Weksler *et. al.* zum ersten Mal beschrieben und seitdem weitgehend charakterisiert. Hergestellt wurde sie aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (CECs), die aus Gewebe isoliert wurden, das während einer Epilepsieoperation aus dem Schläfenlappen entnommen wurde. Durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren mit dem SV40 T-Antigen und humaner Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) wurden sie immortalisiert.^[144,147] Hinsichtlich spezifischer Eigenschaften zerebraler Endothelzellen konnte durch vielfältige Studien die Expression wichtiger *Tight Junction*-Proteine, Transporter, Rezeptoren und metabolischer Enzyme bestätigt werden. Ein stabiles Wachstum und die Beibehaltung eines BBB-Phänotypen konnte bis in hohe Passagen gezeigt werden, weshalb sich diese Zelllinie gut zur *in vitro* Rekonstruktion der BBB eignet und auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde.^[134]

4.1.1. Untersuchung verschiedener Beschichtungen

Die Kultivierung der Zellen im vasQchip erfolgte auf einer PC-Membran. PC gilt als zytokompatibel und wird bereits kommerziell zur Herstellung verschiedener Kultivierungsmaterialien eingesetzt. Da in verschiedenen *in vitro* Studien für die Kultivierung von Hirnendothelzellen jedoch gezeigt werden konnte, dass sowohl das Kultivierungsmaterial als auch die zur Beschichtung verwendeten Basalmembranproteine einen signifikanten Einfluss auf die Barrierefähigkeit des Endothels haben^[143,145], wurden zunächst verschiedene Extrazellulärmatrixproteine und Glykoproteine zur Beschichtung der PC-Membran gewählt und hinsichtlich verschiedener Faktoren untersucht. Dadurch sollte festgestellt werden, ob eine Beschichtung der PC-Membran für die Etablierung einer BBB im vasQchip notwendig ist und ob verschiedene Matrixproteine zu einer erhöhten Barrierefähigkeit beitragen. Diese Versuche wurden zunächst zwei-dimensional und unter statischen Bedingungen durchgeführt. Als Matrixproteine dienten Fibronectin, Gelatine, GelTrexTM, Kollagen I, Kollagen IV und Laminin. Die Konzentration der einzelnen Beschichtungen betrug jeweils 20 µg/cm².

Laut Hersteller wird die Kultivierung von hCMEC/D3 auf Kollagen I-beschichteten Kultivierungsmaterialien empfohlen.^[146] Auch in der vaskulären Basalmembran des Gehirns sind Kollagene als wichtiger Bestandteil vorzufinden. Hier sind jedoch vor allem Kollagen IV und Kollagen XVII vertreten.^[117] Strukturell unterscheiden sich die beiden untersuchten Kollagentypen: Während Kollagen I wie auch Kollagen XVII fibrilläre Strukturen bilden, weist Kollagen IV eine netzartige Struktur auf, wodurch es im Vergleich flexibler ist.^[148] Wie Kollagen, ist auch Laminin ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran, während Fibronectin im gesunden Gehirn normalerweise nur gering exprimiert wird.^[117] Dennoch findet Fibronectin sehr häufig Anwendung als Beschichtungsmaterial und wurde aus diesem Grund zur Untersuchung hinzugezogen. Im Gegensatz zu den bereits genannten Matrixbestandteilen handelt es sich bei GelTrexTM nicht um ein einzelnes (Glyko-)Protein, sondern um eine komplexe Mischung aus verschiedenen Basalmembranbestandteilen. Es besteht unter anderem aus Laminin, Kollagen IV, Heparansulfatproteoglykanen und Entacin/Nidogen. Da sich auch die vaskuläre Basalmembran aus

Ergebnisse

verschiedenen Proteinen und Glykoproteinen zusammensetzt, wozu auch die vier genannten zählen, wurde dies hier als mögliches Beschichtungsmaterial untersucht. Mit Gelatine wurde zusätzlich ein vergleichsweise sehr günstiges Material getestet. Hierbei handelt es sich um das Hydrolyseprodukt von Kollagen, welches aus Schlachtabfällen gewonnen wird. Im Körper hat es keine funktionelle Bedeutung.

4.1.1.1 Einfluss der Beschichtung auf Adhäsion, Wachstum und Verteilung

Aufgrund des kleinen Kanalvolumens im vasQchip von ca. 5,5 µl ist eine schnelle Zelladhäsion erforderlich, da die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen nur einschränkt erfolgen kann. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten, muss der Chip aus diesem Grund an ein Pumpensystem angeschlossen werden. Dies kann jedoch erst erfolgen, wenn die Zellen an die Oberfläche angewachsen sind. Um die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche zu untersuchen, wurde die PC-Folien durch selbstklebende Zellkultur-Slides in Kammern unterteilt und die Zellen in diese ausgesät. Dabei wurde die PC-Folie zuvor entweder mit einem der genannten Matrixproteine beschichtet oder blieb als Kontrolle unbeschichtet. Die Zelladhäsion wurde dann über einen Zeitraum von drei Stunden in 30-Minuten-Intervallen visuell überwacht. Nach 24 h wurden zusätzlich die Zellkerne gefärbt (Hoechst33342, 2 µg/ml) und es wurde überprüft, ob die Zellen gleichmäßig über die Oberfläche verteilt waren. Hierzu wurden verschiedene Stellen im Well visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 - Abbildung 17 dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die Wahl der Beschichtung einen deutlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Zellanheftung hat. Während bei Fibronectin (Abbildung 12) bereits nach 30 min ein Großteil der Zellen an der Oberfläche angewachsen war und nach 1,5 h die für Endothelzellen typische Morphologie ausbildeten, war bei einer Beschichtung mit Gelatine (Abbildung 13) und Laminin (Abbildung 17) auch nach 3 h noch eine Vielzahl von nicht angewachsenen Zellen zu beobachten (helle Punkte). Zu einer ebenfalls schnellen Anhaftung der Zellen an die PC-Folie führten Beschichtungen mit Kollagen I, Kollagen IV und GelTrex™. Unabhängig von der Art der Beschichtung konnte jedoch eine homogener Verteilung der Zellen auf der Oberfläche im Vergleich zur unbeschichteten PC-Folie festgestellt werden. Auch hier konnte nach 24 h zwar ein Anhaften der Zellen beobachtet werden, allerdings zeigten sich an den Rändern teilweise große Löcher im Zelllayer, während die Zellen in der Mitte des Wells sehr dichte Cluster bildeten (Abbildung 11).

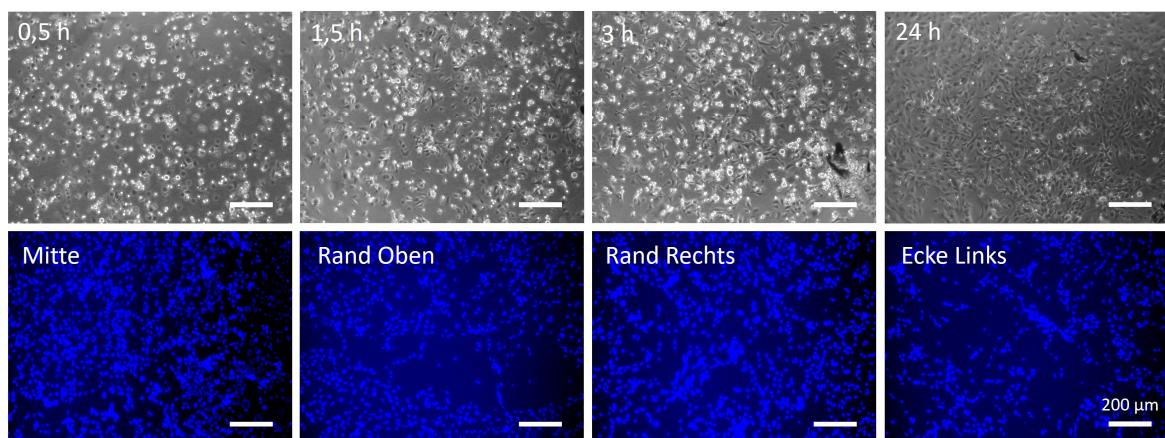


Abbildung 11 Wachstum von hCMEC/D3 auf unbeschichteter Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine unbeschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 µm.

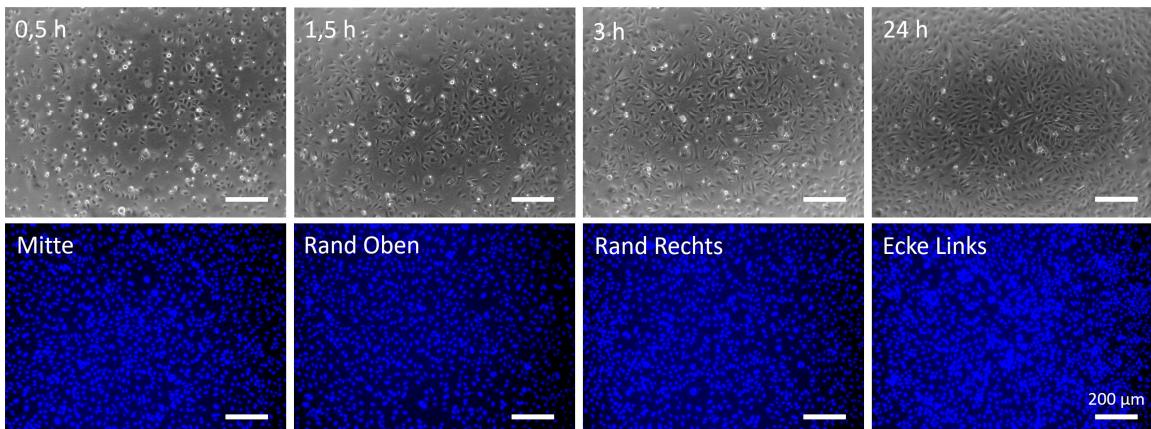


Abbildung 12 Wachstum von hCMEC/D3 auf Fibronectin-beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit humanem Fibronektin beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 µm.

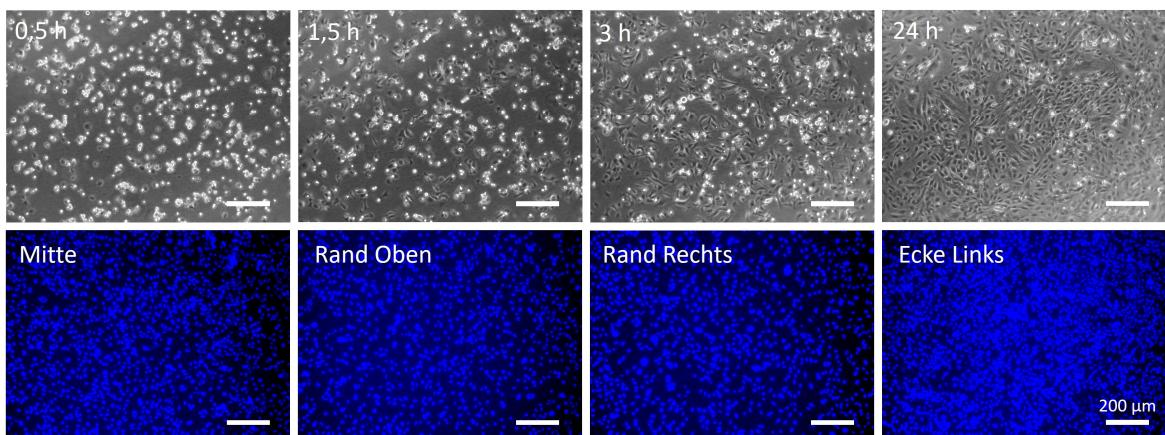


Abbildung 13 Wachstum von hCMEC/D3 auf Gelatine-beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit porciner Gelatine beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 µm.

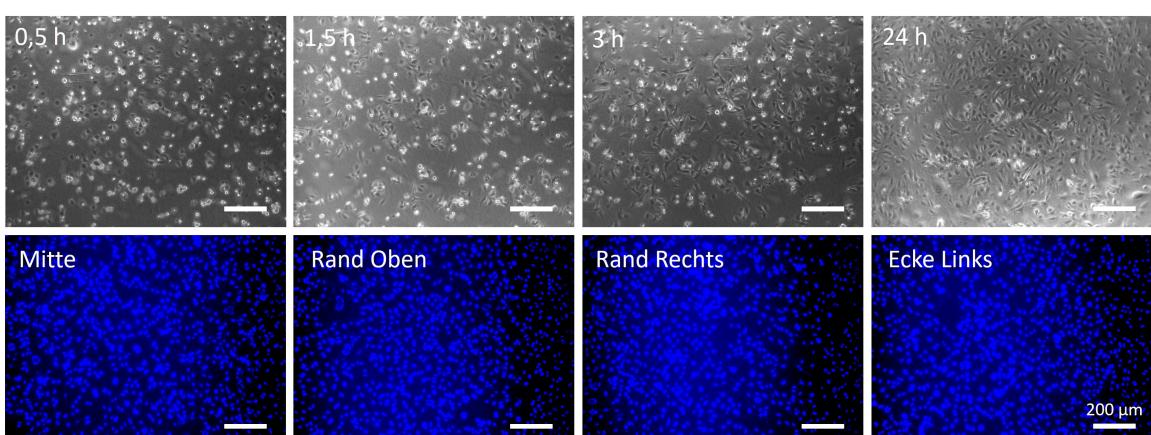


Abbildung 14 Wachstum von hCMEC/D3 auf GelTrex™-beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit murinem GelTrex™ beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 µm.

Ergebnisse

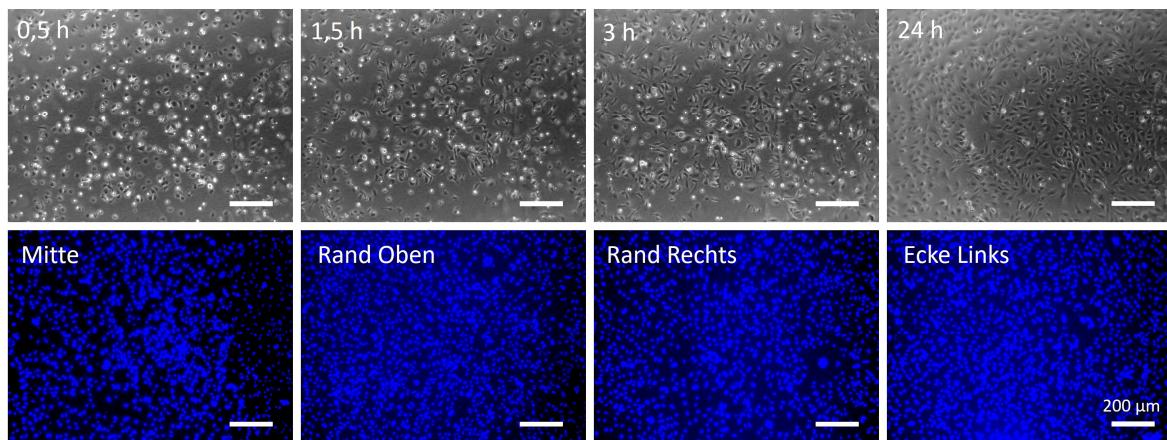


Abbildung 15 Wachstum von hCMEC/D3 auf Kollagen I-beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit murinem Kollagen-I beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $200 \mu\text{m}$.

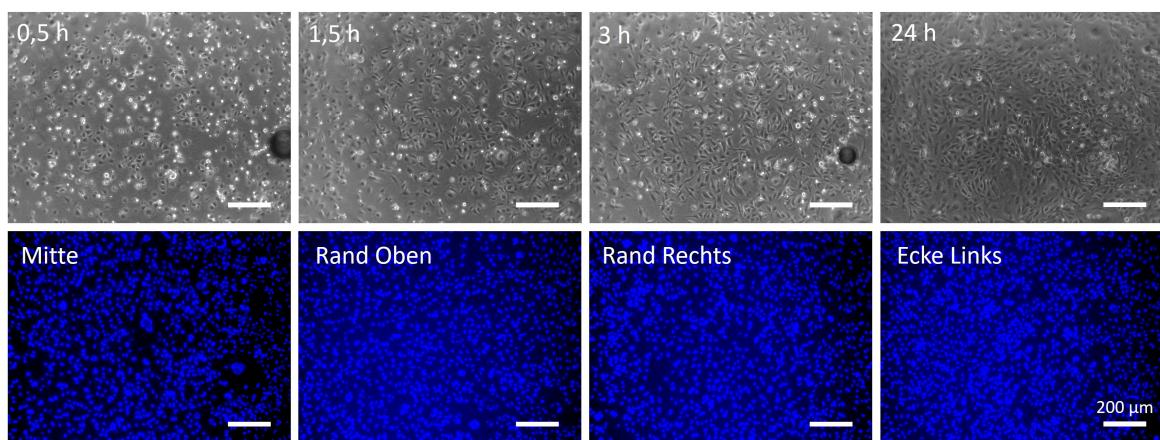


Abbildung 16 Wachstum von hCMEC/D3 auf Kollagen VI-beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit humanem Kollagen IV beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop DMIL Leica LED. Maßstab: $200 \mu\text{m}$.

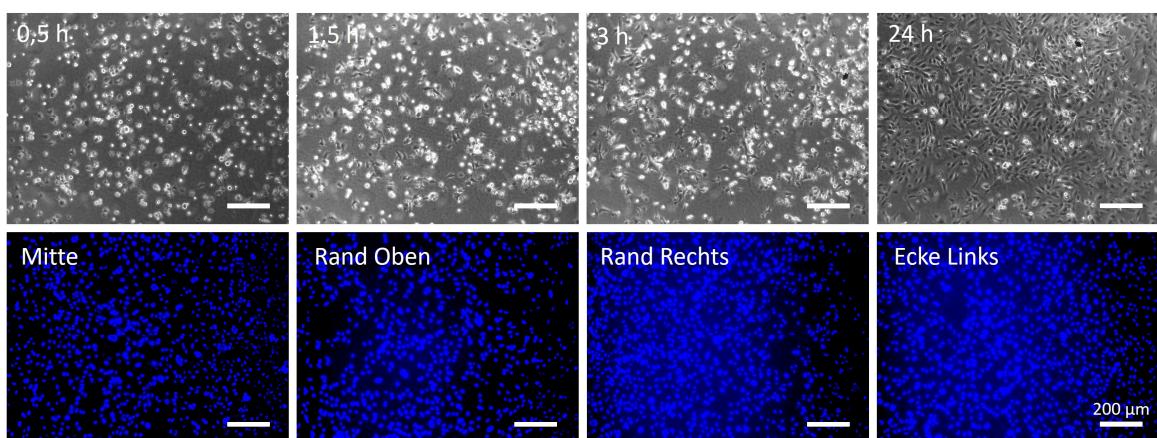


Abbildung 17 Wachstum von hCMEC/D3 auf Laminin--beschichteter ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Polycarbonat-Folie. $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden auf eine zuvor mit murinem Laminin beschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Nach 24 h erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342 um die Verteilung der Zellen im Well zu visualisieren. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $200 \mu\text{m}$.

Da in der Literatur für die eingesetzten Beschichtungen sehr unterschiedliche Konzentrationen angegeben werden und diese teilweise um mehrere Zehnerpotenzen voneinander abweichen, wurde in einem separaten Versuch untersucht, ob die Geschwindigkeit des Anwachsens von der Konzentration der Beschichtung abhängt. Hierzu wurden Fibronectin und Gelatine miteinander verglichen, da diese zum einen sehr große Unterschiede in der Geschwindigkeit des Anhaftens zeigten und die in der Literatur angegebenen Werte zur Beschichtung zum anderen zwei Zehnerpotenzen auseinanderliegen. Während in der Literatur für die Beschichtung mit Gelatine Konzentrationen von 100-200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ angeben sind [149], liegt die angegebene Konzentration für eine Beschichtung mit Fibronectin deutlich niedriger bei 1-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. [150] Zusätzlich zur bereits untersuchten Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ wurde daher für Fibronectin eine Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ gewählt, für Gelatine eine Konzentration von 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Auf die so beschichteten PC-Folien wurden $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 ausgesät und das Anhaften der Zellen wurde analog zu oben über einen Zeitraum vom 3 h in Intervallen von 30 min visuell überwacht. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, zeigten die unterschiedlichen Konzentrationen keine Änderung in der Geschwindigkeit des Anhaftens der Zellen.

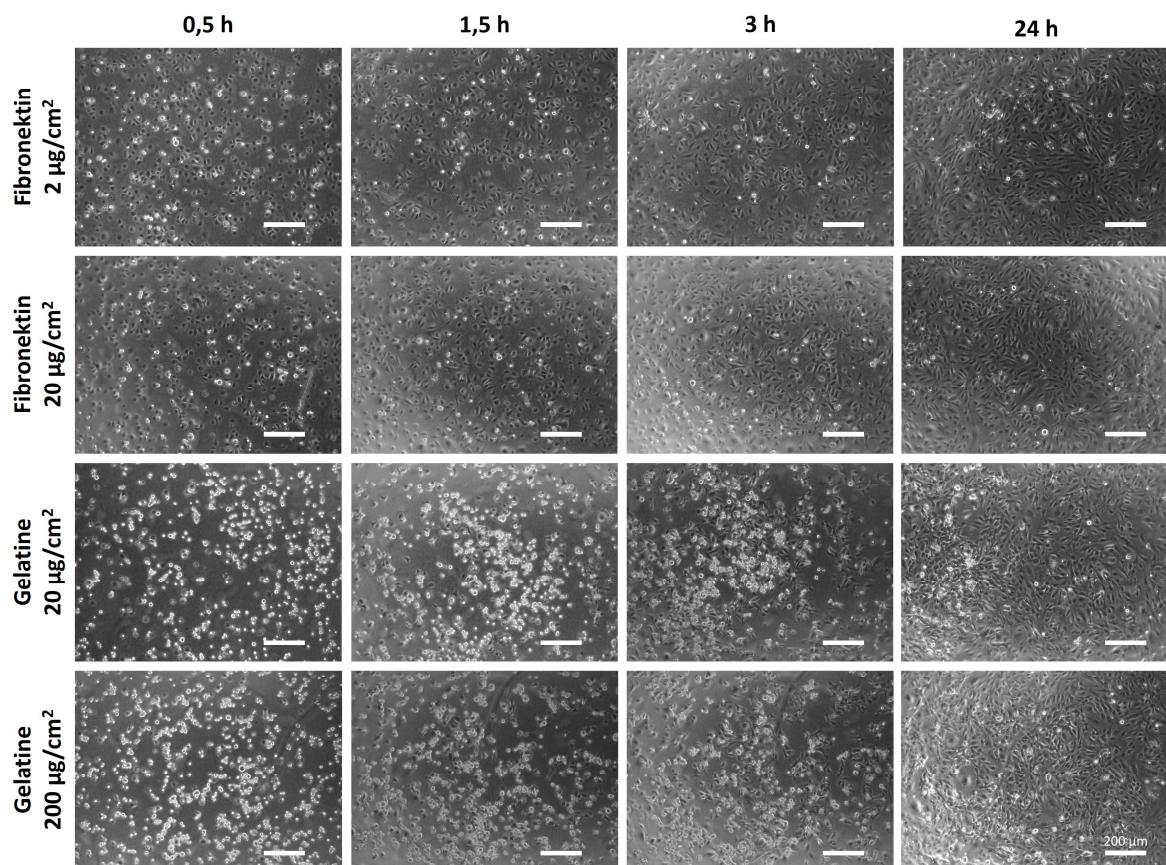


Abbildung 18 Vergleich verschiedener Beschichtungskonzentrationen. PC-Folien (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) wurden mit je zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Fibronectin ($2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und Gelatine ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Anschließend wurden je $4 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h visuell überwacht. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 μm .

Um einen Einfluss der Beschichtung auf das Wachstum von hCMEC/D3 zu untersuchen, wurden die Wells einer 96-Well-Platte mit den oben genannten Matrixproteinen in einer Konzentration von $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichtet, anschließend wurden die Zellen ausgesät und das Wachstum über einen Zeitraum von sieben Tagen verfolgt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Das

Ergebnisse

größte Wachstum konnte dabei für Beschichtungen mit Fibronectin, Kollagen I sowie Kollagen IV mit prozentualen Zellzahlzunahmen von 2133 %, 2062 % und 1958 % beobachtet werden. Das geringste Wachstum mit einer Zunahme von 1480 % wurde für eine Beschichtung mit GelTrex™ bestimmt. Gelatine und Laminin wiesen Wachstumsraten von je 1733 % und 1612 % auf.

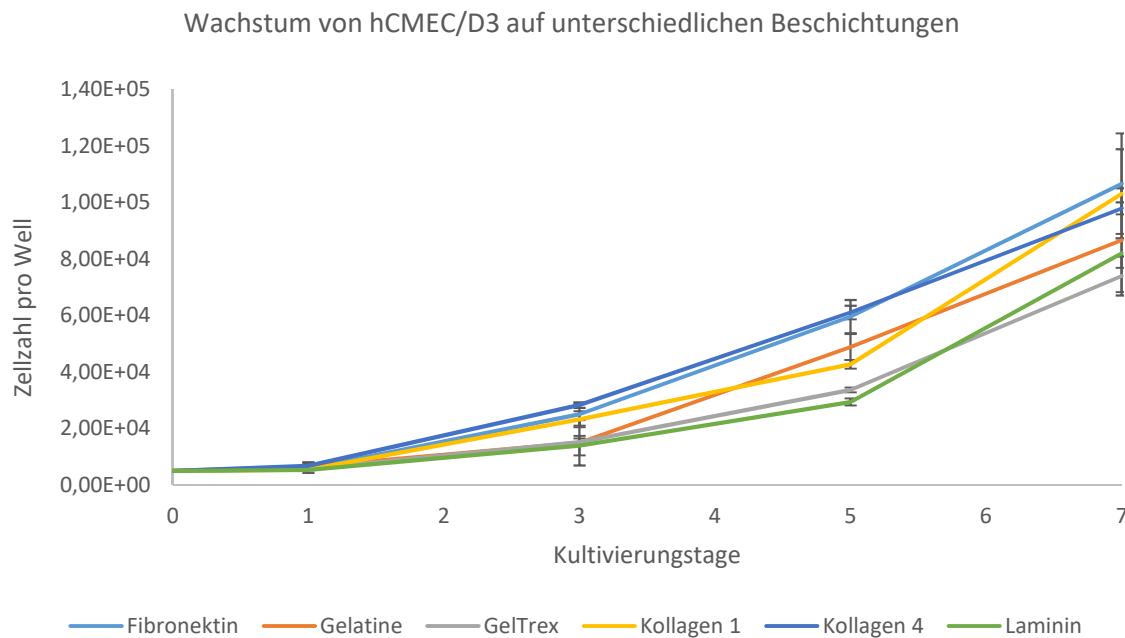


Abbildung 19 Wachstumskurve von hCMEC/D3 auf unterschiedlichen Beschichtungen. Je $5 \cdot 10^3$ hCMEC/D3 wurden in 100 µl hCMEC/D3-Kultivierungsmedium in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und für 7 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. An Tag 1, 3, 5 und 7 wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Mittelwert und Standardabweichungen wurden berechnet aus n=3 unabhängigen Proben.

4.1.1.2 Einfluss der Beschichtung auf die Expression spezifischer Marker

Neben einer schnellen Zelladhäsion an die PC-Folie zur Versorgung der Zellen über eine Mikrofluidik war für die Etablierung der BBB vor allem die Ausbildung einer dichten Barriere entscheidend. *In vivo* zeichnet sich das BBB-Endothel neben fehlenden Fenestrationen und einer geringen Pinozytose durch die Ausbildung eines dichten Netzwerks von *Tight Junctions* aus.^[84,151,152] Diese verbinden benachbarte Zellen und stellen so einen engen Kontakt zwischen diesen her. Die Expression spezifischer *Tight* und *Adherens Junctions* ist für die verwendete Zelllinie hCMEC/D3 weitgehend untersucht und in der Literatur bekannt.^[134,147] Da wie oben bereits erwähnt jedoch das Kultivierungsmaterial und die Beschichtung einen Einfluss auf die Ausbildung einer dichten Barriere haben können, wurde die Genexpression von CD31, Claudin-5, Occludin, ZO-1 und VE-Cadherin für eine Kultivierung auf unterschiedlich beschichteten PC-Folien durch RT-qPCR untersucht.

Alle der untersuchten Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Barrierefintegrität und -selektivität der BBB. CD31 gehört dabei zur Gruppe der *Tight Junction*-assoziierten Proteine und dient als Regulator für die Gefäßpermeabilität.^[153,154] Claudin-5 und Occludin sind beides Transmembranproteine, die zur Gruppe der *Tight Junctions* gehören. Während Claudin-5 die Integrität und Permeabilität der BBB reguliert^[155,156], ist Occludin wichtig für die Interaktion und Eingliederung der *Tight Junctions* in das komplexe Netzwerk mit Gerüstproteinen, zu denen ZO-1 zählt.^[157–159] Durch Wechselwirkungen mit den Transmembranproteinen auf der einen Seite und dem Aktinzytoskelett auf der anderen wird so eine Verbindung hergestellt.^[156] Anders als die bisher genannten Proteine, zählt VE-Cadherin (*Vascular Endothelial Cadherin*) zu den

Adherens Junction-Proteine. Diese sind wie auch die *Tight Junction*-Proteine verantwortlich für die Adhäsion zwischen Zellen sowie zu zytoplasmatischen Proteinen und Gerüstproteinen. [156] VE-Cadherin spielt dabei eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung und Kontrolle der Endothelzellkontakte.[160]

Um den Einfluss der Beschichtung zu untersuchen, wurden hCMEC/D3-Zellen auf zuvor beschichtete PC-Membranen ausgesät, für 48 h bis zur Konfluenz mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert und anschließend weitere 48 h in einem Wachstumsfaktor-reduzierten Medium (im Folgenden als hCMEC/D3-Differenzierungsmedium bezeichnet) weiterkultiviert. Die RNA (Ribonukleinsäure, engl. *Ribonucleic Acid*) wurde dann isoliert, in cDNA (komplementäre DNA, engl. *complementary Desoxyribonucleic Acid*) transkribiert und eine relative Quantifizierung über eine farbstoffbasierte RT-qPCR (quantitative Echtzeit (engl. *Real Time*) - Polymerasekettenreaktion, engl. *Polymerase chain reaction*) durchgeführt. Als Referenzgen diente hierbei Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Quantifizierung erfolgte in Relation zum Wachstum auf einer unbeschichteten PC-Folie. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 20 aufgeführt.

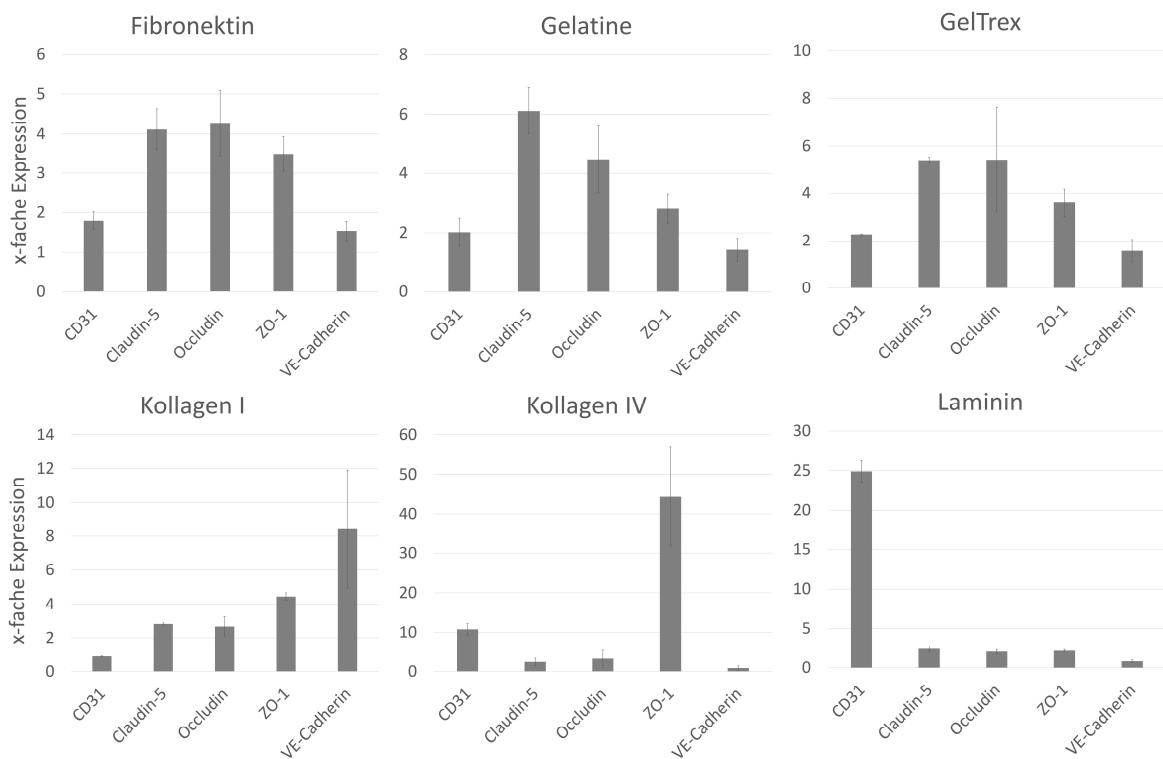


Abbildung 20 Relative RNA-Expression verschiedener Proteine von hCMEC/D3 auf unterschiedlich beschichteten PC-Folien im Vergleich zur unbeschichteten Folie (=1). PC-Folien wurden mit Fibronektin, Gelatine, GelTrex™, Kollagen I, Kollagen IV und Laminin in einer Konzentration von 20 µg/cm² (Wachstumsfläche 0,7 cm²) beschichtet und anschließend mit 2·10⁴ hCMEC/D3 besiedelt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz im hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, anschließend weitere 48 h im Differenzierungsmedium kultiviert. Durch TRIzol®-Isolation wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode, indem die relative RNA-Expression auf eine unbeschichtete PC-Folie (=1) normiert wurde. Als Referenzgen diente GAPDH, Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden aus n=3 unabhängigen Proben berechnet.

Zusätzlich zur molekularbiologischen Untersuchung wurde eine Immunofluoreszenzfärbung der Proteine CD31 und VE-Cadherin sowie eine Visualisierung des Aktinzytoskeletts durchgeführt (Abbildung 21).

Ergebnisse

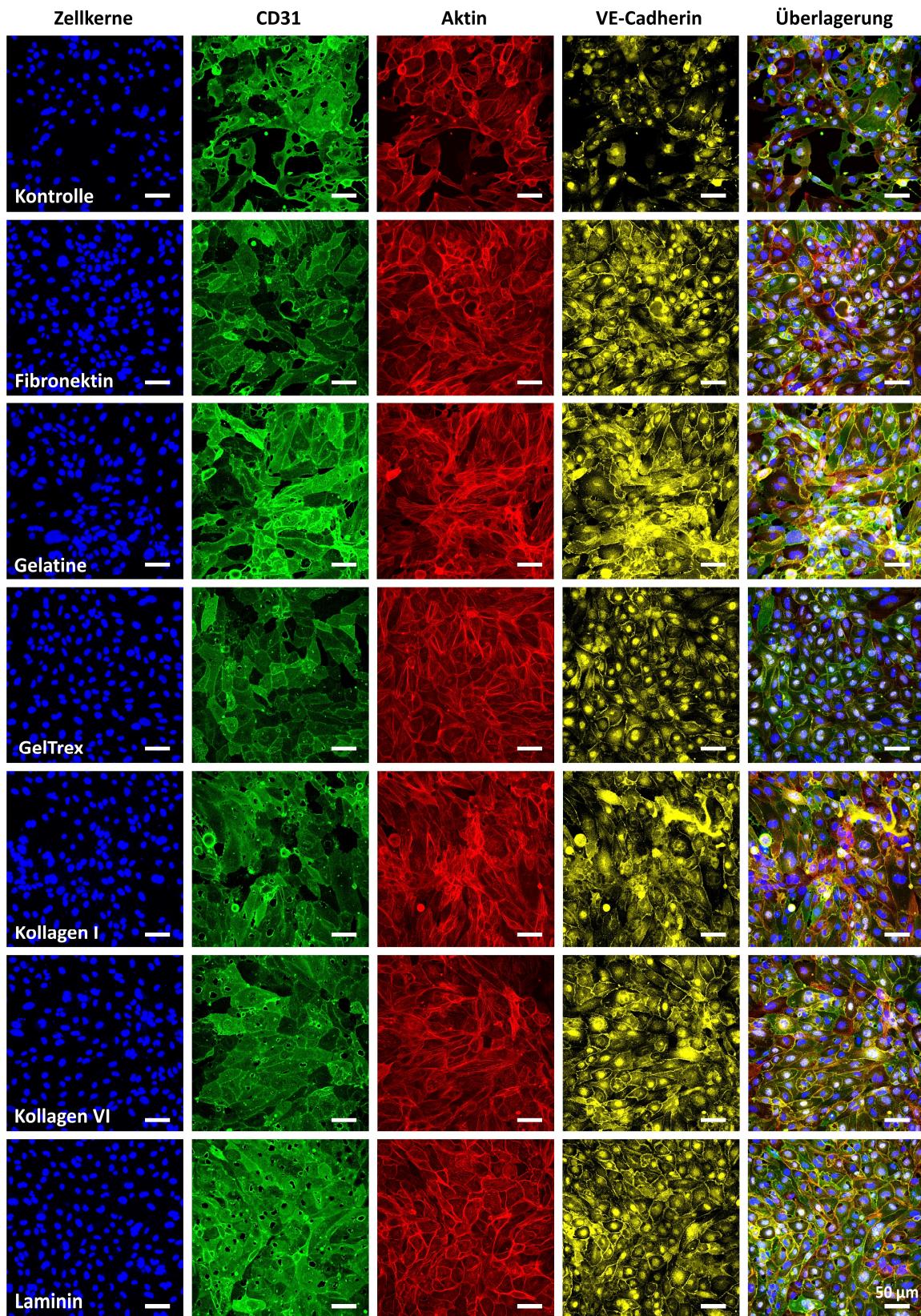


Abbildung 21 Visualisierung spezifischer Zellstrukturen auf unterschiedlich beschichteten PC-Folien. PC-Folien wurden mit Fibronektin, Gelatine, GelTrex™ Kollagen I, Kollagen IV und Laminin in einer Konzentration von $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Wachstumsfläche $0,7 \text{ cm}^2$) beschichtet und anschließend mit $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz im hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, anschließend weitere 48h im Differenzierungsmedium kultiviert, dann mit PFA fixiert und spezifische Zellstrukturen visualisiert. Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne, Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31, Rot: Visualisierung des Aktinzytoskeletts über Phalloidin-TRITC, Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: $50 \mu\text{m}$

Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Beschichtung der PC-Membran die Genexpression von wichtigen *Tight Junction*-Proteinen beeinflusst werden kann. Durch Beschichtungen mit Fibronectin, GelTrex™ und Gelatine konnte für alle untersuchten Proteine eine Hochregulation der RNA-Level gegenüber der Kultivierung auf einer unbeschichteten Folie nachgewiesen werden. Für die Beschichtungen mit Kollagen I, Kollagen IV und Laminin wurden ebenfalls Hochregulationen der RNA-Level von je vier der untersuchten Proteine beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle waren jedoch CD31 auf einer Kollagen I-Beschichtung ($0,897 \pm 0,032$) und VE-Cadherin auf einer Kollagen IV- ($0,904 \pm 0,543$) sowie Laminin-Beschichtung ($0,822 \pm 0,206$) erniedrigt. Der Vergleich mit der Immunfluoreszenzfärbung zeigte für CD31, dass dieses auch in der Kontrolle sehr stark exprimiert wurde, wodurch sich die relative Erniedrigung bei einer Kultivierung auf Kollagen I erklären könnte. Anders als erwartet, war dieses jedoch nicht verstärkt an den Zellkontakten, wie beispielsweise bei Fibronectin oder GelTrex™, sondern über die gesamte Zelle verteilt. Auffällig war dies ebenfalls für eine Kultivierung auf Laminin, bei der das Protein zwar gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt detektiert wurde, jedoch einige Fenestrierungen aufwies. Molekularbiologisch wurde für Laminin eine stark erhöhte Expression für CD31 im Vergleich zur Kontrolle gezeigt ($24,904 \pm 1,350$). Die erniedrigten Expressionen von VE-Cadherin auf Kollagen IV und Laminin-Beschichtungen konnten durch die Immunfluoreszenzfärbungen nicht belegt werden. Für die Kontrolle wurde hier ein deutlich geringeres Signal detektiert.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Beschichtung der PC-Folie zu einer erhöhten RNA-Expression verschiedener *Tight Junction*-Proteine führte und damit zur Ausbildung einer dichten Barriere beitragen kann. Da der Assay jedoch keine Aussage über die tatsächlich vorhandene Proteinmenge liefert, sondern nur über die Aktivität des zugrundeliegenden Gens und die zum Zeitpunkt der Durchführung vorliegende RNA-Menge, müsste diese in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

4.1.1.3 Einfluss der Beschichtung auf den parazellulären Transport

Die Ausbildung eines dichten Netzwerks von *Tight Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen *in vivo* führt zu einer hohen Barrierefähigkeit des Zelllayers, die die Grundlage für einen selektiven und geregelten Stoffaustausch darstellt. Angegeben wird die Barrierefähigkeit oft als TEER-Wert (engl. *Transendothelial Electrical Resistance*), der den elektrischen Widerstand des Zelllayers beschreibt. Für die BBB *in vivo* liegt dieser Wert bei $1800 \Omega \text{ cm}^2$.^[161] Neben der Expressionsanalyse zur Beurteilung der Bildung eines dichten Netzwerks von *Tight Junctions* wurde aus diesem Grund die Barrierefähigkeit des Zelllayers bei einem Wachstum auf unterschiedlichen Beschichtungen über Permeabilitätstests ermittelt. Diese sind, neben der Messung des TEER-Werts, ein wichtiges Instrument zur Untersuchung der Barrieredichtigkeit. Dabei wird der Transport einer fluoreszenzmarkierten Substanz durch das Endothel in einem bestimmten Zeitintervall gemessen. Die Permeabilität eines Stoffes durch die BBB ist dabei abhängig von Größe, Lipophilie und davon, ob dieser Zielsubstanz spezifischer Rezeptoren ist. Kleine lipophile Moleküle können die BBB über passive Diffusion überwinden, während der Transport von großen, hydrophilen Molekülen eingeschränkt ist und nur über spezielle Transportmechanismen stattfinden kann.^[162] Um die Dichtigkeit der BBB zu untersuchen, werden hierzu Stoffe verwendet, die weder in die Zellen aufgenommen, noch durch endotheliale Enzyme abgebaut werden oder Substrate endothelialer Rezeptoren oder Efflux-Pumpen sind. Die Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten erfolgt dabei über die folgende Formel:^[163]

Ergebnisse

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{1}{A*C_0}$$

P _{app} :	Permeabilitätskoeffizient [cm/s]
dQ/dt:	transportierte Masse pro Zeit [µg/s]
A:	Diffusionsoberfläche [cm ²]
C ₀ :	Anfangskonzentration [µg/ml]

Bei der Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten einer Zellschicht muss dabei berücksichtigt werden, dass auch die zur Kultivierung verwendete Membran einen Einfluss auf den Transport des untersuchten Stoffes hat und bereits eine Barriere für dessen Diffusion darstellt. Um den Permeabilitätskoeffizienten der reinen Zellschicht zu bestimmen, muss aus diesem Grund zusätzlich der Permeabilitätskoeffizient der Membran bestimmt werden. Der Permeabilitätskoeffizient der Zellen P_{Zellen} ohne Membraneinfluss P_{Membran} ergibt sich dabei über folgenden Zusammenhang:

$$\frac{1}{P_{Zellen}} = \frac{1}{P_{Gesamt}} - \frac{1}{P_{Membran}}$$

Zur Untersuchung des Einflusses der Beschichtung auf die Barrierefähigkeit wurde der Stoff *Lucifer Yellow* (LY) (Abbildung 22) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein hydrophiles, fluoreszierendes Molekül, welches in der Literatur häufig Anwendung als Dichtigkeitsmarker für die Untersuchung von BBB-Modellen findet.^[143,164,165]

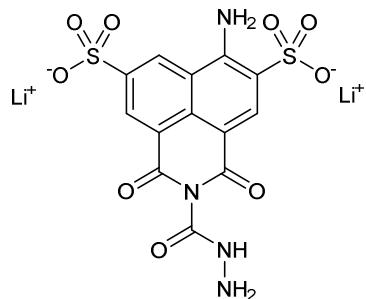


Abbildung 22 Struktur von Lucifer Yellow

Um zu untersuchen, ob die Beschichtung einen Einfluss auf die Barrierefähigkeit der ausgebildeten hCMEC/D3-Zellschicht hat, wurden die Zellen zunächst für sechs Tage auf unterschiedlich beschichteten porösen PC-Membranen (0,4 µm Poren) kultiviert. Um die Ausbildung einer dichten Barriere zu induzieren, wurde nach 72 h auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium umgestellt. LY wurde anschließend apikal appliziert und für 1 h inkubiert. Die apikale sowie basale Konzentration wurde dann durch Fluoreszenzmessung bestimmt und somit der Permeabilitätskoeffizient ermittelt. Als Referenz diente jeweils eine entsprechend beschichtete PC-Membran ohne Zellen. Durch Färbung der Zellkerne wurde nach erfolgtem Assay überprüft, ob die Zellschicht konfluent war und keine Löcher aufwies, da dies die Aussagekraft des Experiments einschränken würde. Die Ergebnisse der Permeabilitätsmessung sind in Abbildung 23 dargestellt. Die Hoechst33342-gefärbten Zelllayer sind im Anhang in Abbildung 101 aufgeführt. Zudem wurde die Mass Recovery berechnet, diese gibt den Massenwiederfindungswert der Substanz an, der sich aus der Summe der berechneten LY-Mengen im apikalen und basalen Kompartiment

zusammensetzt. Laut Hubatsch et. al. sollte diese für eine akzeptable Annäherung des P_{app} -Werts bei mindesten 80 % liegen.^[166] Dies war sowohl für die Permeabilitätsbestimmungen der beschichteten Membranen sowie die Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten der Zellschichten gegeben. Die Massenwiederfindungswerte lagen zwischen 80,89 % und 98,77 %. Die Permeabilitätskoeffizienten für alle getesteten Beschichtungen lagen im Bereich von 10^{-5} cm/s und damit in einem Bereich, der mit aus der Literatur bekannten Werten gut übereinstimmt.^[143,164] Für eine Beschichtung mit Kollagen I konnte mit $1,50 \cdot 10^{-5} \pm 3,33 \cdot 10^{-6}$ cm/s der niedrigste Permeabilitätskoeffizient und damit der geringste Durchtritt von LY bestimmt werden. Die höchste Permeabilität wurde für eine Beschichtung mit Kollagen IV nachgewiesen, hier lag der Wert bei $2,55 \cdot 10^{-5} \pm 5,94 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Dieser war damit 1,7-fach höher als der Wert von Kollagen I. Es konnte zudem gezeigt werden, dass bereits die Beschichtung einen Einfluss auf den Durchtritt von LY durch die Membran hat. Auffällig war, dass im Gegensatz zu Fibronectin, Gelatine und Kollagen I, die Beschichtung mit Kollagen IV bereits eine vergleichsweise starke Barriere für den Durchtritt von LY bildete und stärker zur Erniedrigung der Permeabilität beitrug als die reine Zellschicht. Der Permeabilitätskoeffizient für die reine Beschichtung mit Kollagen IV lag bei $2,19 \cdot 10^{-5} \pm 2,42 \cdot 10^{-6}$.

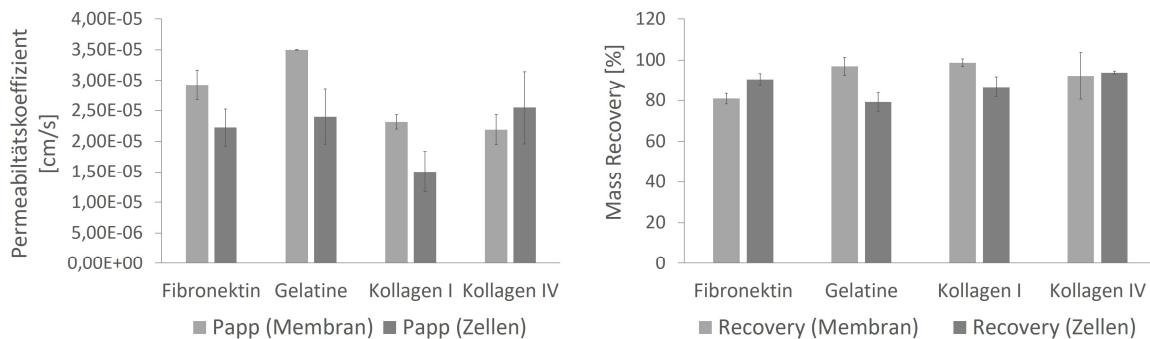


Abbildung 23 Einfluss der Beschichtung auf die Permeabilität von Lucifer Yellow in hCMEC/D3. Je $1 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden für 72 h in beschichteten ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Transwell-Filter mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ im hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und anschließend für weitere 72 h im hCMEC/D3-Differenzierungsmedium bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Zur Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten von LY wurde dieses apikal appliziert ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) und für 1 h inkubiert. Anschließend folgten eine Fluoreszenzmessung und Konzentrationsbestimmung der apikalen sowie der basalen Lösung und die Berechnung der Permeabilitätskoeffizienten. Die P_{app} -Werte der beschichteten PC-Membranen wurden abgezogen. Mittelwert und Standardabweichungen wurden berechnet aus $n=3$ unabhängigen Proben. Nach erfolgtem Assay wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) angefärbt, um die Zelllayer auf ihre Unversehrtheit zu prüfen.

4.1.1.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der PC-Folie mit Matrixproteinen zu einer homogeneren Verteilung der Zellen auf der Oberfläche im Vergleich zur unbeschichteten PC-Folie führte. Bei ausbleibender Beschichtung dauerte es zudem länger bis die Zellen an der Oberfläche adhärierten. Zusätzlich zum schnelleren Anwachsen und einer gleichmäßigeren Verteilung der Zellen, konnte darüber hinaus durch molekularbiologische sowie immunologische Analysen gezeigt werden, dass eine Beschichtung zu erhöhten Expressionen wichtiger *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteinen führte, die essentiell für die Ausbildung einer dichten Barriere sind. Eine Beschichtung der Folie war aus diesem Grund erforderlich. Da Beschichtungen mit Laminin und Gelatine zu einer sehr langsamen Adhäsion an die Folie führten, waren diese beiden Beschichtungen, trotz besserer Verteilung und höherer RNA-Level von *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteinen, nicht geeignet. Die Beschichtung mit GelTrex™ führte ebenfalls zu einer verstärkten RNA-Expression aller untersuchten *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteine und

Ergebnisse

im Vergleich zu Gelatine und Laminin darüber hinaus auch zu einer sehr schnellen Adhäsion der Zellen an die PC-Folie. Da es sich hierbei jedoch um eine komplexe Mischung verschiedener Basalmembranproteine handelt, die aus murinen Engelbreth-Holm-Swarm Tumoren gewonnen und aufgereinigt wird, kann es von Batch zu Batch zu veränderten Protein Zusammensetzungen kommen. Eine reproduzierbare Kultivierung und Barriereförderung im Mikrokanal war dadurch nicht gewährleistet und GelTrexTM aus diesem Grund als Beschichtungsmaterial auszuschließen.

In Bezug auf die parazelluläre Permeabilität konnte gezeigt werden, dass verschiedene Beschichtungen zu unterschiedlich dichten Barrieren gegenüber LY führten. Die dichteste Barriereförderung konnte für eine Beschichtung mit Kollagen I nachgewiesen werden, während Zellen die auf Kollagen IV kultiviert wurden, den größten Permeabilitätskoeffizienten und damit die schwächste Barriere für LY darstellten. Ein weiteres Problem bei der Kultivierung der Zellen auf Kollagen IV in Hinblick auf die Kultivierung im Mikrokanal des vasQchips stellten, die durch die Beschichtung entstehenden, starken Unebenheiten auf der Oberfläche der Membran dar. Die Anlagerung von großen, ungelösten Teilen der Beschichtungslösung (siehe Abbildung 24) könnten im Mikrokanal aufgrund der geringen Oberfläche und des kleinen Volumens dazu führen, dass eine gleichmäßige Durchströmung des Kanals nicht mehr gegeben ist.

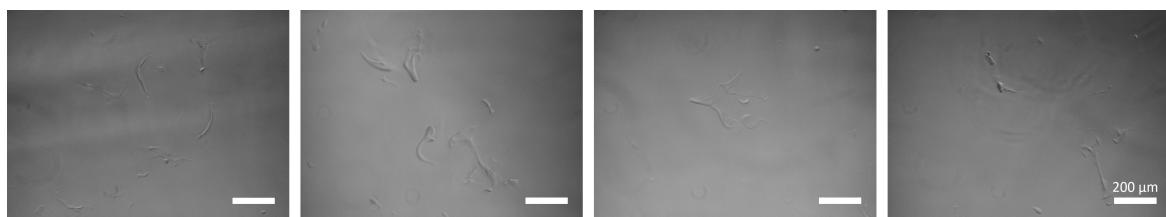


Abbildung 24 Ungelöste Partikel der Kollagen IV Beschichtungslösung nach Beschichtung mit 20 µg/cm². Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 µm

Für die fluidische Kultivierung im Mikrokanal des vasQchips eigneten sich von den in dieser Arbeit untersuchten Beschichtungen aus den oben genannten Gründen daher am besten Kollagen I sowie Fibronectin. Beide Beschichtungen führten zu einer schnellen Adhäsion der Zellen an die PC-Folie, zeigten erhöhte Expressionen wichtiger *Tight Junction*- und *Adherens Junctions* und führten zu einer verstärkten Barriereförderung im Vergleich mit beispielsweise Gelatine und Kollagen IV für den parazellulären Transport von LY.

4.1.2. Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Barriereförderung

Laut Literatur kann die Barriereförderung *in vitro* dadurch induziert werden, dass die Zellen in einen quasi-statischen Zustand versetzt werden, in dem sie sich nicht mehr teilen. Neben dem Anlegen eines Flusses kann auch das Entfernen oder die Reduktion von im Medium befindlichen wichtigen Wachstumsfaktoren zur Ausbildung einer dichten Barriere beitragen.^[134] Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene Medien und deren Einfluss auf die Expression spezifischer Marker untersucht. Hierzu wurden 1·10⁴ hCMEC/D3-Zellen auf zuvor beschichtete PC-Folien (Kollagen I, 10 µg/cm², Wachstumsfläche 1 cm²) ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Hierbei wurde die Kontrollgruppe für den gesamten Zeitraum im normalen hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert, während bei einer Probengruppe das Medium nach 48 h auf ein Wachstumsfaktor-reduziertes Medium, das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium umgestellt wurde. Bei diesem sind die Wachstumsfaktoren entfernt sowie zusätzlich die Konzentration an fötalem Kälberserum (FCS) reduziert. Alle weiteren Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage.

Anschließend wurde die RNA der Proben isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression spezifischer Gene für CD31, VE-Cadherin, Claudin-5, Occludin, ZO-1, sowie der Efflux-Pumpen BCRP und P-gp durch farbstoffbasierte RT-qPCR bestimmt. Dabei wurde die Expression der mRNA relativ im Vergleich zur Kultivierung im Kultivierungsmedium (=1) quantifiziert (Abbildung 25). Für CD31 ($1,439 \pm 0,145$), VE-Cadherin ($1,881 \pm 0,734$), Claudin-5 ($1,351 \pm 0,020$) und ZO-1 ($1,408 \pm 0,396$) konnte dabei für die Kultivierung im Differenzierungsmedium eine leicht verstärkte Expression nachgewiesen werden. Occludin und BCRP wurden etwa gleich stark exprimiert wie bei einer Kultivierung im Kultivierungsmedium, wohingegen die Expression von P-gp geschwächt war ($0,722 \pm 0,198$).

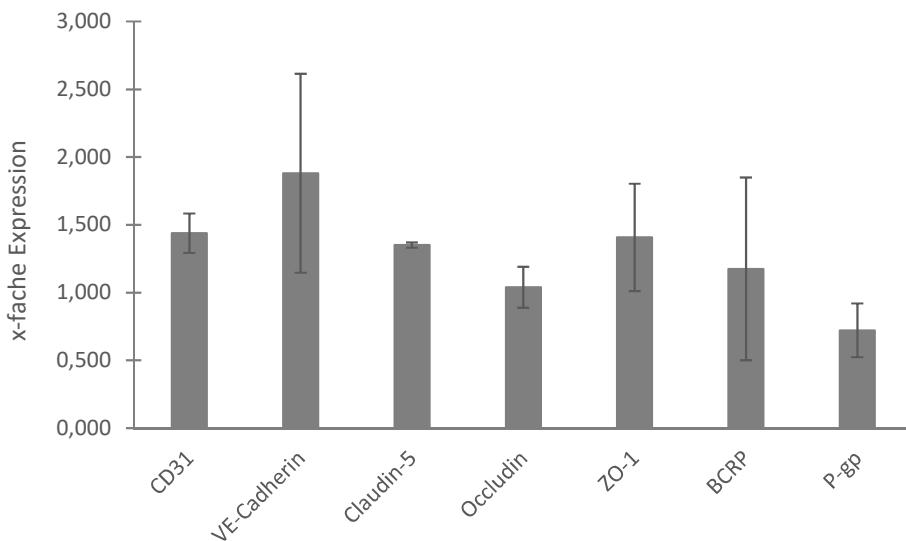


Abbildung 25 Relative RNA-Expression bei einer Kultivierung im hCMEC/D3-Differenzierungsmedium im Vergleich zum hCMEC/D3-Kultivierungsmedium. PC-Folien wurden mit Kollagen I in einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Wachstumsfläche 1 cm^2) beschichtet und anschließend mit $1 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Anschließend wurden die Zellen sieben Tage bei 37°C und 5 % CO_2 statisch kultiviert, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Im Falle einer Umstellung des Mediums vom Kultivierungsmedium auf das Differenzierungsmedium, erfolgte der Wechsel nach 48 h. Durch TRIzol®-Isolation wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine RT-qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, indem die relative RNA-Expression auf die Kultivierung mit KM (=1) normiert wurde. Als Referenzgene dienten GAPDH und Aktin, Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden aus $n=2-4$ unabhängigen Proben berechnet.

4.1.3. Zellzahl zur Kultivierung im vasQchip

Nach erfolgter Untersuchung verschiedener Beschichtungen der PC-Membran sowie des Einflusses von Wachstumsfaktoren im Medium, war der nächste Schritt die Einbringung der Endothelzellen in den Mikrokanal. Im Vergleich zur 2D-Kultivierung, die einfach, schnell und reproduzierbar ist und nach wie vor viel Anwendung in der Forschung findet, spiegelt die Kultivierung der Zellen im Kanal auf einer gekrümmten Oberfläche besser die *in vivo*-Situation wider. Durch Untersuchungen mit HUVEC-Zellen auf planaren und gekrümmten Oberflächen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Zellen deutlich schneller auf einen angelegten Fluss reagieren und die Bildung von F-Aktin reduziert wird.^[167]

Da bekannt ist, dass Endothelzellen *in vivo* und unter fluidischen Bedingungen nicht oder nur begrenzt weiter proliferieren, sollten die Zellen möglichst konfluent in die Kanalstruktur eingesetzt werden.^[168,169] Über die Berechnung der Kanalfläche sowie die Bestimmung der Zelldichte in einer konfluenten 2D-Zellkultur konnte die benötigte Zellzahl näherungsweise ermittelt werden und

Ergebnisse

sollte ca. $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3-Zellen betragen. Hierbei muss jedoch die veränderte Geometrie im Kanal beachtet werden. Experimentell wurden daher vier verschiedene Zellzahlen ($2,5 \cdot 10^4$; $5 \cdot 10^4$; $7,5 \cdot 10^4$; $1 \cdot 10^5$) getestet. Dazu wurden die Zellen in den Kollagen I-beschichteten Mikrokanal eingesät und für 1 h gleichmäßig zur Besiedlung der gesamten Kanalstruktur mit Hilfe des vasQturns gedreht (4 U/h, Abbildung 26).



Abbildung 26 Darstellung des vasQturns mit zwei vasQchips zur Besiedlung. Schematisch in Rot dargestellt ist die Lage des Mikrokanals sowie die Drehrichtung der vasQchips.

Anschließend wurde der Mikrokanal mit Medium durchspült und die Zellen zur Regeneration und vollständigen Ausrichtung 2 h statisch bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Visualisierung wurden die Zellen nach erfolgter Inkubation fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 sowie das Zytosol mit CellTracker™ Red angefärbt. Durch eine konfokalmikroskopische Auswertung mit anschließender Überlagerung der einzelnen Bilder zum 3D-Bild konnte die Verteilung der Zellen im Mikrokanal gezeigt werden (Abbildung 27). Dabei zeigte eine Zellzahl von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen nur eine unvollständige und sehr lückenhafte Besiedlung der Kanalfläche. Bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen hingegen zeigten sich, vor allem in der Kanalmitte, sehr dichte Zellcluster, so dass einzelne Strukturen hier nicht mehr erkennbar waren. Bei einer zu dichten Kultivierung kann keine Ausrichtung der Zellen mehr stattfinden und diese weisen daher zunehmend runde anstatt der typischerweise kopfsteinpflasterartigen Morphologie auf. Auch eine mögliche Ausrichtung der Zellen entlang des Flusses bei Kultivierung unter mikrofluidischen Bedingungen wird dadurch erschwert. Ein weiteres Problem, das durch die Einbringung einer zu großen Zellzahl entstehen kann, ist ein Absterben der Zellen, bei zu geringem Platz oder Nährstoffangebot.

Bei beiden Zellzahlen von $5 \cdot 10^4$ und $7,5 \cdot 10^4$ Zellen war eine gleichmäßige Verteilung der Zellen über die Kanaloberfläche und eine gute Besiedlungsdichte mit erkennbaren einzelnen Zellstrukturen zu beobachten. Dies sind gute Voraussetzungen für die Ausbildung eines dichten Netzwerkes unter fluidischen Bedingungen bei gleichzeitigem Erhalt der Viabilität und morphologischen Eigenschaften.

Zur Beurteilung der Ausbildung eines solchen Netzwerks und damit der Bildung einer dichten Barriere wurden Kanäle mit den beiden Zellzahlen $5 \cdot 10^4$ und $7,5 \cdot 10^4$ besiedelt und über einen Zeitraum von vier Tagen unter mikrofluidischen Bedingungen (100 µl/h) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt und eine Immunofluoreszenzfärbung des *Tight Junction*-assoziierten Proteins CD31 durchgeführt. Durch Z-Stack-Messungen mit inverser Konfokalmikroskopie wurden die Zellstrukturen visualisiert (Abbildung 28). Bei beiden Zellzahlen konnte die Expression von CD31 und die Ausbildung eines

Netzwerks nachgewiesen werden, wobei bei einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen teilweise Löcher in diesem Netzwerk zu beobachten waren. Alle weiterführenden Versuche wurden aus diesem Grund mit Zellzahlen von $7,5 \cdot 10^4$ Zellen durchgeführt.

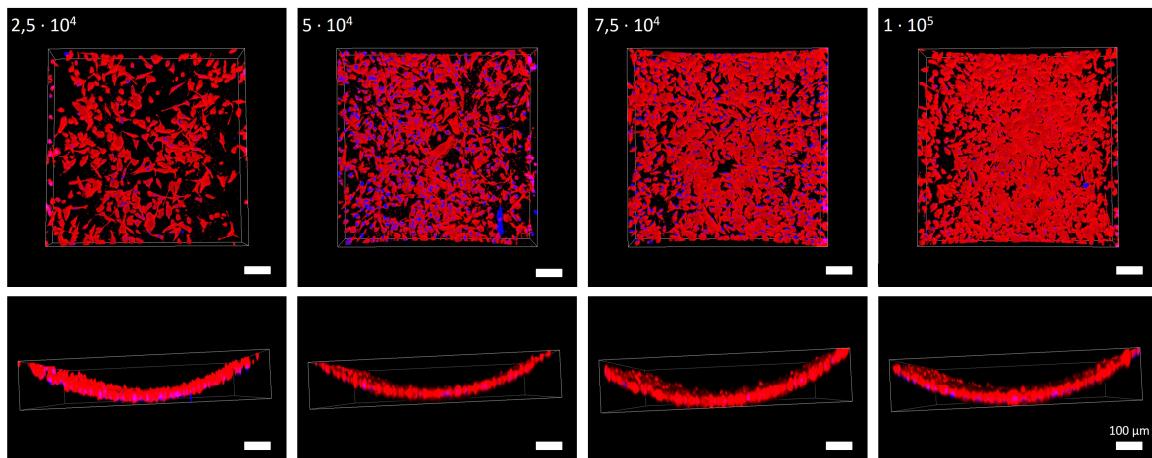


Abbildung 27 Verschiedene Zellzahlen im vasQchip. Je $2,5 \cdot 10^4$; $5 \cdot 10^4$; $7,5 \cdot 10^4$; $1 \cdot 10^5$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal des vasQchips (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät. Dieser wurde daraufhin für 1 h mit 4 U/h bei 37°C und 5 % CO_2 zur vollständigen Auskleidung des Mikrokanals gedreht. Anschließend wurde der Kanal gespült, 2h statisch inkubiert, die Zellen fixiert und angefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=46-50$, Abstand=3 µm, $h=138-150 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Rot: CellTracker™ Red-Färbung des Zytosols, Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne, Maßstab: 100 µm.

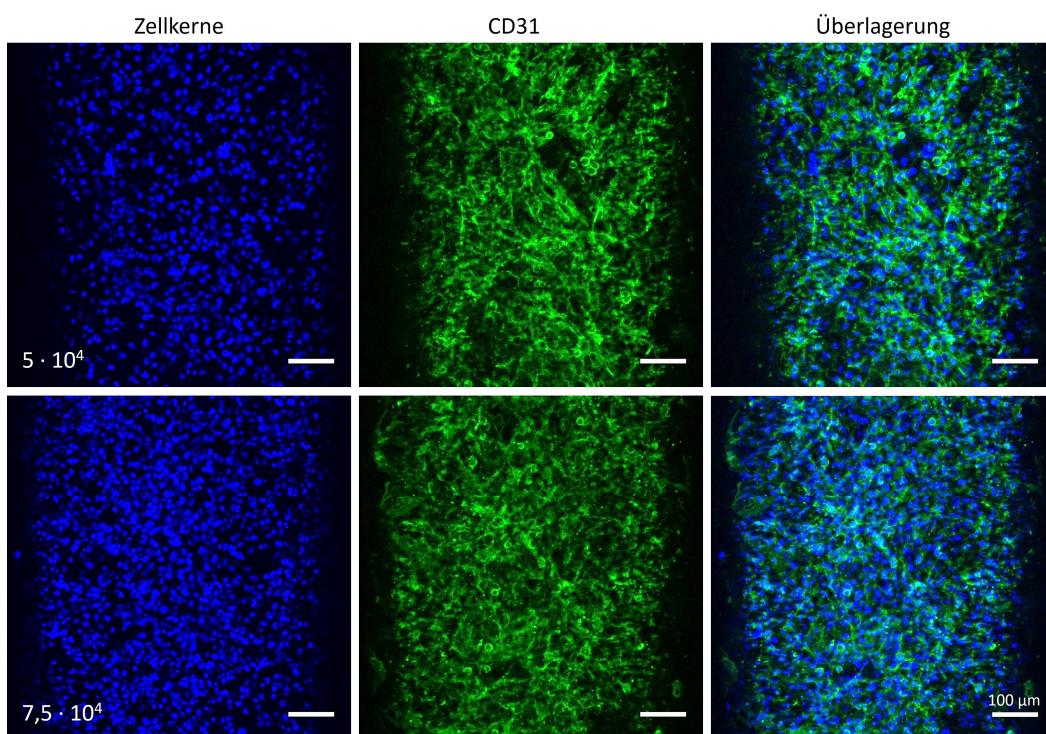


Abbildung 28 Verschiedene Zellzahlen im vasQchip nach vier Tagen mikrofluidischer Kultivierung. Je $5 \cdot 10^4$ und $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal des vasQchips (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für vier Tage bei 37°C und 5 % CO_2 unter fluidischen Bedingungen ($100 \mu\text{l}/\text{h}$) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und angefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=25$, Abstand=3 µm, $h=80 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne, Grün: Immunofluoreszenzfärbung von CD31 mit FITC, Maßstab: 100 µm

4.1.4. Fluss und Scherkräfte

Um die Zellen des etablierten Blutgefäßes mechanischen Reizen auszusetzen, kann der vasQchip an ein Pumpensystem angeschlossen werden, das die Erzeugung eines künstlichen Blutflusses ermöglicht. Dabei entstehen Scherkräfte, die sich sowohl auf die Zellmorphologie als auch die -funktion auswirken. Im Vergleich zu den häufig verwendeten rechteckigen Strukturen weist der vasQchip dabei eine gleichmäßigere Verteilung der Scherkräfte über das gesamte Kanalprofil auf.^[133,170]

4.1.4.1 Mikrofluidische Langzeitkultivierung im vasQchip (Spritzenpumpe)

In Hinblick auf die Etablierung eines Gesamthirnmodells, vor allem bei der Einbringung von Zellen in einer EZM-imitierenden Matrix in das umgebende Kompartiment, war es zunächst notwendig zu untersuchen, ob eine Kultivierung der Zellen im Kanal auch über Zeiträume von ein bis zwei Wochen möglich ist. Je nach verwendeter Matrix kann die Ausrichtung der Zellen und die damit verbundene Funktionalität unterschiedlich lange dauern. Auch die Reaktion der Zellen im Kanal auf die wirkenden Scherkräfte und die Ausrichtung entlang eines angelegten Flusses erfolgt erst nach einigen Tagen unter fluidischen Bedingungen.^[171] Erste Experimente zur fluidischen Langzeitkultivierung wurden mit einer Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 100 µl/h (1,67 µL/min) durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine langfristige Zellkultivierung innerhalb der Kanalstruktur möglich ist. Dazu wurden $7,5 \cdot 10^4$ Zellen in den Mikrokanal ausgesät und fluidisch kultiviert. Um die Ausbildung einer dichten Barriere zu induzieren, wurde nach 48 h vom hCMEC/D3-Kultivierungsmedium auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium umgestellt. Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, war eine Kultivierung von sieben Tagen im Kanal unter Ausbildung einer dichten Endothelzellschicht über die gesamte Kanalstruktur möglich.

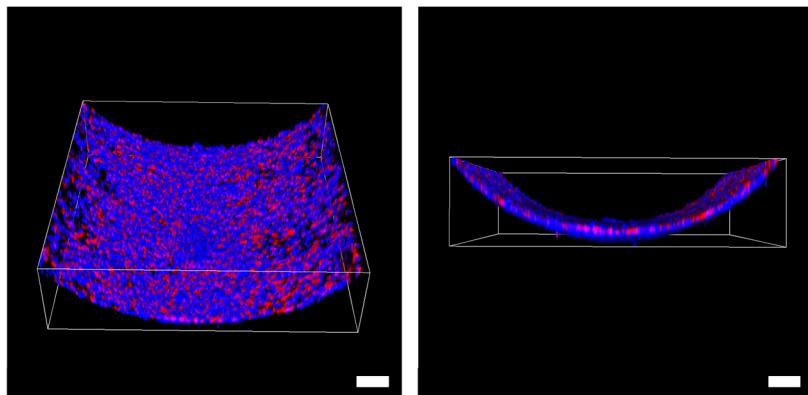


Abbildung 29 Visualisierung verschiedener Zellstrukturen des Endothels nach Langzeitkultivierung über sieben Tage bei 100 µl/h. $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal des vasQchip (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für sieben Tage bei 37°C und 5 % CO_2 unter fluidischen Bedingungen (100 µl/h) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, nach 48 h erfolgte eine Umstellung des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden anschließend fixiert und angefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=80$, Abstand=3 µm, $h=237$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne, Rot: Phalloidin-TRITC-Färbung des Aktinzytoskeletts, Maßstab: 100 µm.

Um zusätzlich die Viabilität der Zellen im Kanal zu untersuchen, wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) nach sieben bzw. 14 Tagen durchgeführt. Calcein-AM (Abbildung 30) ist ein nicht-fluoreszierender lipophiler Ester, der durch die Zellmembran ins Zellinnere von lebenden Zellen migrieren kann. Dort wird er anschließend durch die Aktivität von

Esterasen zum hydrophilen, grün-fluoreszierenden Calcein gespalten, welches die Zellmembran nicht mehr passieren kann und damit im Inneren der Zelle verbleibt. Als Zielsubstrat von P-gp wird Calcein-AM normalerweise aktiv aus dem Zellinneren von hCMEC/D3-Zellen transportiert. Durch die Verwendung einer relativ hohen Konzentration von 4 µg/ml konnte jedoch eine Visualisierung der lebenden Zellen erreicht werden. [172]

Im Gegensatz zu Calcein-AM kann PI (Abbildung 30) die intakte Zellmembran nicht durchdringen und interkaliert lediglich in die DNA nekrotischer Zellen, da bei diesen die Zellmembran zerstört ist. Auf diese Weise können nekrotische Zellen bzw. deren Zellkern durch ein rotes Fluoreszenzsignal von PI identifiziert und sichtbar gemacht werden.

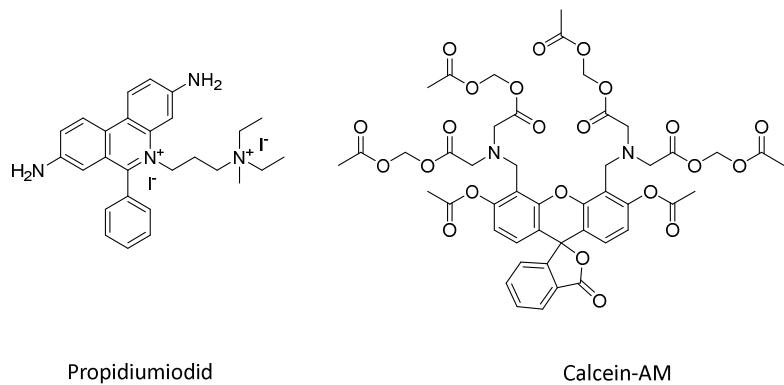


Abbildung 30 Struktur von Calcein-AM und PI

Mit Hilfe der Lebend/Tot-Färbung konnte gezeigt werden, dass sowohl nach 7- wie auch nach 14-tägiger Kultivierung im Kanal eine Vielzahl lebender Zellen vorzufinden war. Die Zahl toter Zellen war im Vergleich hierzu relativ gering (Abbildung 31). Damit ist eine Kultivierung auch über längere Zeiträume im vasQchip möglich.

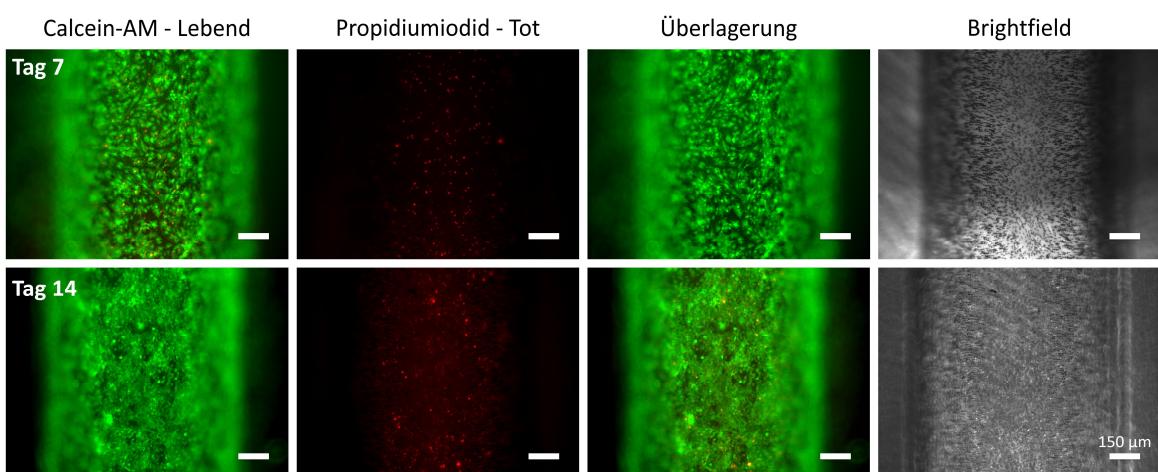


Abbildung 31 Lebend/Tot-Färbung im vasQchip nach sieben und 14 Tagen Kultivierung bei 100 µl/h. 7,5·10⁴ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten (10 µg/cm²) Mikrokanal des vasQchips (Wachstumsfläche 0,5 cm²) ausgesät und für sieben Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ unter fluidischen Bedingungen (100 µl/h, Pumpsystem Fusion 200 Chemyx) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, nach 48 h erfolgte eine Umstellung des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums auf das Differenzierungsmedium. Nach sieben Tagen erfolgte eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 150 µm.

4.1.4.2 Permeabilitätsassay im vasQchip

Analog zur Bestimmung der parazellulären Permeabilität in statisch kultivierten Endothelzellschichten (Kapitel 4.1.1.3), wurde für fluidisch kultivierte Zelllayer im vasQchip der Permeabilitätskoeffizient für LY bestimmt. Auch wenn die Bestimmung des TEER-Werts immer häufiger Anwendung in mikrofluidischen Systemen findet,^[173,174] gestaltet sich die Einbringung von Elektroden in den vasQchip aufgrund des Aufbaus als schwierig. Aus diesem Grund eignet sich der Permeabilitätsassay gut zur Bestimmung der Barrieredichtigkeit. Der Assay erfolgte nach dem von D. Ivannikov entwickelten Prinzip (Abbildung 32).^[171] Der Mikrokanal (Porengröße 1 µm) wurde hierzu mit Kollagen I (1 µg/cm²) beschichtet und mit hCMEC/D3 besiedelt. Nach einer siebentägigen mikrofluidischen Kultivierung (100 µl/h) wurde der Mikrokanal mit einer Spritze verbunden, durch die LY, in Zellkulturmedium gelöst, durch den Kanal gepumpt wurde (1 ml/h). Das umgebende Kompartiment wurde parallel dazu mit reinem Zellkulturmedium und ebenfalls einer Flussrate von 1 ml/h durchströmt. Der Ausfluss aus beiden Kompartimenten wurde in 30-Minuten-Intervallen gesammelt, die aufgefangenen Mengen durch Wiegen bestimmt und die Fluoreszenz der Lösungen gemessen. Um den Größenunterschied der beiden Kompartimente auszugleichen und so einen gleichmäßigen Ausstrom aus beiden Kompartimenten zu gewährleisten, wurden am Ausgang jeweils zwei Widerstandseinheiten angeschlossen.

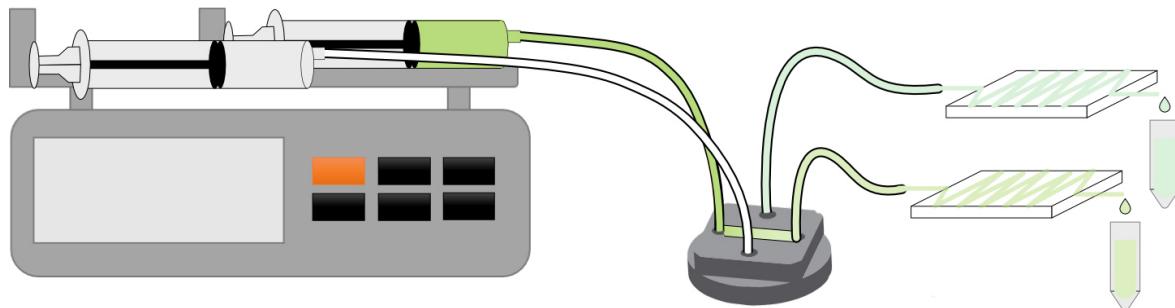


Abbildung 32 Schematischer Versuchsaufbau zur Permeabilitätsuntersuchung nach D. Ivannikov.^[171] Der vasQchip wurde mit zwei Spritzen verbunden, die mit gleicher Geschwindigkeit (1 ml/h) die zu untersuchende Substanz LY (20 µM) durch den Kanal sowie Zellkulturmedium durch das untere Kompartiment pumpten (Pumpsystem Fusion 200 Chemyx). Beide Kompartimente wurden an eine Widerstandseinheit angeschlossen und der Mediumausfluss aufgesammelt. Die Probenentnahme erfolgte alle 30 min.

Die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten erfolgte über die in Kapitel 4.1.1.3 beschriebenen Zusammenhänge. Als Referenz dienten vasQchips, die nur mit Kollagen I beschichtet wurden. Um mögliche Einflüsse zu minimieren, die sich durch Varianzen in der Porendichte und -größe der einzelnen vasQchips ergeben können, wurden diese nach der Bestimmung des Referenzwerts zur Kultivierung der hCMEC/D3 weiterverwendet.

Für den Permeabilitätskoeffizienten der Endothelzellschicht im vasQchip wurde ein Wert von $8,61 \cdot 10^{-5} \pm 4,16 \cdot 10^{-5}$ cm/s ($n=3$) ermittelt. Dieser war damit 5,74-fach höher als für die statische Kultivierung auf einer Kollagen I Beschichtung (Vgl. Kapitel 4.1.1.3). Aufgrund unterschiedlicher Kollagenkonzentrationen zur Beschichtung und unterschiedlicher Porengrößen ist eine direkte Vergleichbarkeit jedoch schwierig. Zudem zeigte die Hoechst-Färbung der Chips nach dem Permeabilitätsassay einige Löcher im Zelllayer, was die erhöhte Permeabilität erklären könnte (Anhang, Abbildung 104).

4.1.4.3 Anpassung der Flussrate zur Erzeugung physiologischer Scherkräfte

Unter Berücksichtigung der Kanalabmessungen, erzeugt die oben eingesetzte Flussrate von 100 µl/h eine vergleichsweise niedrige Scherkraft von 0,0264 dyn/cm².^[133,170] Im Vergleich hierzu beträgt die Scherkraft in Kapillaren *in vivo* abhängig vom Organismus und dem jeweiligen Organ zwischen 3-95 dyn/cm².^[175] Die Flussrate in Kapillaren im menschlichen Körper beträgt typischerweise 6 bis 12 nl/min, was bei einer Viskosität von 1 cP (0,001 Pa·s, Blut unter Berücksichtigung des Fahraeus-Lindqvist Effekts) einem Scherstress von 10-20 dyn/cm² in einer 10 µm Kapillare entspricht.^[101] Obwohl also eine Langzeitkultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen möglich war und zu dichten Zellschichten führte (Kapitel 4.1.4.1), betrug die resultierende Scherkraft weniger als 1 % der minimalen Scherkraft, die *in vivo* auf die Gefäßwand-bildenden Zellen in Kapillaren wirkt. Da die durch den Blutfluss erzeugten Scherkräfte wichtig für die Zellfunktion und im Falle der BBB für die Induktion und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion sind, bestand der nächste Schritt in der Anwendung von Flussraten, die zur Erzeugung physiologischer Scherkräfte führen.^[27,100,176]

Um physiologischere Scherkräfte zu erzeugen, wurden Flussraten von 30 ml/h (500 µl/min, 7,92 dyn/cm²) und 60 ml/h (1 ml/min, 15,84 dyn/cm²) getestet. Hierzu wurde eine Peristaltikpumpe (PeRISYS-S, Cetoni) verwendet, die das Medium aus einem Reservoir konstant im Kreis pumpte.

500 µl/min

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob überhaupt eine Kultivierung mit solch hohen Flussraten möglich ist. Hierzu wurden zwei verschiedene Beschichtungen (Kollagen I, Fibronektin 10 µg/cm²) untersucht und die Flussrate beginnend bei 50 µl/min alle 24 h stufenweise um weitere 50 µl/min bis zur maximalen Flussrate von 500 µl/min erhöht. Die Zellschicht innerhalb des Kanals wurde täglich lichtmikroskopisch untersucht. Dabei konnte mit zunehmender Flussgeschwindigkeit eine vermehrte Ausrichtung einzelner Zellen in Flussrichtung beobachtet werden. Die Zellen wiesen im Vergleich zu niedrigeren Flussraten eine dünnere und länglichere Morphologie auf (Abbildung 33).

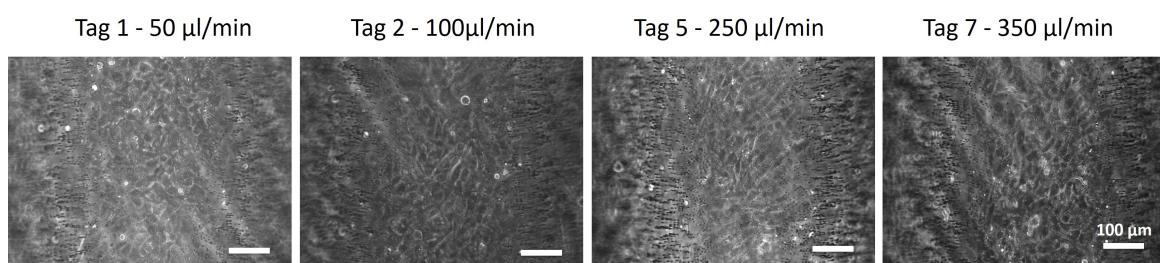


Abbildung 33 Ausrichtung von hCMEC/D3-Zellen nach Anlegen eines Flusses 7,5·10⁴ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten (10 µg/cm²) Mikrokanal des vasQchips (Wachstumsfläche 0,5 cm²) ausgesät. Beginnend mit einer Flussrate von 50 µl/min wurde diese alle 24 h um weitere 50 µl/min erhöht und die Zellen im Kanal täglich mikroskopisch verfolgt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, nach 48 h erfolgte eine Umstellung des hCMEC/D3-Kultivierungsmedium auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 100 µm.

Nach Erreichen der Flussrate von 500 µl/min nach zehn Tagen wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 (2 µg/ml) gefärbt. In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass sich für

Ergebnisse

Kanalbeschichtungen mit Fibronectin und Kollagen I auch bei einer Kultivierung unter physiologischeren Flussraten dichte Zelllayer ausbildeten.

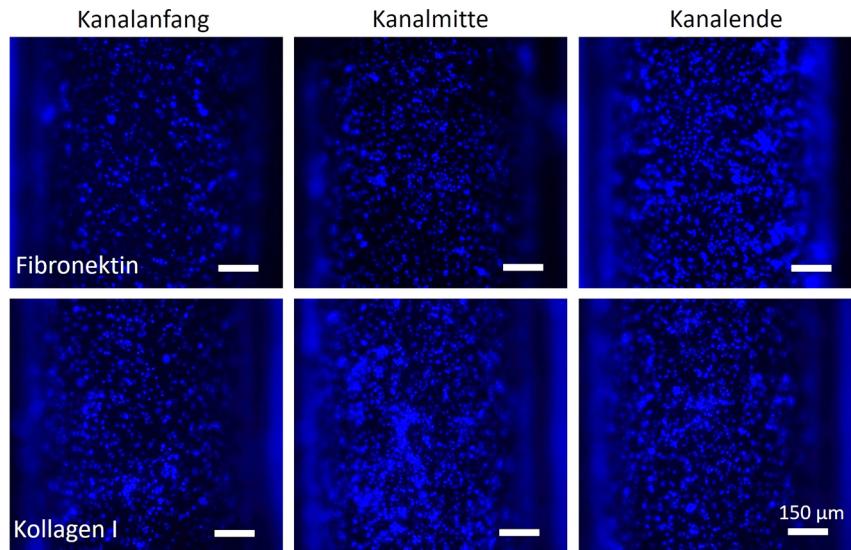


Abbildung 34 Untersuchung physiologischer Scherkräfte im Mikrokanal des vasQchips. Die Mikrokanäle der vasQchips wurden mit Fibronectin und Kollagen I in einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichtet und anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) besiedelt. Beginnend mit einer Flussrate von $50 \mu\text{l}/\text{min}$ wurde diese alle 24 h um weitere $50 \mu\text{l}/\text{min}$ bis zum Erreichen einer maximalen Flussrate von $500 \mu\text{l}/\text{min}$ ($\sim 7,92 \text{ dyn}/\text{cm}^2$) nach 10 Tagen erhöht. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, nach 48 h erfolgte eine Umstellung des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums auf das Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 visualisiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $150 \mu\text{m}$.

Die Verwendung einer niedriger konzentrierten Kollagen I-Lösung, wie sie zur Kultivierung bei niedrigen Flussraten ($0,1 \text{ ml}/\text{h}$, Kapitel 4.1.4.1) eingesetzt wurde, führte mit zunehmendem Fluss zur Ablösung von Zellen. Nach Erreichen der Geschwindigkeit von $500 \mu\text{l}/\text{min}$ waren im Vergleich zur höher konzentrierten Kollagen I-Beschichtung nur noch wenige Zellen im Kanal detektierbar (Abbildung 35).

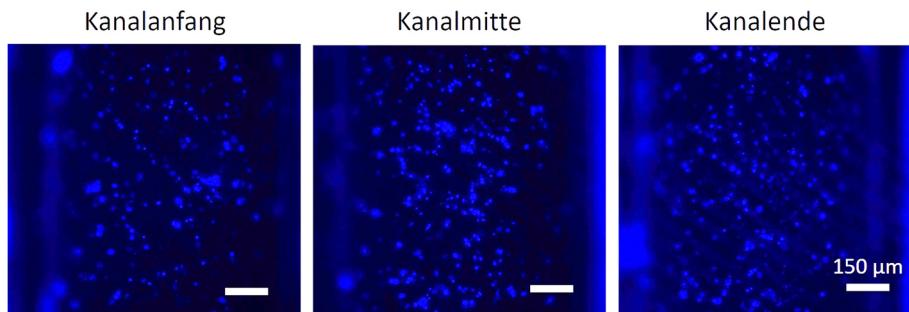


Abbildung 35 Untersuchung physiologischer Scherkräfte im Mikrokanal des vasQchips. Der Mikrokanal des vasQchips wurden mit Kollagen I in einer Konzentration von $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichtet und anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) besiedelt. Beginnend mit einer Flussrate von $50 \mu\text{l}/\text{min}$ wurde diese alle 24 h um weitere $50 \mu\text{l}/\text{min}$ bis zum Erreichen einer maximalen Flussrate von $500 \mu\text{l}/\text{min}$ nach 10 Tagen erhöht. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage, nach 48 h erfolgte eine Umstellung des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums auf das Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 visualisiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $150 \mu\text{m}$.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Steigerung der Flussraten auf $500 \mu\text{l}/\text{min}$ innerhalb von 48 h möglich ist, ohne dass sich die Zellen ablösen, da üblicherweise nach 2-3 Tagen ein Austausch des Mediums im Reservoir erfolgen muss. Hierzu wurde ein Programm etabliert, bei dem die Flussrate beginnend bei $10 \mu\text{l}/\text{min}$ zunächst jede Stunde stufenweise um weitere $10 \mu\text{l}/\text{min}$ bis

zum Erreichen einer Geschwindigkeit von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert wurde. Diese Geschwindigkeit wurde für drei Stunden gehalten und anschließend in 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ -Schritten alle 5 Stunden gesteigert, bis zum Erreichen einer maximalen Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ nach insgesamt 47 h. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Langzeitkultivierung von insgesamt sieben Tagen unter diesen Bedingungen möglich ist. Der Mediumwechsel im Reservoir sowie im umgebenden Kompartiment erfolgte dabei alle 2-3 Tage. Dabei wurde die Flussrate nach jedem Mediumwechsel erneut beginnend bei 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ alle 15 Minuten stufenweise über 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ und anschließend in weiteren 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ -Schritten bis zur Maximalflussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert, um ein Ablösen der Zellen durch einen zu hohen Flüssigkeitsdruck zu vermeiden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Flussrate auf 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ innerhalb von 48 h unter Erhalt einer dichten Zellschicht im kompletten Kanal sowohl für Fibronectin als auch Kollagen I möglich war (Abbildung 36 und Abbildung 37). Für beide Beschichtungen waren über den gesamten Kanal dichte Zellschichten ohne Löcher zu beobachten.

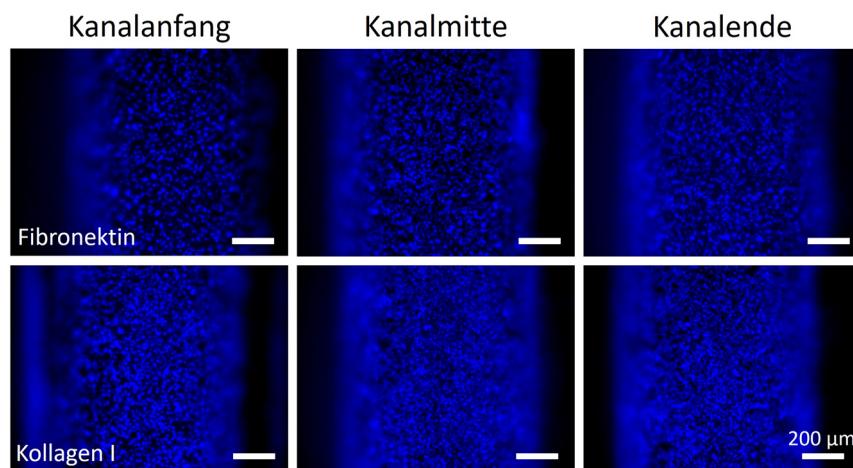


Abbildung 36 Untersuchung physiologischer Scherkräfte im vasQchip und Steigerung der Flussrate innerhalb von 48 h.
Die Mikrokanäle der vasQchips wurden mit Fibronectin und Kollagen I in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichtet und anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 (Wachstumsfläche 0,5 cm^2) besiedelt. Die Flussrate wurde innerhalb von 48 h auf eine Geschwindigkeit von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert, die Zellen anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 visualisiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 200 μm .

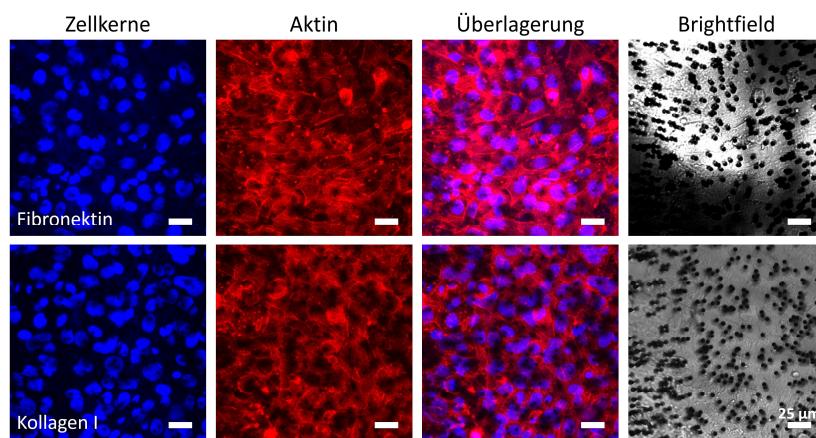


Abbildung 37 Untersuchung physiologischer Scherkräfte im vasQchip und Steigerung der Flussrate innerhalb von 48 h.
Die Mikrokanäle der vasQchips wurden mit Fibronectin und Kollagen I in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Wachstumsfläche 0,5 cm^2) beschichtet und anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Die Flussrate wurde innerhalb von 48 h auf eine Geschwindigkeit von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesteigert, die Zellen anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 sowie die Aktinfasern durch Phalloidin-TRITC-Färbung visualisiert. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 25 μm .

Ergebnisse

Auch eine Langzeitkultivierung über einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen war möglich. Eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI zeigte eine hohe Viabilität des Zelllayers für eine Kultivierung im hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, es konnten nur vereinzelt tote Zellen detektiert werden (Abbildung 39). Eine Umstellung des Kultivierungsmediums auf das Differenzierungsmedium nach Erreichen der Flussrate von 500 µl/min nach 48 h führte jedoch nach sieben Tagen Kultivierung zu einer nicht komplett ausgebildeten Zellschicht. Bei einer Kultivierung mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium konnten hingegen dichte Zelllayer erreicht werden (Abbildung 38).

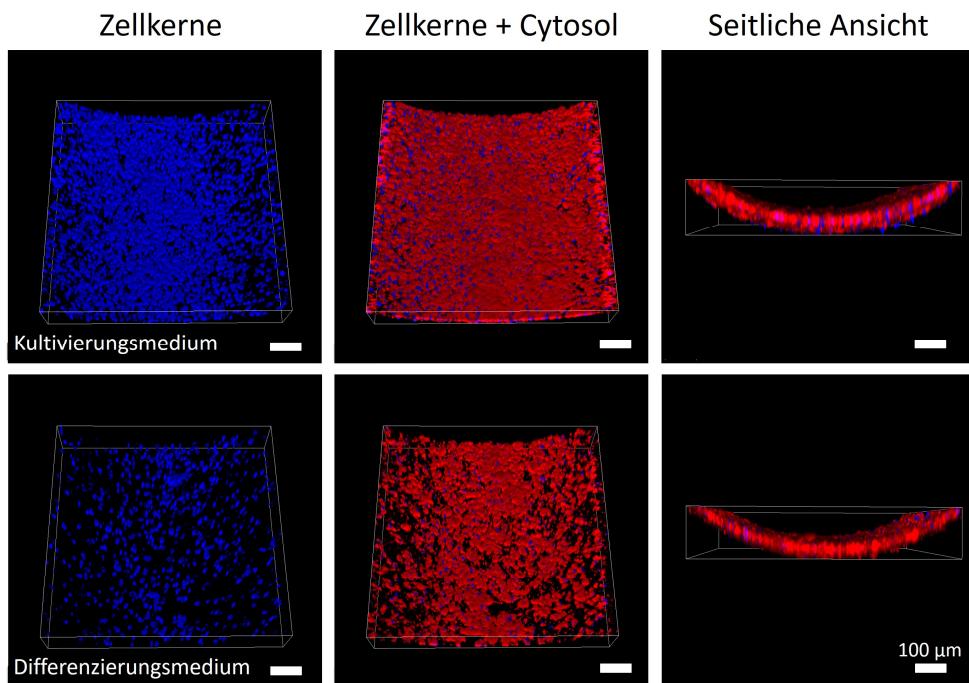


Abbildung 38 Visualisierung verschiedener Zellstrukturen nach einer Langzeitkultivierung von sieben Tagen im vasQchip mit einer Flussrate von 500 µl/min. Je $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I-beschichteten ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für sieben Tage mit einer Flussrate von 500 µl/min bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Flussrate wurde dabei innerhalb von 48 h auf die Maximalgeschwindigkeit gesteigert, ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 sowie das Zytosol mit CellTracker™ Red visualisiert. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 100 µm.

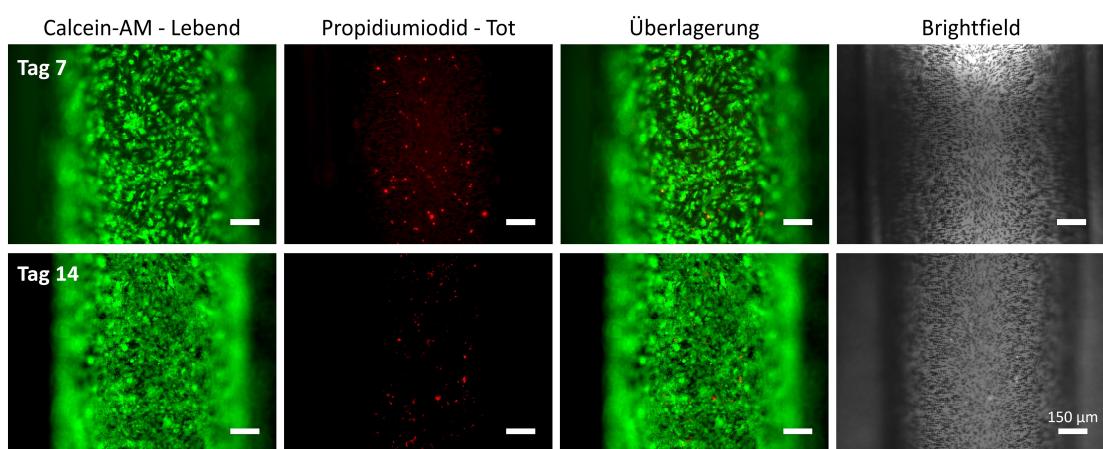


Abbildung 39 Lebend/Tot-Färbung der Endothelzellen im vasQchip nach 7 und 14 Tagen Kultivierung bei 500 µl/min. $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I beschichteten ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal des vasQchip (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für sieben Tage bei 37°C und 5 % CO₂ unter fluidischen Bedingungen (500 µl/min, Peristaltikpumpe peRISYS-S) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Zellen wurden anschließend für 30 min unter Standardbedingungen mit Calcein-AM und PI inkubiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 150 µm.

1000 µl/min

Die Untersuchung einer Flussrate von 1000 µl/min sollte zeigen, ob eine weitere Steigerung der Flussrate und damit eine Annäherung an die im Gehirn auf Zellen wirkenden, physiologischen Scherkräfte von 10-20 dny/cm² möglich ist.^[101] Zunächst wurde wieder die Steigerung innerhalb der für einen Mediumwechsel benötigten Zeitspanne von 2-3 Tagen untersucht. Dabei wurde das bereits etablierte Programm zur Steigerung bis 500 µl/min verwendet, eine weitere stufenweise Erhöhung der Flussrate in 50 µl/min-Schritten bis zum Erreichen der Maximalflussrate von 1000 µl/min erfolgte dabei anschließend in zweistündigen Intervallen und damit über einen Gesamtzeitraum von 67 h. Für die anschließende Langzeitkultivierung wurde die Flussrate nach jedem Mediumwechsel analog zur Flussrate von 500 µl/min beginnend bei 10 µl/min alle 15 Minuten über 50 µl/min, 100 µl/min und anschließend in weiteren 100 µl/min-Schritten bis zur Maximalflussrate von 1000 µl/min gesteigert. Wie in Abbildung 40 für Tag 3 erkennbar ist, war das Erreichen einer Flussrate von 1000 µl/min innerhalb der untersuchten Zeitspanne und unter Aufrechterhaltung eines dichten Zelllayers möglich. Die Visualisierung der Zellen durch Calcein-AM zeigte zudem eine hohe Viabilität des untersuchten Zelllayers. Die so gefärbten Zellschichten wurden daraufhin mit Medium gewaschen, das Medium im Reservoir sowie im umgebenden Kompartiment ausgetauscht und die vasQchips erneut an die Peristaltikpumpe angeschlossen, um so die Möglichkeit und Wirkung einer Langzeitkultivierung zu untersuchen. Der Fluss wurde wie oben beschrieben erhöht und die Zellschicht nach weiteren drei Tagen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ erneut mit Calcein-AM gefärbt. Dabei war zu beobachten, dass sich ein Großteil der Zellen aus dem Kanal abgelöst hatte. Die Verwendung des Differenzierungsmediums führte sogar zur kompletten Abwesenheit von Zellen im Kanal (Abbildung 40). Eine Langzeitkultivierung bei einer Flussrate von 1000 µl/min war aus diesem Grund für die verwendeten Parameter (Beschichtung, Flussratenprogramm, Intervall des Mediumwechsels) nicht möglich.

Ergebnisse

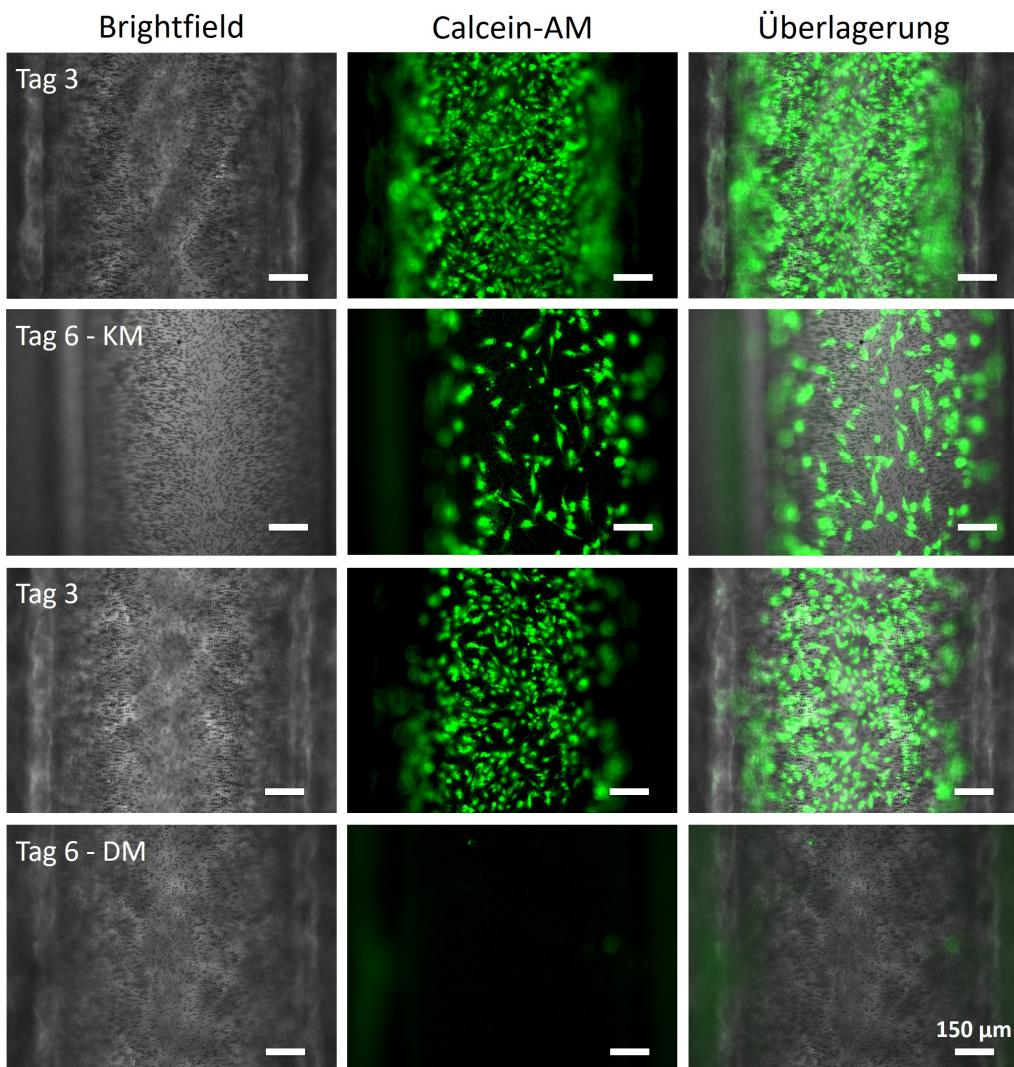


Abbildung 40 Langzeitkultivierung der Endothelzellen im vasQchip mit einer Flussrate von 1000 µl/min. Je $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den Kollagen I-beschichteten ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Mikrokanal (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) ausgesät und für sechs Tage mit einer Flussrate von $1000 \mu\text{l}/\text{min}$ bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Die Flussrate wurde dabei innerhalb von 67 h auf die Maximalgeschwindigkeit gesteigert. Nach jeweils 72 h wurden die Zellen zur Visualisierung lebender Zellen für 30 min mit Calcein-AM behandelt. KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, DM: Differenzierungsmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $150 \mu\text{m}$.

Da die Zellen an Tag 3 mit Calcein-AM gefärbt und anschließend weiter kultiviert wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass die Ablösung der Zellen durch eine mögliche toxische Wirkung von Calcein-AM verursacht wurde. Hierzu wurde ein MTT-Toxizitätsassay durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität, welche ein Maß für die Zellviabilität ist. Der Nachweis beruht dabei auf der Umwandlung des wasserlöslichen, gelben Tetrazolium-Salzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolumbromid) zum unlöslichen violetten Formazan (Abbildung 41). Dabei wird der Farbstoff lediglich von lebenden Zellen durch die Succinat-Dehydrogenase der Mitochondrien verstoffwechselt und akkumuliert daraufhin in den Zellen.^[177] Die Absorption des Farbstoffs kann dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden und die Zellviabilität in Relation zu einer Lebend- und Totkontrolle quantifiziert werden.

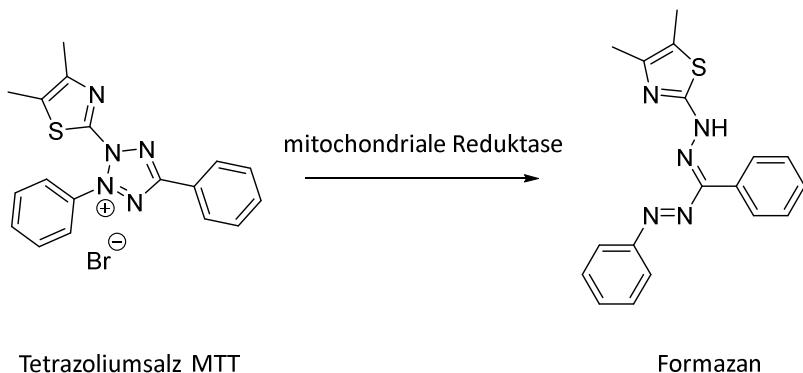


Abbildung 41 Reaktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zum violetten Formazan.

Zur Untersuchung der Toxizität von Calcein-AM auf hCMEC/D3 wurden diese in 96-Well-Platten kultiviert und behandelt. Hierzu wurden zwei verschiedene Bedingungen getestet. Im ersten Fall wurde der Stoff in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) zu den Zellen gegeben, analog zur Visualisierung im Chip für 30 min inkubiert, anschließend mit DBPS^{-/-} gewaschen und im Kultivierungsmedium für weitere 72 h inkubiert. Im zweiten Fall wurde Calcein-AM in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen zugegeben und insgesamt für 72 h inkubiert. Dabei konnte für eine 30-minütige Inkubation mit Calcein-AM in keiner der untersuchten Konzentrationen ein deutlich toxischer Effekt nachgewiesen werden, die Viabilität lag zwischen 90,68 % (10 µg/ml) und 95,46 % (0,1 µg/ml) und der LD₅₀-Wert damit über 10 µg/ml. Auch eine Inkubation von 72 h mit Calcein-AM zeigte bis zu einer Konzentration von 1 µg/ml kaum toxische Effekte (93,93%). Der LD₅₀-Wert lag bei 7,73 µg/ml.

Da der MTT-Test jedoch lediglich Aufschluss über die Viabilität und nicht über die Adhäsion der Zellen gibt und ein Ablösen unter Erhalt der Viabilität denkbar war, was im Chip durch den konstanten Fluss zum Herauspülen der Zellen führen würde, wurde zusätzlich eine 30 Minuten behandelte Zellschicht über 72 h lichtmikroskopisch verfolgt. Es zeigte sich hier jedoch kein Ablösen der Zellen. (s. Abbildung 108 im Anhang)

Es konnte damit gezeigt werden, dass für die im Chip gewählten Bedingungen der Behandlung mit Calcein-AM (4 µg/ml für 30 min und anschließendes Waschen der Zellen) eine hohe Viabilität der Zellen und kein Ablösen von der Oberfläche zu erwarten ist. Da die Versuche unter statischen Bedingungen durchgeführt wurden, kann dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Behandlung mit anschließender fluidischer Kultivierung bei einer Flussrate von 1000 µl/min keine Auswirkung auf die Zellschicht hatte und die Ablösung der Zellen dadurch bedingt war. Dies sollte in weiterführenden Versuchen untersucht werden.

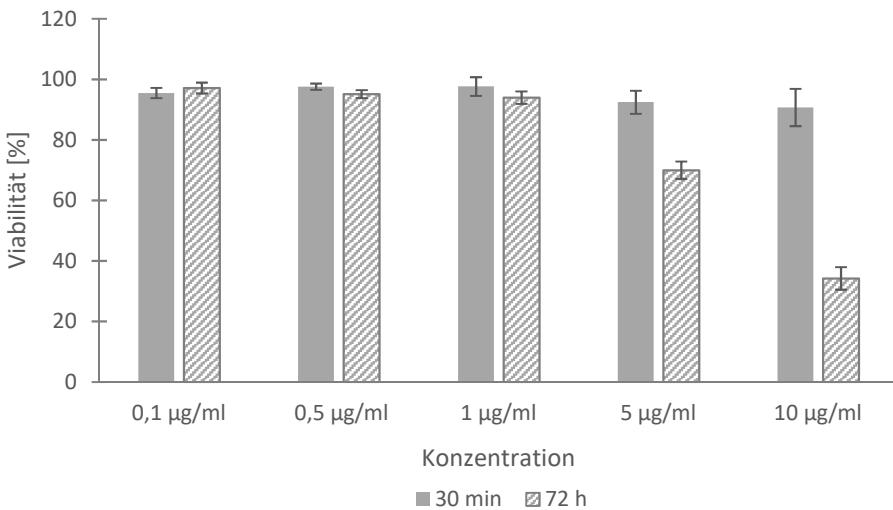


Abbildung 42 Viabilität der hCMEC/D3 nach Behandlung mit Calcein-AM. $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Well einer 96-Well-Platte wurden ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen Calcein-AM (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) für 30 min und 72 h inkubiert. Im Falle der 30-minütigen Inkubation, wurde die Substanz abgenommen, die Zellen gewaschen und ebenfalls weitere 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch einen MTT-Toxizitätsassay. Die Auswertung erfolgte in Relation zu einer Totkontrolle (=0%), die vor Zugabe des MTT-Reagenzes mit Triton-X-100 abgetötet wurde sowie einer unbehandelten Lebendkontrolle (=100%). Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden berechnet aus n=5 unabhängigen Proben.

4.1.4.4 Einfluss von Scherkräften und Medium auf die Expression spezifischer Marker

Da aus der Literatur bekannt ist, dass unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die Morphologie und Funktion der Endothelzellen sowie die Dichtigkeit der ausgebildeten Barriere haben [134], wurden verschiedene dieser Einflussfaktoren in Hinblick auf die Expression spezifischer *Tight* und *Adherens Junctions* (CD31, VE-Cadherin, Claudin-5, Occludin, ZO-1) sowie spezieller Efflux-Pumpen (BCRP, P-gp) untersucht. Hierfür wurden hCMEC/D3 unter unterschiedlichen Bedingungen im vasQchip kultiviert, anschließend die RNA isoliert und durch RT-qPCR untersucht. Vor der Isolation der RNA wurden die Zellkerne jeweils mit Hoechst33342 (2 µg/ml) angefärbt, um die Unversehrtheit der Endothelzellschicht zu überprüfen. Untersucht wurden hierbei neben einer statischen Kultivierung im Chip zwei verschiedene Flussraten (5 µl/min und 500 µl/min) mit ihren korrespondierenden Scherkräften von 0,0792 dyn/cm² und 7,92 dyn/cm² sowie die Kultivierung in zwei verschiedenen Medien, die sich in der Konzentration der eingesetzten Wachstumsfaktoren unterschieden. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl das Anlegen eines Flusses mit den daraus resultierenden, auf die Zellen wirkenden Scherkräften, als auch die Reduktion von Wachstumsfaktoren im Nährmedium zu einer Induktion der Barriere-Bildung beitragen können. Durch beide Methoden werden die Zellen in einen quasi-statischen Zustand versetzt, in dem sie sich nicht (oder nur noch beschränkt) teilen (Vgl. Kapitel 4.1.2). [134] Die Untersuchung der beiden verschiedenen Flussraten sollte dabei zeigen, ob bereits eine sehr niedrige Scherkraft Einfluss auf die Ausbildung einer dichteren Barriere hat und wie die Wirkung höherer Scherkräfte ist. Hierfür wurde eine Peristaltikpumpe (PeRISYS-S, Cetoni) verwendet. Für die Untersuchung der verschiedenen Nährmedien wurde einerseits das normale zur Kultivierung der hCMEC/D3 eingesetzte Nährmedium hCMEC/D3-Kultivierungsmedium sowie das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium eingesetzt. Hierbei erfolgte die Umstellung auf das Differenzierungsmedium jeweils 48 h nach Aussäen der Zellen und Anlegen eines Flusses. Die Kultivierung bei einer Flussrate von 500 µl/min wurde lediglich im Kultivierungsmedium

durchgeführt, da durch die Verwendung von Differenzierungsmedium keine dichten Zelllayer erreicht werden konnten. Eine Vielzahl der Zellen löste sich nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen aus dem Mikrokanal ab (Vgl. 4.1.4.3, Langzeitkultivierung).

Beide Medienbedingungen wurden zudem statisch durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen analog zu den fluidischen Versuchen in die Mikrokanäle der Chips ausgesät und anschließend offen, das heißt ohne den Verschluss des umgebenden Kompartiments mit einem Deckglas, in einer Petrischale inkubiert. Die poröse Unterseite des Kanals lag somit in Flüssigkeit. Die Anschlüsse des Kanals wurden zudem mit Medium gefüllt. Die Kultivierung erfolgte dabei im gleichen Volumen an Medium, das zur fluidischen Kultivierung verwendet wurde. Zum Mediumwechsel wurde das Medium in der Petrischale ausgetauscht, dabei wurde jeweils 1 ml altes Medium in der Petrischale gelassen, da dies dem im Schlauch verbleibenden Medium bei einer fluidischen Kultivierung entspricht. Das Medium aus den Anschlüssen wurde vorsichtig entnommen, um durch das Pipettieren entstehende Scherkräfte zu vermeiden und durch frisches Medium ersetzt.

Die Ergebnisse der RT-qPCR-Untersuchung sind in Abbildung 43 dargestellt.

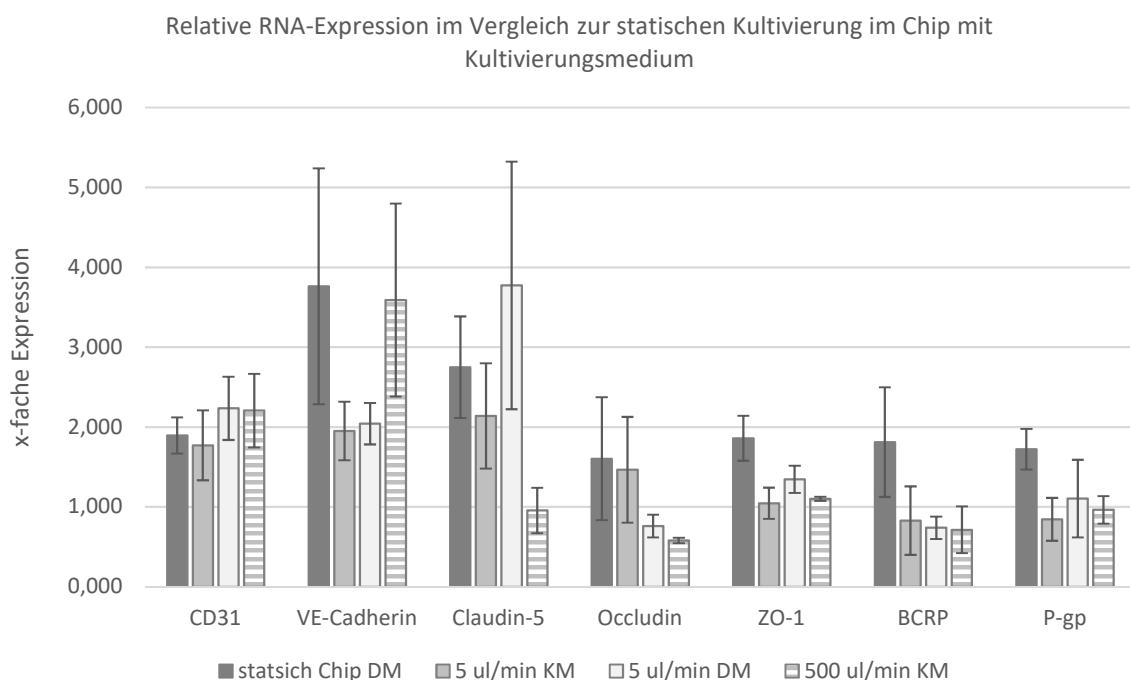


Abbildung 43 Relative RNA-Expression von hCMEC/D3 bei unterschiedlichen Flussraten und Kultivierungsbedingungen. VasQchips wurden mit Kollagen I in einer Konzentration von $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Wachstumsfläche $0,5 \text{ cm}^2$) beschichtet und anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Anschließend wurden die Zellen sieben Tage bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ statisch oder fluidisch mit einer Peristaltikpumpe kultiviert, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Im Falle einer Umstellung des Mediums vom Kultivierungsmedium auf das Differenzierungsmedium, erfolgte der Wechsel nach 48 h. Durch TRIzol®-Isolation wurde die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine RT-qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, indem die relative RNA-Expression auf die statische Kultivierung im Chip mit KM (=1) normiert wurde. Als Referenzgene dienten GAPDH und Aktin, Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden aus $n=2-4$ unabhängigen Proben berechnet.

Die Kultivierung unter fluidischen Bedingungen zeigte zwar für einzelne der untersuchten Proteine eine Steigerung in der RNA-Expression, beispielsweise für CD31 ($1,000$ (statisch) $< 1,771$ ($5 \mu\text{l}/\text{min}$) $< 2,206$ ($500 \mu\text{l}/\text{min}$) im Kultivierungsmedium und $1,894$ (statisch) $< 2,233$ ($5 \mu\text{l}/\text{min}$) im Differenzierungsmedium) oder auch für VE-Cadherin ($1,066$ (statisch) $< 1,950$ ($5 \mu\text{l}/\text{min}$) $< 3,590$ ($500 \mu\text{l}/\text{min}$) im Kultivierungsmedium), insgesamt waren hier jedoch geringere bis keine Effekte (ZO-1, BCRP, P-gp im Kultivierungsmedium), teilweise mit steigender Flussrate sogar niedrigere

Ergebnisse

Expressionen zu beobachten (vor allem für Occludin, ZO-1, BCRP und P-gp im Differenzierungsmedium). Dies widerspricht zum Teil Ergebnissen aus der Literatur wie sie beispielsweise für HBMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells) gezeigt wurden. Cucullo *et al.* konnten durch den Einfluss von Scherstress (4 dyn/cm^2) verstärkte Expressionen der Proteine CD31, Occludin, Claudin-5, VE-Cadherin und ZO-1 nachweisen.^[100] Da die *in vivo* Expression dieser Proteine im Gehirn im Vergleich zu einer statischen Kultivierung von hCMEC/D3 jedoch nicht ausreichend untersucht ist, ist es durchaus denkbar, dass die Expressionsrate in statisch kultivierten hCMEC/D3 im Vergleich zu den im Gehirn herrschenden Bedingungen erhöht ist. Die Kultivierung unter fluidischen Bedingungen mit den erniedrigten Expressionsraten ist dadurch nicht unbedingt als schlechter zu bewerten. Deutlich wird aus den durchgeföhrten Untersuchungen lediglich, dass die Wirkung von Scherkräften einen Einfluss auf die Genexpression wichtiger Proteine hat. Zudem kann über die durchgeföhrte Untersuchung keine Aussage über den vorhandenen Proteingehalt getroffen werden, sondern nur über die zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhandene mRNA-Menge und damit die Aktivität der Gene. In weiterführenden Versuchen wäre daher eine zusätzliche Proteomanalyse denkbar. Unter dem Aspekt der *in vivo*-artigen Situation entspricht die Kultivierung mit hohen Flussraten eher der *in vivo* Bedingung als eine statische Kultivierung und ist daher bei der Entwicklung eines Organmodells zu bevorzugen.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt werden konnte, wurde durch die Reduktion von Wachstumsfaktoren im Medium eine erhöhte Expression der untersuchten Proteine beobachtet. Lediglich für Occludin (0,759 im Vgl. zu 1,463) und BCRP (0,738 im Vgl. zu 0,827) bei einer Flussrate von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ wurden durch die Verwendung von Differenzierungsmedium erniedrigte Expressionen festgestellt.

4.1.4.5 Zusammenfassung

Für die mikrofluidische Kultivierung im vasQchip konnte für zwei verschiedene Flussraten ($100 \mu\text{l}/\text{h}$ und $500 \mu\text{l}/\text{min}$) gezeigt werden, dass eine Kultivierung über vierzehn Tage unter Erhalt einer dichten Zellschicht möglich ist. Dabei erfolgte bei einer Kultivierung mit $100 \mu\text{l}/\text{h}$ nach 48 h eine Umstellung des Kultivierungsmediums auf ein Wachstumsfaktor-reduziertes Medium. Da dies bei einer Flussrate von $500 \mu\text{l}/\text{min}$ nicht zur Ausbildung einer dichten Zellschicht führte, wurden die Zellen hier über den gesamten Zeitraum im Kultivierungsmedium kultiviert. Lebend/Tot-Färbungen zeigten, dass in beiden Fällen nach sieben sowie vierzehn Tagen nur wenige tote Zellen im Kanal waren und die Viabilität der Zellen damit sehr hoch war. Eine weitere Steigerung der Flussgeschwindigkeit auf $1000 \mu\text{l}/\text{min}$ war unter den untersuchten Bedingungen nicht möglich. Nach drei Tagen Kultivierung konnten zwar dichte Zelllayer mit viablen Zellen nachgewiesen werden, nach weiteren drei Tagen Kultivierung waren jedoch nur noch wenige Zellen im Kanal detektierbar. Ein möglicher Effekt durch die Färbung der Zellen mit Calcein-AM wurde untersucht. Da die hierzu durchgeföhrten Untersuchungen unter statischen Bedingungen erfolgten, konnte ein solcher Effekt jedoch nicht abschließend ausgeschlossen werden.

Um den Effekt der Durchblutung und der dadurch wirkenden Scherkräfte auf den Zelllayer zu untersuchen, wurde eine semi-quantitative PCR durchgeföhrt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Flussraten ($5 \mu\text{l}/\text{min}$, $500 \mu\text{l}/\text{min}$, PeRISYS-S, Cetoni) sowie eine statische Kultivierung im Mikrokanal miteinander verglichen. Zusätzlich wurde ein Einfluss der Wachstumsfaktoren im Medium (Vgl. Kapitel 4.1.2) untersucht. Für einzelne der untersuchten Proteine konnte mit

steigender Flussrate zwar eine verstärkte Genexpression nachgewiesen werden, insgesamt war der Effekt jedoch eher gering, teilweise waren sogar niedrigere Expressionen zu beobachten.

Für die Kultivierung im Differenzierungsmedium konnten, ähnlich wie bereits in Kapitel 4.1.2 festgestellt, sowohl für eine statische Kultivierung als auch für eine Kultivierung bei einer Flussrate von 5 µl/min erhöhte Expressionen festgestellt werden (außer Occludin und BCRP bei 5 µl/min).

Im Folgenden wurde für die Kultivierung bei hohen Flussraten das hCMEC/D3-Kultivierungsmedium eingesetzt, zur Kultivierung mit niedrigen Flussraten wurde nach 48-72 h auf das Differenzierungsmedium umgestellt, um so entweder durch die Wirkung von Scherkräften oder die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren den aus der Literatur beschriebenen quasi-statischen Zustand zu induzieren.^[134]

4.2. Etablierung der BBB inklusive Perizyten und Astrozyten

Nach erfolgter Etablierung und Evaluierung des Blutgefäßes war der nächste Schritt die Inkorporation weiterer Zelltypen der NVU. Hierfür wurden humane Perizyten und Astrozyten aus dem Gehirn verwendet (HBVP, *Human Brain Vascular Pericytes* und HA, *Human Astrocytes*). Von beiden Zelltypen ist es bekannt, dass sie wichtig zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer dichten Barriere im Gehirn sind.^[107,108,111–114]

4.2.1. Bestimmung eines geeigneten Kultivierungsmediums

In vivo werden sämtliche Zellen, angepasst an ihren speziellen Bedarf, durch den Blutstrom mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Bei einer Kultivierung außerhalb des Körpers ist dies nicht möglich. Die Kultivierung verschiedener Zellen erfolgt daher in einem spezifischen auf den jeweiligen Zelltyp abgestimmten Nährmedium, das zum Wachstum und zur Beibehaltung typischer morphologischer und funktioneller Eigenschaften beiträgt. Für eine Ko-Kultivierung verschiedener Zelltypen, wie dies im vasQchip der Fall ist, musste aus diesem Grund ein Kultivierungsmedium oder eine Zusammensetzung verschiedener Medien gefunden werden, die sich zur Kultivierung aller verwendeten Zelltypen eignet. Untersucht wurden die jeweiligen Spezialmedien der verwendeten Zelltypen, welche ein für die Astrozyten, für die Perizyten und die Endothelzellen abgestimmtes Nährmedium darstellten. Im Hinblick auf eine spätere Einbringung von Neuronen in das Modell wurde zudem ein neuronenspezifisches Medium sowie eine 1:1-Mischung aus Endothelzell- und Neuronenmedium getestet. Hierbei war es vor allem wichtig zu untersuchen, ob sich das neuronenspezifische Medium alleine oder in der Mischung mit Endothelzellmedium für die Kultivierung der weiteren Zelltypen eignet, da eine umfangreiche Untersuchung verschiedener Medien und Medienzusammensetzungen mit Neuronen aus Kosteneffizienz-Gründen nicht möglich war. Da es sich bei Neuronen jedoch um sehr sensible Zellen handelt, die für ihre korrekte Funktionalität eine sehr definierte Mikroumgebung benötigen, wurde davon ausgegangen, dass eine Verwendung des spezifischen Mediums notwendig ist.

Neben einer Proliferationsanalyse und einer Viabilitätsbestimmung in den unterschiedlichen Medien wurde die Morphologie und die Ausbildung und Beibehaltung spezifischer Marker untersucht.

4.2.1.1 Wachstum und Viabilität

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens in den unterschiedlichen Medien wurden die Zellen über einen Zeitraum von sieben Tagen unter Standardbedingungen (Kapitel 6.1.1) in einer 96-Well-

Ergebnisse

Platte kultiviert. An Tag 1, 3, 5 und 7 sowie zur Bestimmung eines Anfangswertes an Tag 0 wurde der PrestoBlue-Assay durchgeführt. Hierbei wird der membrangängige blaue Farbstoff Resazurin eingesetzt, der durch Reduktion in lebenden Zellen zum rosafarbenen, fluoreszierenden Molekül Resorufin umgesetzt wird (Abbildung 44). Durch Fluoreszenzmessung (Einheit *Fluorescence Unit*, FU) und den Vergleich mit dem Anfangswert, konnte so eine relative Fluoreszenzsteigerung und damit ein relativer Unterschied im Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Medien bestimmt werden.

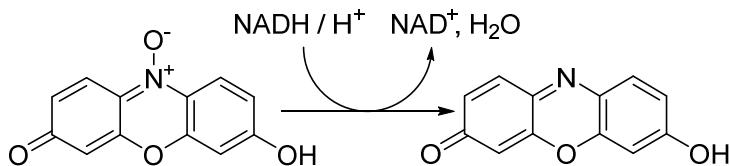


Abbildung 44 Reduktion des blauen Resazurin zum rosafarbenen, fluoreszierenden Resorufin

Im Gegensatz zu der häufig durchgeführten Wachstumskurve durch Auszählen der Zellen, liefert diese Methode ohne Kalibrierung zwar keine absoluten Zellzahlen, ist dafür jedoch weniger fehleranfällig. Darüber hinaus wird der Farbstoff lediglich von lebenden Zellen umgesetzt, eine zusätzliche Detektion toter Zellen durch beispielsweise Trypanblau war deshalb nicht notwendig. Die Ergebnisse des Proliferationsassay sind in Abbildung 45 dargestellt.

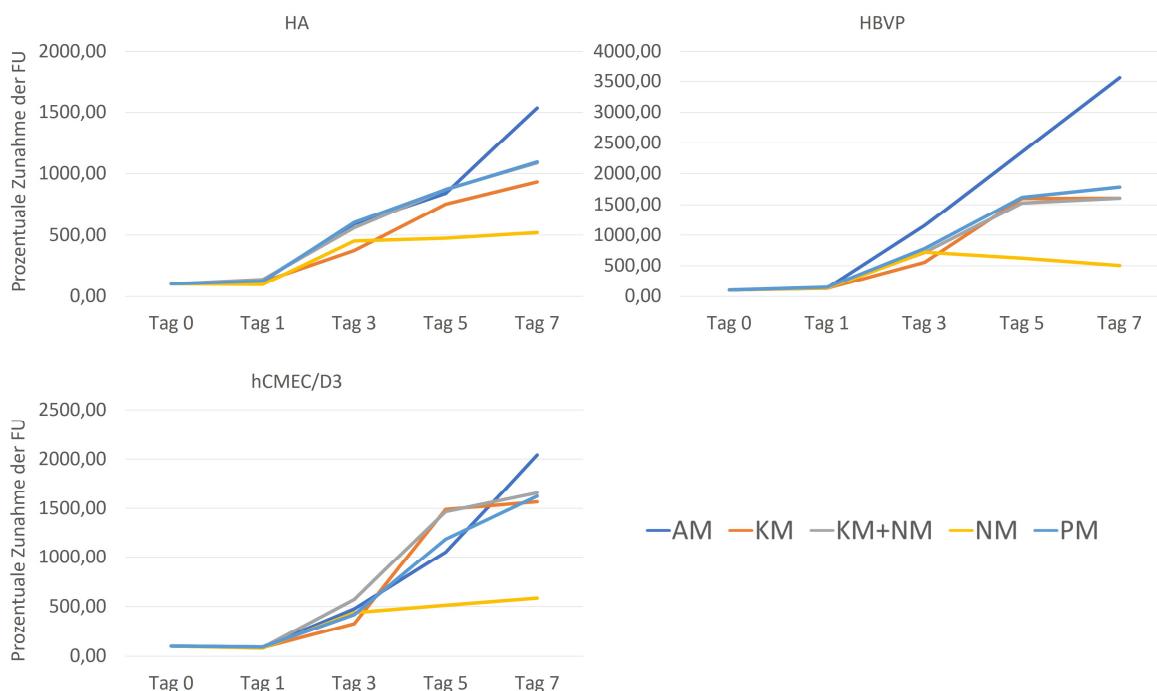


Abbildung 45 Proliferation der an der BBB-beteiligten Zelltypen in unterschiedlichen Medien. Je $5 \cdot 10^3$ hCMEC/D3, HA und HBVP wurden in 100 µl der jeweiligen Spezialmedien und einer 1:1 Mischung aus Endothelzell- und Neuronenmedium für 7 Tage kultiviert, wobei das Medium alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde. 3 h nach Aussaat sowie an Tag 1, 3, 5 und 7 wurden die Zellen mit 100 µl PrestoBlue-Reagenz behandelt und für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 50 µl 3 % SDS gestoppt und die Fluoreszenz bestimmt (λ_{ex} : 360 nm, λ_{em} : 400 nm). Dargestellt ist die Steigerung der Fluoreszenz in Prozent in Relation zum Anfangswert (=100%). n=3. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perizytenmedium.

Über einen Zeitraum von sieben Tagen konnte die stärkste Proliferation für alle Zelltypen im Astrozytenmedium festgestellt werden, während das Wachstum bei einer Kultivierung mit Neuronenmedium ab Tag 3 nahezu stagnierte, für die HBVP sogar retrograd war. Für eine Kultivierung in hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, Perizytenmedium sowie einer 1:1 Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium zeigten sich ähnliche Proliferationsraten. Um im nächsten Schritt die Viabilität, bezogen auf die Gesamtzellzahl, nach sieben Tagen in den unterschiedlichen Medien zu beurteilen, wurden die Zellen unter Standardbedingungen (Kapitel 6.1.1) kultiviert, wobei das Medium alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde. Anschließend wurden eine Lebend/Tot-Färbung mit FDA (Fluoresceindiacetat) und PI durchgeführt. FDA ist, wie Calcein-AM (Kapitel 4.1.4.1), ein pro-fluoreszierendes Molekül, das die Zellmembran lebender Zellen passieren kann und im Zellinneren zum fluoreszierenden Molekül Fluorescein gespalten wird. Da dieses die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann, verbleibt es im Zellinneren und führt so zu einer grünen Fluoreszenz lebender Zellen.^[178]

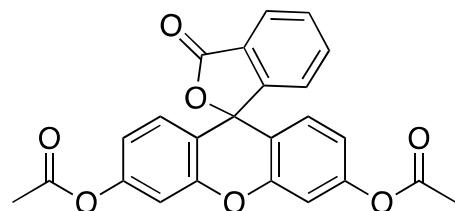


Abbildung 46 Struktur von Fluoresceindiacetat

Die Ergebnisse der Lebend/Tot-Färbung sind in Abbildung 47 - Abbildung 49 exemplarisch anhand eines Wells dargestellt. Es ist, wie bereits durch die Wachstumskurve bestimmt, zu erkennen, dass die Kultivierung in den unterschiedlichen Medien zu unterschiedlichen Proliferationsraten führte. Im Neuronenmedium wurde jeweils die geringste Anzahl an Zellen detektiert. Dennoch waren in allen Medien nur sehr wenige tote Zellen (rot – PI) im Vergleich zur Anzahl an lebenden Zellen (grün – FDA) zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass die Überlebensrate in allen Medien hoch war. Eine quantitative Analyse der Anzahl nekrotischer Zellen konnte dies bestätigen (Abbildung 50). Hierfür wurden zusätzlich die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt und eine Gesamtzellzahlbestimmung sowie die Bestimmung der nekrotischen Zellen mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt. Für alle drei untersuchten Zelltypen sowie alle fünf Medien-/zusammensetzungen wurden Werte über 90 % bestimmt. Mit Ausnahme des Neuronenmediums mit Werten von 98,16% für HA, 93,12% für HBVP und 95,57% für hCMEC/D3 konnten sogar Werte von über 99 % bestimmt werden.

Ergebnisse

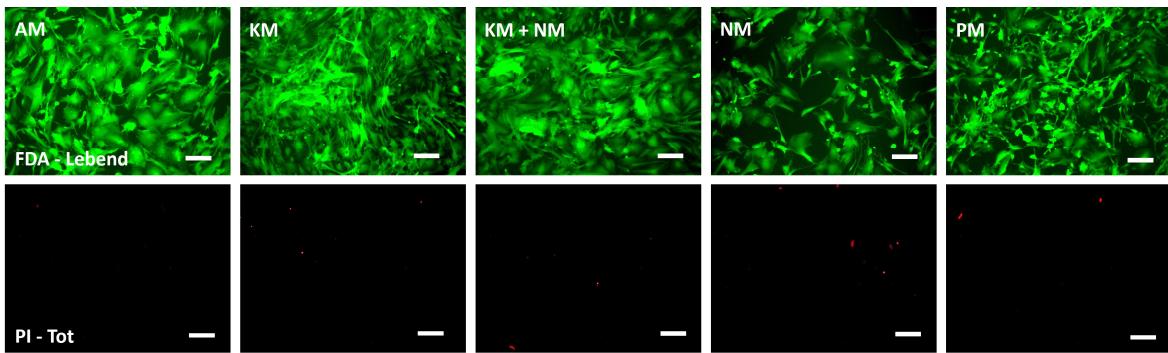


Abbildung 47 Lebend/Tot-Färbung der HA nach sieben Tagen Kultivierung in verschiedenen Medien. Je $5 \cdot 10^3$ HA wurden pro Well einer 96-Well-Platte (PLL-beschichtet, 2 µg/ml) im zellspezifischen Medium ausplattiert und für 3h anwachsen lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und in den verschiedenen Medien bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert. Ein Mediumwechsel fand dabei alle 2-3 Tage statt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch Färbung mit FDA und PI. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perzytenmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 150 µm

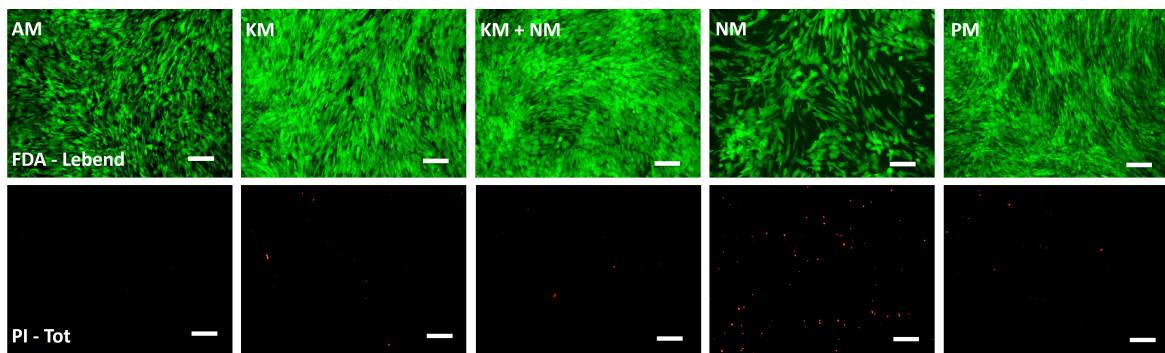


Abbildung 48 HBVP LT Tag 7 Lebend/Tot-Färbung der HBVP nach sieben Tagen Kultivierung in verschiedenen Medien. Je $5 \cdot 10^3$ HA wurden pro Well einer 96-Well-Platte (PLL-beschichtet, 2 µg/ml) im zellspezifischen Medium ausplattiert und für 3h anwachsen lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und in den verschiedenen Medien bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert. Ein Mediumwechsel fand dabei alle 2-3 Tage statt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch Färbung mit FDA und PI. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perzytenmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 150 µm

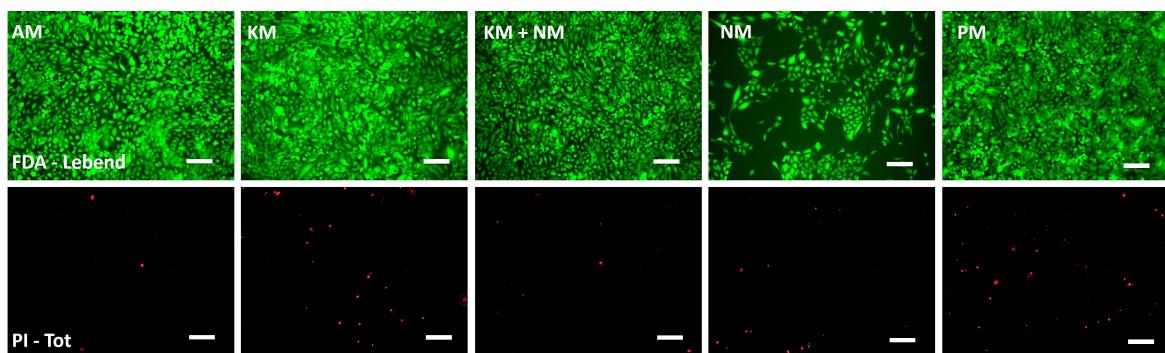


Abbildung 49 hCMEC/D3 LT Tag 7 Lebend/Tot-Färbung der hCMEC/D3 nach sieben Tagen Kultivierung in verschiedenen Medien. Je $5 \cdot 10^3$ hCMEC/D3 wurden pro Well einer 96-Well-Platte (Kollagen I-beschichtet, 0,1 mg/ml) im zellspezifischen Medium ausplattiert und für 3h anwachsen lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und in den verschiedenen Medien bei 37°C und 5% CO₂ weiterkultiviert. Ein Mediumwechsel fand dabei alle 2-3 Tage statt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch Färbung mit FDA und PI. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perzytenmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: 150 µm

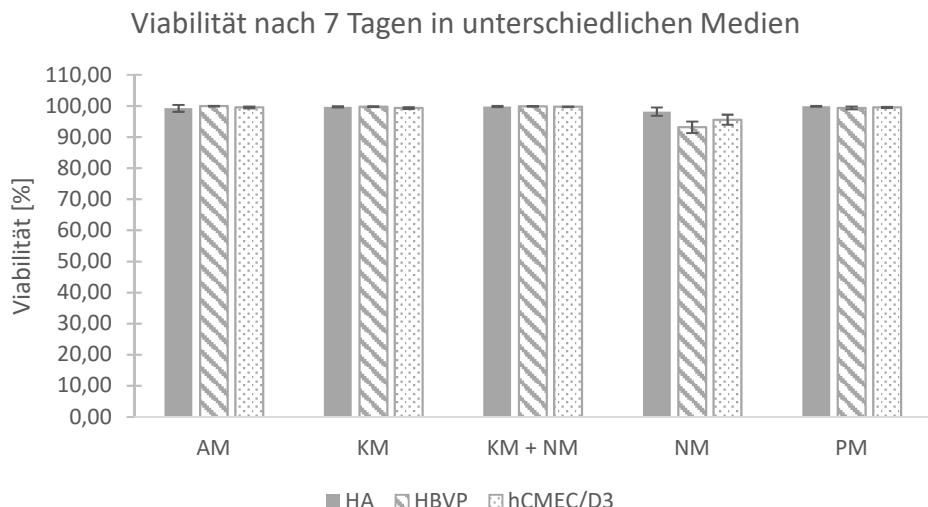


Abbildung 50 Viabilität von HA, HBVP und hCMEC/D3 in unterschiedlichen Medien nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen. Je $5 \cdot 10^3$ HA, HBVP und hCMEC/D3-Zellen wurden pro Well einer 96-Well-Platte (PLL- (HA bzw. HBVP), Kollagen I- (hCMEC/D3) beschichtet) im zellspezifischen Medium ausplattiert und für 3h anwachsen lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und in den verschiedenen Medien bei 37°C und 5% CO_2 weiterkultiviert. Ein Mediumwechsel fand dabei alle 2-3 Tage statt. Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch Färbung mit FDA und PI sowie eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Auswertung wurde mit der Software ImageJ durchgeführt. Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden berechnet aus $n=4$

4.2.1.2 Morphologie und Nachweis zellspezifischer Marker

Neben der Untersuchung der Viabilität, die in allen Medien vergleichbar hoch war, war vor allem die Untersuchung der Morphologie und der Expression spezifischer Marker in den unterschiedlichen Medien von Bedeutung. In einem geeigneten Medium müssen alle Zelltypen lebensfähig sein und weiterhin ihre charakteristischen Marker beibehalten, um so eine korrekte Funktionalität der einzelnen Zelltypen gewährleisten zu können. Hierfür wurden die Zellen in den jeweiligen Spezialmedien in die Kammern eines 8-Well- $\mu\text{-Slides}$ ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 1, 3, 5 und 7 wurden die Zellen lichtmikroskopisch visualisiert. Die Aufnahmen sind in Abbildung 51 sowie Abbildung 109 bis Abbildung 111 im Anhang dargestellt. Dabei konnten, wie bereits durch die Proliferationsanalyse gezeigt, unterschiedliche Wachstumsverhalten in den verschiedenen Medien festgestellt werden. Die geringe Proliferation im Neuronenmedium im Vergleich zu den anderen Medien konnte bestätigt werden. Eine deutlich stärkere Proliferation im Astrozytenmedium hingegen war nicht festzustellen. Bis auf das Neuronenmedium zeigten alle untersuchten Medien ähnlich starke Zellzunahmen über sieben Tage. Auch morphologisch konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Lediglich im Neuronenmedium waren die Zellen, vor allem die HBVP, insgesamt raumgreifender, was durch die niedrigere Zellzahl und den damit größeren zu Verfügung stehenden Platz zu begründen ist.

Ergebnisse

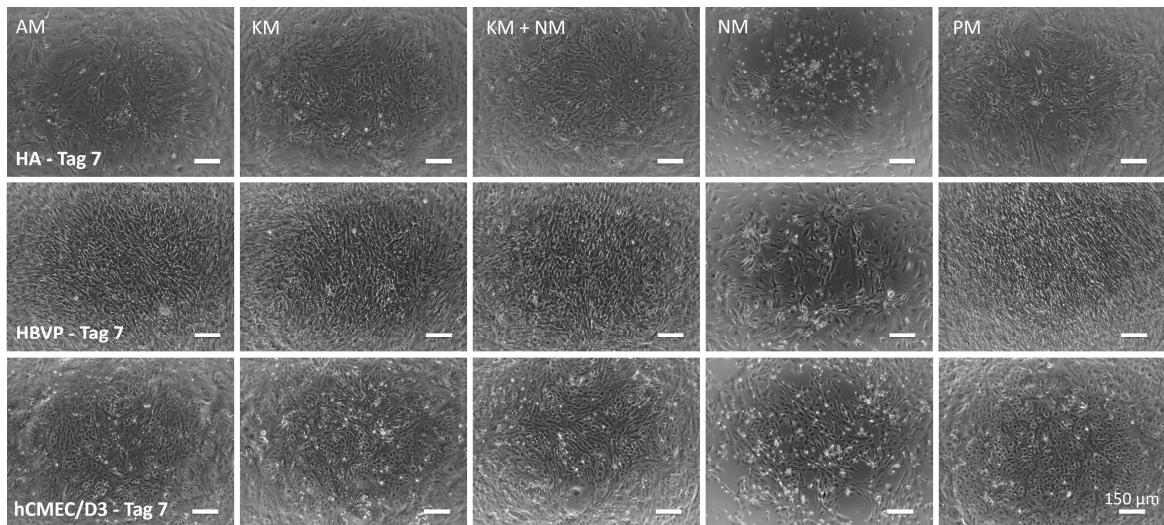


Abbildung 51 Lichtmikroskopischer, morphologischer Vergleich verschiedener Medien zur Ko-Kultivierung von HA, HBVP und hCMEC/D3 an Tag 7. Je $1 \cdot 10^4$ (HA, HBVP) bzw. $2 \cdot 10^4$ (hCMEC/D3) Zellen wurden pro Kammer eines 8-Well- μ -Slides (Wachstumsfläche: 1 cm^2) in den jeweiligen Spezialmedien AM, KM, NM und PM sowie einer 1:1 Mischung aus KM und NM ausgesät und für 7 Tage unter Standardbedingungen kultiviert, dabei wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perizytenmedium. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab = 150 μm .

Für eine genauere Analyse der Morphologie und der Ausbildung spezifischer Marker wurden die Zellen an Tag 7 fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Marker FABP7 (*Fatty Acid Binding Protein 7*, auch *Brain Lipid Binding Protein*) für Astrozyten, α -SMA (*Alpha Smooth Muscle Actin*) für Perizyten und CD31 für die Ausbildung einer dichten Endothelzellschicht herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 - Abbildung 54 dargestellt.

FABP7 gehört zu einer Familie von kleinen, hochkonservierten, zytoplasmatischen Proteinen mit einer Größe von ungefähr 15 kDa. Diese binden langketige Fettsäuren und spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme, dem Transport und dem Metabolismus von Fettsäuren. Im ZNS adulter Säugetiere werden drei FABPs exprimiert. FABP3 wird dabei vorwiegend in Neuronen exprimiert, während FABP5 sowohl in Neuronen als auch Gliazellen und FABP7 in Astrozyten und radialen Glia exprimiert wird.^[179–181] Wie in Abbildung 52 zu erkennen ist, konnte die Expression von FABP7 in Astrozyten in allen untersuchten Medien nachgewiesen werden.

Die Expression von α -SMA, einer Aktin-Isoform, die in den glatten Muskelzellen der Gefäße vorherrscht^[182], konnte ebenso Medium-unabhängig detektiert werden (Abbildung 53).

Die Visualisierung von CD31 als Marker für die Ausbildung eines dichten Netzwerks von *Tight Junctions* in Endothelzellen ist in Abbildung 54 gezeigt. Eine verstärkte Expression konnte, wie erwartet, an den Zellkontaktepunkten detektiert werden. Lediglich im Neuronenmedium konnte CD31 nur sehr schwach detektiert werden. Dies ist auf die geringe Proliferation zurückzuführen, wodurch es nicht zur Ausbildung eines dichten Zelllayers kam.

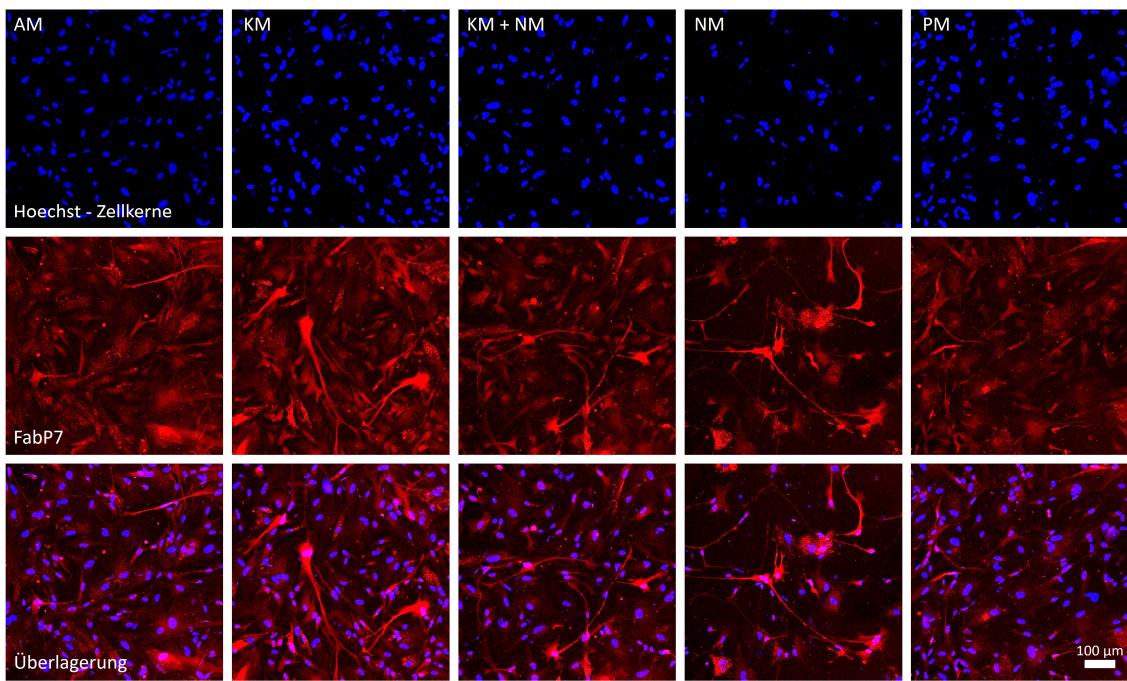


Abbildung 52 Immunfluoreszenz-Nachweis von FABP7 in HA. $1 \cdot 10^4$ HA wurden in die Kammern eines 8-Well- μ -Slides ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen in unterschiedlichen Medien kultiviert. Das Medium wurde dabei alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 7 wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, die Zellmembran mit Triton-X permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung von FABP7 durchgeführt. Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perizytenmedium. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 100 μ m.

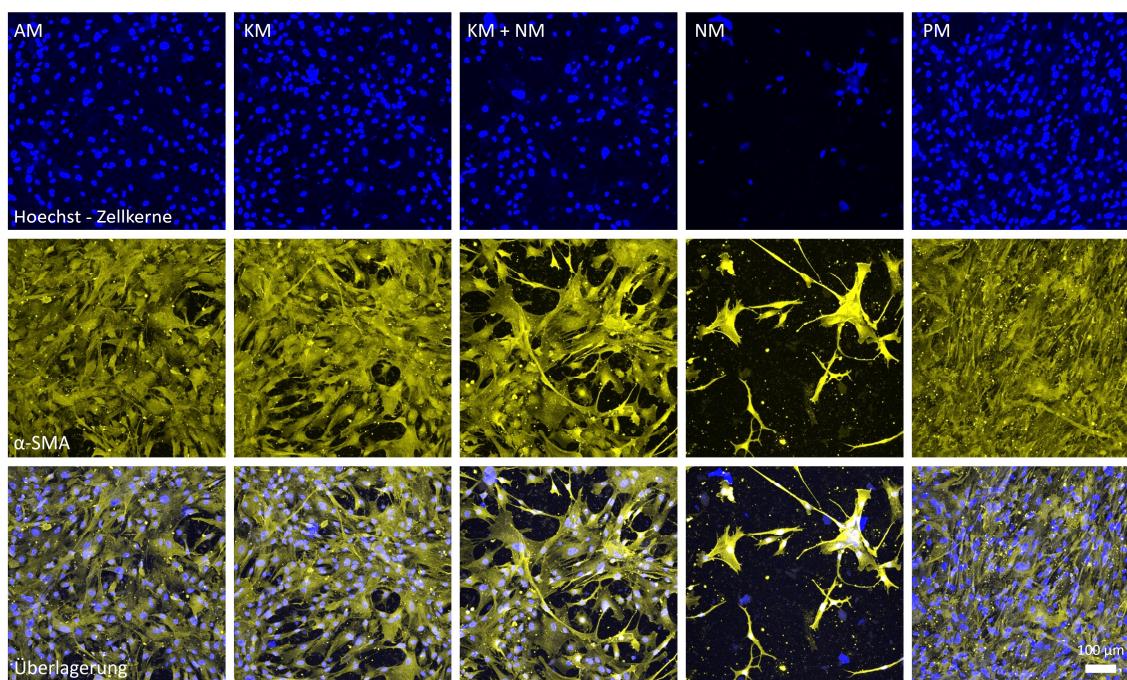


Abbildung 53 immunfluoreszenz-Nachweis von α -SMA in HBVP. $1 \cdot 10^4$ HBVP wurden in die Kammern eines 8-Well- μ -Slides ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen in unterschiedlichen Medien kultiviert. Das Medium wurde dabei alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 7 wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, die Zellmembran mit Triton-X permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA durchgeführt. Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perizytenmedium. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 100 μ m

Ergebnisse

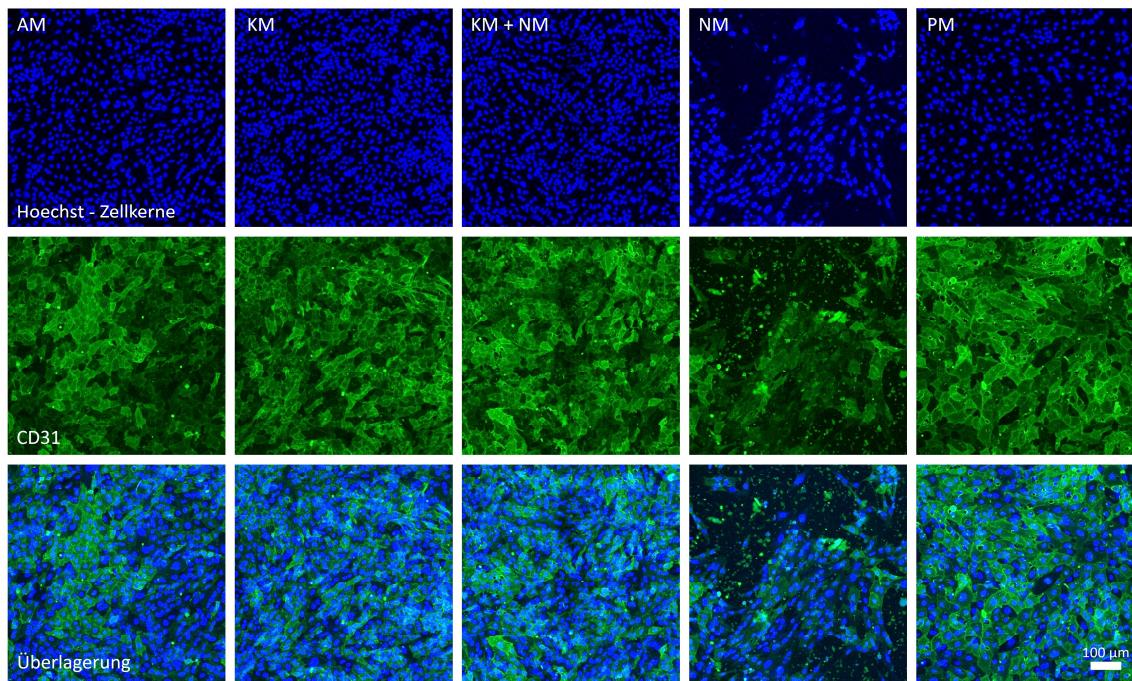


Abbildung 54 Immunfluoreszenz-Nachweis von CD31 in hCMEC/D3. $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in die Kammern eines 8-Well- μ -Slides ausgesät und für sieben Tage unter Standardbedingungen in unterschiedlichen Medien kultiviert. Das Medium wurde dabei alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ersetzt. An Tag 7 wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert, die Zellmembran mit Triton-X permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung von CD31 durchgeführt. Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. AM: Astrozytenmedium, KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium, PM: Perizytenmedium. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 100 μ m

4.2.1.3 Zusammenfassung

Für die Wahl eines geeigneten Mediums zur Ko-Kultivierung der verschiedenen Zelltypen der NVU wurde zunächst eine Proliferationsanalyse mit HA, HBVP und hCMEC/D3 durchgeführt. Diese zeigte für die untersuchten Zelltypen eine besonders starke Proliferation mit Zunahmen der Fluoreszenzintensität um das 15- (HA) bis 30-fache (HBVP) gegenüber dem Anfangswert im Astrozytenmedium, wohingegen die Proliferation im Neuronenmedium vergleichsweise gering bis stagnierend, für die HBVP nach Tag 3 sogar rückläufig war. Die weiteren untersuchten Medien hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, Perizytenmedium sowie die Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium zeigten für alle Zelltypen ähnliche Proliferationen (HA ca. 10-fache, HBVP und hCMEC/D3 ca. 16-fache Zunahme der Fluoreszenz gegenüber dem Anfangswert). Da die Zellen in den Chip bereits konfluent ausgesät werden, spielt die Proliferation nur eine untergeordnete Rolle, eine besonders starke Proliferation soll sogar vermieden werden. Durch die Untersuchung der Proliferation sollte jedoch vor allem festgestellt werden, ob die Zellen in den verschiedenen Medien lebens- und teilungsfähig sind. Es sollte damit ausgeschlossen werden, dass es zu einem Absterben der Zellen kommt. Sowohl die Verwendung des Astrozytenmediums als auch des Neuronenmediums waren daher eher ungeeignet.

Neben der Untersuchung der Teilungsfähigkeit, war vor allem die Untersuchung der Viabilität sowie der Morphologie und der Ausbildung typischer Marker wichtig. Hierbei konnte gezeigt werden, dass für die Kultivierung im Neuronenmedium nach sieben Tagen Viabilitäten über 90 %, für die Kultivierung in den anderen Medien sogar Viabilitäten über 99 %, bezogen auf die Gesamtzellzahl, erreicht wurden. Alle Zellen zeigten zudem typische Morphologien, eine Immunfluoreszenzfärbung

gegen FABP7 (HA), α -SMA (HBVP) und CD31 (hCMEC/D3) bestätigte die Expression spezifischer Marker. Eine noch genauere Aussage über die Wirkung verschiedener Medien auf die Zellen würde eine molekularbiologische Untersuchung liefern. Da durch mikroskopischen Nachweis jedoch die typischen Morphologien sowie die Ausbildung von spezifischen Markern gezeigt werden konnte, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit als ausreichender Nachweis für die Verwendbarkeit des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums, des Perizytenmediums sowie einer Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium angesehen. Da zu einem später Zeitpunkt eine Einbringung von Neuronen erfolgen sollte und es sich bei diesen um sehr sensible Zellen handelt, die eine sehr definierte Mikroumgebung benötigen und stark auf die Änderung äußerer Einflüsse reagieren, wurde angenommen, dass die Verwendung des spezifischen Mediums zur Kultivierung erforderlich ist. Im Hinblick auf die spätere Einbringung der Neuronen, wurde für das Gesamtmodell daher die Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium gewählt.

4.2.2. Ko-Kultur aus Endothelzellen und Perizyten

Die Erzeugung und Nachbildung eines durchbluteten Organs im vasQchip erfolgt durch eine halbrunde, poröse Membran zur Formgebung des Blutgefäßes und der Nachbildung des spezifischen Gewebes in einem umgebenden Kompartiment. Im Falle der BBB wird das Blutgefäß *in vivo* von Endothelzellen gebildet, das von flach darum angeordneten Perizyten umschlossen wird. Beide Zelltypen teilen sich eine Basalmembran, das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen beträgt im ZNS 1:3-4.^[104] Da zur Nachbildung *in vitro* die poröse Membran als Formgeber notwendig ist, waren für die Anordnung von Endothelzellen und Perizyten im vasQchip zwei Methoden denkbar, um die beiden Zelltypen miteinander in Verbindung zu bringen. Einerseits kann eine Einbringung beider Zelltypen in die Kanalstruktur erfolgen, um so einen direkten Kontakt herzustellen. Andererseits kann eine Kultivierung der Endothelzellen in der Kanalstruktur und eine Kultivierung der Perizyten auf der Rückseite der Kanalstruktur im umgebenden Kompartiment erfolgen. Die beiden Zelltypen sind dann durch die Membran getrennt, stehen aber über die Poren miteinander in Verbindung. Schematisch ist dies in Abbildung 55 gezeigt.

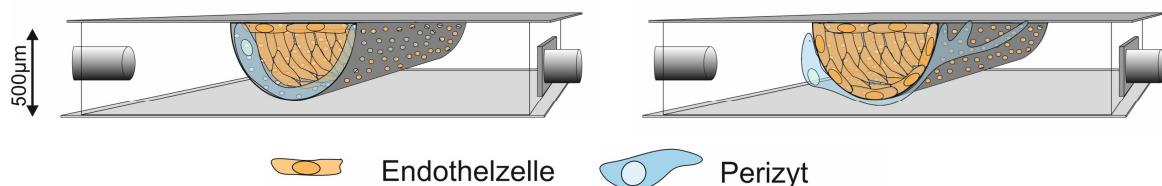


Abbildung 55 Schematische Darstellung der Ko-Kultur aus hCMEC/D3 und HBVP. Rechts ist die Kultivierung der hCMEC/D3 im Kanal dargestellt, während die Kultivierung der HBVP auf der Kanalrückseite stattfindet. Links ist eine mögliche Ko-Kultur beider Zelltypen im Mikrokanal des vasQchips gezeigt.

Für eine Kultivierung der HBVP im vasQchip war es zunächst erforderlich zu untersuchen, ob eine Beschichtung der PC-Folie prinzipiell notwendig ist und, ob sich hierfür Kollagen I eignet. Im Fall der Kultivierung auf der Kanalrückseite wären so beide Seiten des Kanals mit dem gleichen Matrixprotein beschichtet. Hierzu wurde die PC-Folie entweder mit Kollagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Wachstumsfläche 1 cm^2) beschichtet oder blieb als Kontrolle unbeschichtet. Anschließend wurden $2 \cdot 10^4$ HBVP auf die planare PC-Folie ausgesät und über einen Zeitraum von 3 h, jede Stunde, visuell überwacht. Eine weitere statische Kultivierung erfolgte daraufhin unter Standardbedingungen

Ergebnisse

(Kapitel 6.1.1) für eine gesamte Zeitspanne von 120 h, in der die Zellen weiterhin lichtmikroskopisch visualisiert wurden. Das Medium wurde nach 48 h durch frisches Medium ersetzt.

Wie in Abbildung 56 zu erkennen ist, zeigten die Zellen auf der beschichteten PC-Folie eine deutlich schnellere Adhäsion an die Oberfläche. Für eine Kultivierung auf der Kanalrückseite war dies zwar nicht unbedingt entscheidend, da die Einbringung der Zellen und die anschließende Adhäsion vor der Besiedlung des Kanals über Nacht erfolgen kann. Für eine Kultivierung im Kanal wäre dies jedoch wichtig, damit die Zellen bei der nachfolgenden Besiedlung mit Endothelzellen nicht aus dem Kanal gespült werden. Zudem ist das Kanalvolumen, wie bereits in Kapitel 4.1.1.1 erwähnt, sehr klein und die Versorgung der Zellen muss entsprechend zeitnah über eine Mikrofluidik erfolgen. Aus Abbildung 56 wird außerdem deutlich, dass die Zellen auf der beschichteten Folie homogener verteilt waren. Auf der unbeschichteten PC-Folie wuchsen die Zellen in vereinzelten, sehr dichten Clustern. Eine Beschichtung der PC-Folie war aus diesem Grund erforderlich. Da die Adhäsion der Zellen an die Membran sehr schnell erfolgte und diese homogen auf der Folie verteilt waren, eignete sich Kollagen I zur Beschichtung der PC-Folie für eine anschließende Kultivierung von HBVP.

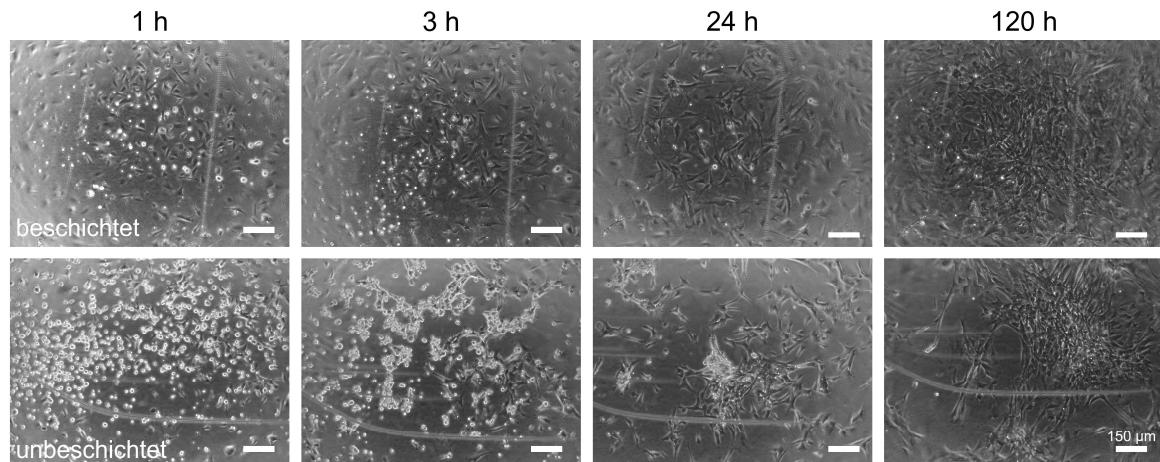


Abbildung 56 Wachstum von HBVP auf Kollagen I-beschichteter im Vergleich zu unbeschichteter Polycarbonat-Folie. $2 \cdot 10^4$ HBVP wurden auf eine Kollagen I-beschichtete ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. auf eine unbeschichtete Polycarbonat-Folie (Wachstumsfläche 1 cm^2) ausgesät. Nach 1, 3, 24 und 120 h wurde das Anwachsen sowie die Verteilung der Zellen auf der Folie lichtmikroskopisch visualisiert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Maßstab: $150 \mu\text{m}$

Für eine Ko-Kultur der beiden Zelltypen in direktem Kontakt im Kanal wurde anschließend ebenfalls statisch und in 2D untersucht, ob eine Kultivierung der hCMEC/D3 auf einer ausgebildeten Perizyten-Schicht möglich ist. Hierfür wurden zunächst $5 \cdot 10^4$ HBVP konfluent auf eine PC-Membran ausgesät, die zuvor mit Kollagen I beschichtet wurde ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, Wachstumsfläche 1 cm^2). Nach 24 h Inkubation erfolgte entweder eine direkte Aussaat der hCMEC/D3 ($15 \cdot 10^4$) auf den Perizytenlayer oder eine erneute Beschichtung mit Kollagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) und anschließender Aussaat der hCMEC/D3. Für die Ko-Kultur der beiden Zelltypen wurde das Endothelzellmedium hCMEC/D3-Kultivierungsmedium gewählt. Die Ko-Kultur wurde für insgesamt sechs Tage kultiviert und dabei visuell überwacht. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. An Tag 6 der Ko-Kultivierung wurden die Zellen mit Hoechst33342 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche Beschichtung zwischen den beiden Zelltypen zur Ausbildung von makroskopischen, faserartigen Strukturen führte, während dies bei einer direkten Kultivierung der hCMEC/D3 auf dem Perizytenlayer ausblieb (Abbildung 57). Die Bildung konnte bereits nach 24 h beobachtet werden. Dabei zog sich die obere Zellschicht

zusammen, war aber weiterhin noch planar. Nach 72 h waren die faserartigen Strukturen dann voll ausgebildet. Da im vasQchip bereits die Kanalstruktur das Blutgefäß darstellt und eine intrinsische Bildung von Blutgefäßstrukturen innerhalb des Kanals nicht gewünscht war, wurden die beiden Zelltypen im Folgenden ohne zusätzliche Beschichtung direkt aufeinander im Kanal kultiviert.

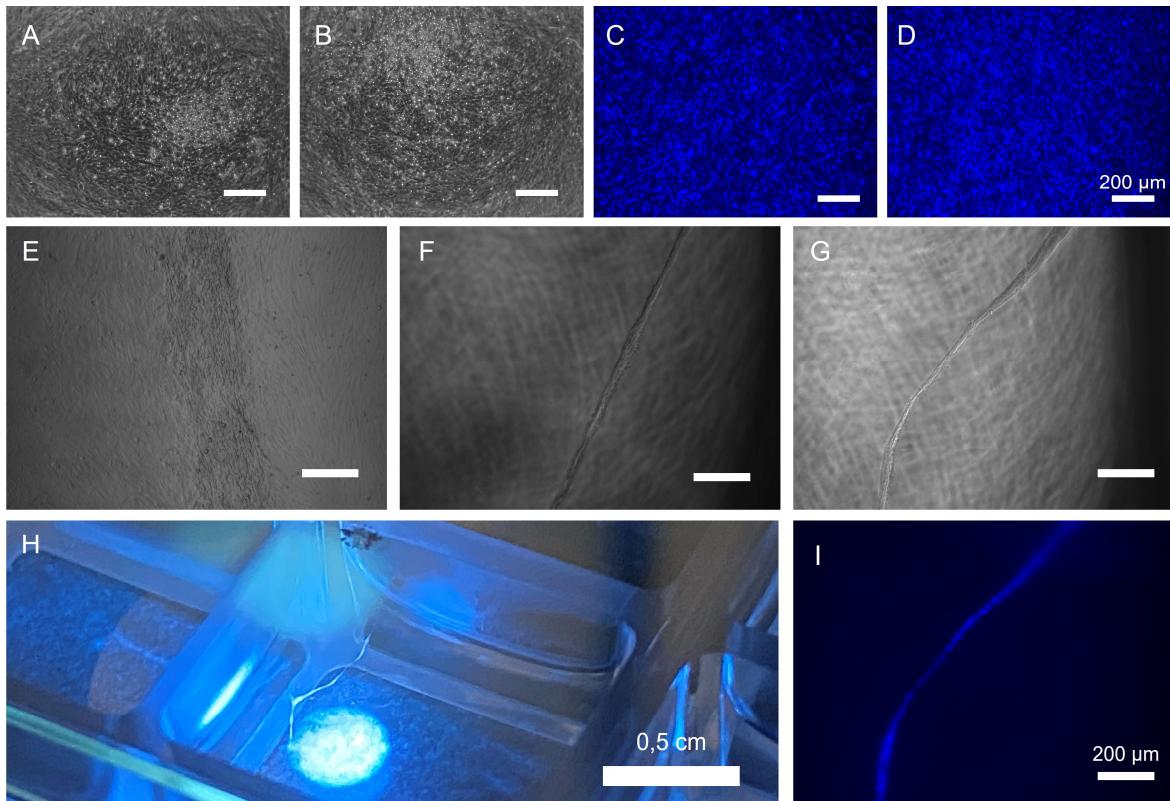


Abbildung 57 Statische Ko-Kultur aus HBVP und hCMEC/D3. $5 \cdot 10^4$ HBVP wurden auf eine Kollagen I beschichtete ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) PC-Folie ausgesät und für 24 h inkubiert. Daraufhin wurden $15 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 entweder direkt (A-D) auf den ausgebildeten Perizytenlayer ausgesät oder nach zusätzlicher Beschichtung mit Kollagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (E-I). Die Ko-Kultur wurde für weitere sechs Tage kultiviert. An Tag 6 erfolgte eine Färbung der Zellkerne mit Hoechst33342. (A, E) 24 h (B, F) 72 h (C) 6 Tage, Mitte des Wells, Hoechst33342-gefärbte Zellkerne (D) 6 Tage, Rand des Wells, Hoechst33342-gefärbte Zellkerne (G-I) 72 h. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED.

Im nächsten Schritt wurde die Ko-Kultivierung der beiden Zelltypen im vasQchip unter fluidischen Bedingungen untersucht. Hierfür wurde sowohl eine Ko-Kultur beider Zelltypen im Kanal sowie die Kultivierung getrennt durch die PC-Folie (siehe Abbildung 55) untersucht.

Kultivierung der HBVP im Kanal

Für die Kultivierung der Perizyten im Kanal des vasQchips wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen eingesetzt, da dies bei einer Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 dem im ZNS vorkommendem Verhältnis von 1:3 entspricht. Hierfür wurden die Zellen in 20 µl des hCMEC/D3-Kultivierungsmediums analog zur Besiedlung mit Endothelzellen in den Kollagen I-beschichteten Mikrokanal ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) pipettiert. Der vasQchip wurde anschließend für 1 h mit einer Geschwindigkeit von 4 U/h gedreht, um eine vollständige Auskleidung des Kanals zu erreichen. Nach einer darauffolgenden Inkubation von 2 h unter statischen Bedingungen erfolgte die Einbringung von hCMEC/D3 in den Kanal. Hierfür wurden die Anschlüsse des Kanals nicht komplett entleert und die Zellen in 50 µl Medium auf der einen Seite hinein pipettiert. Auf der gegenüberliegenden Seite des Kanals wurden dann vorsichtig 50 µl abgenommen, um so die Zellen durch den Kanal zu spülen und gleichzeitig zu verhindern, dass sich

Ergebnisse

die Perizyten durch einen zu starken Druck aus dem Kanal ablösen. Es folgte eine erneute Drehung des Kanals für 1 h mit 4 U/h. Anschließend wurden die Zellen 1 h statisch inkubiert, dann mit der Fluidik verbunden und für eine weitere Stunde statisch inkubiert, bevor ein Fluss von 100 µl/h gestartet wurde. Die Ko-Kultur wurde so für insgesamt sieben Tage mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert und dann zur Visualisierung fixiert und mit Hoechst33342 gefärbt. In Abbildung 58 sind verschiedene Stellen des Mikrokanals gezeigt. Es war zu beobachten, dass die Zellen keinen gleichmäßigen und planaren Layer innerhalb des Kanals bildeten. An mehreren Stellen war zu erkennen, dass die Zellen in dichten Aggregaten wuchsen und sich vom Boden des Kanals ablösten. Damit war eine Kultivierung der beiden Zelltypen im Kanal unter den gewählten Bedingungen nicht möglich.

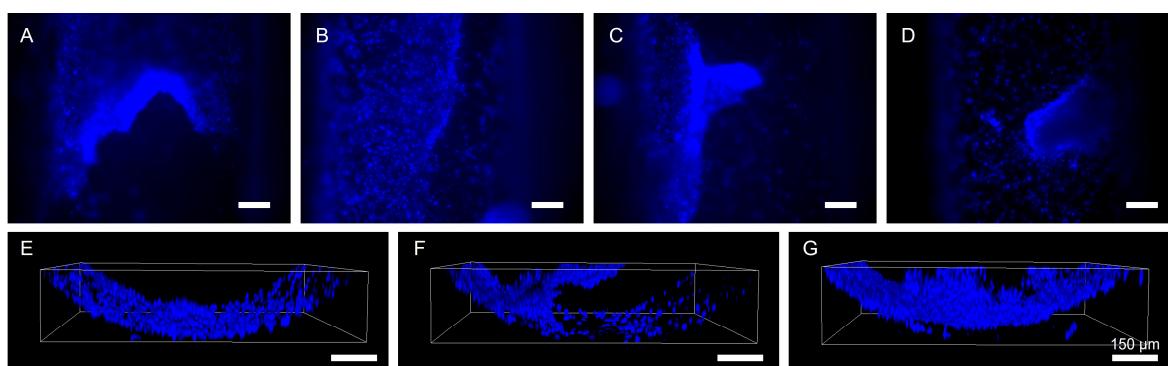


Abbildung 58 Ko-Kultur aus HBVP und hCMEC/D3 im Mikrokanal des vasQchips nach sieben Tagen fluidischer Kultivierung bei 100 µl/h. $2.5 \cdot 10^4$ HBVP wurden in den Kollagen I-beschichteten Mikrokanal ausgesät und für 1 h mit 4 U/h bei 37 °C und 5 % CO₂ zur gleichmäßigen Besiedlung des Mikrokanals gedreht. Anschließend wurden die Zellen für 2 h statisch inkubiert. Auf die Perizytenbeschichtung wurde daraufhin eine weitere Zellschicht aus $7.5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 ausgesetzt und für 1 h mit 4 U/h gedreht. Die Ko-Kultur wurde für sieben Tage kultiviert (100 µl/h), fixiert und die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. Maßstab: 150 µm. (A-D): Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED, (E-G): Leica TCS SPE DMI4000B.

Kultivierung der HBVP im umgebenden Kompartiment

Zur Kultivierung der HBVP im umgebenden Kompartiment auf der Kanalrückseite erfolgte die Einbringung der Zellen durch Pipettieren einer Zellsuspension auf einer Seite in den Anschluss des umgebenden Kompartiments. Um zu erreichen, dass die Zellen auf der Kanalrückseite anwachsen, wurde der Chip anschließend um 180° gedreht und für drei Stunden inkubiert. Daraufhin wurde der Chip wieder in die Ausgangsposition zurückgedreht und mit der Besiedlung des Kanals fortgefahrt. Schematisch ist der Besiedlungsvorgang des umgebenden Kompartiments in Abbildung 59 dargestellt.

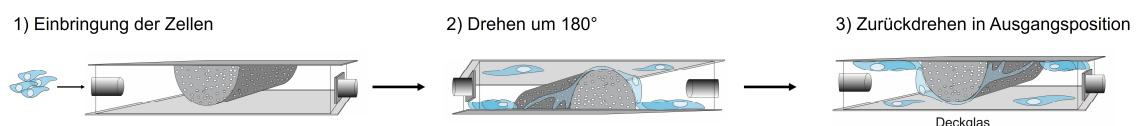


Abbildung 59 Schematischer Besiedlungsvorgang des umgebenden Kompartiments. Die Zellen wurden durch Pipettieren in den Anschluss des vasQchips eingebracht. Der vasQchip wird anschließend um 180° gedreht, für 3 h inkubiert und wieder in die Ausgangsposition zurückgedreht.

Dabei musste für eine Kultivierung der HBVP im umgebenden Kompartiment beachtet werden, dass die Zellen bei einer Einbringung über die Anschlüsse nicht nur um den Kanal angeordnet sind, sondern gleichmäßig das gesamte Kompartiment besiedeln. Unter Berücksichtigung der 58

Kontaktfläche von $0,31 \text{ cm}^2$ sowie der Gesamtfläche der PC-Folie von $4,52 \text{ cm}^2$ wurden für ein Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen von 1:3 damit theoretisch näherungsweise $25 \cdot 10^4$ HBVP benötigt. Darüber hinaus musste jedoch beachtet werden, dass durch das Drehen des vasQchips um 180° zwar erreicht wird, dass ein Großteil der Zellen auf der PC-Folie anwächst, dennoch kann nicht verhindert werden, dass ein Teil der Zellen ebenso am Deckglas anwächst. Die Besiedlung des umgebenden Kompartiments erfolgte aus diesem Grund mit einem Überschuss an HBVP. Dabei wurden $50 \cdot 10^4$ HBVP in $500 \mu\text{l}$ Medium eingesetzt. Der Kanal wurde anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt und die Ko-Kultur für sieben Tage mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{h}$ kultiviert, wobei das Medium im umgebenden Kompartiment alle 2-3 Tage durch spülen mit frischem Medium ausgetauscht wurde.

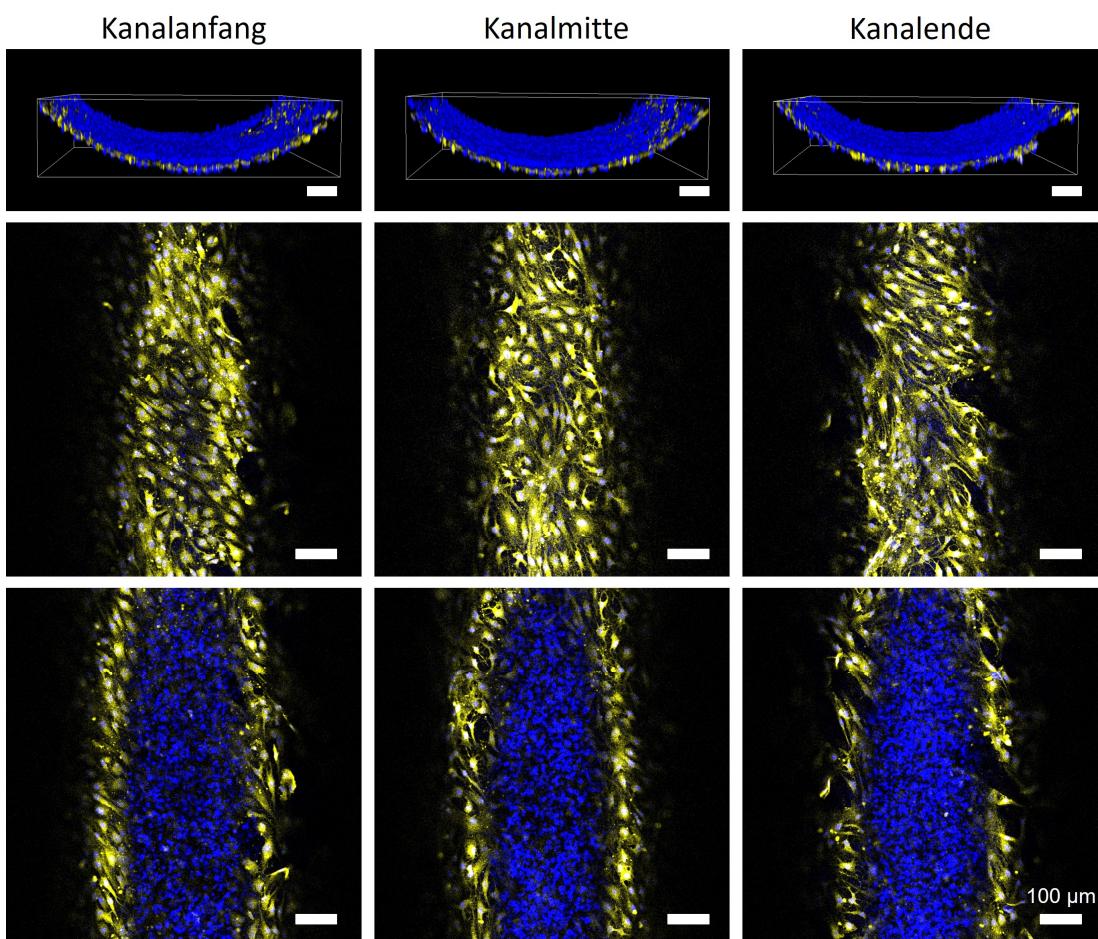


Abbildung 60 Visualisierung spezifischer Strukturen der Ko-Kultur von hCMEC/D3 im Mikrokanal und HBVP im umgebenden Kompartiment des vasQchips nach sieben Tagen fluidischer Kultivierung bei $100 \mu\text{l}/\text{h}$. Das umgebende Kompartiment des vasQchips wurde mit $50 \cdot 10^4$ HBVP für 3 h um 180° gedreht besiedelt. Anschließend erfolgte die Einbringung von $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den Mikrokanal. Die Ko-Kultur wurde für sieben Tage unter Standardbedingungen mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{h}$ kultiviert, anschließend fixiert und die Zellkerne mit Hoechst333342 (blau) gefärbt. Zur Visualisierung der HBVP wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA (gelb) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=69-79$, Abstand=3 μm , $h=204-234 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: $100 \mu\text{m}$

In Abbildung 60 sind drei Stellen des fixierten und gefärbten vasQchips dargestellt. In Blau sind die Zellkerne durch Hoechst33342-Färbung gezeigt. Zur besseren Unterscheidung der beiden Zellschichten wurden die HBVP zusätzlich durch Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA visualisiert. In der seitlichen Projektion der 3D-Ansicht können deutlich die zwei Schichten von Zellen, getrennt

Ergebnisse

durch die PC-Folie, erkannt werden. Dabei besiedelten die hCMEC/D3 den Kanal vollständig und gleichmäßig, während die HBVP um den Kanal angeordnet waren. Zur Bestimmung des Verhältnisses beider Zelltypen, wurde die Zellzahl aus drei verschiedenen Ausschnitten durch Auszählen der Zellkerne mit ImageJ ermittelt. Dabei konnte ein Verhältnis von $3,18 \pm 0,35 : 1$ bestimmt werden, was gut mit den tatsächlichen Bedingungen *in vivo* übereinstimmt.

4.2.3. Ko-Kultur aus Perizyten und Astrozyten

Als weiterer Zelltyp neben den Perizyten spielen Astrozyten ebenfalls eine wichtige Rolle für die Barrierausbildung der BBB, was bereits durch mehrere Studien aus Ko-Kulturen von Endothelzellen und Astrozyten gezeigt werden konnte.^[111,183,184] Während Perizyten flach um das Endothel angeordnet sind und dieses umschließen, stehen Astrozyten *in vivo* über lange Fortsätze, den Astrozytenendfüßchen, mit den Endothelzellen in Kontakt. Da die Kultivierung im vasQchip im umgebenden Kompartiment auf der ausgebildeten Perizytenschicht stattfindet, wurde zunächst statisch untersucht, ob die Ko-Kultur aus beiden Zellen möglich ist.

Zur Untersuchung der Bedingungen für eine Ko-Kultur aus HBVP und HA wurde die PC-Membran zunächst mit Kollagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet und mit $5 \cdot 10^4$ HBVP besiedelt. Am Folgetag wurden auf die ausgebildete Perizytenschicht $5 \cdot 10^4$ HA entweder direkt oder nach erneuter Beschichtung mit Kollagen I ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) ausgesät. Die Ko-Kultur wurde für insgesamt fünf Tage in hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert, anschließend fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der beiden Zelltypen durchgeführt. Zur Markierung der Perizyten wurde hierzu α -SMA angefärbt, während die Visualisierung der Astrozyten durch Färbung von FABP7 erfolgte. Durch beide Kultivierungsmethoden konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Ein Wachstum von Astrozyten auf der ausgebildeten Perizytenschicht war sowohl mit als auch ohne zusätzliche Beschichtung unter Ausbildung typischer Morphologien und spezifischer Marker möglich (Abbildung 61). Im weiteren Verlauf wurde daher auf eine zusätzliche Beschichtung zwischen den beiden Zelltypen verzichtet.

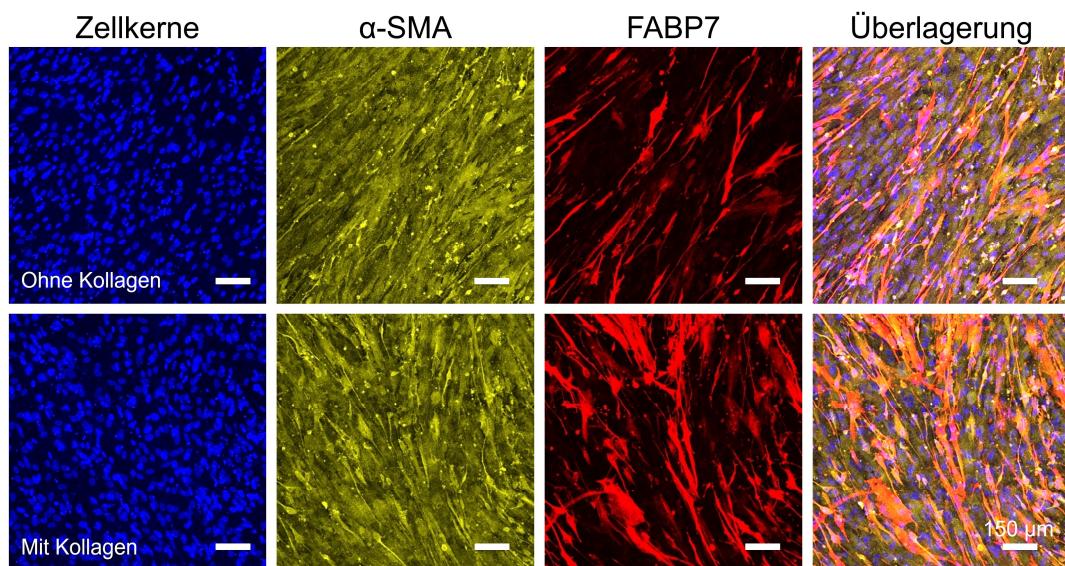


Abbildung 61 Visualisierung spezifischer Strukturen der Ko-Kultur aus HBVP und HA unter statischen Bedingungen. $5 \cdot 10^4$ HBVP wurden auf die Kollagen I-beschichtete ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) PC-Folie ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden auf die Perizytenschicht entweder direkt oder mit einer Kollagen I Beschichtung dazwischen ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) $5 \cdot 10^4$ HA ausgesät. Die Ko-Kultur wurde für fünf Tage in hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert, daraufhin fixiert und durch Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Blau: Zellkerne, Hoechst33342, Gelb: α -SMA der HBVP, Rot: FABP7 der HA. Leica TCS SPE DMI4000B. Maßstab: 150 µm.

4.2.4. Ko-Kultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im Chip

Für die Kultivierung von Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im vasQchip wurde als Beschichtungsmaterial Kollagen I gewählt, da in Vorversuchen (4.1.1 und 4.2.2) gezeigt werden konnte, dass sich dieses zur Kultivierung von sowohl hCMEC/D3 als auch HBVP auf der PC-Folie eignet. Dazu wurde der Kanal mit 50 µl einer 1 mg/ml Lösung ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. 0,1 mg/ml ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), das umgebenden Kompartiment mit 500 µl einer 0,6 mg/ml Lösung für eine Stunde bei 37 °C beschichtet. Nach einem anschließenden Waschschritt wurden zunächst die HBVP, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, in das umgebende Kompartiment eingebracht. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $50 \cdot 10^4$ HA in 500 µl nach dem gleichen Prinzip in das umgebende Kompartiment. Die Besiedlung des Kanals und der Anschluss an die Fluidik erfolgten frühestens nach drei Stunden, spätestens am nächsten Tag. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der ersten Versuche nur die Spritzenpumpe zur Verfügung stand, wurden die folgenden Experimente aus Gründen der Vergleichbarkeit alle mit einer Flussrate von 100 µl/h durchgeführt. Die in Kapitel 4.1.4.3 beschriebene Anpassung der Flussrate erfolgte erst später. Eine Wiederholung aller Versuche mit angepasster Flussrate war aus zeitlichen Gründen nicht realisierbar. Im weiteren Verlauf der Entwicklung sollte die Flussrate jedoch auch für das Gesamtmodell erhöht werden, um so physiologische Bedingungen zu schaffen.

Da auch die Einbringung der Neuronen in das Modell zeitlich erst später erfolgte und V. Kappings in vorherigen Studien zeigen konnte, dass sich das hCMEC/D3-Kultivierungsmedium für die Ko-Kultur aus HBVP, HA und hCMEC/D3 eignet, wurden die folgenden Versuche mit diesem durchgeführt.^[133] Lediglich eine Viabilitätsuntersuchung wurde nachträglich mit einer Mischung aus Endothelzellmedium und Neuronenmedium durchgeführt.

4.2.4.1 Versorgung des umgebenden Kompartiments

In vivo findet die Versorgung von Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen über die Blutbahn statt. Um zu untersuchen, ob im vasQchip ebenfalls eine Versorgung des umgebenden Kompartiments über die Poren in der Membran des Mikrokanals und durch die verschiedenen Zellschichten hindurch stattfinden kann, wurden die Chips wie oben beschrieben mit HBVP, HA und hCMEC/D3 besiedelt und für 72 h mit einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Die durchschnittliche Porengröße der verwendeten vasQchips betrug dabei 1,6 µm. Um den Transport durch den Mikrokanal zu visualisieren wurden die Chips nach 72 h von der Fluidik getrennt und ein Kollagengel (2 mg/ml) mit darin eingekapselten Astrozyten in das umgebende Kompartiment eingebracht und für 3 h statisch inkubiert. Anschließend wurden die Chips erneut an die Fluidik angeschlossen, hierbei wurde der Farbstoff CellTracker™ Green CMFDA (Abbildung 62) für 1 bzw. 24 h durch den Kanal gepumpt.

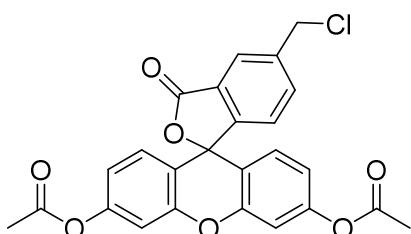


Abbildung 62 Struktur von CellTracker™ Green CMFDA

Ergebnisse

Hierbei handelt es sich um ein fluoreszierendes Molekül, das die Zellmembran ungehindert passieren kann und im Zellinneren zu einem nicht-membrangängigen Produkt umgewandelt wird. Dieses ist für mindestens 72 h stabil, nicht toxisch und wird darüber hinaus nicht an benachbarte Zellen übertragen. Zur Visualisierung der Versorgung des umgebenden Kompartiments eignete sich dieser Farbstoff daher sehr gut. Die Ergebnisse sind in Abbildung 63 gezeigt, wobei die Visualisierung durch Z-Stack-Messungen von 100 µm durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte. Dabei wurden verschiedene Stellen unterhalb und neben dem Mikrokanal aufgenommen. Unterhalt des Kanals wurde nach 1 h Inkubation zudem eine Z-Stack-Messung mit einer Gesamthöhe von 500 µm durchgeführt. Für eine bessere Beurteilung der Penetration des Farbstoffes wurden die Zellkerne der im Kollagengel eingeschlossenen Astrozyten mit Hoechst33342 (2 µg/ml) gefärbt.

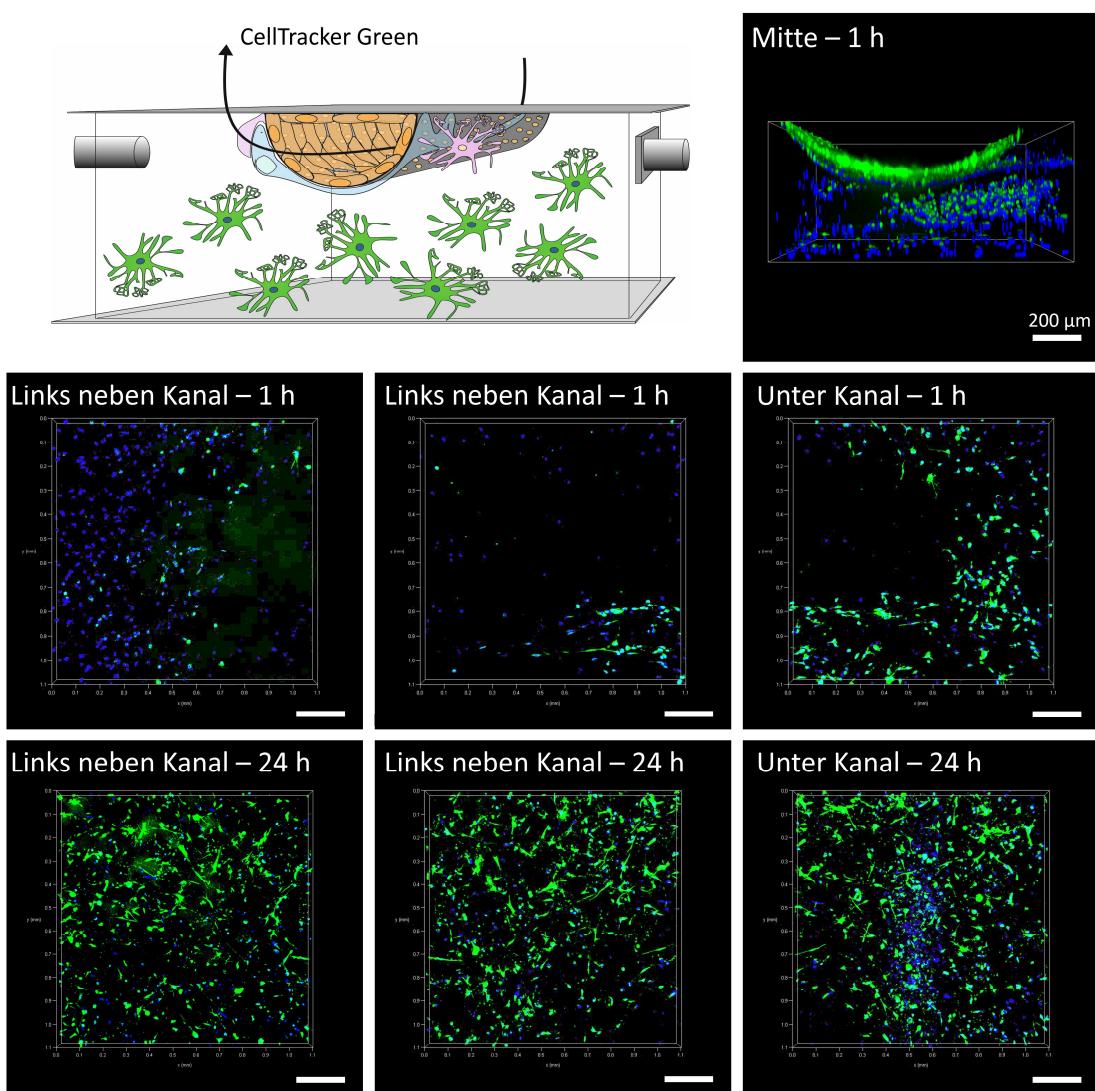


Abbildung 63 Versorgung des umgebenden Kompartiments durch Untersuchung der Penetration des Farbstoffes CellTracker™ Green CMFDA. VasQchips mit einer durchschnittlichen Porengröße von 1,6 µm wurden mit Kollagen I beschichtet (1 mg/ml Kanal, 0,6 mg/ml UK) und mit HBVP ($5 \cdot 10^5$), HA ($5 \cdot 10^5$) und hCMEC/D3 ($7,5 \cdot 10^4$) besiedelt. Nach 72 h fluidischer Kultivierung mit 100 µl/h wurde in das umgebende Kompartiment ein Kollagengel (2 mg/ml) inkl. HA eingebracht und für 3 h statisch inkubiert. Anschließend wurde CellTracker™ Green CMFDA (20 µM) mit einer Flussrate von 100 µl/h durch den Kanal gepumpt. Nach einer bzw. 24 h wurden die Penetration des Farbstoffes durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (n=33, Abstand=3 µm, h=100 µm, Leica TCS SPE DMI4000B) visualisiert. Die Zellkerne der HA im Gel wurden zudem mit Hoechst33342 gefärbt. Maßstab: 200 µm

Bereits nach einer Stunde konnte eine Färbung der umliegenden Zellen und eine Penetration des Farbstoffes bis zu 2 mm seitlich des Kanals beobachtet werden. Nach 24 h war diese intensiver und auch weiter vom Kanal entfernte Zellen waren gefärbt.

Das vorliegende Experiment zeigte, dass eine Versorgung von umliegendem Gewebe durch die Poren des besiedelten Kanals sowie die umgebenden Zellen stattfinden kann. Die Penetrationsweite und -geschwindigkeit ist dabei jedoch maßgeblich von der Molekülgröße und der umgebenden Matrix abhängig.

4.2.4.2 Lebend/Tot-Nachweis

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein Austausch von Stoffen über die Poren des Mikrokanals stattfand und damit eine Versorgung von umliegendem Gewebe gewährleistet ist, bestand der nächste Schritt in der Untersuchung der Viabilität der Ko-Kultur. Hierfür wurden die Zellen wie in 4.2.4 beschrieben in den vasQchip ausgesät und die Ko-Kultur für insgesamt sieben Tage unter fluidischen Bedingungen kultiviert. 72 h nach der Einbringung der hCMEC/D3 wurde vom hCMEC/D3-Kultivierungsmedium auf eine Mischung aus Differenzierungsmedium und Neuronenmedium umgestellt, da im weiteren Verlauf der Modelletablierung zu diesem Zeitpunkt eine Einbringung von Neuronen in das bestehende Modell erfolgen sollte. Die Untersuchung der Viabilität erfolgte durch Färbung mit Calcein-AM und PI (Kapitel 4.1.4.1, Abbildung 30) nach 72 h, vor der Umstellung des Mediums sowie nach insgesamt sieben Tagen Ko-Kultivierung (Abbildung 64). Dabei zeigten sich sowohl nach 72 h wie auch nach sieben Tagen eine Vielzahl lebender Zellen und eine vergleichsweise geringe Anzahl nekrotischer Zellen sowohl im Kanal wie auch auf der Kanalrückseite im umgebenden Kompartiment. Durch die dreidimensionale, seitliche Darstellung des Mikrokanals (Abbildung 64 B und E) waren deutlich die zwei durch die Membran getrennten Zellschichten im Mikrokanal und im umgebenden Kompartiment erkennbar.

Ergebnisse

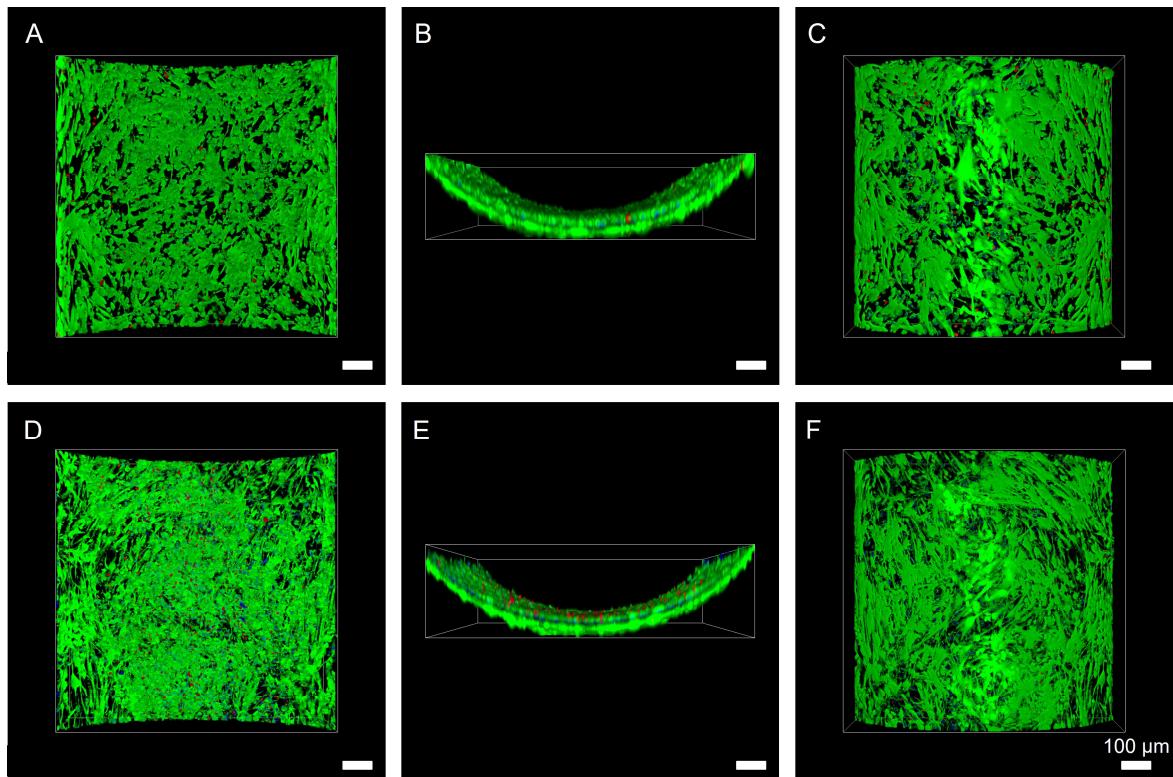


Abbildung 64 Lebend/Tot-Färbung der BBB im vasQchip nach 72 h bzw. sieben Tagen fluidischer Kultivierung. Je $5 \cdot 10^5$ HBVP und HA wurden nacheinander in das mit Kollagen I beschichtete (0,6 mg/ml) umgebende Kompartiment ausgesät. Die Besiedlung des Mikrokanals (Kollagen I, 1 mg/ml, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) erfolgte anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3. Die Kultur wurde mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ unter Standardbedingungen für 72 h mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert. Daraufhin wurde der vasQchip entweder von der Fluidik getrennt und Kanal sowie umgebendes Kompartiment mit Calcein-AM (lebende Zellen, grün) und PI (nekrotische Zellen, rot) gefärbt (A-C) bzw. das Medium auf eine Mischung aus hCMEC/D3-Differenzierungsmedium und Neuronenmedium umgestellt. Eine Lebend/Tot-Färbung erfolgte analog nach insgesamt sieben Tagen fluidischer Kultivierung mit 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ (D-F). Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (A-C: n=79, Abstand=3 μm , h=234 μm , D-E: n=85, Abstand=3 μm , h=252 μm , Leica TCS SPE DMI4000B). Dargestellt sind die 3D-Ansichten des Mikrokanals von oben (A, D), seitlich (B, E) sowie von unten (C, F). Maßstab: 100 μm .

Zur besseren Unterscheidung lebender und toter Zellen sind in Abbildung 65 und Abbildung 66 die getrennten Farbkanäle exemplarisch für je drei verschiedene Ebenen der Z-Stack-Messung (A-C) sowie eine Überlagerung aller Ebenen zu einem Gesamtbild (D) dargestellt. Zur besseren Unterscheidung der Zellen im und unter dem Kanal wurden die hCMEC/D3 zusätzlich mit Hoechst33342 angefärbt. Während nach 72 h hauptsächlich nekrotische Zellen im umgebenden Kompartiment und nur sehr wenige im Mikrokanal detektiert wurden, zeigte sich nach sieben Tagen eine erhöhte Anzahl nekrotischer Zellen im Mikrokanal. Gleichzeitig war jedoch eine generelle Zunahme der Gesamtzellzahl und damit auch lebender Zellen zu beobachten. Insgesamt waren die Zellen überwiegend viabel.

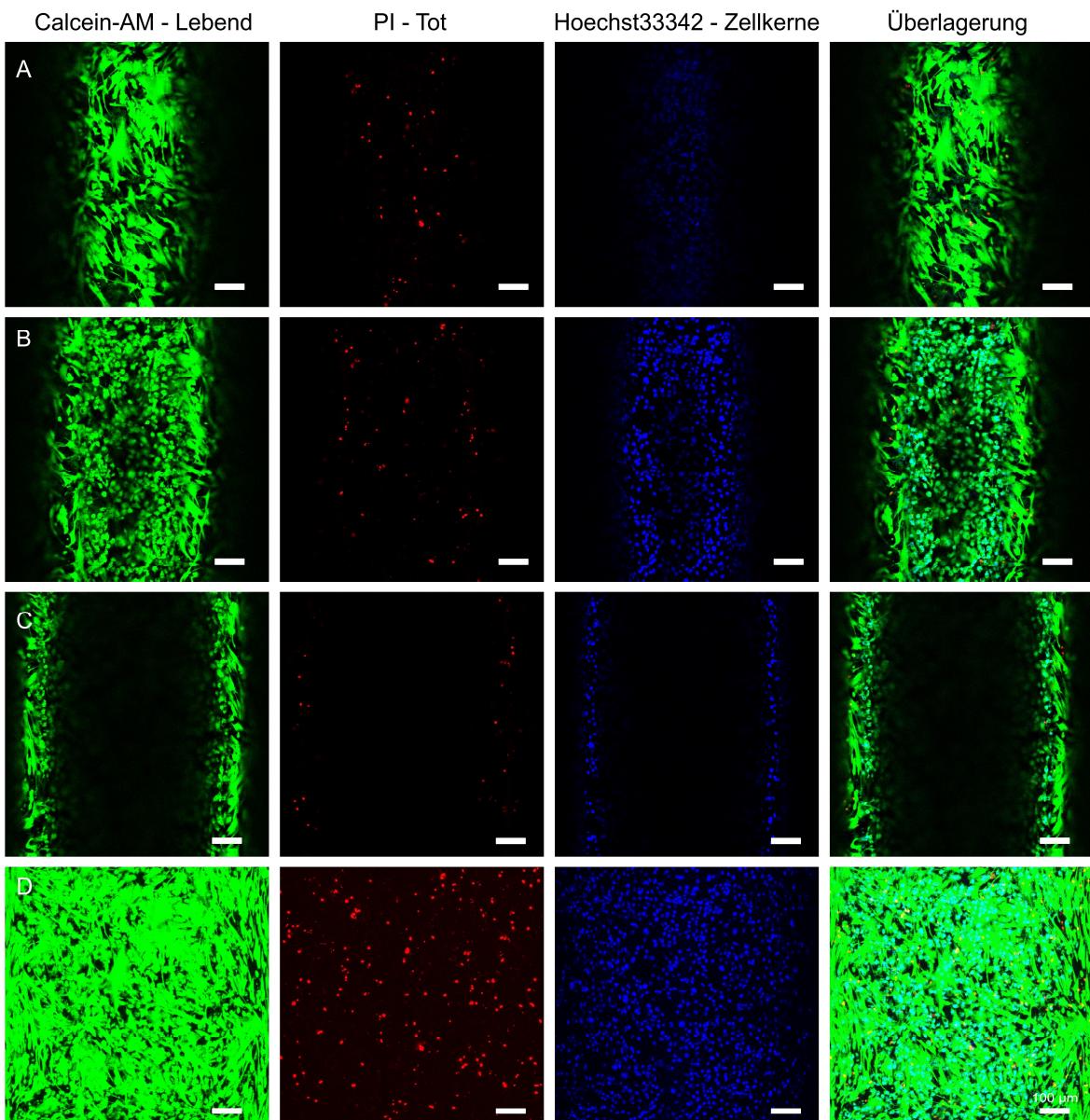


Abbildung 65 Lebend/Tot-Färbung der BBB im vasQchip nach 72 h fluidischer Kultivierung. Je $5 \cdot 10^5$ HBVP und HA wurden nacheinander in das mit Kollagen I beschichtete (0,6 mg/ml) umgebende Kompartiment ausgesät. Die Besiedlung des Mikrokanals (Kollagen I, 1 mg/ml) erfolgte anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3. Die Ko-Kultur wurde 72 h mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ unter Standardbedingungen mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert, daraufhin von der Fluidik getrennt und Kanal sowie umgebendes Kompartiment mit Calcein-AM (lebende Zellen, grün) und PI (nekrotische Zellen, rot) gefärbt. Die Zellkerne der hCMEC/D3 im Mikrokanal wurden zudem mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=79$, Abstand=3 μm , $h=234 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Dargestellt sind je drei verschiedene Ebenen (A, B, C) sowie die Maximalüberlagerung aller Ebenen zu einem Bild (D). Maßstab: 100 μm .

Ergebnisse

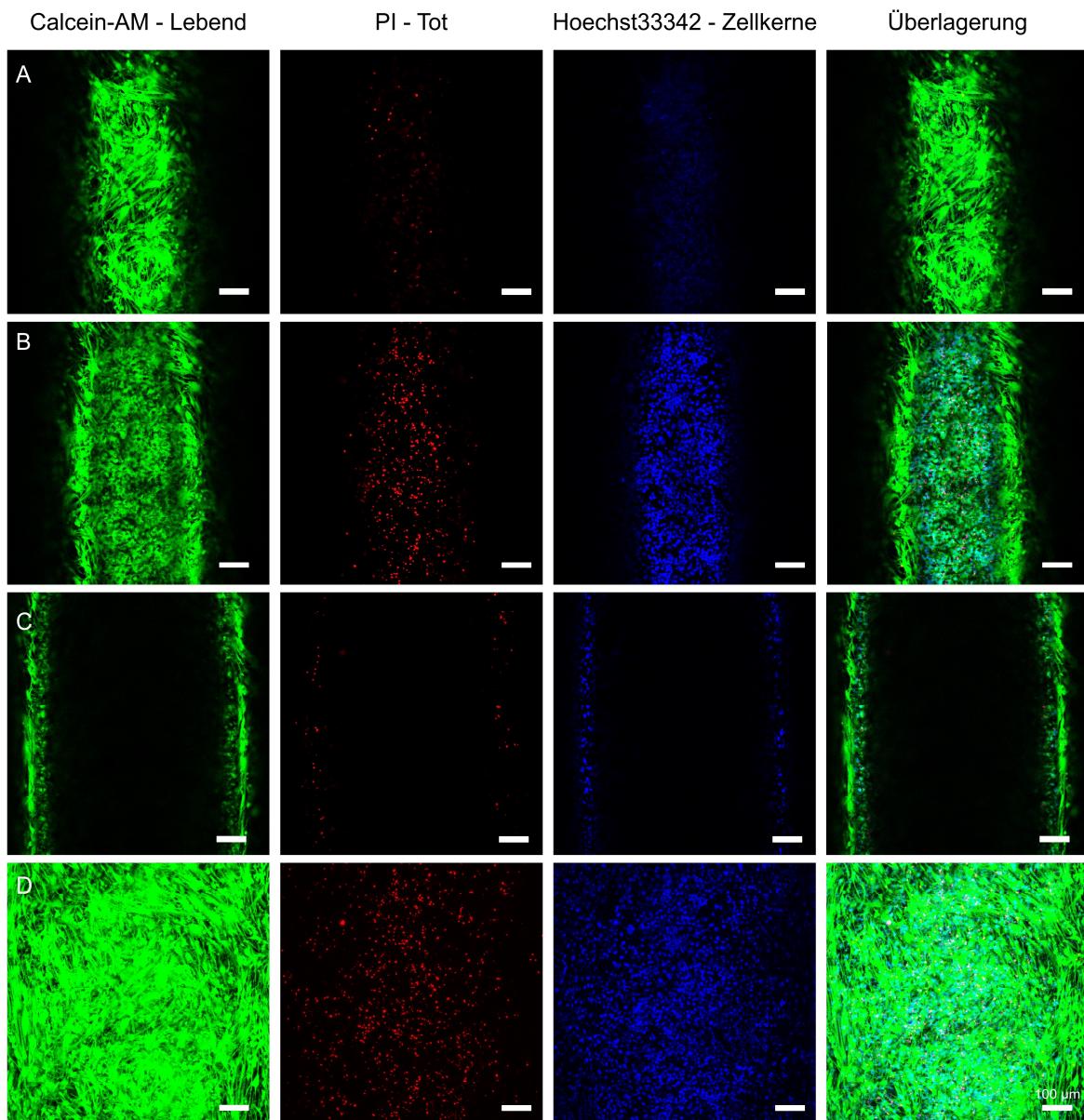


Abbildung 66 Lebend/Tot-Färbung der BBB im vasQchip nach 7 Tagen fluidischer Kultivierung. Je $5 \cdot 10^5$ HBVP und HA wurden nacheinander in das mit Kollagen I beschichtete (0,6 mg/ml) umgebende Kompartiment ausgesät. Die Besiedlung des Mikrokanals (Kollagen I, 1 mg/ml, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) erfolgte anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3. Die Ko-Kultur wurde 72 h mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ unter Standardbedingungen mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert, daraufhin wurde auf eine Mischung aus hCMEC/D3-Differenzierungsmedium und Neuronenmedium umgestellt und für weitere vier Tage mit 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ kultiviert. Anschließend wurde der vasQchip von der Fluidik getrennt und Kanal sowie umgebendes Kompartiment mit Calcein-AM (lebende Zellen, grün) und PI (nekrotische Zellen, rot) gefärbt. Die Zellkerne der hCMEC/D3 im Mikrokanal wurden zudem mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=85$, Abstand=3 μm , $h=252$ μm , Leica TCS SPE DMI4000B). Dargestellt sind je drei verschiedene Ebenen (A, B, C) sowie die Maximalüberlagerung aller Ebenen zu einem Bild (D). Maßstab: 100 μm .

In einem ersten Versuch zum Gesamt-BBB-Modell mit angepasster Flussrate wurde ebenfalls eine Lebend/Tot-Färbung durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie unter 4.2.4 beschrieben in den vasQchip ausgesät und für sieben Tage mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ entsprechend der in 4.1.4.3 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die Färbung mit Calcein-AM und PI zeigte im Vergleich zur Kultivierung mit der Spritzenpumpe eine deutlich größere Anzahl toter Zellen gegenüber lebenden Zellen (Abbildung 67). Es konnte darüber hinaus eine sehr inhomogene und lückenhafte Besiedlung des umgebenden Kompartiments festgestellt werden. Während die Zellen

im umgebenden Kompartiment (HBVP und HA) bei einer Kultivierung mit $100 \mu\text{l}/\text{h}$ eine hohe Viabilität aufwiesen und den Kanal vollständig umspannten, zeigten sich bei der Kultivierung mit hoher Flussrate vor allem in der Mitte des Kanals große Löcher im Zellrasen sowie überwiegend tote Zellen. Da es sich bei dem vorliegenden Experiment jedoch lediglich um ein erstes *Proof-of-Principle*-Experiment mit höherer Flussrate handelt, müssen hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Sollte sich dabei weiterhin eine schlechte Viabilität sowie Verteilung der Zellen im umgebenden Kompartiment zeigen, muss eine erneute Anpassung der Besiedlungs- und Kultivierungsprotokolle erfolgen.

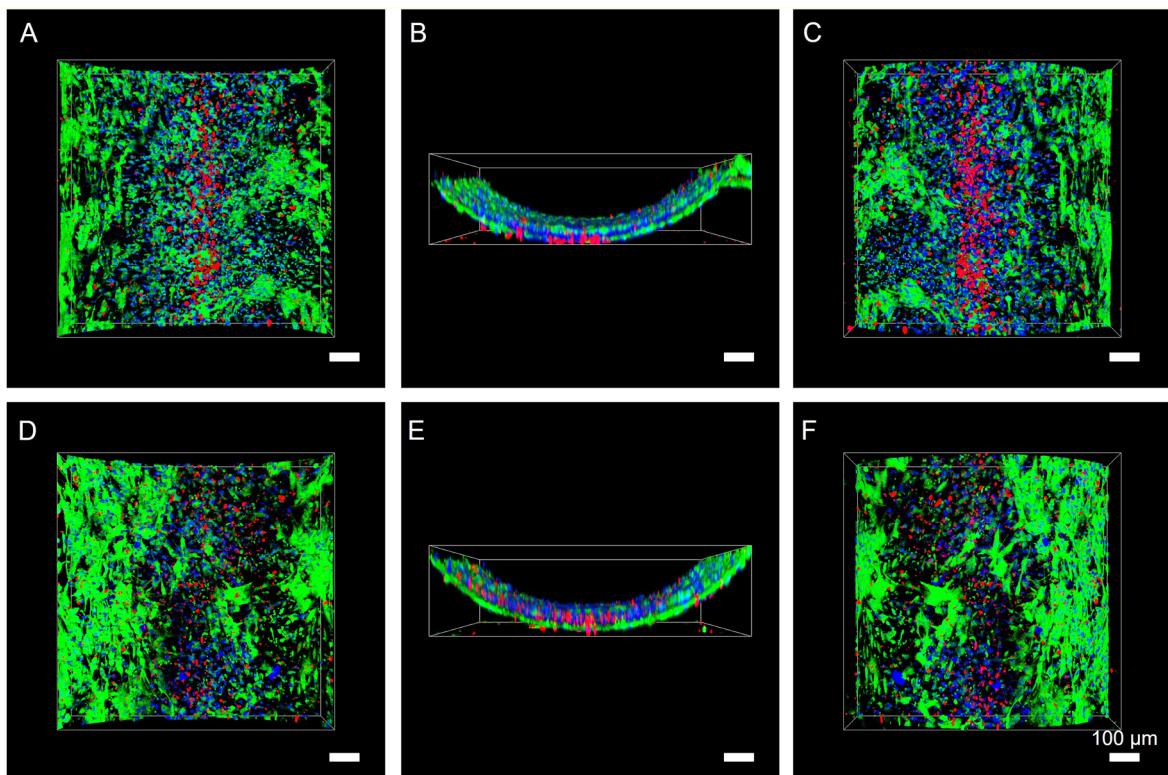


Abbildung 67 Lebend/Tot-Färbung der BBB im vasQchip nach 7 Tagen fluidischer Kultivierung. Je $5 \cdot 10^5$ HBVP und HA wurden nacheinander in das mit Kollagen I beschichtete ($0,6 \text{ mg/ml}$) umgebende Kompartiment ausgesetzt. Die Besiedlung des Mikrokanals (Kollagen I, 1 mg/ml , $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) erfolgte anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3. Die Ko-Kultur wurde für insgesamt sieben Tage mit einer Flussrate von $500 \mu\text{l}/\text{h}$ (PeRISYSY-S, Cetoni) unter Standardbedingungen kultiviert, wobei das Medium nach 72 h vom hCMEC/D3-Kultivierungsmedium auf eine Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium umgestellt wurde. Die Steigerung der Flussrate erfolgte nach dem in Kapitel 4.1.4.3 etablierten Programm. Anschließend wurde der vasQchip von der Fluidik getrennt und Kanal sowie umgebendes Kompartiment mit Calcein-AM (lebende Zellen, grün) und PI (nekrotische Zellen, rot) gefärbt. Die Zellkerne der hCMEC/D3 im Mikrokanal wurden zudem mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=85$, Abstand= $3 \mu\text{m}$, $h=252 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Dargestellt sind die 3D-Projektionen des Mikrokanals von oben (A, D), seitlich (B, E) und von unten (C, F) von zwei unabhängigen vasQchips. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

4.2.4.3 Nachweis zellspezifischer Marker

Um die verschiedenen Zelltypen der Ko-Kultur zu visualisieren und damit zu überprüfen, ob eine Ko-Kultivierung aller drei Zelltypen unter Ausbildung zellspezifischer Marker im vasQchip möglich ist, wurde eine Immunofluoreszenzfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in den vasQchip eingebracht und für sieben Tage mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{h}$ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, die Zellkerne mit Hoechst33342 und die zellspezifischen Marker CD31 (hCMEC/D3, Abbildung 68 (E, I)), α -SMA (HBVP, Abbildung 68 (F, J)) und GFAP (engl. *Glial fibrillary acidic protein*,

Ergebnisse

HA, Abbildung 68 (G, K) durch Antikörper-Bindung gefärbt. Durch die konfokale Aufnahme eines Z-Stacks mit einer Höhe von 340 µm und die anschließende Überlagerung zum 3D-Bild (Abbildung 68 (A-C)) konnte der gesamte Mikrokanal visualisiert werden.

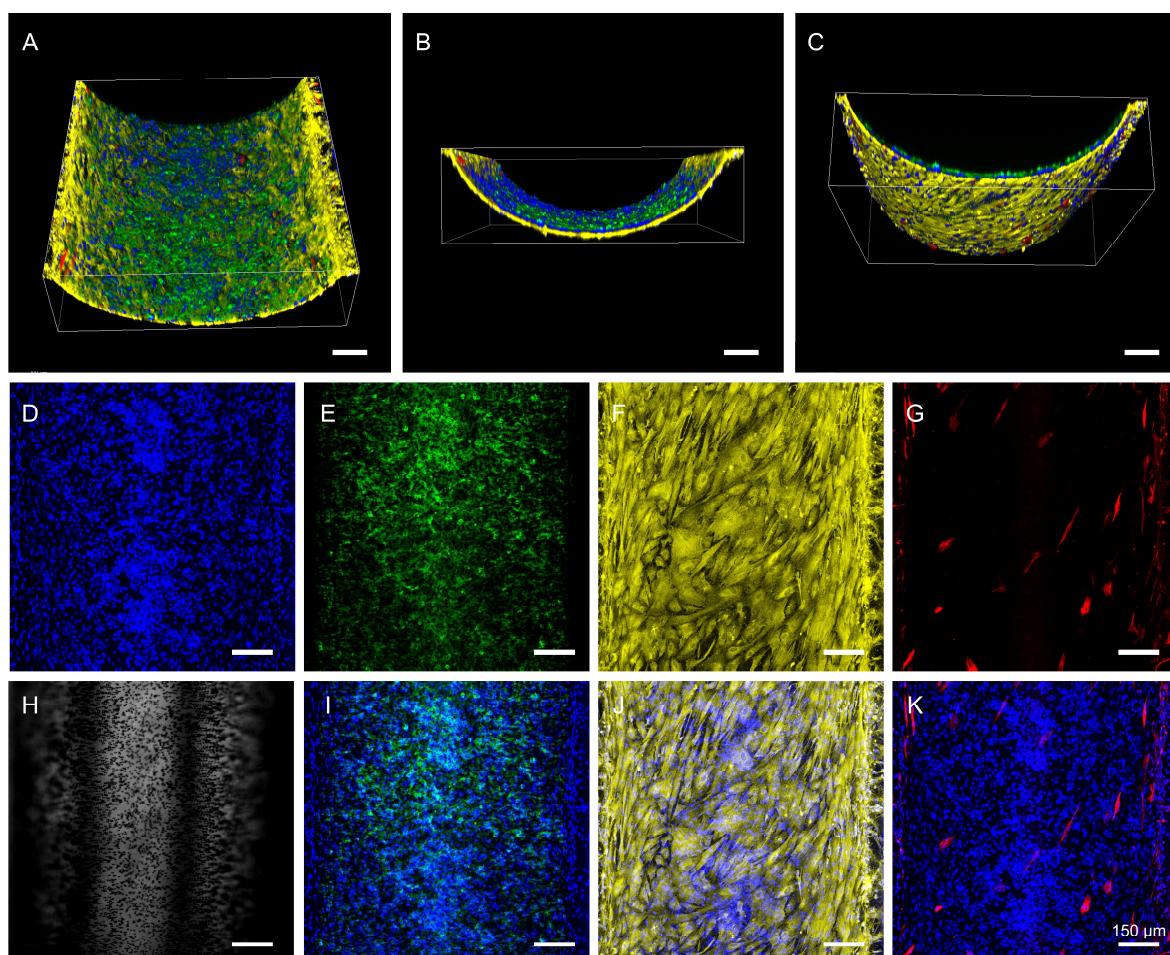


Abbildung 68 Nachweis zellspezifischer Strukturen der Ko-Kultur aus hCMEC/D3, HBVP und HA im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment eingebracht und über nach um 180° gedreht inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA auf die ausgebildete Perizytenschicht und eine erneute Inkubation um 180° gedreht über Nacht. Die Einbringung der hCMEC/D3 ($7,5 \cdot 10^4$) in den mit Kollagen I beschichteten Kanal (0,1 mg/ml, 1 µg/cm²) erfolgte am dritten Tag. Die Ko-Kultur wurde für sieben Tag mit einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert, wobei das Medium nach 48 h vom hCMEC/D3-Kultivierungsmedium auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium umgestellt wurde, ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment erfolgte alle 2-3 Tage. Zur Visualisierung spezifischer Zellstrukturen wurden die Zellen mit PFA fixiert, die Zellmembran permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Zellkerne wurden zudem mit Hoechst33342 gefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (n=228, Abstand=1,5 µm, h=340 µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die Einzelbilder wurden anschließend zum 3D-Bild (A-C) bzw. zu einem Maximalbild (D-G) überlagert. Blau: Zellkerne aller Zellen (D), Grün: CD31 der hCMEC/D3 (E), Gelb: α-SMA der HBVP (F), Rot: GFAP der HA (G). (H) Brightfield, (I-K) Überlagerung der einzelnen Strukturen mit Hoechst. Maßstab: 150 µm.

Durch die seitliche Darstellung des Mikrokanals (Teilabbildung B und C) sind deutlich die zwei durch die Membran getrennten Zellschichten aus hCMEC/D3 im Mikrokanal sowie HBVP und HA auf der Rückseite des Mikrokanals zu erkennen. Die Visualisierung der spezifischen Zellstrukturen bestätigte die erfolgreiche Kultivierung aller drei Zelltypen im vasQchip unter Ausbildung spezifischer Marker. Die Färbung der HA zeigte eine sehr geringe Anzahl an Zellen, vor allem im Vergleich zu den HBVP. Dies ist darauf zurückzuführen, dass GFAP, ein Intermediärfilament im

Cytoplasma von Gliazellen, hauptsächlich in reaktiven Astrozyten, die auf ZNS-Verletzungen reagieren, exprimiert wird. In gesundem Gewebe ist GFAP immunhistochemisch meist nur schwach oder gar nicht nachweisbar.^[185] Durch eine 2D-Kontrolle einer Astrozyten-Kultur konnte dies bestätigt werden (Abbildung 69). Dennoch gilt GFAP als Astrozytenmarker und wird entsprechend für deren Identifikation eingesetzt.

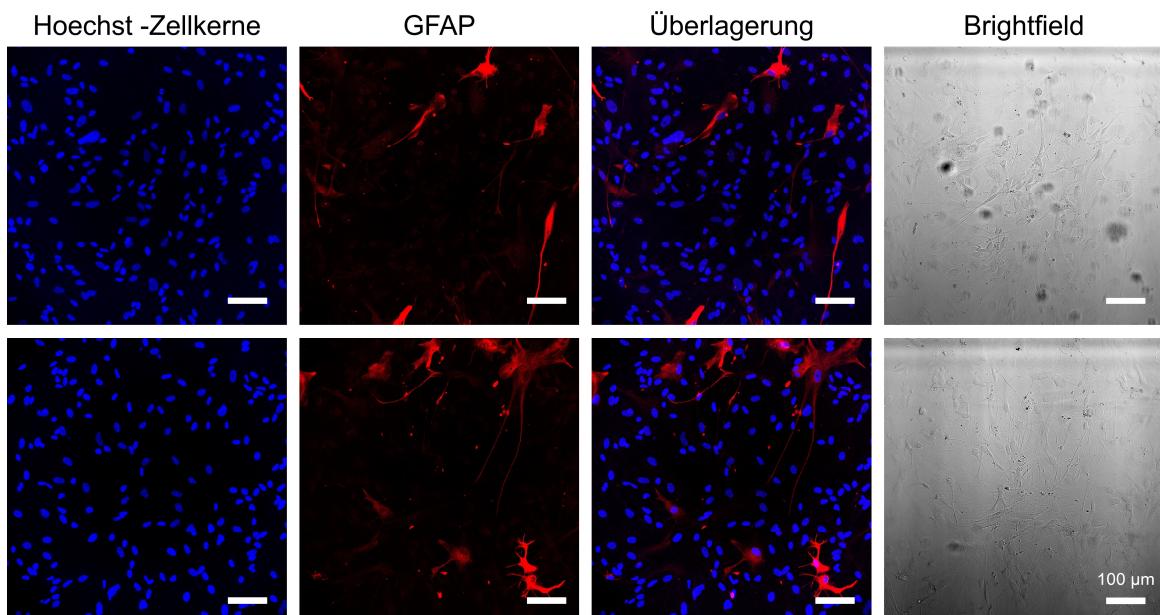


Abbildung 69 GFAP-Expression in HA. $2 \cdot 10^4$ HA wurden in die Wells eines 8 Well μ -Slides ausgesät und vier Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit PFA fixiert, die Zellmembran mit Triton-X-100 permeabilisiert und GFAP durch Immunfluoreszenzfärbung (rot) angefärbt. Die Zellkerne (blau) wurden mit Hoechst33342 angefärbt, die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: 100 μ m.

Abbildung 70 zeigt nochmals die Visualisierung von CD31 in hCMEC/D3 im Ko-Kultur-Modell im vasQchip. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen den Kanal lückenlos auskleideten und ein dichtes Netzwerk aus *Tight Junctions* ausbildeten. Die Verteilung von CD31 zeigte sich typischerweise zwischen benachbarten Zellen.

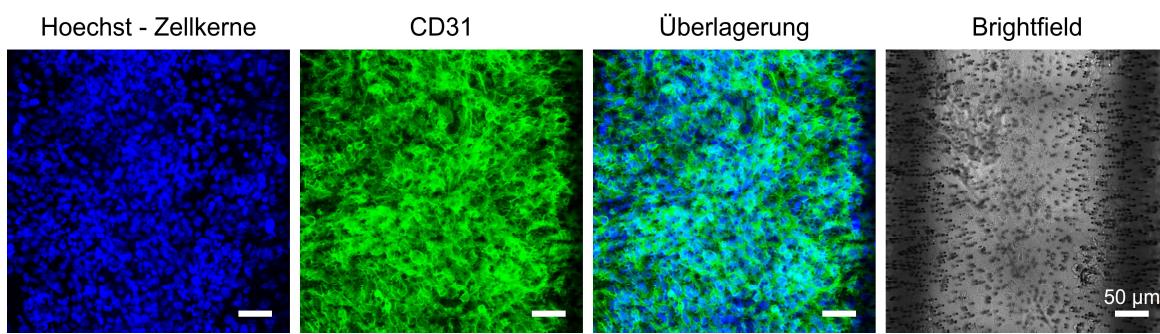


Abbildung 70 CD31-Expression in hCMEC/D3 im Ko-Kultur-Modell im vasQchip. Je $5 \cdot 10^5$ HBVP und HA wurden in das umgebende Kompartiment (0,6 mg/ml Kollagen I) eingebracht. Die Besiedlung des Mikrokanals (0,1 mg/ml Kollagen I, 1 μ g/cm²) erfolgte mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3. Die Ko-Kultur wurde für sieben Tage unter Standardbedingungen mit einer Flussrate von 100 μ l/h kultiviert, wobei das hCMEC/D3-Kultivierungsmedium nach 48 h durch Differenzierungsmedium ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, und die Zellmembran permeabilisiert. Zur Visualisierung von CD31 (grün) wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (blau) angefärbt. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (n=79, Abstand=0,5 μ m, h=39 μ m, Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: 50 μ m.

4.2.4.4 Einfluss von Perizyten und Astrozyten auf die Expression spezifischer Marker

Die besondere Barrierefunktion der BBB ist auf einige Besonderheiten des Hirnendothels, wie ein dichtes Netzwerk von *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* sowie der Expression spezifischer Effluxpumpen zurückzuführen. Dennoch ist schon lange bekannt, dass auch die umgebenden Zellen einen großen Einfluss auf die Barriereintegrität haben. Dies konnte durch zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Studien belegt werden. So konnten Bell *et al.* beispielsweise zeigen, dass ein Knockout von *Pdgfrβ* in Perizyten, einem wichtigen Rezeptor für die Interaktion mit Endothelzellen, zu einer reduzierten Expression von *Tight Junction*-Proteinen führte. Dies wiederum resultierte in einer Funktionsstörung der BBB.^[105] Auch der Einfluss von Astrozyten auf die Funktion der BBB ist hinreichend untersucht und durch zahlreiche Studien belegt. So konnte gezeigt werden, dass Astrozyten Moleküle sekretieren, die zur Aufrechterhaltung der Barriereintegrität beitragen.^[110] Verschiedene Modelle, die Endothelzellen zusammen mit Astrozyten oder Astrozyten-Faktoren kultivierten, zeigten Hochregulationen in *Tight Junction*-Proteinen, Transportern sowie eine verstärkte Dichtigkeit der Barriere.^[124,186–190]

Um den Einfluss von Perizyten und Astrozyten im vasQchip auf die im Mikrokanal kultivierten hCMEC/D3 zu untersuchen, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Dabei wurde die Genexpression verschiedener *Tight* und *Adherens Junctions* sowie Effluxpumpen der reinen Endothelzellschicht im Kanal mit dem Ko-Kultur-Modell aus hCMEC/D3, HBVP und HA verglichen. Dazu wurden die vasQchips entsprechend besiedelt und für sieben Tage bei einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Nach 48 h erfolgte die Umstellung des Mediums auf das hCMEC/D3-Differenzierungsmedium. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 71 dargestellt. Die RNA-Expression der reinen Endothelzellschicht wurde dabei auf 1 gesetzt, die Expression im Ko-Kultur-Modell wurde im Vergleich dazu aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Ko-Kultur mit HBVP und HA zu einer leichten Hochregulierung der RNA-Level von Claudin-5 ($1,469 \pm 0,131$), Occludin ($1,441 \pm 0,516$), ZO-1 ($1,596 \pm 0,717$), BCRP ($1,725 \pm 0,623$) und P-gp ($1,157 \pm 0,126$) führte. Die stärkste Hochregulation konnte für VE-Cadherin mit $3,194 \pm 1,991$ gezeigt werden. Lediglich für CD31 war die Genexpression im Ko-Kultur-Modell schwächer als im reinen Endothel ($0,932 \pm 0,258$). Der in der Literatur beschriebene positive Effekt der umliegenden Zellen auf die Barriere konnte damit bestätigt werden. Ein Vergleich mit *in vivo* Bedingungen kann an dieser Stelle jedoch nicht gezogen werden, da es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine relative Quantifizierung zweier Bedingungen handelt.

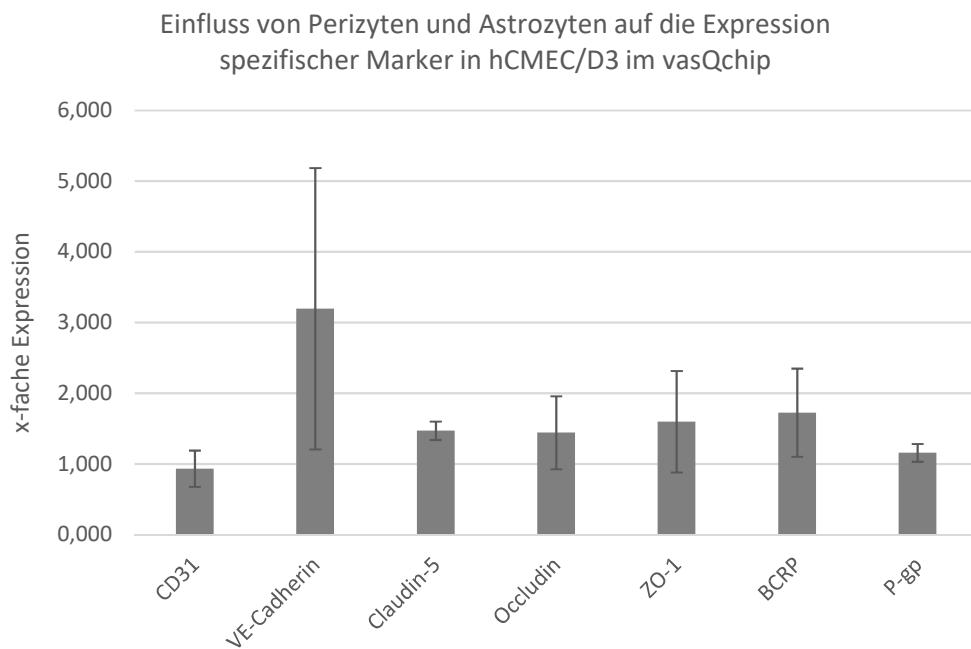


Abbildung 71 Einfluss von Perizyten und Astrozyten auf die Expression spezifischer Marker in hCMEC/D3. Kollagen I beschichtete vasQchips (Mikrokanal: 0,1 mg/ml, umgebendes Kompartiment 0,6 mg/ml) wurden mit HBVP ($5 \cdot 10^5$), HA ($5 \cdot 10^4$) und hCMEC/D3 ($7,5 \cdot 10^4$) besiedelt und die Ko-Kultur für insgesamt sieben Tage mit einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Nach 48 h wurde auf das DM umgestellt. Durch TRIzol®-Isolation wurde die RNA isoliert und eine RT-qPCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode, indem die relative RNA-Expression auf die reine Endothelzellschicht (=1) normiert wurde. Als Referenzen diente GAPDH, Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden aus n=3 unabhängigen Proben berechnet.

4.2.4.5 Funktionalitätstest - Transporterassay

Nachdem in Kapitel 4.2.4.4 der Einfluss der Perizyten und Astrozyten auf die Genexpression wichtiger *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und Effluxpumpen durch molekularbiologische Methoden untersucht wurde und dadurch gezeigt werden konnte, dass die umliegenden Zellen einen positiven Einfluss auf die Expression haben, sollte im nächsten Schritt die Funktionalität der BBB untersucht werden. Häufig wird hierzu die Barrieredichtigkeit durch Permeabilitäts- oder TEER-Messungen bestimmt. Wie bereits in Kapitel 4.1.4.2 erwähnt, gestaltet sich eine Integration von Elektroden in den vasQchip als schwierig, weshalb zur Überprüfung der Barrieredichtigkeit des Endothels ein Permeabilitätstest mit LY durchgeführt wurde. Für eine Untersuchung der Permeabilität im BBB-Modell müsste jedoch beachtet werden, dass die umgebenden Zellen neben dem positiven Effekt auf die Barrierefähigkeit des Endothels ebenfalls eine physische Barriere für den Stoffdurchtritt darstellen. Eine direkte Vergleichbarkeit des reinen Endothelmodells mit dem BBB-Modell wäre damit nicht gegeben und eine Aussage über den Einfluss von Perizyten und Astrozyten auf die Barrieredichtigkeit kann damit nicht getroffen werden. Auch der Vergleich verschiedener Modellsysteme untereinander ist limitiert. Die Untersuchung der Funktionalität erfolgte in dieser Arbeit daher durch einen Transporterassay der Effluxpumpe P-gp. Dabei wird die Funktionalität durch die Inkubation mit spezifischen Zielsubstraten untersucht. Normalerweise werden ins Gehirn eingedrungene Xenobiotika durch die Aktivität von Effluxpumpen zurück ins Blutgefäßlumen transportiert, weshalb diese Pumpen neben den *Tight Junctions* eine sehr wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gehirn-Homöostase spielen. Durch eine gezielte Inhibierung der Pumpen kann jedoch eine Anreicherung von Zielsubstrat in den Zellen erreicht werden. Aus diesem

Ergebnisse

Grund stehen Effluxpumpen auch bei der Entwicklung von Arzneimitteln sehr im Interesse der Forschung. Durch die gezielte Inhibition kann eine Anreicherung von Wirkstoff im Gehirn erzielt werden. Die Untersuchung einer solchen Funktionalität ist also vor allem in Hinblick auf die Etablierung eines Modells zur Wirkstoffuntersuchung wichtig.

Für die Untersuchung der Funktionalität kann durch die Verwendung fluoreszierender Substanzen eine Auswertung über mikroskopische Verfahren oder Fluoreszenzmessungen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung von P-gp das Substrat Calcein-AM eingesetzt, als Inhibitor diente Verapamil (Abbildung 72).

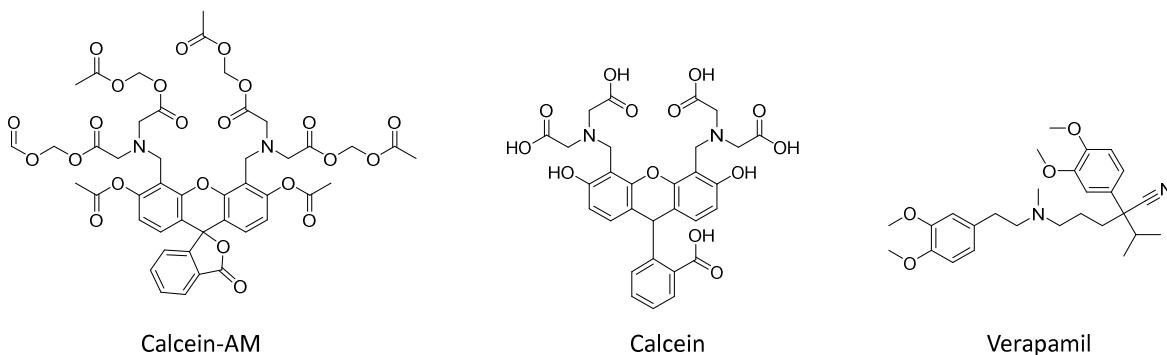


Abbildung 72 Strukturformeln von Calcein-AM, Calcein und Verapamil. Calcein-AM als farbloses Substrat von P-gp kann die Zellmembran ungehindert passieren. Bei einer Inhibition von P-gp mit Verapamil kommt es im Zytosol zur Umsetzung von Calcein-AM zum fluoreszierenden Farbstoff Calcein.

Wie bereits in Kapitel 4.1.4.1 erläutert, kann Calcein-AM die Zellmembran lebender Zellen durch passive Diffusion ungehindert passieren. Im Zellinneren wird das nicht-fluoreszierende Molekül dann durch die Aktivität von Esterasen zum fluoreszierenden Calcein gespalten. Dieses kann die Zellmembran nicht mehr passieren. Aufgrund der Aktivität von P-gp kann Calcein-AM jedoch auch gegen ein Konzentrationsgefälle aus den Zellen zurück ins Lumen transportiert werden, bevor eine Spaltung stattfinden kann. Durch die Inhibierung mit Verapamil wird der Rücktransport blockiert und eine Anreicherung von Calcein kann im Zytosol erfolgen, wodurch eine Steigerung des Fluoreszenzsignals zu beobachten ist. Das Funktionsprinzip des Transporterassays ist in Abbildung 73 schematisch dargestellt.

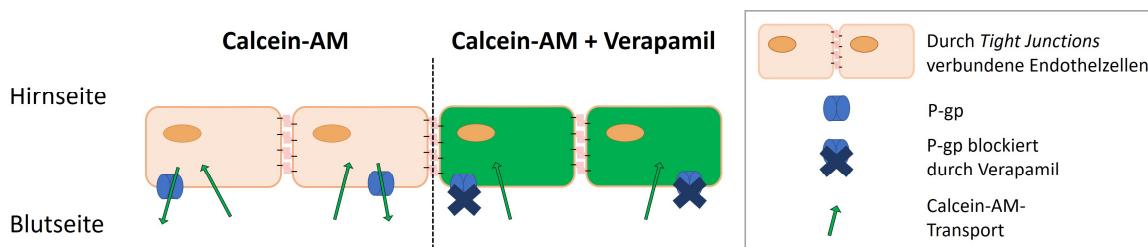


Abbildung 73 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des P-gp-Transporterassays. Auf der linken Seite ist die Inkubation mit dem Substrat Calcein-AM dargestellt. Dieses kann die Zellmembran ungehindert passieren, wird jedoch durch die Efflux-Aktivität zurück ins Blutlumen gepumpt. Rechts ist die Inkubation bei gleichzeitiger Inhibierung der Effluxpumpen mit Verapamil gezeigt. Das Substrat kann die Zellmembran weiterhin ungehindert passieren. Durch Blockierung der Effluxpumpe P-gp kann jedoch kein Rücktransport stattfinden, weshalb es zu einer Anreicherung im Zytosol kommt. Das farblose Calcein-AM wird im Zellinneren durch Esterase-Aktivität zum fluoreszierenden Calcein umgewandelt.

Zunächst wurde statisch eine Konzentrationsanpassung für den P-gp-Assay durchgeführt. Es sollte dadurch ein Konzentrationsbereich gefunden werden, in dem eine maximale Steigerung der

Fluoreszenz beobachtet werden kann. Dies war notwendig, da Calcein-AM zwar durch P-gp-Aktivität aus dem Zellinneren geschleust wird, es aber dennoch auch ohne Inhibierung zu einer Akkumulation im Zellinneren kommen kann. Da Calcein-AM nach der Spaltung durch Esterasen in Calcein die Zellmembran nicht mehr passieren kann, kann es bei einer zu hohen Konzentration zur Übersättigung der Effluxpumpen kommen, so dass der Influx und die Spaltung des Substrats schneller ablaufen als der Efflux. Dies wurde zum Beispiel in Kapitel 4.1.4 sowie 4.2.4.2 ausgenutzt, um Calcein-AM als Substrat zum Nachweis der Viabilität einzusetzen.

Es wurden drei verschiedene Konzentrationen untersucht. Dazu wurde eine statisch kultivierte hCMEC/D3-Kultur zunächst entweder für 30 min mit dem Inhibitor Verapamil (100 µg/ml) behandelt oder blieb als Kontrolle unbehandelt. Anschließend wurde zu den vorinkubierten Zellen eine Mischung aus Verapamil (100 µg/ml) und Calcein-AM (0,5 µg/ml, 1 µg/ml oder 4 µg/ml) gegeben, die un behandelten Zellen wurden nur mit dem Substrat Calcein-AM behandelt. Nach einer Inkubation von 30 min wurden die Zellen gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Exemplarisch ist dies in Abbildung 74 für je eine Probe gezeigt. Die Steigerung des Fluoreszenzsignals wurde mit Hilfe der Software ImageJ durch RGB-Analyse ermittelt. Hierfür wurde jeweils der mittlere Intensitätswert des Grünanteils über die gesamte Bildfläche bestimmt und zwischen inhibierten und nicht-inhibierten Proben verglichen, wobei jeweils der Mittelwert aus zwei unabhängigen Proben gebildet wurde. Die größte Fluoreszenzsteigerung relativ zur jeweiligen nicht inhibierten Kontrollprobe konnte dabei für eine Konzentration von 1 µg/ml Calcein-AM ermittelt werden. Im Vergleich zur nicht-inhibierten Probe konnte ein 2,64-fach stärkeres Fluoreszenzsignal detektiert werden, während bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml eine Steigerung von 2,18 ermittelt wurde. Bei einer Konzentration von 4 µg/ml war ohne Inhibierung bereits ein sehr starken Fluoreszenzsignal detektierbar und durch die Inhibition kaum noch eine Steigerung zu beobachten. Die Analyse mit ImageJ ergab hierfür ein 1,35-fach stärkeres Signal.

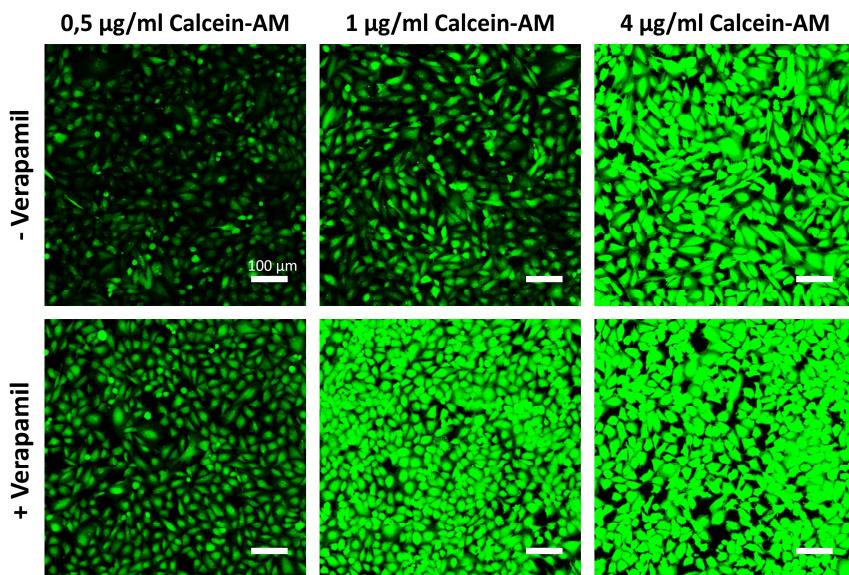


Abbildung 74 Konzentrationsanpassung des Substrats Calcein-AM für einen P-gp-Transporterassay. $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in die Wells eines 8-Well-µ-Slides ausgesät und für drei Tage kultiviert. Anschließend erfolgte ein P-gp-Assay mit Verapamil (100 µg/ml) und Calcein-AM (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 4 µg/ml) und eine anschließende fluoreszenzmikroskopische Auswertung (Leica TCS SPE DMI4000B, Laser 488 3 %). Maßstab: 100 µm.

Da die Versuche zur Effluxpumpenaktivität normalerweise unter statischen Bedingungen im Well-Plate-Format durchgeführt werden, musste im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine

Ergebnisse

Übertragbarkeit auf den Chip möglich und eine quantitative Fluoreszenzmessung realisierbar ist. Typischerweise erfolgen Untersuchungen der Effluxpumpenaktivität durch Lyse der Zellen im Well und anschließender Fluoreszenzmessung. Da eine Messung im Chip direkt jedoch nicht möglich ist und die Messung im Plattenformat erfolgen musste, wurde zunächst statisch untersucht, ob eine Trypsinierung der Zellen mit anschließender Zellyse möglich ist. So könnten die Zellen aus dem Kanal herausgelöst und anschließend durch Fluoreszenzmessung untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen statisch kultiviert und zur Durchführung des Assays wie oben beschrieben mit Verapamil (100 µg/ml) und Calcein-AM (1 µg/ml) bzw. nur mit Calcein-AM behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 10 min mit Trypsin (0,25 %) behandelt und schließlich durch die Zugabe von Triton-X-100 (10 %) lysiert. Die Suspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, durchmischt, und eine Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$) in einer 96-Well-Platte durchgeführt. In zwei unabhängigen Versuchen mit je vier Proben wurden dabei Fluoreszenzsteigerungen von 1,70 bzw. 1,77 ermittelt. Eine Reproduzierbarkeit des Versuchs konnte somit nachgewiesen werden und wurde für die anschließende Untersuchung der Transporteraktivität im vasQchip angewendet.

Für die Untersuchung der Effluxpumpe P-gp im vasQchip wurde die BBB wie unter 4.2.4 beschrieben vorbereitet und für sieben Tage bei einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Anschließend wurden die Chips von der Fluidik getrennt und wie oben beschrieben mit Inhibitor und Substrat statisch behandelt. Die Lösung wurde hierzu in den Mikrokanal pipettiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Chips gewaschen, mit Trypsin behandelt, die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von Triton-X-100 lysiert und eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurde das gemessene Fluoreszenzsignal auf die Zellzahl normiert. Dieser Schritt wurde für die Untersuchung im fluidischen System ergänzt, um mögliche Unterschiede in der Fluoreszenz durch unterschiedliche Zellzahlen zu minimieren. Prinzipiell werden zu Beginn des Versuchs zwar gleiche Zellzahlen ausgesät, anders als bei einer einfachen statischen 2D-Kultivierung können sich durch die Komplexität des Systems dennoch Unterschiede ergeben. Für die Fluoreszenzmessung wurden diese Unterschiede zu verfälschten Ergebnissen führen. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in Abbildung 75 gezeigt.

Nach der Normierung konnte eine Steigerung des Fluoreszenzsignals von 1,29 durch die Inhibition bestimmt werden. Da nur eine sehr geringe Fluoreszenzsteigerung ermittelt werden konnte und es sich hierbei zudem um lediglich je zwei Proben pro Bedingung handelt, die sehr starke Varianzen untereinander aufwiesen, müsste der Versuch für eine zuverlässige Aussage über die Efflux-Aktivität im vasQchip in einem größeren Probenumfang wiederholt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht weiter untersucht.

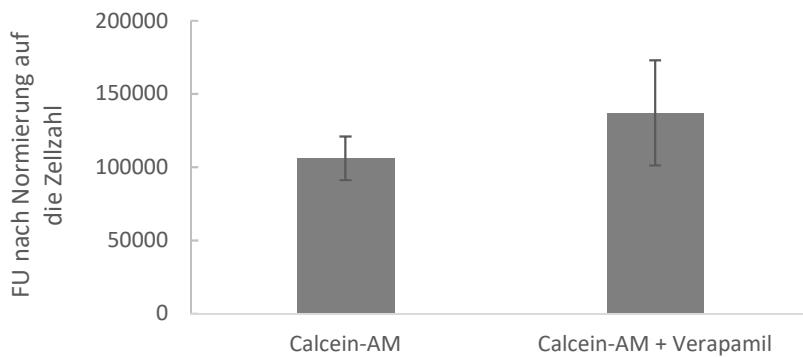


Abbildung 75 Fluoreszenzsteigerung des Calcein-AM-Signals nach Inhibierung der P-gp-Pumpe durch Verapamil im vasQchip. Die BBB wurde nach 4.2.4 vorbereitet und für sieben Tage mit einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Anschließend erfolgte die Durchführung des Transporterassays mit Verapamil (100 µg/ml) und Calcein-AM (1 µg/ml). Die Zellen wurden zur Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$) mit Trypsin (0,25 %) aus dem Mikrokanal gelöst und mit Triton-X-100 lysiert. n = 2.

4.3. Hydrogele als EZM-imitierende Substanz

Der Aufbau des vasQchips bietet durch das untere Kompartiment die Möglichkeit einer dreidimensionalen Kultivierung von Zellen. Durch eine einfache Kultivierung organotypischer Zellen auf der Rückseite der PC-Membran bleibt es jedoch bei einer überwiegend zweidimensionalen Kultur. Für die Generierung einer *in vivo*-ähnlichen Situation der NVU war es daher erforderlich eine Dreidimensionalität zu schaffen. Durch den Einsatz einer geeigneten Gelmatrix, die die Eigenschaften der natürlichen EZM in der Struktur und Festigkeit nachahmt, kann so ein Wachstum der Zellen durch unterschiedliche Ebenen hindurch und somit eine dreidimensionale Netzwerkbildung ermöglicht werden. Hierfür wurde zum einen das natürliche Hydrogel Kollagen I sowie die zwei semi-synthetischen Hydrogele GelMA (Gelatine-Methacryloyl) und GeINB/GelS (Norbornen- bzw. Thiol-funktionalisierte Gelatine) getestet. Untersucht wurden dabei die Biokompatibilität und die Ausrichtung der Zellen am Beispiel humaner Astrozyten. Obwohl eine spätere Einbringung von Neuronen geplant war, konnte eine umfassende Untersuchung der geeigneten Gelbedingungen aus Kosteneffizienzgründen nicht mit Neuronen durchgeführt werden. Da Astrozyten jedoch innerhalb der NVU das Bindeglied zwischen den Neuronen und den Endothelzellen darstellen und mit den Neuronen zusammen in großen Netzwerken organisiert in der EZM vorliegen, eigneten sich diese für Voruntersuchungen. Alle weiterführenden Versuche wurden daher auf Grundlage der durch Astrozytenuntersuchungen gewonnenen Daten durchgeführt.

Die Zellen wurden dazu statisch in eine Hydrogelmatrix eingebracht und über einen Zeitraum von 7 bis 14 Tagen mikroskopisch verfolgt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte dabei eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI zur Beurteilung der Viabilität und Netzwerkbildung.

4.3.1. Kollagen

Kollagene sind eine natürlich vorkommende Gruppe von Strukturproteinen, die Bestandteile der EZM sind und sich durch ihre intrinsische Biokompatibilität gut als Matrix zur Zellkultivierung eignen.

4.3.1.1 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel

Zur Kultivierung humaner Astrozyten im Kollagenhydrogel wurden zwei verschiedene Zellzahlen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml sowie $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) sowie zwei unterschiedliche Kollagenkonzentrationen (1 mg/ml und 2 mg/ml) untersucht, die Kultivierung erfolgte in je 200 µl Gelmatrix in 8-Well-µ-Slides. Hierfür wurde Kollagen I (rat tail) verwendet. Die Vernetzung zum Hydrogel erfolgte durch das Einstellen eines neutralen pH-Werts und die Erwärmung auf 37 °C für 30 min. Anschließend wurden die so hergestellten Kollagenhydrogele mit zellkulturspezifischem Medium überschichtet. Nach 1 h, 1 Tag sowie 7 Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI durchgeführt, um die Zellausrichtung und die Viabilität der Zellen im Gel zu untersuchen. Die so gefärbten Zellen wurden durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Die einzelnen, 300 µm hohen Stacks wurden anschließend zum 3D-Bild überlagert. Um die Verteilung der Zellen im Gel besser zu visualisieren, wurden zudem Tiefenfärbungen erstellt, welche die Lage der Zellen in der Z-Ebene durch eine Farbcodierung darstellen. (Abbildung 76 - Abbildung 79).

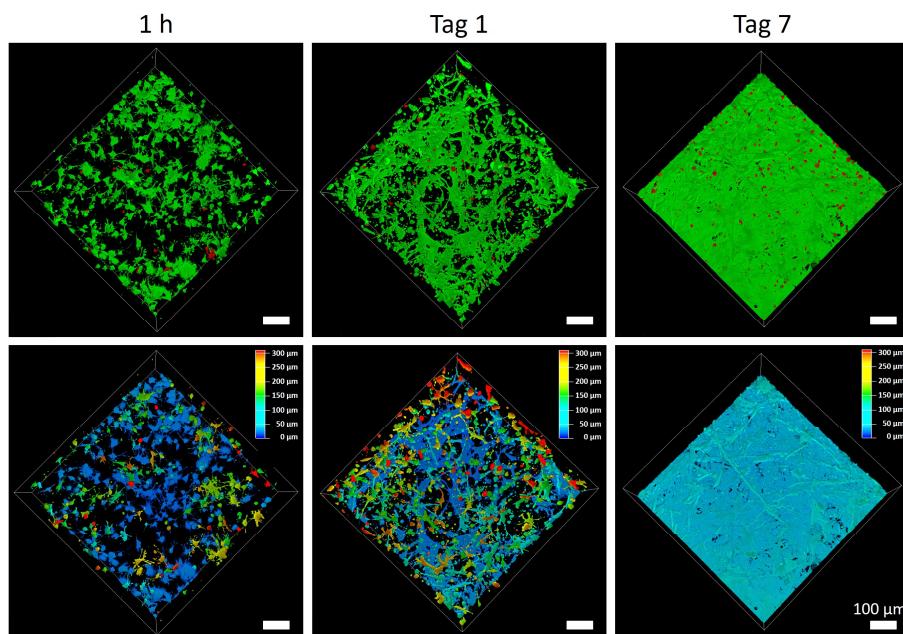


Abbildung 76 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) im Kollagen I-Hydrogel (1 mg/ml). $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden im 1 mg/ml Kollagenhydrogel eingekapselt und über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Jeweils 1 h, 1 Tag und 7 Tage nach Einbringen der Zellen in die Gele wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks (n=60, Abstand=5 µm, h=300 µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Oben: Lebend/Tot-Färbung, unten: korrespondierende Tiefenfärbung Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

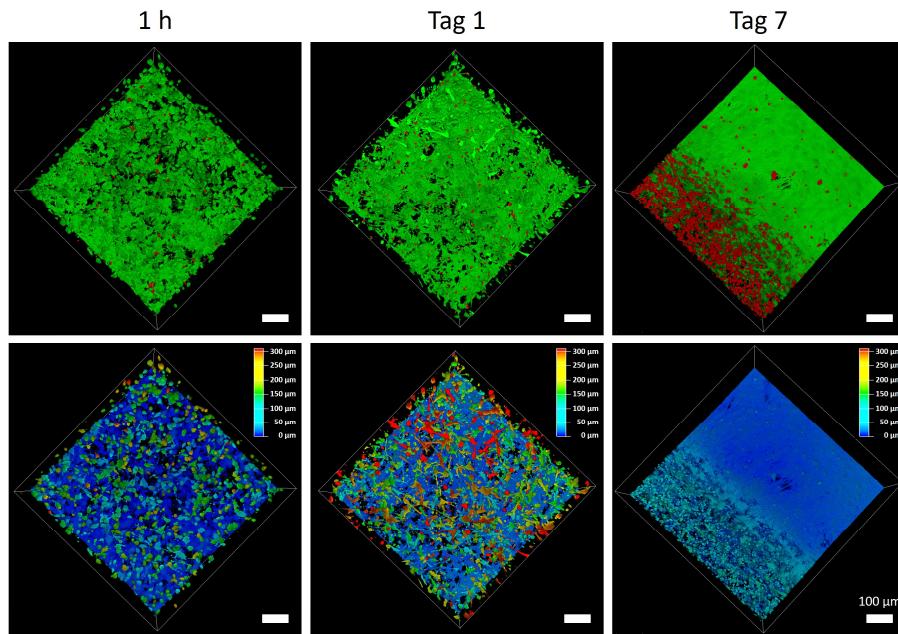


Abbildung 77 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) im Kollagen I-Hydrogel (1 mg/ml). $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden im 1 mg/ml Kollagenhydrogel eingekapselt und über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Jeweils 1 h, 1 Tag und 7 Tage nach der Einbringung der Zellen in die Gele wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks ($n=60$, Abstand=5 µm, $h=300$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung des Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Oben: Lebend/Tot-Färbung, unten: korrespondierende Tiefenfärbung Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

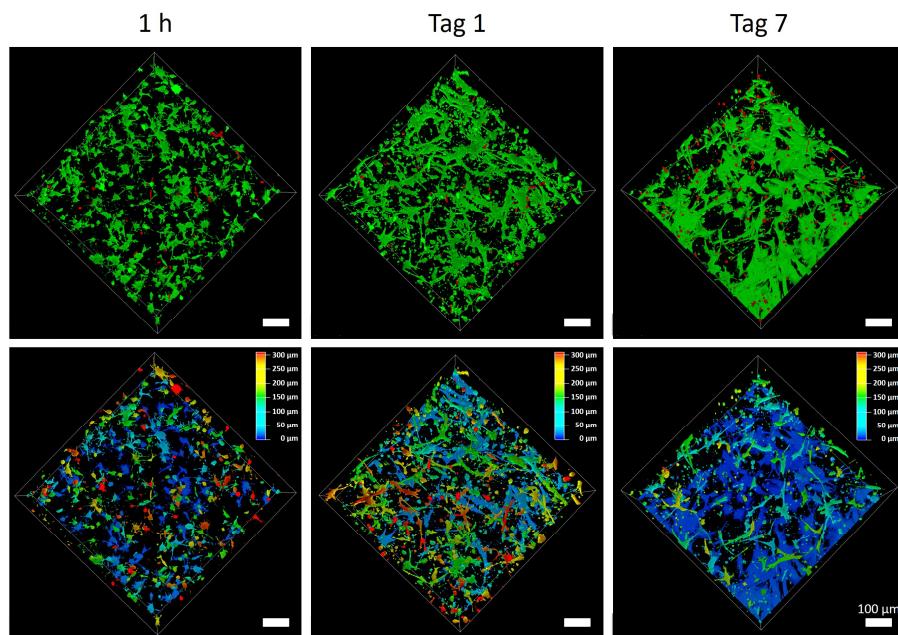


Abbildung 78 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) im Kollagen I-Hydrogel (2 mg/ml). $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden im 2 mg/ml Kollagenhydrogel eingekapselt und über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Jeweils 1 h, 1 Tag und 7 Tage nach Einbringen der Zellen in die Hydrogele wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks ($n=60$, Abstand=5 µm, $h=300$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung des Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Oben: Lebend/Tot-Färbung, unten: korrespondierende Tiefenfärbung Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

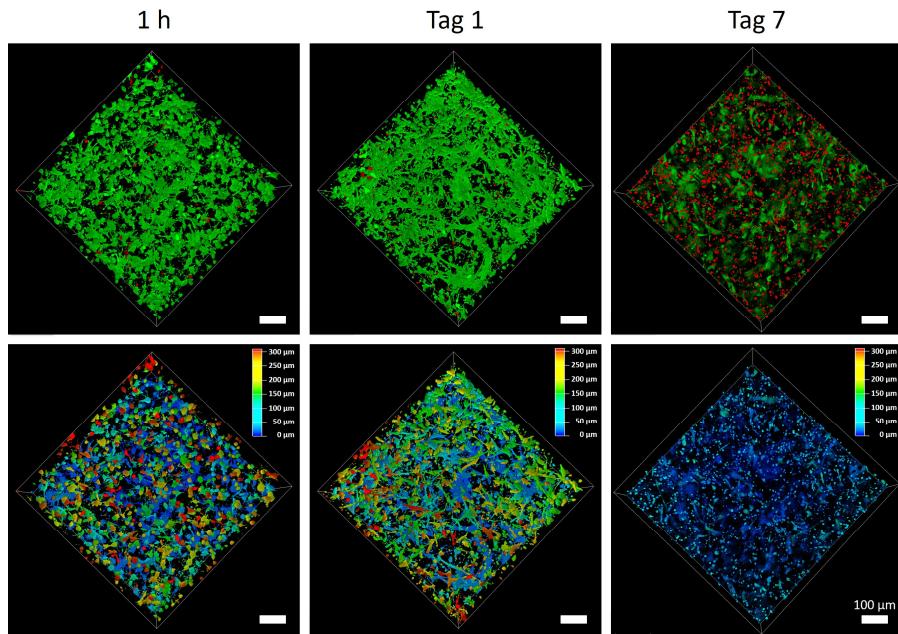


Abbildung 79 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) im Kollagen I-Hydrogel (2 mg/ml). $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden im 2 mg/ml Kollagenhydrogel eingekapselt und über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Jeweils 1 h, 1 Tag und 7 Tage nach der Einbringung der Zellen in die Hydrogele wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TSC SPE, Objektiv 10x/dry, Zoom 1,5) durch Aufnahme von Z-Stacks ($n=60$, Abstand=5 µm, $h=300$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Oben: Lebend/Tot-Färbung, unten: korrespondierende Tiefenfärbung. Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

Wie in Abbildung 76 - Abbildung 79 zu erkennen ist, fingen die Zellen bereits nach sehr kurzer Zeit an, sich im Gel auszurichten. Für alle untersuchten Bedingungen waren bereits eine Stunde nach der Herstellung der Gele typische, sternförmige Zellausläufer erkennbar. Durch die Calcein-AM/PI-Färbung konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zellen in den Gelen lebendig waren. Dies zeigte sich durch eine sehr geringe Anzahl an roten und somit nekrotischen Zellen, die wahrscheinlich bereits beim Einbringer der Zellen ins Gel tot waren. Eine negative Auswirkung durch den Herstellungsprozess der Gele konnte somit nicht festgestellt werden.

Durch die Tiefenkodierung der 300 µm hohen Aufnahmen zeigte sich zudem ein Absinken der Zellen auf den Boden des Wells. Dies lässt sich durch eine vergleichsweise langsame Vernetzungsreaktion erklären. Mit steigender Kollagenkonzentration wird dieser Prozess jedoch beschleunigt, so dass bei einer Konzentration von 2 mg/ml eine deutlich bessere Verteilung der Zellen über die gesamte gemessene Höhe beobachtet werden konnte.

Die Lebend/Tot-Färbung an Tag 1 zeigte eine gleichbleibende Anzahl toter Zellen, im Vergleich zur Färbung nach 1 h, es konnte jedoch eine weitere Ausrichtung der Zellen und die Bildung eines dichten Netzwerks durch unterschiedliche Ebenen hindurch festgestellt werden. Die Hydrogele nahmen jedoch bereits deutlich an Volumen ab und zogen sich vom Rand hin zusammen. Dieser Effekt nahm mit steigender Zellzahl und geringerer Kollagenkonzentration zu.

Nach einer Kultivierungsdauer von sieben Tagen wuchsen die Zellen planar auf dem Boden des Kultivierungsmaterials, was durch die Tiefenkodierung deutlich wird. Durch den Abbau der Gelmatrix und den damit verbundenen Verlust der Dreidimensionalität sanken die Zellen auf den Boden ab. Lediglich bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und einer Kollagenkonzentration von 2 mg/ml waren vereinzelt noch Zellen in unterschiedlichen Ebenen detektierbar, das Gel nahm hier

jedoch ebenfalls deutlich an Volumen ab, was in Abbildung 78 durch die Tiefenfärbung sowie in Abbildung 80 c erkennbar ist. Da der Boden des Kultivierungsmaterials lediglich eine geringe Wachstumsfläche von 1 cm^2 bietet, konnten nach sieben Tagen Kultivierung zudem vermehrt tote Zellen beobachtet werden, was vor allem bei einer Zellzahl von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml deutlich wurde.

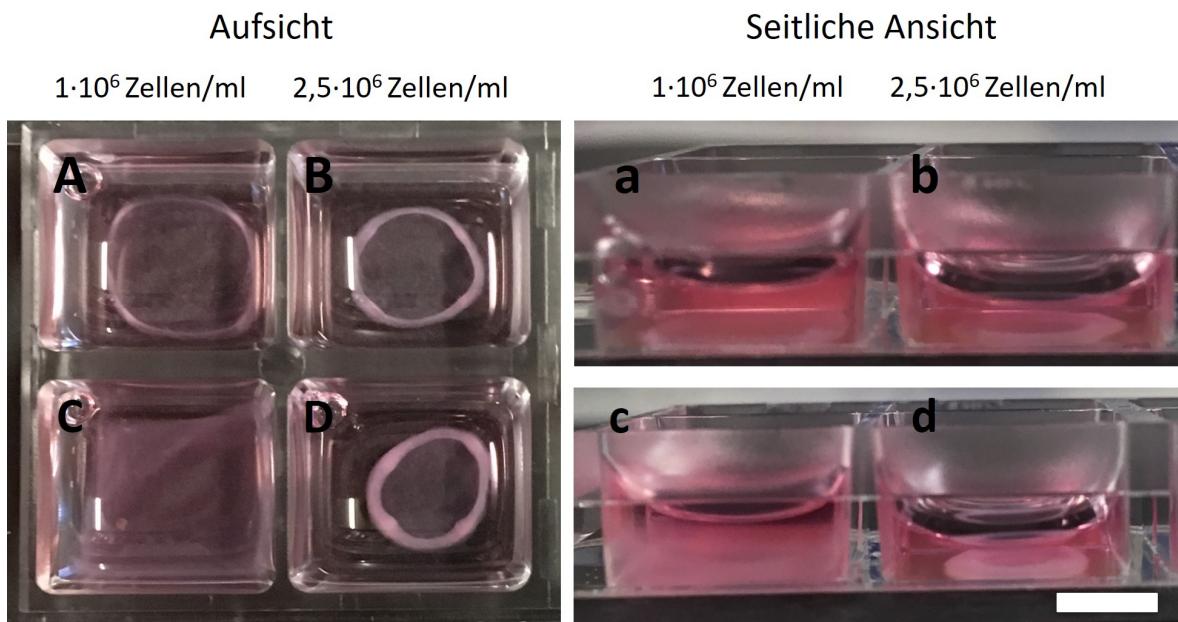


Abbildung 80 Kultivierung humaner Astrozyten im Kollagen I-Hydrogel. Fotografische Aufnahme der Kollagen-Gele an Tag 7. (A, a, B, b) 1 mg/ml Kollagen, (C, c, D, d) 2 mg/ml Kollagen. Maßstab = 0,5 cm

4.3.1.2 Untersuchung der Einwanderung humaner Astrozyten in die Gelmatrix

Ein zweiter Ansatz sollte zeigen, ob ein Wachstum planar ausgesäter Zellen in die Hydrogelmatrix möglich ist, da dies für die Anwendung in einem NVU-Modell sehr interessant wäre. Durch die Einkapselung der Zellen während des Polymerisationsprozesses kommt es zu einer zufälligen Verteilung innerhalb der Hydrogelmatrix. *In vivo* stehen Astrozyten jedoch auf der einen Seite mit ihren Endfüßchen in Kontakt zum Endothel und bilden über große Netzwerke auf der anderen Seite die Verbindung zu den Neuronen. Wäre ein Wachstum planar ausgesäter Zellen in die Matrix möglich, könnte so auf der einen Seite die Verknüpfung zur Endothelzellschicht und gleichzeitig die Bildung dreidimensionaler Netzwerke gewährleitet werden. Die Zellen wurden dazu zunächst zweidimensional kultiviert und anschließend mit dem Hydrogel überschichtet. Hierzu wurden Kollagengele mit einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. 2 mg/ml auf die planare Zellschicht aufgebracht, für 30 min vernetzt und mit zellspezifischem Medium überschichtet. Nach einem und sieben Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM und PI durchgeführt, um so neben der Viabilität der Zellen beurteilen zu können, ob eine Einwanderung in die Matrix erfolgte. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurden Z-Stack-Messungen durchgeführt. In Abbildung 81 (1 mg/ml Kollagen) und Abbildung 82 (2 mg/ml Kollagen) sind die zum 3D-Bild überlagerten Aufnahmen dargestellt.

Ergebnisse

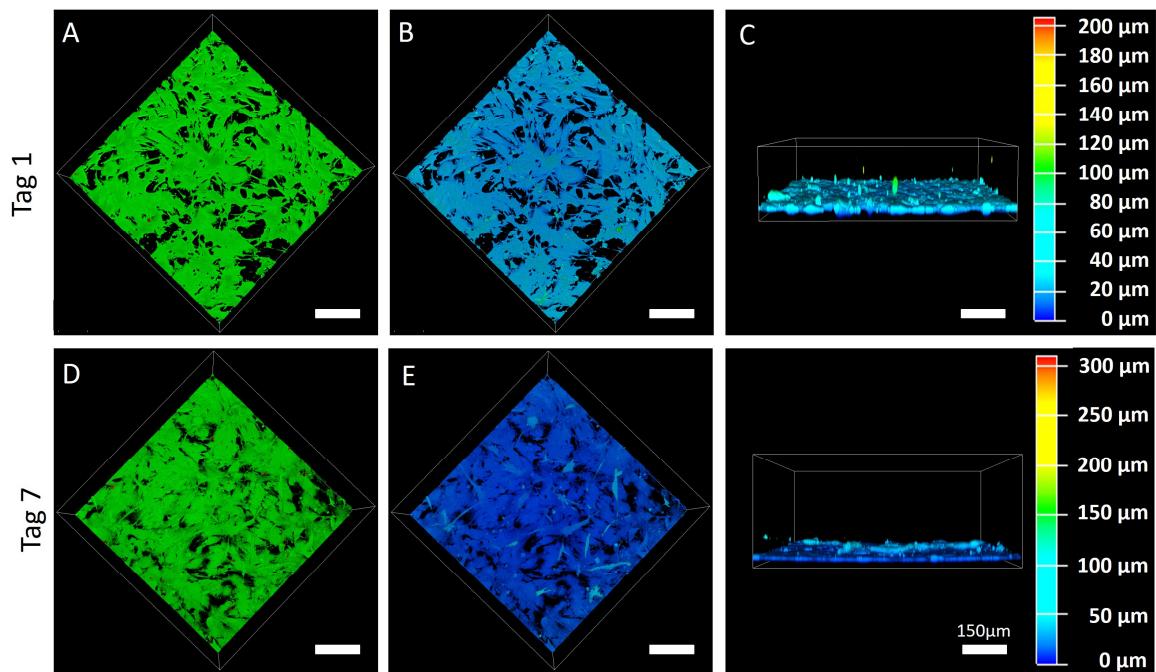


Abbildung 81 Lebend/Tot-Färbung humaner Astrozyten überschichtet mit Kollagen I-Hydrogel (1 mg/ml). $5 \cdot 10^4$ HA wurden in die Wells eines 8-Well-µ-Slides ausgesät und mit einem 1 mg/ml Kollagengel überschichtet. Nach ein bzw. sieben Tagen erfolgte eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Abstand = 5 µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. (A, D) Lebend/Tot-Färbung, grün: Calcein-AM, lebend, rot: PI, tot. (B, E) Tiefenfärbung der Bilder A und D. (C, F) seitliche Ansicht der Tiefenfärbung. Maßstab: 150 µm.

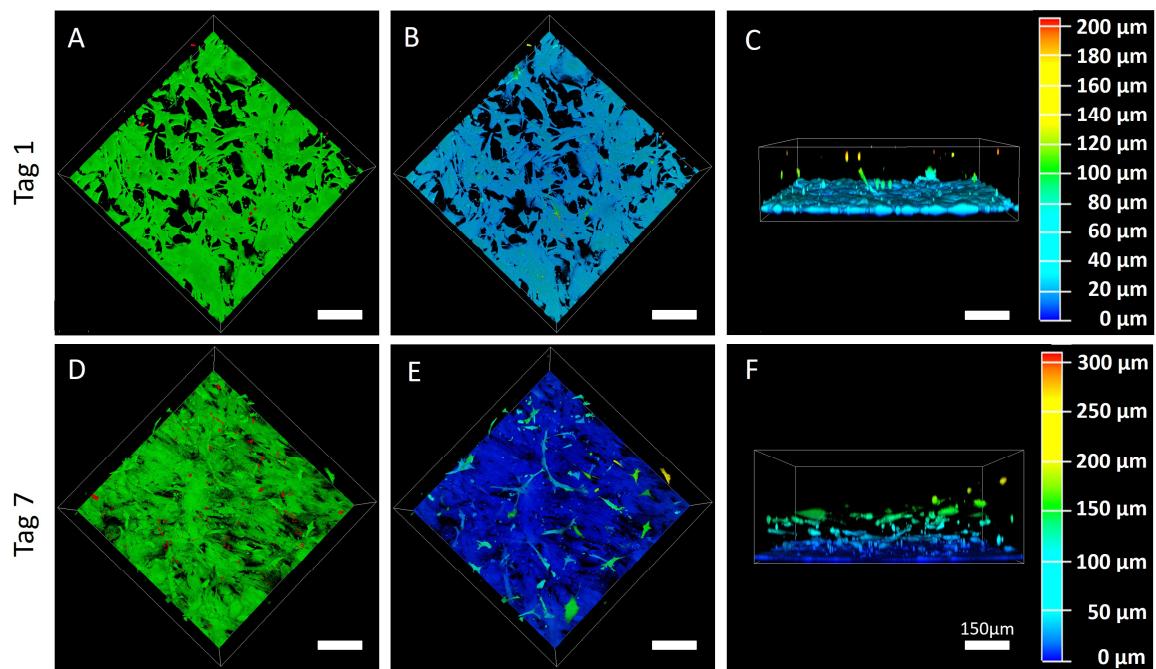


Abbildung 82 Lebend/Tot-Färbung humaner Astrozyten überschichtet mit Kollagen I-Hydrogel (2 mg/ml). $5 \cdot 10^4$ HA wurden in die Wells eines 8-Well-µ-Slides ausgesät und mit einem 2 mg/ml Kollagengel überschichtet. Nach ein bzw. sieben Tagen erfolgte eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Abstand = 5 µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. (A, D) Lebend/Tot-Färbung, grün: Calcein-AM, lebend, rot: PI, tot. (B, E) Tiefenfärbung der Bilder A und D. (C, F) seitliche Ansicht der Tiefenfärbung. Maßstab: 150 µm.

Für beide Gelkonzentrationen konnten sowohl nach einem als auch nach sieben Tagen kaum tote Zellen nachgewiesen werden. Die Aufbringung der Gelmatrix auf die Zellschicht ohne eine negative Beeinflussung der Zellviabilität sowie eine Versorgung der Zellen mit Nährstoffen durch die Hydrogelmatrix hindurch konnte damit gezeigt werden. Ein starkes Wachstum der Zellen in die Matrix konnte jedoch nicht festgestellt werden. Einzelne Zellen zeigten zwar kurze Ausläufer, wobei sich die höher konzentrierten Kollagengele als geeigneter erwiesen, insgesamt waren die Zellschichten aber hauptsächlich planar.

4.3.2. GelMA

Um die Limitierungen wie den schnellen Abbau des natürlichen Hydrogels Kollagen zu überwinden, wurde im nächsten Schritt das aus der Literatur bekannte semi-synthetische Hydrogel GelMA für die Kultivierung humaner Astrozyten untersucht. Als Ausgangsstoff dient hier Gelatine, die als Hydrolyseprodukt von Kollagen weiterhin viele Vorteile, wie beispielsweise die Zytokompatibilität, mit einem sehr günstigen Rohstoff vereint. Außerdem besitzt sie durch eine geringere Anzahl an aromatischen Gruppen eine niedrigere Immunogenität als Kollagen.^[191] Zahlreiche RGD-Sequenzen (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) unterstützen darüber hinaus die Zellhaftung.^[192,193]

Reine Gelatine kann aufgrund des physikalischen Gelierungsprozesses jedoch nur bei bestimmten Konzentrationen und Temperaturen Hydrogele bilden und weist zudem eine geringe mechanische Festigkeit auf. Die Zusammenlagerung zu intermolekularen Triple-Helices erfolgt reversibel bei niedriger Temperatur.^[194] Bei physiologischen Temperaturen, die zur Kultivierung von Zellen notwendig sind, verflüssigt sich die Gelatine wieder.

Die permanente kovalente Vernetzung verschiedener Gelatinestränge von GelMA wird durch Modifikation der Seitenketten erlaubt. Dabei entsteht durch eine Methacrylierung der Seitenketten ein semi-synthetisches Polymer, welches die Vorteile von Gelatine als Biopolymer mit der Möglichkeit der gezielt steuerbaren und permanenten Vernetzung vereint. Dies wird durch Zugabe eines Photoinitiators und der Bestrahlung mit Licht erreicht. Durch Mischen mit einer Zellsuspension werden die Zellen während der Polymerisation im entstehenden Hydrogel eingeschlossen. Die so hergestellten Gele sind, im Gegensatz zu reiner Gelatine, bei 37 °C stabil. Der Grad der Vernetzung und damit die Steifigkeit des Hydrogels kann durch die Variation verschiedener Parameter angepasst werden

4.3.2.1 Synthese und Charakterisierung

Die GelMA-Synthese erfolgte durch Reaktion von Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid nach Van Den Bulcke *et al.*^[58]. Hierbei greift das freie Elektronenpaar der Aminogruppe von Lysin- und Hydroxylysins Seitenketten in einer nucleophilen Acylsubstitution am Carbonylkohlenstoff des Methacrylsäureanhydrids an, wobei Methacrylat als Abgangsgruppe abgespalten wird. Die Reaktionsgleichung ist in Abbildung 83 dargestellt.

Ergebnisse

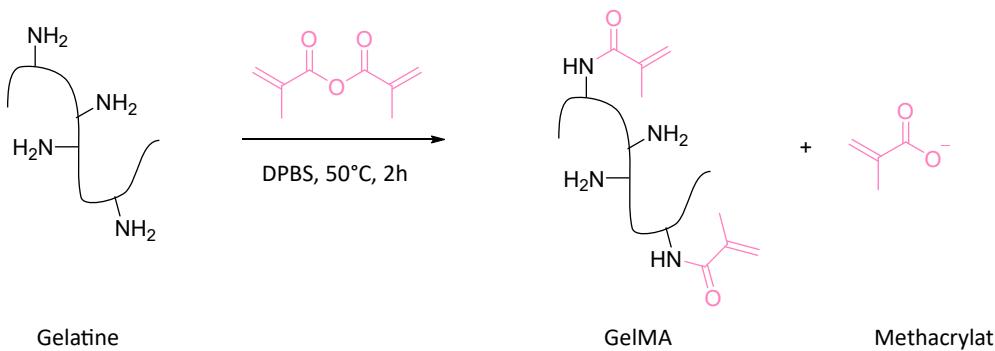


Abbildung 83 Reaktion von Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid zum GelMA Polymer nach Van Den Bulcke et al.^[58]

Um potenziell zytotoxische Nebenprodukte sowie nicht reagiertes Methacrylsäureanhydrid zu entfernen, wurde die Mischung nach erfolgter Reaktion sieben Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert (Dialysemembran: 12-14 kDa). Durch Lyophilisation wurde ein weißer Feststoff erhalten. Dieser wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Bildung des vernetzten Hydrogels erfolgte unter Zugabe eines Photoinitiators und die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge (Abbildung 84). Dabei kommt es zu einem Zerfall des Photoinitiators, wobei freie Radikale erzeugt werden, die als Initiatoren für die Kettenpolymerisation der methacrylierten Seitenketten dienen. Die anschließende Kettenpropagation kann dabei zwischen Methacrylatgruppen der gleichen Kette sowie zwischen unterschiedlichen Ketten stattfinden. Die Zellen werden während dieses Prozesses im entstehenden Hydrogel eingeschlossen. Eine Termination der Kettenreaktion erfolgt durch die Reaktion zweier wachsender Ketten oder durch die Reaktion einer wachsenden Kette mit einem freien Radikal.^[59] Im Vergleich zu den oben untersuchten Kollagenhydrogelen verläuft die Vernetzung deutlich schneller, wodurch ein Absinken der Zellen verhindert wird.

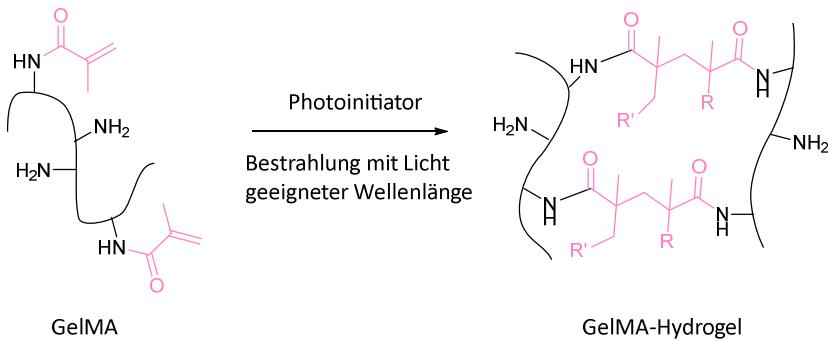


Abbildung 84 Reaktion des GelMA-Polymers zum vernetzten Hydrogel. Durch Zugabe eines Photoinitiators und der Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge entstehen in einer radikalischen Kettenpolymerisation vernetzte Hydrogеле.

Über die zugegebene Menge Methacrylsäureanhydrid kann der Grad der Methacrylierung variiert werden, wodurch sich bei der Vernetzung die Steifigkeit des Hydrogels beeinflussen lässt.

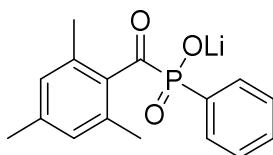
Um ein breites Spektrum an Funktionalisierungsgraden zu erreichen, wurden verschiedene Äquivalente an Methacrylsäureanhydrid bezogen auf NH_2 -Gruppen in der Gelatine verwendet (0,5, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20 und 30 Äq). Die umfangreiche Charakterisierung der Hydrogеле erfolgte durch S. Haase und T. Göckler. Dabei wurde unter anderem der Grad der Funktionalisierung (*Degree of functionalization, DoF*) durch einen TNBSA (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure)-Assay untersucht,

wobei der Prozentsatz modifizierter freier Aminogruppen im Vergleich zu reiner Gelatine bestimmt wurde.

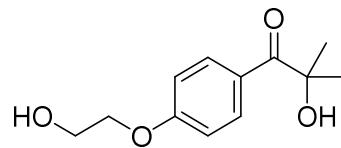
Dabei wurden drei Hydrogele mit niedrigem (1 Äq, DoF 30 %), mittlerem (8 Äq, DoF 52 %) und hohem (20 Äq, DoF 70 %) Funktionalisierungsgrad identifiziert, die im Folgenden als GelMA *low*, GelMA *medium* und GelMA *high* bezeichnet werden.^[195,196]

4.3.2.2 Untersuchung geeigneter Photoinitiatoren

Da für die Polymerisation ein Photoinitiator zur Reaktionsinitiation benötigt wurde, bestand der erste Schritt in der Wahl eines geeigneten Photoinitiators. Kommerziell sind eine Vielzahl verschiedener Photoinitiatoren erhältlich. Für den Einsatz in der Zellkultur sollte ein geeigneter Photoinitiator neben einer guten Wasserlöslichkeit und geringen Toxizität bei einer Wellenlänge aktivierbar sein, die nicht zur Schädigung lebender Organismen führen kann. Im Folgenden wurden die beiden häufig verwendeten Photoinitiatoren Irgacure 2959 (2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone) und Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP) miteinander verglichen (Abbildung 85). Hierfür wurden zunächst die Absorptionsspektren der beiden Photoinitiatoren untersucht.



LAP



Irgacure 2959

Abbildung 85 Struktur der Photoinitiatoren LAP und Irgacure 2959

Die Absorptionsbestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Sonja Haase (AK Schepers, KIT, IFG) durchgeführt und lieferte für beide Photoinitiatoren ein Absorptionsmaximum bei 300 nm.^[195] Der Photoinitiator LAP wies ein zusätzliches lokales Absorptionsmaximum bei 370 nm auf, was die Ergebnisse von Fairbanks *et al.* bestätigt.^[197] Da bereits durch viele Studien gezeigt werden konnte, dass kurzwellige und damit energiereiche Strahlung zu Schädigungen der DNA führen und Mutationen erzeugen können, sollten Strahlungen im niedrigen Wellenlängenbereich bei der Arbeit mit Zellen vermieden werden.^[198–200] Für den Einsatz in der Zellkultur ist der Photoinitiator LAP aus diesem Grund dem Irgacure 2959 vorzuziehen.

Ergebnisse

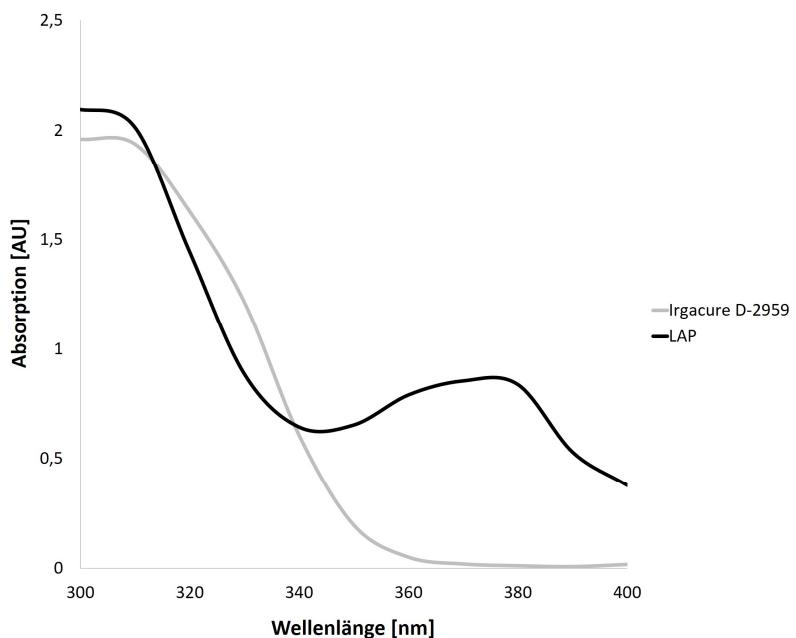


Abbildung 86 Absorptionsspektren der Photoinitiatoren Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP) und Irgacure 2959 in einer Konzentration von 0,1 % (w/v) DPBS-/. In Kollaboration mit S. Haase.^[195]

Nach erfolgter Absorptionsbestimmung und der Wahl des Photoinitiators LAP sollte die Toxizität durch einen MTT-Assay mit humanen Astrozyten bestimmt werden. Das Funktionsprinzip dieses Tests ist in Kapitel 4.1.4.3 bereits erläutert. Dazu wurden die Zellen für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an LAP (0,5 %, 0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 %, 0,01 % (w/v)) inkubiert.

Da der Photoinitiator in einem normalen Versuchsaufbau durch Licht angeregt wird und dadurch in reaktive Spezies zerfällt, wurden die mit Photoinitiator behandelten Zellen in einem separaten Versuch für 30 s bei 500 mW/cm² (Omnicure S2000, 320-500 nm) belichtet und anschließend 72 h weiterkultiviert. Die Ergebnisse des Toxizitätsassays sind Abbildung 87 gezeigt.

Aus den Ergebnissen wurde für eine 72-stündige Behandlung ein LD₅₀-Wert von 0,216 % (w/v) LAP, nach der Bestrahlung ein LD₅₀-Wert von 0,183 % (w/v) ermittelt. Somit verstärkte sich die Zytotoxizität des Photoinitiators durch die Bestrahlung und die dabei entstehenden freien Radikale. Zudem war eine starke Abhängigkeit des zytotoxischen Effekts von der Konzentration des Photoinitiators nachweisbar. Für die Verwendung in der Zellkultur sollte somit mit möglichst geringen Mengen an Photoinitiator gearbeitet werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass unter realen Bedingungen die erzeugten Radikale bei der Polymerisation des Hydrogels verbraucht werden. Zudem wird durch jeden Mediumwechsel evtl. nicht abreagierter Photoinitiator aus dem Gel gewaschen, wodurch die untersuchten toxischen Effekte weniger stark ausgeprägt sein sollten.

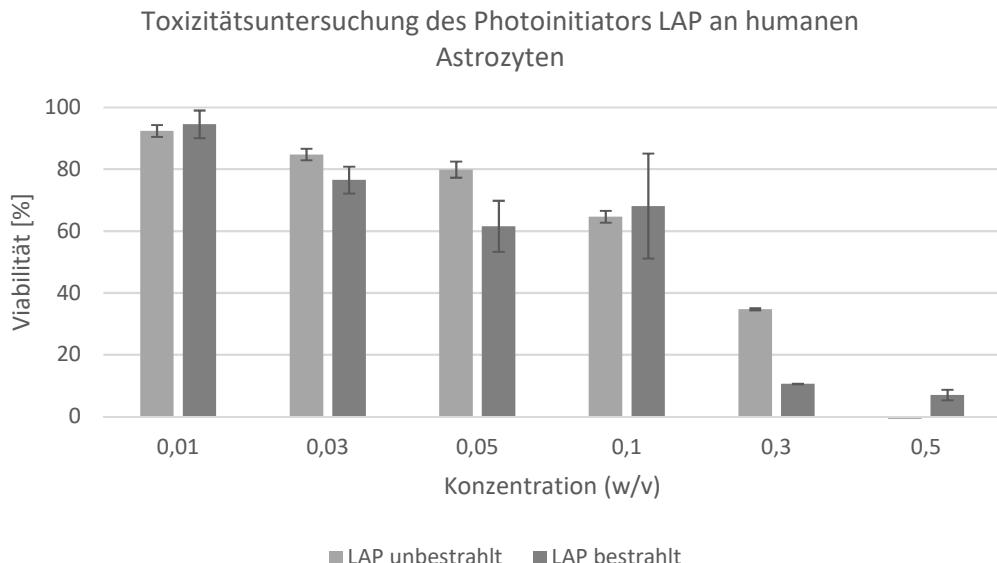


Abbildung 87 Toxizität des Photoinitiators LAP ohne sowie nach Bestrahlung. $1 \cdot 10^4$ HA wurden in die Wells einer 96-Well-Platte ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Photoinitiators LAP für 72 h behandelt. Die Bestrahlung erfolgte für 30 s mit einer Intensität von 500 mW/cm^2 (Omnicure S2000, 320-500 nm). Die Bestimmung der Viabilität erfolgte durch den MTT-Assay. Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden aus $n=3$ unabhängigen Proben berechnet.

4.3.2.3 Toxizität der Bestrahlung

Neben dem Einsatz eines Photoinitiators kann ebenfalls die Belichtung einen Einfluss auf die Viabilität der im Hydrogel eingeschlossenen Zellen haben. Durch die Verwendung des Photoinitiators LAP kann zwar prinzipiell bei einer höheren Wellenlänge gearbeitet werden als dies für den Photoinitiator Irgacure 2959 der Fall ist, dennoch findet die Bestrahlung im UV-Bereich statt. Daher sollte einerseits geklärt werden, ob die Bestrahlung negativ auf die Zellen wirkt und inwiefern verschiedene Bedingungen wie Zeit und Intensität eine Rolle spielen. Da X. Kempter zeigen konnte, dass die Bestrahlung mit höherer Intensität zu einer schnelleren Aushärtung von GelMA-Hydrogelen führt, sollte untersucht werden, ob eine kürzere Bestrahlung bei hoher Intensität oder eine längere Bestrahlung bei niedriger Intensität für den Einsatz mit Zellen gewählt werden sollte.^[201] Hierfür wurden je $1 \cdot 10^4$ humane Astrozyten in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen frisches ausgetauscht und die Zellen unter verschiedenen Bedingungen belichtet. Um auszuschließen, dass die Zellen mehrfach der Bestrahlung ausgesetzt sind, wurden 96-Well-Platten mit lichtundurchlässigen Wells gewählt. Dadurch sollte eine Streuung des Lichts durch die Wells hindurch verhindert werden. Zudem wurde sowohl vertikal als auch horizontal nur jedes zweite Well auf der Platte bestrahlt. Die so belichteten Zellen wurden anschließend für weitere 72 h bei Standardbedingungen (Kapitel 6.1.1) kultiviert und die Viabilität daraufhin durch MTT-Assay bestimmt. Als Bedingung für die Strahlung wurden drei verschiedene Intensitäten (500 mW/cm^2 , 1000 mW/cm^2 , 5000 mW/cm^2) sowie drei verschiedene Zeiten (10 s, 30 s und 2 min) untersucht. Der Abstand von der Strahlungsquelle zur Probe betrug dabei 5 cm. Die Ergebnisse sind in Abbildung 88 dargestellt.

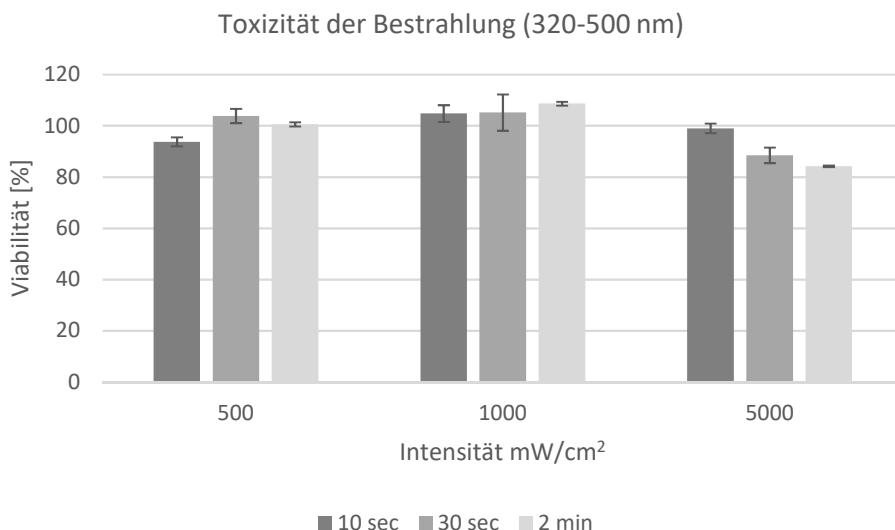


Abbildung 88 Toxizität der Bestrahlung im Wellenlängenbereich von 320-500 nm nach 72 h. $1 \cdot 10^4$ HA wurden in die Wells einer 96-Well-Platte ausplattiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel und eine anschließende Bestrahlung der Zellen mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm (Omicure S2000) mit unterschiedlichen Intensitäten und für verschiedene Zeitintervalle. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung der Viabilität durch einen MTT-Assay. Mittelwerte und statistische Fehlerbalken wurden berechnet aus n=3.

Für die Bestrahlung mit Intensitäten von 500 und 1000 mW/cm² zeigten sich durch die unterschiedlichen Bestrahlungszeiten von 10 s, 30 s und 2 min kaum Unterschiede in der Viabilität. Eine negative Auswirkung auf die Zellviabilität durch eine längere Bestrahlungsdauer war nicht zu beobachten. Bei einer Intensität von 5000 mW/cm² sank die Zellviabilität im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Intensitäten mit steigender Bestrahlungsdauer jedoch. Während bei einer 10-sekündigen Bestrahlung noch 99 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle lebten, sank die Viabilität bei einer Dauer von 2 min auf 84 % ab. Ein LD₅₀-Wert konnte mit den untersuchten Bedingungen nicht berechnet werden, da die Viabilität der Zellen stets über 80 % lag. Da es sich bei dem hier verwendeten Assay um einen Viabilitätstest handelt, der keine Aussagen über mögliche Mutationen oder nicht-letale DNA-Schäden liefert, wurde für die Polymerisation der Hydrogele im Folgenden eine möglichst geringe Intensität von 500 mW/cm² gewählt. Die Bestrahlungsdauer betrug 30 s.

4.3.2.4 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel

Um zu untersuchen, ob sich GelMA als Matrix für die Kultivierung humaner Astrozyten eignet, wurden analog zu den Kollagenhydrogelen zwei verschiedene Zellzahlen sowie unterschiedliche Gelbedingungen getestet. Dabei wurde die Steifigkeit der Hydrogele durch den Einsatz unterschiedlich funktionalisierter Polymere variiert. Untersucht wurden GelMA *low*, *medium* und *high* jeweils in einer Konzentration von 5 % (w/v). Dazu wurden die Polymere bei 40-50 °C als 10%-ige Lösungen in DPBS^{-/-} gelöst, anschließend mit 0,3 % LAP und Zellsuspension gemischt und je 200 µl dieser Mischung in die Wells eines 8-Well-µ-Slides überführt. Die Polymerisation erfolgte für 30 s bei 500 mW/cm² (Omicure S2000, 320-500 nm). Anschließend wurden die Gele mit 200 µl zellspezifischem Medium überschichtet und unter Standardbedingungen kultiviert, wobei alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel stattfand. Dabei wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 200 µl frisches Medium ersetzt. Aufgrund des starken Quellverhaltens und der Instabilität der GelMA *low* Gele war ein Abnehmen des Mediums nicht möglich ohne dabei die Matrix zu

zerstören. Um dennoch eine Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde frisches Medium hinzugegeben ohne eine vorherige Abnahme des alten Mediums.

Die Untersuchung der Viabilität und die Beurteilung der Ausrichtung und Netzwerkbildung in der Gelmatrix erfolgte an Tag 1, 7 und 14 und ist in Abbildung 89 und Abbildung 90 dargestellt. Dabei sind jeweils 300 µm hohe Z-Stacks der mit Calcein-AM und PI gefärbten Gele an Tag 1, 7 und 14 dargestellt. Zudem visualisiert das tiefencodierte Profil an Tag 14 die Verteilung der Zellen innerhalb der gemessenen 300 µm.

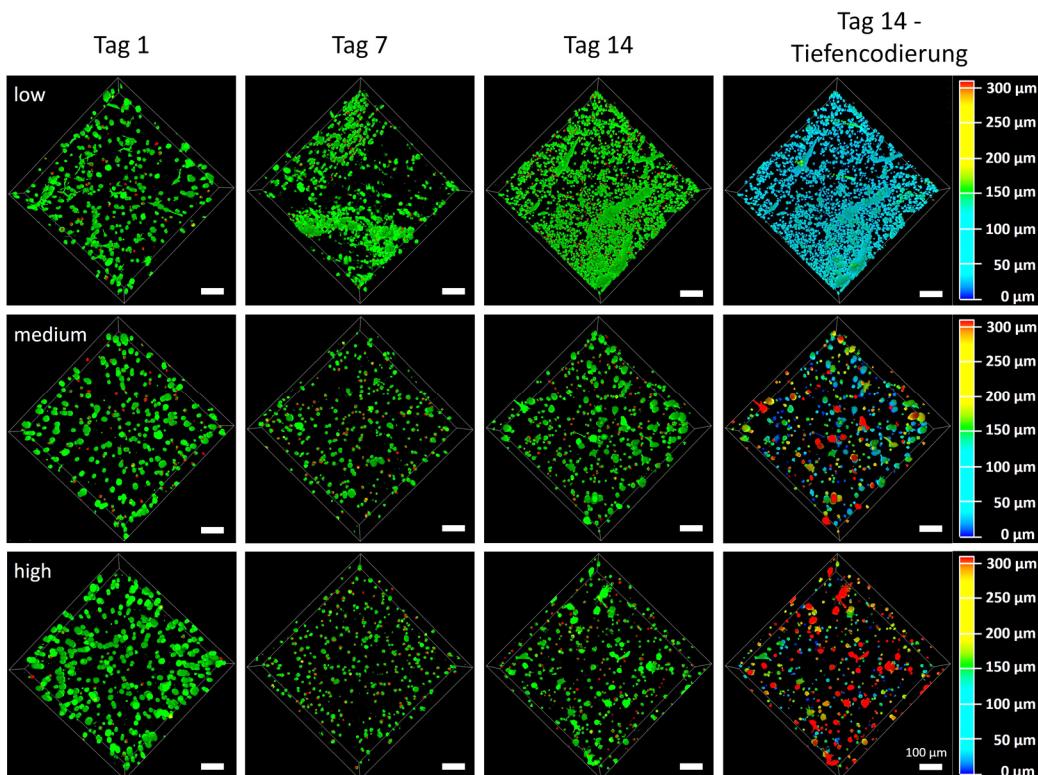


Abbildung 89 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in GelMA-Hydrogelen. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden durch Photopolymerisation in einem GelMA-Hydrogel eingeschlossen. Untersucht wurden GelMA *low*, *medium* und *high*, die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,3 % LAP für 30 s bei 500 mW/cm² (Omnicure S2000, 320-500 nm). Nach 1, 7 und 14 Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks (n = 60, Abstand = 5 µm, h = 300 µm, Leica TCS SPE DMI4000B) Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

Abbildung 89 zeigt die Kultivierung von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in den unterschiedlich funktionalisierten GelMA-Hydrogelen. Für alle drei Hydrogele konnten an Tag 1 gleichmäßig verteilte Astrozyten beobachtet werden. Durch die geringe Anzahl roter und damit nekrotischer Zellen im Vergleich zu den grün gefärbten Zellen konnte gefolgert werden, dass sich der Herstellungsprozess nicht negativ auf die Zellviabilität auswirkte. Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch nach 7 bzw. 14 Kultivierungstagen. Eine Zunahme nekrotischer Zellen konnte nicht beobachtet werden. Die in 4.3.2.2 angenommene Vermutung, dass die toxische Wirkung des Photoinitiators durch den Herstellungsprozess sowie Verdünnungseffekte bei der dreidimensionalen Kultivierung keine Rolle mehr spielt, konnte somit bestätigt werden.

In Bezug auf die Ausrichtung und Netzwerkbildung der Zellen innerhalb der Matrix war im GelMA *low* bereits an Tag 1 eine beginnende Ausrichtung der Zellen zu beobachten, während die Zellen in GelMA *medium* und *high* noch eine runde Morphologie aufwiesen. Auch nach sieben

Ergebnisse

Kultivierungstagen war keine verstärkte Ausrichtung der Zellen in GelMA *medium* und *high* zu beobachten. Die Zellen zeigten weiterhin runde Morphologien. Die Zellen im GelMA *low* wiesen nach sieben Tagen allerdings eine sehr inhomogene Verteilung auf. Während an manchen Stellen eine sehr starke Clusterbildung beobachtet werden konnte, waren an einigen Stellen kaum Zellen vorhanden. Dies lässt sich durch die instabile Gelmatrix erklären. Zurückzuführen ist dies einerseits auf das starke Quellverhalten der Hydrogele, was dazu führte, dass die Gele keine kompakte Struktur mehr bildeten, sondern sehr flüssig waren. Zudem fand ein verstärkter Abbau durch die Zellen statt, was vor allem nach 14 Tagen gut durch die Tiefenfärbung gezeigt werden konnte. Ähnlich wie bei den Kollagengelen war auch für GelMA *low* nach 14 Tagen keine Dreidimensionalität mehr nachweisbar. Im Vergleich zu den Kollagengelen war der Abbau jedoch langsamer. Die GelMA *medium* und *high* Gele zeigten auch nach 14 Tagen weiterhin gleichmäßig verteilte Zellen; eine beginnende Ausrichtung war zu beobachten, bei der sich zwischen den beiden Gelen kaum ein Unterschied zeigte. Durch eine längere Kultivierungsdauer könnte hier möglicherweise eine stärkere Ausrichtung mit einer komplexen Netzwerkbildung erreicht werden, was für eine anschließende fluidische Kultivierung aufgrund des hohen Mediumverbrauchs für Hochdurchsatzverfahren jedoch nicht geeignet ist.

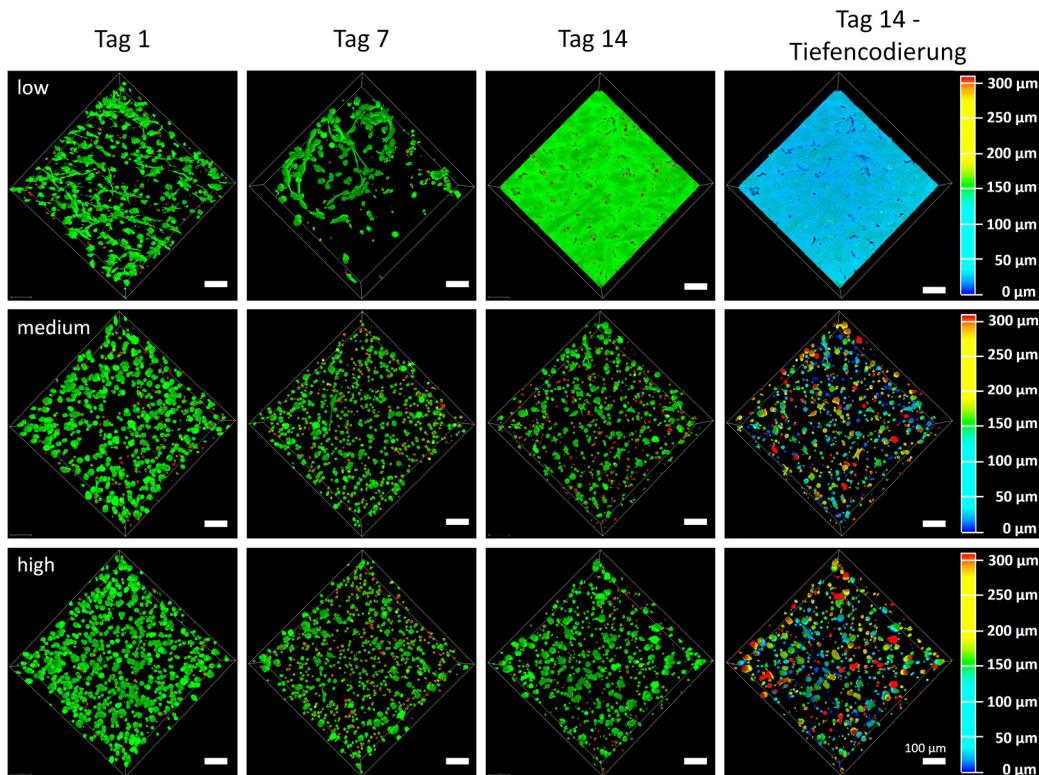


Abbildung 90 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) in GelMA-Hydrogelen. $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden durch Photopolymerisation in einem GelMA-Hydrogel eingeschlossen. Untersucht wurden GelMA *low*, *medium* und *high*, die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,3 % LAP für 30 s bei 500 mW/cm² (Omnicure S2000, 320-500 nm). Nach 1, 7 und 14 Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks (n = 60, Abstand = 5 µm, h = 300 µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 300 µm

Die Kultivierung von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml lieferte vergleichbare Ergebnisse. Diese sind in Abbildung 90 dargestellt. In GelMA *low* zeigten die Zellen bereits nach einem Tag eine beginnende Ausrichtung, wobei aufgrund des Abbaus der Matrix nach 14 Tagen ein planares Wachstum der Zellen

beobachtet werden konnte. Auch hier zeigten sich für alle Gele und Zeitpunkte hohe Zellviabilitäten, wobei die Zahl nekrotischer Zellen in GelMA *medium* und *high* von Tag 1 bis Tag 14 zunahm. Dies lässt sich möglicherweise durch die höhere Zellzahl und das dadurch verminderte Nährstoffangebot im Vergleich zur niedrigeren Zellzahl erklären. Eine beginnende Zellausrichtung konnte vereinzelt ebenfalls erst an Tag 14 festgestellt werden.

4.3.3. GelNB/GelS

Obwohl das Hydrogel GelMA in der Literatur bereits für verschiedene biomedizinische Anwendungen eingesetzt wird^[202], weist es einige Nachteile auf. Dazu zählt neben der relativ hohen Konzentration an Photoinitiator, die zur Aushärtung benötigt wird, auch die Funktionalisierung selbst. Da Methacrylatgruppen bei der Polymerisation sowohl mit Methacrylatgruppen derselben, als auch räumlich benachbarter Gelatinestränge reagieren können, führt die Aushärtung zu einer heterogenen Netzwerkstruktur. Darüber hinaus verfügen nicht umgesetzte Gruppen über eine hohe Reaktivität und können mit Bestandteilen der Zelloberfläche reagieren.^[203,204] Aus diesem Grund wurde das Zweikomponenten-Hydrogel GelNB/GelS für die Kultivierung humaner Astrozyten untersucht.

4.3.3.1 Synthese und Charakterisierung

Die Synthese und Charakterisierung der beiden Hydrogel-Komponenten GelNB und GelS erfolgte durch S. Haase und T. Göckler.^[195,196]

Die Synthese beider Komponenten wurde in separaten Ansätzen durch die Modifizierung primärer Amine der Seitenketten von Lysin und Hydroxylysin der Gelatine durchgeführt. Norbornen-funktionalisierte Gelatine (GelNB) wurde dabei durch die Reaktion mit 5-Norbornen-2-carboxylsäure synthetisiert und erfolgte auf der Basis einer Aminkupplungsreaktion durch Aktivierung mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysuccinimid). Thiol-funktionalisierte Gelatine wurde durch die Reaktion mit N-Acetyl-DL-Homocystein-Thiolacton nach Van Vlierberghe *et al.* synthetisiert.^[205] Durch Variation der Menge an Funktionalisierungsreagenzien wurden Polymere mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden hergestellt und durch TNBSA-Assay charakterisiert. So wurden für GelNB drei verschiedene Polymere: *low* (DoF 20 ± 2 %), *medium* (DoF 53 ± 1 %) und *high* (DoF 97 ± 1 %) definiert, für GelS zwei Polymere: *low* (DoF 20 ± 3 %) und *medium* (DoF 50 ± 3 %). Eine höhere Funktionalisierung für GelS konnte nicht erreicht werden.

Eine Übersicht über die Synthese der beiden Komponenten und die Polymerisation zum Hydrogel ist in Abbildung 91 gezeigt.

Ergebnisse

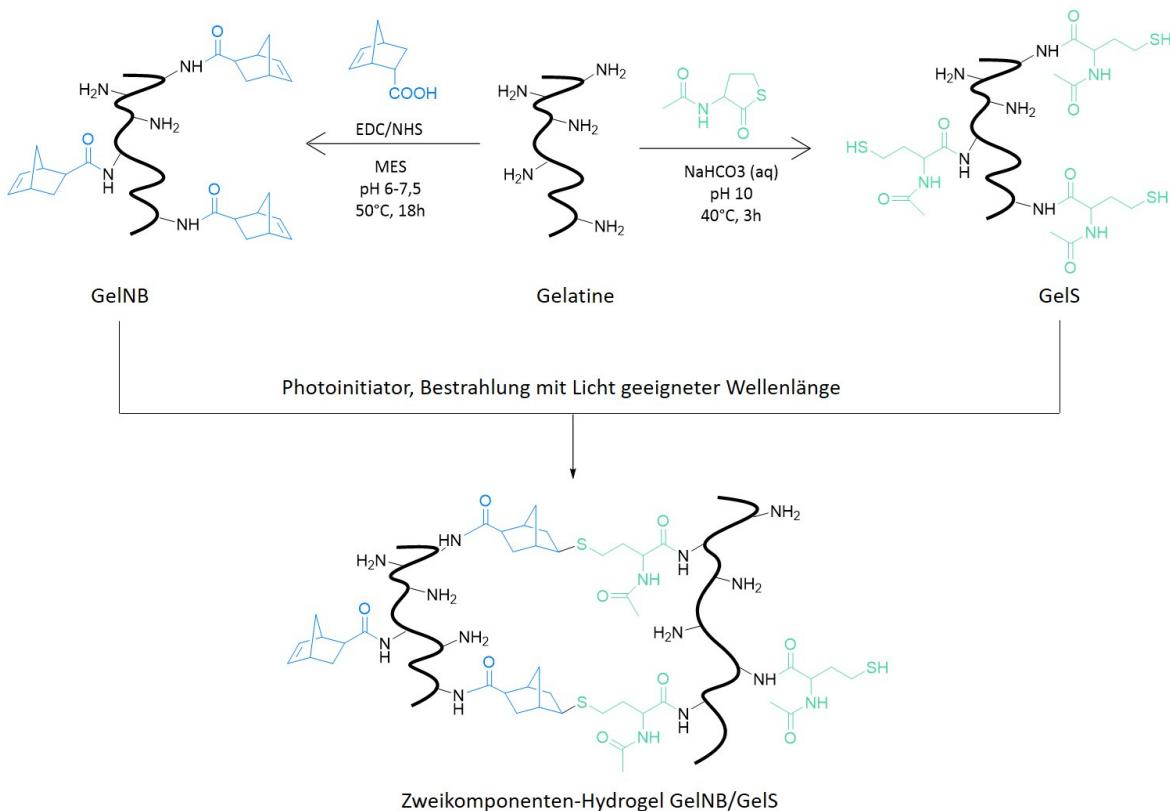


Abbildung 91 Synthese und Vernetzung des Zweikomponenten-Hydrogels GelNB/GelS. Die beiden Hydrogel-Komponenten GelNB und GelS wurden separat durch Modifizierung von Gelatine synthetisiert und durch die Bestrahlung mit Licht in einer Stufenwachstumspolymerisation kovalent vernetzt.

Der Reaktionsmechanismus der Polymerisation basiert auf der Thiol-En-Chemie, bei der eine Thiolgruppe in einer Stufenwachstumspolymerisation mit einem Alken, in diesem Fall dem cyclischen Norbornen, reagiert. Dazu wurden die Hydrogelvorläufer gelöst und äquimolar gemischt, um so ein 1:1-Verhältnis von Norbornen zu Thiol zu erhalten. Durch die Zugabe eines Photoinitiators und die Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge wurde die Polymerisation initiiert. Dabei wurden Hydrogele mit drei verschiedenen Vernetzungsgraden erzeugt, die im Folgenden als GelNB/GelS *low*, *medium* und *high* bezeichnet werden.

Im Vergleich zu GelMA sind die Seitengruppen dieser Hydrogel-Komponenten nicht nur weniger zytotoxisch, für die Polymerisation werden zudem geringere Konzentrationen an Photoinitiator benötigt. Da darüber hinaus eine Homopolymerisation auf dem gleichen Gelatinestrang vermieden wird, können im Vergleich zu GelMA homogeneres Netzwerke erzeugt werden.

4.3.3.2 Kultivierung humaner Astrozyten im Hydrogel

Für die Kultivierung humaner Astrozyten wurden die drei Hydrogele GelNB/GelS *low*, *medium* und *high* jeweils in einer Konzentration von 5 % (w/v) eingesetzt. Der Einschluss der Zellen in die Hydrogelmatrix erfolgte dabei durch Zugabe von 0,03 % LAP und anschließender Belichtung bei 500 mW/cm² (Omicure S2000, 320-500 nm) für 30 s. Die Kultivierung erfolgte dabei analog zu Kapitel 4.3.1.1 und 4.3.2.4 in 200 µl Gelmatrix, die mit 200 µl zellspezifischem Medium überschichtet wurde, welches alle 2-3 Tage durch frisches Medium ersetzt wurde. Wie GelMA *low* zeigten auch die GelNB/GelS *low* Gele ein starkes Quellverhalten und wiesen eine hohe Instabilität auf, so dass ein Mediumwechsel hier ebenfalls nicht ohne Zerstörung der Matrix möglich war. Die

Zugabe von frischem Medium erfolgte daher ohne vorherige Abnahme des alten Mediums. Die Lebend/Tot-Färbungen der Gele an Tag 1, 7 und 14 sind in Abbildung 92 dargestellt.

Alle drei Hydrogele wiesen an Tag 1 gleichmäßig verteilte Zellen sowie nur eine geringe Anzahl nekrotischer Zellen auf. Während in GelNB/GelS *low* bereits eine beginnende Ausrichtung der Zellen beobachtet werden konnte, zeigten die Zellen in den *medium* und *high* Gelen jedoch noch runde Morphologien. Nach 14 Tagen zeigten sich in den *medium* und *high* Gelen dagegen deutlich ausgerichtete Zellen und vernetzte Strukturen, während im GelNB/GelS *low* Gel nur wenige ausgerichtete und inhomogen verteilte Zellen detektierbar waren. Ähnlich wie GelMA *low* wies auch GelNB/GelS *low* ein sehr starkes Quellverhalten und eine dadurch begründete Instabilität auf.

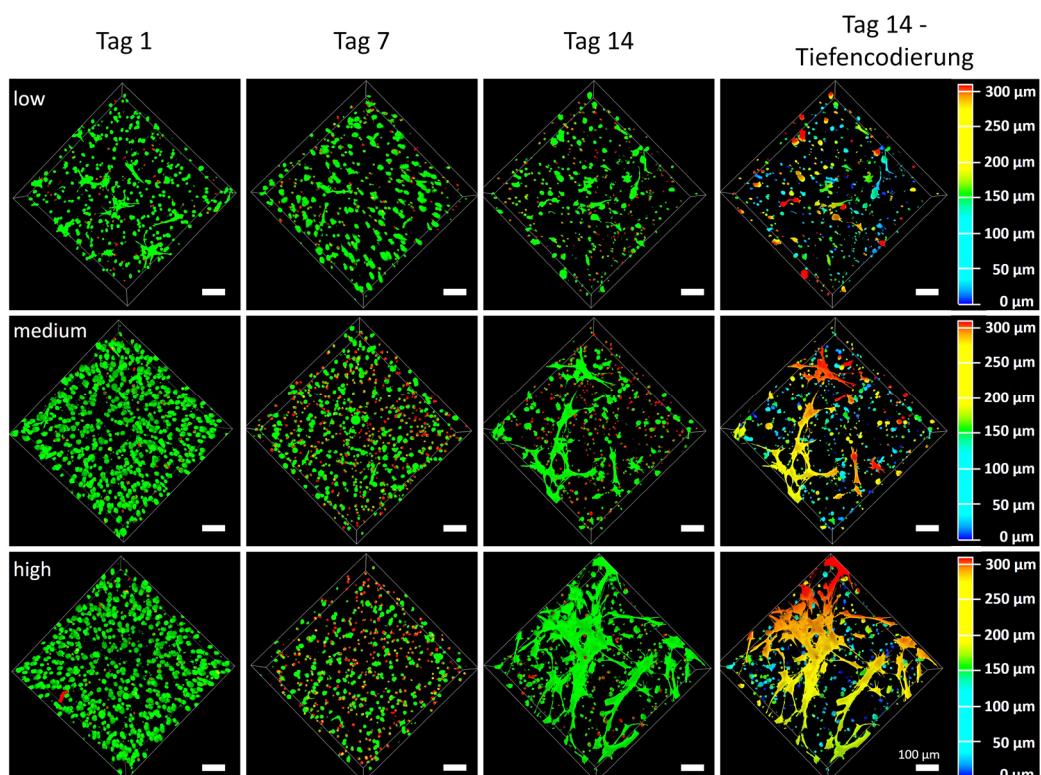


Abbildung 92 Lebend/Tot-Färbung und Tiefenkodierung humaner Astrozyten in GelNB/GelS-Hydrogelen. $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden durch Photopolymerisation in einem GelNB/GelS-Hydrogel eingeschlossen. Untersucht wurden *low*, *medium* und *high* Gele, die Polymerisation erfolgte durch Zugabe von 0,03 % LAP für 30 s bei 500 mW/cm² (Omnicure S2000, 320-500 nm). Nach 1, 7 und 14 Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks (n=60, Abstand=5 μm, h=300 μm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion und Erstellung eines Tiefenprofils erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 μm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 μm, blau = 0 μm, rot = 300 μm

4.3.4. Zusammenfassung

Die Nachbildung eines komplexen neuronalen Netzwerks im vasQchip erfordert die Kultivierung der Zellen in einer strukturgebenden dreidimensionalen Matrix. Die hier untersuchten Hydrogele Kollagen I (1 mg/ml und 2 mg/ml), GelMA (*low*, *medium* und *high*) und GeNB/GelS (*low*, *medium* und *high*) wurden hinsichtlich ihrer Biokompatibilität in Bezug auf Viabilität und Ausrichtung anhand einer humanen Astrozytenkultur untersucht. Die Kollagen-Hydrogele waren dabei zwar durch eine sehr schnelle Anhaftung und Ausrichtung der Zellen gleichzeitig jedoch auch durch einen schnellen Abbau der Matrix durch die Zellen gekennzeichnet. Auch die Hydrogele GelMA *low* und GelNB/GelS *low* zeichneten sich durch die schnelle Ausrichtung der Zellen nach bereits einem Tag

aus, waren jedoch sehr instabil. Für die folgenden Versuche wurden daher sowohl 1 mg/ml Kollagen, GelMA *low* und GelNB/GelS *low* trotz hoher Zellviabilitäten und der schnellen Ausrichtung der Zellen ausgeschlossen. Die *medium* und *high* Gele zeigten zwar ebenfalls hohe Zellviabilitäten, die Ausrichtung der Zellen dauerte allerdings deutlich länger als in den *low* Gelen. Während bei GelNB/GelS jedoch nach 14 Tagen ausgerichtete und vernetzte Strukturen zu beobachten waren, zeigte sich in GelMA erst eine beginnende Zellausrichtung. Deutliche Unterschiede zwischen den Vernetzungsgraden *medium* und *high* konnten hierbei nicht festgestellt werden. Da Hirngewebe, im Gegensatz zu anderen Gewebetypen, sehr weich ist, die *low* Gele jedoch zu instabil waren, wurden für die nachfolgenden Versuche *medium* Gele eingesetzt. Trotz der relativ langsamem Ausrichtung in den statischen Vorversuchen, war eine Verwendbarkeit im vasQchip nicht auszuschließen, da sowohl Mikrofluidik als auch die Ko-Kultur mit weiteren Zelltypen einen Einfluss auf die Ausrichtung haben kann. Die rheologische Charakterisierung^[195] der Gele bestätigte deren Verwendbarkeit zum Aufbau eines NVU-Modells. Für die Speichermodule ergaben sich G'-Werte von 320 Pa (GelMA *medium*) und 400 Pa (GelNB/GelS *medium*), womit sie im Bereich der Festigkeit von Hirngewebe liegen, welches sich zwischen 100-1000 Pa bewegt.^[206-208]

4.4. NVU im Chip inklusive BBB, Neuronen und EZM

Als letzter Schritt sollten die einzelnen Bausteine der vorangegangenen Kapitel in einem ersten *Proof-of-Principle*-Experiment zu einem Gesamtmodell inklusive der etablierten BBB, Neuronen und einer Matrix zusammengeführt werden. Dabei sollte untersucht werden, ob eine Ko-Kultur aus allen vier Zelltypen inklusive einer Gel-Matrix mit viablen Zellen möglich ist.

Hierzu wurde die BBB zunächst entsprechend den in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Bedingungen vorbereitet und fluidisch für 72 h kultiviert. Da ein erster Versuch zur BBB mit einer Flussrate von 500 µl/min zu inkonfluent ausgebildeten Zellschichten mit einer hohen Zahl nekrotischer Zellen führte (Kapitel 4.2.4.2), wurden die folgenden *Proof-of-Principle*-Versuche mit der bereits etablierten Flussrate von 100 µl/h durchgeführt. Langfristig wäre das Ziel jedoch höhere Flussraten zu erreichen, um eine physiologische Situation nachzubilden. Für die Einbringung von Neuronen in das Gesamtmodell wurden humane primäre Neuronen gewählt, die in verschiedenen Gelmatrices in das umgebende Kompartiment des vasQchips eingebracht wurden. Da es sich hierbei um sehr teure Zellen handelt, die schwierig zu gewinnen sind, sollte vor deren Einbringung die Funktionsfähigkeit der vorbereiteten BBB-Chips sichergestellt werden. Aufgrund des derzeit noch händischen Zusammenbaus des umgebenden Kompartiments mit einem Klebering und einem Deckglas, kann es vorkommen, dass dieses nicht vollständig dicht abgeschlossen ist. Daher wurden die vorbereiteten BBB-Chips für 72 h zur Überprüfung der Dichtigkeit fluidisch mit hCMEC/D3-Kultivierungsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zelllayer im Kanal und im umgebenden Kompartiment hinsichtlich ihrer Unversehrtheit lichtmikroskopisch beurteilt. Erst danach erfolgte die Einbringung der Neuronen. Hierfür wurden die vasQchips von der Fluidik getrennt, die Neuronen in Passage 0 aufgetaut und direkt für die Versuche eingesetzt. Dazu wurden sie mit den entsprechenden Gelmatrices gemischt und ins umgebende Kompartiment eingebracht. Anschließend erfolgte die Polymerisation. Untersucht wurde sowohl Kollagen (2mg/ml), GelMA *medium* sowie GelNB/GelS *medium*. Nach erfolgter Polymerisation wurden die vasQchips wieder an die Fluidik angeschlossen und für weitere sieben Tagen bei einer Flussrate von 100 µl/h unter Standardbedingungen (Kapitel 6.1.1) kultiviert. Da bei niedriger Flussrate gearbeitet wurde, diente zur Kultivierung eine Mischung aus hCMEC/D3-Differenzierungsmedium und Neuronenmedium.

Sieben Tage nach Einbringung der Neuronen wurde eine Lebend/Tot-Färbung der vasQchips durchgeführt, um die Viabilität der Zellen im Chip sowie die Ausrichtung der Neuronen zu beurteilen. Zusätzlich wurden unter den gleichen Bedingungen Gele mit Neuronen hergestellt, die statisch in den Wells eines 8-Well- μ -Slides kultiviert wurde. Auch bei diesen erfolgte nach sieben Tagen eine Lebend/Tot-Färbung.

Da durch die Einbringung einer Gelmatrix in das umgebende Kompartiment keine Durchspülung mehr möglich war, wurde die Lebend/Tot-Färbung fluidisch über den Kanal durchgeführt. Dazu wurden die vasQchips für eine Stunde mit der Färbelösung durchspült, um so eine Diffusion des Farbstoffs durch die Poren in das umgebende Kompartiment und die Gelmatrix zu gewährleisten. Anschließend erfolgte eine Visualisierung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 500 μ m aufgenommen, um so das komplette Kompartiment darzustellen. Die Aufnahme erfolgte seitlich des Mikrokanals, um gleichzeitig die Viabilität der Zellen im und um den Kanal zu zeigen.

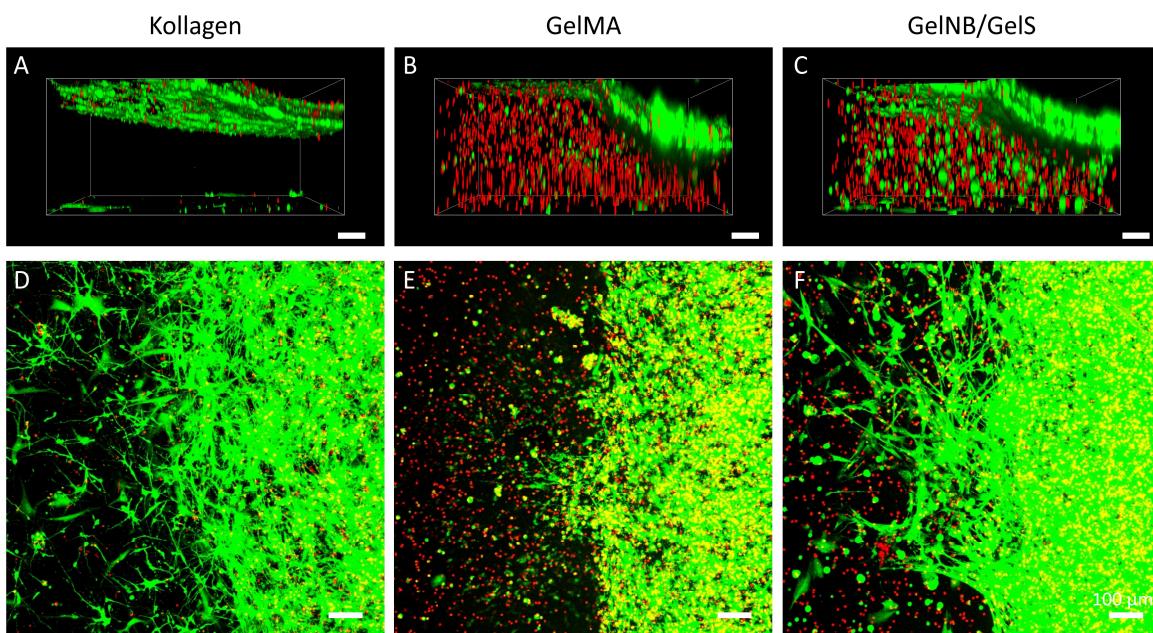


Abbildung 93 Lebend/Tot-Färbung der NVU im vasQchip. Die BBB aus hCMEC/D3, HBVP und HA wurde entsprechend den in Kapitel 4.2.4 beschriebenen Bedingungen vorbereitet. Nach 72 h fludischer Kultivierung erfolgte die Einbringung von $0,5 \cdot 10^6$ Neuronen in 500 μ l Gelmatrix (Kollagen 2 mg/ml, GelMA medium, GelNB/GelS medium) in das umgebende Kompartiment. Die Polymerisation erfolgte nach den in Kapitel 6.3.2 angegebenen Bedingungen. Anschließend wurden die vasQchips wieder mit der Fluidik verbunden und mit einer Flussrate von 100 μ l/h kultiviert. Nach sieben Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks (A, B, C n=100, Abstand=5 μ m, h=500 μ m, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. A, B, C seitliche Darstellung der fluidisch kultivierten NVU. D, E, F Überlagerung aller Z-Stack-Aufnahmen zum Maximalbild (Sicht von oben). Maßstab: 100 μ m.

In Abbildung 93 A-C sind die seitlichen Projektionen der so gefärbten Chips dargestellt. Für alle drei Gelmatrizen waren am Mikrokanal (rechts oben) zwei deutlich voneinander getrennte Schichten erkennbar, die überwiegend grüne, also viabile Zellen aufwiesen. Hierbei handelt es sich bei der oberen Schicht um die im Mikrokanal befindlichen hCMEC/D3, bei der unteren Schicht um die auf die Kanalrückseite ausgesäten HBVP und HA. Für das Kollagenhydrogel (A) konnte gezeigt werden, dass die im Gel eingekapselten Neuronen zwar ebenfalls überwiegend viabel waren, allerdings wurde das Gel gleichzeitig sehr stark abgebaut, so dass dieses an der breitesten Stelle nur noch etwa 170 μ m hoch war. Für die beiden semi-synthetischen Hydrogele GelMA und GelNB/GelS

Ergebnisse

konnten über die gesamten 500 µm hingegen gleichmäßig verteilte Zellen festgestellt werden. Dabei zeigte sich jedoch eine sehr geringe Viabilität der Zellen in beiden Gelen, wobei diese bei GelMA niedriger war als bei GelNB/GelS.

Für eine Kultivierung unter statischen Bedingungen konnten nach sieben Tagen Kultivierung in GelMA keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Auch die Kultivierung in GelNB/GelS und Kollagen führte zu überwiegend toten Zellen. Dabei konnte für die lebenden Zellen im Kollagengel eine beginnende Ausrichtung beobachtet werden, während die Zellen im GelNB/GelS-Gel eine runde Morphologie aufwiesen. Die 3D-Projektionen der Mikroskopieaufnahmen sind in Abbildung 94 dargestellt.

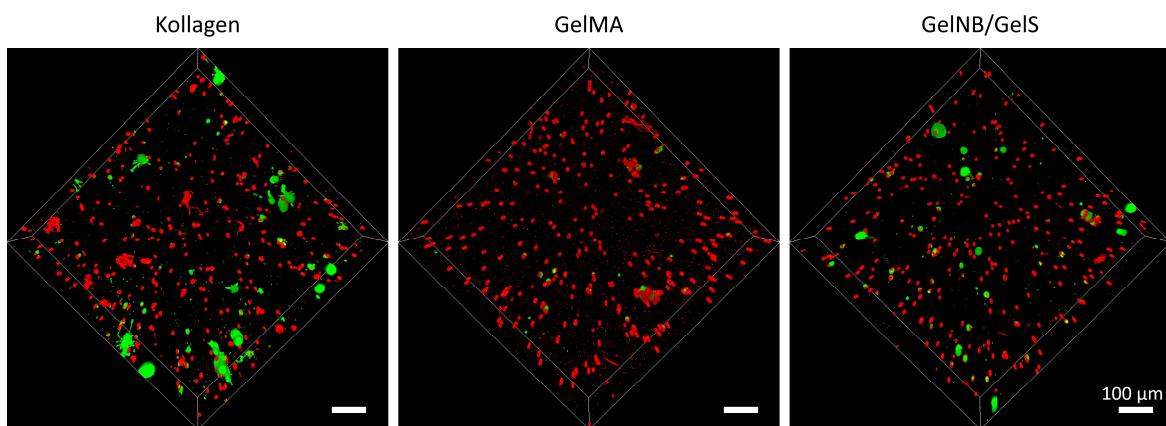


Abbildung 94 Lebend/Tot-Färbung humaner Neuronen in verschiedenen Gelmatrices. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden in verschiedene Gelmatrices eingeschlossen. Untersucht wurden 2 mg/ml Kollagen I, GelMA medium sowie GelNB/GelS medium. Die Polymerisation erfolgte entsprechend den in Kapitel 6.3.2 angegebenen Bedingungen. Nach sieben Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie durch Aufnahme von Z-Stacks ($n=60$, Abstand=5 µm, $h=300$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 µm

Eine mögliche Ursache für die geringe Anzahl lebender Zellen könnte ein Zentrifugationsschritt vor der Einbringung der Zellen in die Hydrogele sein. Laut Hersteller wird eine Zentrifugation nach dem Auftauen nicht empfohlen, da das verbleibende DMSO im Einfriermedium weniger schädlich ist, als die durch die Zentrifugation wirkenden Kräfte. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Zellen in einem großen Überschuss an Kultivierungsmedium ausplattiert werden müssen, so dass sich die Konzentration an DMSO auf unter 1 % verringert. Gleichzeitig wird jedoch eine Subkultivierung, die über das initiale Ausplattieren der Zellen hinaus geht nicht empfohlen, so dass die Zellen direkt für die durchzuführenden Versuche eingesetzt werden mussten. Im Falle der fluidische 3D-Kultivierung im Hydrogel wäre dies nicht ohne Zentrifugieren der Zellen möglich gewesen. Einerseits mussten die Zellen für die benötigte Zelldichte in einem geringeren Volumen vorliegen, andererseits wäre eine Verdünnung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO nicht auf unter 1 % möglich gewesen. Weitere Ursachen könnten der Einsatz des Photoinitiators zur Polymerisation sowie die Bestrahlung sein. Da beide Faktoren jedoch nur sehr kurz auf die Zellen wirken und die Viabilität im Kollagenhydrogel ebenfalls sehr niedrig war, ist dies als Ursache eher unwahrscheinlich. Auch die in Kapitel 4.3.2.4 und 4.3.3.2 durchgeföhrten Versuche mit Astrozyten deuteten nicht auf eine hohe Toxizität durch den Photoinitiator oder die Bestrahlung hin. LaPlaca *et al.* zeigten für die dreidimensionale Kultivierung muriner Neuronen in einer Matrigelmatrix, dass die Zelldichte ein entscheidender Einflussfaktor für die Zellviabilität ist.^[209] Auch dies wäre eine

mögliche Ursache für die schlechte Zellviabilität, die durch die Verwendung verschiedener Zellzahlen untersucht werden müsste.

Parallel zu den Gelversuchen wurde eine nachträgliche Untersuchung des Mediums durchgeführt. Hierbei wurde die zur Kultivierung im Chip verwendete Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium mit der Kultivierung im neuronenspezifischen Medium verglichen. Eine vorhergehende Untersuchung war aus Gründen der Material- und Zellverfügbarkeit nicht durchführbar. Durch die parallele Untersuchung sollten jedoch mögliche Effekte auf die Viabilität und Ausrichtung beurteilt werden.

Analog zu den in Kapitel 4.2.1 durchgeführten Untersuchungen wurde die Kultivierung in beiden Medien hinsichtlich Proliferation, Viabilität sowie Morphologie und Ausbildung spezifischer Marker untersucht. Dazu wurden die Neuronen entsprechend des Herstellerprotokolls in Kultur genommen und in den entsprechenden Zellzahlen ausplattiert. Um den Stress für die Zellen möglichst gering zu halten, wurde ein Mediumwechsel und die Umstellung des Mediums erst nach 24 h durchgeführt. Anschließend erfolgte der Wechsel alle 2-3 Tage. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 95 dargestellt.

Teilabbildung A zeigt dabei die Ergebnisse der Proliferationsanalyse durch einen PrestoBlue-Assay. Hierbei wurde durch die Kultivierung in der Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium eine prozentuale Zunahme der gemessenen Fluoreszenz um das 10-fache über einen Zeitraum von sieben Tagen festgestellt. Im Neuronenmedium hingegen nahm die Fluoreszenzintensität nach einer anfänglichen leichten Steigerung ab Tag 5 jedoch wieder ab, was auf ein Absterben der Zellen hindeutet. Durch die Lebend/Tot-Färbung mit FDA und PI konnte dies bestätigt werden (Teilabbildung B). Während die Viabilität in der Mischung bei nahezu 100 % lag, waren im Neuronenmedium 54 % der detektierten Zellen tot, womit die Viabilität lediglich bei 46 % lag. Da für die Kultivierung der Neuronen in den statischen Gelen das reine Neuronenmedium verwendet wurde, könnte dies ein möglicher Grund für die schlechtere Viabilität als in der fluidischen Kultivierung in den Chips sein.

Da die relative starke Proliferation in der Medienmischung hingegen sehr ungewöhnlich für Neuronen ist und diese sich normalerweise nicht teilen, war es vor allem wichtig zu untersuchen, ob die Zellen typische Charakteristika aufwiesen. Analog zu den anderen Zelltypen erfolgte die Charakterisierung über eine Immunfluoreszenzfärbung, als Marker wurde Synapsin-I gewählt. Hierbei handelt es sich um ein Protein der Synapsin-Familie, die zu einer Gruppe neuronaler Phosphoproteine zählt. Diese sind mit der zytoplasmatischen Oberfläche synaptischer Vesikel assoziiert und sind an der Synaptogenese und der Modulation der Neurotransmitterfreisetzung beteiligt. Gleichzeitig erfolgte eine Färbung von FABP7 als Astrozytenmarker, da denkbar wäre, dass die Neuronenkultur einen kleinen Prozentsatz Gliazellen enthielt, die durch die Verwendung der Medienmischung stark proliferierten (Vgl. Kapitel 4.2.1). Wie in Teilabbildung C gezeigt ist, war Synapsin-I über die Immunfluoreszenzfärbung in beiden Medien nicht nachweisbar, es konnte jedoch eine positive Färbung auf FABP7 nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den viablen Zellen möglicherweise um eine Kultur aus Astroglia handelt. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen sind jedoch zahlreiche weiterführende Experimente notwendig. An dieser Stelle würde sich vor allem eine molekularbiologische Untersuchung oder die Färbung weiterer spezifischer Neuronen- sowie Astrozytenmarker anbieten.

Ergebnisse

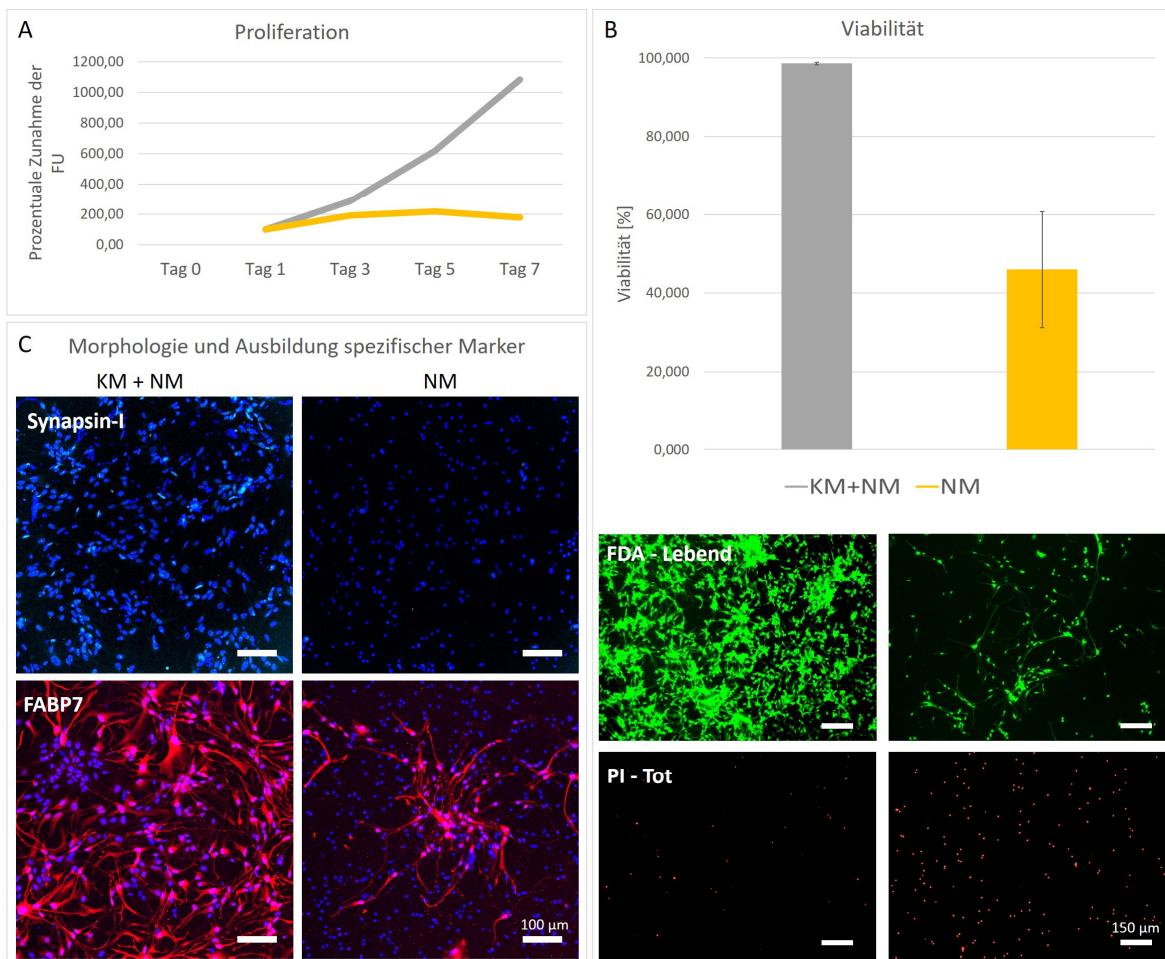


Abbildung 95 Vergleich des Neuronenmediums mit einer 1:1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium zur Kultivierung humaner Neuronen. Humane Neuronen wurden entsprechend des Herstellerprotokolls aufgetaut und je $1 \cdot 10^4$ HN (96-Well) bzw. $3 \cdot 10^4$ HN (8-Well- μ -Slide) pro Well im NM ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und mit frischem Medium überschichtet. Alle 2-3 Tage erfolgte anschließend ein Mediumwechsel. (A) Für die Proliferationsanalyse wurden an Tag 1, 3, 5 und 7 jeweils ein PrestoBlue-Assay durchgeführt ($n=3$). (B) Die Bestimmung der Viabilität erfolgte nach sieben Tagen durch FDA und PI, die Quantifizierung erfolgte mit ImageJ ($n=3$). Exemplarische ist die Färbung jeweils eines Wells dargestellt. Maßstab: 150 μ m. (C) Immunfluoreszenzfärbung von Synapsin-I und FABP7 und konfokalmikroskopische Auswertung. Cyan: Synapsin-I, rot: FABP7, blau: Hoechst-Färbung der Zellkerne. KM: hCMEC/D3-Kultivierungsmedium, KM+NM: 1+1-Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium, NM: Neuronenmedium. Maßstab: 100 μ m.

4.5. 3D-Bioprinting auf dem Chip

Der vasQchip weist durch seinen Aufbau mit der Kanalstruktur in der Mitte und dem relativ großen umgebenden Kompartiment einen maximalen Abstand von etwa 12 mm zu beiden Seiten des Mikrokanals auf. *In vivo* beträgt der Abstand zwischen Blutgefäßen jedoch maximal 100-400 μ m.^[210] Für die Nachbildung eines *in vitro* Organs sind daher vor allem die Zellen in direkter Nachbarschaft zum Kanal von besonderem Interesse. Durch die Einbringung der Zellen über die Anschlüsse des umgebenden Kompartiments findet jedoch eine Verteilung der Zellen über die gesamte Fläche statt und eine gezielte Positionierung um den Kanal ist nicht möglich. Vor allem wenn mit sehr teuren Zellen gearbeitet wird, hat dies den Nachteil, dass mit einem sehr großen Überschuss gearbeitet werden muss. Dies wurde in Kapitel 4.2.2 durch die Besiedlung mit Perizyten gezeigt. Obwohl rechnerisch eine Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ HBVP für ein korrektes Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen ausreichen würde, um nur den Bereich um den Kanal zu besiedeln, werden für die

Besiedlung des gesamten unteren Kompartiments $25 \cdot 10^4$ HBVP benötigt. Experimentell wurde diese Zellzahl nochmals verdoppelt, da berücksichtigt wurde, dass durch den Besiedlungsprozess ein gewisser Prozentsatz an Zellen entweder wieder auf der gegenüberliegenden Seite hinausfließen oder am Deckglas anwachsen kann. Die anschließende Bestimmung der Zellzahl von Perizyten und Endothelzellen zeigte, dass dies zu einem korrekten Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander führte. Damit musste die 25-fache Menge der tatsächlich benötigten Zellzahl eingesetzt werden. Bei einer dreidimensionalen Kultivierung in einem Hydrogel muss entsprechend mit einem noch größeren Überschuss gearbeitet werden.

Bei der Einbringung eines Hydrogels, wie dies in Kapitel 4.4 durchgeführt wurde, ergibt sich zudem das Problem, dass die Anschlüsse verstopft werden und eine Durchspülung des umgebenden Kompartiments nicht mehr möglich ist. Für die Versorgung der Zellen spielt dies zwar eine untergeordnete Rolle, da diese über die Poren des Mikrokanals erfolgen kann, was in Kapitel 4.2.4.1 gezeigt wurde. Dennoch stellt dies ein Problem für einige anschließenden Untersuchungen dar. Immunfluoreszenzfärbungen können beispielsweise nicht über die Mikrofluidik durchgeführt werden, da der Verbrauch an Antikörpern zu hoch wäre und diese die intakte BBB darüber hinaus nicht überwinden können. Die gezielte und präzise Positionierung der Zellen um den Mikrokanal war daher von großem Interesse. Hierfür stellt der 3D-Biodruck eine geeignete Methode dar.

In Kollaboration mit Sonja Haase (AK Schepers, KIT, IFG) wurde ein Modell der BBB mithilfe des extrusionsbasierten 3D-Drucks erzeugt.^[195] Dabei erfolgte die präzise Platzierung von Perizyten und Astrozyten durch Einkapselung der Zellen in einer Photopolymerlösung. Diese Biotinte wurde dann in eine Kartusche gefüllt und durch Luftdruck auf die Kanalrückseite extrudiert. Der schematische Druckprozess über den Mikrokanal ist in Abbildung 96 dargestellt. Durch anschließende Besiedlung des Kanals mit Endothelzellen und den Anschluss an die Mikrofluidik wurde ein BBB-Modell generiert.

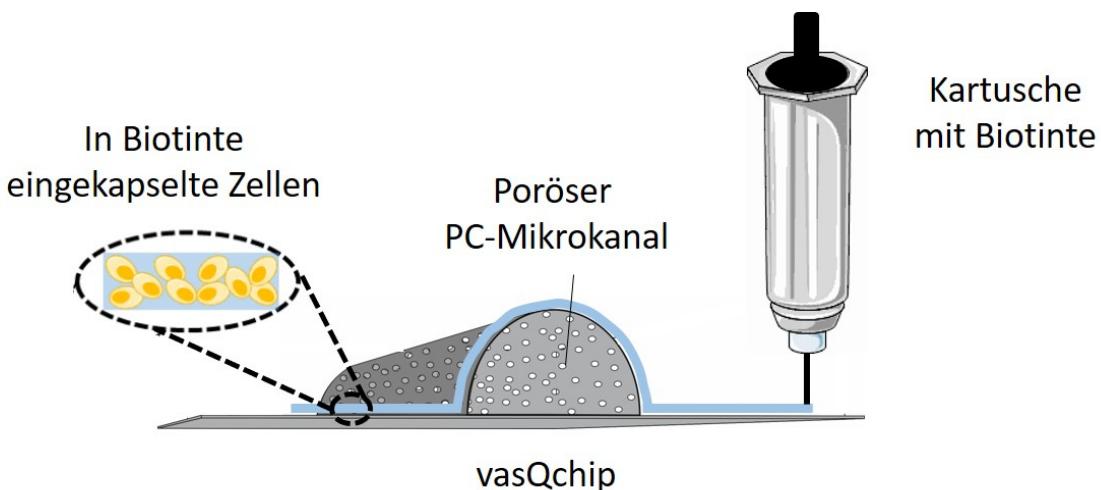


Abbildung 96 Schematische Darstellung des Druckprozesses. Die in der Biotinte eingekapselten Zellen wurden mithilfe des 3D-Druck schichtweise über die Kanalstruktur des vasQchips aufgebracht.

Im ersten Schritt sollten eine Testung der Druckparameter und der Zellpositionierung erfolgen. Zur späteren Unterscheidung der beiden Zelltypen wurde zunächst eine Zytosolfärbung durchgeführt, wobei die Perizyten mit CellTracker™ Green, die Astrozyten mit CellTracker™ Red angefärbt wurden. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in der Photopolymerlösung (5 % GelMA medium, 0,3 % LAP) resuspendiert. Dabei wurde

Ergebnisse

eine relativ hohe Zellzahl verwendet, da diese bereits für den Druckprozess optimiert wurde. Die so vorbereiteten Lösungen wurden in eine Druckerkartusche überführt und in den Extrusionsdruckkopf des Bioprinters 3D Discovery Gen1 (regenHU) mit angeschlossenem Kühlungssystem eingesetzt. In einem schichtweisen Verfahren wurden zuerst eine Schicht mit Perizyten und anschließend eine Schicht mit Astrozyten gedruckt. Jede Schicht wurde dabei mit der Osram Ultra Vitalux 300W E27 (Strahlungsleistung: 280-315 nm, 3 W, 315-400 nm, 13,6 W) für 30 s ausgehärtet. Nach erfolgtem Druckprozess wurde das umgebende Kompartiment mit einem Deckglas verschlossen, mit Kultivierungsmedium befüllt und die Positionierung der beiden Zelltypen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 500 µm seitlich des Mikrokanals aufgenommen. Dies ist zusammen mit der gedruckten Struktur in Abbildung 97 dargestellt.

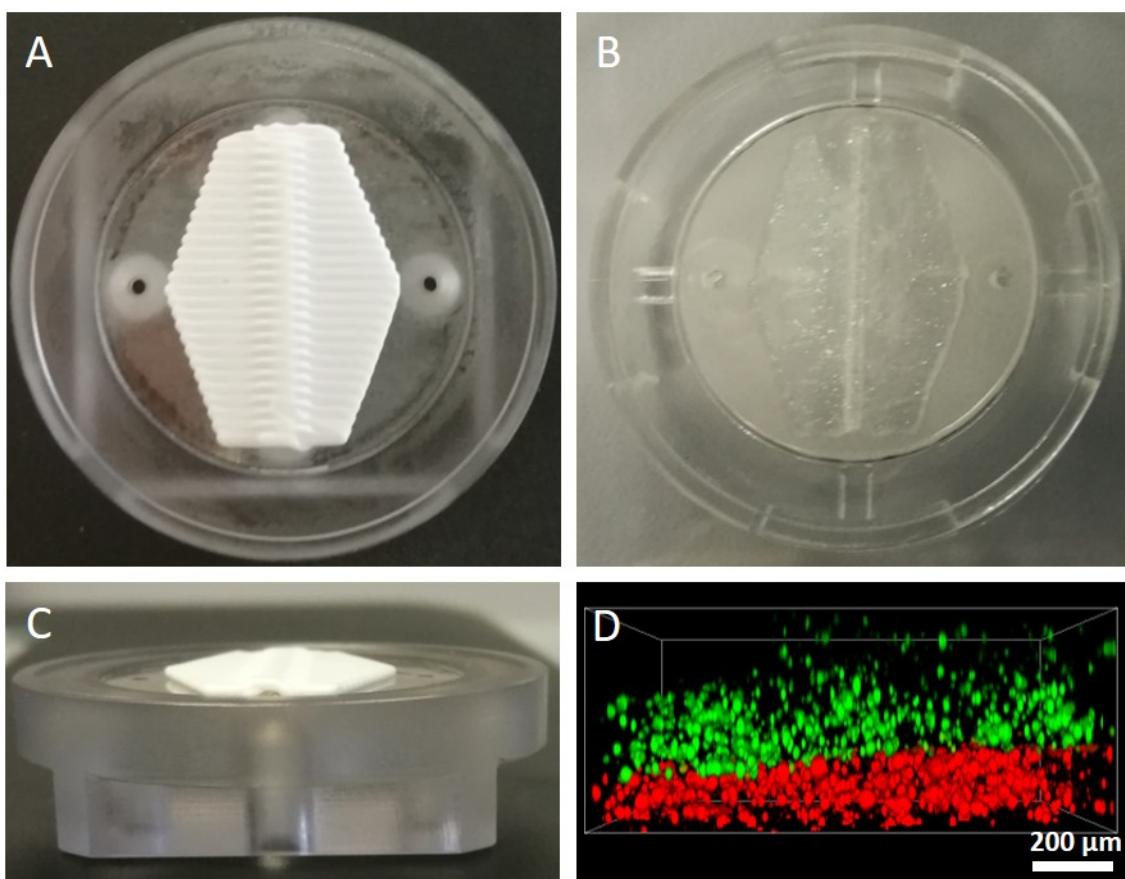


Abbildung 97 3D-gedruckte Konstrukte auf dem vasQchip. (A, C) Darstellung der 3D-gedruckten Struktur mit NIVEA-Creme. (B) HBVP und HA enthaltendes Hydrogel auf dem vasQchip. (D) Positionierung der HBVP (CellTracker™ green, grün) und HA (CellTracker™ red, rot) innerhalb des gedruckten Hydrogels (Aufnahme mit dem Leica TCS SPE DMI4000B, 60 Z-Stacks mit Abstand=5 µm, h=300 µm) Maßstab: 200 µm. In Kollaboration mit S. Haase.^[195]

In Abbildung 97 B ist die gedruckte Hydrogelstruktur mit eingekapselten Perizyten und Astrozyten dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Struktur zudem mit NIVEA-Creme gedruckt. Dies ist in Teilabbildung A und C dargestellt. Es wurde bei der Wahl der Struktur und der Erstellung des Druckprotokolls darauf geachtet, dass die Löcher der Anschlüsse frei bleiben, um so eine Durchspülung des umgebenden Kompartiments zu ermöglichen. Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass auch bei einem starken Quellen des Hydrogels noch ausreichend Platz bleibt. Die seitliche Darstellung in Teilabbildung C zeigt die Erhebung der gedruckten Struktur über dem Mikrokanal. Teilabbildung D zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gedruckten

Zellen in einer seitlichen Ansicht, wobei sich der Mikrokanal links oben befindet (seitliche Ansicht wie in Teilabbildung C, aber um 180 ° gedreht). Dies kann durch die halbrunde Struktur erkannt werden, um die die gedruckten Zellen angeordnet sind. Die beiden gedruckten Zellschichten waren deutlich zu erkennen und klar voneinander abgegrenzt. Eine Vermischung der beiden Strukturen war nicht detektierbar. Somit konnte die erfolgreiche Positionierung der beiden Zellschichten mit Hilfe des extrusionsbasierten 3D-Drucks bestätigt werden.

Im nächsten Schritt wurde ein vollständiges BBB-Modell inklusive Perizyten, Astrozyten und Endothelzellen mithilfe des 3D-Drucks auf dem vasQchip aufgebaut. Dazu wurden die beiden Hydrogele GelMA *medium* sowie GelNB/GelS *medium* hinsichtlich ihrer Eignung für den 3D-Druck von Perizyten und Astrozyten untersucht. Die Zellen wurden separat in den 5 %-igen Photopolymerlösungen vorgelegt und die Biotinte in die Druckerkartuschen überführt. Dabei wurden der Biotinte für GelMA 0,3 % LAP zugesetzt, für GelNB/GelS 0,03 %. Wie oben beschrieben, wurde zunächst eine Schicht Perizyten, dann eine Schicht Astrozyten gedruckt. Zur Vermeidung von Luftblasen durch den Temperaturunterschied wurden die so bedruckten Chips vor der Beschichtung und Besiedlung des Mikrokanals offen für eine Stunde im Inkubator äquilibriert. Um das Austrocknen des Hydrogels während dieser Zeit zu verhindern und die Versorgung der Zellen zu gewährleisten, wurden diese mit 1 ml Medium überschichtet. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen, das umgebende Kompartiment mit einem Deckglas verschlossen und mit Zellkulturmedium befüllt. Zur Beschichtung des Kanals wurde eine Kollagen I-Lösung eingesetzt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend folgte die Besiedlung des Mikrokanals mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 und der Anschluss an die Fluidik. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen für sieben Tage mit einer Flussrate von 100 µl/h. Für die Kultivierung wurde das hCMEC/D3-Kultivierungsmedium eingesetzt, welches nach 48 h durch das Differenzierungsmedium ersetzt wurde. Nach einem sowie sieben Tagen wurde eine Lebed/Tot-Färbung durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich der Druckprozess negativ auf die Zellviabilität auswirkt. Dazu wurden die Zellen mit Calcein-AM und PI gefärbt und anschließend durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Es wurden jeweils Z-Stacks mit einer Höhe von 500 µm seitlich des Mikrokanals aufgenommen. Die 3D-rekonstruierten Aufnahmen sind in Abbildung 98 dargestellt.

Beim Vergleich der beiden Hydrogele konnten im GelNB/GelS-Hydrogel einen Tag nach dem Druckprozess neben einer höheren Anzahl lebender bereits einige ausgerichtete Zellen detektiert werden, während die Zellen im GelMA-Hydrogel noch eine runde Morphologie aufwiesen. Die erhöhte Zahl an toten Zellen im GelMA-Hydrogel könnte zwar auf den Druckprozess zurückgeführt werden, da die Zellen im Vergleich zur manuellen Herstellung der Hydrogele relativ lange in der unvernetzten Polymerlösung vorliegen. Dadurch können die einzelnen Bestandteile (Photoinitiator, Photopolymer) mit den Zellen reagieren und eine negative Auswirkung auf die Zellviabilität haben (siehe Kapitel 4.3.2.2). Neben der höheren Photoinitiatorkonzentration, die zur Polymerisation von GelMA im Vergleich zu GelNB/GelS benötigt wird, können auch die Methacrylatgruppen des Polymers mit Zellbestandteilen reagieren und dadurch die Zellviabilität beeinflussen. Da es sich beim vorliegenden Experiment jedoch lediglich um einen ersten Druckversuch handelt, und die Zellviabilität nach sieben Tagen in beiden Hydrogelen vergleichbar hoch war, müsste dies mit einer größeren Probenanzahl genauer überprüft werden. Nach sieben Tagen konnte im GelMA-Hydrogel ebenfalls eine Ausrichtung einiger Zellen detektiert werden, diese war jedoch weniger stark ausgeprägt als im GelNB/GelS-Hydrogel. Dies bestätigt die in den statischen Versuchen gezeigten

Ergebnisse

Ergebnisse, bei denen ebenfalls eine schnellere und stärkere Ausrichtung in den GelNB/GelS-Gelen im Vergleich zu GelMA festgestellt wurde.

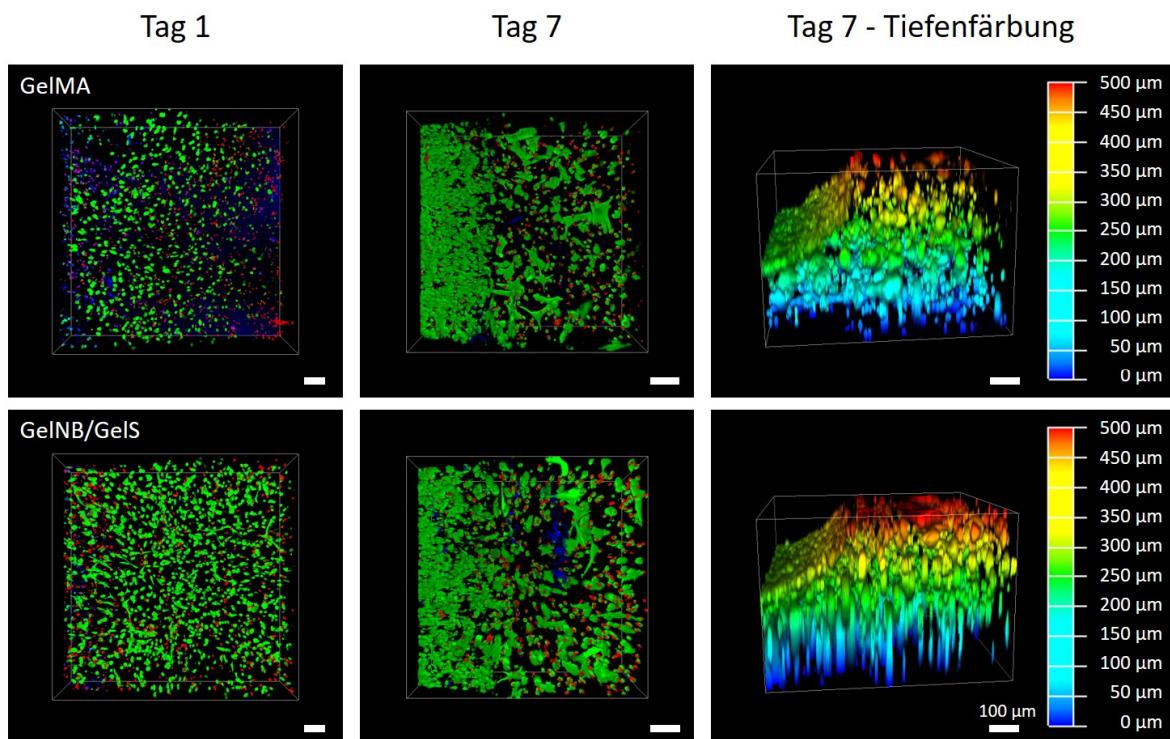


Abbildung 98 Lebend/Tot-Färbung der 3D-gedruckten BBB im *vasQchip*. HBVP und HA wurden durch extrusionsbasierten 3D-Druck in den Hydrogelen GelMA medium (5 %, 0,3 % LAP, $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und GeNB/GelS medium (5 %, 0,03 % LAP, $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) über den Mikrokanal des *vasQchip*s gedruckt. Der Mikrokanal (1 mg/ml Kollagen I, 10 µg/cm²) wurde anschließend mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt und unter Standardbedingungen für sieben Tage mit einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. Nach einem sowie nach sieben Tagen wurde eine Lebend/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie (Leica TSC SPE, Objektiv 10x/dry, Zoom 1 (Tag 1), Zoom 1,5 (Tag 7)) durch Aufnahme von Z-Stacks (n=60, Abstand=5 µm, h=300 µm). Die 3D-Rekonstruktion erfolgte mit der Leica LasX-Software. Maßstab: 100 µm, Skalierung der Tiefenkodierung: 50 µm, blau = 0 µm, rot = 500 µm. In Kollaboration mit S. Haase.^[195]

Der erfolgreiche Aufbau eines BBB-Modells durch Kombination von 3D-Druck mit der Organ-on-Chip-Technologie konnte dadurch in einem *Proof-of-principle*-Ansatz gezeigt werden. Zukünftig wäre die Kombination verschiedener Printing-Techniken möglich, um die *in vivo* Situation noch besser nachzubilden und die benötigte Zellzahl zu reduzieren. Dabei wäre eine noch gezieltere Positionierung und planare Anordnung der Perizyten durch Inkjet- oder Laserbasierte Druckmethoden denkbar. In einem anschließenden extrusionsbasierten Druck könnte eine Mischung aus Neuronen und Astrozyten im Hydrogel gedruckt werden, um das komplexe Netzwerk im Gehirn dreidimensional nachzubilden.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines humanen, vaskularisierten *in vitro* Modells der NVU. Zur Nachbildung des Organsystems wurde hierfür der vasQchip eingesetzt. Dieser beruht auf einem halbrunden, porösen Kanal, der mit Hilfe des SMART-Prinzips hergestellt wird. Der Vorteil im Vergleich zu vielen bereits existierenden Modellen liegt dabei vor allem in der besseren Nachahmung der *in vivo* Struktur eines gekrümmten Blutgefäßes. Viele bereits existierende Modelle basieren auf eckigen Kanalstrukturen. Durch Fluss-Simulationen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verteilung von Scherkräften in elliptischen und halbrunden Kanalprofilen deutlich gleichmäßiger über die gesamte Kanalwand verteilt ist als dies bei eckigen Kanalprofilen der Fall ist.^[28] Auch auf die Zellmorphologie und -funktion hat eine gekrümmte Oberfläche einen Einfluss.^[167] Die Porosität des Kanals erlaubt darüber hinaus einen Austausch von Stoffen mit umliegendem Gewebe und die Interaktion der Zellen miteinander. Während Blutgefäße *in vivo* von Endothelzellen gebildet werden, muss zur Nachbildung *in vitro* eine entsprechende Stützstruktur zur Verfügung gestellt werden. Dies erschwert den direkten Kontakt der Endothelzellen mit den Zellen des umliegenden Gewebes. Durch die Verwendung einer sehr dünnen und porösen Membran kann dies jedoch trotzdem gewährleistet werden. Die Poren können je nach Organ in der Größe angepasst werden und erlauben so eine bestmögliche Nachbildung verschiedener Blutgefäßtypen. Zusammen mit der Möglichkeit der fluidischen Kultivierung stellt dieses System ein geeignetes Modell zur organotypischen Nachbildung kleinsten funktioneller Organeinheiten dar. Die Verwendung einer dünnen, transparenten PC-Folie zur Erzeugung des Mikrokanals ermöglicht darüber hinaus eine direkte Visualisierung der Zellen durch Mikroskopie.

Erste Arbeiten zum Endothel und der BBB im vasQchip wurden durch I. Hebeiß (2012) und D. Ivannikov (2015) durchgeführt.^[63,64] I. Hebeiß zeigte in ihrer Dissertation die erfolgreiche Kultivierung einer HUVEC-Endothelzellschicht im Mikrokanal. Dabei konnte sie nachweisen, dass durch die Kultivierung unter Flussbedingungen eine Ausrichtung der Zellen sowie eine verringerte Expression von Adhäsionskontakten erfolgte.^[64] D. Ivannikov führte diese Untersuchungen in ihrer Dissertation weiter und etablierte erfolgreich eine Ko-Kultur aus Endothelzellen (HUVEC), Perizyten (hPC-PL) und Astrozyten (HA). Dieses erste BBB-Modell im vasQchip zeigte typische physiologische Eigenschaften wie eine verringerte Proliferation und metabolische Aktivität im Vergleich zu einer statischen Kultivierung. In einem ersten Versuch mit hirnspezifischen Endothelzellen (hCMEC/D3) konnte zudem die Funktionalität der Efflux-Pumpe P-gp erfolgreich nachgewiesen werden.^[63] Hierbei handelte es sich jedoch lediglich um einen *Proof-of-Principle*-Versuch zur Einsetzbarkeit mikrovaskulärer Endothelzellen. Zudem wurden weiterhin Perizyten aus der Plazenta verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte daher eine weitere Etablierung und Charakterisierung der mikrovaskulären, hirnspezifischen Endothelzellschicht sowie der Einsatz hirnspezifischer Perizyten und Astrozyten. Darüber hinaus wurde das Modell durch die Inkorporation von Neuronen und einer Matrix ergänzt.

Der erste Schritt in der Entwicklung des NVU-Modells bestand in der Etablierung der Endothelzellschicht. Da Hirnendothelzellen einige besondere Merkmale aufweisen und sich durch eine besonders dichte Barriere auszeichnen, wurden zunächst zweidimensional verschiedene

Diskussion

Bedingungen untersucht, um die Bildung einer solchen Barriere zu gewährleisten. Für die Nachbildung des Blutgefäßes wurde hierfür die immortalisierte Zelllinie hCMEC/D3 eingesetzt. Zunächst wurden verschiedene Beschichtungen zur Kultivierung der hCMEC/D3 auf der PC-Folie untersucht, da diese im vasQchip zum Einsatz kommt und Eigenmann *et al.* in einer Studie mit mehreren immobilisierten humanen Hirnendothelzelllinien zeigen konnten, dass das Kultivierungsmaterial sowie die Beschichtung mit Matrixproteinen einen Einfluss auf die Barrierefunktion haben.^[143] Ein ähnliches Ergebnis erzielten auch Tilling *et al.* die eine entsprechende Studie mit Endothelzellen aus porcinen Hirnkapillaren bereits 1998 durchführten. Auch sie zeigten durch TEER-Messungen einen Einfluss des Beschichtungsmaterials auf die Barrierefunktion.^[145] Es wurden daher sechs verschiedene Beschichtungen gewählt und untereinander sowie mit einer unbeschichteten Folie verglichen. Untersucht wurden dabei Faktoren, wie die Adhäsionsgeschwindigkeit, die Genexpression wichtiger *Tight Junction*-Proteine, wie beispielsweise CD31, Claudin-5 oder Occludin sowie die parazelluläre Dichtigkeit. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Beschichtung der PC-Folie in jedem Fall notwendig ist, um eine schnelle und gleichmäßige Adhäsion zu unterstützen. Auch eine verstärkte Genexpression sowie ein Einfluss auf den parazellulären Transport konnte nachgewiesen werden. Dies bestätigte die durch Eigenmann *et al.* festgestellten Einflüsse des Kultivierungsmaterials. Für die Kultivierung von hCMEC/D3 auf PC erwiesen sich dabei Kollagen I sowie Fibronectin als besonders geeignete Materialien zur Beschichtung. Beide (Glyko-)Proteine kommen zwar *in vivo* in der Basalmembran nicht vor, führen jedoch zu einer schnellen und gleichmäßigen Adhäsion der Zellen an die PC-Folie sowie zu einem erhöhten mRNA-Level wichtiger Proteine und zeigten ähnliche Permeabilitätskoeffizienten für LY, die ebenfalls aus der Literatur bekannt sind.^[146] Vor allem Kollagen I wird auch in der Literatur häufig zur Beschichtung für hCMEC/D3 verwendet und darüber hinaus vom Hersteller empfohlen.^[146]

Einen zusätzlichen Einfluss auf die Barrierefunktion können auch Wachstumsfaktoren im Kulturmedium haben. Das normale Medium, das zur Kultivierung von hCMEC/D3 eingesetzt wird, enthält neben den Wachstumsfaktoren EGF (*Endothelial Growth Factor*), bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*) und VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) zusätzlich 2,5 % FCS. Durch die Reduktion der Wachstumsfaktoren im Medium können die Zellen, ähnlich wie bei einer fluidischen Kultivierung, in einen quasi-statischen Zustand versetzt werden, wodurch die Bildung einer dichten Barriere induziert wird.^[134] Um diesen Einfluss in hCMEC/D3 zu untersuchen, wurde das gleiche Basalmedium wie zur Kultivierung verwendet; diesem wurden jedoch keine Wachstumsfaktoren zugesetzt sowie eine geringere Menge an FCS (0,25 %). Ein Vergleich der Genexpression verschiedener Proteine, die für die Barrierefunktion wichtig sind, zeigte für die Kultivierung im Wachstumsfaktor-reduzierten Medium eine höhere Expression von CD31, VE-Cadherin, Claudin-5 und ZO-1 als im normalen Medium.

Das Entfernen der Wachstumsfaktoren aus dem Medium hat jedoch auch einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Ohne die für das Wachstum wichtigen Faktoren teilen sich die Zellen nur noch begrenzt. Für die Einbringung in den Mikrokanal war es daher wichtig eine Zellzahl zu wählen, bei der die Zellen bereits möglichst konfluent die gesamte Oberfläche bedeckten. Hierfür erwies sich eine Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ als geeignet; die Zellen bedeckten einen Großteil der Kanaloberfläche, hatten jedoch weiterhin genug Platz, um sich vollständig auszurichten. Durch die kontinuierliche Drehung für eine Stunde mithilfe einer eigens dafür vorgesehenen Konstruktion, konnte eine gleichmäßige Besiedlung der gesamten Kanaloberfläche erreicht werden. Nach vier Tagen

fluidischer Kultivierung, die zunächst für 48 h noch mit dem Kultivierungsmedium und anschließend weitere 48 h mit dem Wachstumsfaktor-reduzierten Medium stattfand, konnte ein gut ausgebildet Netzwerk aus *Tight Junctions* und eine lückenlose Zellschicht nachgewiesen werden. Die Zellzahl konnte damit im Vergleich zu den ersten Versuchen mit mikrovaskulären Endothelzellen, die durch D. Ivannikov durchgeführt wurden, um 94 % von $1,25 \cdot 10^6$ auf $7,5 \cdot 10^4$ gesenkt werden.^[63] Vor allem in Bezug auf Hochdurchsatzverfahren ist dies von Vorteil, da neben der geringeren benötigten Zellzahl auch der Verbrauch an Kultivierungsmaterialien und Medien gesenkt werden kann.

Nach der Bestimmung geeigneter Parameter zur Einbringung und Kultivierung der Zellen im Mikrokanal bestand der nächste Schritt in der Integration mechanischer Stimuli durch die Erzeugung eines artifiziellen Blutstroms. Es ist bekannt, dass neben der korrekten dreidimensionalen Mikroumgebung auch mechanische Reize eine wichtige Funktion bei der Ausbildung korrekter morphologischer und funktioneller Charakteristika haben. Vor allem Zellen des Blutgefäßsystems sind *in vivo* einem ständigen Reiz durch den Blutfluss ausgesetzt, der die Erzeugung von Scherkräften bewirkt. Es handelt sich dabei um eine mechanische Kraft, die durch die Reibung zwischen dem fließenden Blut und der apikalen Zellmembran entsteht und parallel zum umliegenden Endothel in Richtung des Blutflusses wirkt. Der Einfluss von Scherstress wurde bereits vielfach, auch für die BBB, untersucht und ist hinreichend belegt. Neben Veränderungen in der Genexpression wirkt sich der Scherstress auch auf die Morphologie der Zellen aus. Im Gegensatz zur statischen Kultivierung, bei der Endothelzellen häufig eine kopfsteinpflasterartige Morphologie aufweisen, führt die Wirkung von Scherkräften zur Ausbildung länglicher Morphologien entlang des Flusses.^[100–103] Aus diesem Grund geht der Trend der aktuellen Forschung weg von statischen Modellen und viele Forschungsgruppen integrieren bereits mikrofluidische Systeme.^[67,71,211,212]

Um die hCMEC/D3 im vasQchip mechanischen Reizen auszusetzen, wurde zunächst eine Spritzenpumpe verwendet und eine Flussgeschwindigkeit von 100 µl/h gewählt. Diese Methode der Kultivierung wurde von I. Ivannikov übernommen, die für das so kultivierte mikrovaskuläre Endothel die Funktionalität der Efflux-Pumpe P-gp nach sieben Tagen im Mikrokanal nachwies.^[63] Im Hinblick auf die Einbringung von Neuronen in einer Matrix sollte jedoch festgestellt werden, ob eine Kultivierung mit den zuvor untersuchten Bedingungen auch über längere Zeiträume von 14 Tagen möglich ist. Da durch RT-qPCR-Untersuchungen gezeigt wurde, dass die Reduktion von Wachstumsfaktoren zu einer verstärkten Expression wichtiger *Tight Junction*-Proteine führte, erfolgte nach 48 h eine Umstellung des Mediums in den Spritzen. Eine Lebend/Tot-Färbung nach sieben bzw. 14 Tagen zeigte dabei dicht ausgebildete Zelllayer mit überwiegend viablen Zellen. Da eine Einbringung von Neuronen in einer Matrix in den Chip geplant war, war dies ein wichtiges Kriterium. Je nach Art der gewählten Matrix kann eine Ausrichtung der Zellen und Netzwerkbildung einige Zeit in Anspruch nehmen. Eine längere Kultivierungsdauer wurde jedoch nicht untersucht, da dies zu einem enorm hohen Mediumverbrauch führen würde und für Hochdurchsatzverfahren nicht geeignet wäre.

Zur Untersuchung der Funktionalität der Barriere wurde ein Transporterassay mit Lucifer Yellow durchgeführt, der zeigen sollte, ob eine dichte parazelluläre Transportbarriere gebildet wurde. Die Untersuchung der Permeabilität für die fluidisch kultivierten Zellen führte dabei zu einem knapp 6-fach höheren Permeabilitätskoeffizienten als in der statischen Kultur. Dies widerspricht den Erwartungen, dass bei einer fluidischen Kultivierung eine dichtere Barriere ausgebildet werden sollte. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass eine direkte Vergleichbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Versuchsaufbauten nur bedingt möglich ist. So wurden für die fluidische

Diskussion

Kultivierung Porengrößen von 1 µm verwendet, während die statische Kultivierung in Transwells mit einer Porengröße von 0,4 µm durchgeführt wurde. Weiterhin unterschieden sich die beiden Experimente in der Konzentration der Beschichtungslösung, der Kultivierungsdauer und der Geometrie der verwendeten Kultivierungsmaterialien und damit auch in Wachstumsfläche und Zellzahl. Ein lückenhafter Zelllayer, der durch die Hoechst-Färbung nach Beendigung des Assays nachgewiesen wurde, schränkte die Aussagekraft des Experiments zusätzlich ein. Um eine Aussage über den Einfluss der fluidischen Kultivierung auf die parazelluläre Transportbarriere treffen zu können, müsste der Versuch zukünftig mit angepassten Bedingungen wiederholt werden.

Da die Flussrate von 100 µl/h nur eine Scherkraft von 0,0264 dyn/cm² erzeugt und damit im Vergleich zur Scherkraft *in vivo*, die bei 3-95 dyn/cm² liegt, sehr niedrig war, erfolgte eine Anpassung der Flussrate an physiologische Bedingungen.^[175] Durch den Aufbau der Spritzenpumpe, bei der das Medium aus einer Spritze durch den Kanal gespült und anschließend in einem Abfallbehälter aufgesammelt wird, eignet sich diese Art der Kultivierung nur für sehr niedrige Flussrate. Eine Möglichkeit des Zurückleitens des Mediums ohne einen Richtungswechsel des Fluxes ist nicht möglich. Bei höheren Flussraten wäre der Mediumverbrauch daher deutlich zu hoch und je nach Flussrate eine erneute Befüllung der Spritzen bereits nach wenigen Minuten erforderlich. Zur Verwendung höherer Flussraten wurde aus diesem Grund eine Peristaltikpumpe gewählt, bei der das Medium aus einem Reservoir konstant im Kreis gepumpt wurde. Dies erlaubte neben einem deutlich niedrigeren Mediumverbrauch auch die Anreicherung spezieller Stoffe im Medium. Einerseits ist dies für Arzneimitteluntersuchungen vorteilhaft, da so nur geringe Mengen des zu untersuchenden Stoffes benötigt werden. Andererseits können so auch von den Zellen sekretierte Stoffe, wie Wachstumsfaktoren, angereichert werden. Gleichzeitig muss jedoch bedacht werden, dass auch Abfallstoffe anreichern, deren „Abtransport“ erst mit dem Austausch des Mediums im Reservoir erfolgt.

Eine erste Untersuchung zur Verwendung höherer Flussraten zeigte bei einer stufenweisen Erhöhung des Fluxes alle 24 h um 50 µl/min auch nach 10 Tagen und einer Geschwindigkeit von 500 µl/min noch dichte Zelllayer. Im Vergleich zur statischen Kultivierung konnte mit zunehmender Geschwindigkeit außerdem eine länglichere Zellmorphologie in Richtung des Fluxes festgestellt werden. Dieser Effekt ist bereits lange bekannt und wurde für verschiedene Endothelzellen gezeigt.^[213,214] Auch I. Hebeiß konnte in ihrer Dissertation durch die fluidische Kultivierung von HUVEC im vasQchip eine Ausrichtung der Zellen parallel zum Mediumfluss nachweisen.^[64] Dennoch steht diese Beobachtung im Widerspruch zur Literatur für Hirnendothelzellen. So zeigten Ye *et al.* (2014) in einer Untersuchung mit humanen mikrovaskulären Hirnendothelzellen (HBMEC), dass diese im Vergleich zu HUVEC keine veränderte Morphologie durch die Wirkung von Scherstress aufwiesen. Reinitz *et al.* (2015) bestätigten dieses Ergebnis in einer separaten Studie, in der ebenfalls die Wirkung von Scherstress auf die Morphologie von HBMEC untersucht wurde. Beide Gruppen kamen zu dem Schluss, dass dies möglicherweise mit der Besonderheit der BBB zusammenhängt. Da das Netzwerk aus *Tight Junctions* durch die Morphologie der Endothelzellen definiert ist, vermuteten Ye *et al.*, dass es einen evolutionären Vorteil haben könnte, der Ausdehnung durch Scherstress standzuhalten, indem die Gesamtlänge der Zell-Zell-Verbindungen minimiert wird.^[215,216] Da die Beobachtung der Zellausrichtung in dieser Arbeit damit einerseits im Widerspruch zur Literatur steht und andererseits lediglich auf der lichtmikroskopischen Beurteilung einer sehr kleinen Stichprobe basiert, müssten hier genauere Untersuchungen durchgeführt werden. Um festzustellen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Flussgeschwindigkeit

und der Zellmorphologie besteht, müssten in einem größeren Probenumfang statisch kultivierte Zellen mit fluidisch kultivierten Zellen verglichen werden. Dazu würde sich beispielsweise eine Färbung von *Tight Junction*-Proteinen oder des Zytoskeletts eignen. Während unter statischen Bedingungen eine kopfsteinpflasterartige Anordnung zu beobachten ist, findet bei einer Ausrichtung aufgrund wirkender Scherkräfte eine parallele Anordnung in Richtung des Flusses statt. Mit dieser Untersuchung konnte zwar gezeigt werden, dass die Anwendung hoher Flussraten prinzipiell möglich ist, die langsame Steigerung führte allerdings dazu, dass die physiologisch interessante Flussrate erst nach sehr langer Zeit erreicht wurde. Grundsätzlich soll diese Flussrate jedoch möglich schnell erreicht werden, um so eine Kultivierung unter diesen Bedingungen über einen möglichst langen Zeitraum zu ermöglichen. Ein direkter Start bei hoher Flussrate hingegen ist ebenfalls nicht ratsam, da durch das sehr kleine Volumen des Kanals ein plötzlicher und sehr starker Druck auf den Zelllayer wirken würde. Dies könnte wiederum dazu führen, dass sich die Zellschicht ablöst. Als Kompromiss wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Steigerung innerhalb von 48 h untersucht, um so ein Ablösen der Zellen zu vermeiden und gleichzeitig eine möglichst lange Kultivierung unter physiologischen Bedingungen zu erlauben. Dabei wurde ein Zeitraum von 48 h gewählt, da nach dieser Zeit typischerweise ein Austausch des Mediums und eine Umstellung auf ein Wachstumsfaktor-reduziertes Medium erfolgte. Die Färbung der Zellen nach 48 h zeigte dicht ausgebildete Zelllayer für die beiden untersuchten Beschichtungen Kollagen I und Fibronektin. Im nächsten Schritt wurde eine Langzeitkultivierung von sieben und 14 Tagen durchgeführt. Auch nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen waren kaum tote Zellen, dafür ein dicht ausgebildeter Layer mit viablen Zellen zu beobachten. Dies zeigte sich allerdings nur bei der Verwendung des normalen hCMEC/D3-Kultivierungsmediums. Eine Umstellung auf das Wachstumsfaktor-reduzierte Medium führte zu relativ großen Löchern im Zelllayer. Für die Nachbildung des dichten BBB-Endothels war dies daher nicht geeignet. Da in weiterführenden Versuchen eine lückenhafte Zellauskleidung bei einer Umstellung des Mediums bestätigt werden konnte und teilweise sogar zur kompletten Ablösung des Zelllayers führte, wurde für die Kultivierung bei hoher Flussrate auf die Umstellung verzichtet.

Eine weitere Steigerung der Flussrate auf 1000 µl/min war unter den untersuchten Bedingungen im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich.

Um den Einfluss der Flussrate und der dadurch wirkenden Scherkräfte auf die Ausbildung einer dichten Barriere zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Flussraten und eine statische Kultivierung im Chip auf molekularbiologischer Ebene miteinander verglichen. Hierzu wurde die Genexpression wichtiger Marker, wie *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* sowie spezieller Efflux-Pumpen, durch eine RT-qPCR untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD31 und VE-Cadherin zwar mit steigender Flussrate zunahm, ZO-1 wies hingegen keine deutliche Änderung auf. Die Expression von BCRP und Occludin (bei 500 µl/min) war im Vergleich zur statischen Kultivierung sogar niedriger. Dies widerspricht zwar Ergebnissen, die aus der Literatur für eine andere Endothelzelllinie gezeigt wurden, ein Vergleich mit *in vivo* Werten kann jedoch nicht gezogen werden.^[100,133] Einerseits handelt es sich bei den ermittelten Werten nicht um absolute, sondern um relative Quantitäten in Bezug auf eine festgesetzte Bedingung, in diesem Fall die statische Kultivierung. Darüber hinaus fehlt es an umfangreichen Daten für die Expression *in vivo* im Gehirn sowie vergleichenden Expressionsprofilen zur statischen Kultivierung verschiedener Endothelzellen *in vitro*. Einzelne Studien hierzu existieren zwar, dennoch bräuchte es für eine ausführliche und fundierte Beurteilung weitere Daten.^[217,218] Eine abschließende Beurteilung in

Diskussion

Bezug auf die *in vivo* Bedingungen kann daher nicht getroffen werden, dennoch entspricht die Kultivierung unter fluidischen Bedingungen eher der *in vivo* Situation und ist aus diesem Grund zu bevorzugen. Eine zusätzliche Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren konnte die aus den statischen 2D-Untersuchungen gewonnenen Daten bestätigen. Die Reduktion von Wachstumsfaktoren im Medium führte zu erhöhten mRNA-Leveln der untersuchten Proteine (außer Occludin und BCRP bei einer Flussarte von 5 µl/min).

Nach der erfolgreichen fluidischen Kultivierung der Endothelzellen wurden im nächsten Schritt weitere Zellen der NVU in das Modell eingebracht. Hierfür wurde das Modell zunächst um Perizyten und Astrozyten ergänzt, da diese in direkter Nachbarschaft zum Endothel liegen und damit in direktem Kontakt zu diesem stehen. Verschiedene Studien belegen zudem deren Einfluss auf die Barriereförderung der BBB.^[107,108,111–114] Um eine möglichst gute Übertragbarkeit des Modells auf den Menschen zu erlauben, wurden humane, hirnspezifische Perizyten und Astrozyten (HBVP und HA) gewählt.

Da Zellen *in vitro* durch spezifische Nährmedien kultiviert werden, die speziell an die Bedürfnisse einzelner Zellen angepasst sind, eine Ko-Kultur jedoch verschiedene Zelltypen enthält, musste zunächst ein geeignetes Nährmedium für die Ko-Kultur aus hCMEC/D3, HA und HBVP bestimmt werden. Hierzu wurden die verschiedenen zellspezifischen Medien für HA, HBVP und hCMEC/D3 untersucht. In Hinblick auf eine spätere Einbringung von Neuronen wurde zudem das neuronenspezifische Medium sowie eine Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium analysiert. Da angenommen wurde, dass Neuronen als sensible Zellen auf die Verwendung des spezifischen Mediums angewiesen sind, war vor allem interessant zu untersuchen, ob sich das Neuronenmedium alleine oder in der Mischung mit Endothelzellmedium für die Kultivierung des Ko-Kultur-Modells eignet. Dabei wurde eine Proliferationsanalyse durch einen PrestoBlue-Assay, eine Viabilitätsbestimmung durch Lebend/Tot-Färbung sowie eine morphologische Charakterisierung durch Immunfluoreszenzfärbung spezifischer Strukturen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Neuronenmedium alleine zwar nicht für das Ko-Kultur-Modell eignete, die Mischung mit Endothelzellmedium jedoch einen guten Kompromiss darstellte. Für alle untersuchten Zelltypen konnte weiterhin eine Teilungsfähigkeit, eine hohe Viabilität nach sieben Tagen sowie die Ausbildung typischer morphologischer Charakteristika bestätigt werden.

Die Etablierung der Ko-Kultur erfolgte Schritt-für-Schritt zunächst durch die Einbringung von Perizyten, da diese *in vivo* in direkter Nachbarschaft flach um das Endothel angeordnet sind. Im Anschluss erfolgte die Einbringung der Astrozyten, die *in vivo* lediglich über die Astrozytenendfüßchen mit dem Endothel in Kontakt stehen und die Verbindung zu den Neuronen herstellen.

Perizyten teilen sich *in vivo* eine Basalmembran mit den Endothelzellen. Für ein Kontaktmodell im vasQchip wurden daher zwei verschiedene Möglichkeiten für die Ko-Kultur untersucht. Um einen direkten Kontakt von Perizyten zu Endothelzellen zu gewährleisten, erfolgte die Einbringung der Perizyten in einem ersten Versuch in den Mikrokanal. Als Beschichtung wurde Kollagen I gewählt, da dieses einerseits für die Kultivierung der Endothelzellen verwendet wurde und gleichzeitig für eine schnelle und gleichmäßige Adhäsion der Perizyten an die PC-Oberfläche sorgte. Auf diese Perizytenschicht wurden die Endothelzellen ausgesät und die so besiedelten Mikrokanäle unter fluidischen Bedingungen kultiviert. Dabei konnte nach sieben Tagen beobachtet werden,

dass die Zellen innerhalb des Kanals sehr ungleichmäßige Strukturen bildeten, teilweise in Clustern übereinander wuchsen und große Löcher innerhalb des Zelllayers aufwiesen. Eine Ko-Kultur von Perizyten und Endothelzellen im Mikrokanal war aus diesem Grund unter den untersuchten Bedingungen nicht möglich. Um dennoch einen Kontakt der beiden Zelltypen zueinander herzustellen, erfolgte die Kultivierung der Perizyten auf der Kanalrückseite im umgebenden Kompartiment. Da hierbei beachtet werden musste, dass eine gezielte Anordnung der Perizyten um den Kanal nicht möglich ist und dennoch ein korrektes Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen sichergestellt werden sollte, wurde mit einem deutlichen Überschuss an Perizyten gearbeitet. Dabei wurde einerseits die Größe des umgebenden Kompartiments beachtet, andererseits wurde davon ausgegangen, dass ein Teil der Zellen ebenfalls am Deckglas anwächst oder durch den Besiedlungsprozess wieder aus dem umgebenden Kompartiment heraus gespült wird. Eine anschließende Analyse der tatsächlichen Zellzahl von hCMEC/D3 im Kanal und Perizyten auf der Kanalrückseite nach sieben Tagen Kultivierung konnte für die gewählten Bedingungen ein korrektes Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander zeigen. Dies lag bei $3,18 \pm 0,35$ hCMEC/D3 : 1 HBVP, was den *in vivo* Bedingungen im ZNS von 3-4 Endothelzellen : 1 Perizyten sehr gut entspricht. Im nächsten Schritt erfolgte die Einbringung von Astrozyten auf die Perizytenschicht im umgebenden Kompartiment. Die Kultivierung erfolgte dabei direkt auf der Perizytenschicht, da durch eine Beschichtung mit Kollagen I zwischen den beiden Zellschichten keine Unterschiede zu einer direkten Kultivierung festgestellt werden konnten. Das so hergestellte BBB-Modell zeigte eine hohe Viabilität nach einer siebtägigen Kultivierung bei einer Flussrate von 100 µl/h. Darüber hinaus konnte durch Immunfluoreszenzfärbung die Ausbildung spezifischer Marker nachgewiesen und damit die erfolgreiche Ko-Kultivierung bestätigt werden. Ein erster Versuch zur Einsetzbarkeit hoher Flussraten für das BBB-Modell zeigte hingegen niedrigere Viabilitäten und schlecht ausgebildete Zelllayer.

Im Hinblick auf die Integration eines Neuronennetzwerks in einer EZM-imitierenden Substanz in das umgebende Kompartiment war es interessant zu untersuchen, ob eine Nährstoffversorgung über den Mikrokanal durch die verschiedenen Zellschichten und Poren hindurch stattfinden kann. Der zu diesem Zweck eingesetzte Farbstoff CellTracker™ Green diffundierte bereits nach kurzer Zeit in das umgebende Kompartiment und färbte die in einem Kollagenhydrogel eingebetteten Astrozyten an. Damit konnte ein Austausch von Nährstoffen über den porösen Mikrokanal gezeigt werden.

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass die umgebenden Zellen einen Einfluss auf die Barrierausbildung der BBB haben.^[107,108,111–114] Um diesen Effekt im vasQchip zu untersuchen, wurden RT-qPCR-Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gene, die für wichtige *Tight Junction*- sowie *Adherens Junction*-Proteine codieren, durch die Ko-Kultur mit Perizyten und Astrozyten stärker exprimiert wurden, als bei der Kultivierung der Endothelzellen alleine. Vor allem VE-Cadherin wurde durch den Einfluss der umliegenden Zellen 3-fach stärker exprimiert. Ebenso konnte ein positiver Einfluss auf die beiden Effluxpumpen BCRP und P-gp gezeigt werden. Lediglich CD31 zeigte durch die Ko-Kultur eine niedrigere Expression. Der aus der Literatur beschriebene Effekt konnte damit bestätigt werden. Die Funktionalität der BBB sollte in einem abschließenden Experiment durch einen Effluxpumpen-Assay untersucht werden. Vor allem im Hinblick auf die Entwicklung eines Modells zur Wirkstoffuntersuchung war die Funktionalitätsprüfung wichtig. Efflux-Pumpen sind dabei ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung. Unter normalen Bedingungen sind diese für den Rücktransport spezieller Stoffe aus dem Gehirn zurück in den Blutkreislauf zuständig. Eine Anreicherung von Medikamenten ist aus diesem

Diskussion

Grund schwierig. Bei einer gezielten Inhibition kann jedoch eine Anreicherung von Wirkstoff im Gehirn erreicht werden. Hierfür wurden die Zellen mit dem P-gp-Substrat Calcein-AM und dem Inhibitor Verapamil behandelt. Nach der Wahl geeigneter Versuchs- und Analysebedingungen wurden die Zellen im Chip entweder nur mit dem Substrat oder zusammen mit dem Substrat und dem Inhibitor behandelt und die Fluoreszenzsteigerung nach einer Inhibierung durch Fluoreszenzmessung beurteilt. Es konnte hierbei eine 1,29-fache Steigerung ermittelt werden, für eine aussagekräftige Beurteilung wäre jedoch eine Wiederholung des Versuchs notwendig, da sich sehr große Varianzen ergaben und zudem nur eine kleine Stichprobe untersucht wurde.

Ein weiterer Schritt zur Etablierung des Hirnmodells auf dem vasQchip bestand in der Erzeugung einer dreidimensionalen *in vivo* ähnlichen Mikroumgebung der NVU, um Hirngewebe im umgebenden Kompartiment nachzubilden. Der Mikrokanal des vasQchips stellt zwar die korrekte Mikroumgebung eines Blutgefäßes nach, ohne entsprechende Matrix ist eine Kultivierung von Zellen im umgebenden Kompartiment allerdings nur planar, entweder auf der Kanalrückseite oder auf dem Deckglas möglich. *In vivo* befinden sich die meisten Zellen jedoch in einer dreidimensionalen Umgebung. So bilden Astrozyten der NVU *in vivo* sternförmige Morphologien aus. Mit dem Endothel stehen sie lediglich über ihre Endfüßchen in Kontakt und bilden zusammen mit den Neuronen große Netzwerke aus miteinander verknüpften Zellen. Für die Generierung solcher Netzwerke musste ein Material gefunden werden, dass einerseits biokompatibel ist und die Zellausrichtung unterstützt und andererseits physikalisch gut kontrollierbare und reproduzierbare Eigenschaften aufweist. In den letzten Jahren stieg vor allem das Interesse an der Verwendung von Hydrogelen.^[205] Durch ihre gewebehähnlichen elastischen Eigenschaften und die hohe Wasserbindungskapazität eignen sie sich besonders gut für die Nachbildung der EZM.^[219] Für die Nachbildung der NVU wurde zunächst das natürliche Hydrogel Kollagen I untersucht. Da dieses Hauptbestandteil der EZM *in vivo* ist und in vielen Geweben vorkommt, hat es den Vorteil, intrinsisch biokompatibel zu sein. In der Literatur wurde Kollagen I sowie andere auf natürlichen Polymeren basierende Hydrogele bereits für die Kultivierung neuronaler Zellen eingesetzt. So konnten O’Conner *et al.* (2000) beispielsweise zeigen, dass die Kultivierung muriner neuronaler Vorläuferzellen in Kollagengelen zur Ausrichtung und Differenzierung in Astrozyten und Neuronen führte.^[220] Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Kollagen I als EZM-imitierende Substanz eine hohe Zellviabilität und eine sehr schnelle Adhäsion und Ausrichtung humaner Astrozyten in die Matrix gezeigt werden, was Kollagen prinzipiell zu einem geeigneten Material für die Nachbildung der NVU macht. Dennoch wies es einige Nachteile auf. Zum einen konnte ein starkes Absinken der Zellen beobachtet werden, was sich durch die relativ langsame Polymerisation der Gele erklären lässt. Durch die Verwendung einer höheren Konzentration konnte dieser Effekt minimiert werden, da die Geschwindigkeit der Polymerisationsreaktion mit steigender Konzentration zunimmt.^[221] Einen weiteren Nachteil stellte allerdings der schnelle Abbau der Matrix dar, welcher durch eine höhere Zellzahl sowie eine niedrigere Kollagenkonzentration beschleunigt wurde. Vor allem im Hinblick auf die Kultivierung von Neuronen, die *in vivo* in sehr dichten Netzwerken vorliegen, ist die Verwendung hoher Zellzahlen jedoch erforderlich.

Da Astrozyten *in vivo* zwar in großen Netzwerken organisiert vorliegen, aber dennoch mit den Endfüßchen in Kontakt zum Endothel stehen, sollte ein zweiter Ansatz zeigen, ob ein Wachstum planar ausgesäter Astrozyten in eine darüber aufgebrachte Hydrogelmatrix möglich ist. Dies wäre für die Rekonstruktion der NVU von Vorteil, da so der Kontakt zum Endothel sichergestellt werden

könnte. Hierbei erwies sich erneut die höhere Kollagenkonzentration als besser geeignet, ein deutliches und netzwerkartiges Wachstum in die Matrix konnte nach sieben Tagen jedoch nicht festgestellt werden. Lediglich einzelne Zellen zeigten ein Wachstum durch verschiedene Ebenen. Um die Nachteile des Kollagengels wie die geringe mechanische Stabilität und den schnellen Abbau zu umgehen, wurde im nächsten Schritt das semi-synthetische Hydrogel GelMA untersucht. Durch die Einführung methacrylierter Seitenketten in ein Gelatinerückgrat konnte eine gezielte und permanent kovalente Vernetzung durch Photopolymerisation erreicht werden. Da die hierbei ablaufende Kettenpolymerisationsreaktion ein sehr schneller Prozess ist, wurde das Absinken der Zellen während der Polymerisation verhindert. Als Hydrolyseprodukt von Kollagen ist Gelatine darüber hinaus ein sehr günstiger und biokompatibler Ausgangsstoff, der für die Zellhaftung wichtige RGD-Motive enthält und gleichzeitig weniger immunogen als Kollagen ist.^[191,193] Im Bereich des *Tissue Engineering* findet GelMA bereits vielfach Anwendung.^[222–224]

Als Initiator der Kettenpolymerisation wurde der Photoinitiator LAP eingesetzt. Im Vergleich zum ebenfalls häufig eingesetzten Irgacure 2959 besitzt dieser Photoinitiator ein zweites lokales Absorptionsmaximum im langwelligeren UV-Bereich bei 370 nm, so dass eine Polymerisation der Hydrogele mit energetisch ärmerer Strahlung initiiert werden konnte. Wie bereits vielfach für verschiedene Zelltypen gezeigt wurde, haben niedrige und damit energiereiche Wellenlängen phototoxische und mutagene Eigenschaften und sollten aus diesem Grund bei der Arbeit mit Zellen möglichst vermieden werden.^[198–200,225] Obwohl beide Photoinitiatoren im Bereich der UV-Strahlung aktiv sind, liegt der Absorptionsbereich des häufig verwendeten Irgacure 2959^[226,227] im Bereich der kurzweligen UVB-Strahlung, während LAP zudem im langwelligeren und energetisch ärmeren UVA-Bereich aktiv ist. Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung können zu Schädigungen der DNA führen, dennoch weisen verschiedene Studien darauf hin, dass die energiereichere UVB-Strahlung schädlicher ist. So zeigten beispielsweise Tornaletti *et al.* (1996), dass Strahlungen im Bereich von 245 nm und 290 nm maximal von der DNA absorbiert wird.^[228] Eine Studie von Kielbassa *et al.* (1997) zeigte, dass die Bildung von Pyrimidindimeren ab einer Wellenlänge von 315 nm exponentiell pro Dosisseinheit sinkt.^[199] Auch Matsumara *et al.* (2004) zeigten später, dass UVB-Strahlung stärker an der Bildung von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen beteiligt ist.^[200] Der Photoinitiator LAP war damit für die Verwendung in der Zellkultur besser geeignet. Eine anschließende Toxizitätsstudie zeigte jedoch, dass der Photoinitiator LAP sowie die durch Bestrahlung gebildeten Radikale einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben. Bei der Verwendung zur Polymerisation eines Hydrogels wird der Photoinitiator zwar verbraucht, dennoch sollte darauf geachtet werden, dass mit möglichst geringen Mengen an Photoinitiator gearbeitet wird.

Für die Kultivierung humaner Astrozyten im GelMA-Hydrogel wurden drei unterschiedlich stark funktionalisierte Polymere verwendet, die zu unterschiedlich festen Hydrogelen (*low*, *medium* und *high*) führte. Während GelMA *low* (DoF 30 %) sehr weich und dadurch sehr instabil war, konnten durch die Verwendung von mittel (DoF 52 %) und hoch (DoF 70 %) funktionalisierten Polymeren stabile Hydrogele erzeugt werden. Obwohl diese eine hohe Zellviabilität über einen Zeitraum von 14 Tagen aufwiesen, fand jedoch kaum eine Ausrichtung der Zellen statt. Nach 14 Tagen konnten lediglich einzelne, kurze Zellausläufer detektiert werden, zwischen den beiden Funktionalisierungsgraden konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Als weiteres Hydrogel wurde das Zweikomponenten-Hydrogel GelNB/GelS getestet. Hierbei basiert die Polymerisation auf einer Thiol-En-Reaktion der Norbornen-funktionalisierten Gelatine mit der

Diskussion

Thiol-funktionalisierten Gelatine in einer Stufenwachstumspolymerisation. Im Gegensatz zu GelMA können so homogenere Netzwerke gebildet werden, die zur Polymerisationsinitiation zudem weniger Photoinitiator benötigten. Ein weiterer Vorteil gegenüber GelMA sind die weniger reaktiven Seitenketten. Nicht reagierte Methacrylatgruppen im GelMA können mit Bestandteilen der Zelloberfläche reagieren, was potenziell toxisch für die im Gel eingeschlossenen Zellen ist. Für die Kultivierung humaner Astrozyten wurden ebenfalls Hydrogele mit drei unterschiedlichen Festigkeiten (*low*, *medium* und *high*) untersucht. Der Einschluss der Zellen erfolgte unter Erhalt einer hohen Viabilität, wie bei GelMA wiesen die *low* Gele jedoch ebenfalls eine hohe Instabilität auf und eigneten sich nicht für die Langzeitkultivierung. Bei den *medium* und *high* Gelen konnte nach 14 Tagen eine deutliche Zellausrichtung mit der Bildung einer Netzwerkstruktur beobachtet werden.

Obwohl durch die Verwendung von Kollagengelen eine schnelle Zellausrichtung erreicht werden konnte, eigneten sich diese nur bedingt zur Rekonstruktion von neuronalem Gewebe. Vor allem die Instabilität und der schnelle Abbau der Matrix waren dabei problematisch. Im Hinblick auf einen möglichen 3D-Bio-Druck sind Kollagengelen ebenfalls nicht anwendbar. Hierfür eignen sich die semi-synthetischen Hydrogele GelMA und GelNB/GelS deutlich besser, da diese erst durch die gezielte Bestrahlung mit Licht vernetzt werden. Eine hohe Zellviabilität konnte in allen untersuchten Bedingungen nachgewiesen werden. GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* wiesen zudem ähnliche Festigkeiten wie das Hirngewebe auf und eignen sich daher als Stützmatrix.^[195]

In einem letzten Schritt wurden die einzelnen Bausteine zu einem Gesamtmodell zusammengeführt. Hierfür wurde das etablierte BBB-Modell im Chip durch die Einbringung einer Matrix inklusive Neuronen ergänzt. Um die weiche Matrix des Gehirngewebes bestmöglich nachzubilden, wurden hierfür 2 mg/ml Kollagen sowie GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* Gele eingesetzt. Niedriger konzentrierte Kollagengelen sowie GelMA *low* und GelNB/GelS *low* erwiesen sich aufgrund der mechanischen Instabilität trotz der schnellen Zellausrichtung als ungeeignet.

Nach einer siebentägigen Kultivierung der humanen Neuronen im umgebenden Kompartiment des vasQchips zeigten sich für die beiden semi-synthetischen Hydrogele sehr schlechte Zellviabilitäten. Während die Zellen der BBB im Kanal und auf der Rückseite des Kanals im umgebenden Kompartiment überwiegend viabel waren, war der Großteil der ins Gel eingebrachten Neuronen tot. Da Neuronen sehr sensible Zellen sind und empfindlich auf verschiedene äußere Einflüsse reagieren, waren hierfür unterschiedliche Ursachen denkbar. Bereits die Einbringung der Zellen in den Chip in einer Hydrogelmatrix stellte eine große Herausforderung dar. Einerseits wird laut Hersteller dazu geraten, die Zellen nach dem Auftauen nicht zu zentrifugieren, um diese möglichst wenig mechanischem Stress auszusetzen. Gleichzeitig wird eine Sub-Kultivierung nach der initialen Ausplattierung nicht empfohlen. Für den durchgeföhrten Versuch war eine Zentrifugation aus diesem Grund unumgänglich. Einerseits mussten die Zellen für die Einbringung ins Hydrogel in einem geringeren Volumen vorliegen als dies in der Einfrierlösung der Fall gewesen wäre; auf der anderen Seite wäre eine Verdünnung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO auf eine zytotoxisch unproblematische Konzentration nicht möglich gewesen. Das DMSO wäre damit für die gesamte Versuchsdauer in einer Konzentration im Hydrogel verblieben, die über diese Zeit deutlich zytotoxisch gewirkt hätte. Die Zentrifugation kann sich jedoch negativ auf die Zellviabilität ausgewirkt haben. Zusammen mit der Bestrahlung und der Reaktion mit Bestandteilen der

Photopolymerlösung direkt nach dem Auftauprozess kann dies zur geringen Zellviabilität geführt haben. Da nach der Einbringung der Gele in das umgebende Kompartiment zudem kein Durchspülen mehr möglich war, können nicht abreagierte Photoinitiatorreste einen verstärkten toxischen Effekt haben. Weiterhin denkbar wäre ein Einfluss der Zelldichte. *In vivo* liegen Neuronen in sehr dichten Netzwerken vor und jedes Neuron ist dazu in der Lage, mit mindestens 10.000 anderen Neuronen in Kontakt zu treten.^[115] In Bezug auf die Masse des Gehirns eines erwachsenen Mannes mit 1273 cm^3 und einer durchschnittlichen Anzahl von 86 ± 8 Milliarden Hirnneuronen beträgt die Zelldichte etwa $68 \cdot 10^6$ Zellen/ml.^[229,230] Die im Chip eingesetzte Zelldichte betrug dagegen lediglich $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml und wich damit deutlich von den *in vivo* Bedingungen ab. Einen Zellzahl-abhängigen Effekt der Zellviabilität konnten beispielsweise auch LaPlaca *et al.* für die dreidimensionale Kultivierung muriner Neuronen in einer Matrigel-Matrix nachweisen.^[209] Ob durch die Verwendung höherer Zellzahlen bessere Viabilitäten erreicht werden können, müsste durch Untersuchungen mit variierenden Zellzahlen gezeigt werden.

Für die Kultivierung im Kollagenhydrogel konnte im Vergleich zu den beiden semi-synthetischen Hydrogelen eine höhere Zellviabilität nachgewiesen werden, allerdings wurde dieses durch die Zellen sehr stark abgebaut. Nach der 7-tägigen Kultivierung war das Gel an der dicksten Stelle nur noch $170 \mu\text{m}$ hoch. Für eine bessere Stabilität und einen langsameren Abbau wäre zukünftig höhere Kollagenkonzentrationen oder eine Vernetzung mit StarPEG denkbar. Hierbei handelt es sich um ein vierarmiges, end-funktionalisiertes Polyethylenglykol, das beispielsweise von Seyedhassantehrani *et al.* erfolgreich eingesetzt wurde, um den schnellen Abbau von Kollagengelen zu verlangsamen, ohne die Zellviabilität signifikant zu beeinflussen.^[231]

Um mögliche Einflüsse des Mediums auf die Viabilität zu beurteilen und ausschließen zu können, wurden parallel zu den Gelversuchen Proliferations- und Viabilitätsassays sowie eine morphologische Untersuchung durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des neuronenspezifischen Mediums zu einer sehr geringen Zellviabilität führte, während eine Medienmischung aus Neuronenmedium und hCMEC/D3-Kultivierungsmedium zu nahezu 100 % Zellviabilität führte. Da gleichzeitig jedoch eine sehr starke Proliferation beobachtet werden konnte, die für Neuronen untypisch ist, wurde eine morphologische Charakterisierung durchgeführt. Hierbei konnte ein positiver Nachweis für die Expression des Astrozytenmarkers FABP7 erzielt werden, während die Immunfluoreszenzfärbung gegen Synapsin-I negativ war. Dies könnte ein erstes Indiz dafür sein, dass die Neuronenkultur einige Gliazellen enthielt, die durch die Kultivierung in der Medienmischung sehr stark proliferierten. Dies müsste durch molekularbiologische Untersuchungen jedoch noch bestätigt werden.

Ein erstes *Proof-of-Principle*-Experiment zur Nachbildung neuronalen Gewebes im vasQchip mit primären Neuronen war damit nicht erfolgreich. Wie jedoch gezeigt werden konnte, schränkt die komplizierte Handhabung die Verwendbarkeit primärer Neuronen für die Rekonstruktion eines funktionalen NVU-Modells für die Arzneimittelforschung stark ein. Auch die schlechte Verfügbarkeit stellt in Bezug auf die korrekte Nachbildung großer Neuronen-Netzwerke eine Herausforderung dar. Denkbar wäre für die weitere Entwicklung des Modells daher die Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS). Hierbei handelt es sich um Zellen, die sich zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren können. Hergestellt werden sie durch eine künstliche Reprogrammierung aus adulten somatischen Zellen, die aus unterschiedlichen Geweben stammen können.^[232] Eine Kooperation mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) ist hierzu in Vorbereitung.

In Kollaboration mit S. Haase wurde in einem abschließenden Experiment die Kombination von 3D-Biodruck mit der *Organ-on-Chip*-Technologie zur Rekonstruktion der BBB auf dem Chip eingesetzt.^[195] Durch extrusionsbasierten Bio-Druck wurden die Perizyten und Astrozyten in einem schichtweisen Verfahren um den Mikrokanal geduckt. Anschließend wurde der Mikrokanal mit Endothelzellen besiedelt und die Chips so für sieben Tage fluidisch kultiviert. Dabei konnten für die beiden Gele GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* hohe Zellviabilitäten und beginnende Zellausrichtungen beobachtet werden. Der Vorteil des 3D-Biodrucks liegt dabei in der exakten Positionierung der Zellen um den Mikrokanal. Dadurch kann die benötigte Zellzahl zur Besiedlung des umgebenden Kompartiments deutlich reduziert werden, was vor allem bei der Verwendung sehr teurer Zellen vorteilhaft ist. *In vivo* werden die Zellen ohnehin lediglich bis zu einem Abstand von 400 µm von einem Blutgefäß versorgt. Zellen, die weiter vom Mikrokanal entfernt liegen, sind für physiologische Betrachtungen daher nicht relevant. Bei einer manuellen Besiedlung über die Anschlüsse muss jedoch das gesamte Kompartiment besiedelt werden, da die exakte Positionierung nicht möglich ist. Wie durch die Besiedlung mit Perizyten gezeigt werden konnte, muss dabei mit einem deutlichen Überschuss an Zellen gearbeitet werden. Ein weiterer Vorteil des *Bioprinting* ist die Aussparung der Löcher für die Anschlüsse, da dadurch ein Durchspülen des umgebenden Kompartiments weiterhin möglich bleibt. Für verschiedene Analyseverfahren, wie beispielsweise eine Immunfluoreszenzfärbung, ist dies notwendig. Eine Einbringung der Gelmatrix über die Anschlüsse führt hingegen zum Verstopfen der Löcher. So konnte durch die Kombination beider Verfahren eine verbesserte Methode zur präzisen Besiedlung des umgebenden Kompartiments gezeigt werden. Für die Entwicklung eines Gesamtmodells der NVU und eine noch bessere Nachbildung der *in vivo* Situation wäre zukünftig die Kombination verschiedener Drucktechniken möglich. Durch die Verwendung von Inkjet- oder laserbasierten Druckmethoden könnten die Perizyten in einer planaren Anordnung um den Mikrokanal platziert werden und die Zellzahl weiter reduziert werden. In einem anschließenden extrusionsbasierten Druck könnte dann eine Mischung aus Neuronen und Astrozyten im Hydrogel gedruckt werden, um das komplexe Netzwerk im Gehirn dreidimensional nachzubilden.

Das große Potential durch die Kombination der beiden Methoden zeigt sich auch in der Literatur. Es gibt bereits verschiedene Ansätze, die 3D-Biodruck mit der *Organ-on-Chip*-Technologie verbinden.^[202,233]

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht das enorme Potential, das durch die Kombination verschiedener Ansätze aus dem *Tissue Engineering* hervorgeht. Kleinste Einheiten funktioneller Gewebe können bereits heutzutage *in vitro* rekonstruiert werden. Die stetige Forschung und Entwicklung führen zu immer neueren Ansätzen, die eine immer genauere und reproduzierbarere Nachbildung von Organgewebe ermöglichen.^[234,235] Ein vaskularisiertes Modell der BBB konnte in dieser Arbeit auf Basis von drei humanen, hirnspezifischen Zellen entwickelt werden. Der Einsatz von Hydrogelen ermöglichte die dreidimensionale Rekonstruktion von Hirngewebe, zur Nachbildung des neuronalen Netzwerks sind jedoch noch zahlreiche weiterführende Untersuchungen notwendig. Der 3D-Biodrucks und die Verwendung von iPS Zellen könnten in Zukunft zur Nachbildung miniaturisierte Hirnmodelle eingesetzt werden. Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson könnten so auf zellulärer Ebene analysiert werden, um so eine

beschleunigte Medikamentenuntersuchung mit einer reduzierten Anzahl an Tierversuchen und einer verbesserten Patientensicherheit zu gewährleisten.

6. Methoden

6.1. Allgemeine Zellkultur

6.1.1. Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte adhärent im spezifischen Kultivierungsmedium im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % wurden die Zellen gesplittet, wodurch sich die Passage um 1 erhöhte.

6.1.2. Beschichtung der Kultivierungsmaterialien

6.1.2.1 hCMEC/D3

Für die Kultivierung von hCMEC/D3 wurden 75-cm²-Kulturflaschen mit 5 ml Kollagen (0,1 mg/ml in ddH₂O) für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet und anschließend einmal mit DPBS^{/-} gewaschen.

6.1.2.2 HBVP/HA

Die Materialien zur Kultivierung von HBVP sowie HA wurden über Nacht mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (2 µg/cm² in ddH₂O) bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Anschließend wurde einmal mit DPBS^{/-} gewaschen.

6.1.2.3 HN

Die Materialien zur Kultivierung von HN wurden für eine Stunde mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (2 µg/cm² in ddH₂O) bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Anschließend wurde einmal mit ddH₂O gewaschen.

6.1.3. Passagieren von adhärenten Zellen

Nach Erreichen einer konfluente Zellschicht wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellschicht einmal mit DPBS^{/-} gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen durch die Zugabe von Trypsin/EDTA (0,25 %) vom Boden der Zellkulturfasche abgelöst. Die Inkubation mit Trypsin/EDTA erfolgte für drei bis fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe der doppelten Menge Trypsininhibitor (10 % FCS in DPBS^{/-}) abgestoppt und die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt. Bei Bedarf wurde die Flasche mehrmals mit zellspezifischem Medium gespült, um die verbleibenden Zellen zu sammeln. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt, die Zellsuspension zwei Minuten bei 300 x g zentrifugiert, das Medium abgenommen und das Zellpellet in der benötigten Menge Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für weitere Versuche verwendet oder zur Weiterkultivierung auf verschiedene Flaschen aufgeteilt.

Eine Besonderheit bildete die Kultivierung humaner Neuronen. Eine Subkultivierung war hier nicht möglich. Die Zellen wurden in Passage 0 geliefert, entsprechend des Herstellerprotokolls behandelt und direkt für die Versuche eingesetzt.

6.1.4. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Für eine längerfristige Lagerung der Zellen wurden diese im spezifischen Einfriermedium eingefroren. Das Zellpellet wurde dafür in Einfriermedium resuspendiert und in einem Nalgene® Mr. Frosty bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h erfolgte eine endgültige Lagerung in Stickstoff bei -196 °C. Nach dem Auftauen der Zellen erfolgte frühestens nach drei Stunden, aber spätestens am nächsten Tag ein Mediumwechsel, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO die Zellen schädigt.

6.2. vasQchip

Falls nicht explizit erwähnt, wurden Chips mit einer mittleren Porengröße von 1-2 µm verwendet.

6.2.1. Herstellung

Die Produktion des Mikrokanals erfolgte durch die Firma 300 microns nach dem SMART-Prinzip. Hierfür wurden Schwerionen-beschossene PC-Folien in einem speziellen Formwerkzeug bei einer Temperatur von 147 °C und einem Druck von 4 bar geformt. Durch nasschemisches Ätzen mit 5 M NaOH und einer Dowfax 2A1™ Konzentration von 0,01 % wurden die latenten Ionenspuren bei 70 °C freigeätzt. Die Porengröße wurde durch Variation der Ätzzeit bestimmt. Nach der Qualitätskontrolle und Bestimmung der Porengröße durch die Firma 300 microns wurden die Folien durch Laserschweißen auf die Trägerchips (Spritzguss durch Firma Hoffmann GmbH durchgeführt) aufgebracht.

6.2.2. Handhabung

6.2.2.1 Beschichtung

Vor Versuchsbeginn wurden die vasQchips zunächst durch einen Klebering mit einem Deckglas verschlossen und durch UV-Bestrahlung sterilisiert. Jeweils am Vortag wurden die so assemblierten Chips in den Inkubator gelegt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert.

Mikrokanal

Die Beschichtung des porösen PC-Mikrokanals (Länge: 20 mm, Breite: 1 mm, Höhe: 300 µm, 10⁶ Poren/cm²) erfolgte durch 50 µl einer Beschichtungslösung, die in den Mikrokanal pipettiert und für 1h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurde. Anschließend wurde der Kanal mit je 200 µl DPBS/- und 200 µl hCMEC-Kultivierungsmedium gespült.

Umgebendes Kompartiment

Die Beschichtung des umgebenden Kompartiments (Durchmesser: 24 mm, Höhe: 500 µm) erfolgt durch 500 µl einer Beschichtungslösung. Diese wurde in das umgebende Kompartiment pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit je 1 ml DPBS/- und 1 ml hCMEC-Kultivierungsmedium gespült.

6.2.2.2 Besiedlung

Mikrokanal

Für die Auskleidung des PC-Mikrokanals wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte in je 20 µl des entsprechenden Mediums eingesetzt. Zunächst wurde der Kanal von Mediumresten geleert. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam in den Kanal pipettiert. Um eine vollständige Auskleidung des gesamten Kanals zu gewährleisten wurde dieser daraufhin 1h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit einer Geschwindigkeit von 4 U/h mit Hilfe des vasQturns gedreht. Nach Ablauf der Zeit wurde der Chip in die aufrechte Position gebracht, die Anschlüsse mit Medium befüllt und die Zellen zur Regeneration 1 h statisch inkubiert. Anschließend wurde der Kanal mit 200 µl Medium gespült und an die Fluidik angeschlossen (Kapitel 6.2.2.3).

Umgebendes Kompartiment

Die Besiedlung des umgebenden Kompartiments erfolgte durch Einbringung der Zellsuspension in 500 µl Medium. Die Zellsuspension wurde dazu möglichst luftblasenfrei durch die Anschlüsse in das untere Kompartiment gegeben. Um das Anwachsen der Zellen auf der Rückseite des Kanals zu gewährleisten, wurde der Chips anschließend sofort um 180° gedreht. Durch leichtes Klopfen auf das Deckglas sollte das Absetzen der Zellen auf die Folie erreicht und ein Wachstum am Deckglas verringert werden. Die so besiedelten Chips wurden für mindestens 3h, maximal über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Das Medium im umgebenden Kompartiment wurde alle 2-3 Tage durch spülen mit 1 ml frischem Medium ausgetauscht.

6.2.2.3 Anschluss an die Fluidik

Zur Vermeidung von Luftblasen durch Temperaturunterschied wurden alle zur Kultivierung verwendeten Schläuche, Spritzen etc. bereits am Vortag befüllt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Vor dem Anschluss der Chips wurden die Schläuche auf Luftblasen kontrolliert und diese ggf. entfernt. Daraufhin wurden die Schläuche mit den Anschlüssen des Mikrokanals verbunden und die Chips eine weitere Stunde statisch inkubiert, bevor die Fluidik gestartet wurde.

Spritzenpumpe Fusion 200 Chemyx

Zur Erzeugung niedriger Flussraten wurde eine Spritzenpumpe verwendet. Hierfür wurde der Einlass des Mikrokanals mit einem Schlauch verbunden, an dessen Ende eine 10 ml-Spritze angeschlossen war. Mit einer Flussrate von 100 µl/h und der Wahl der Infusion-Mode wurde der Kanal so mit Medium durchspült. Der Auslass des Kanals war ebenfalls mit einem Schlauch verbunden, der in einen Abfallbehälter führte. Schematisch ist dies in Abbildung 99 dargestellt. Nach 48 bis 72 h wurde das Medium in den Spitzen jeweils erneuert.

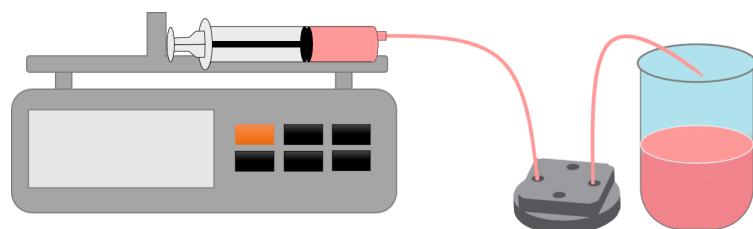


Abbildung 99 Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kultivierung mit einer Spritzenpumpe

Peristaltikpumpe PeRISYS-S, Cetoni

Zur Erzeugung höherer Flussraten wurde eine Peristaltikpumpe verwendet, als Reservoir diente ein 15 ml-Röhrchen, welches mit 5 ml Medium befüllt wurde. Aus dem Reservoir führte ein Schlauch zum Einlass des Mikrokanals. Vom Auslass des Mikrokanals führte der Schlauch über die Pumpe zurück in das Reservoir. Sowohl der Chip als auch das Reservoir wurden im Inkubator bei Standardbedingungen gelagert, während die Pumpe selbst bei RT stand. Durch Voranschaltung des Reservoirs vor den Chip diente dieses somit als Blasenfalle. Schematisch ist das Funktionsprinzip in Abbildung 100 dargestellt. Nach 48 bis 72 h wurde das Medium im Reservoir jeweils ausgetauscht.

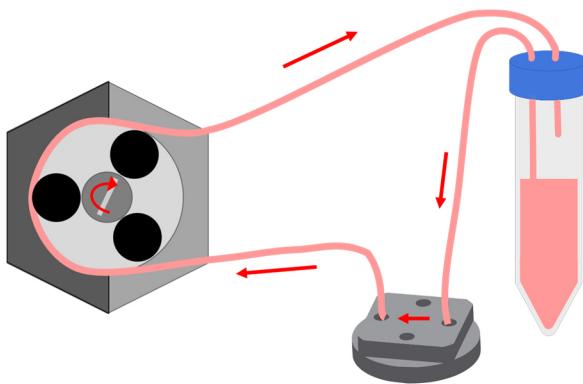


Abbildung 100 Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kultivierung mit einer Peristaltikpumpe

6.2.2.4 BBB

Die Rekonstruktion der BBB erfolgte durch eine Ko-Kultivierung von HBVP (Passage 5-8), HA (Passage 5-8) und hCMEC/D3 (Passage 33-35 bzw. Passage 5-8). Dazu wurde der Kanal mit 50 µl einer 1 mg/ml Lösung ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bzw. 0,1 mg/ml, das umgebenden Kompartiment mit 500 µl einer 0,6 ml/ml Lösung für eine Stunde bei 37°C beschichtet. Nach einem anschließenden Waschschnitt wurden zunächst $5 \cdot 10^5$ HBVP in das umgebende Kompartiment eingebracht. Der Chip wurde um 180° gedreht und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA in das umgebende Kompartiment und eine erneute Drehung des Chips um 180°. Frhestens nach 3 h, spätestens am nächsten Tag erfolgte die Besiedlung des Mikrokanals mit $7,5 \cdot 10^5$ hCMEC/D3 und der Anschluss an die Mikrofluidik.

6.2.2.5 Einbringung eines Hydrogels

Die Einbringung eines Hydrogels in das umgebende Kompartiment erfolgte durch Pipettieren von 500 µl Lösung durch die Anschlüsse. Die Herstellung und Polymerisation erfolgten entsprechend den in Kapitel 6.3.2 angegebenen Spezifikationen.

6.3. Hydrogele

6.3.1. Synthesen

6.3.1.1 GelMA

Für die Synthese von GelMA wurde 1 g Gelatine (0,266 mmol NH₂-Gruppen) in einem Masse-zu-Volumen-Verhältnis (w/v) von 10 % in DPBS^{-/-} gelöst. Bei 50°C wurde so lange gerührt, bis die Gelatine vollständig gelöst war. Anschließend wurden je nach gewünschtem Methacrylierungsgrad

Methoden

790 µl (*high*, 5,32 mmol, 20 Äq), 316 µl (*medium*, 2,128 mmol, 8 Äq) oder 39,5 µl (*low*, 0,266 mmol, 1 Äq) Methacrylsäureanhydrid tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde 2 h bei 50°C gerührt. Danach wurde die gleiche Menge DPBS^{-/-}, in der zuvor gelöst wurde, auf 50°C erwärmt und zur Reaktionslösung gegeben. Es wurde für weitere 10 min bei 50°C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde daraufhin in Dialysemembranen gegeben (Cellulose, 12-14 kDA) und sieben Tage gegen ddH₂O bei 40°C dialysiert, wobei zweimal täglich ein Wasserwechsel durchgeführt wurde. Nach erfolgter Dialyse wurde die Reaktionsmischung im gleichen Volumen Reinstwasser gelöst und für 15 min auf 40°C erhitzt. Die Lösung wurde anschließend über Nacht bei -80°C gefroren. Die gefrorene Lösung wurde lyophilisiert und der weiße Feststoff bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.3.1.2 GelNB

326 µL 5-Norbornen-2-Carbonsäure (368 mg, 2,66 mmol, 10 Äq) wurden in 10-20 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst und anschließend durch Zugabe von 1,02 g EDC-HCl (5,32 mmol, 20 Äq) und 0,31 g NHS (2,66 mmol, 10 Äq) aktiviert. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei 50°C gerührt. Nach der Zugabe von 1 g Gelatine (0,266 mmol NH₂-Gruppen, 1 Äq) wurde der pH-Wert mit NaOH (10 M) auf 7,5-7,8 eingestellt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 50°C gerührt und die Lösung anschließend zentrifugiert (2000 U/min, 3 min), um ungelöste Rückstände zu entfernen. Der Überstand wurde in Dialysemembranen (Cellulose, 12-14 kDA) überführt und sieben Tage bei 40°C gegen dH₂O dialysiert. Die gereinigte Lösung wurde bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten und bei -20°C gelagert. GelNB mit verschiedenen Funktionalisierungsgraden (niedrig, mittel, hoch) wurde durch Variation der Mengen von 5-Norbornen-2-Carbonsäure (0,3 Äq, 2 Äq, 10 Äq), EDC-HCl (0,6 Äq, 4 Äq, 20 Äq) und NHS (0,3 Äq, 2 Äq, 10 Äq) synthetisiert.

6.3.1.3 GelS

Die GelS-Synthese erfolgte nach Van Vlierberghe *et. al.*^[205] Dazu wurde 1 g Gelatine (0,266 mmol NH₂-Gruppen, 1 Äq) in 10-20 ml entgastem Natriumcarbonat-Bicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 10) gelöst. Die Lösung wurde unter inerter Argonatmosphäre auf 40 °C erhitzt und anschließend 0,212 g N-Acetyl-DL-Homocystein-thiolacton (1,33 mmol, 5 Äq) zugegeben. Um die Oxidation der Thiolgruppen zu verhindern, wurde 1 mM EDTA zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 3 h bei 40°C gerührt, anschließend mit 10 ml dH₂O verdünnt, in Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDA) überführt und bei 40 °C unter Argon gegen dH₂O dialysiert. Nach 24 h wurde die gereinigte Lösung bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff gewonnen und bei -80 °C unter Argonatmosphäre gelagert. GelS mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden (niedrig, mittel) wurde durch Variation der Menge an N-Acetyl DL-Homocystein-Thiolacton synthetisiert (1 Äq bzw. 5 Äq).

6.3.2. Herstellung von vernetzten Hydrogelen

6.3.2.1 GelMA

Zur Herstellung vernetzter Gele wurde das lyophilisierte GelMA in einer Konzentration von 10 % (w/v) in DPBS^{-/-} bei 50 °C gelöst. Anschließend wurde LAP zugegeben (Endkonzentration 0,3 % (w/v)) und mit DPBS^{-/-} auf eine Endkonzentration von 5 % (w/v) verdünnt. Die Polymerisation

erfolgte durch Belichtung (Omicure S2000, 320-500 nm, 500 mW/cm², 30 s). Für die Herstellung von Gelen mit eingekapselten Zellen wurde DPBS^{-/-} zum Verdünnen durch die Zugabe von Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl ersetzt. Nach dem Aushärten wurden die Gele in den 8-Well- μ -Slides jeweils mit 200 μ l Medium überschichtet, der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage durch Abnahme des alten Mediums und die Zugabe von 200 μ l frischem Medium.

6.3.2.2 GelNB/GelS

Zur Herstellung der vernetzten Gele wurden die beiden lyophilisierten Photopolymere in einer Konzentration in DPBS^{-/-} gelöst (GelNB 50 °C, GelS 70 °C). Anschließend wurden diese entsprechend der in Tabelle 1 angegebenen Mengen mit LAP und Zellsuspension gemischt und für 30 s belichtet (Omicure S2000, 320-500 nm, 500 mW/cm²). Zur Herstellung der *low* Gele wurden dazu GelNB *low* mit GelS *low* gemischt, für *medium* Gele GelNB *medium* mit GelS *medium* und für *high* Gele wurde GelNB *high* mit GelS *medium* gemischt. Nach dem Aushärten wurden die Gele in den 8-Well- μ -Slides jeweils mit 200 μ l Medium überschichtet, der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage durch Abnahme des alten Mediums und die Zugabe von 200 μ l frischem Medium.

Tabelle 1 Zusammensetzung für je 1 ml Photopolymerlösung

	GelNB 10 %	LAP 10 %	GelS 5 %	Zellsuspension
Low	250 μ l	3 μ l	500 μ l	247 μ l
Medium	250 μ l	3 μ l	500 μ l	247 μ l
High	173 μ l	3 μ l	655 μ l	173 μ l

6.3.2.3 Kollagen

Die Herstellung der Kollagenhydrogele erfolgte entsprechend den in Tabelle 2 angegebenen Mengen. Alle Komponenten wurden auf Eis zusammen pipettiert und anschließend für 30 min bei 37 °C gelieren gelassen. Nach dem Aushärten wurden die Gele in den 8-Well- μ -Slides jeweils mit 200 μ l Medium überschichtet, der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage durch Abnahme des alten Mediums und die Zugabe von 200 μ l frischem Medium.

Tabelle 2 Zusammensetzung für je 1 ml Hydrogellösung

	Kollagen I (5 mg/ml)	10x DPBS ^{-/-}	NaOH (1M)	Zellsuspension
1 mg/ml	200 μ l	100 μ l	1 μ l	699 μ l
2 mg/ml	400 μ l	100 μ l	1 μ l	499 μ l

6.3.3. Absorptionsbestimmung der Photoinitiatoren

Zur Bestimmung der Absorptionsspektren wurden die Photoinitiatoren in DPBS^{-/-} gelöst (0,1 % (w/v)). Die Absorptionsmessung erfolgte anschließend mit dem SmartSpec 3000. Dazu wurde jeweils 1 ml der Photoinitiatorlösung in eine Küvette überführt und ein Spektrum von 300-400 nm in 10 nm-Schritten aufgenommen. Als Blank diente DPBS^{-/-}.

6.4. Visualisierung von Zellen und Zellstrukturen

6.4.1. Fixierung von Zellen

Zur Fixierung der Zellen wurden diese zunächst zweimal mit DPBS^{+/+} gewaschen und anschließend mit einer 4%-igen PFA-Lösung für 10 min auf Eis behandelt. Nach erfolgter Inkubation wurde die PFA-Lösung entnommen und die Zellschicht zweimal mit eiskaltem DPBS^{-/-} gewaschen. Die verwendeten Mengen sind Tabelle 4 (Kapitel 6.4.6) angegeben.

6.4.2. Visualisierung der Zellkerne

Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte durch Inkubation der Zellen mit Hoechst 33342 (2 µg/ml im entsprechenden Medium für vitalen Zellen bzw. in DPBS^{-/-} für fixierte Zellproben) für 5 min bei RT. Anschließend wurde zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die verwendeten Mengen entsprechen den in Tabelle 4 (Kapitel 6.4.6) angegebenen Werten.

λ_{ex} : 405

λ_{em} : 415-480 nm

6.4.3. Visualisierung des Aktinzytoskeletts

Die Visualisierung des Aktinzytoskeletts erfolgte an zuvor fixierten Proben. Diese wurden mit Phalloidin-TRITC (100 nM in DPBS-/-) für 40 min bei RT behandelt und anschließend zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die entsprechenden Mengenangaben sind in Tabelle 4 (Kapitel 6.4.6) angegeben.

λ_{ex} : 532 nm

λ_{em} : 545-625 nm

6.4.4. Markierung des Zytosols

Die Visualisierung des Cytosols erfolgte mit CellTracker™ Red oder Green (10 µM im entsprechenden Medium) für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die eingesetzten Mengen sind Tabelle 4 (Kapitel 6.4.6) zu entnehmen.

λ_{ex} : 532 nm

λ_{em} : 580-650 nm

6.4.5. Immunfluoreszenz-Färbung spezifischer Strukturen

Zur Visualisierung spezifischer Strukturen über Antikörper, wurden die Zellen zunächst, bei intrazellulär Bindung der Antikörper, mit 0,1 % Triton-X für 4 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Zugabe von CasBlock™ für 30 min bei RT blockiert. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte anschließend, gelöst in CasBlock™, über Nacht bei 4 °C. Bei direkter Färbemethode wurde die Probe am nächsten Tag zweimal gewaschen und mikroskopisch visualisiert. Bei indirekter Färbung erfolgte nach dem Waschen eine Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (in CasBlock™) über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde die Lösung abgenommen, die Probe zweimal gewaschen und anschließend mikroskopisch visualisiert. Die verwendeten Konzentrationen sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3 Übersicht über verwendete Primär- und Sekundärantikörper, eingesetzten Konzentrationen sowie Anregungs- und Emissionswellenlängen

Antikörper	Konzentration	Anregung	Emission
Primärantikörper			
Monoclonal Anti-CD31-FITC produced in mouse, Sigma, F8402	1:100	488 nm	500-550 nm
Anti-CD31 produced in sheep, R&D Systems, AF806	5 µg/ml	/	/
Anti-Alpha-SMA produced in mouse, abcam, ab54723	10 µg/ml	/	/
Anti-GFAP produced in rabbit, Merck, ab5804	1:1000	/	/
Anti-Brain Lipid Binding Protein (FABP7) produced in rabbit, Merck, ABN14	1:250	/	/
Anti-VE-Cadherin produced in rabbit, abcam, ab33168	5 µg/ml	/	/
Anti-ZO-1 produced in goat, abcam, ab190085	60 µg/ml	/	/
Anti-Synapsin-I produced in rabbit, abcam, ab64581	1:200	/	/
Sekundärantikörper			
Goat-anti-mouse-AF 568, Invitrogen™, A11030	4 µg/ml	532 nm	600-630 nm
Chicken-anti-rabbit-AF 647, Life technologies, A21443	4 µg/ml	635 nm	650-700 nm 640-750 nm
Donkey-anti-sheep-FITC, Life technologies, A16049	1:500	488 nm	500-550 nm
Goat-anti-mouse-AF 488, Life technologies, A11001	1 µg/ml	488 nm	495-535 nm

Methoden

6.4.6. Mengenangaben

Tabelle 4 Mengenangaben der verwendeten Reagenzien zur Visualisierung verschiedener Zellstrukturen in unterschiedlichen Formaten

Format	Menge in µl
Waschschrifte	
8-Well-µ-Slides (ibidi) (1 cm ²)	200 µl
LabTek Chamber (0,7 cm ²)	200 µl
vasQchip Mikrokanal	200 µl
vasQchip umgebendes Kompartiment	1 ml
Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung	
8-Well-µ-Slides (ibidi)	200 µl
LabTek Chamber	200 µl
vasQchip Mikrokanal	200 µl
vasQchip umgebendes Kompartiment	500 µl
Visualisierung von Zellkernen und Zytoskelett	
8-Well-µ-Slides (ibidi)	200 µl
LabTek Chamber	200 µl
vasQchip Mikrokanal	150 µl
vasQchip umgebendes Kompartiment	500 µl
Markierung des Zytosols	
vasQchip Mikrokanal	200 µl
75-cm ² -Flasche	5 ml
Immunfluoreszenz	
8-Well-µ-Slides (ibidi)	100 µl
LabTek Chamber	100 µl
vasQchip Mikrokanal	150 µl
vasQchip umgebendes Kompartiment	350 µl

6.5. Molekularbiologische Methoden: PCR

6.5.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation der Zellproben erfolgte durch TRIzol®-Isolation nach Angaben des Hersteller-Protokolls. Dazu wurde zunächst das Medium entfernt und anschließend TRIzol® zur Zellprobe gegeben. Die Isolation im Well erfolgte durch Zugabe von 200 µl TRIzol®. Das Lysat wurde daraufhin einige Male zur Homogenisierung auf und ab pipettiert und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation aus dem Mikrokanal erfolgte analog in zwei Schritten durch mehrmaliges Durchspülen des Kanals mit je 100 µl TRIzol® (Endvolumen: 200 µl). Das gesammelte Lysat wurde zunächst für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 40 µl (0,2 ml je 1 ml TRIzol®) Chloroform versetzt. Nach 15-sekündigem Schütteln des Reaktionsgefäßes wurde dieses weitere 3 min bei RT inkubiert und daraufhin für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dabei trennte sich das

Gemisch in eine Phenol-Choloform-Phase, in eine Interphase und die RNA-enthaltende wässrige Phase. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Phenol-Chloroform- sowie die Interphase verworfen. Zur wässrigen Phase wurden dann 100 µl Isopropanol (0,5 ml je 1 ml TRIzol®) zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das RNA-Pellet zum Waschen in 200 µl 75% Ethanol (1 ml je 1 ml TRIzol®) resuspendiert und bei 4 °C und 7.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet 10 min bei RT luftgetrocknet. Nach anschließendem Lösen in 20 µl Wasser wurde die RNA 10 min bei 60 °C inkubiert und die RNA-Menge durch Nanodrop-Messung bestimmt.

6.5.2. DNA-Verdau

Für den Verdau genommischer DNA wurden in einem zweifachen Ansatz RNA-Probe, DNase, DNase-Puffer und Wasser nach der in Tabelle 5 angegebenen Mengen zusammen pipettiert und für 30 min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen folgte die Zugabe von je 2 µl DNase Stop Solution (1 µl je Einfachansatz) und eine 10-minütige Inkubation bei 65°C. Die Proben wurden anschließend für eine Reverse Traskription weiterverarbeitet (Kapitel 6.5.3). In jedem experimentellen Ansatz wurde zusätzlich zu den RNA-Proben eine No-Template-Control (NTC) durch den Einsatz von Wasser anstelle von RNA eingesetzt, um Kontaminationen der eingesetzten Reagenzien ausschließen zu können.

Tabelle 5 Zusammensetzung eines einfachen Ansatzes für den Verdau genommischer DNA

RNA	1 µg
DNase	1 µl (= 1U)
DNase-Puffer 10x	1 µl
Nucleasefreies Wasser	Auf 10 µl auffüllen

6.5.3. RT-PCR

Zunächst wurden zu den Proben aus Kapitel 6.5.2 je 2 µl Random Primer (200 ng/µl, 1 µl je Einfachansatz) zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70°C im Thermocycler wurden die Proben auf 2 Tubes aufgeteilt und zu je einer der Proben ein Mastermix inklusive Reverser Transkriptase und zu einer ein Mastermix ohne Reverse Transkriptase zugegeben (Endvolumen: 22 µl). Die Zusammensetzungen der Mastermixe sind in Tabelle 6 angegeben. Es folgte die Reverse Traskription der RNA-Proben in cDNA im Thermocycler nach dem folgenden Programm:

- 10 min bei 25°C
- 60 min bei 42°C
- 10 min bei 70°C
- RT bis zur Weiterverwendung

Nach erfolgter Reaktion wurden die cDNA-Proben mit 100 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Methoden

Tabelle 6 Zusammensetzung der Mastermixe für die Reverse Transkription

	+ RT	- RT
5x Puffer	4	4
dNTP (10 mM)	2	2
Reverse Traskriptase	0,5	/
Nukleasefreies Wasser	3,5	4

6.5.4. Kontroll-PCR

Der Erfolg des DNA-Verdaus sowie der reversen Transkription wurde durch eine Kontroll-PCR überprüft. Hierzu wurden die cDNA-Proben aus Kapitel 6.5.3 mit Polymerase, 5x-Polymerase-Puffer, dNTP, forward-Primer, reverse-Primer sowie Wasser nach dem in Tabelle 7 angegeben Schema auf Eis zusammen pipettiert und im Thermocycler dem folgenden Programm unterzogen:

Schritt 1: 1 Zyklus	2 min bei 95°C
	30 s bei 95°C
Schritt 2: 35 Zyklen	30 s bei 60°C
	30 s bei 72°C
Schritt 3: 1 Zyklus	5 min bei 72°C
Schritt 3: bis zur Weiterverwendung	RT

Tabelle 7 Zusammensetzung für die Kontroll-PCR

5x Puffer	4 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Polymerase	0,25 µl
Wasser	10,25 µl
cDNA	3 µl

Die entstandenen Amplifikate wurden auf ein 2%-iges Agarosegel (0,25 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und in Referenz zu einem DNA-Marker ausgewertet.

6.5.5. qPCR

Auf Eis wurden die in Tabelle 8 angegebenen Reagenzien zusammen pipettiert und auf die Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Anschließend wurden je 4 µl cDNA zugegeben, die Platte versiegelt, 2 min bei 1400 rpm zentrifugiert und dem folgenden Programm unterzogen:

Schritt 1: 1 Zyklus	2 min bei 95°C
Schritt 2: 40 Zyklen	15 s bei 95°C
	60 s bei 60°C
3. Schritt: 1 Zyklus	60 s bei 95°C

Für jede Probe wurden mindesten zwei technische Multiplikate durchgeführt. Die Amplifikate wurden durch Schmelzkurvenanalyse sowie die Auftragung auf ein 2%-iges Agarosegel überprüft. Die Berechnung der relativen Quantifizierung erfolgte nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode durch Normierung auf die Referenzgene Aktin und GAPDH.

Tabelle 8 Zusammensetzung für qPCR

GoTaq® qPCR Mastermix	10 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Wasser	4 µl

6.6. Wachstums- und Viabilitätsuntersuchungen

6.6.1. Wachstumskurve

6.6.1.1 Beschichtungen

Die Wells einer 96-Well-Platte wurden analog zu den in 6.7.1 beschriebenen Bedingungen mit GelTrex™, Gelatine, Laminin, Kollagen I, Kollagen IV und Fibronektin beschichtet. Anschließend wurden je $5 \cdot 10^3$ hCMEC/D3 in 100 µl hCMEC/D3-Kultivierungsmedium in die Wells ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Beginnend am Folgetag wurde die Zellzahl über einen Zeitraum von sieben Tagen alle zwei Tage bestimmt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellschicht mit 100 µl DPBS-/ gewaschen und mit 50 µl Trypsin/EDTA (0,25 %) bzw. an Tag 7 mit 100 µl Trypsin/EDTA (0,25 %) für 3 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Die Zellsuspension wurde gut resuspendiert und anschließend die Zelldichte bestimmt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte jeweils in Triplikaten.

6.6.2. Presto Blue-Assay

Die Wells einer 96-Well-Platte wurden mit 50 µl einer 0,1 µg/ml Kollagen I- (hCMEC/D3) bzw. in einer Konzentration von 2 µg/cm² mit PLL (HBVP/HA/HN) für 1h unter Standardbedingungen beschichtet. Anschließend wurden die Wells einmal mit 100 µl DPBS-/ gewaschen. Die Zellen wurden wie in 6.1.3 beschrieben abgelöst, die Zelldichte bestimmt und die Zellen anschließend im jeweiligen Kulturmedium ausgesät und für 3 h anwachsen lassen. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 100 µl DPBS-/ gewaschen und mit 100 µl der jeweiligen Spezialmedien Astrozytenmedium, Perizytenmedium, hCMEC/D3-Kultivierungmedium, Neuronenmedium und einer 1:1 Mischung aus hCMEC/D3-Kultivierungsmedium und Neuronenmedium überschichtet. Nach 3 h sowie an den Tagen 1, 3, 5 und 7 wurden die Zellen jeweils in Triplikaten mit Presto Blue Reagenz behandelt. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, die Presto Blue im Verhältnis 1+9 mit dem jeweiligen Medium gemischt und 100 µl dieser Mischung zu den Zellen gegeben. Als Blank diente die Mischung ohne Zellen. Nach 15 min Inkubation unter Standardbedingungen wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 % SDS abgestoppt und die Fluoreszenz am Mikroplatten-Reader bestimmt (λ_{em} : 560 nm, λ_{ex} : 600 nm). Die Inkubation mit

Methoden

Presto Blue Reagenz wurde für die Untersuchung mit humanen Neuronen auf 3 h ausgeweitet, da das Signal nach 15 min zu schwach für die Detektion war. Alle anderen Schritte erfolgten analog. Die Zellzahlzunahme in den unterschiedlichen Medien wurde relativ über die Fluoreszenzsteigerung bestimmt.

6.6.3. MTT-Toxizitätsassay

Um die Toxizität eines Stoffes zu bestimmen, wurden Toxizitätstests mit MTT-Reagenz und anschließender optischer Auswertung durchgeführt. Dazu wurden auf einer 96-Well-Platte je $1 \cdot 10^4$ (HA, HBVP) bzw. $2 \cdot 10^4$ (hCMEC/D3) Zellen pro Well ausplattiert und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Danach wurde mit der Behandlung der Zellen begonnen. Die zu untersuchende Substanz wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und die Zellen für weitere 72 h kultiviert. Als Referenzwerte für die Auswertung dienten Lebend- und Totkontrollen, bei denen ein Mediumwechsel, ohne die Zugabe des zu untersuchenden Stoffes erfolgte.

Für die Auswertung wurden zunächst jeweils 5 µl 20 % Triton X zur Totkontrolle zugegeben. Anschließend wurden zu jedem Well jeweils 15 µl des Farbstoffes MTT zugegeben. Nach 3 h Inkubation wurden in jede Kammer 100 µl Solubilization/Solution Stop Mix gegeben. Dabei handelt es sich um einen Lysis-Puffer, der den Farbstoff aus den Zellen löst und damit für die Entstehung einer gleichmäßigen Lösung sorgt. Am nächsten Tag erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm mit einem Mikroplatten-Reader. Die Viabilität der Zellen konnte durch den Vergleich mit einer Lebendkontrolle bestimmt werden.

6.6.4. Lebend/Tot-Färbung

Die Visualisierung lebender und toter (nekrotischer) Zellen erfolgte durch Inkubation mit Färbelösungen aus Calcein-AM und PI oder FDA und PI. Die Zusammensetzungen beider Färbelösungen sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 9 Zusammensetzung der Färbelösung aus Calcein-AM und PI

Reagenz	Volumen
Zellspezifisches Medium	996 µl
Calcein-AM (1 mg/ml)	4 µl
PI (2 mg/ml)	10 µl

Tabelle 10 Zusammensetzung der Färbelösung aus FDA und PI

Reagenz	Volumen
Zellspezifisches Medium	1000 µl
FDA (5 mg/ml)	1,6 µl
PI (2 mg/ml)	10 µl

6.6.4.1 Im Chip

Zur Lebend/Tot-Färbung der Zellen im Chip wurde eine Färbelösung aus Calcein-AM und PI entsprechend den in Tabelle 9 angegebenen Mengen vorbereitet. 200 µl dieser Lösung wurden für die Färbung der Zellen im Mikrokanal und 500 µl zur Färbung der Zellen im umgebenden

Kompartiment eingesetzt. Dabei wurde jeweils mit der Färbelösung durchspült. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurden die so gefärbten Chips mikroskopiert.

6.6.4.2 Im Hydrogel: statisch im Well

Der Lebend/Tot-Nachweis der Zellen im Gel erfolgte durch Färbung mit Calcein-AM und PI. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist in Tabelle 9 angegeben. Hierzu wurde das Medium vorsichtig vom Gel abgenommen und das Gel mit der Färbelösung für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, anschließend mit DPBS^{-/-} gewaschen und mikroskopisch ausgewertet.

6.6.4.3 Im Hydrogel: fluidisch im Chip

Im vasQchip erfolgte der Lebend/Tot-Nachweis der Zellen im Gel durch Färbung mit Calcein-AM und PI. Die Zusammensetzung der Färbelösung in Tabelle 9 angegeben. Hierfür wurde eine Spritze mit der Färbelösung befüllt und diese fluidisch für eine Stunde durch den Kanal gespült. Somit konnte eine Diffusion in das umgebende Kompartiment und eine Färbung der Zellen stattfinden.

6.6.4.4 2D im Well

Die Färbung einer zwei-dimensionalen Zellkultur erfolgte durch FDA und PI entsprechend der in Tabelle 10 angegebenen Zusammensetzung. Dazu wurde das Zellkulturmedium zunächst abgenommen und die Zellschicht mit Färbelösung überschichtet. Es folgte ein Inkubation von 5 min bei RT und ein anschließender Waschschritt mit DPBS^{-/-}.

6.6.4.5 Mikroskopeinstellungen

Calcein-AM	Propidiumiodid
λ _{ex} : 488 nm λ _{em} : 500-580 nm	λ _{ex} : 532 nm λ _{em} : 610-700 nm

6.7. Funktionalitätstests

6.7.1. Beschichtungen mit unterschiedlichen Matrixproteinen

Die Beschichtung mit verschiedenen EZM-Proteinen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator. Hierfür wurden Gelatine sowie Kollagen I in der gewünschten Konzentration in Wasser, Fibronektin, GelTrex™ und Laminin in DPBS^{-/-} und Kollagen IV in 0,25% Essigsäure gelöst und die PC-Folie für 1h bzw. 2h für Gelatine inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgenommen und die PC-Folie mit DPBS^{-/-} gewaschen.

6.7.2. Permeabilitätsassay

6.7.2.1 Im Transwell

Die apikale Seite einer Transwell-Membran wurde analog zu den in 6.7.1 beschriebenen Bedingungen mit Gelatine, Kollagen I, Kollagen IV und Fibronektin beschichtet. Anschließend wurden je 1·10⁴ hCMEC/D3 in 100 µl hCMEC/D3-Kultivierungsmedium in die Wells ausgesät und

Methoden

bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, die basale Kammer wurde mit 1 ml Medium befüllt. Parallel wurden Transwells beschichtet, auf die keine Zellen ausgesät wurden. Diese wurden analog zu den Zellen enthaltenden Transwells behandelt. Nach 72h erfolgte eine Umstellung des Mediums auf das Differenzierungsmedium und eine weitere Kultivierung von 72h. Zur Durchführung des Permeabilitätsassays wurden die Zellen zunächst in Ringer-HEPES-Puffer äquilibriert, dazu wurde das Medium entfernt und durch 100 µl Puffer apikal und 600 µl Puffer basal ersetzt. Anschließend wurden die Transwell-Filter in eine neue Platte mit 600 µl Ringer-HEPES-Puffer überführt. Apikal wurde die Pufferlösung entnommen und 150 µl der Analysesubstanz (Lucifer Yellow, 10 µg/ml in Ringer-HEPES-Puffer) appliziert. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Transwell-Filter erneut in eine neue Platte überführt, die Lösungen basal und apikal gesammelt und die Fluoreszenz am Mikroplatten-Reader (λ_{em} : 428 nm, λ_{ex} : 536 nm) ausgelesen.

6.7.2.2 *Im Chip*

Zur Durchführung des Permeabilitätsassays im vasQchip wurden Mikrokanäle mit einer durchschnittlichen Porengröße von 1 µm gewählt. Diese wurden nach 6.2.2.1 mit Kollagen I (1 µg/cm²) beschichtet und mit 7,5·10⁴ hCMEC/D3 (6.2.2.2) besiedelt. Anschließend erfolgte die Verbindung mit der Mikrofluidik nach 6.2.2.3 und eine siebentägige Kultivierung mit einer Flussrate von 100 µl/h, wobei nach 48 h auf das Differenzierungsmedium umgestellt wurde.

Zur Permeabilitätsbestimmung wurde der Mikrokanal anschließend mit einer Spritze verbunden, die LY in einer Konzentration von 20 µM, gelöst in Zellkulturmedium, enthielt. Das umgebende Kompartiment wurde parallel dazu mit einer Spritze verbunden, die mit reinem Zellkulturmedium befüllt war. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 1 ml/h eingestellt und der Ausfluss aus beiden Kompartimenten in 30-Minuten-Intervallen gesammelt. Die aufgefangenen Mengen wurden durch Wiegen bestimmt und die Fluoreszenz der Lösungen am Mikroplatten-Reader (λ_{em} : 428 nm, λ_{ex} : 536 nm) gemessen. Um den Größenunterschied der beiden Kompartimente auszugleichen und so einen gleichmäßigen Ausstrom aus beiden Kompartimenten zu gewährleisten, wurden am Ausgang jeweils zwei Widerstandseinheiten angeschlossen.

6.7.3. Versorgung des umgebenden Kompartiments

VasQchips mit einer durchschnittlichen Porengröße von 1,6 µm wurden wie in Kapitel 6.2.2.4 beschrieben mit HBVP, HA und hCMEC/D3 besiedelt und anschließend für 72 h mit einer Flussrate von 100 µl/h unter Standardbedingungen kultiviert. Die Chips wurden daraufhin von der Fluidik getrennt und 5·10⁵ HA im Kollagenhydrogel (2 mg/ml, Herstellung nach 6.3.2.3) in das umgebende Kompartiment eingebracht und für 3 h statisch inkubiert. Anschließend wurden die Chips erneut an die Fluidik angeschlossen, hierbei wurde der Farbstoff CellTracker™ Green CMFDA (10 µM im Kultivierungsmedium) für eine bzw. 24 h mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 µl/h durch den Kanal gepumpt. Die Visualisierung der Zellen im Gel erfolgte durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurden Z-Stack-Messungen von 100 µm durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Stellen unterhalb und neben dem Mikrokanal aufgenommen. Unterhalb des Kanals wurde nach 1 h Inkubation zudem eine Z-Stack-Messung mit einer Gesamthöhe von 500 µm durchgeführt. Für eine bessere Beurteilung der Penetration des Farbstoffes wurden die Zellkerne der im Kollagengel eingeschlossenen Astrozyten mit Hoechst33342 (2 µg/ml) gefärbt.

6.8. Bioprinting

Für das Bioprinting zellbeladener Hydrogele auf dem vasQchip wurden humane Astrozyten (HA) und Perizyten (HBVP) nach den in Kapitel 6.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert, trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Hydrogellösungen wie in 6.3.2 beschrieben, hergestellt und in Druckerkartuschen überführt. Es wurde ein Kartuschenstopfen eingesetzt und die Kartusche von beiden Seiten mit einer Kappe verschlossen. Um Luftblasen innerhalb der Lösung zu vermeiden, wurden die Kartuschen bis zur Verwendung über Kopf bei RT gelagert. Für den Druckprozess wurden die Kartuschen in den Extrusionsdruckkopf des 3D Discovery eingesetzt und eine konische Nadel mit einem Durchmesser von 0,15 mm angeschlossen. Das Kühlsystem wurde auf 24 °C eingestellt und die Druckluft entsprechend angepasst (GelMA 0,045 MPa, GelNB/GelS 0,075 MPa). Die Bedruckung des vasQchips wurde in einem schichtweisen Verfahren durchgeführt, wobei zunächst eine Schicht Perizyten gefolgt von einer Schicht Astrozyten aufgebracht wurde. Jede Schicht wurde durch Belichtung mit einer Osram Ultra Vitalux Lampe vernetzt. Die Belichtungszeiten betrugen dabei 30 s für GelMA bzw. 20 s für GelNB/GelS.

Nach dem Druckprozess wurden die vasQchips zunächst offen für eine Stunde im Inkubator äquilibriert, wobei die Hydrogele mit 1 ml Medium überschichtet wurden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium vorsichtig abgenommen, das umgebende Kompartiment mit einem Klebering und einem Deckglas verschlossen und mit Medium befüllt. Die Beschichtung und Besiedlung des Mikrokanals erfolgten entsprechend den in Kapitel 6.2.2 angegebenen Bedingungen.

7. Material

7.1. Zellen

- HA (Humane Astrozyten, SC-1800, Provitro), Passage 5-9
- HBVP (Human Brain Vascular Pericytes, Provitro), Passage 5-9
- hCMEC/D3 (Primary Human Brain Microvascular Endothelial Cells, von Prof. G. Fricker, Universität Heidelberg bereitgestellt), Passage 33-35
- hCMEC/D3 (SCC066, Merck), Passage 5-8 (Eine genaue Angabe zur Passage wird vom Hersteller nicht gegeben, eine Passagierung bis zu 10 Passagen wird jedoch ohne Verlust spezifischer Marker und Funktionalitäten garantiert. Die nach Erhalt in Kultur genommenen Zellen wurden als Passage 1 bezeichnet.)
- HN (Humane Neuronen, 1520-5, Provitro), Passage 0

7.2. Zellkulturmedien

Zellen	Art des Mediums	Zusammensetzung
HA	Kultivierungsmedium	500 ml AM (Provitro / ScienCell) AGS Zusätze (Provitro / ScienCell) 5 ml P/S
HBVP	Kultivierungsmedium	500 ml PM (Provitro / ScienCell) PGS Zusätze (Provitro / ScienCell) 5 ml P/S
hCMEC/D3	Kultivierungsmedium	500 ml EBM®-2 (Promocell) 125 µl Ascorbinsäure (EGM®-2 Zusatz) 125 µl bFGF (EGM®-2 Zusatz) 125 µl EGF (EGM®-2 Zusatz) 125 µl IGF-1 (EGM®-2 Zusatz) 125 µl VEGF (EGM®-2 Zusatz) 5 ml P/S 2,5 % FCS 0,55 µM Hydrocortison
	Differenzierungsmedium	500 ml EBM®-2 125 µl Ascorbinsäure (EGM®-2 Zusatz) 0,25 % FCS 0,55 µM Hydrocortison 5 ml P/S
HN	Kultivierungsmedium	500 ml NM (Provitro / ScienCell)

		NGS Zusätze (Provitro / Scicell) 5 ml P/S
HA, hCMEC/D3	Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FCS
HBVP	Einfriermedium	10 % DMSO 50 % FCS 40 % PM

7.3. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Lieferant / Hersteller
5-Norbornen-2-Carbonsäure	TCI Chemicals
CaCl ₂	Carl Roth®
Calcein-AM	Invitrogen™
CasBlock™	Invitrogen™
CellTracker™ Green CMFDA Farbstoff	Invitrogen™
CellTracker™ Red CMTPX Farbstoff	Invitrogen™
Chloroform	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Collagen I from rat tail	Enzo Life Science
D(+)-Glucose	Carl Roth®
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
DNA ladder, 100 bp plus	Applichem Lifescience
dNTP Solution Mix	New England Biolabs
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x, 10x -CaCl ₂ , -MgCl ₂), (1x, +CaCl ₂ , +MgCl ₂)	Gibco® life technologies
EDC-HCl, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimidhydrochlorid	Carl Roth®
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth®
Ethanol 99,8 % AnalR NORMAPUR	VWR Chemicals
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth®
FBS, Fetal Bovine Serum	Gibco® life technologies
FDA, Fluoresceindiacetat	Sigma Aldrich
Fibronektin	Promocell (Heidelberg, Deutschland)
Gelatine Typ A, porcine skin	Sigma Aldrich® Merck KGaA
GelTrex™ LDVE-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix w/o Phenol Red	Thermo Fisher Scientific

Material

GoTaq® qPCR MasterMix	Promega
HEPES	Carl Roth®
Hoechst 33342 10 mg/ml Solution	Invitrogen™
Hydrocortison	Sigma Aldrich
Irgacure 2959, 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Isopropanol	Carl Roth®
KCl	Carl Roth®
Kollagen IV, human	Advanced Biomatrix
Laminin, mouse sarcoma	MP Biomedicals
LAP, Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat	TCI Chemicals
Lucifer Yellow CH, Lithiumsalz	Invitrogen™
Methacrylsäureanhydrid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
MgCl ₂	Carl Roth®
MTT Reagenz und Solubilization Solution/Stop Mix	Promega
N-Acetyl-DL-Homocystein-thiolacton	Sigma Aldrich® Merck KGaA
NaCl	Carl Roth®
NaHCO ₃	Carl Roth®
NaOH, Natriumhydroxid	Carl Roth®
NHS, N-Hydroxysuccinimid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Nukleasefreies Wasser	Promega
Paraformaldehyd	Carl Roth®
Penicillin/Streptomycin	Gibco® life technologies
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Poly-L-Lysin	ScienCell BosterBio
PrestoBlue Zellviabilitätsreagenz	Invitrogen™
Propidiumiodid	Sigma Aldrich
Quick-Load® 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs
Random Primers	Promega
RNase AWAY®	Carl Roth®
SDS, Sodiumdodecylsulfat	Carl Roth®
Triton-X 100	Carl Roth®
Trizol® Reagent	Invitrogen™

Trypsin-EDTA 0,25%	Gibco® life technologies
Universal-Agarose, peqGOLD	VWR
Verapamil	Sigma Aldrich® Merck KGaA

7.4. Enzyme

Bezeichnung	Lieferant / Hersteller
GoTaq® G2 DNA-Polymerase inkl. Puffer	Promega
Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant) inkl. Puffer	Promega
RQ1 RNase-free DNase inkl. Puffer und Stop Solution	Promega

7.5. Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10 x TAE-Puffer (pH 8,5)	48,4 g Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan 37,2 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 11,4 ml Essigsäure konz. Auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen
Ringer-HEPES-Puffer (pH 7,4)	8,766 g NaCl 0,244 g CaCl ₂ 0,041 g MgCl ₂ 0,388 g KCl 0,504 g NaHCO ₃ 0,555 g D(+)-Glucose 1,192 g HEPES pH-Wert mit 10 M NaOH eingestellt, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt

7.6. Antikörper

Bezeichnung	Lieferant / Hersteller
Anti-Alpha-SMA produced in mouse, ab54723	abcam
Anti-Brain Lipid Binding Protein (FABP7) produced in rabbit, ABN14	Merck KGaA
Anti-CD31 produced in sheep, AF806	R&D Systems
Anti-GFAP produced in rabbit, ab5804	Merck KGaA

Material

Anti-Synapsin-I produced in rabbit, ab64581	abcam
Anti-VE-Cadherin produced in rabbit, ab33168	abcam
Anti-ZO-1 produced in goat, ab190085	abcam
Monoclonal Anti-CD31-FITC produced in mouse, F8402	Sigma Aldrich®, Merck KGaA
Chicken-anti-rabbit-AF 647, A21443	Invitrogen™
Donkey-anti-sheep-FITC, A16049	Invitrogen™
Goat-anti-mouse-AF 488, A11001	Invitrogen™
Goat-anti-mouse-AF 568, A11030	Invitrogen™

7.7. Oligonukleotide

Bezeichnung	Forward 5' – 3'	Reverse 5' – 3'
Actin	AGC ATC CCC CAA AGT TCA CAA	GCT ATC ACC TCC CCT GTG TGG
BCRP	AGG CAG ATG CCT TCT TCG TTA	ATG CTG CAA AGC CGT AAA TCC
CD31	ATT GCA GTG GTT ATC ATC GGA GTG	CTC GTT GTT GGA GTT CAG AAG TGG
Claudin-5	AGG CGT GCT CTA CCT GTT TTG	AAC TCG CGG ACG ACA ATG TT
GAPDH	GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG	GCT TCC CGT TCT CAG CCT TG
Occludin	AAG AGC ACC TGC AAA GGG AAG	TCC TGT AGG CCA GTG TCA AAA
P-gp	TTG ACC CGC ACT TCA GCT AC	CTC GGG GTT GAT GCC GTA TT
VE-Cadherin	AGG TGC TAA CCC TGC CCA AC	GCC TCT CAA TGG CGA ACA CG
ZO-1	AGA GGT GTT CCG TGT TGT GG	GTC TCC GCC TGC TGT TTT TG

7.8. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant / Hersteller
µ-Slide 8 Well ibiTreat	Ibidi®
Corning® 6.5 mm Transwell® with 0.4 µm pore polycarbonate membrane insert, TC-treated	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Deckglas Dicke 0,16-0,19 cm	Langenbrinck
Deckgläschen, ø 32 mm, #1,5	Menzel
Dialyseschlüsse 12-14 kDa	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Falcon Tubes 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One
Female Luer Lock Coupler	ibidi
Kartusche, Optimum, 3cc, klar	Nordson EFD
Kartuschenverschluss unten, drehbar	Nordson EFD
Klebeband VHB™	Scotch™
Luer Connector Female	ibidi
Luer Connector Male	ibidi
Luer Plug Male	ibidi
Messpipetten	Brand GmbH

5 ml, 10 ml, 20 ml	
Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Scientific
Multiwell-Platte 24-Well	Greiner Bio-One
48-Well	
96-Well	
Nadeln 0,15 mm lila, konisch, Standard	Vieweg GmbH
Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System 8 Wells	Thermo Scientific™
Pasteurpipetten	Brand GmbH
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	VWR International
1-200 µl	
Pipettenspitzen 100-1000 µl	Corning Incorporated
Polycarbonatfolie Fluenz 10^6 Ionen/cm ²	It4ip
Pumpenschlauch Tygon 3350, Innendurchmesser 0,76 mm	Saint-Gobain Performance plastics
Pumpenschlauch Tygon LMT-55, 2 Stopper Innendurchmesser 0,76 mm	Ismatec
Safe-Lock-Tubes 1,5 und 2 ml	Eppendorf
Spritzen Inkjet®, 10 ml	B.Braun
Spritzen Omnifix®, 10 ml	B.Braun
Sticky slide 8 well	Ibidi®
Stopfen, 3cc, rot	Nordson EFD
Verschlusskappe oben, blau, für 3cc Kartuschen	Nordson EFD
Zellkulturfälschen 75 cm ²	Greiner Bio-One

7.9. Geräte

Bezeichnung	Lieferant / Hersteller
3D-Drucker 3D Discovery Gen 1	regenHU (Villaz-St-Pierre, Schweiz)
Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Bioscience GmbH
Absorptionsspektrometer SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH
CFX Connect Real Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH
CO ₂ -Inkubator	Labotect GmbH
CO ₂ -Inkubator, C170	Binder
ENVAIReco® Werkbank	ENVAIR
Feinwaage LAG214i	Molecular Devices
Inverses Lichtmikroskop DMIL LED	Leica

Material

Konfokalmikroskop TCS SPE DMI4000B	Leica
Kühlsystem für 3D Discovery, Umwälzkühler Huber Pilot One	Peter Huber Kältemaschinenbau AG (Offenburg, Deutschland)
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR International GmbH
Lyophilisator Christ Alpha 1-4	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Magnetrührer VMS-C7 mit Heizplatte und Temperaturfühler PT1000	VWR International GmbH
Mikroplatten-Reader SpectraMax iD3	Molecular Devices
Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop™ Lite	Thermo Scientific
Omnicure S2000 mit Radiometer R2000	Excelitas Technologies Corp.
Peristaltikpumpe; PeRISYS-S	Cetoni
pH-Meter	VWR International GmbH
Pipetten Eppendorf Research plus 0,5-10 µl 10-100 µl 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettierhelfer accu-jet pro, 0,1-200 ml	Brand
Spritzenpumpe, Fusion 200 Classic Syringe Pump	Chemyx
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermocycler peqSTAR	VWR, peqlab
Transferpette 2,5 µl	Brand
vasQturn	Eigenproduktion
Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH + Co. KG
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus

7.10. Software

- **ChemdrawProfessional 15.0**, CambridgeSoft
- **Image J**
- **Leica LAS AF Lite** (Leica Application Suite, Advanced Fluorescence Lite)
- **Microsoft Office 2011**
- **Bio-Rad CFX Maestro**
- **CorelDRAW X4**

8. Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
AM	Astrozytenmedium
Äq	Äquivalent
BBB	Blut-Hirn-Schranke (engl. <i>Blood-Brain-Barrier</i>)
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CEC	zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen
cm	Zentimeter
Da	Dalton
ddH₂O	<i>double distilled water</i>
DM	hCMEC/D3-Differenzierungsmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DoF	<i>Degree of functionalization</i>
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EBM	<i>Endothelial Basal Medium</i>
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethyldiaminteratessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
EZM	Extrazellulärmatrix
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FCS	Fötales Kälberserum (engl. <i>Fetal calf serum</i>)
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluorescein
FU	<i>Fluorescence Unit</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GelMA	methacrylierte Gelatine
GelNB	Norbornen-funktionalisierte Gelatine
GelS	Thiol-funktionalisierte Gelatine
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
h	Höhe
h	Stunde
HA	Human Astrocytes
HBVP	Human Brain Vascular Pericytes
HN	Humane Neuronen
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IGF	Insulin-like Growth Factor

Abkürzungsverzeichnis

KIT	Karlsruher Institut für Technologie
KM	hCMEC/D3-Kultivierungsmedium
LAP	Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat
LD₅₀	Letale Dosis 50 %
LED	<i>Light-Emitting Diode</i>
LY	Lucifer Yellow
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NM	Neuronenmedium
NVU	Neurovaskuläre Einheit (engl. <i>Neurovascular Unit</i>)
Ooc	<i>Organ-on-Chip</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Propidiumiodid
PLL	Poly-L-Lysin
PM	Perizytenmedium
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RGB	Rot-Grün-Blau
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (engl. <i>Standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEER	<i>Transendothelial Electrical Resistance</i>
TRITC	Tetramethylrhodamin
U	Umdrehungen
UV	Ultraviolett
VE-Cadherin	<i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	<i>Zona Occludens</i>
α-SMA	<i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>

9. Literaturverzeichnis

- [1] E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. Fodor, M. A. Gallop, Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions, *Journal of medicinal chemistry* **1994**. DOI: 10.1021/jm00036a001.
- [2] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, Combinatorial synthesis — the design of compound libraries and their application to drug discovery, *Tetrahedron* **1995**. DOI: 10.1016/0040-4020(95)00467-M.
- [3] P. Verma, V. Verma, in *Animal biotechnology: Models in discovery and translation* (Eds.: A. S. Verma, A. Singh), Academic Press, an imprint of Elsevier. London, United Kingdom, San Diego, CA, United States **2020**, p. 295.
- [4] R. Langer, J. Vacanti, Advances in tissue engineering, *Journal of pediatric surgery* **2016**. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.
- [5] B. Guo, P. X. Ma, Conducting Polymers for Tissue Engineering, *Biomacromolecules* **2018**. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b00276.
- [6] K. Dzobo, N. E. Thomford, D. A. Senthebane, H. Shipanga, A. Rowe, C. Dandara, M. Pillay, K. S. C. M. Motaung, Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine, *Stem cells international* **2018**. DOI: 10.1155/2018/2495848.
- [7] D. J. Lo, B. Kaplan, A. D. Kirk, Biomarkers for kidney transplant rejection, *Nature reviews. Nephrology* **2014**. DOI: 10.1038/nrneph.2013.281.
- [8] K. J. Wood, R. Goto, Mechanisms of rejection: current perspectives, *Transplantation* **2012**. DOI: 10.1097/TP.0b013e31823cab44.
- [9] A. S. Mao, D. J. Mooney, Regenerative medicine: Current therapies and future directions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**. DOI: 10.1073/pnas.1508520112.
- [10] S. T. Boyce, A. L. Lalley, Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care, *Burns & trauma* **2018**. DOI: 10.1186/s41038-017-0103-y.
- [11] F. Berthiaume, T. J. Maguire, M. L. Yarmush, Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges, *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **2011**. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- [12] R. S. Mahla, Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics, *International Journal of Cell Biology* **2016**. DOI: 10.1155/2016/6940283.
- [13] B. Arjmand, P. Goodarzi, F. Mohamadi-Jahani, K. Falahzadeh, B. Larijani, Personalized Regenerative Medicine, *Acta medica Iranica* **2017**.
- [14] J. P. Hughes, S. Rees, S. B. Kalindjian, K. L. Philpott, Principles of early drug discovery, *British Journal of Pharmacology* **2011**. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- [15] L. E. Lansdowne, *Exploring the Drug Development Process* **2020**.

Literaturverzeichnis

- [16] D. W. Thomas, J. Burns, J. Audette, A. Carrol, Dow-Hygelund, Corey, Hay, Michael, *Clinical Development Success Rates 2006-2015* **2016**.
- [17] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, L. Yang, Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors, *Assay and drug development technologies* **2014**.
DOI: 10.1089/adt.2014.573.
- [18] M. W. Hess, K. Pfaller, H. L. Ebner, B. Beer, D. Hekl, T. Seppi, in *Methods in cell biology*, Vol. 96 (Ed.: T. Müller-Reichert), Elsevier/Academic Press. Amsterdam **2010**, p. 649.
- [19] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture, *Physiology (Bethesda, Md.)* **2017**.
DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [20] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska, 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures, *Archives of Medical Science AMS* **2016**.
DOI: 10.5114/aoms.2016.63743.
- [21] P. D. Benya, J. D. Shaffer, Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell* **1982**.
DOI: 10.1016/0092-8674(82)90027-7.
- [22] J. Bierwolf, M. Lutgehetmann, K. Feng, J. Erbes, S. Deichmann, E. Toronyi, C. Stieglitz, B. Nashan, P. X. Ma, J. M. Pollok, Primary rat hepatocyte culture on 3D nanofibrous polymer scaffolds for toxicology and pharmaceutical research, *Biotechnology and bioengineering* **2011**.
DOI: 10.1002/bit.22924.
- [23] K. von der Mark, V. Gauss, H. von der Mark, P. Müller, Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture, *Nature* **1977**.
DOI: 10.1038/267531a0.
- [24] J. W. Haycock, 3D cell culture: a review of current approaches and techniques, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**.
DOI: 10.1007/978-1-60761-984-0_1.
- [25] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, J. de Boer, Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues, *Trends in Biotechnology* **2013**.
DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [26] R.-Z. Lin, R.-Z. Lin, H.-Y. Chang, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, *Biotechnology journal* **2008**.
DOI: 10.1002/biot.200700228.
- [27] D. Huh, G. A. Hamilton, D. E. Ingber, From 3D cell culture to organs-on-chips, *Trends in cell biology* **2011**.
DOI: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [28] V. Kappings, C. Grün, D. Ivannikov, I. Hebeiss, S. Kattge, I. Wendland, B. E. Rapp, M. Hettel, O. Deutschmann, U. Schepers, vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues, *Adv. Mater. Technol.* **2018**.
DOI: 10.1002/admt.201700246.
- [29] S. N. Bhatia, D. E. Ingber, Microfluidic organs-on-chips, *Nature biotechnology* **2014**.
DOI: 10.1038/nbt.2989.

- [30] R. O. Hynes, Extracellular matrix: not just pretty fibrils, *Science* **2009**.
DOI: 10.1126/science.1176009.
- [31] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *Journal of cell science* **2010**.
DOI: 10.1242/jcs.023820.
- [32] J. D. Humphries, A. Byron, M. J. Humphries, Integrin ligands at a glance, *Journal of cell science* **2006**.
DOI: 10.1242/jcs.03098.
- [33] B. Leitinger, E. Hohenester, Mammalian collagen receptors, *Matrix biology journal of the International Society for Matrix Biology* **2007**.
DOI: 10.1016/j.matbio.2006.10.007.
- [34] D. S. Harburger, D. A. Calderwood, Integrin signalling at a glance, *Journal of cell science* **2009**.
DOI: 10.1242/jcs.018093.
- [35] X. Xian, S. Gopal, Couchman, JR, Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix, *Cell and tissue research* **2010**.
DOI: 10.1007/s00441-009-0829-3.
- [36] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos, Extracellular matrix structure, *Advanced drug delivery reviews* **2016**.
DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [37] K. C. Clause, T. H. Barker, Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair, *Current opinion in biotechnology* **2013**.
DOI: 10.1016/j.copbio.2013.04.011.
- [38] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, F. D. P. Solomon, 3D cell culture systems: advantages and applications, *Journal of cellular physiology* **2015**.
DOI: 10.1002/jcp.24683.
- [39] J. Lee, M. J. Cuddihy, N. A. Kotov, Three-dimensional cell culture matrices: state of the art, *Tissue Engineering. Part B, Reviews* **2008**.
DOI: 10.1089/teb.2007.0150.
- [40] G. Jose, K. T. Shalumon, J.-P. Chen, Natural Polymers Based Hydrogels for Cell Culture Applications, *Current medicinal chemistry* **2020**.
DOI: 10.2174/0929867326666190903113004.
- [41] J. Zhu, R. E. Marchant, Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds, *Expert review of medical devices* **2011**.
DOI: 10.1586/erd.11.27.
- [42] E. M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research* **2015**.
DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [43] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture, *Biotechnology and bioengineering* **2009**.
DOI: 10.1002/bit.22361.
- [44] L. T. Saldin, M. C. Cramer, S. S. Velankar, L. J. White, S. F. Badylak, Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function, *Acta Biomaterialia* **2017**.
DOI: 10.1016/j.actbio.2016.11.068.
- [45] E. E. Antoine, P. P. Vlachos, M. N. Rylander, Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport, *Tissue*

Literaturverzeichnis

- Engineering. Part B, Reviews* **2014**.
DOI: 10.1089/ten.teb.2014.0086.
- [46] R. W. Dettman, H.-G. Simon, Rebooting the collagen gel: Artificial hydrogels for the study of epithelial mesenchymal transformation, *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists* **2018**.
DOI: 10.1002/dvdy.24560.
- [47] E. Bell, B. Ivarsson, C. Merrill, Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1979**.
- [48] D. Eyrich, F. Brandl, B. Appel, H. Wiese, G. Maier, M. Wenzel, R. Staudenmaier, A. Goepferich, T. Blunk, Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering, *Biomaterials* **2007**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.
- [49] A. Noori, S. J. Ashrafi, R. Vaez-Ghaemi, A. Hatamian-Zaremi, T. J. Webster, A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering, *International journal of nanomedicine* **2017**.
DOI: 10.2147/IJN.S124671.
- [50] C. Schneider-Barthold, S. Baganz, M. Wilhelmi, T. Scheper, I. Pepelanova, *Hydrogels based on collagen and fibrin - Frontiers and applications*, Berlin De Gruyter **2016**.
- [51] X. Xu, A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-Carson, X. Jia, Hyaluronic Acid-Based Hydrogels: from a Natural Polysaccharide to Complex Networks, *Soft matter* **2012**.
DOI: 10.1039/C2SM06463D.
- [52] P. Rastogi, B. Kandasubramanian, Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering, *Biofabrication* **2019**.
DOI: 10.1088/1758-5090/ab331e.
- [53] M. C. Catoira, L. Fusaro, D. Di Francesco, M. Ramella, F. Boccafoschi, Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications, *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* **2019**.
DOI: 10.1007/s10856-019-6318-7.
- [54] S.-L. Chen, R.-H. Fu, S.-F. Liao, S.-P. Liu, S.-Z. Lin, Y.-C. Wang, A PEG-Based Hydrogel for Effective Wound Care Management, *Cell transplantation* **2018**.
DOI: 10.1177/0963689717749032.
- [55] U. Mendez, H. Zhou, A. Shikanov, Synthetic PEG Hydrogel for Engineering the Environment of Ovarian Follicles, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2018**.
DOI: 10.1007/978-1-4939-7741-3_9.
- [56] B. B. Grosshäuser, *Engineered Three Dimensional Neuro-Environment for Organ-On-Chip Applications*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2017**.
- [57] J. A. Benton, C. A. DeForest, V. Vivekanandan, K. S. Anseth, Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function, *Tissue engineering. Part A* **2009**.
DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0545.
- [58] A. I. van den Bulcke, B. Bogdanov, N. de Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels, *Biomacromolecules* **2000**.
DOI: 10.1021/bm990017d.

- [59] K. Yue, G. Trujillo-de Santiago, M. M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, A. Khademhosseini, Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels, *Biomaterials* **2015**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045.
- [60] W. T. Brinkman, K. Nagapudi, B. S. Thomas, E. L. Chaikof, Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function, *Biomacromolecules* **2003**.
DOI: 10.1021/bm0257412.
- [61] J. E. Sosa-Hernández, A. M. Villalba-Rodríguez, K. D. Romero-Castillo, M. A. Aguilar-Aguila-Isaías, I. E. García-Reyes, A. Hernández-Antonio, I. Ahmed, A. Sharma, R. Parra-Saldívar, H. M. N. Iqbal, Organs-on-a-Chip Module: A Review from the Development and Applications Perspective, *Micromachines* **2018**.
DOI: 10.3390/mi9100536.
- [62] M. Mastrangeli, S. Millet, t. O. partners, J. van den Eijnden-van Raaij, *Organ-on-Chip In Development: Towards a roadmap for Organs-on-Chip* **2019**.
- [63] D. Ivannikov, *In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2016**.
- [64] I. Hebeiß, *Etablierung eines mikrofluidischen 3D-Bioreaktors zur Untersuchung des transendothelialen Transports in vitro*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2012**.
- [65] C. Grün, R. Pfister, S. Haase, U. Schepers, *GIT* **2018**.
- [66] S. Giselbrecht, E. Gottwald, R. Truckenmueller, C. Trautmann, A. Welle, A. Guber, V. Saile, T. Gietzelt, K.-F. Weibezahn, *Journal of visualized experiments JoVE* **2008**.
- [67] D. D. Huh, A human breathing lung-on-a-chip, *Annals of the American Thoracic Society* **2015**.
DOI: 10.1513/AnnalsATS.201410-442MG.
- [68] N. D. Yoon, K. H. Lee, J. Lee, S. H. Lee, 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip, *Lab on a chip* **2015**.
DOI: 10.1039/c5lc00611b.
- [69] S. Y. Chang, E. J. Weber, K. van Ness, D. L. Eaton, E. J. Kelly, Liver and Kidney on Chips: Microphysiological Models to Understand Transporter Function, *Clinical pharmacology and therapeutics* **2016**.
DOI: 10.1002/cpt.436.
- [70] S. Lee, S. P. Jin, Y. K. Kim, G. Y. Sung, J. H. Chung, J. H. Sung, Construction of 3D multicellular microfluidic chip for an in vitro skin model, *Biomedical microdevices* **2017**.
DOI: 10.1007/s10544-017-0156-5.
- [71] K.-Y. Shim, D. Lee, J. Han, N.-T. Nguyen, S. Park, J. H. Sung, Microfluidic gut-on-a-chip with three-dimensional villi structure, *Biomedical microdevices* **2017**.
DOI: 10.1007/s10544-017-0179-y.
- [72] E. Jastrzebska, E. Tomecka, I. Jesion, Heart-on-a-chip based on stem cell biology, *Biosensors & bioelectronics* **2016**.
DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.012.
- [73] D. T. Phan, R. H. F. Bender, J. W. Andrejcsik, A. Sobrino, S. J. Hachey, S. C. George, C. C. Hughes, Blood-brain barrier-on-a-chip: Microphysiological systems that capture the complexity of the blood-central nervous system interface, *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **2017**.
DOI: 10.1177/1535370217694100.

Literaturverzeichnis

- [74] M. A. Mofazzal Jahromi, A. Abdoli, M. Rahamanian, H. Bardania, M. Bayandori, S. M. Moosavi Basri, A. Kalbasi, A. R. Aref, M. Karimi, M. R. Hamblin, Microfluidic Brain-on-a-Chip: Perspectives for Mimicking Neural System Disorders, *Molecular neurobiology* **2019**. DOI: 10.1007/s12035-019-01653-2.
- [75] C. W. McAleer, C. J. Long, D. Elbrecht, T. Sasserath, L. R. Bridges, J. W. Rumsey, C. Martin, M. Schnepper, Y. Wang, F. Schuler, A. B. Roth, C. Funk, M. L. Shuler, J. J. Hickman, Multi-organ system for the evaluation of efficacy and off-target toxicity of anticancer therapeutics, *Science translational medicine* **2019**. DOI: 10.1126/scitranslmed.aav1386.
- [76] J. H. Sung, Y. I. Wang, N. Narasimhan Sriram, M. Jackson, C. Long, J. J. Hickman, M. L. Shuler, Recent Advances in Body-on-a-Chip Systems, *Analytical chemistry* **2019**. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b05293.
- [77] J. W. Mink, R. J. Blumenshine, D. B. Adams, Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis, *The American journal of physiology* **1981**. DOI: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.R203.
- [78] U. Lendahl, P. Nilsson, C. Betsholtz, Emerging links between cerebrovascular and neurodegenerative diseases-a special role for pericytes, *EMBO reports* **2019**. DOI: 10.15252/embr.201948070.
- [79] S. Duchemin, M. Boily, N. Sadekova, H. Girouard, The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation, *Frontiers in neural circuits* **2012**. DOI: 10.3389/fncir.2012.00051.
- [80] C. Iadecola, The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease, *Neuron* **2017**. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.07.030.
- [81] A. H. Bell, S. L. Miller, M. Castillo-Melendez, A. Malhotra, The Neurovascular Unit: Effects of Brain Insults During the Perinatal Period, *Frontiers in neuroscience* **2019**. DOI: 10.3389/fnins.2019.01452.
- [82] V. Muoio, P. B. Persson, M. M. Sendeski, The neurovascular unit - concept review, *Acta physiologica (Oxford, England)* **2014**. DOI: 10.1111/apha.12250.
- [83] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nature reviews. Neuroscience* **2006**. DOI: 10.1038/nrn1824.
- [84] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, D. J. Begley, Structure and function of the blood-brain barrier, *Neurobiology of disease* **2010**. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- [85] H. F. Cserr, M. Bundgaard, Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach, *The American journal of physiology* **1984**. DOI: 10.1152/ajpregu.1984.246.3.R277.
- [86] W. Risau, Development and differentiation of endothelium, *Kidney international. Supplement* **1998**. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.06701.x.
- [87] G. J. Tortora, B. H. Derrickson, *Anatomie und Physiologie*, Wiley-VCH Verl., Weinheim **2006**.

- [88] D. S. Miller, Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier, *Trends in pharmacological sciences* **2010**.
DOI: 10.1016/j.tips.2010.03.003.
- [89] J. Badaut, S. S. Cohen, D. Virgintino, B. S. Stonestreet, in *Fetal and neonatal physiologynVolume 1* (Eds.: R. A. Polin, S. H. Abman, D. H. Rowitch, W. E. Benitz, W. W. Fox), Elsevier **2017**, 1314-1325.e4.
- [90] I. Cockerill, J.-A. Oliver, H. Xu, B. M. Fu, D. Zhu, Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of Amyloid- β from the BBB, *Advances in experimental medicine and biology* **2018**.
DOI: 10.1007/978-3-319-96445-4_14.
- [91] M. Paulsson, Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **1992**.
DOI: 10.3109/10409239209082560.
- [92] L. Xu, A. Nirwane, Y. Yao, Basement membrane and blood-brain barrier, *Stroke and vascular neurology* **2019**.
DOI: 10.1136/svn-2018-000198.
- [93] M. S. Thomsen, L. J. Routhe, T. Moos, The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain, *Journal of cerebral blood flow and metabolism official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2017**.
DOI: 10.1177/0271678X17722436.
- [94] R. O. Hynes, Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* **1992**.
DOI: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.
- [95] K. M. Baeten, K. Akassoglou, Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke, *Developmental neurobiology* **2011**.
DOI: 10.1002/dneu.20954.
- [96] G. A. Rosenberg, E. Estrada, R. O. Kelley, M. Kornfeld, Bacterial collagenase disrupts extracellular matrix and opens blood-brain barrier in rat, *Neuroscience Letters* **1993**.
DOI: 10.1016/0304-3940(93)90927-D.
- [97] G. Savettieri, I. Di Liegro, C. Catania, L. Licata, G. L. Pitarresi, S. D'Agostino, G. Schiera, V. de Caro, G. Giandalia, L. I. Giannola, A. Cestelli, Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells, *Neuroreport* **2000**.
DOI: 10.1097/00001756-200004070-00035.
- [98] A. Müllner, *Basalmembran- und Integrinveränderungen nach experimentellem Schädelhirntrauma*, München **2008**.
- [99] ibidi, *Why Cell Culture Under Flow* **2020**, <https://ibidi.com/content/303-why-cell-culture-under-flow>.
- [100] L. Cucullo, M. Hossain, V. Puvenna, N. Marchi, D. Janigro, The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology, *BMC neuroscience* **2011**.
DOI: 10.1186/1471-2202-12-40.
- [101] A. D. Wong, M. Ye, A. F. Levy, J. D. Rothstein, D. E. Bergles, P. C. Searson, The blood-brain barrier: an engineering perspective, *Frontiers in Neuroengineering* **2013**.
DOI: 10.3389/fneng.2013.00007.
- [102] X. Wang, B. Xu, M. Xiang, X. Yang, Y. Liu, X. Liu, Y. Shen, Advances on fluid shear stress regulating blood-brain barrier, *Microvascular research* **2020**.
DOI: 10.1016/j.mvr.2019.103930.
- [103] B. J. DeOre, P. P. Partyka, F. Fan, P. A. Galie, CD44 regulates blood-brain barrier integrity in response to fluid shear stress.

Literaturverzeichnis

- [104] I. Sá-Pereira, D. Brites, M. A. Brito, Neurovascular unit: a focus on pericytes, *Molecular neurobiology* **2012**.
DOI: 10.1007/s12035-012-8244-2.
- [105] R. D. Bell, E. A. Winkler, A. P. Sagare, I. Singh, B. LaRue, R. Deane, B. V. Zlokovic, Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging, *Neuron* **2010**.
DOI: 10.1016/j.neuron.2010.09.043.
- [106] M. Hellström, H. Gerhardt, M. Kalén, X. Li, U. Eriksson, H. Wolburg, C. Betsholtz, Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis, *The Journal of cell biology* **2001**.
DOI: 10.1083/jcb.153.3.543.
- [107] C.-H. Lai, K.-H. Kuo, The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte, *Brain research. Brain research reviews* **2005**.
DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.07.004.
- [108] B. V. Zlokovic, The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders, *Neuron* **2008**.
DOI: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.
- [109] M. D. Sweeney, S. Ayyadurai, B. V. Zlokovic, Pericytes of the neurovascular unit: Key functions and signaling pathways, *Nature neuroscience* **2016**.
DOI: 10.1038/nn.4288.
- [110] J. Keaney, M. Campbell, The dynamic blood-brain barrier, *The FEBS journal* **2015**.
DOI: 10.1111/febs.13412.
- [111] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka, M. Niwa, A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Neurochemistry international* **2009**.
DOI: 10.1016/j.neuint.2008.12.002.
- [112] Ross Booth, Hanseup Kim, Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB), *Lab Chip* **2012**.
DOI: 10.1039/C2LC40094D.
- [113] J. I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonniere, M. Bernard, J. van Horssen, H. E. de Vries, F. Charron, A. Prat, The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence, *Science* **2011**.
DOI: 10.1126/science.1206936.
- [114] D. W. Beck, H. V. Vinters, M. N. Hart, P. A. Cancilla, Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier, *Journal of neuropathology and experimental neurology* **1984**.
DOI: 10.1097/000005072-198405000-00001.
- [115] Alberts, Bray, Hopkins, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, *Essential Cell Biology*, Garland Science **2003**.
- [116] C. S. von Bartheld, J. Bahney, S. Herculano-Houzel, The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting, *The Journal of comparative neurology* **2016**.
DOI: 10.1002/cne.24040.
- [117] U. Novak, A. H. Kaye, Extracellular matrix and the brain: components and function, *Journal of clinical neuroscience official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* **2000**.
DOI: 10.1054/jocn.1999.0212.

- [118] S. Bagchi, T. Chhibber, B. Lahooti, A. Verma, V. Borse, R. D. Jayant, In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview, *Drug design, development and therapy* **2019**.
DOI: 10.2147/DDDT.S218708.
- [119] L. Jiang, S. Li, J. Zheng, Y. Li, H. Huang, Recent Progress in Microfluidic Models of the Blood-Brain Barrier, *Micromachines* **2019**.
DOI: 10.3390/mi10060375.
- [120] A. Bhalerao, F. Sivandzade, S. R. Archie, E. A. Chowdhury, B. Noorani, L. Cucullo, In vitro modeling of the neurovascular unit: advances in the field, *Fluids and Barriers of the CNS* **2020**.
DOI: 10.1186/s12987-020-00183-7.
- [121] A. Wolff, M. Antfolk, B. Brodin, M. Tenje, In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches, *Journal of pharmaceutical sciences* **2015**.
DOI: 10.1002/jps.24329.
- [122] M. W. van der Helm, A. D. van der Meer, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, L. I. Segerink, Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research, *Tissue Barriers* **2016**.
DOI: 10.1080/21688370.2016.1142493.
- [123] J. Banerjee, Y. Shi, H. S. Azevedo, In vitro blood-brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms, *Drug discovery today* **2016**.
DOI: 10.1016/j.drudis.2016.05.020.
- [124] N. J. Abbott, Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability, *Journal of anatomy* **2002**.
DOI: 10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
- [125] Y. He, Y. Yao, S. E. Tsirka, Y. Cao, Cell-culture models of the blood-brain barrier, *Stroke* **2014**.
DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.005427.
- [126] B. D. Gastfriend, S. P. Palecek, E. V. Shusta, Modeling the blood-brain barrier: Beyond the endothelial cells, *Current opinion in biomedical engineering* **2018**.
DOI: 10.1016/j.cobme.2017.11.002.
- [127] I. Megard, A. Garrigues, S. Orlowski, S. Jorajuria, P. Clayette, E. Ezan, A. Mabondzo, A co-culture-based model of human blood–brain barrier: application to active transport of indinavir and in vivo–in vitro correlation, *Brain research* **2002**.
DOI: 10.1016/S0006-8993(01)03337-6.
- [128] K. Hatherell, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, G. J. Pilkington, Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models, *Journal of neuroscience methods* **2011**.
DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.05.012.
- [129] J. A. Brown, V. Pensabene, D. A. Markov, V. Allwardt, M. D. Neely, M. Shi, C. M. Britt, O. S. Hoilett, Q. Yang, B. M. Brewer, P. C. Samson, L. J. McCawley, J. M. May, D. J. Webb, D. Li, A. B. Bowman, R. S. Reiserer, J. P. Wikswo, Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor, *Biomicrofluidics* **2015**.
DOI: 10.1063/1.4934713.
- [130] A. K. H. Achyuta, A. J. Conway, R. B. Crouse, E. C. Bannister, R. N. Lee, C. P. Katnik, A. A. Behensky, J. Cuevas, S. S. Sundaram, A modular approach to create a neurovascular unit-on-

Literaturverzeichnis

- a-chip, *Lab Chip* **2013**.
DOI: 10.1039/c2lc41033h.
- [131] H. C. Helms, M. Hersom, L. B. Kuhlmann, L. Badolo, C. U. Nielsen, B. Brodin, An electrically tight in vitro blood-brain barrier model displays net brain-to-blood efflux of substrates for the ABC transporters, P-gp, Bcrp and Mrp-1, *The AAPS journal* **2014**.
DOI: 10.1208/s12248-014-9628-1.
- [132] J. A. Kim, H. N. Kim, S.-K. Im, S. Chung, J. Y. Kang, N. Choi, Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template, *Biomicrofluidics* **2015**.
DOI: 10.1063/1.4917508.
- [133] Vanessa Kappings, *Tumormodelle in vitro: von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System*, Cuvillier Verlag, Göttingen **2018**.
- [134] B. Weksler, I. A. Romero, P.-O. Couraud, The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier, *Fluids and Barriers of the CNS* **2013**.
DOI: 10.1186/2045-8118-10-16.
- [135] C. Kengla, A. Kidiyoor, S. V. Murphy, in *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration*, Elsevier **2017**, p. 957.
- [136] L. Hayflick, The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research* **1965**.
DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- [137] T. May, H. Hauser, D. Wirth, Funktionale Zelllinien durch neue Immortalisierungsprotokolle, *Biospektrum* **2012**.
DOI: 10.1007/s12268-012-0199-3.
- [138] L. Hayflick, P. S. Moorhead, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research* **1961**.
DOI: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- [139] J. W. Shay, W. E. Wright, Hayflick, his limit, and cellular ageing, *Nature reviews. Molecular cell biology* **2000**.
DOI: 10.1038/35036093.
- [140] M. I. Maqsood, M. M. Matin, A. R. Bahrami, M. M. Ghasroldasht, Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment, *Cell biology international* **2013**.
DOI: 10.1002/cbin.10137.
- [141] Y. Katakura, S. Alam, S. Shirahata, in *Animal Cell Culture Methods*, Vol. 57, Elsevier **1998**, p. 69.
- [142] C. Darimont, K. Macé, Immortalization of human preadipocytes, *Biochimie* **2003**.
DOI: 10.1016/j.biochi.2003.10.015.
- [143] D. E. Eigenmann, G. Xue, K. S. Kim, A. V. Moses, M. Hamburger, M. Oufir, Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies, *Fluids and Barriers of the CNS* **2013**.
DOI: 10.1186/2045-8118-10-33.
- [144] H. C. Helms, N. J. Abbott, M. Burek, R. Cecchelli, P.-O. Couraud, M. A. Deli, C. Förster, H. J. Galla, I. A. Romero, E. V. Shusta, M. J. Stebbins, E. Vandenhaute, B. Weksler, B. Brodin, In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use, *Journal of cerebral blood flow and metabolism*

- official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2016**.
DOI: 10.1177/0271678X16630991.
- [145] T. Tilling, D. Korte, D. Hoheisel, H. J. Galla, Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro, *Journal of neurochemistry* **1998**.
DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.71031151.x.
- [146] Merck, *Blood-Brain-Barrier hCMEC/D3 Cell Line*,
https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Blood-Brain-Barrier-hCMEC-D3-Cell-Line,MM_NF-SCC066#anchor_DS.
- [147] B. B. Weksler, E. A. Subileau, N. Perrière, 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, Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2005**.
DOI: 10.1096/fj.04-3458fje.
- [148] M. D. Shoulders, R. T. Raines, Collagen structure and stability, *Annual review of biochemistry* **2009**.
DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [149] Merck, *Gelatin Coating Protocol*, <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/gelatin-solution-product.html>.
- [150] Merck, *Fibronectin Coating Protocol*, <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/fibronectin-product-protocols.html>.
- [151] M. Weidner, S. Hüwel, F. Ebert, T. Schwerdtle, H.-J. Galla, H.-U. Humpf, Influence of T-2 and HT-2 toxin on the blood-brain barrier in vitro: new experimental hints for neurotoxic effects, *PloS one* **2013**.
DOI: 10.1371/journal.pone.0060484.
- [152] B. Engelhardt, L. Sorokin, The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction, *Seminars in immunopathology* **2009**.
DOI: 10.1007/s00281-009-0177-0.
- [153] P. Lertkhatmongkol, D. Liao, H. Mei, Y. Hu, P. J. Newman, Endothelial functions of PECAM-1 (CD31), *Current opinion in hematology* **2016**.
DOI: 10.1097/MOH.0000000000000239.
- [154] J. R. Privratsky, P. J. Newman, PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity, *Cell and tissue research* **2014**.
DOI: 10.1007/s00441-013-1779-3.
- [155] J. Lv, W. Hu, Z. Yang, T. Li, S. Jiang, Z. Ma, F. Chen, Y. Yang, Focusing on claudin-5: A promising candidate in the regulation of BBB to treat ischemic stroke, *Progress in neurobiology* **2018**.
DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.12.001.
- [156] S. M. Stamatovic, A. M. Johnson, R. F. Keep, A. V. Andjelkovic, Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction, *Tissue Barriers* **2016**.
DOI: 10.1080/21688370.2016.1154641.
- [157] M. M. Buschmann, Le Shen, H. Rajapakse, D. R. Raleigh, Y. Wang, Y. Wang, A. Lingaraju, J. Zha, E. Abbott, E. M. McAuley, L. A. Breskin, L. Wu, K. Anderson, J. R. Turner, C. R. Weber, Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux, *Molecular biology of the cell* **2013**.
DOI: 10.1091/mbc.E12-09-0688.

Literaturverzeichnis

- [158] J. Cording, J. Berg, N. Käding, C. Bellmann, C. Tscheik, J. K. Westphal, S. Milatz, D. Günzel, H. Wolburg, J. Piontek, O. Huber, I. E. Blasig, In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization, *Journal of cell science* **2013**.
- DOI: 10.1242/jcs.114306.
- [159] A. Schmidt, D. I. Utepbergenov, S. L. Mueller, M. Beyermann, J. Schneider-Mergener, G. Krause, I. E. Blasig, Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation, *Cellular and molecular life sciences CMS* **2004**.
- DOI: 10.1007/s00018-004-4010-6.
- [160] D. Vestweber, VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**.
- DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.158014.
- [161] C. Crone, S. P. Olesen, Electrical resistance of brain microvascular endothelium, *Brain research* **1982**.
- DOI: 10.1016/0006-8993(82)91227-6.
- [162] N. V. S. D. K. Bhupathiraju, X. Hu, Z. Zhou, F. R. Fronczek, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, M. G. H. Vicente, Synthesis and in vitro evaluation of BBB permeability, tumor cell uptake, and cytotoxicity of a series of carboranylporphyrin conjugates, *Journal of medicinal chemistry* **2014**.
- DOI: 10.1021/jm500786c.
- [163] P. Garberg, M. Ball, N. Borg, R. Cecchelli, L. Fenart, R. D. Hurst, T. Lindmark, A. Mabondzo, J. E. Nilsson, T. J. Raub, D. Stanimirovic, T. Terasaki, J.-O. Oberg, T. Osterberg, In vitro models for the blood-brain barrier, *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA* **2005**.
- DOI: 10.1016/j.tiv.2004.06.011.
- [164] B. Poller, H. Gutmann, S. Krähenbühl, B. Weksler, I. Romero, P.-O. Couraud, G. Tuffin, J. Drewe, J. Huwyler, The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies, *Journal of neurochemistry* **2008**.
- DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05730.x.
- [165] W. Zhao, L. Han, Y. Bae, D. S. Manickam, *Journal of visualized experiments JoVE* **2019**.
- [166] I. Hubatsch, E. G. E. Ragnarsson, P. Artursson, Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers, *Nature protocols* **2007**.
- DOI: 10.1038/nprot.2007.303.
- [167] M. D. Frame, I. H. Sarelius, Flow-induced cytoskeletal changes in endothelial cells growing on curved surfaces, *Microcirculation (New York, N.Y. 1994)* **2000**.
- [168] A. Eberhard, S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K. H. Plate, H. G. Augustin, Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies, *Cancer research* **2000**.
- [169] B. Hobson, J. Denekamp, Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies, *British journal of cancer* **1984**.
- DOI: 10.1038/bjc.1984.66.
- [170] S. Kattge, *In silico Design von artifiziellen Blutgefäßen für Organ-on-a-Chip Systeme*, Karlsruhe **2017**.

- [171] Darja Ivannikov, *In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren*, Karlsruhe 2015.
- [172] L. C. Crowley, B. J. Marfell, A. P. Scott, N. J. Waterhouse, Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry, *Cold Spring Harbor protocols* 2016.
DOI: 10.1101/pdb.prot087288.
- [173] O. Y. F. Henry, R. Villenave, M. J. Cronce, W. D. Leineweber, M. A. Benz, D. E. Ingber, Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function, *Lab on a chip* 2017.
DOI: 10.1039/c7lc00155j.
- [174] M. W. van der Helm, M. Odijk, J.-P. Frimat, A. D. van der Meer, J. C. T. Eijkel, A. van den Berg, L. I. Segerink, Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips, *Biosensors & bioelectronics* 2016.
DOI: 10.1016/j.bios.2016.06.014.
- [175] A. G. Koutsiaris, S. V. Tachmitzi, N. Batis, M. G. Kotoula, C. H. Karabatsas, E. Tsironi, D. Z. Chatzoulis, Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo, *Biorheology* 2007.
- [176] R. M. Nerem, Shear force and its effect on cell structure and function, *ASGSB bulletin publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 1991.
- [177] G. Fotakis, J. A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology letters* 2006.
DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- [178] K. H. Jones, J. A. Senft, An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide, *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* 1985.
DOI: 10.1177/33.1.2578146.
- [179] Merck, *Anti-Brain lipid binding protein Antibody*,
https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Anti-Brain-lipid-binding-protein-Antibody,MM_NF-ABN14.
- [180] M. Furuhashi, G. S. Hotamisligil, Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets, *Nature reviews. Drug discovery* 2008.
DOI: 10.1038/nrd2589.
- [181] J. R. Gerstner, I. J. Perron, S. M. Riedy, T. Yoshikawa, H. Kadotani, Y. Owada, H. P. A. van Dongen, R. J. Galante, K. Dickinson, J. C. P. Yin, A. I. Pack, M. G. Frank, Normal sleep requires the astrocyte brain-type fatty acid binding protein FABP7, *Science advances* 2017.
DOI: 10.1126/sciadv.1602663.
- [182] S. Cherrng, J. Young, H. Ma, *J Am Sci* 2008.
- [183] I. Isobe, T. Watanabe, T. Yotsuyanagi, N. Hazemoto, K. Yamagata, T. Ueki, K. Nakanishi, K. Asai, T. Kato, Astrocytic contributions to blood-brain barrier (BBB) formation by endothelial cells: A possible use of aortic endothelial cell for In vitro BBB model, *Neurochemistry international* 1996.
DOI: 10.1016/0197-0186(95)00142-5.
- [184] Y.-C. Kuo, C.-H. Lu, Effect of human astrocytes on the characteristics of human brain-microvascular endothelial cells in the blood-brain barrier, *Colloids and surfaces. B,*

Literaturverzeichnis

- Biointerfaces* **2011**.
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.005.
- [185] Michael V. Sofroniew, Harry V. Vinters, Astrocytes: biology and pathology, *Acta Neuropathol* **2010**.
DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- [186] M. P. Dehouck, S. Méresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro, *Journal of neurochemistry* **1990**.
DOI: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01236.x.
- [187] L. L. Rubin, D. E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H. C. Horner, M. Janatpour, C. W. Liaw, K. Manning, J. Morales, A cell culture model of the blood-brain barrier, *The Journal of cell biology* **1991**.
DOI: 10.1083/jcb.115.6.1725.
- [188] R. J. Rist, I. A. Romero, M. W.K. Chan, P.-O. Couraud, F. Roux, N.J. Abbott, F-Actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors, *Brain research* **1997**.
DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00586-6.
- [189] K. Sobue, N. Yamamoto, K. Yoneda, M. E. Hodgson, K. Yamashiro, N. Tsuruoka, T. Tsuda, H. Katsuya, Y. Miura, K. Asai, T. Kato, Induction of blood–brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors, *Neuroscience Research* **1999**.
DOI: 10.1016/S0168-0102(99)00079-6.
- [190] B. El Hafny, O. Chappéy, M. Piciotti, M. Debray, B. Boval, F. Roux, Modulation of P-glycoprotein activity by glial factors and retinoic acid in an immortalized rat brain microvessel endothelial cell line, *Neuroscience Letters* **1997**.
DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00679-4.
- [191] A. K. Lynn, I. V. Yannas, W. Bonfield, Antigenicity and immunogenicity of collagen, *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2004**.
DOI: 10.1002/jbm.b.30096.
- [192] Van den Steen, Philippe E, B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2002**.
DOI: 10.1080/10409230290771546.
- [193] Y. Liu, M. B. Chan-Park, A biomimetic hydrogel based on methacrylated dextran-graft-lysine and gelatin for 3D smooth muscle cell culture, *Biomaterials* **2010**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.10.040.
- [194] V. Normand, S. Muller, J.-C. Ravey, A. Parker, Gelation Kinetics of Gelatin: A Master Curve and Network Modeling, *Macromolecules* **2000**.
DOI: 10.1021/ma9909455.
- [195] S. Haase, *Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck*, Karlsruhe **2020**.
- [196] T. Göckler, *Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering*, Karlsruhe **2020**.
- [197] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth, Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization

- rate and cytocompatibility, *Biomaterials* **2009**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.055.
- [198] U. P. Kappes, D. Luo, M. Potter, K. Schulmeister, T. M. Rünger, Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells, *The Journal of investigative dermatology* **2006**.
DOI: 10.1038/sj.jid.5700093.
- [199] C. Kielbassa, L. Roza, B. Epe, Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light, *Carcinogenesis* **1997**.
DOI: 10.1093/carcin/18.4.811.
- [200] Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicology and applied pharmacology* **2004**.
DOI: 10.1016/j.taap.2003.08.019.
- [201] X. Kempter, *Synthese und Charakterisierung photopolymerisierbarer Hydrogеле auf Gelatinebasis*, Karlsruhe **2018**.
- [202] J. Ma, Y. Wang, J. Liu, Bioprinting of 3D tissues/organs combined with microfluidics, *RSC Adv.* **2018**.
DOI: 10.1039/C8RA03022G.
- [203] Z. Münoz, H. Shih, C.-C. Lin, Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation, *Biomaterials science* **2014**.
DOI: 10.1039/C4BM00070F.
- [204] M. W. Tibbitt, A. M. Kloxin, L. Sawicki, K. S. Anseth, Mechanical Properties and Degradation of Chain and Step Polymerized Photodegradable Hydrogels, *Macromolecules* **2013**.
DOI: 10.1021/ma302522x.
- [205] S. van Vlierberghe, E. Schacht, P. Dubrule, Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties, *European Polymer Journal* **2011**.
DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.015.
- [206] M. Iwashita, H. Ohta, T. Fujisawa, M. Cho, M. Ikeya, S. Kidoaki, Y. Kosodo, Brain-stiffness-mimicking tilapia collagen gel promotes the induction of dorsal cortical neurons from human pluripotent stem cells, *Sci Rep* **2019**.
DOI: 10.1038/s41598-018-38395-5.
- [207] S. Budday, G. Sommer, J. Haybaeck, P. Steinmann, G. A. Holzapfel, E. Kuhl, Rheological characterization of human brain tissue, *Acta Biomaterialia* **2017**.
DOI: 10.1016/j.actbio.2017.06.024.
- [208] S. R. Moxon, N. J. Corbett, K. Fisher, G. Potjewyd, M. Domingos, N. M. Hooper, Blended alginate/collagen hydrogels promote neurogenesis and neuronal maturation, *Materials Science and Engineering: C* **2019**.
DOI: 10.1016/j.msec.2019.109904.
- [209] M. C. LaPlaca, V. N. Vernekar, J. T. Shoemaker, K. D. Cullen, *Methods in Bioengineering* **2010**.
- [210] A. Martínez-González, G. F. Calvo, L. A. Pérez Romasanta, V. M. Pérez-García, Hypoxic cell waves around necrotic cores in glioblastoma: a biomathematical model and its therapeutic implications, *Bulletin of mathematical biology* **2012**.
DOI: 10.1007/s11538-012-9786-1.

Literaturverzeichnis

- [211] J. H. Sung, C. Kam, M. L. Shuler, A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip, *Lab Chip* **2010**.
DOI: 10.1039/B917763A.
- [212] S. Musafargani, S. Mishra, M. Gulyás, P. Mahalakshmi, G. Archunan, P. Padmanabhan, B. Gulyás, Blood brain barrier: A tissue engineered microfluidic chip, *Journal of neuroscience methods* **2020**.
DOI: 10.1016/j.jneumeth.2019.108525.
- [213] P. R. Girard, R. M. Nerem, Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins, *Journal of cellular physiology* **1995**.
DOI: 10.1002/jcp.1041630121.
- [214] H. Inoguchi, T. Tanaka, Y. Maehara, T. Matsuda, The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft, *Biomaterials* **2007**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.020.
- [215] Mao Ye, Henry M. Sanchez, Margot Hultz, Zhen Yang, Max Bogorad, Andrew D. Wong, Peter C. Searson, Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress, *Sci Rep* **2014**.
DOI: 10.1038/srep04681.
- [216] A. Reinitz, J. DeStefano, M. Ye, A. D. Wong, P. C. Searson, Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress, *Microvascular research* **2015**.
DOI: 10.1016/j.mvr.2015.02.008.
- [217] S. Ohtsuki, C. Ikeda, Y. Uchida, Y. Sakamoto, F. Miller, F. Glacial, X. Decleves, J.-M. Scherrmann, P.-O. Couraud, Y. Kubo, M. Tachikawa, T. Terasaki, Quantitative Targeted Absolute Proteomic Analysis of Transporters, Receptors and Junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood–Brain Barrier Model, *Mol. Pharmaceutics* **2013**.
DOI: 10.1021/mp3004308.
- [218] S. Agarwal, Y. Uchida, R. K. Mittapalli, R. Sane, T. Terasaki, W. F. Elmquist, Quantitative Proteomics of Transporter Expression in Brain Capillary Endothelial Cells Isolated from P-Glycoprotein (P-gp), Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp), and P-gp/Bcrp Knockout Mice, *Drug Metab Dispos* **2012**.
DOI: 10.1124/dmd.112.044719.
- [219] G. D. Nicodemus, S. J. Bryant, Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Tissue Engineering. Part B, Reviews* **2008**.
DOI: 10.1089/ten.teb.2007.0332.
- [220] S. M. O'Connor, D. A. Stenger, K. M. Shaffer, D. Maric, J. L. Barker, W. Ma, Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca²⁺ response in three-dimensional collagen gel, *Journal of neuroscience methods* **2000**.
DOI: 10.1016/S0165-0270(00)00303-4.
- [221] C.-H. Chuang, R.-Z. Lin, J. M. Melero-Martin, Y.-C. Chen, Comparison of covalently and physically cross-linked collagen hydrogels on mediating vascular network formation for engineering adipose tissue, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **2018**.
DOI: 10.1080/21691401.2018.1499660.
- [222] N. Annabi, Š. Selimović, J. P. Acevedo Cox, J. Ribas, M. Afshar Bakooshli, D. Heintze, A. S. Weiss, D. Cropek, A. Khademhosseini, Hydrogel-coated microfluidic channels for

- cardiomyocyte culture, *Lab on a chip* **2013**.
DOI: 10.1039/c3lc50252j.
- [223] Y.-C. Chen, R.-Z. Lin, H. Qi, Y. Yang, H. Bae, J. M. Melero-Martin, A. Khademhosseini, Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels, *Advanced functional materials* **2012**.
DOI: 10.1002/adfm.201101662.
- [224] M. Nikkhah, N. Eshak, P. Zorlutuna, N. Annabi, M. Castello, K. Kim, A. Dolatshahi-Pirouz, F. Edalat, H. Bae, Y. Yang, A. Khademhosseini, Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels, *Biomaterials* **2012**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.068.
- [225] C. A. Jones, E. Huberman, M. L. Cunningham, M. J. Peak, Mutagenesis and Cytotoxicity in Human Epithelial Cells by Far- and Near-Ultraviolet Radiations: Action Spectra, *Radiation Research* **1987**.
DOI: 10.2307/3576902.
- [226] N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, W. J. A. Dhert, The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels, *Biomaterials* **2009**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.037.
- [227] C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, J. H. Elisseeff, Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation, *Biomaterials* **2005**.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.024.
- [228] S. Tornaletti, G. P. Pfeifer, UV damage and repair mechanisms in mammalian cells, *BioEssays news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **1996**.
DOI: 10.1002/bies.950180309.
- [229] F. A. C. Azevedo, L. R. B. Carvalho, L. T. Grinberg, J. M. Farfel, R. E. L. Ferretti, R. E. P. Leite, W. Jacob Filho, R. Lent, S. Herculano-Houzel, Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain, *The Journal of comparative neurology* **2009**.
DOI: 10.1002/cne.21974.
- [230] J. S. Allen, H. Damasio, T. J. Grabowski, Normal neuroanatomical variation in the human brain: an MRI-volumetric study, *American journal of physical anthropology* **2002**.
DOI: 10.1002/ajpa.10092.
- [231] N. Seyedhassantehrani, Y. Li, L. Yao, Dynamic behaviors of astrocytes in chemically modified fibrin and collagen hydrogels, *Integrative biology quantitative biosciences from nano to macro* **2016**.
DOI: 10.1039/c6ib00003g.
- [232] S. Yamanaka, H. M. Blau, Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches, *Nature* **2010**.
DOI: 10.1038/nature09229.
- [233] H.-G. Yi, H. Lee, D.-W. Cho, 3D Printing of Organs-On-Chips, *Bioengineering (Basel, Switzerland)* **2017**.
DOI: 10.3390/bioengineering4010010.
- [234] Y. Liu, R. Yang, Z. He, W.-Q. Gao, Generation of functional organs from stem cells, *Cell regeneration (London, England)* **2013**.
DOI: 10.1186/2045-9769-2-1.

Literaturverzeichnis

- [235] T. Miyamoto, H. Nakauchi, Generation of functional organs from pluripotent stem cells,
[Rinsho ketsueki] The Japanese journal of clinical hematology **2015**.
DOI: 10.11406/rinketsu.56.2213.

10. Anhang

Zu Kapitel 4.1.1.3 Einfluss der Beschichtung auf den parazellulären Transport

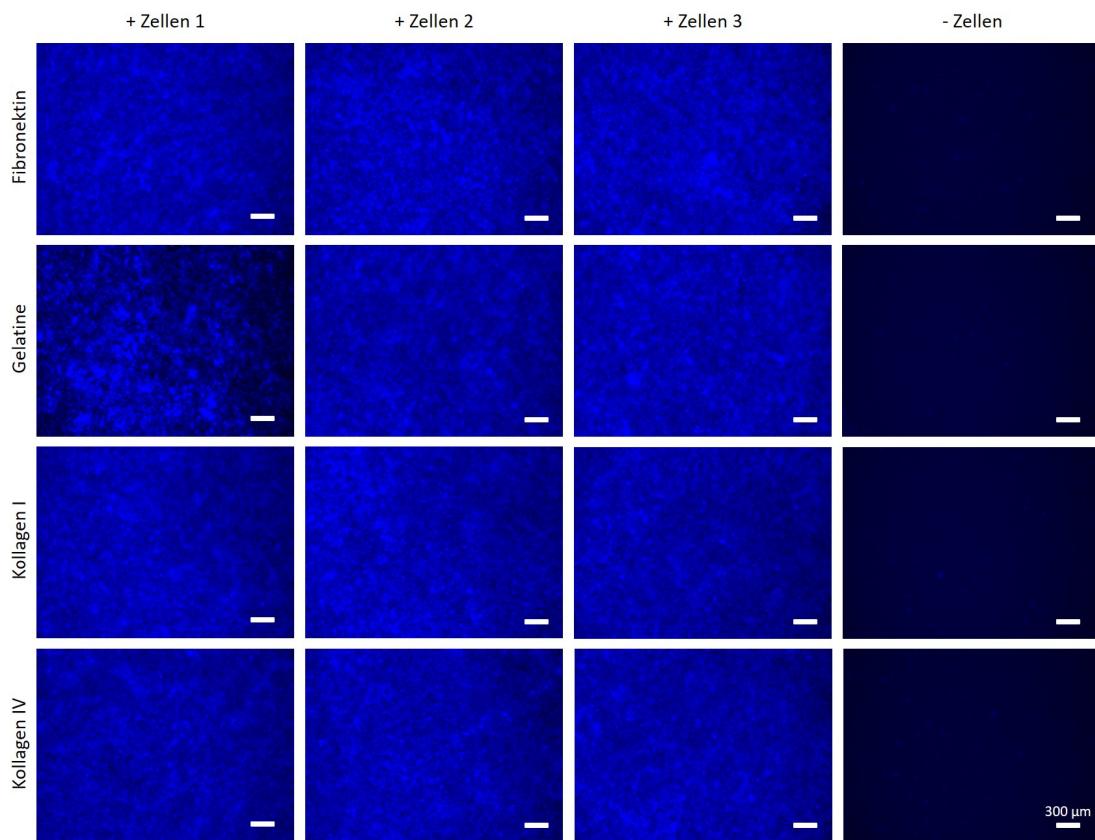


Abbildung 101 Dichtigkeitsüberprüfung der für den Permeabilitätsassay eingesetzten Zelllayer durch Hoechst33342-Färbung. Maßstab: 300 μm . (zu Abbildung 23)

Anhang

Zu Kapitel 4.1.3 Zellzahl zur Kultivierung im vasQchip

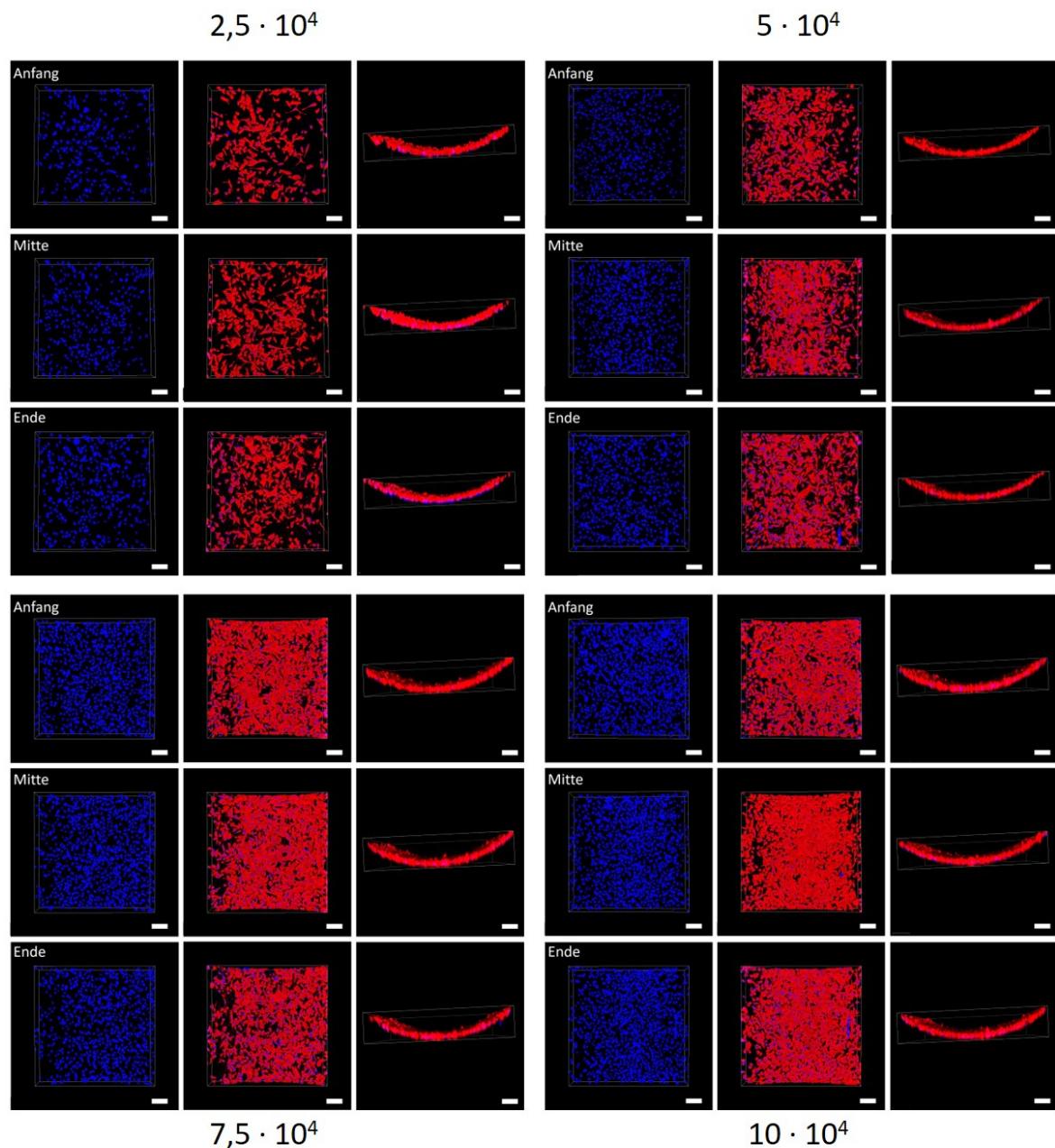


Abbildung 102 Verschiedene Zellzahlen im vasQchip. Aufnahme an je drei verschiedenen Stellen des Mikrokanals. Die Visualisierung erfolgte durch Z-Stack-Messung mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie ($n=46-50$, Abstand=3 μm , $h=138-150 \mu\text{m}$). Rot: CellTracker™ Red-Färbung des Zytosols (10 μM), Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Maßstab: 100 μm . (zu Abbildung 27)

Zu Kapitel 4.1.4.1 Mikrofluidische Langzeitkultivierung im vasQchip (Spritzenpumpe)

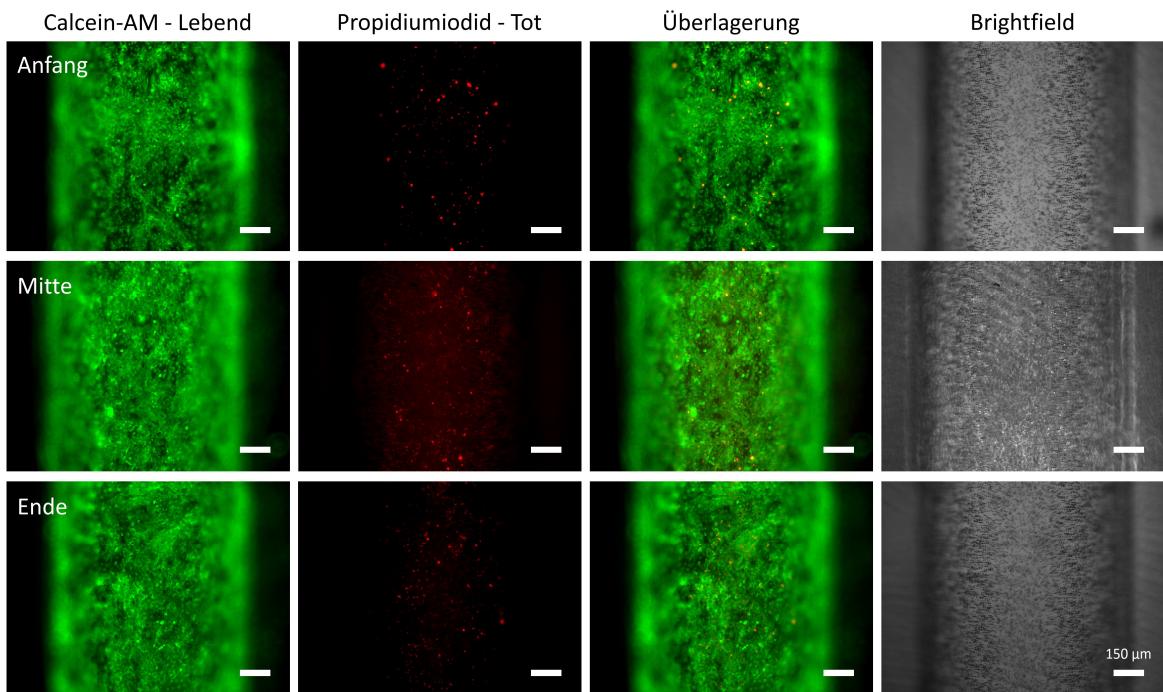


Abbildung 103 Lebend/Tot-Färbung im vasQchip nach 14 Tagen Kultivierung bei 100 µl/h. Aufnahme an drei verschiedenen Stellen im Mikrokanal. Grün: Calcein-AM, rot: PI. Maßstab: 150 µm. (zu Abbildung 31)

Zu Kapitel 4.1.4.2 Permeabilitätsassay im vasQchip

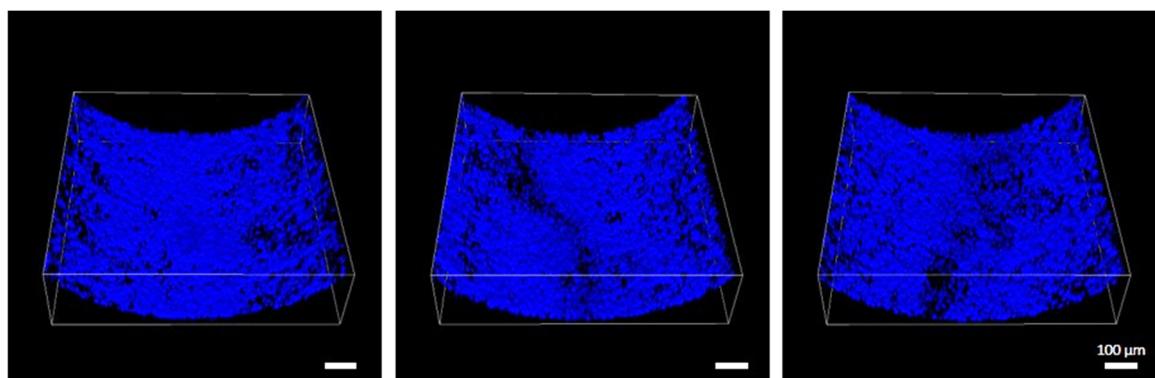


Abbildung 104 Dichtigkeitsüberprüfung der für den Permeabilitätsassay eingesetzten Zelllayer durch Hoechst33342-Färbung. Maßstab: 100 µm.

Zu Kapitel 4.1.4.3 Anpassung der Flussrate zur Erzeugung physiologischer Scherkräfte

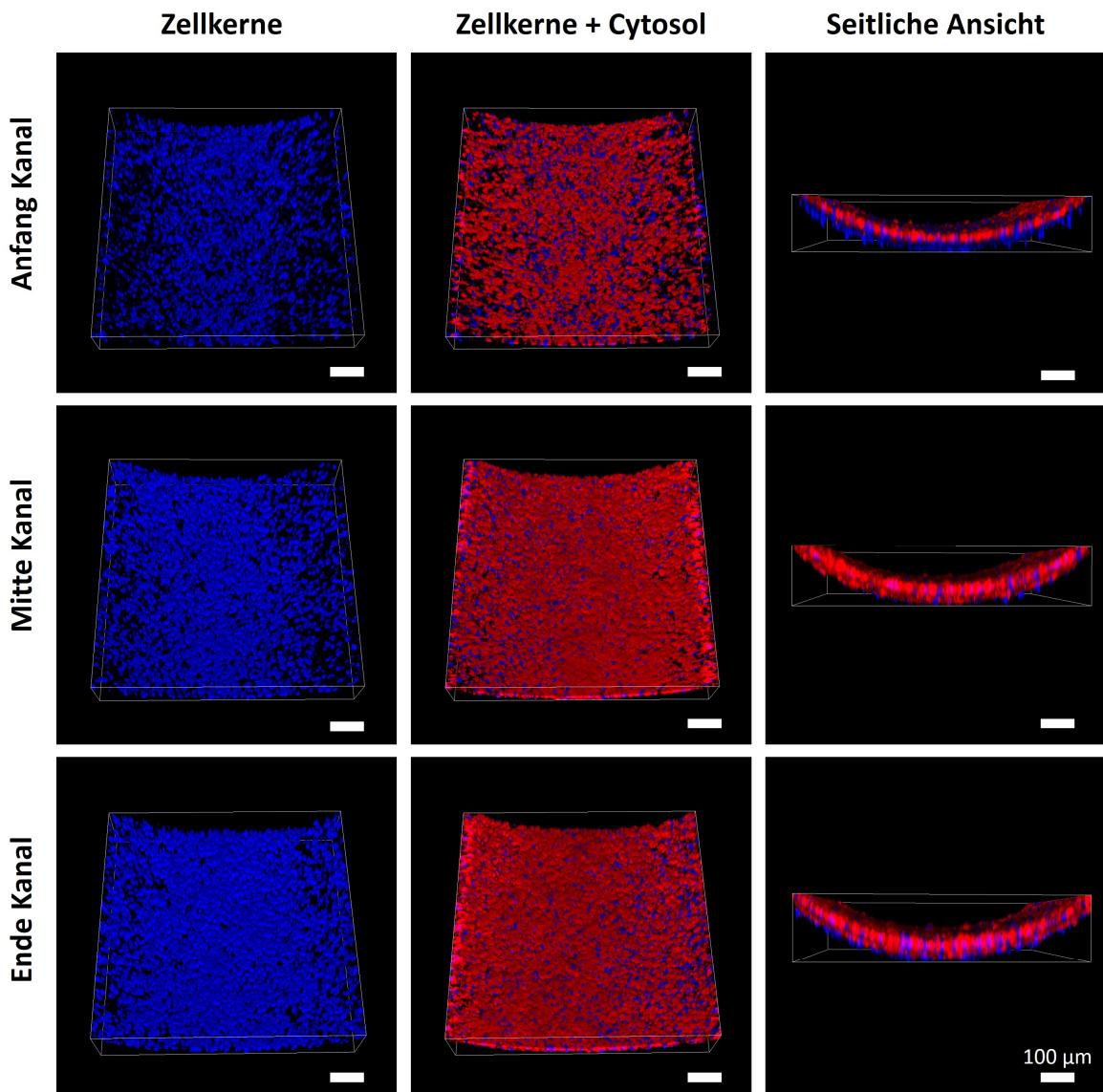


Abbildung 105 Langzeitkultivierung über sieben Tage im vasQchip mit einer Flussrate von 500 µl/min im KM. Rot: CellTracker™ Red-Färbung des Zytosols (10 µM), Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne (2 µg/ml). Maßstab: 100 µm.
(zu Abbildung 38)

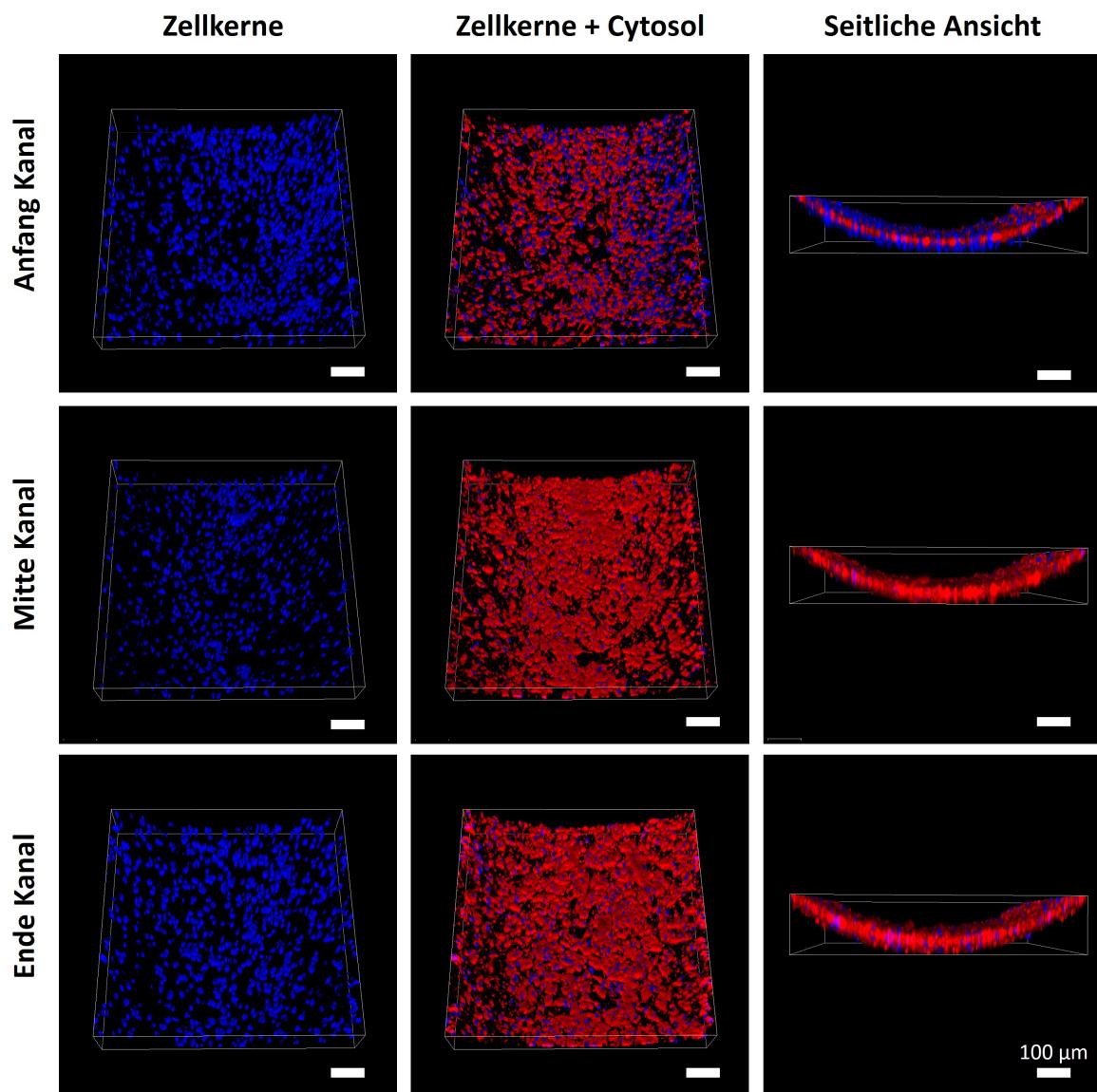


Abbildung 106 Langzeitkultivierung über sieben Tage im vasQchip mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ im DM. Rot: CellTracker™ Red-Färbung des Zytosols (10 μM), Blau: Hoechst33342-Färbung der Zellkerne (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Maßstab: 100 μm . (zu Abbildung 38)

Anhang

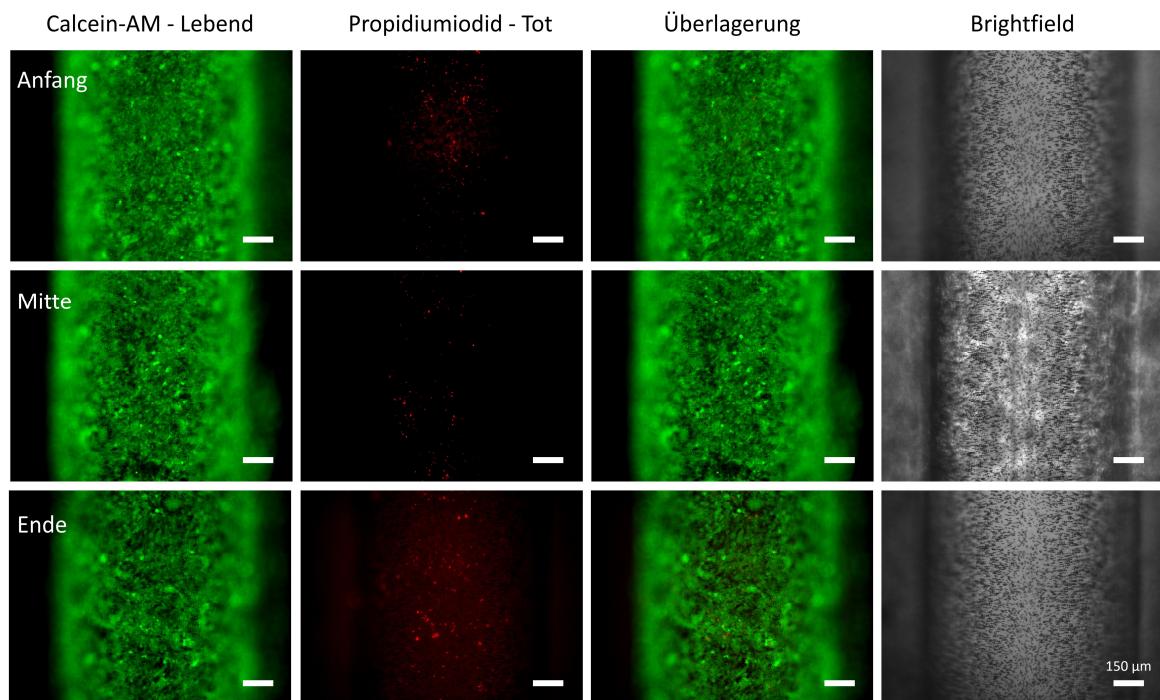


Abbildung 107 Lebend/Tot-Färbung im vasQchip nach 14 Tagen Kultivierung bei 500 µl/min. Aufnahme an drei verschiedenen Stellen im Mikrokanal. Grün: Calcein-AM, rot: PI. Maßstab: 150 µm. (zu Abbildung 39)

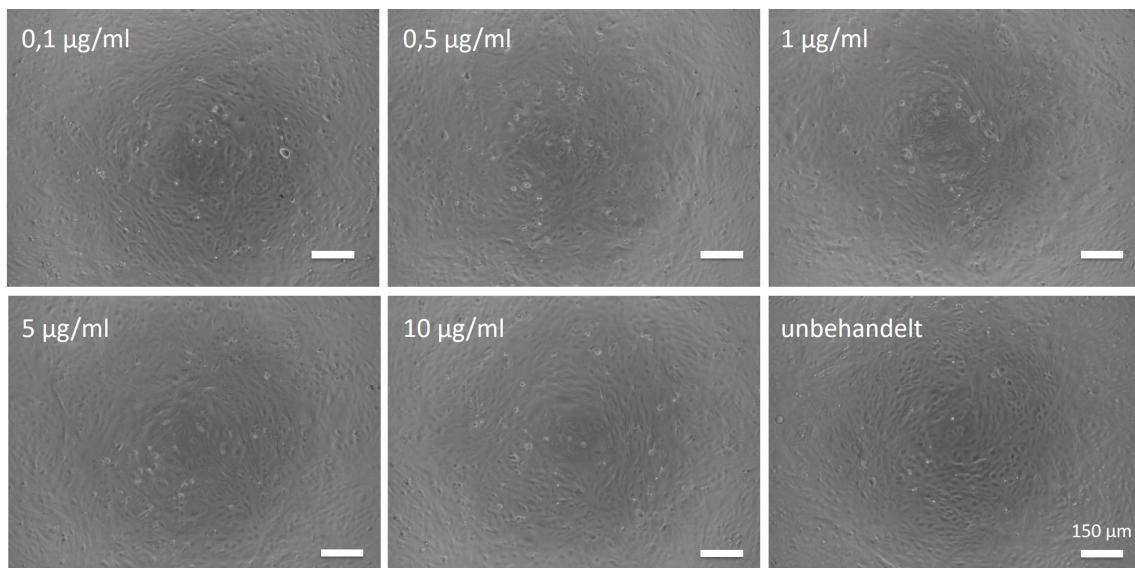


Abbildung 108 Visuelle Überwachung der Calcein-AM-behandelten hCMEC/D3 hCMEC/D3 wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Calcein-AM für 30 min behandelt, anschließend gewaschen und für weitere 72 h inkubiert, dann lichtmikroskopisch untersucht. Maßstab: 150 µm

Zu Kapitel 4.2.1.2 Morphologie und Nachweis zellspezifischer Marker

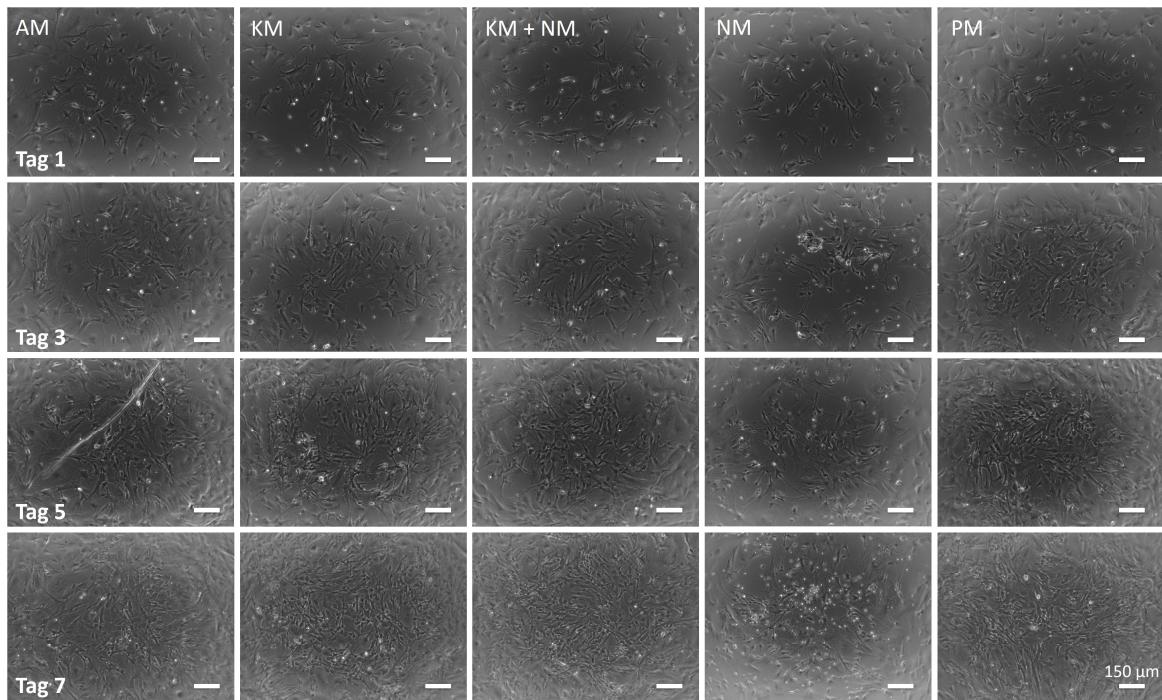


Abbildung 109 Lichtmikroskopischer, morphologischer Vergleich verschiedener Medien zur Ko-Kultivierung von HA (zu Abbildung 51)

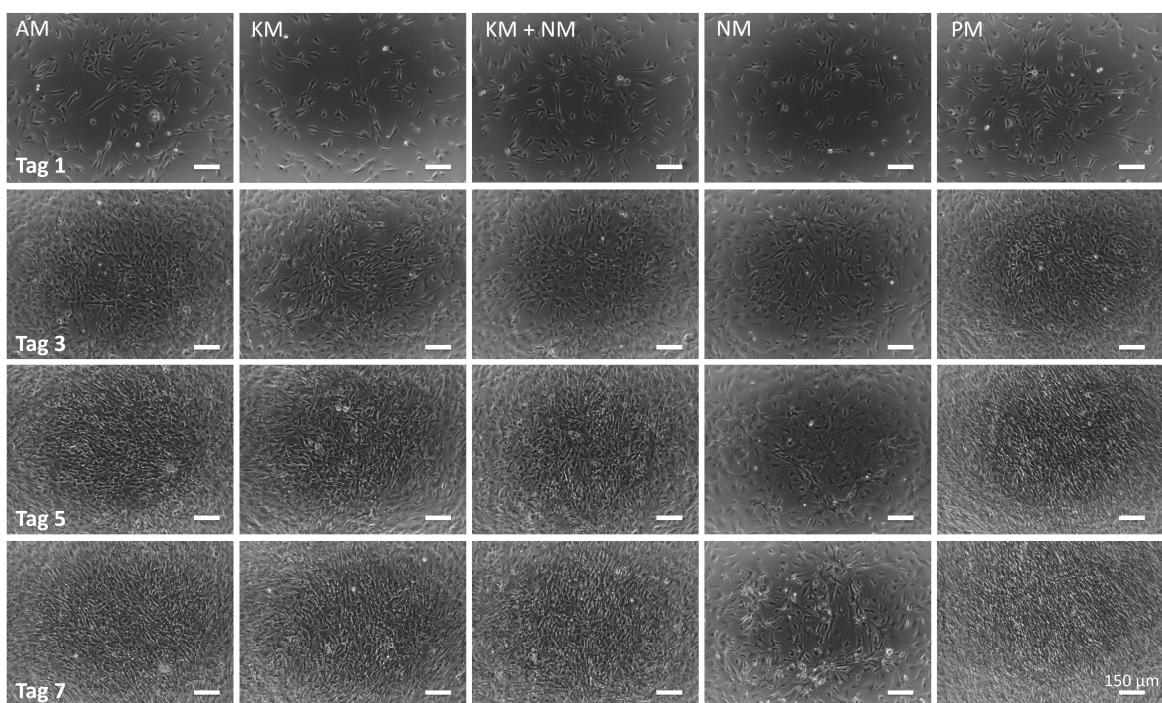


Abbildung 110 Lichtmikroskopischer, morphologischer Vergleich verschiedener Medien zur Ko-Kultivierung von HBVP (zu Abbildung 51)

Anhang

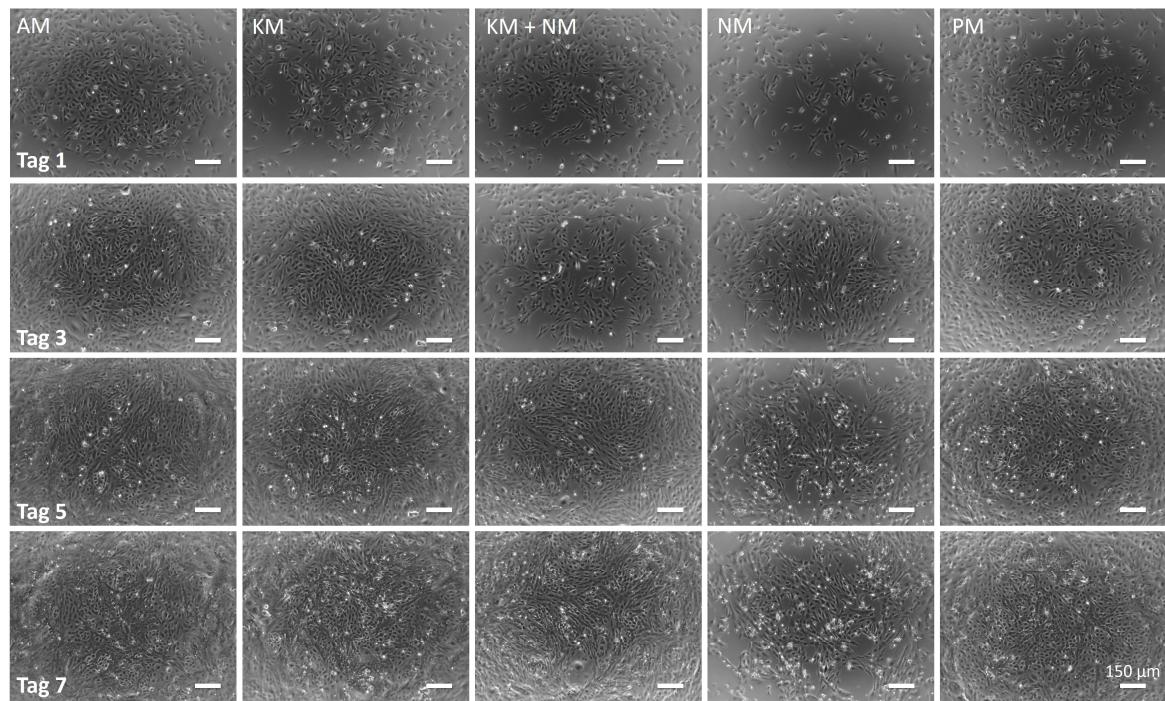


Abbildung 111 Lichtmikroskopischer, morphologischer Vergleich verschiedener Medien zur Ko-Kultivierung von hCMEC/D3 (zu Abbildung 51)

11. Danksagung

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich auf meinem Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben und auf unterschiedliche Weise dazu beigetragen haben, dass ich heute an diesem Punkt angelangt bin.

Zunächst möchte ich mich bei PROF. DR. UTE SCHEPERS für die Aufnahme in ihren Arbeitskreis und die Möglichkeit an so einem spannenden und innovativen Thema zu arbeiten bedanken. Danke für deine Betreuung, deine fachliche Unterstützung und dein stetes Engagement. Ich danke Dir auch für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen Konferenzen und Kursen.

PD DR. BEATE KÖBERLE danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen derzeitigen und früheren KOLLEGEN des AK SCHEPERS für die nette Arbeitsatmosphäre und den tollen Teamzusammenhalt bedanken. Ihr habt alle sehr dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne zur Arbeit gekommen bin.

DR. VANESSA KAPPINGS und DR. EVA ZITTEL möchte ich für Einführung in das Themengebiet der *Organs-on-Chips* und die Einarbeitung im Labor sowie die stete fachliche Unterstützung bedanken. Ebenfalls danke ich CHRISTOPH GRÜN für die zahlreichen Diskussionen auf diesem Gebiet und die Hilfe bei fachlichen Fragen. MICHAEL GRÜN und LUDWIG POLLICH danke ich für die Unterstützung bei technischen Fragen und Problemstellungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an TOBIAS GÖCKLER und SONJA HAASE. Seit dem Beginn des Studiums vor acht Jahren gehen wir gemeinsam durch die Höhen und Tiefen des Studien- und Promotionsalltags. TOBI, dir danke ich neben den fachlichen Diskussionen vor allem für die vielen lustigen gemeinsamen Momente während der letzten acht Jahre auf Bahnfahrten, Konzerten, im Labor und in der Freizeit. SONJA, danke dir dafür, dass du mich seit der allerersten Minute des Studiums als Praktikumspartnerin, Mitstreiterin, Arbeitskollegin, vor allem aber als Freundin begleitest. Wir haben so viel gemeinsam durchgestanden, erlebt, uns über die gleichen Dinge geärgert und viel zusammen gelacht. Danke, dass du jederzeit für mich da bist.

Ihr beide habt die letzten acht Jahre für mich unvergesslich gemacht. Ich danke euch für diese wundervolle Zeit und eure Freundschaft.

DOMINIK FESER, XENIA KEMPTER, und ANNA MESCHKOV danke ich für die unzähligen schönen Momente im und außerhalb des Labors. DOMINIK, dir danke ich für die vielen lustigen, tiefgründigen, ernsthaften und blödsinnigen Gesprächen zu allen erdenklichen sinnvollen und unsinnigen Themen. Danke auch für deine Anwesenheit und Unterstützung bei deutlich zu späten Abenden im Labor. XENIA, danke dir für Lachanfälle, gemeinsame Tollpatschigkeiten und deine wundervolle Unterstützung zu jeder Zeit. ANNA, dir danke ich für unsere Freitagabende, unsere Spaziergänge, die kleinen Ausflüge zur Cafeteria und dein jederzeit offenes Ohr für mich. Euch allen danke ich von Herzen für die unvergesslichen und schönen Zeiten. Danke, dass ihr so viel mehr als nur Arbeitskollegen seid und ich mich jederzeit auf euch verlassen kann.

Danksagung

Bei allem IBCS und IFG Mitarbeitern möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfe bei organisatorischen, technischen oder fachlichen Fragen bedanken.

Der BIOINTERFACES-INTERNATIONAL GRADUATE SCHOOL (BIF-IGS) und dem KARLSRUHER HAUS OF YOUNG SCIENTISTS (KHY'S) bedanke ich mich für die vielen promotionsbegleitenden Weiterbildungsmöglichkeiten. Darüber hinaus danke ich BIF-IGS für die Ermöglichung des vielfältigen Austauschs mit Doktoranden aus anderen Fachrichtungen.

DR. ERIC GOTTWALD und DR. VERONICE ORION-ROUSSEAU danke ich für die fachliche Unterstützung und Ratschläge als Mitglieder meines TAC-Komitees.

Für die finanzielle Förderung meiner Promotion danke ich der JÜRGEN MANCHOT STIFTUNG.

Mein ganz besonders großer Dank gilt meiner FAMILIE, die mich immer unterstützt und hinter mir steht. Danke, dass ihr mich aufbaut und auch dann an mich glaubt, wenn ich es gerade nicht tue. Ohne euren liebevollen Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen.

FABIAN, dir danke ich dafür, dass du ohne Wenn und Aber immer für mich da bist, und alle größeren und kleineren Katastrophen mit mir durchstehst.