

***In vitro* Rekonstruktion der neurovaskulären Einheiten des
Gehirns und der Retina auf einem Organ-on-a-chip System
zur Modellierung degenerativer Erkrankungen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Nicole Pleschka

aus

Bad Friedrichshall

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referentin: PD Dr. Beate Köberle

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2022

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von Juni 2019 bis Juni 2022 am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie angefertigt.

Frau PD Dr. Beate Köberle möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Meinem Partner

*Hindernisse und Schwierigkeiten sind Stufen,
auf denen wir in die Höhe steigen.*

(Friedrich Nietzsche)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 <i>Tissue Engineering</i>	4
1.1.1 Modellsysteme im <i>Tissue Engineering</i>	4
1.1.2 EZM und Hydrogele	6
1.1.3 <i>Organ-on-a-chip</i> Systeme	8
1.2 Barrieren im menschlichen Körper	11
1.2.1 BBB und iBRB im ZNS	12
1.2.2 Das menschliche Gehirn und die neurovaskuläre Einheit	14
1.2.2.1 Perizyten.....	16
1.2.2.2 Astrozyten.....	16
1.2.2.3 Mikroglia.....	17
1.2.2.4 Neuronen	17
1.2.3 Das menschliche Auge und die retinale neurovaskuläre Einheit	20
1.3 Degenerative Erkrankungen	22
1.3.1 Parkinson und Neuroinflammation.....	22
1.3.2 Diabetische Retinopathie.....	24
1.4 <i>In vitro</i> Rekonstruktion der rNVU und NVU	25
2 Zielsetzung	27
3 Ergebnisse und Diskussion	29
3.1 Retinale neurovaskuläre Einheit.....	29
3.1.1 Etablierung eines iBRB-Endothels im vasQchip	29
3.1.1.1 Untersuchung einer geeigneten Beschichtung	30
3.1.1.2 Porengröße und Zellzahl im vasQchip.....	35
3.1.1.3 Integration eines Flusses und Scherkräfte.....	37
3.1.2 Etablierung der iBRB inklusive Perizyten und Astrozyten.....	41
3.1.2.1 Wachstumskurve	42
3.1.2.2 Etablierung der iBRB inklusive Astrozyten und Perizyten im Transwell....	43
3.1.2.3 Etablierung der iBRB inklusive Perizyten und Astrozyten im vasQchip.....	47
3.1.3 Hydrogele als EZM-imitierende Stützmatrix.....	56

3.1.3.1	Kollagen I-Hydrogel	56
3.1.3.2	GelMA-Hydrogel	59
3.1.3.3	Kapitelzusammenfassung Hydrogele als EZM-imitierende Stützmatrix....	65
3.1.4	Modellierung der diabetischen Retinopathie	65
3.1.4.1	Toxizität von D-(+)-Glucose.....	66
3.1.4.2	Hyperglykämie im Transwell	67
3.1.4.3	Hyperglykämie im vasQchip und Behandlung mit COMP-Ang1	73
3.2	Neurovaskuläre Einheit im Gehirn	75
3.2.1	Neuronen	76
3.2.1.1	Nachweis der Pluripotenz von iPSC	77
3.2.1.2	<i>EZ spheres</i>	80
3.2.1.3	Nachweis der NSC-Marker.....	83
3.2.1.4	Differenzierung von Neuronen.....	86
3.2.1.5	Nachweis neuronaler Marker.....	87
3.2.1.6	Einfluss der Beschichtung auf die Expression neuronaler Marker.....	92
3.2.2	Etablierung der NVU im Transwell	97
3.2.2.1	Untersuchung eines geeigneten Nährmediums	98
3.2.2.2	Kokultur aus Astrozyten und Neuronen im 24-Well	107
3.2.2.3	Kokultur aus hCMEC/D3 und Neuronen im Transwell-System	108
3.2.2.4	Kokultur der NVU-Zelltypen im Transwell.....	109
3.2.2.5	<i>Contact co-culture system</i> und <i>Non-contact co-culture system</i>	113
3.2.2.6	Kapitelzusammenfassung Etablierung der NVU im Transwell	115
3.2.3	Etablierung der NVU im vasQchip	115
3.2.3.1	Kokultur von Astrozyten und Neuronen im vasQchip	116
3.2.3.2	Kokultur der NVU im vasQchip und Immunfluoreszenzfärbung.....	118
3.2.3.3	Viabilität und Proliferation der Zellen.....	121
3.2.3.4	Expression spezifischer Barriere-Marker.....	124
3.2.3.5	Funktionalitätstest BCRP Transporter Assay.....	125
3.2.3.6	Kapitelzusammenfassung Etablierung der NVU im vasQchip	128
3.2.4	Aktivität der Neuronen.....	128
3.2.4.1	<i>Calcium Imaging</i> im μ -Slide 8 Well	129

3.2.4.2	<i>Calcium Imaging</i> im vasQchip.....	133
3.2.4.3	Kapitelzusammenfassung Aktivität der Neuronen.....	135
3.2.5	Hydrogel als EZM-imitierende Stützmatrix.....	136
3.2.5.1	Kollagen I-Hydrogel.....	136
3.2.5.2	Zweikomponentenhydrogel GelNB/GelS.....	139
3.2.5.3	Kapitelzusammenfassung Hydrogel als EZM-imitierende Stützmatrix	146
3.2.6	NVU-Modell inklusive Neuronen im Kollagen I-Hydrogel	147
3.2.6.1	Kapitelzusammenfassung NVU-Modell inklusive Neuronen im Kollagen I-Hydrogel.....	151
3.2.7	<i>3D-Bioprinting</i> der Neuronen.....	151
3.2.7.1	<i>3D-Bioprinting</i> der Neuronen auf einen Objektträger	152
3.2.7.2	<i>3D-Bioprinting</i> von Neuronen auf dem vasQchip.....	155
3.2.7.3	Kapitelzusammenfassung <i>3D-Bioprinting</i> der Neuronen	157
3.2.8	Modellierung der Neuroinflammation in Parkinson.....	158
3.2.8.1	Toxizität der pro-inflammatorischen Zytokine	159
3.2.8.2	Nachweis zelltypischer Marker unter Einfluss der Zytokine	160
3.2.8.3	Aktivierung der Mikroglia	162
3.2.8.4	Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die Barriere der BBB....	165
3.2.8.5	Kapitelzusammenfassung Modellierung der Neuroinflammation in Parkinson	168
3.2.9	Wirkstofftestung im vasQchip zur Behandlung von Parkinson	169
3.2.9.1	Testung von Wirkstoffen zur Therapie von Parkinson im vasQchip	169
3.2.9.2	Transport von Dopamin beladenem Nanogel im vasQchip	174
3.3	Abschlussdiskussion	182
4	Material und Methoden	183
4.1	Material.....	183
4.1.1	Zellen.....	183
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	183
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	188
4.1.4	Zellkulturmedien.....	191
4.1.4.1	Medien der immortalisierten und primären Zellen.....	191
4.1.4.2	Stammzell- und Differenzierungsmedien.....	192

4.1.5	Enzyme	194
4.1.6	Puffer	194
4.1.7	Antikörper.....	194
4.1.7.1	Primärantikörper.....	194
4.1.7.2	Sekundärantikörper	195
4.1.7.3	Antikörper für die Durchflusszytometrie	195
4.1.8	Primer	196
4.1.9	Geräte.....	196
4.1.9.1	Mikroskope	196
4.1.9.2	Allgemeine Geräte.....	197
4.1.10	Software	199
4.2	Methoden.....	199
4.2.1	Allgemeine Zellkultur	199
4.2.1.1	Beschichtung der Kultivierungsmaterialien	199
4.2.1.2	Kultivierung der Zellen.....	201
4.2.1.3	Differenzierung von Neuronen.....	202
4.2.1.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen	203
4.2.2	Transwell-System.....	203
4.2.2.1	Etablierung des iBRB/rNVU-Modells im Transwell	203
4.2.2.2	Etablierung des BBB/NVU-Modells im Transwell	203
4.2.2.3	TEER-Messung	204
4.2.3	<i>Organ-on-a-chip</i> System vasQchip.....	204
4.2.3.1	Herstellung.....	204
4.2.3.2	Handhabung	205
4.2.3.3	Anschluss an die Mikrofluidik.....	206
4.2.3.4	Etablierung der iBRB/rNVU im vasQchip.....	208
4.2.3.5	Etablierung der BBB/NVU im vasQchip.....	208
4.2.4	Hydrogele	209
4.2.4.1	Chemische Synthesen der Gelatine-basierten Hydrogele	209
4.2.4.2	Herstellung und Vernetzung der Hydrogele.....	210
4.2.5	<i>3D-Bioprinting</i>	212

4.2.6	Visualisierung von Zellen und zellulären Strukturen	213
4.2.6.1	Fixierung der Zellen	213
4.2.6.2	Permeabilisierung der Zellen.....	213
4.2.6.3	Färbung der Zellkerne.....	213
4.2.6.4	Färbung des Aktinzytoskelett	213
4.2.6.5	Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen.....	213
4.2.6.6	Verwendete Volumina	216
4.2.6.7	Durchflusszytometrie.....	216
4.2.6.8	REM.....	218
4.2.7	Molekularbiologische Methoden.....	219
4.2.7.1	RNA-Isolation.....	219
4.2.7.2	DNA-Verdau	219
4.2.7.3	Reverse Transkription	220
4.2.7.4	Kontroll-PCR	220
4.2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	221
4.2.7.6	RT-qPCR.....	221
4.2.8	Wachstums- und Viabilitätsanalysen	222
4.2.8.1	Wachstumskurve	222
4.2.8.2	PrestoBlue Assay.....	222
4.2.8.3	XTT Assay	223
4.2.8.4	MTT Assay	223
4.2.8.5	Lebend-/Tot-Färbung	224
4.2.9	Funktionalitätstests	224
4.2.9.1	P-gp Transporter Assay	224
4.2.9.2	BCRP Transporter Assay	225
4.2.9.3	Permeabilitätstest im Transwell-System	225
4.2.9.4	<i>Calcium Imaging</i> in Neuronen.....	226
4.2.10	Wirkstofftestung im vasQchip	226
4.2.10.1	Levodopa und Carbidopa.....	226
4.2.10.2	Nanogel	227
4.2.11	Statistische Auswertung.....	227

5	Abkürzungsverzeichnis	229
6	Literaturverzeichnis	237
7	Anhang	269

Zusammenfassung

Die Zahl degenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder diabetische Retinopathie steigt weltweit. Trotz der drastischen Zunahme sind diese Erkrankungen bis heute nicht heilbar. Infolgedessen ist die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden und potentieller Wirkstoffe zur Therapie der Erkrankungen von enormer Bedeutung. Dabei gestaltet sich die Validierung der Wirksamkeit dieser Wirkstoffe sowie eine direkte Erforschung im Patienten schwierig. Folglich werden Tierversuche herangezogen, die jedoch aufgrund speziesspezifischer Unterschiede häufig nicht auf den Menschen übertragbar und ethisch schwer vertretbar sind. Infolgedessen beschäftigt sich das *Tissue Engineering* mit der Entwicklung von *in vitro* Modellsystemen, welche menschliches Gewebe oder Organe so exakt wie möglich abbilden sollen. Besonders im Fokus stehen dabei *Organ-on-a-chip* Systeme. Dies sind mikrofluidische funktionelle Modellsysteme, die zur Nachbildung von miniaturisierten Organsystemen und Krankheitsbildern eingesetzt werden können. Solche Modelle auf Basis humaner Zellen können zukünftig zur spezifischeren Wirkstofftestung sowie zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten beitragen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Rekonstruktion der retinalen neurovaskulären Einheit (rNVU) im Auge sowie der neurovaskulären Einheit (NVU) im Gehirn im *Organ-on-a-chip* System vasQchip. Der vasQchip besteht aus einem porösen halbrunden Mikrokanal, welcher zur Nachbildung eines Blutgefäßes mit Endothelzellen ausgekleidet und zur Erzeugung eines artifiziellen Blutflusses an eine Mikrofluidik angeschlossen werden kann. Das umliegende Kompartiment ermöglicht die Rekonstruktion von vaskularisierten 3D-Gewebe. Um die physiologischen Besonderheiten der beiden vaskulären Einheiten zu berücksichtigen, war die Etablierung einer dichten Barriere der Blut-Hirn-Schranke (BBB) in der NVU sowie der inneren Blut-Retina-Schranke (iBRB) in der rNVU maßgeblich. Die iBRB und BBB gewährleisten einen geregelten Stoffaustausch zwischen Retina beziehungsweise Gehirn und dem Blutsystem. Der dichte Barrierecharakter wird unter anderem durch *Tight Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen und durch spezifische Transporter wie den Efflux-Pumpen sichergestellt.

Zur Etablierung eines dichten iBRB-Endothels im vasQchip wurden geeignete Kultivierungsbedingungen im Mikrokanal untersucht und optimiert. Durch das Anlegen eines Flusses und den daraus resultierenden Scherkräfte konnte ein dichtes iBRB-Endothel im Mikrokanal des vasQchips erzielt werden. Auch weitere Zelltypen der rNVU wie Perizyten und Astrozyten tragen zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der iBRB bei. So konnte nach Validierung einer Kokultur der drei Zelltypen im vasQchip eine erhöhte Expression spezifischer Barriere-Marker sowie die Funktionalität einer der wichtigsten *Gatekeeper* der Barrierefunktion, die Efflux-Pumpe P-gp, festgestellt werden. Auch erste Ansätze zur dreidimensionalen Kultivierung von Astrozyten in Gerüststrukturen wie natürlichen Hydrogelen auf Kollagenbasis und

semi-synthetischen Hydrogelen (GelMA), welche die extrazelluläre Matrix (EZM) imitieren, wurden erzielt. Hierbei wurden Hydrogele verwendet, die der Festigkeit von retinalem Gewebe entsprechen.

Im letzten Schritt wurde das iBRB-Modell inklusive Perizyten und Astrozyten so verändert, dass es das Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie abbilden konnte. So konnte ein Funktionsverlust der iBRB durch eine verminderte Expression wichtiger Barriere-Marker sowie eine höhere parazelluläre Permeabilität erzielt werden. Durch zusätzliche Behandlung mit einem in der Literatur bewährten potentiellen Wirkstoff konnte die Barrierefunktion der iBRB zwar erhöht, aber nicht zuverlässig regeneriert werden.

Im Vergleich zur iBRB/rNVU gibt es zahlreiche BBB/NVU-Modelle, welchen es jedoch häufig an einigen Zelltypen der NVU fehlt. Neben Perizyten, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen wurde das NVU-Modell im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls aus Neuronen aufgebaut. Diese wurden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) differenziert und hinsichtlich ihrer Morphologie, Expression zelltypischer Marker und Aktivität evaluiert. Nach einer Untersuchung von geeigneten Kultivierungsbedingungen konnte ein Kokultur-Modell der fünf Zelltypen einschließlich Neuronen im vasQchip etabliert und validiert werden. Auch die in der Literatur beschriebenen positiven Einflüsse der Zellen auf die Barrierefunktion im Endothel konnte mithilfe von RT-qPCR Analysen und TEER-Messungen sowie einem Funktionalitätstest der Efflux-Pumpe BCRP bestätigt werden. Zur Entwicklung eines 3D-Gewebemodells wurden Neuronen zur Ausdifferenzierung in natürliche Hydrogele auf Kollagenbasis und semi-synthetische Hydrogele (GelNB/GelS) eingebracht, welche in ihrer Festigkeit dem Hirngewebe ähneln. So wirkte sich zwar die Einbettung der Neuronen auf die Viabilität der Zellen negativ aus, dennoch konnte im natürlichen Hydrogel ein dichtes neuronales Netzwerk erzeugt werden. Diese dreidimensionalen Netzwerke wurden anschließend in das vollständige NVU-Modell im vasQchip integriert und fluidisch langzeitkultiviert. Auch mithilfe des *3D-Bioprintings* wurden erstmals iPSC-differenzierte Neuronen trotz mangelnder Ausrichtung im druckbaren GelNB/GelS auf dem vasQchip extrudiert und fluidisch kultiviert.

Im letzten Schritt wurden erste Ansätze zur Abbildung des Krankheitsbilds von Parkinson in Form einer Neuroinflammation erzielt. So konnte eine Aktivierung der Mikroglia sowie ein Funktionsverlust der BBB nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde mithilfe von Wirkstoffen zur Therapie von Parkinson und neuartigen *Drug-Delivery*-Systemen die Eignung des vasQchips als Testmodell für therapeutische Wirkstoffe überprüft.

Anhand der vorliegenden Arbeit wurden wichtige Erkenntnisse zur Krankheitsmodellierung und Wirkstofftestung erzielt, die als Fundament zur Entwicklung einsatzfähiger *in vitro* Organsysteme fungieren. Durch Kombination verschiedener Technologien des *Tissue Engineerings* wie *3D-Bioprinting* und Stammzellsystemen können langfristig exakte Nachbildungen von Organen erzielt werden und damit zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen beitragen.

1 Einleitung

Aktuelle Fortschritte in der Medizin sowie in der Technik ermöglichen es, die Lebensdauer des Menschen signifikant zu verlängern.¹ Gleichzeitig steigt global mit zunehmenden Alter die Inzidenz der degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Multiple Sklerose oder Diabetes mellitus einschließlich der diabetischen Retinopathie.²⁻⁴ Ursache sind neben der steigenden Lebenserwartung sowie genetischen Prädispositionen schlechter werdende Umweltbedingungen und eine ungesunde Lebensweise.⁵⁻⁷ Weltweit ist Parkinson nach Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung.^{8,9} Forschern zufolge soll sich die Zahl der Parkinsonerkrankungen bis zum Jahr 2040 um den Faktor 2,83 erhöhen, sodass bis zu 17 Millionen Menschen betroffen sein werden.⁵ Auch die Anzahl der Diabetiker soll bis 2045 von 463 Millionen auf 700 Millionen Individuen steigen.^{7,10} Trotz der steigenden Anzahl an Menschen, die unter solchen degenerativen Erkrankungen leiden, sind diese bis heute nicht heilbar.¹¹⁻¹⁴ Demnach ist das Erforschen alternativer Behandlungsmethoden und potentieller Wirkstoffkandidaten gegen diese Erkrankungen notwendig. Heutzutage ermöglicht unter anderem der enorme Fortschritt in der kombinatorischen Synthese die Herstellung einer großen Vielfalt an potentiellen Wirkstoffkandidaten.^{15,16} Jedoch ist die Überprüfung neuer potentieller Wirkstoffe auf ihre Wirksamkeit sowie eine direkte Erforschung der degenerativen Erkrankungen im Patienten nur eingeschränkt möglich. Infolgedessen werden häufig Tierversuche herangezogen.^{17,18} Diese liefern teilweise wichtige Erkenntnisse zur Pathologie verschiedener degenerativer Erkrankungen.¹⁹ Zudem kann die Toxizität, die Wirkmechanismen sowie das Penetrationsverhalten der potentiellen Wirkstoffe *in vivo* untersucht werden.²⁰⁻²² Dennoch sind die erzielten Erkenntnisse aufgrund speziesspezifischer Unterschiede häufig unzureichend auf den Menschen übertragbar.^{23,24} So konnten Studien zeigen, dass 80 % der getesteten Wirkstoffe aus präklinischen Tierversuchsstudien nach humaner Testung in der klinischen Phase scheitern.^{18,25} Darüber hinaus werden Tierversuche im Rahmen der Tierethik gesellschaftlich zunehmend kontrovers diskutiert.^{17,20} Infolgedessen werden alternative *in vitro* Modellsysteme benötigt, welche eine möglichst naturgetreue Nachbildung menschlicher Gewebesysteme sowie Krankheitsbilder ermöglichen. Derartige Modelle auf Basis humaner Zellen haben zukünftig das Potential, potentielle Wirkstoffe effizienter zu testen und zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten auf zellulärer Ebene beizutragen. Daher richtet sich heutzutage der Fokus der Forschung auf das *Tissue Engineering*.^{26,27}

1.1 *Tissue Engineering*

Der Begriff *Tissue Engineering* wurde erstmals 1988 von der *National Science Foundation* (NSF) definiert und ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches die Entwicklung von funktionellen naturgetreuen *in vitro* Gewebemodellen beinhaltet.^{26,28,29} Es kombiniert dabei Technologien der Ingenieur- sowie Naturwissenschaften, um die Diskrepanz zwischen natürlichem und künstlichem Gewebe bis auf zellulärer Ebene zu überwinden.³⁰⁻³² Die Grundlage dabei ist die Verwendung von Zellen, Gerüststrukturen und Wachstumsfaktoren.²⁷ Schon seit den späten 90er Jahren rückt das *Tissue Engineering* besonders in der regenerativen Medizin immer mehr in den Fokus.^{29,32} So konnten in den letzten Jahren deutliche Fortschritte in der Biomedizin zur Rekonstruktion von künstlichen Spenderorganen erzielt werden.^{26,27,32} Darüber hinaus können durch Integration neuartiger Technologien wie Stammzellkulturen oder dem *3D-Bioprinting* neue Maßstäbe zur personalisierten Medizin gesetzt werden.^{32,33} Auch die Rekonstruktion von funktionellen *in vitro* Gewebe- und Organsystemen sowie die Modellierung verschiedener Erkrankungen ist im *Tissue Engineering* von besonderem Interesse.³⁴ Derartige Modellsysteme ermöglichen neben einer Reduktion von Tierversuchen eine gezieltere Überprüfung von potentiellen Wirkstoffkandidaten in der präklinischen Phase.^{34,35} Darüber hinaus erlauben diese Modelle eine Untersuchung von pathologischen Mechanismen verschiedener Erkrankungen auf molekularer Ebene, was zur Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten beiträgt.³⁵

1.1.1 *Modellsysteme im Tissue Engineering*

Das einfachste und häufigste Modellsystem im *Tissue Engineering* stellt die konventionelle humane 2D-Zellkultur dar.³⁶ Hierbei werden adhärente Zellen unter geeigneten Bedingungen auf einer planaren Polystyrol- oder Glasoberfläche in einem Nährmedium kultiviert.³⁶ Seit mehr als 40 Jahren finden solche 2D-Monozellkulturen in der Forschung unter anderem zur Charakterisierung von Wirkstoffen Verwendung (Abbildung 1).^{37,38} Diese Modellsysteme zeichnen sich durch einfache Handhabung, Reproduzierbarkeit und Kosteneffizienz aus, jedoch spiegeln sie nicht die dreidimensionale Anordnung von Zellen im menschlichen Körper wider.^{37,39} So kann anhand dieser primitiven Modelle die Komplexität eines Organs oder eines ganzen Organismus nicht abgebildet werden.³⁵ Damit ist die Übertragbarkeit der erzielten Resultate in 2D-Modellsystemen auf den Menschen eingeschränkt.^{36,38} Infolgedessen erlangten dreidimensionale Modellsysteme in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Popularität.^{36,37,39} Im menschlichen Körper wachsen Zellen in dreidimensionalen hochkomplexen Gewebestrukturen, in denen verschiedene Zelltypen von einer extrazellulären Matrix (*Extracellular Matrix*, EZM) umgeben sind.^{37,40} Eine dreidimensionale Kultivierung der Zellen erlaubt somit eine *in vivo* ähnliche gewebetypische Mikroumgebung und damit eine Ausbildung zahlreicher Zell-Zell-Kontakte sowie Zell-Matrix-Kontakte.³⁶ Diese ermöglichen eine korrekte Zelldifferenzierung, Proliferation und Funktionalität der Zellen.^{36,37,39} Darüber hinaus spielt eine

dreidimensionale Kultivierung der Zellen eine wesentliche Rolle in der Morphologie, Signalweiterleitung sowie im Stoffwechsel.^{36,38} Eine der ersten 3D-Zellkulturen wurde in den 70er-Jahren etabliert.³⁶ Dabei handelte es sich um einfache solide kugelförmige Zellaggregate, sogenannte Sphäroide. Sphäroide können entweder in Suspension oder auf nicht-adhäsiven Oberflächen generiert werden (Abbildung 1).³⁶⁻³⁸ Hierbei akkumulieren adhärenente Zellen aufgrund ihrer Neigung zur Zellaggregation.³⁷ Besonders in der Rekonstruktion von Tumoren finden Sphäroide in der Krebsforschung sowie in präklinischen Studien Verwendung.^{36,39} Neben Sphäroiden können Zellen auch in EZM-imitierende Gerüststrukturen eingebettet werden, welche ein dreidimensionales Wachstum über mehrere Ebenen erlauben.^{38,41} Durch Kombination mit dem *3D-Bioprinting* wird dabei eine präzise und kontrollierte 3D-Anordnung der druckbaren EZM-imitierenden Substanz gewährleistet (Abbildung 1).^{32,42}

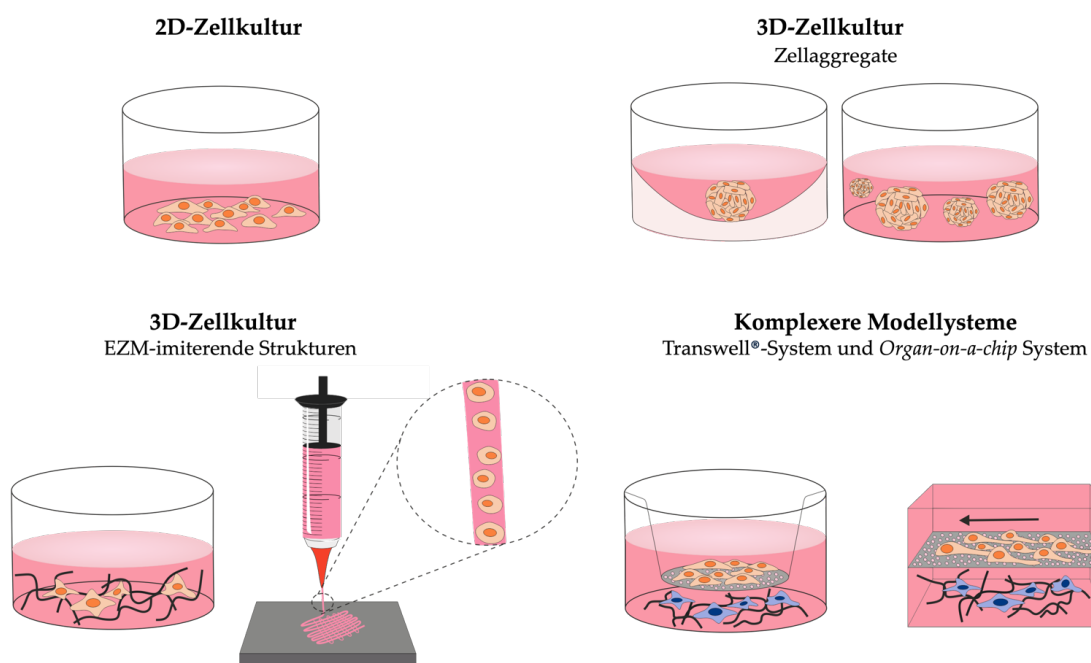


Abbildung 1: Verschiedene Modellsysteme zur Modellierung von Gewebe im Tissue Engineering. Das einfachste Modellsystem stellt die 2D-Zellkultur dar, in dem Zellen auf einer planaren Oberfläche kultiviert werden. Um zusätzlich eine dreidimensionale Mikroumgebung zu schaffen, werden 3D-Zellkulturen verwendet. Dabei können Zellen als Zellaggregate oder eingebettet in einer EZM-imitierenden Struktur wie beispielsweise einem Hydrogel, vorliegen. Durch Kombination mit *3D-Bioprinting* kann bei Letzterem eine präzisere Platzierung erzielt werden. Um funktionelle Gewebesysteme in ihrer Komplexität besser abbilden zu können, werden Transwell®-Systeme herangezogen. Jedoch bleiben mechanische Stimuli in diesen statischen Modellen unberücksichtigt. Dagegen ermöglichen *Organ-on-a-chip* Systeme die Integration von dynamischen Prozessen wie beispielsweise einem künstlichen Blutstrom. Die Komplexität der Modellsysteme nimmt dabei von 2D-Zellkulturen bis zu *Organ-on-a-chip* Systemen zu (modifiziert nach Pfister).¹⁴

Obwohl 3D-Modellsysteme im Vergleich zu 2D-Modellsystemen die strukturellen *in vivo* Gegebenheiten von Gewebe besser abbilden, fehlen weiterhin essentielle Faktoren zur Nachbildung funktionaler Gewebesysteme. Dazu gehören mechanische Stimuli wie die Kontraktion und Expansion einer Lunge oder der Blutstrom und die daraus resultierenden

Scherkräfte.^{35,43,44} Neben diesen spielen auch variierende biochemische Gradienten und Grenzflächen zwischen zwei Gewebsschichten eine wichtige Rolle für eine korrekte Funktion sowie Anordnung der Zellen in einem Gewebe.⁴⁵ Mithilfe von Transwell[®]-Systemen kann eine zusätzliche Komplexität in einem Modellsystem erzeugt werden. Hierbei werden zwei Zellschichten durch eine 10 µm dicke permeable Membran getrennt kultiviert (Abbildung 1).^{46,47} Dennoch mangelt es solchen statischen Modellen weiterhin an dynamischen Prozessen zur Abbildung authentischer komplexer Organsysteme. Jüngste Fortschritte haben die Entwicklung von miniaturisierten mikrofluidischen Organsystemen, die sogenannten *Organ-on-a-chip* Systeme ermöglicht.^{38,48} Diese können unter kontrollierbaren physiologischen Bedingungen zur Nachahmung verschiedener Organsysteme und Krankheitsmodelle eingesetzt werden.^{48,49} Hierbei werden Zellen oder *ex vivo* Gewebe über einen bestimmten Zeitraum in vorgefertigte miniaturisierten *in vitro* Organchips eingebracht (Abbildung 1).⁴⁸⁻⁵⁰ Durch Integration einer Mikrofluidik werden artifizielle Blutströme erzeugt, welche zur Vaskularisierung des *in vitro* Gewebemodells beitragen.^{34,35,48}

1.1.2 EZM und Hydrogele

Jedes Gewebe und Organ im menschlichen Körper wird durch Zellen, welche in eine nicht-zelluläre dynamische Komponente (EZM) eingebettet sind, organisiert.⁵¹⁻⁵⁴ Die EZM ist ein hoch komplexes makromolekulares Netzwerk aus strukturellen Proteinen.⁵¹ Die Hauptkomponenten bilden Proteoglykane und die faserartigen Proteine Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin.^{51,52,55} Eine Interaktion der faserartigen Proteine ermöglicht die Generierung von multi-molekularen mechanischen Strukturen, welche das komplexe dreidimensionale Matrix-Netzwerk aufbauen.⁵¹ Dabei sind die Zwischenräume dieser charakteristischen Netzwerke mit Wasser und Proteoglykan ausgefüllt.⁵⁴ Die individuelle Zusammensetzung der EZM variiert nach Gewebe und Funktion.⁵¹ So sind im Gehirn vermehrt strukturelle Proteine wie Lectican und Hyaluronsäure vertreten.⁵⁶ Zellen können durch ihre Oberflächenrezeptoren wie Integrine oder Diskoidin-Domäne-Rezeptoren mit der EZM interagieren.^{51,54,55} Neben einer Stütz- und Gerüstfunktion für die Zellen, spielt die EZM eine wesentliche Rolle in deren Wachstum, Differenzierung, Morphogenese sowie in der Homöostase einzelner Gewebe.⁵¹⁻⁵⁵ Darüber hinaus reguliert die EZM das Migrationsverhalten sowie die Polarität der zellulären Komponenten.^{51,54}

Um *in vitro* funktionelle Gewebesysteme zu kreieren, werden EZM-imitierende Strukturen, die den Eigenschaften einer *in vivo* EZM nachkommen, benötigt. Daher liegt das Hauptaugenmerk in den letzten 50 Jahren auf der Entwicklung von Hydrogelen, die aufgrund ihres breiten Anwendungsspektrums in biologischen und biomedizinischen Bereichen immer häufiger Verwendung finden.⁵⁷⁻⁵⁹ Hydrogele sind wasserunlösliche Polymer-Netzwerke mit hydrophilen Eigenschaften.^{57,58} Sie sind in der Lage aufgrund hydrophiler funktioneller Gruppen große Mengen an Wasser einzulagern.⁵⁷⁻⁶⁰ Aufgrund dessen besitzen Hydrogele gewebeähnliche Eigenschaften, was sie für das *Tissue Engineering* besonders attraktiv macht.^{57,59} Darüber hinaus können Zellen in

Hydrogele eingeschlossen werden, wobei eine dreidimensionale gewebeähnliche Mikroumgebung simuliert wird.^{57,59} Bei der Charakterisierung von Hydrogelen wird nach Gewinnungsart der zu vernetzenden Polymerketten in natürliche, synthetische oder semi-synthetische Hydrogele unterschieden.⁵⁹ Natürliche Hydrogele stammen unter anderem aus Proteinen der EZM wie Hyaluronsäure, Fibronectin und Kollagen.^{59,60} Auch natürliche Hydrogele aus Cellulose, aus der Alge (Alginat), aus dem Hydrolyseprodukt von Kollagen (Gelatine) oder aus Chitin (Chitosan) finden häufig Verwendung.⁵⁹⁻⁶¹ Synthetische Hydrogele hingegen werden meist aus Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylenglykol (PEG) gebildet.⁵⁹ Dabei kann eine Vernetzung der verschiedenen Polymerketten zu einem 3D-Netzwerk physikalisch oder chemisch erfolgen.^{58,60} Im Gegensatz zur chemischen Vernetzung haben physikalisch vernetzte Hydrogele den Vorteil, dass die Zugabe eines chemischen Initiators nicht erforderlich ist.⁵⁸ Die Vernetzung findet beispielsweise durch Änderung der Temperatur oder des pH-Wertes statt.^{58,62} Jedoch entsteht dabei eine weniger mechanisch stabile Vernetzung, welche anfälliger für Degradierungsprozesse ist.⁵⁸ Natürliche Hydrogele weisen im Vergleich zu synthetischen Hydrogelen eine höhere Biokompatibilität, zelluläre Wechselwirkungen sowie eine biologische Abbaubarkeit auf.^{59,60} Zudem kreieren natürliche Hydrogele eine physiologischere Mikroumgebung.^{59,60,62} Im Gegensatz dazu gewährleisten synthetische Hydrogele eine höhere Wasseraufnahmekapazität, eine längere Beständigkeit sowie eine höhere mechanische Festigkeit.^{57,59,60} Daher wurden in den letzten 20 Jahren natürliche Hydrogele nach und nach durch synthetische Hydrogele ersetzt.^{57,59} Dennoch mangelt es den synthetischen Hydrogelen häufig an Adhäsionsstellen für zelluläre Interaktionen.^{60,63} Daher liegt der Fokus in biologischen sowie biomedizinischen Anwendungen auf semi-synthetischen Hydrogelen, welche die Vorteile von natürlichen sowie synthetischen Polymeren vereinen.^{60,63} Dabei werden natürliche Materialien chemisch so modifiziert, dass diese ein stabiles semi-synthetisches Polymer abbilden.^{60,63} Grundlage hierbei ist die Modifizierung der Seitenketten des Rückgrates des natürlichen Materials. Ein Beispiel ist die Funktionalisierung von Gelatine.⁶⁴ Um Gelatine als stabiles Polymer beziehungsweise Hydrogel zu nutzen, werden die Lysinseitenketten der Gelatine zu GelMA methacryliert.^{60,65} Anschließend können diese funktionalisierten Polymere durch Zugabe eines Photoinitiators und Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge zu einem polymeren 3D-Netzwerk kovalent verknüpft werden.^{60,65} Dabei können Zellen in diese Gelmatrix eingebettet werden, um 3D-Kulturen zu erzeugen (Abbildung 2).

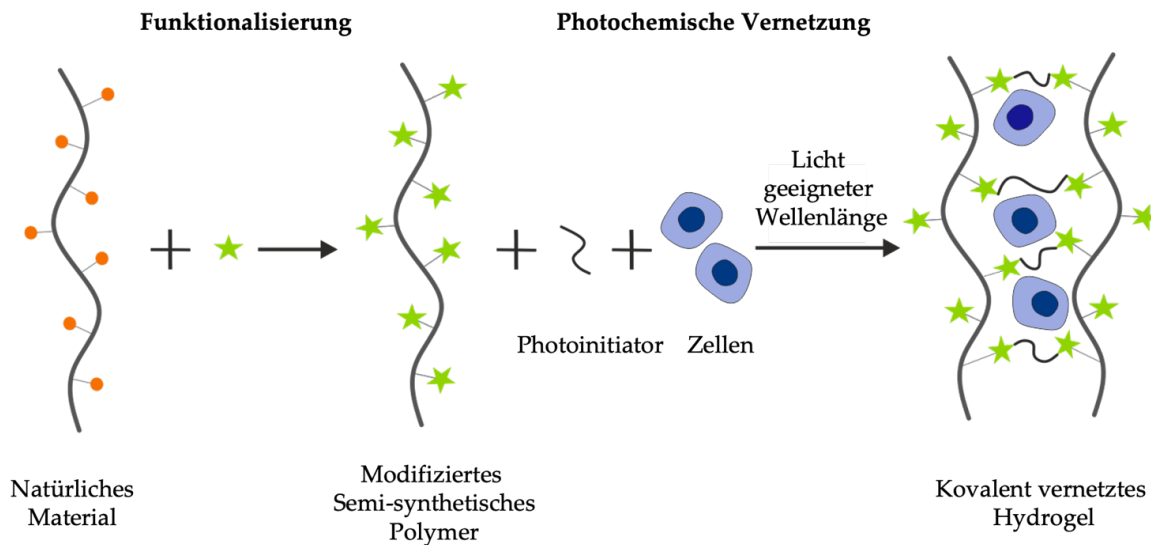


Abbildung 2: Schematische Darstellung für eine Funktionalisierung und photochemische Vernetzung von semi-synthetischen Hydrogelen und die Einbettung von Zellen. Das natürliche Material wird zu einem semi-synthetischen Polymer funktionalisiert. Durch Zugabe eines geeigneten Photoinitiators und Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge können Zellen in einem kovalent vernetzten Hydrogel eingebettet werden (modifiziert nach Grosshäuser).⁶⁶

1.1.3 Organ-on-a-chip Systeme

Organ-on-a-chip Systeme haben in den letzten Jahren im Bereich des *Tissue Engineerings* immer mehr an Bedeutung gewonnen.^{48,49,67} Dabei wurde das Konzept erstmals 2004 publiziert und seitdem kontinuierlich weiterentwickelt, sodass es heutzutage zu den zehn erfolgversprechendsten Technologien dieses Fachbereichs gezählt wird.^{48,68} So stieg die Anzahl von Publikationen, innovativer Technologie und Unternehmen in diesem Bereich weltweit.^{48,49} Durch Kombination der Zellbiologie, Ingenieurwissenschaft sowie der Biomaterialtechnologie konnten diese kostengünstigen mikrofluidischen Zellkultur-Plattformen entwickelt werden, welche durch Mikrofabrikationstechniken hergestellt werden.⁶⁸ Das Ziel ist es, menschliche *in vivo* ähnliche funktionelle Gewebe- oder Organeinheiten zu rekonstruieren.^{48,49,67,68} So konnten bereits Organeinheiten wie die Leber, das Gehirn, die Lunge oder die Niere in solchen mikrofluidischen Systemen etabliert werden.^{49,69,70-72} Derartige Modelle sind in der Lage Gewebe-Gewebe- und Zell-Zell-Interaktionen, Grenzflächen sowie räumlich und zeitlich variierende biochemische Gradienten nachzubilden.^{49,68} Des Weiteren können durch Integration einer Mikrofluidik artifizielle Blutströme und eine Vaskularisierung des Gewebes erzeugt werden.^{40,72} Damit bieten *Organ-on-a-chip* Systeme gegenüber primitiven statischen 2D- sowie 3D-Zellkulturen einzigartige Vorteile, indem sie eine *in vivo* ähnlichere, dynamischere und physiologischere Mikroumgebung für Zellen anbieten.^{48,49,68} Diese kleinsten funktionellen Einheiten verfügen über ein enormes Potential das Verständnis von menschlichen Gewebe- und Organeinheiten zu erweitern.^{48,49,68} Zudem bieten solche Modelle ein essentielles Instrument zur Etablierung der personalisierten Medizin.^{48,49} Darüber hinaus können verschiedene

Krankheitsmodelle integriert werden, um Wirkstoffe präzise unter skalierbaren Bedingungen zu untersuchen.^{48,49,68} So können bereits in der präklinischen Phase erste Erkenntnisse über die Wirkstoffverträglichkeit, den Wirkmechanismus oder die Wirksamkeit gesammelt werden, um die Patientensicherheit in klinischen Phasen zu verbessern. Dabei kann im Vergleich zu Tierversuchen, durch Verwendung von humanen Materialien die limitierte Übertragbarkeit aufgrund genetischer Unterschiede überwunden werden.^{49,68} *Organ-on-a-chip* Systeme haben damit das Potential als zukünftige Ersatzstrategie für Tierversuche langfristig die Arzneimittelforschung zu verändern.^{48,49,68}

Der am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Arbeitsgruppe Schepers entwickelte vasQchip stellt ein Beispiel für ein solches *Organ-on-a-chip* System dar (Abbildung 3).⁷²

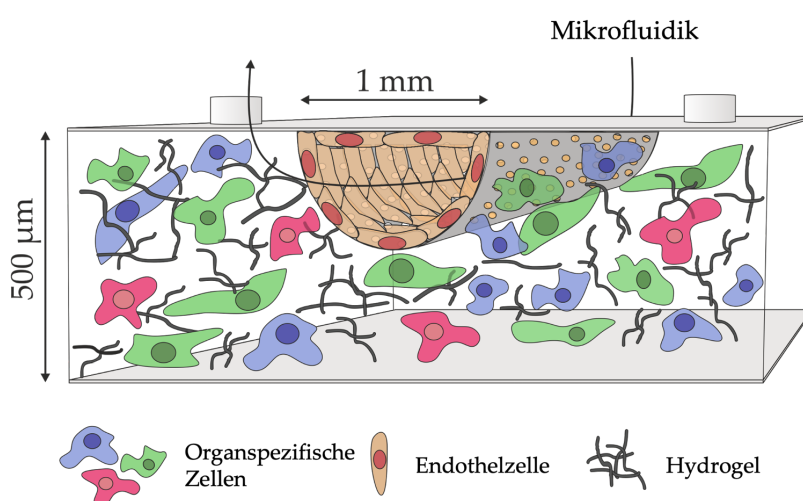


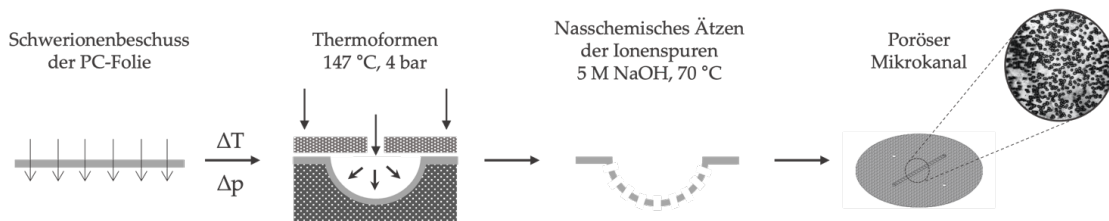
Abbildung 3: Schematische Darstellung des *Organ-on-a-chip* Systems vasQchip. Das vaskularisierte Organsystem besteht aus einem halbrunden Mikrokanal und einem umgebenden Kompartiment. Während der poröse halbrunde Mikrokanal zur Nachbildung eines Blutgefäßes mit Endothelzellen ausgekleidet wird, können in das umgebende Kompartiment organspezifische 3D-Zellkulturen integriert werden. Der Anschluss an eine Mikrofluidik simuliert einen artifiziellen Blutstrom, versorgt die Zellen mit Nährstoffen und fördert die naturgetreue Morphologie sowie die Entwicklung der Zellen (modifiziert nach Kappings *et al.*).⁷²

Der vasQchip besteht wie die Mehrheit der *Organ-on-a-chip* Systeme aus zwei Kompartimenten, welche durch eine dünne poröse Membran räumlich getrennt werden. Eine Besonderheit des vasQchips ist die halbrunde Form des Mikrokanals aus Polycarbonat (PC), welche im Vergleich zu anderen rechteckigen Systemen die natürliche Geometrie eines *in vivo* Blutgefäßes besser abbildet.⁷² Das größere darunterliegende Kompartiment umgibt dabei den Mikrokanal und steht über die poröse PC-Membran mit diesem in Kontakt. Zur Nachbildung eines Blutgefäßes, kann der vasQchip mit Endothelzellen ausgekleidet werden. Durch anschließende Integration einer Mikrofluidik wird ein artifizieller Blutstrom und daraus resultierende Scherkräfte erzeugt. Diese gewährleisten *in vivo* die naturgetreue Morphologie, Entwicklung und Funktionalität der Endothelzellen.^{49,68} Anhand von Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) konnten die durch Scherkräfte verursachten physiologischen Eigenschaften im Mikrokanal des vasQchips

nachgewiesen werden.⁷² Darüber hinaus ermöglicht die halbrunde Form des Mikrokanals im Vergleich zu eckigen Strukturen eine bessere Verteilung der Scherkräfte über die gesamte Kanaloberfläche.⁷² Das umgebende Kompartiment erlaubt die Integration von organspezifischen Zellen. Durch Einbettung der Zellen in EZM-imitierende Stützstrukturen wie Hydrogele können organspezifische 3D-Zellkulturen generiert werden. Damit ist die Etablierung von dreidimensionalen durchbluteten Organsystemen im vasQchip realisierbar.

Die Herstellung des PC-Mikrokanals basiert auf der von Giselbrecht *et al.* am KIT entwickelten SMART-Technologie (*Substrate modification and replication by thermoforming*, SMART).⁷³ Diese wird prinzipiell in drei Schritte unterteilt.⁷³ Zur Herstellung der porösen PC-Mikrokanäle werden kommerziell erwerbliche mit Schwerionen beschossene PC-Membranen (10-50 µm dick, 10⁶ Ionenspuren/cm²) verwendet (Abbildung 4).⁷²

1) Herstellung des porösen Mikrokanals nach der SMART-Technologie



2) Assemblierung des vasQchips und Applikation

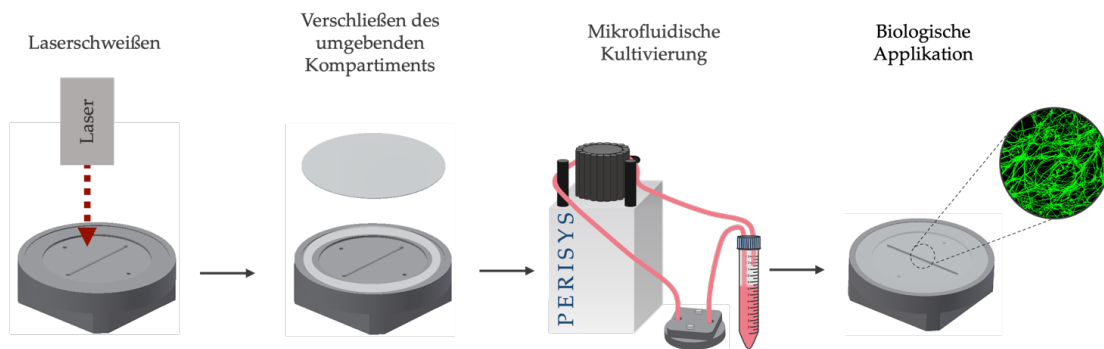


Abbildung 4: Herstellung des porösen Mikrokanals sowie des vasQchips. Die Herstellung des porösen Mikrokanals erfolgte nach der SMART-Technologie von Giselbrecht *et al.*⁷³ Mit Schwerionen beschuss behandelte PC-Membrane wurden im Thermoform-Prozess in halbrunde Mikrokanäle geformt. Im Anschluss konnte durch nasschemisches Ätzen die latente Ionenspur zu Poren geöffnet werden. Die Anbringung des porösen Mikrokanals auf einen PC-Block erfolgte durch Laserschweißen. Im letzten Schritt konnte das umgebende Kompartiment mithilfe eines Deckglases sowie eines Kleberinges verschlossen werden. Anschließend konnten biologische Applikationen unter einer mikrofluidischen Kultivierung durchgeführt werden (modifiziert nach Grün *et al.*).⁷⁴

Im nächsten Schritt wird durch Hitze und Druck eine halbrunde Kanalstruktur (Breite: 1 mm, Länge: 2 cm, Tiefe: 300 µm) in der modifizierten PC-Membran geformt (Thermoformen).⁷²⁻⁷⁴ Anschließend wird durch nasschemisches Ätzen des halbrunden Mikrokanals eine Öffnung der latenten Ionenspur erzielt.⁷²⁻⁷⁴ Dabei bestimmt die Ätzbedingung die Porengröße der

Mikrokanäle (1-5 μm). Danach können die gefertigten halbrundgeformten porösen Mikrokanäle durch Laserschweißen auf einen PC-Block angebracht werden. Ein Anbringen eines Kleberinges sowie eines Deckglases ermöglicht das Verschließen des umgebenden Kompartiments.^{72,74} Anschließend können die vasQchips für biologische Anwendungen fluidisch kultiviert werden (Abbildung 4).

1.2 Barrieren im menschlichen Körper

Aus einer physiologischen Perspektive ist es möglich den menschlichen Körper als eine Anhäufung von gas- und flüssigkeitsgefüllten Kompartimenten aufzufassen.^{75,76} So sind Harnblase, Dickdarm, Lunge, Prostata oder der Magen kennzeichnende Beispiele dafür.⁷⁵ Für eine korrekte Funktionalität der einzelnen Organe benötigt der menschliche Körper biologische Barrieren, um die einzelnen Kompartimente voneinander abzugrenzen.^{75,77} Dabei befinden sich die meisten Barrieren an den Grenzflächen zwischen Blutgefäßen und dem umliegenden Organgewebe.^{78,79} Diese werden häufig von Endothelzellen, welche zahlreiche mikrovaskuläre Blutgefäße luminal auskleiden, gebildet.⁷⁷⁻⁷⁹ So entspricht die Summe der auskleidenden Endothelzellfläche eines männlichen Individuums von 70 kg einer Fläche von 270 m^2 .⁷⁸ Aufgrund eines geregelten Stoffaustausches sind biologische Barrieren nur für selektive Substanzen in definierter Richtung durchlässig.^{77,80} Dabei wird der selektive Stoffaustausch zwischen dem mikrovaskulären Blutgefäß und dem umliegenden Organgewebe von zahlreichen Zell-Zell-Kontakten und strukturellen Proteinen im Endothel kontrolliert.^{75,77,78,81} Je nach Organ oder Gewebe ist das Endothel unterschiedlich dicht ausgeprägt.^{78,79,81} So besitzt die Leber, Milz oder das Knochenmark ein diskontinuierliches Endothel mit sinusoidalen Öffnungen mit einer Größe von 0,1-1 μm , wodurch die Blutgefäße für polare Substanzen besonders permeabel sind (Abbildung 5).^{78,79} Die Niere sowie der Magen-Darmtrakt weisen ein fenestriertes Endothel mit charakteristisch kleinen zytoplasmatischen Öffnungen der Größe 60-80 nm auf (Abbildung 5).⁷⁷⁻⁷⁹ Dagegen zeichnet sich das kontinuierliche Endothel im Gehirn, in der Retina des Auges oder der Lymphknoten durch eine besonders dichte Barriere sowie eine geringe Permeabilität aus, sodass hauptsächlich lipophile Stoffe penetrieren können (Abbildung 5).⁷⁷⁻⁷⁹ Die Blut-Hirn-Schranke (*Blood-brain barrier*, BBB) im Gehirn sowie die innere Blut-Retina-Schranke in der Retina des Auges (*inner Blood-retinal barrier*, iBRB) stellen solche dichten Barrieren mit einem kontinuierlichen Endothel im zentralen Nervensystem (ZNS) dar.⁸² Es ist bekannt, dass die BBB sowie die iBRB zu den dichtesten Barrieren im menschlichen Körper gehören.⁸³⁻⁸⁵ Aufgrund der hohen Barriereintegrität sind > 98 % der arzneilichen Wirkstoffe nicht in der Lage die BBB zu passieren.^{86,87} Dies erschwert das Einbringen von therapeutischen Wirkstoffen zum Zielgewebe, um dort unter anderem degenerative Erkrankungen zu behandeln.⁸⁶⁻⁸⁸ Infolgedessen steht die Entwicklung von selektiven Wirkstoffen, die solche Barrieren überwinden und dabei verschiedene Erkrankungen behandeln können, seit Jahrzehnten im Fokus der Humanmedizin.⁸⁷⁻⁸⁹

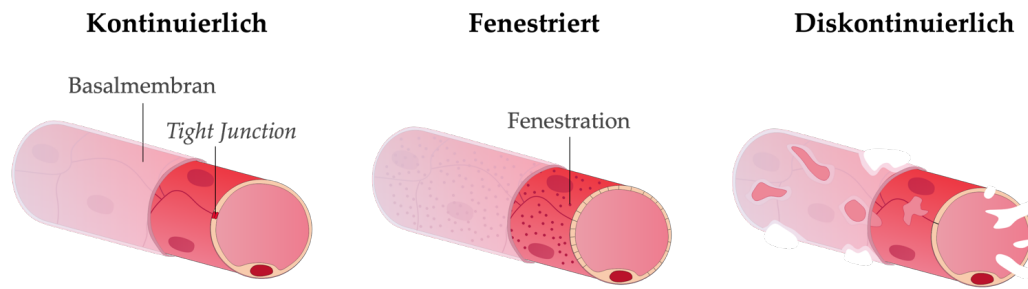


Abbildung 5: Beispiele für unterschiedlich dichte mikrovaskuläre Blutgefäße verschiedener Organe im menschlichen Körper. Prinzipiell besitzen mikrovaskuläre Blutgefäße je nach Organ und Gewebe ein kontinuierliches, fenestriertes oder diskontinuierliches Endothel. Während das kontinuierliche Endothel sich über eine sehr dichte Barriere auszeichnet, weist das fenestrierte Endothel kleine zytoplasmatische Öffnungen und das diskontinuierliche Endothel große Öffnungen auf (modifiziert nach Kolka).⁷⁹

1.2.1 BBB und iBRB im ZNS

Das Gehirn sowie die Retina im Auge haben, bezogen auf ihre Größe, den höchsten Energiebedarf im menschlichen Körper. Bei einer Gesamt-Körpermasse von 2 % finden im Gehirn 20 % und in der Retina 8 % der metabolischen Vorgänge statt.⁸⁵ Dabei wird die Regulierung der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen und Sauerstoff aus dem Blut mithilfe der BBB sowie in der Retina mit der iBRB im ZNS sichergestellt.^{77,80,84,90} Des Weiteren gewährleisten die physiologischen Barrieren den Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten, eine Regulation der Ionenkonzentration, die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn und Retina sowie den Schutz vor potentiell toxischen Substanzen.^{77,80,84,85,90,91} Dabei wird ein strikt selektiver Stoffaustausch zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Hirn- oder retinalen Gewebe durch die beiden Barrieren sichergestellt.^{83,84,92} Der dichte Barrierecharakter wird durch ein Netzwerk aus zahlreichen strukturell interagierenden Proteinen zwischen sehr eng benachbarten Endothelzellen gewährleistet.^{84,85,93} Diese ausgeprägte Barriere-Eigenschaft wird von den sogenannten *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und *Junction*-assoziierten Proteinen gebildet.^{85,93,94} Dabei bilden die *Tight Junctions* eine „klettverschlussartige“ Struktur zwischen benachbarten Endothelzellen.^{84,95} Dies resultiert in einer äußerst geringen vaskulären Permeabilität, sodass eine parazelluläre Diffusion von Ionen und polaren sowie makromolekularen Stoffen stark eingeschränkt wird.^{84,85} Zu den *Tight Junctions* gehören die integralen transmembranen Claudine, Occludin und die zytoplasmatischen ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (*Zonula occludens*).^{75,85,96} Claudin-5 ist im Gehirn sowie in der Retina die am häufigsten vorkommende Isoform und reguliert die Barriereintegrität sowie die damit verbundene vaskuläre Permeabilität.^{85,94,96} Dagegen ist Occludin der Hauptregulator der *Tight Junctions*, welcher die Dichtigkeit der vorhandenen Barriere verstärkt.^{85,94} Zusammen mit Claudin-5 interagiert Occludin mit Proteinen der ZO-Familie.^{85,94,96} Dabei können die transmembranen *Tight Junctions* durch Wechselwirkung mit Ankerproteinen der ZO-Familie an das Aktinzytoskelett assoziieren.^{75,85,96,97} Dies ermöglicht die Regulierung zellulärer Prozesse wie die Aufrechterhaltung der Polarität in Endothelzellen.⁸⁵ Das *Junction*-assoziierte Protein CD31 reguliert die vaskuläre Permeabilität der Endothelzellen.^{98,99} *Adherens Junctions* interagieren mit

Tight Junctions in strukturellen Netzwerken und spielen eine wichtige Rolle in der Adhäsion zwischen angrenzenden Zellen, Polarität sowie in der Regulation des parazellulären Transports.^{85,97,100} So wird dem transmembranen *Adherens Junction*-Protein VE-Cadherin eine Rolle in der Barriereentwicklung sowie in der parazellulären Permeabilität zugeschrieben.^{85,101} Eine schematische Darstellung der *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* sowie des *Junction*-assoziierten Proteins CD31 ist in Abbildung 6 dargestellt.

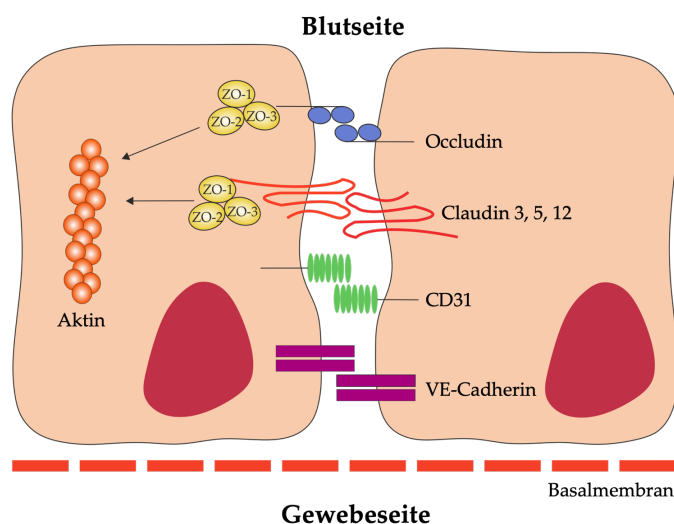


Abbildung 6: Schematische Darstellung der *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und *Junction*-assoziierten Proteine im Endothel der BBB sowie der iBRB. Der dichte Barrierecharakter der BBB sowie der iBRB werden durch strukturell interagierende Proteine zwischen benachbarten Endothelzellen im Blutgefäß aufrechterhalten. Dazu zählen die Proteine der *Tight Junctions* (Occludin, Claudine und CD31), *Adherens Junctions* (VE-Cadherin) sowie das *Junction*-assoziierte Protein CD31. Eine Wechselwirkung zwischen den transmembranen *Tight Junctions* mit den zytoplasmatischen Ankerproteinen der ZO-Familie erlaubt dabei eine Assoziierung mit dem Aktinzytoskelett (modifiziert nach Abbott *et al.*).⁹⁷

Neben dem parazellulären Transport zwischen benachbarten Endothelzellen wird auch der transzelluläre Transport in der BBB sowie der iBRB zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Gewebe strikt reguliert.^{85,100,102} So steuern spezifische Transporter-Systeme auf der luminalen (apikalen) sowie der abluminalen (basolateralen) Seite der Endothelzellen den Transport von Nährstoffen oder Ionen.^{85,100} Eine Besonderheit unter den Transportern bilden die sogenannten Efflux-Pumpen, welche auf der luminalen Seite der Endothelzellen lokalisiert sind.^{97,100} Zu den bekanntesten Efflux-Pumpen gehören BCRP (*Breast cancer resistance protein*) und P-gp (*Permeability glycoprotein*).^{97,103,104} BCRP und P-gp besitzen das ATP-bindende Strukturelement (*Adenosine triphosphate-binding cassette*) und gehören damit zur ABC-Superfamilie.^{97,100} Sie sind in der Lage unter ATP-Hydrolyse unerwünschte Stoffe gegen einen Konzentrationsgradienten aktiv unidirektional aus der Zelle heraus zu transportieren.^{97,100,104} So können eingedrungene Xenobiotika, toxische Metabolite, kleine lipophile Stoffe oder Krankheitserreger, welche die Barrieren passiv penetrieren können, mithilfe der beiden Efflux-Pumpen aktiv in die Blutbahn zurück transportiert werden.^{97,100} Dadurch tragen diese zum Schutz der Retina und des Gehirns

sowie zur dichten Barrierefunktion bei. Neben Xenobiotika können P-gp sowie BCRP auch penetrierte therapeutische Wirkstoffe wie Zytostatika, Antibiotika oder Immunsuppressiva in den Blutkreislauf zurück transportieren, wodurch die Effizienz der Wirkstoffe erheblich vermindert wird.^{97,100,104} Die BBB und die iBRB besitzen neben den Efflux-Pumpen weitere wichtige Transporter-Systeme, wovon die wichtigsten in Abbildung 7 schematisch aufgeführt sind.^{85,97,100} Darüber hinaus unterscheiden sich die iBRB sowie die BBB in ihrem Pinozytoseverhalten. Während die iBRB verschiedene Plasmaproteine durch Pinozytose transportiert, weist die BBB dagegen eine 100-fach geringere Pinozytose auf.^{85,105,106}

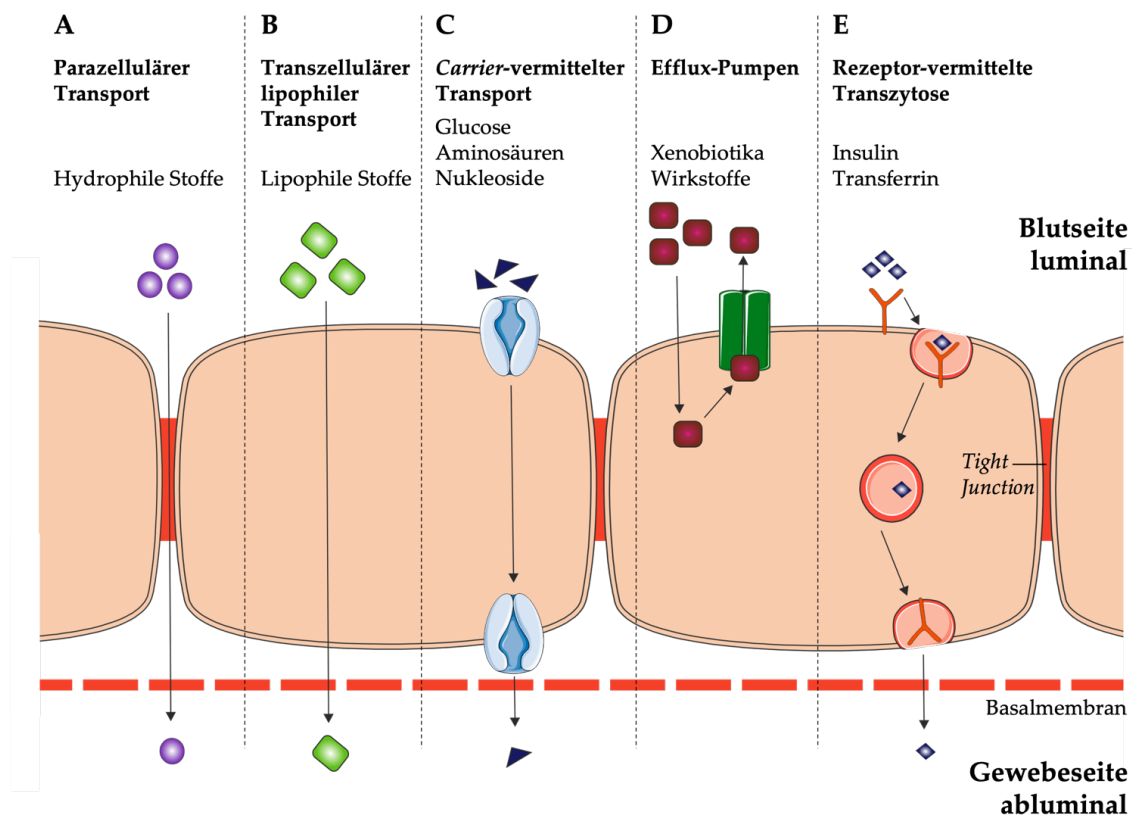


Abbildung 7: Transportmechanismen entlang der Endothelzellen der BBB und iBRB. (A) Der parazelluläre Transport hydrophiler Stoffe wird durch ein Zusammenspiel aus *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* stark eingeschränkt. (B) Kleine lipophile Stoffe können dagegen die Zellmembran transzellulär ungehindert passieren. (C) Mithilfe von *Carrier*-vermittelten Transportern können Glucose, Aminosäuren oder Nucleoside transportiert werden. (D) Efflux-Pumpen ermöglichen einen ATP-abhängigen Rücktransport von Xenobiotika oder einzelnen Wirkstoffen ins Blut und tragen damit zur Barrierefunktion bei. (E) Durch eine Rezeptor-vermittelte Transzytose können Proteine wie Insulin oder Transferrin zur Gewebeseite befördert werden (modifiziert nach Cockerill *et al.*).¹⁰⁰

1.2.2 Das menschliche Gehirn und die neurovaskuläre Einheit

Das Gehirn stellt das komplexeste Organ im menschlichen Körper dar.^{107,108} Als Komponente des ZNS fungiert es als Hauptkontrollort für alle lebenswichtigen bewusst steuerbaren und nicht

bewusst steuerbaren Vorgänge, Sinneswahrnehmungen, Emotionen und Verhaltensweisen im Menschen.¹⁰⁹ Infolgedessen ist es von höchster Priorität dieses lebensnotwendige und dabei sehr weiche Organ vor schädigenden Umwelteinflüssen zu schützen und korrekt zu versorgen.¹⁰⁷ Jedoch kann das Gehirn selbst nur begrenzt benötigte Energiereserven speichern.¹⁰⁸ So muss eine an den Energiebedarf gekoppelte externe Versorgung mit Nährstoffen sowie Sauerstoff aus dem Blut konstant gedeckt werden.^{96,108} Dies wird durch die sogenannte neurovaskuläre Einheit (*Neurovascular unit*, NVU), von welcher die BBB eine wichtige Komponente bildet, sichergestellt.^{91,96,108} Durch Regulation des zerebralen Blutflusses gewährleistet die NVU eine kontinuierliche Versorgung des Gehirns einschließlich aktivierter Neuronen trotz sich stetig ändernder Einflüsse.^{96,108} Dabei bildet die NVU eine anatomische und funktionelle Einheit, welche durch einen Zusammenschluss von vaskulären und neuronalen Zellen sowie extrazellulären Komponenten organisiert wird.^{96,108} Eine enge und wechselseitige Interaktion dieser Komponenten trägt neben der Adaption des zerebralen Blutflusses zur Funktionalität, Ausbildung und Aufrechterhaltung einer dichten Barriere der BBB in den Endothelzellen bei.^{92,97,105,108} Die NVU besteht neben den blutgefäßbildenden Endothelzellen aus Perizyten, Astrozyten, Mikroglia, Neuronen, Interneuronen und der Basalmembran (Abbildung 8).^{92,97,105,108} Dabei sind Perizyten mit den zellulären Fortsätzen der Astrozyten (Endfüßchen) sowie dem Endothel in der Basalmembran zusammen eingebettet.^{96,97}

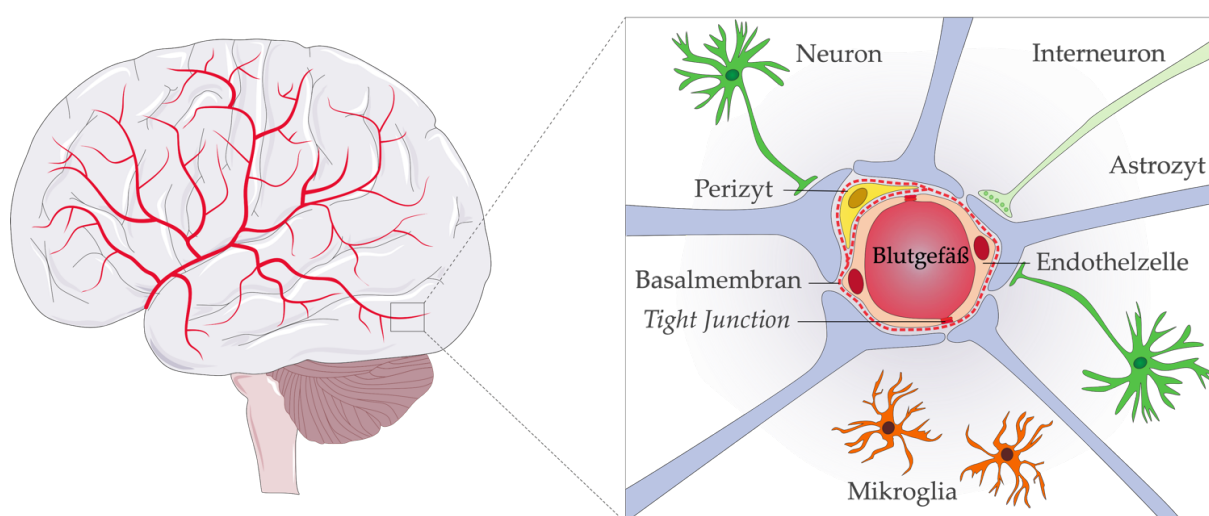


Abbildung 8: Schematischer Aufbau der NVU einschließlich der BBB im menschlichen Gehirn. Die Blutgefäß-bildenden Endothelzellen formen die BBB und teilen sich zugleich mit Perizyten und den Endfüßchen der Astrozyten eine Basalmembran. Zusammen mit Neuronen und Mikroglia bilden diese Komponenten die NVU (modifiziert nach van der Helm *et al.* und Zhou *et al.*).^{18,106}

Die Basalmembran hat eine Dicke von 50-100 nm und ist eine besondere Form der EZM, welche überwiegend als Stützmatrix von Endothel- sowie Epithelzellen fungiert.¹¹⁰⁻¹¹² Sie besteht hauptsächlich aus den vier Matrixproteinen Kollagen IV, Laminin, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykanen und trennt das vaskuläre vom umliegenden Gewebe.¹¹⁰⁻¹¹² Darüber

hinaus wird der Basalmembran ein signifikanter Einfluss in der Barrierefunktion der BBB zugeteilt.^{96,110,112}

Im Folgenden werden die einzelnen zellulären Komponenten der NVU näher beschrieben.

1.2.2.1 Perizyten

Perizyten sind flache langgestreckte kontraktile Zellen des Bindegewebes, welche das Blutgefäß-bildende Endothel abluminal ummanteln.^{96,108,113} So beträgt das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen im Gehirn 1:3-4 und ist damit höher als in peripheren Blutgefäßen (1:10).^{90,113,114} Dabei können Perizyten über ihre langen zytoplasmatischen sternförmigen Fortsätze durch *Adherens Junction* organisierte Adhäsionskontakte sowie mithilfe von *Peg-and-Socket*-Kontakten mit Endothelzellen zellulär interagieren.^{96,113} Darüber hinaus findet über sogenannte *Gap Junctions* ein Austausch von Metaboliten und Ionen zwischen den beiden Zelltypen statt.^{96,113} Diese enge zelluläre Wechselwirkung ermöglicht es den Perizyten die Proliferation, Viabilität, Migration sowie die Differenzierung von Endothelzellen zu regulieren.^{108,113} Darüber hinaus tragen Perizyten unter anderem durch Regulation der endothelialen Genexpression, Verringerung der Transzytose und durch Polarisation der Astrozytenendfüßchen zur Ausbildung sowie zur Aufrechterhaltung der Barriereintegrität der BBB bei.^{96,108,115-117} Auch in der Stabilisierung und Bildung neuer vaskulärer Blutgefäße (Angiogenese) spielen Perizyten eine wesentliche Rolle.^{108,96,113,115} Des Weiteren können Perizyten durch Expression kontraktiler Proteine den Durchmesser von zerebralen Blutgefäßen modulieren (Erweiterung des Blutgefäßes \triangleq Vasodilatation, Verengung des Blutgefäßes \triangleq Vasokonstriktion), um den Blutfluss an den Energiebedarf aktiver Neuronen anzupassen.^{108,113} Dieser Mechanismus wird durch vasoaktive Stoffe und entsprechenden Rezeptoren reguliert.¹⁰⁸

1.2.2.2 Astrozyten

Die sternförmigen Astrozyten gehören zu den häufigsten Zelltypen der Gliazellen und bedecken mehr als 99 % der Oberflächen von Blutkapillaren im ZNS.^{96,118,119} Neben den Perizyten beeinflussen Astrozyten den Phänotyp einzelner Endothelzellen und die damit verbundene Ausbildung, Aufrechterhaltung und Funktionalität der BBB.^{83,96,105} So konnte gezeigt werden, dass die enge zelluläre Interaktion mit Astrozyten die Expression essentieller *Tight Junctions* sowie verschiedener Transporter in Endothelzellen verstärkt.^{91,117,118} Neben dem Einfluss auf die Barriereintegrität der BBB gewährleisten Astrozyten eine korrekte Funktion und Signalweiterleitung von Neuronen.^{18,96,105,108,118} So interagieren Astrozyten im Durchschnitt mit über 2 Millionen neuronalen Synapsen im menschlichen Gehirn.¹²⁰ Astrozyten stellen damit eine dynamische Komponente der NVU dar, in der sie mit ihren Endfüßchen mit Neuronen, Perizyten, anderen Gliazellen sowie Endothelzellen vielseitig interagieren und diese beeinflussen.^{108,121} Daher werden Astrozyten auch als „Bindeglied“ der NVU bezeichnet.¹²¹ Die zelluläre Interaktion wird nicht nur auf physikalischer Ebene, sondern auch auf chemischer Ebene durch Sekretion von Gliotransmittern oder durch intrazelluläre Ca^{2+} -Ströme sichergestellt.^{108,117,121} Dabei sind Astrozyten in zellulären Netzwerken organisiert, welche hauptsächlich über *Gap Junctions*

kommunizieren.^{108,119,121} Diese strukturellen Netzwerke erlauben eine Übertragung verschiedener Signale über große Distanzen sowie eine schnelle Weiterleitung an Perizyten am vaskulären Blutgefäß.¹⁰⁸ Des Weiteren produzieren und sekretieren Astrozyten Substanzen wie Prostaglandine, ATP und Stickstoffmonoxide (NO), welche eine Vasodilatation oder Vasokonstriktion induzieren.^{108,121}

1.2.2.3 Mikroglia

Neben Astrozyten gehören auch Mikroglia zu den Gliazellen. Dabei stellen Mikroglia aus einer morphologischen Perspektive die kleinsten Vertreter der Gliazellen dar und bilden einen Anteil von ca. 5-12 % der Zellen im ZNS.^{96,118} Sie besitzen im nicht-aktivierten Zustand („*resting state*“) einen kleinen runden Zellkörper und können über ihre dünnen zellulären verzweigten Fortsätze sowie über sekretierte Faktoren mit anderen Zelltypen der NVU interagieren.^{96,122} Mikroglia zählen zu den residenten Makrophagen des ZNS und sind damit Teil der angeborenen Immunantwort.^{123,118,122,124} Als Komponente der NVU ist es ihre Aufgabe die BBB von Fremdkörpern und Zellfragmenten durch Phagozytose zu befreien.^{118,122} So besitzen Mikroglia spezifische Oberflächenrezeptoren zur Erkennung und Beseitigung von sowohl „Fremdartigem“ wie pathogene Krankheitserreger als auch „Nicht-Fremdartigem“ wie apoptotische Neuronen oder gestörte Synapsen.^{118,122} Außerdem spielen sie eine große Rolle in der Neurogenese, in der Regulierung der Barriereintegrität der BBB sowie in inflammatorischen Prozessen.^{96,118,122,124} Dabei werden inflammatorische Prozesse im Gehirn und Rückenmark als Neuroinflammation bezeichnet.^{125,126} Mikroglia können unter anderem durch Verletzungen, Stress sowie Infektionen aktiviert werden („*activate state*“).^{118,122} Dies resultiert in einer veränderten amöboiden-artigen Morphologie mit größerem Zellkörper sowie dickeren Zellfortsätzen.^{118,122} Eine Aktivierung der Mikroglia stellt dabei die erste inflammatorische Immunantwort im ZNS dar und führt zur Sekretion verschiedener Zytokine, Chemokine und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).^{96,118,127} Dies kann sich positiv oder negativ auf das ZNS auswirken.^{96,118,122,127} So kann zum einen durch eine Aktivierung der Mikroglia die Homöostase im Gewebe zum Schutz des ZNS aufrechterhalten werden. Zum anderen kann eine Überaktivierung der Mikroglia („*overactive state*“) in einer chronischen Neuroinflammation resultieren und damit zu Anomalien im Gewebe sowie zur Verstärkung der Pathogenese in degenerativen Erkrankungen wie Parkinson beitragen.^{96,118,122,127}

1.2.2.4 Neuronen

Das menschliche Gehirn verfügt über durchschnittlich 100 Milliarden Neuronen und ca. zehnmal so viele Gliazellen.¹²⁸ Die Morphologie der Neuronen ist im Vergleich zu anderen Zellen des menschlichen Körpers einzigartig, was ihnen ermöglicht ihrer speziellen Funktion im Gehirn nachzukommen.^{129,130} Die meisten Neuronen im menschlichen Körper (multipolare Neuronen) besitzen einen kugelförmigen Zellkörper (Soma oder Perikaryon), von dem ein langer dünner Zellfortsatz (Axon) und mehrere stark verzweigte kürzere zelluläre Fortsätze (Dendriten) ausgehen.^{107,130-133} Neuronen erhalten über Dendriten Signale anderer Neuronen, verarbeiten diese und leiten diese anschließend mithilfe ihrer Axone im neuronalen Netzwerk weiter.^{97,107,134}

Dendriten weisen eine Durchschnittslänge von 13,5 mm auf.¹³⁰ Dagegen erzielen Axone eine Länge von mehreren 100 cm und werden durch im Aktinkortex eingebettete dicht gepackte Mikrotubuli und Neurofilamente organisiert.^{107,130} Dadurch können Signale verschiedener Organe des gesamten menschlichen Körpers im ZNS empfangen und weiterverarbeitet werden.¹³⁴ Für eine schnellere Reizweiterleitung sind Axone mit einer dielektrischen Myelinscheide isoliert und stellen damit den größten Teil der weißen Substanz im menschlichen Gehirn dar.¹⁰⁷ *In vivo* agieren Neuronen in sehr dichten komplexen dynamischen Netzwerken.^{108,135} Die Kommunikation erfolgt dabei über ein Zusammenspiel aus elektrischen und chemischen Signalen.^{97,107,134} Des Weiteren erkennen Neuronen geringste Schwankungen in der Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr, wodurch sie elektrische und chemische Signale an benachbarte Interneurone oder Astrozyten durch zelluläre Interaktionen weiterleiten.¹⁰⁸ So können Neuronen indirekt über weitere Prozesse den Gefäßtonus beeinflussen und damit die Blutversorgung an ihren Bedarf anpassen.^{108,119,136} Des Weiteren spielen Neuronen in vielen degenerativen Erkrankungen sowie in der Ausbildung und Aufrechterhaltung des Barrierecharakters der BBB eine bedeutende Rolle.^{105,119,136} Letzteres wird durch eine Expression verschiedener *Tight Junctions* und eine dadurch verminderte vaskuläre Permeabilität induziert.¹⁰⁵

1.2.2.4.1 Reizweiterleitung und Synapsen

Eine korrekte Gehirnfunktion basiert auf der Kommunikation einzelner Neuronen unter Weiterleitung von Signalen.^{129,131} Die Grundlage dieser Reizweiterleitung bilden elektrische Impulse in Form von Aktionspotentialen, die eine schnelle Kommunikation zwischen einzelnen Neuronen ermöglichen.^{129,137,138} Die Signalweiterleitung erfolgt nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz, sodass das Signal erst bei Überschreitung eines Schwellenwertes übermittelt wird.^{129,137} Dabei findet die interneuronale Kommunikation hauptsächlich an den sogenannten Synapsen statt.^{129,137,138} *In vivo* weist ein Axon der Länge von ca. 200 cm eine Anzahl von ca. 50.000 Synapsen auf.¹³⁰ Diese können in chemische sowie elektrische Synapsen eingeteilt werden. Im menschlichen Gehirn sind neuronale Netzwerke über 15 bis 20 Billionen chemische und elektrische Synapsen verbunden und verfügen dadurch über eine enorme Rechenleistung. Bei einer Annahme einer Speicherkapazität von 5 Bits einer einzelnen chemischen Synapse würde die Speicherkapazität des menschlichen Gehirns bei etwa 1 Petabyte liegen.¹²⁰ So stellen chemische Synapsen den höheren Anteil in Vertebraten dar.^{129,139} Für eine Signalweiterleitung in chemischen Synapsen muss das Aktionspotential in der Präsynapse in ein chemisches Signal umgewandelt werden.^{129,140,141} Hierfür öffnen sich bei Ankunft des Aktionspotentials spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, was einen intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} induziert. Infolgedessen fusionieren synaptische Vesikel der Größe von 40-50 nm mit der präsynaptischen Membran (über Exozytose), wodurch eine Ausschüttung von chemischen Neurotransmittern in den synaptischen Spalt resultiert.^{129,139,142} Dabei stellt Glutamat den häufigsten exzitatorischen und γ -Aminobuttersäure als Gegenspieler den häufigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS dar.^{143,144} Die freigesetzten Neurotransmitter können im synaptischen Spalt an spezifische Rezeptoren der postsynaptischen Membran binden und eine Öffnung oder Schließung der Ionenkanäle erzielen.^{129,140} Folglich ändert

sich das Membranpotential der Postsynapse und unter Berücksichtigung des Alles-oder-Nichts-Gesetzes erfolgt eine Umwandlung in ein elektrisches Signal.¹²⁹ Eine schematische Darstellung der neuronalen Signalweiterleitung sowie einer chemischen Synapse ist in Abbildung 9 aufgeführt.

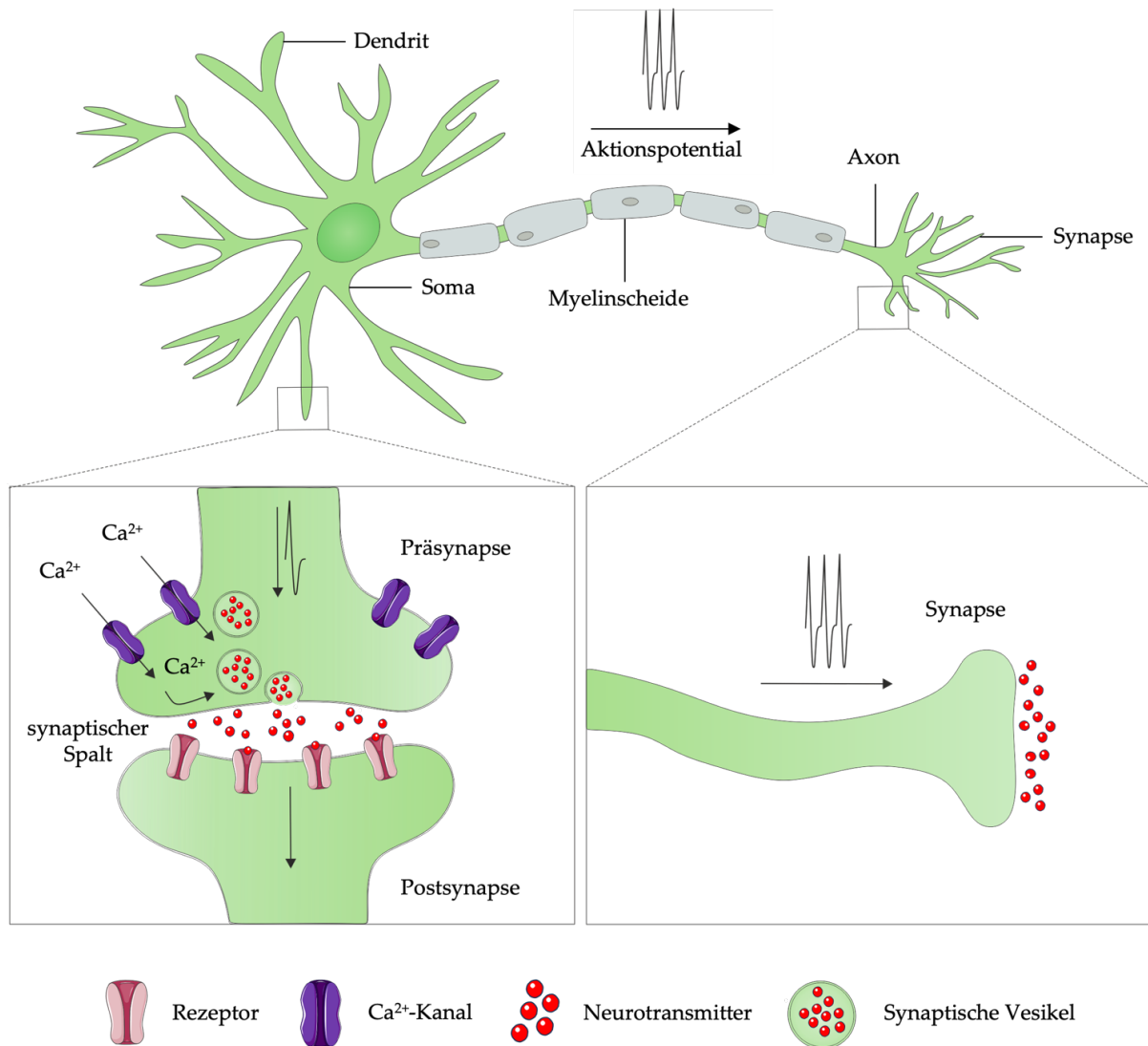


Abbildung 9: Schematische Darstellung der neuronalen Signalweiterleitung mithilfe von chemischen Synapsen. Ein präsynaptisches Signal öffnet spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle, welche eine Fusionierung von synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran induzieren. Durch Exozytose werden Neurotransmitter in den synaptischen Spalt freigesetzt. Eine Bindung der Neurotransmitter an den Rezeptor erzielt eine Schließung oder Öffnung von Ionenkanälen. Anschließend ermöglicht die Änderung des Membranpotentials eine Signalweiterleitung in der Postsynapse. Beim Überschreiten des Schwellenwerts wird ein Aktionspotential generiert, wodurch eine Signalweiterleitung an andere Neuronen über Synapsen des Axonterminals erfolgen kann (modifiziert nach Kourrich *et al.* und Pereda).^{129,142}

1.2.3 Das menschliche Auge und die retinale neurovaskuläre Einheit

Das menschliche Auge ist ein komplexes Sinnesorgan, welches eine visuelle Wahrnehmung von externen Umwelteinflüsse ermöglicht.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Der Verlust verursacht extreme Einschränkungen im alltäglichen Leben sowie tiefgreifende Veränderungen der menschlichen Psyche.¹⁴⁵ Infolgedessen kann das Auge als eines der wichtigsten Sinnesorgane im menschlichen Körper erachtet werden. Die visuellen Reize werden von einer 200 µm dicken Gewebsschicht, der Retina (Netzhaut), im hinteren Bereich des menschlichen Auges wahrgenommen und verarbeitet.^{146,147} Als Teil des ZNS verfügt die Retina über ca. 55 verschiedene Zelltypen, darunter auch eine Vielzahl an neuronalen Zellen.^{146,148,149} Dabei ermöglicht ein Zusammenspiel aus Photorezeptoren, Horizontalzellen, amakrinen Zellen, Ganglienzellen sowie Bipolarzellen, die Wahrnehmung von Lichtreizen und eine Weiterleitung entsprechender elektrischer Signale an das Gehirn.^{84,146,148} Für eine korrekte Funktion dieser Zellen ist die Versorgung mit essentiellen Nährstoffen, Ionen und Sauerstoff sowie der Schutz vor potentiell toxischen Xenobiotika aus dem Blutkreislauf maßgeblich.^{84,85,94} Diese Aufgaben bewerkstelligt die BRB, welche in die innere BRB (*inner BRB*, iBRB) sowie die äußere BRB (*outer BRB*, oBRB) unterteilt wird (Abbildung 10).^{85,102,150} Die oBRB wird durch eng benachbarte retinale Pigmentepithelzellen (RPE) gebildet und befindet sich zwischen dem neurosensorischen Bereich und der fenestrierten *Choriocapillaris*.^{85,102,150} So reguliert die oBRB den Stofftransport zwischen der *Choriocapillaris* und der umliegenden Photorezeptorschicht.^{85,150} Dagegen besitzt die iBRB eine ausgeprägtere Barrierefunktion und wird durch dicht benachbarte Endothelzellen in mikrovaskulären Blutgefäßen der inneren Retinaschichten geformt.^{84,85,102,150} Damit kontrolliert die iBRB den Stoffaustausch an den inneren retinalen Kapillaren und versorgt dabei zwei Drittel des retinalen Gewebes.^{84,85,150} Die iBRB bildet dabei eine wichtige Komponente der retinalen neurovaskulären Einheit (*Retinal neurovascular unit*, rNVU). Als funktionelle Einheiten des ZNS sind sich die NVU im Gehirn sowie die rNVU im Auge in den beteiligten Zelltypen sowie in ihrer Anatomie und Funktion sehr ähnlich.^{84,85,102} Neben einer Adaption des retinalen Blutflusses zur Versorgung des neuronalen Gewebes trägt die rNVU zur Entwicklung, Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barriereintegrität der iBRB bei.^{84,85} Analog zur NVU umfasst die rNVU einen eng interagierenden Zusammenschluss aus den Barriere-bildenden Endothelzellen, Perizyten, Neuronen, Mikroglia, Astrozyten und der Basalmembran.^{84,85,102, 121} Dabei übernehmen Zelltypen und Basalmembran in der rNVU ähnliche Funktionen wie deren entsprechende Komponenten in der NVU.^{85,102} So regulieren retinale kontraktile Perizyten durch analoge Mechanismen den Gefäßtonus der Blutkapillaren.^{84,121} Im Vergleich zum Gehirn (1:3-4) beträgt dabei das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen in der Retina 1:1.^{90,113,114} Wie auch in der NVU induzieren Perizyten sowie Astrozyten unter anderem die Genexpression wichtiger *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* in den retinalen Endothelzellen und verringern damit die vaskuläre Permeabilität.^{84,85,150} Des Weiteren schützen retinale Mikroglia als Bestandteil des angeborenen Immunsystems das Gewebe vor apoptotischen Zellen, Krankheitserregern und Schädigungen.^{122,149,151}

Eine weitere wichtige Komponente der rNVU sind die Müllerzellen. Müllerzellen repräsentieren 90 % der retinalen Gliazellen und überspannen die Retina radial von der äußeren bis zur inneren Grenze und stehen dabei mit nahezu jedem Zelltyp eng in Kontakt.^{121,122,152} Neben den Mikroglia üben sie einen Einfluss auf die Barriereintegrität der iBRB aus.^{84,122,152} Des Weiteren regulieren Müllerzellen den mikrovaskulären Blutfluss und damit die Versorgung des retinalen Gewebes mit Nährstoffen.^{121,122,152} Zudem wird ihnen neben den Astrozyten eine unterstützende Funktion neuronaler Zellen im retinalen Gewebe durch Hochregulierung von trophischen Faktoren sowie Antioxidantien zugeschrieben.^{121,122}

Trotz heutigem Wissensstand ist das Konzept der iBRB sowie der rNVU im Vergleich zum strukturellen Äquivalent im Gehirn relativ neu. So wurde die BBB bereits 1885 entdeckt und im Jahr 1918 als Barriere definiert. Dagegen erfolgte die Entdeckung der iBRB erst im Jahr 1947.⁸⁵ Infolgedessen ist die Charakterisierung der iBRB sowie der rNVU auf molekularer und zellulärer Ebene stets Gegenstand der heutigen Forschung.

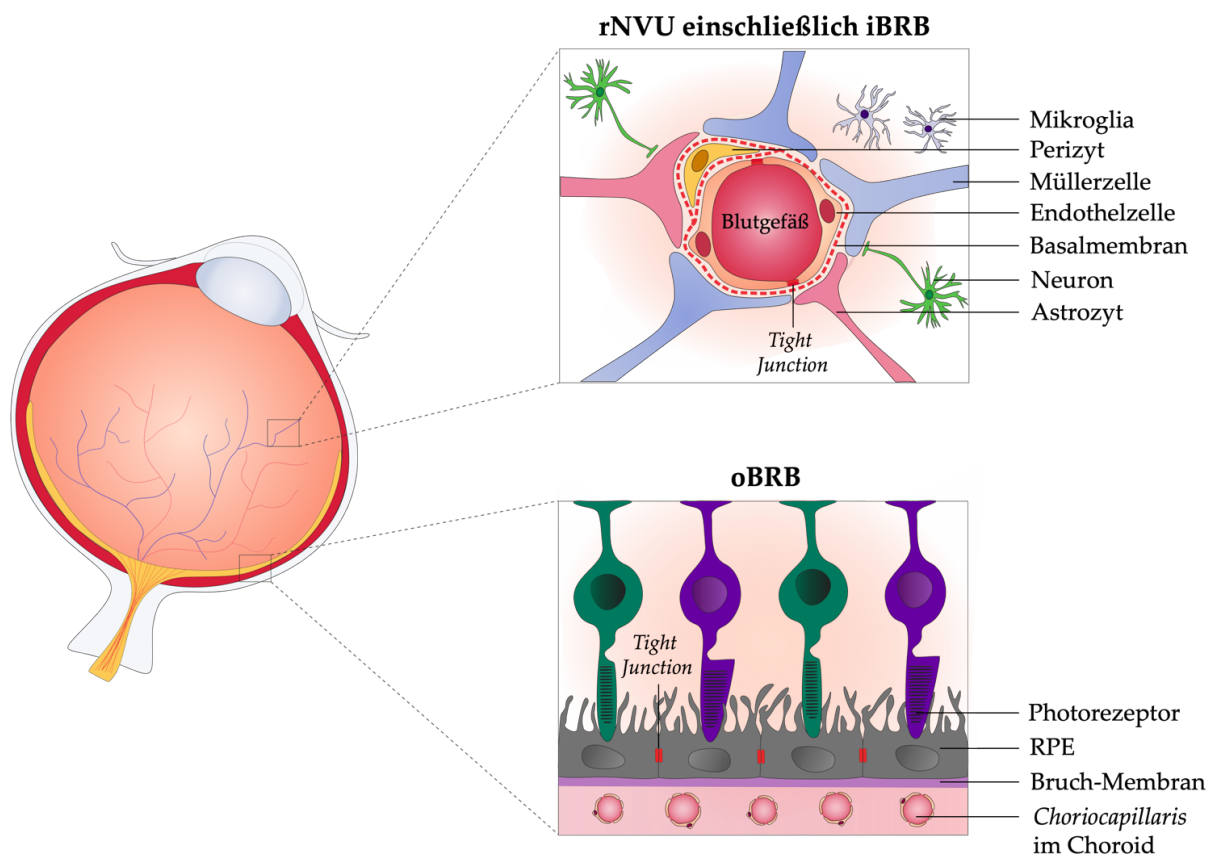


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der rNVU einschließlich der iBRB sowie der oBRB in der menschlichen Retina. Die Blutgefäß-bildenden Endothelzellen formen die iBRB und teilen sich mit Perizyten, den Endfüßchen der Astrozyten sowie den Müllerzellen die Basalmembran. Zusammen mit Neuronen und Mikroglia bilden diese Komponenten die rNVU. Die oBRB wird vom benachbarten RPE gebildet und reguliert den Stofftransport zwischen der fenestrierten *Choriocapillaris* und der Photorezeptorschicht (modifiziert nach Yang *et al.*).¹⁰²

1.3 Degenerative Erkrankungen

Degenerative Erkrankungen wie Parkinson im Gehirn sowie die durch Diabetes mellitus verursachte diabetische Retinopathie im Auge zeigen neben den typischen klinischen Merkmalen einen Ausfall der Barrierefunktion der BBB sowie der iBRB.^{85,153,154,155,156} Dabei verursachen chronische neuroinflammatorische Prozesse (Parkinson) oder die Hyperglykämie (Diabetes mellitus) eine erhöhte parazelluläre sowie transzelluläre Permeabilität in den Barriere-bildenden Endothelzellen.^{3,102,151} Ausschlaggebend ist die verminderte Expression essentieller *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* sowie die beeinträchtigte Funktion von spezifischen Transportern, insbesondere den Efflux-Pumpen.^{3,150} Durch den Verlust der Barrierefunktion der iBRB sowie der BBB kann eine definierte Mikroumgebung im Gewebe nicht aufrechterhalten und damit die korrekte Funktion einzelner Zellen nicht mehr gewährleistet werden.^{150,151,157} Dies resultiert in einer Verstärkung der pathologischen Merkmale.^{3,151}

1.3.1 Parkinson und Neuroinflammation

Parkinson wurde bereits im Jahr 1817 entdeckt und ist heutzutage die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung der Welt.^{3,158,159} Zu den pathologischen Kennzeichen gehören neben dem Ausfall der Barrierefunktion der BBB das chronische und progressive Absterben von Dopamin-bildenden Neuronen (dopaminerge Neuronen) in der Hirnregion *Substantia nigra pars compacta*.^{156,158,160,161} Überschreitet der Verlust der dopaminergen Neuronen einen Anteil von 80 %, entsteht ein irreversibler Dopaminmangel, welcher die charakteristischen primären motorischen Störungen verursacht.^{155,160,161} Neben motorischen Störungen treten ebenso nicht-motorische Störungen wie Depressionen, vegetativ-autonome Störungen, beispielsweise in der Verdauung, sowie kognitive Veränderungen auf.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Als Auslöser wird neben der Neurodegeneration von dopaminergen Neuronen eine divergierende Funktion der überlebenden Neuronen vermutet.³ Dabei ist die genaue Ursache sowie Entwicklung dieser Erkrankung bislang nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass mehrere konvergierende Mechanismen zur Pathogenese der heterogenen multifaktoriellen Erkrankung führen.^{3,8,156} Darunter zählen unter anderem eine mitochondriale Dysfunktion, oxidativer Stress, neurotoxische Substanzen in der Umwelt, genetische Prädispositionen, eine verstärkte Akkumulation des mutierten Proteins α -Synuclein (*Lewy bodies*) und epigenetische Faktoren.^{8,156,161} Ein weiteres Kennzeichen der Pathogenese in der Parkinson-Erkrankung ist die Neuroinflammation.^{155-157,165} Zahlreiche Studien konnten Zusammenhänge zwischen einer Neuroinflammation und Parkinson in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen nachweisen.^{125,127,157} Ob dabei die Neuroinflammation Folge oder Ursache der Erkrankung ist bleibt bislang ungeklärt.¹⁶⁰ Neben Parkinson finden neuroinflammatorische Vorgänge auch in weiteren neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Multipler Sklerose oder amyotropher Lateralsklerose statt.^{136,157} Infolgedessen ist die Neuroinflammation im Kontext von neurodegenerativen Erkrankung ein fester Bestandteil der aktuellen Forschung.^{136,155} Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass der neuroinflammatorische

Prozess in Parkinson neben einer Aktivierung von Mikroglia („*activated state*“) die Beteiligung von peripheren Immunzellen aus dem Blutgefäß umfasst.^{155,165,166} Prinzipiell wird eine Aktivierung der Mikroglia sowie eine Neuroinflammation durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ , Chemokine und ROS induziert.^{125,155,167} Dabei führt eine Überaktivierung der Mikroglia („*overactivated state*“) zu einer erhöhten Produktion und Sekretion der pro-inflammatorischen Faktoren und damit zur pathologischen Neuroinflammation, welche das Absterben dopaminerger Neuronen induziert.^{96,118,122,127,154} Auch Astrozyten tragen durch Sekretion verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren zur Förderung der neuronalen Inflammation bei.^{125,155,165} Jedoch ist der genaue Auslöser zur Überaktivierung der Mikroglia sowie die komplexen molekularen Zusammenhänge zwischen der Neuroinflammation und der Degeneration dopaminerger Neuronen weitgehend unbekannt.^{155,165} Darüber hinaus korreliert die Neuroinflammation mit einem Funktionsverlust der BBB, wodurch die Barriere permeable Eigenschaften aufweist.^{153, 154,156} Dies ermöglicht eine Penetration pro-inflammatorischer Zytokine sowie Immunzellen (T-Lymphozyten und Monozyten) aus dem peripheren Blutgefäß, welche eine Aktivierung weiterer Mikroglia induzieren (Abbildung 11).^{125,155,157,161} Dadurch entsteht ein sich selbst beschleunigender Prozess, was in einer chronischen neuronalen Inflammation und einer damit korrespondierenden Neurodegeneration resultiert.¹⁵⁴

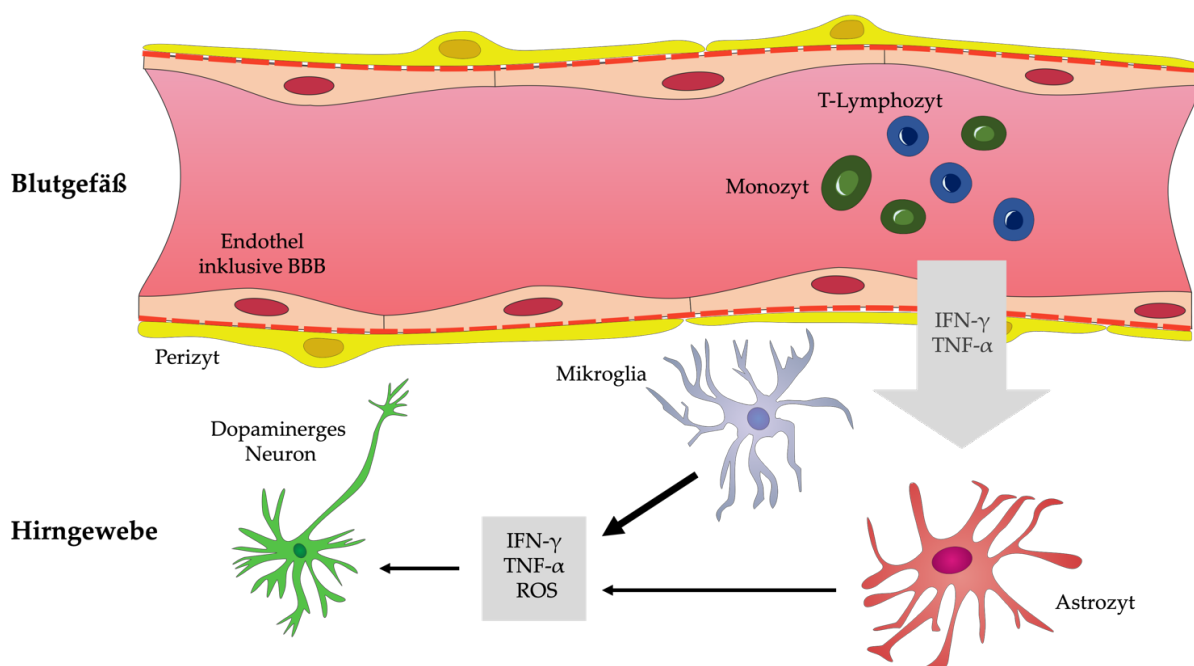


Abbildung 11: Vereinfachte Darstellung der chronischen Neuroinflammation in der Substantia nigra pars compacta. Eine Überaktivierung der Mikroglia führt zu einer erhöhten Produktion und Sekretion von pro-inflammatorischen Faktoren wie IFN- γ , TNF- α oder ROS. Dies bewirkt unter anderem eine chronische Neuroinflammation und damit die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta. Des Weiteren induziert die chronische Neuroinflammation den Barriereverlust der BBB sowie die Rekrutierung von peripheren Immunzellen aus dem Blutgefäß (modifiziert nach Nolan *et al.*).¹⁶¹

Grundlegend trägt die Neuroinflammation auch zu positiven Aspekten wie der Wiederherstellung und Aufrechterhaltung der Hirnhomöostase bei.¹²⁵ Jedoch sind die positiven Effekte während der chronischen Neuroinflammation in Parkinson unzureichend oder gar unwirksam, was letztendlich zu einer Verschlechterung der klinischen Merkmale führt.^{125,156}

1.3.2 Diabetische Retinopathie

86 % aller Typ 1 und 40,3 % aller Typ 2 Diabetiker zeigen nach 10 Jahren chronischer Diabetes mellitus erste Anzeichen einer diabetischen Retinopathie.^{4,151} Die diabetische Retinopathie ist eine der häufigsten Ursachen für eine Erblindung bei Menschen in der westlichen Zivilisation und ist bis heute nicht heilbar.^{102,113,151} So beträgt der Anteil der Typ 1 Diabetiker 42 % und der Typ 2 Diabetiker 8,2 %, welche im Verlauf der Erkrankung Beeinträchtigungen im Sehvermögen entwickeln.¹⁵¹ Die diabetische Retinopathie ist eine multifaktorielle, mikrovaskuläre komplexe Erkrankung, die durch einen erhöhten Blutzucker (Hyperglykämie) verursacht wird.^{151,168,169} Dabei wird in eine nicht-proliferative (Anfangsstadium) und proliferative (Fortgeschrittenes Stadium) diabetische Retinopathie unterteilt.^{4,169,170} Durch die Hyperglykämie werden im retinalen Gewebe oxidativer Stress, eine Inflammation, eine neuronale Dysfunktion und eine Akkumulation von Glykationsendprodukten (*Advanced glycation end products*, AGEs) induziert.^{102,151} Letztendlich entwickelt sich eine vaskuläre Dysfunktion in den retinalen mikrovaskulären Blutgefäßen.^{113,151} Dabei ist eines der frühesten pathologischen Anzeichen eine Anomalie der Basalmembran sowie eine Degeneration der um die Blutgefäße liegenden Perizyten.^{113,151} Des Weiteren resultiert aus der vaskulären Dysfunktion ein Ausfall der Barrierefunktion in der iBRB und eine damit korrespondierende erhöhte vaskuläre Permeabilität aufgrund verminderter Expression essentieller *Tight Junctions*.^{85,94,151} Die vaskuläre Permeabilität der iBRB ist dabei für eine Progression der diabetischen Retinopathie entscheidend.^{85,168} Zahlreiche Untersuchungen konnten belegen, dass die Degeneration von Perizyten die Läsion der iBRB sowie eine Bildung von azellulären Kapillaren zusätzlich begünstigt.^{85,113,151} Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler sind sich allerdings über die genauen Zusammenhänge zwischen dem Barriereausfall der iBRB und dem Verlust von Perizyten uneinig.^{85,102} Daneben tragen auch Gliazellen (Mikroglia, Astrozyten und Müllerzellen) durch inflammatorische Prozesse sowie Sekretion pro-angiogener Wachstumsfaktoren zur Läsion der iBRB in der diabetischen Retinopathie bei.^{102,151,171,172} Auch neurodegenerative Prozesse konnten in Patienten der diabetischen Retinopathie untersucht werden.^{102,168,169} Neben dem Verlust der Perizyten sowie der Barrierefunktion treten in der nicht-proliferativen diabetischen Retinopathie weitere pathologische Merkmale wie Vasodilatation, Blutungen, Mikroaneurysmen und Ischämie auf.^{85,102,113,151} Charakteristisch sind dabei die sogenannten „Cotton-Wool-Herde“, welche fokale Infarkte von Nervenfasern im retinalen Gewebe darstellen.^{4,102,170} Unbehandelt kann eine proliferative diabetische Retinopathie resultieren. Hierbei treten schwerwiegende strukturelle Veränderungen, wie Makulaödeme oder proliferative Neovaskularisationen (Angiogenese) auf, was in einer Ablösung der Retina und damit in irreversiblen schweren Sehstörungen und Erblindung

resultiert.^{4,102,113,151} Die Auswirkungen der diabetischen Retinopathie im menschlichen Auge sind in Abbildung 12 aufgeführt.

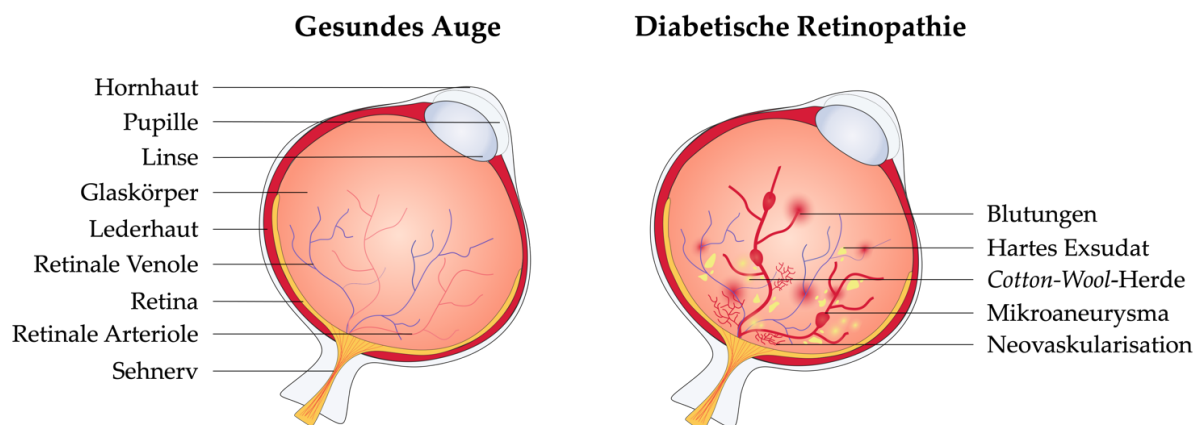


Abbildung 12: Schematische Darstellung der diabetischen Retinopathie im menschlichen Auge. Die diabetische Retinopathie wird durch die Hyperglykämie von Diabetes mellitus verursacht. Dies resultiert in einer vaskulären Dysfunktion sowie vaskulären Permeabilität, was eine Degeneration des retinalen Gewebes induziert. Begleitet wird die Erkrankung durch Blutungen, Mikroaneurysmen und den charakteristischen „Cotton-Wool-Herden“. Unbehandelt führt die diabetische Retinopathie zu Makulaödemen und einer Neovaskularisation, was schlussendlich bei Patienten zu starken Sehbeeinträchtigungen bis hin zur Blindheit führen kann (modifiziert nach Sinha *et al.*).¹⁷³

1.4 *In vitro* Rekonstruktion der rNVU und NVU

In der Literatur wurden bereits zahlreiche *in vitro* BBB-/NVU- und iBRB-/rNVU-Modelle beschrieben. Die meisten dieser Modelle basieren jedoch auf statischen Transwell-Systemen, welche physiologische Faktoren wie den Blutfluss nicht berücksichtigen.^{18,105,171,174} Daher hat in den letzten Jahren die Anzahl der etablierten Modelle in *Organ-on-a-chip* Systemen zugenommen.^{49,105} Hierbei unterscheiden sich die entwickelten *Organ-on-a-chip* Systeme in ihrer Geometrie, Mikrofluidik sowie in den verwendeten Materialien.⁴⁸ So basieren diese häufig auf rektangulären Kanalsystemen und spiegeln damit nicht die *in vivo* Form der runden Blutgefäße wider.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ Des Weiteren fehlt es den Modellen oftmals an Zelltypen der rNVU/NVU sowie an einer physiologischen Dreidimensionalität.^{105,178-181} Ebenso werden in einigen Fällen auch Zellen nicht-menschlichen Ursprungs verwendet.^{182,183} Neben den bedenklichen ethischen Aspekten sind diese Modelle für den Menschen nicht hinreichend repräsentativ.^{18,105} Erfolgreiche Barriere-Modelle mit den gestellten Anforderungen wurden bis heute noch nicht entwickelt und könnten zukünftig zur effizienteren Wirkstofftestung von Medikamenten sowie zu neuen Behandlungsmöglichkeiten von Parkinson oder der diabetischen Retinopathie führen.^{105,184}

2 Zielsetzung

Zur notwendigen Erforschung der beiden degenerativen Erkrankungen Parkinson und diabetischer Retinopathie war das Ziel der vorliegenden Arbeit die *in vitro* Rekonstruktion der rNVU sowie der NVU. Für eine möglichst exakte Abbildung der physiologischen Bedingungen in der Retina und im Gehirn sollten anhand der *Organ-on-a-chip* Technologie naturgetreue vaskularisierte *in vitro* Modelle auf Basis humaner Zellen entwickelt werden (Abbildung 13). Hierbei war das Ziel, ein dichtes Endothel mit einer ausgeprägten Barrierefunktion sowie weitere Zelltypen der NVU beziehungsweise rNVU unter Verwendung herkömmlicher Zellkulturstrategie und diverser Stammzelltechnologien zu integrieren. Um dabei eine dreidimensionale gewebeartige Anordnung von zellulären Netzwerken zu ermöglichen, sollten verschiedene Hydrogele als EZM-imitierende Stützmatrix unter anderem in Kombination mit dem *3D-Bioprinting* untersucht werden. Im letzten Schritt sollte die Evaluation der etablierten Modelle hinsichtlich ihrer Eignung als Krankheitsmodell sowie als Testmodell für therapeutische Wirkstoffe für Parkinson und der diabetischen Retinopathie erfolgen.

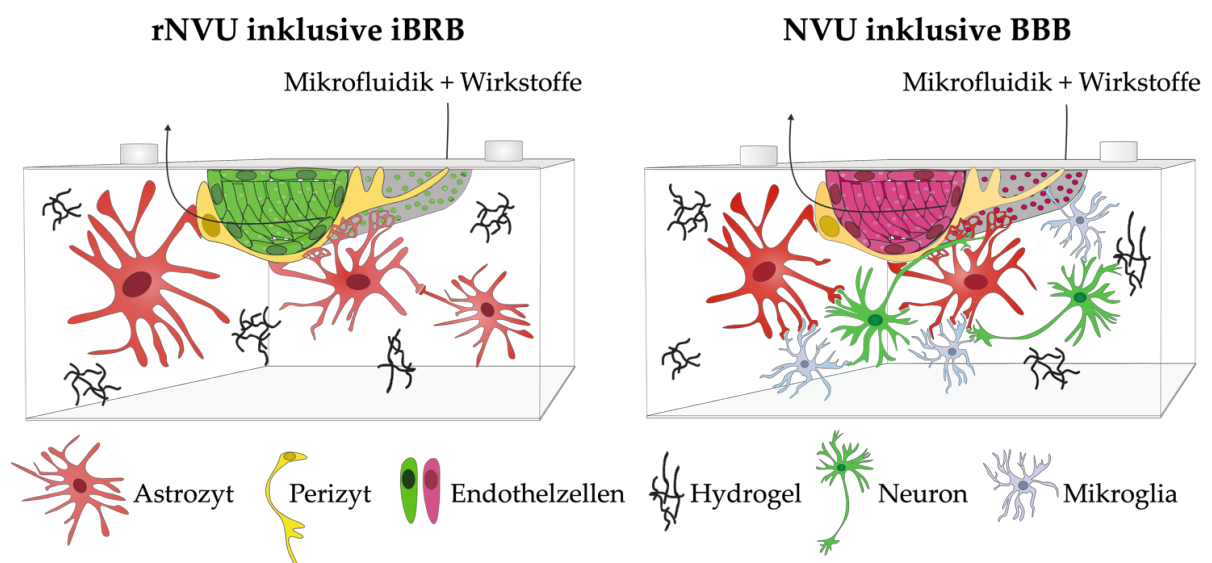


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der iBRB/rNVU- beziehungsweise BBB/NVU-Modelle im Organ-on-a-chip System. Retinale sowie zerebrale Endothelzellen kleiden den porösen halbrunden Mikrokanal aus, während in das umgebende Kompartiment gewebespezifische Zellen aus der Retina oder dem Gehirn in einem Hydrogel eingebettet werden. Der Anschluss an eine Mikrofluidik simuliert einen artifiziellen Blutstrom, vaskularisiert das Modell und versorgt die Zellen mit Nährstoffen. Nach erfolgter Etablierung der beiden Kokultur-Modelle sollten Krankheitsmodelle von Parkinson und der diabetischen Retinopathie integriert sowie potentielle therapeutische Wirkstoffe untersucht werden (modifiziert nach Kappings).⁴⁰

3 Ergebnisse und Diskussion

Die iBRB und BBB weisen, wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, ein sehr dichtes kontinuierliches Endothel auf und gehören zu den wichtigsten Barrieren des menschlichen Körpers. Für eine Rekonstruktion der beiden Barriere-Modelle wurde das in der Arbeitsgruppe Schepers am KIT entwickelte *Organ-on-a-chip* System vasQchip verwendet (Kapitel 1.1.3).^{72,74} Die halbrunde Form des Mikrokanals ermöglichte dabei eine *in vivo* ähnliche geometrische Anordnung der Endothelzellen. Der Anschluss an eine Mikrofluidik erlaubte die Erzeugung eines artifiziellen Blutstroms sowie daraus resultierende Scherkräfte, welche die *in vivo* Gegebenheiten eines natürlichen Blutgefäßes abbilden. Um eine korrekte Funktion, Ausbildung und Aufrechterhaltung der BBB und iBRB sicherzustellen, wurde neben der Rekonstruktion des Endothels auch die natürliche Umgebung der Barriere im Modell hergestellt. Dabei wurden weitere Zelltypen der rNVU im Auge sowie der NVU im Gehirn im umgebenden Kompartiment des vasQchips integriert. Die poröse Membran des Kanals erlaubte hierbei einen Zellkontakt und Nährstoffaustausch zwischen den Endothelzellen im Mikrokanal und den gewebespezifischen Zellen im Kompartiment.

3.1 Retinale neurovaskuläre Einheit

Für eine Rekonstruktion der rNVU sollte zunächst das iBRB-Endothel etabliert und charakterisiert werden. Hierbei war es von Bedeutung, *in vitro* ein sehr dichtes Endothel zu realisieren, welches den *in vivo* Eigenschaften der iBRB nachkommen kann. Anschließend wurden weitere Zelltypen der rNVU in Kokultur eingebracht, um eine korrekte Funktion und Ausbildung der Barrierefunktion der iBRB zu gewährleisten. Im letzten Schritt sollte das etablierte Barriere-Modell so verändert werden, dass es das Krankheitsbild der diabetischen Retinopathie abbilden kann.

3.1.1 Etablierung eines iBRB-Endothels im vasQchip

Zur Etablierung eines dichten retinalen Endothels im vasQchip war es notwendig, Zellen zu verwenden, die den spezifischen Anforderungen nachkommen und in der Lage sind die Eigenschaften der physiologisch dichten retinalen Barriere (iBRB) abzubilden. Hierzu zählt unter anderem die Expression verschiedener *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* sowie essentieller Transporter. Darüber hinaus sollten die Zellen fähig sein, die in der Literatur beschriebenen Effekte der diabetischen Retinopathie abbilden zu können. Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (HRMVEC) sind primäre Zellen aus der menschlichen Retina und besitzen *in vitro* eine dichte Barrierefunktion.^{185,186} Darüber hinaus wurden HRMVEC bereits in verschiedenen Untersuchungen zur Modellierung der diabetischen Retinopathie eingesetzt.^{185,187,188} Infolgedessen wurden HRMVEC im Rahmen dieser Arbeit zur *in vitro* Rekonstruktion der iBRB verwendet.

Hierfür wurden im Folgenden geeignete Kultivierungsbedingungen wie Beschichtung, Zellzahl und Flussgeschwindigkeit untersucht.

3.1.1.1 Untersuchung einer geeigneten Beschichtung

Der poröse Mikrokanal des vasQchips besteht aus einer PC-Membran. Diese zeichnet sich durch Eigenschaften wie Transparenz, Biokompatibilität und eine hohe Festigkeit aus, was ihren häufigen kommerziellen Einsatz als Zellkultivierungsmaterial bedingt. Der Vorteil hierbei ist, dass durch Ionenbeschuss und anschließendem Ätzverfahren unterschiedliche Porengrößen bei der Fertigung eingebracht werden können.¹⁸⁹ Um das Anwachsen von Zellen auf einer PC-Membran sicherzustellen, wird häufig eine Beschichtung mit Matrixproteinen verwendet. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion von Endothelzellen auf einem beschichteten Kultivierungsmaterial um den Faktor 2,5 im Vergleich zum unbeschichteten Material erhöht wird.¹⁹⁰ Neben einer Zelladhäsion soll die Beschichtung auch zur Ausbildung einer dichten Barriere beitragen. In einigen Untersuchungen wurde umfangreich belegt, dass die Wahl einer geeigneten Beschichtung die Barriereintegrität von Endothelzellen fördert.^{150,190,191} Daher wurden im Folgenden verschiedene Matrixproteine hinsichtlich ihrer Eignung für eine erfolgreiche Adhäsion sowie der Ausbildung einer dichten Barrierefunktion der HRMVEC untersucht. Hierfür wurden die Matrixproteine Fibronectin, Vitronectin, Kollagen I, Laminin und Gelatine verwendet. Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Kollagen I sind der EZM zugehörig. Somit fördern diese Proteine eine Zelladhäsion durch spezifische Zell-Matrix-Interaktionen.¹⁹¹ Gemäß dem Hersteller wird zur Kultivierung der HRMVEC eine Beschichtung mit Fibronectin empfohlen.¹⁹² Fibronectin ist ein Glykoprotein, welches durch Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenzen (RGD) in der Lage ist, mit Zellen über Integrin-Rezeptoren zu interagieren.¹⁹³ Dies ermöglicht eine Adhäsion der Zellen an der Matrix.¹⁹⁴ Neben Fibronectin finden das Glykoprotein Laminin sowie das fibrilläre Protein Kollagen I häufig Verwendung in der Beschichtung von Kultivierungsmaterialien.^{195,196} Vitronectin ist ein 75 kDa schweres Glykoprotein und verfügt, wie Fibronectin, über zahlreiche RGD-Domänen. Dagegen wird Gelatine als Hydrolyseprodukt von Kollagen in der Forschung häufig als günstige und nachhaltige Alternative zum teuren Kollagen verwendet, da die Gewinnung aus Schlachtabfällen sehr kosteneffizient ist.⁶⁴

In den folgenden Versuchen wurde die Adhäsion, Morphologie, Konfluenz sowie die Genexpression spezifischer Barriere-Marker der HRMVEC auf den verschiedenen Matrixproteinen untersucht. Die Versuche erfolgten zunächst unter statischen zweidimensionalen Bedingungen.

3.1.1.1.1 Adhäsion, Morphologie und Konfluenz

Um die Adhäsion, Morphologie sowie die Konfluenz der Zellen mikroskopisch zu untersuchen, wurden GFP (*Green fluorescent protein*)-HRMVEC verwendet. GFP-HRMVEC sind in der Lage im Zytosol GFP zu exprimieren. Hierbei wurde das GFP mithilfe einer lentiviralen Transfektion in das Genom der HRMVEC eingebracht.¹⁹⁷ Dies hat den Vorteil, dass eine mikroskopische Visualisierung der lebenden Zellen ohne zusätzliche Färbung ermöglicht wird.

Für diesen Versuch wurden die Wells einer 24-Well-Platte mit einem biokompatiblen Klebering und einer noch unporösen PC-Membran versehen. Diese wurden anschließend mit

unterschiedlichen Konzentrationen der Matrixproteine beschichtet. Hierfür wurde 1 mg/ml Fibronectin, 0,1 mg/ml Kollagen I, 1 mg/ml Gelatine, 5 µg/ml Vitronectin sowie 1 mg/ml Laminin eingesetzt. Da in der Literatur unterschiedliche Konzentrationen der Matrixproteine verwendet werden, wurden die vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen verwendet. Zudem konnte Dr. R. Pfister in ihrer Arbeit zeigen, dass für eine Adhäsion von zerebralen Endothelzellen nicht die Konzentration, sondern das Matrixprotein selbst entscheidend ist.¹⁹⁸ Nach erfolgter Beschichtung der PC-Membran wurden GFP-HRMVEC ausgesät. Dabei wurden als Kontrolle GFP-HRMVEC in Wells ohne Klebering und PC-Membran eingebracht. Anschließend wurden die Zellen an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 mikroskopisch visualisiert. Für eine Besiedlung im Mikrokanal des vasQchips sollte die Adhäsion der HRMVEC nach 3 h sichergestellt sein, um das Abtragen der Zellen im Mikrokanal durch das Anlegen eines Flusses zu verhindern. Aus diesem Grund erfolgte eine zusätzliche mikroskopische Überprüfung der Adhäsion der GFP-HRMVEC 3 h nach ihrer Einbringung. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der HRMVEC hat. So wies das Wachstum der HRMVEC auf den Beschichtungen Vitronectin und Fibronectin die höchste Konfluenz über den Zeitraum von 7 Tagen auf. Bereits nach 3 h konnte eine Adhäsion der GFP-HRMVEC sowie die Ausbildung der zelltypischen Morphologie auf beiden Beschichtungen festgestellt werden. Verglichen mit der Kontrolle erzielten die Zellen auf den mit Fibronectin und Vitronectin beschichteten PC-Membranen eine ähnliche Konfluenz. Eine Kultivierung auf Kollagen I ermöglichte ebenfalls nach 3 h eine schnelle, konfluente Adhäsion der GFP-HRMVEC unter Ausbildung der charakteristischen Endothelzell-Morphologie. Jedoch konnte hierbei nach 7 Tagen kein konfluentes Endothel nachgewiesen werden, wodurch Kollagen I als Beschichtung für eine Langzeitkultivierung für GFP-HRMVEC nicht geeignet ist. Dagegen zeigte eine Kultivierung auf Gelatine und Laminin keine signifikante unterstützende Funktion zur Adhäsion der GFP-HRMVEC.

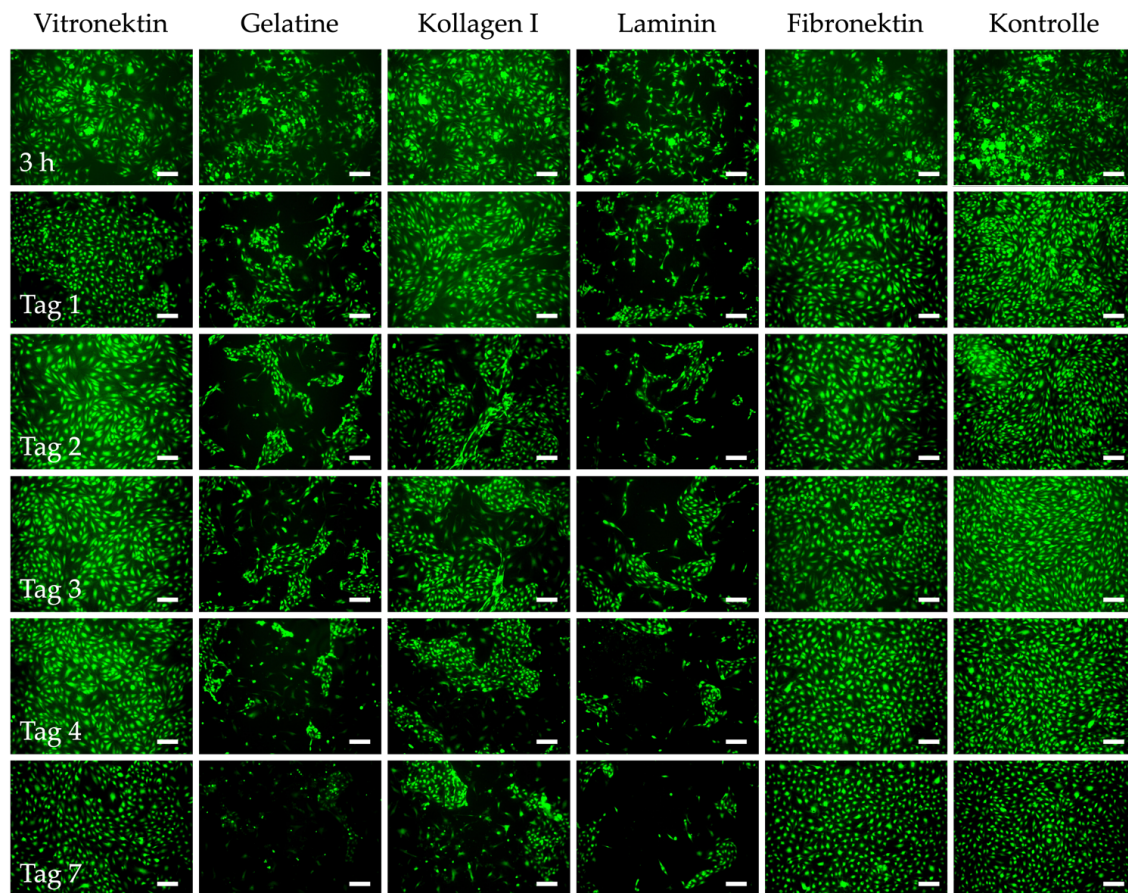


Abbildung 14: Wachstum von GFP-HRMVEC auf unterschiedlich beschichteten PC-Membran über einen Zeitraum von 7 Tagen. Zur Beschichtung der PC-Membran wurde jeweils 1 mg/ml Fibronectin, 0,1 mg/ml Kollagen I, 1 mg/ml Gelatine, 5 µg/ml Vitronectin sowie 1 mg/ml Laminin in einem Volumen von jeweils 400 µl eingesetzt. Zur Kontrolle wurden unbeschichtete Wells einer 24-Well-Platte (ohne PC-Membran) verwendet. Anschließend wurden $6 \cdot 10^4$ GFP-HRMVEC in EGM-2 ausgesät und an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 sowie 3 h nach dem Einbringen mikroskopisch visualisiert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt (inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED). Der Maßstabsbalken entspricht 75 µm.

3.1.1.1.2 Expression spezifischer Marker

Zur Wahl einer geeigneten Beschichtung ist neben der Adhäsion, Morphologie und Konfluenz die Ausbildung einer dichten Barriere maßgeblich. Diese Barriere resultiert unter anderem durch ein strukturelles und interagierendes Netzwerk aus *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen. Daher wurde im Folgenden die Expression dieser essentiellen Barriere-Proteine in den HRMVEC auf unterschiedlich beschichteten PC-Membranen untersucht. Bereits in der Literatur wurde die Expression dieser Marker in HRMVEC ausführlich beschrieben.^{85,199} Für die Expressionsanalyse wurden die *Tight Junction-* und *Adherens Junction-*Proteine ZO-1, VE-Cadherin, Occludin sowie das *Junction-*assoziierte Protein CD31 gewählt. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, sind die Transmembranproteine Occludin, VE-Cadherin und CD31 sowie ZO-1 für eine korrekte Barrierefunktion entscheidend.⁹⁷ Ebenso führt der Verlust dieser Barriere-Marker zu Störungen in der Barrierefunktion der iBRB.^{200,99,201}

Um den Einfluss von Gelatine, Vitronektin, Kollagen I, Laminin und Fibronektin auf die Expression der Barriere-Marker in HRMVEC zu untersuchen, wurde der Versuch, wie in Kapitel 3.1.1.1.1 beschrieben, durchgeführt. In Abwandlung zu Kapitel 3.1.1.1.1 wurden HRMVEC ohne GFP-Reporter gen verwendet. Als Kontrolle wurden HRMVEC ohne Verwendung einer PC-Membran und Beschichtung kultiviert. Nach 7 Tagen konnte die mRNA (*messenger Ribonucleic acid*) der HRMVEC isoliert, die vorhandene genomische DNA mithilfe einer DNase verdaut und anschließend in cDNA (*complementary Desoxyribonucleic acid*) mithilfe einer reversen Transkriptase transkribiert werden. Unter Verwendung der farbstoffbasierten RT-qPCR (*Real Time quantitative Polymerase chain reaction*) wurde die Expression der cDNA quantifiziert. Dabei diente das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mithilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auf die Kontrolle normiert. Die relative Expression der verschiedenen Proteine in Abhängigkeit der Beschichtung ist in Abbildung 15 aufgeführt.

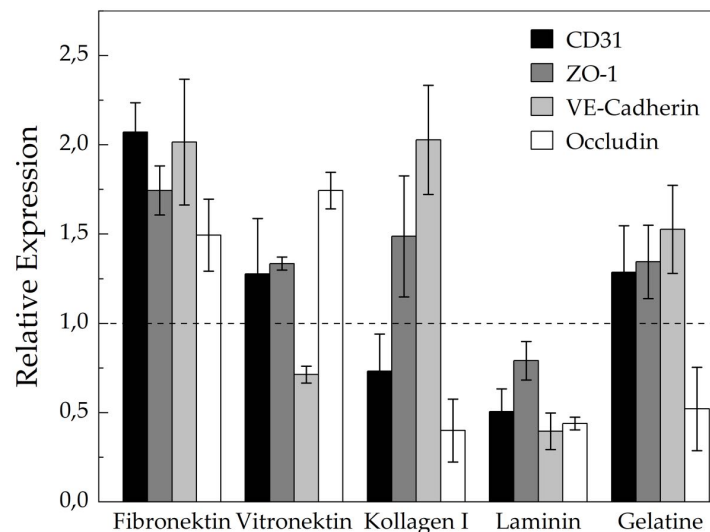


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von HRMVEC auf unterschiedlich beschichteten PC-Membranen. Zur Beschichtung der PC-Membran wurde jeweils 1 mg/ml Fibronektin, 0,1 mg/ml Kollagen I, 1 mg/ml Gelatine, 5 $\mu\text{g/ml}$ Vitronektin sowie 1 mg/ml Laminin in einem Volumen von jeweils 400 μl verwendet. Daraufhin wurden $6 \cdot 10^4$ HRMVEC in EGM-2 ausgesät. Zur Kontrolle wurden HRMVEC ohne Beschichtung und PC-Membran kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen erfolgte eine Isolierung der RNA und eine Transkription in cDNA. Mithilfe einer RT-qPCR konnte die relative Expression von CD31, ZO-1, VE-Cadherin und Occludin untersucht werden. Die Ergebnisse wurden durch Verwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Als Referenzgen fungierte GAPDH. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Beschichtungen einen signifikanten Einfluss auf die Expression der spezifischen Barriere-Proteine ausüben. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine erhöhte Expression der untersuchten Proteine durch Kultivierung auf der Fibronektin-Beschichtung detektiert. So konnte für CD31 mit $2,07 \pm 0,16$, für ZO-1 mit $1,74 \pm 0,14$ für Occludin mit $1,49 \pm 0,20$ und für VE-Cadherin mit $2,01 \pm 0,35$ eine Hochregulation ermittelt werden. Währenddessen

erzielte eine Kultivierung auf den Beschichtungen Vitronektin und Gelatine eine Hochregulation von drei der untersuchten Barriere-Marker. Dabei war die Expression der Proteine VE-Cadherin ($0,71 \pm 0,04$) auf einer Vitronektin-Beschichtung sowie Occludin ($0,52 \pm 0,23$) auf einer Gelatine-Beschichtung vermindert. Hingegen erzielte eine Beschichtung mit Kollagen I eine erniedrigte Expression von CD31 ($0,76 \pm 0,20$) und Occludin ($0,40 \pm 0,17$). Eine Beschichtung mit Laminin resultierte in einer geringeren Expression aller ausgewählter Proteine.

Anhand der Genexpressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass eine Beschichtung mit Fibronektin, im Vergleich zu anderen Beschichtungen, eine erhöhte Expression von CD31, VE-Cadherin, ZO-1 sowie Occludin in HRMVEC erzielte. Um dies genauer zu überprüfen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Marker ZO-1 und VE-Cadherin sowie eine Färbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC durchgeführt. Immunfluoreszenzfärbungen werden häufig zum Nachweis zelltypischer Strukturen oder zur Identifizierung verschiedener Zelltypen in einer Kokultur mithilfe von Antikörpern verwendet. Hierfür wurden HRMVEC auf einer mit Fibronektin beschichteten PC-Membran im Well eines μ -Slide 8 Wells ausgesät. Zur Kontrolle wurden HRMVEC ohne Verwendung einer PC-Membran eingebracht. Nach einer siebentägigen Kultivierung wurden die Zellen für eine immunhistochemische Färbung mit 4 % PFA fixiert, mit 0,1 % Triton-X permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen mit CasBlock™ blockiert. Anschließend erfolgte eine Antikörperfärbung zur Visualisierung von ZO-1 und VE-Cadherin. Zusätzlich wurden die Zellkerne mithilfe von Hoechst33342 gefärbt. Daraufhin wurden die Proben durch inverse Konfokalmikroskopie visualisiert (Abbildung 16).

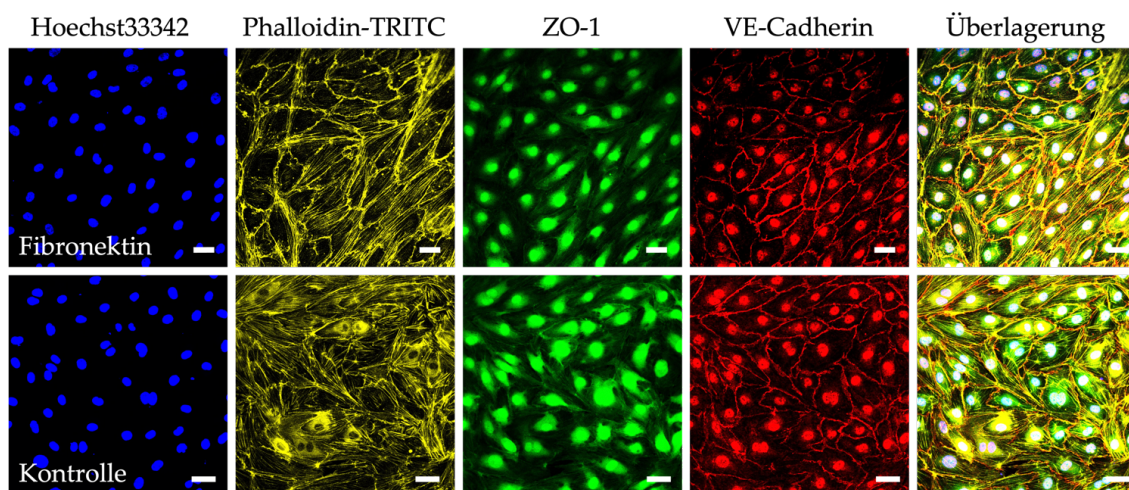


Abbildung 16: Visualisierung zelltypischer Strukturen in HRMVEC. PC-Membranen wurden in μ -Slide 8 Wells mit 1 mg/ml Fibronektin beschichtet und mit $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in EGM-2 besiedelt. Zur Kontrolle wurden unbeschichtete Wells ohne PC-Membran verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die spezifischen Zellstrukturen mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung und Phalloidin-TRITC sowie Hoechst33342 visualisiert. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Gelb: Detektion des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-TRITC. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin (Leica TCS SPE DMI4000B). Der Maßstabsbalken entspricht für Fibronektin 25 μ m und für die Kontrolle 40 μ m.

Im Vergleich zur Kontrolle konnte eine Kultivierung auf der mit Fibronectin beschichteten PC-Membran eine stärkere Ausbildung von VE-Cadherin an den Zellkontakten erzielen. Dieses Resultat ist mit dem Ergebnis der Genexpressionsanalyse deckungsgleich. Allerdings war ZO-1 entgegen der Erwartung in beiden Proben nicht an den Zellkontakten lokalisiert, sondern im Zellkern sowie im Zytosol verteilt. Möglicherweise könnte dies auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen sein.

3.1.1.1.3 Kapitelzusammenfassung Untersuchung einer geeigneten Beschichtung

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Beschichtung der PC-Membran mit 1 mg/ml Fibronectin eine schnelle Adhäsion nach 3 h, ein konfluentes Wachstum über 7 Tage (Kapitel 3.1.1.1.1) sowie eine Hochregulation essentieller Barriere-Proteine erzielte. Aus diesem Grund wurde für eine Etablierung der HRMVEC im Mikrokanal des vasQchips in den folgenden Kapiteln Fibronectin als Beschichtung gewählt.

3.1.1.2 Porengröße und Zellzahl im vasQchip

Der vasQchip bietet aufgrund seines halbrunden Mikrokanals eine geeignete Form zur Rekonstruktion eines *in vivo* Blutgefäßes. Dabei ermöglicht ein Wachstum der Zellen auf einer gekrümmten Oberfläche, im Vergleich zur planaren 2D-Zellkultur, eine naturgetreuere Morphologie und Anordnung des Endothels. In der Literatur wurde bereits die Relevanz der gekrümmten Oberfläche für das Zellwachstum beschrieben.²⁰² So konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen bereits ohne Einwirkung von mikrofluidischen Scherkräften allein durch eine halbrunde Geometrie im Mikrokanal ihre Morphologie sowie ihre Anordnung verändern.²⁰² Dabei spielt eine halbrunde bis runde Form eine bedeutende Rolle. Neben dem Aspekt einer besseren Abbildung eines runden Blutgefäßes konnte in Kanälen mit einem rektangulärem Querschnitt ein vermindertes Wachstum sowie eine inhomogenere Verteilung von Endothelzellen beobachtet werden.²⁰³

Für ein konfluentes Endothel im halbrunden Mikrokanal des vasQchips ist die Wahl einer geeigneten Porengröße und Zellzahl entscheidend. In der Literatur werden Porengrößen von 0,4 µm bis 3 µm zur Kultivierung von retinalen Endothelzellen eingesetzt.^{171,204} Daher wurden für diesen Versuch Porengrößen von 1,8-2,2 µm sowie 3 µm gewählt. Ebenso konnte anhand der Erkenntnisse in der Literatur gezeigt werden, dass das Anlegen eines laminaren Flusses zur Einschränkung der Proliferation der Endothelzellen führt.²⁰⁵ Aufgrund der Kanaloberfläche des vasQchips sowie der Zelldichte nach einer Kultivierung unter planaren 2D-Bedingungen konnte näherungsweise eine benötigte Zellzahl von $7,3 \cdot 10^4$ ermittelt werden. Um dabei eine konfluente Auskleidung des Mikrokanals zu gewährleisten, wurden höhere Zellzahlen von $7,5 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ gewählt. Des Weiteren wurden GFP-HRMVEC verwendet um die Adhäsion und das Wachstum der Zellen ohne zusätzliche Farbstoffe nachweisen zu können. Zur Besiedlung der vasQchips mit Porengrößen von 1,8-2,2 µm sowie 3 µm, wurden die Mikrokanäle mit 1 mg/ml Fibronectin beschichtet. Anschließend konnten GFP-HRMVEC der Zellzahl von $7,5 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^5$ in den Mikrokanälen ausgesät werden. Um die vollständige Auskleidung des halbrunden Mikrokanals

mit Zellen sicherzustellen, wurden die vasQchips mithilfe des vasQturns um ihre eigene Achse gedreht (Abbildung 17). Dabei wurde eine Drehzahl von 0,25 rpm für 1 h verwendet.



Abbildung 17: Darstellung des vasQturns zur Besiedlung des Mikrokanals der vasQchips. Um eine homogene Auskleidung der Zellen im Mikrokanal zu gewährleisten, rotiert der vasQchip um die eigene Achse (in Schwarz veranschaulicht) für 1 h mit der Drehzahl 0,25 rpm.

Nach erfolgter Rotation im vasQturn, wurden die vasQchips bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Um das Wachstum der GFP-HRMVEC in den Mikrokanälen zu überprüfen, erfolgte an Tag 2, 5 und 7 eine mikroskopische Visualisierung der Zellen. In Abbildung 18 und Abbildung 19 ist das Resultat aufgeführt.

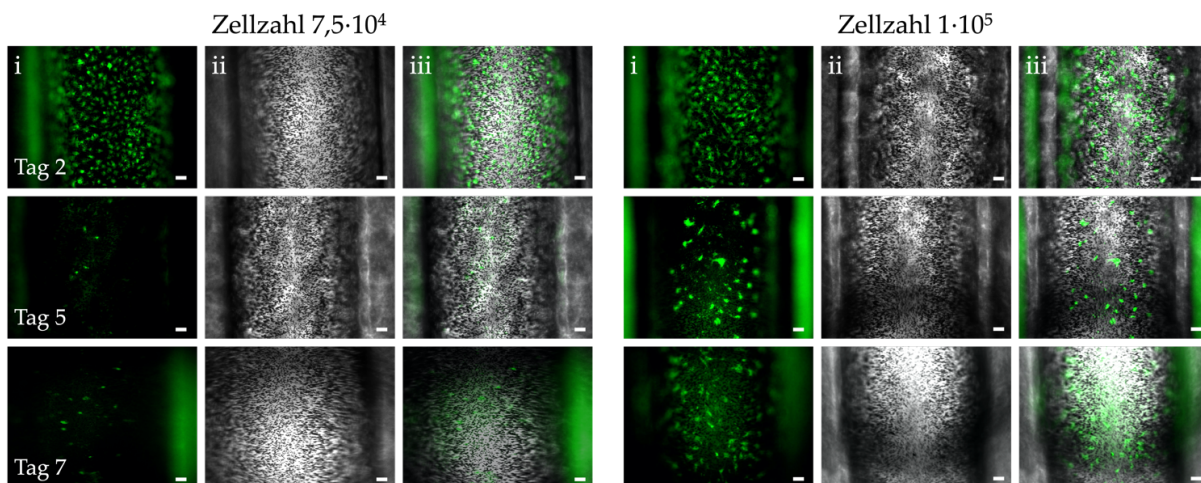


Abbildung 18: Statische Kultivierung der GFP-HRMVEC im vasQchip mit Porengrößen von 1,8-2,2 µm und Zellzahlen von 7,5·10⁴ sowie 1·10⁵. 7,5·10⁴ sowie 1·10⁵ GFP-HRMVEC wurden in mit 1 mg/ml Fibronectin beschichtete Mikrokanäle der Porengröße von 1,8 bis 2 µm in 20 µl EGM-2 ausgesät und für 7 Tage statisch bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Jeden 2. oder 3. Tag wurde ein Mediumwechsel mit EGM-2 durchgeführt. An Tag 2, 5 und 7 erfolgte eine mikroskopische Visualisierung. (i) GFP-Färbung der HRMVEC, (ii) Hellfeld, (iii) Überlagerung (inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED). Der Maßstabsbalken entspricht 75 µm.

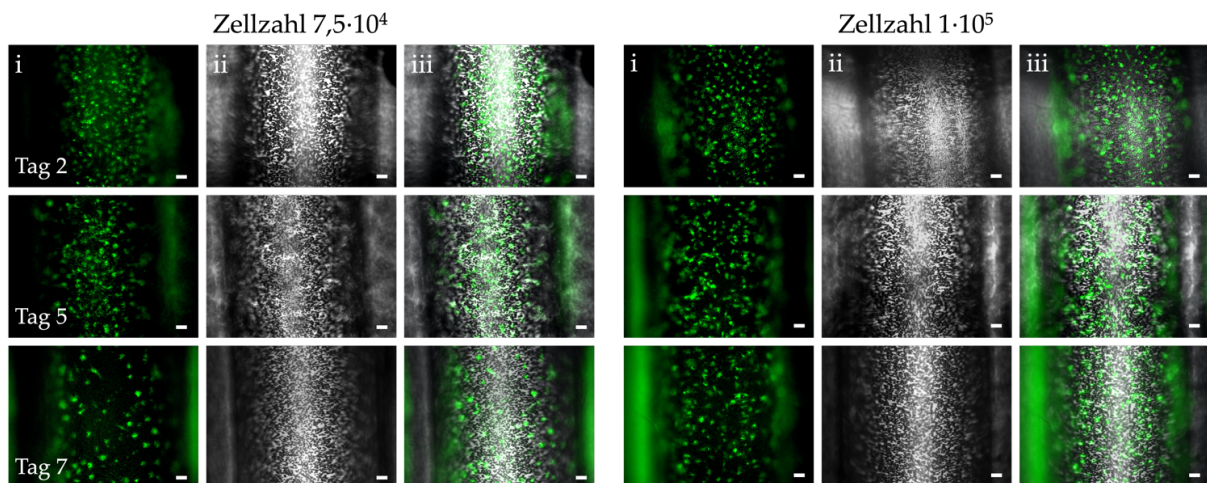


Abbildung 19: Statische Kultivierung der GFP-HRMVEC im vasQchip mit Porengrößen von 3 µm und Zellzahlen von $7,5 \cdot 10^4$ sowie $1 \cdot 10^5$. $7,5 \cdot 10^4$ sowie $1 \cdot 10^5$ GFP-HRMVEC wurden in mit 1 mg/ml Fibronectin beschichtete Mikrokanäle der vasQchips der Porengröße von 3 µm in 20 µl EGM-2 ausgesät und für 7 Tage statisch bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Jeden 2. oder 3. Tag wurde ein Mediumwechsel mit EGM-2 durchgeführt. An Tag 2, 5 und 7 erfolgte eine mikroskopische Visualisierung. (i) GFP-Färbung der HRMVEC, (ii) Hellfeld, (iii) Überlagerung (inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED). Der Maßstabsbalken entspricht 75 µm.

Es konnte gezeigt werden, dass die Porengröße eine entscheidende Rolle für das Wachstum der GFP-HRMVEC auf der Kanaloberfläche spielt. Dabei erzielte eine Kultivierung der HRMVEC auf der Membran mit einer Porengröße von 3 µm eine höhere Zelldichte im Vergleich zur Porengröße von 1,8-2,2 µm. Während an Tag 2 in vasQchips beider Porengrößen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen detektiert werden konnte, zeigte sich ab Tag 5 in den Mikrokanälen kleinerer Porengröße lediglich eine Adhäsion weniger Zellen. Hingegen konnte von Tag 2 bis Tag 7 in den vasQchips der Porengröße 3 µm eine gleichmäßigere Verteilung und eine höhere Anzahl adhärterter Zellen im Mikrokanal beobachtet werden. Dabei wies die verwendete Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ eine dichtere homogenere Verteilung der Zellen im Vergleich zur Zellzahl $7,5 \cdot 10^4$ auf. Aus diesem Grund wurden für folgende Versuche vasQchips der Porengröße 3 µm sowie eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ verwendet.

3.1.1.3 Integration eines Flusses und Scherkräfte

In vivo sind Endothelzellen durch den Blutfluss kontinuierlich mechanischen Reizen ausgesetzt. Zur Rekonstruktion eines dichten iBRB-Endothels steht besonders die durch den Fluss verursachte tangentielle Scherkraft im Fokus.²⁰⁶ Anhand der Literatur konnte gezeigt werden, dass sich Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) durch Exposition einer Mikrofluidik der Scherrichtung entsprechend physiologisch anordnen, um den Widerstand zu minimieren.²⁰⁷ Ferner wurde in verschiedenen Untersuchungen belegt, dass die Scherkraft zur Ausbildung einer erhöhten Barrierefunktion in Endothelzellen von Bedeutung ist.^{186,207,208} So konnten Seebach *et al.* bereits im Jahr 2000 eine erhöhte Expression der *Tight Junction*-Proteine ZO-1 und Occludin sowie Barriere-relevanter Transporter in Endothelzellen unter mikrofluidischen Bedingungen ermitteln.²⁰⁹ Durch einen Anschluss des vasQchips an eine Mikrofluidik wird ein artifizieller

Blutstrom sowie daraus resultierende Scherkräfte im Mikrokanal erzeugt. Dabei unterstützt der halbrunde Querschnitt des vasQchips im Vergleich zu einem Mikrokanal mit einem rektangulären Querschnitt eine gleichmäßige Verteilung der Scherkräfte über die gesamte Kanaloberfläche.⁴⁰

In den folgenden Kapiteln wurden HRMVEC im Mikrokanal des vasQchips durch Integration einer Mikrofluidik einem Fluss ausgesetzt. Dabei wurde einerseits untersucht, ob eine fluidische Langzeitkultivierung über einen Zeitraum von 7 Tagen möglich ist. Andererseits wurde überprüft, ob durch das Anlegen eines Flusses und den daraus resultierenden Scherkräften die Expression essentieller Barriere-Proteine beeinflusst wird.

3.1.1.3.1 Integration einer Mikrofluidik

In den retinalen Blutgefäßen (Arterien und Venen) herrschen totale Volumenströme von $44,0 \pm 13,3 \mu\text{l}/\text{min}$.²¹⁰ In Abhängigkeit des Blutgefäßdurchmessers sowie der Viskosität von Blut von 1 cP unter Berücksichtigung des Fahraeus-Lindqvist-Effekts²¹¹, kann ein daraus resultierender Scherstress von ca. $34,61 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ ermittelt werden. Hingegen herrscht in retinalen Kapillaren ein Scherstress von $10\text{-}15 \text{ dyn}/\text{cm}^2$.¹⁸⁶ Jedoch zeigten Molins *et al.*, dass HRMVEC *in vitro* unter Einfluss eines moderaten Scherstress von $1,5\text{-}5 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ die höchste Expression essentieller *Tight Junction*-Proteine erzielten. Ein Scherstress von $1,7 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ kann näherungsweise bei einem Volumenstrom von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ im Mikrokanal des vasQchips erzielt werden. Bereits Yeste *et al.* konnten mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ ein retinales Barriere-Modell in einem Chip-System aufbauen.¹⁷⁸ Folglich wurde der Volumenstrom von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ gewählt, um eine iBRB mit einer ausgeprägten Barrierefunktion im vasQchip zu rekonstruieren. Hierfür wurden vasQchips mit GFP-HRMVEC, wie in Kapitel 3.1.1.2 beschrieben, besiedelt. Nach erfolgter Rotation im vasQturn wurden die Zellen zur Regeneration 2 h statisch bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Danach konnten die vasQchips an eine Peristaltikpumpe (peRISYS, Cetoni) angeschlossen und ein Fluss angelegt werden. Hierbei wurde das Medium kontinuierlich im Kreis gepumpt. Um ein Ablösen der Zellen durch einen zu hohen Flüssigkeitsdruck zu vermeiden, wurde zunächst eine Flussrate von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Diese wurde stündlich um $10 \mu\text{l}/\text{min}$ erhöht, sodass nach 9 h eine maximale Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ und ein korrespondierender Scherstress von $1,7 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ erzielt werden konnte. Die Endothelzellen wurden an Tag 2, 5 sowie 7 mikroskopisch visualisiert (Abbildung 20). Es konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitkultivierung der HRMVEC über 7 Tagen unter Ausbildung einer konfluenten Zellschicht über die gesamte Kanaloberfläche bei einer Flussrate mit $100 \mu\text{l}/\text{min}$ möglich ist. Aus diesem Grund wurde dieser Volumenstrom für zukünftige Versuche verwendet.

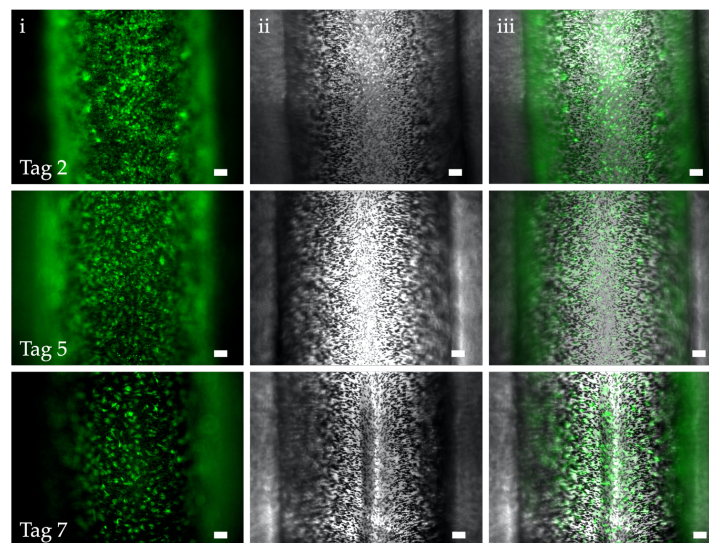


Abbildung 20: Fluidische Kultivierung der GFP-HRMVEC im vasQchip. $1 \cdot 10^5$ GFP-HRMVEC wurden in mit 1 mg/ml Fibronektin beschichtete Mikrokanäle in 20 μ l EGM-2 ausgesät. Es folgte eine einstündige Rotation der Mikrokanäle um die eigene Achse mit einer Drehzahl von 0,25 rpm im vasQturn. Nach einer statischen Kultivierung von 2 h wurden die vasQchips an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Zunächst wurde ein Volumenstrom von 10 μ l/min angelegt, welcher sukzessive auf maximal 100 μ l/min erhöht wurde. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 2, 5 und 7 wurden die Zellen in den Mikrokanälen der vasQchips mikroskopisch visualisiert. (i) GFP-Färbung der HRMVEC, (ii) Hellfeld, (iii) Überlagerung (inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED). Der Maßstabsbalken entspricht 75 μ m.

3.1.1.3.2 Langzeitkultivierung und Nachweis zellspezifischer Marker

Zahlreiche Untersuchungen in der Literatur konnten einen positiven Einfluss auf die Barrierefunktion in Endothelzellen durch Anlegung eines Flusses beschreiben. So konnten Molins *et al.* eine 1,5-fach höhere Detektion von Claudin-5 und eine 1,25-fach erhöhte Verteilung von ZO-1 in HRMVEC bei einem Scherstress von 1,5 dyn/cm² nachweisen.¹⁸⁶ Auch Ragelle *et al.* konnten einen niedrigeren Permeabilitätskoeffizienten und damit eine verstärkte Barrierefunktion von HRMVEC durch Exposition einer Flussrate im Vergleich zur statischen Kultivierung belegen.¹⁵⁰ Aus diesem Grund wurde der Einfluss der fluidischen Kultivierung einschließlich der resultierenden Scherkräfte auf die Expression spezifischer Barriere-Proteine in den HRMVEC untersucht. Hierfür wurden HRMVEC entsprechend der in Kapitel 3.1.1.3.1 beschriebenen Bedingungen in den Mikrokanal des vasQchips eingebracht und für 7 Tage bei einer Flussrate von 100 μ l/min fluidisch kultiviert. Zur Kontrolle wurde eine statische Kultivierung der HRMVEC im Mikrokanal durchgeführt. Nach 7 Tagen konnte mithilfe einer RT-qPCR die Expression verschiedener Proteine quantifiziert werden. Neben den *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* erfolgte eine Quantifizierung der Expression essentieller Efflux-Pumpen P-gp und BCRP. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, transportieren BCRP sowie P-gp unerwünscht eingedrungene Xenobiotika zurück ins Blut und sind damit für eine Aufrechterhaltung der Barriereintegrität in den HRMVEC essentiell.^{212,213} Die auf die Kontrolle normierte Expression ist in Abbildung 21 dargestellt.

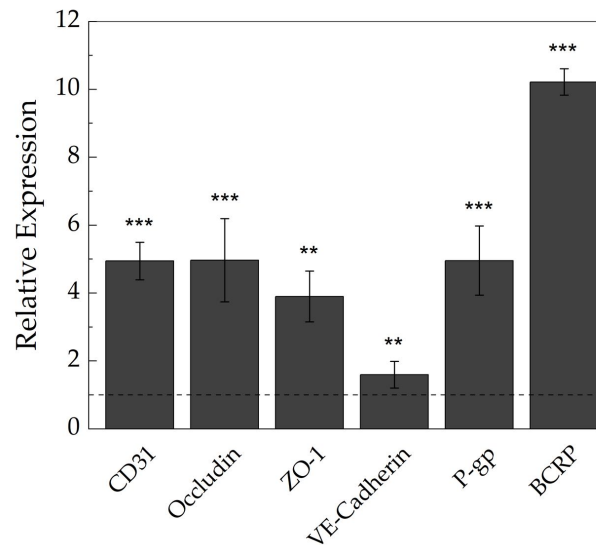


Abbildung 21: Relative mRNA-Expression spezifischer Proteine in HRMVEC bei einer fluidischen Kultivierung im vasQchip. $1 \cdot 10^5$ HRMVEC wurden in mit 1 mg/ml Fibronectin beschichtete Mikrokanäle in 20 μ l EGM-2 ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung der HRMVEC im vasQchip zu gewährleisten, wurden die Mikrokanäle für 1 h um ihre eigene Achse im vasQturn gedreht. Nach 2 h wurde durch Exposition einer Mikrofluidik ein Volumenstrom von 100 μ l/min angelegt und eine daraus resultierende Scherstress von 1,7 dyn/cm² erzeugt. Zur Kontrolle wurden HRMVEC unter statischer Kultivierung im vasQchip analysiert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach einer fluidischen Kultivierung von 7 Tagen, wurde die RNA der HRMVEC isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression spezifischer Barriere-relevanter Proteine mithilfe einer RT-qPCR quantifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mithilfe der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet.

Es konnte eine erhöhte Expression der barrierespezifischen Marker in HRMVEC durch das Anlegen einer Flussrate von 100 μ l/min erzielt werden. Dabei wurde für CD31 eine 4,94-fache, für Occludin eine 4,96-fache, für ZO-1 eine 3,9-fache, für VE-Cadherin eine 1,59-fache, für P-gp eine 4,95-fache und für BCRP eine 10,21-fache Expression bestimmt. Damit wies die Efflux-Pumpe BCRP die höchste relative Expression auf.

Analog dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der HRMVEC zur Visualisierung von CD31 durchgeführt. Die HRMVEC wurden nach einer fluidischen Kultivierung von 7 Tagen im vasQchip immunhistochemisch gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Visualisierung der Zellkerne mit Hoechst33342 sowie des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin-TRITC. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurden *z-stack* Messungen des Mikrokanals in einer Höhe von 110 μ m durchgeführt. Anschließend konnten maximale Überlagerungen sowie 3D-Projektionen erzeugt werden. In Abbildung 22 ist die konfluente Zellschicht der HRMVEC im Mikrokanal unter Ausbildung von CD31 visualisiert.

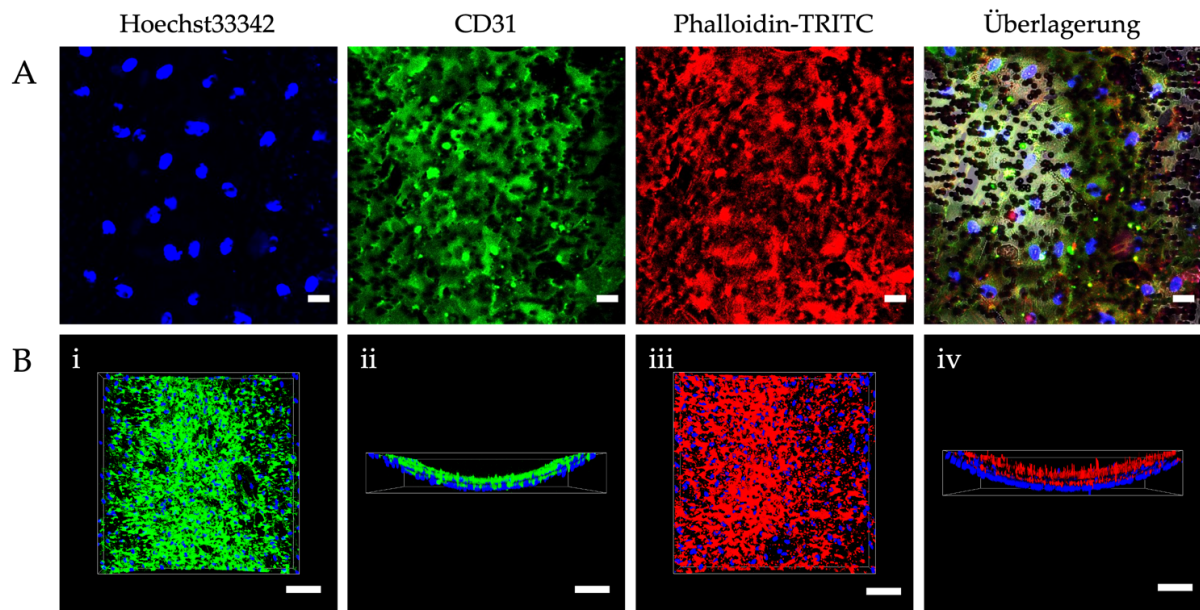


Abbildung 22: Visualisierung spezifischer Zellstrukturen der HRMVEC im vasQchip nach einer fluidischen Kultivierung von 7 Tagen. $1 \cdot 10^5$ HRMVEC wurden in 1 mg/ml Fibronectin beschichtete Mikrokanäle in 20 μ l EGM-2 ausgesät. Zur vollständigen Auskleidung des Mikrokanals wurden die vasQchips um ihre eigene Achse im vasQturn für 1 h gedreht. Nach einer zweistündigen statischen Inkubation zur Regeneration wurden die vasQchips an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Es folgte eine fluidische Kultivierung bei 100 μ l/min für 7 Tage. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen im vasQchip fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und die spezifischen Zellstrukturen immunhistochemisch gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen generiert ($n = 28$, Abstand = 4 μ m, $h = 110 \mu$ m, Leica TCS SPE DMI4000B). (A) Stellt die maximale Überlagerung und (B) generierte 3D-Projektionen dar. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342, Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31, Rot: Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts mit Phalloidin-TRITC. Überlagerung mit Hellfeld. B(i) und (iii) zeigt die laterale und B(ii) sowie B(iv) die horizontale Ansicht der vasQchips. 3D-Projektionen wurden mit der Leica LasX-Software erstellt. Der Maßstabsbalken entspricht in (A) 25 μ m und (B) 100 μ m.

3.1.1.3.3 Kapitelzusammenfassung Integration eines Flusses und Scherkräfte

Anhand dieser Resultate konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitkultivierung der HRMVEC über 7 Tage bei 100 μ l/min unter Ausbildung einer dichten Zellschicht möglich ist. Hierbei konnte die Ausbildung eines Aktin-Zytoskeletts sowie die Expression des *Junction*-assoziierten Proteins CD31 immunhistochemisch im vasQchip nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression essentieller Barriere-Proteine mithilfe einer RT-qPCR detektiert. Damit konnten die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte auf die Barrierefunktion im untersuchten iBRB-Endothel durch Integration eines Flusses und der resultierenden Scherkräfte bestätigt werden.

3.1.2 Etablierung der iBRB inklusive Perizyten und Astrozyten

Für eine Rekonstruktion eines iBRB-Kokulturmodells wurden neben HRMVEC humane retinale Astrozyten (HRA) und humane neurovaskulären Perizyten (HBVP) verwendet. Der Einfluss von Astrozyten und Perizyten auf die Ausbildung sowie Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der

iBRB konnte bereits zahlreich in der Literatur belegt werden.^{171,51,52} HRA sind primäre isolierte Astrozyten aus der menschlichen Retina und spiegeln daher die spezifischen Eigenschaften der *in vivo* retinalen Astrozyten wider. Da humane retinale Perizyten kommerziell begrenzt verfügbar sind und zudem marginal proliferieren, wurden HBVP verwendet. Hierbei handelt es sich um primäre Perizyten aus dem menschlichen Gehirn. Wie in Kapitel 1.2.3 beschrieben, wird den Hirnperizyten *in vivo* eine ähnliche Funktion wie den retinalen Perizyten in der rNVU im Auge zugeschrieben.¹⁷¹ Daher wurde angenommen, dass diese Zellen als Äquivalent zu retinalen Perizyten in der rNVU für eine Rekonstruktion fungieren können.

In den folgenden Kapiteln wurden verschiedene Bedingungen für eine Kokultivierung der drei Zelltypen untersucht. Hierbei wurden Wachstumskurven, Immunfluoreszenzfärbungen, Genexpressionsanalysen sowie Viabilitätstests durchgeführt. Im Anschluss wurde die Barriere des etablierten Modells auf ihre Funktion überprüft.

3.1.2.1 Wachstumskurve

In vivo werden Zellen im menschlichen Körper durch Nährstoffe und Sauerstoff aus dem zirkulierenden Blut versorgt. *In vitro* ist dies bislang nicht möglich. Daher werden zur Kultivierung der Zellen auf verschiedene Nährmedien zurückgegriffen. Diese sind spezifisch an die Anforderungen des jeweiligen Zelltyps angepasst und tragen zur Funktion, Wachstum, Morphologie und Beibehaltung zelltypischer Marker bei. Um eine simultane Kokultivierung der drei Zelltypen zu ermöglichen, wurde daher zunächst ein Kultivierungsmedium bestimmt, in dem alle Zellen eine starke Proliferation aufweisen. Darüber hinaus war es wichtig, dass das ausgewählte Kultivierungsmedium die Ausbildung einer dichten Barriere in den HRMVEC begünstigt. Zunächst wurde mithilfe von Wachstumskurven das Wachstum der drei Zelltypen in vier verschiedenen kommerziell erhältlichen Spezialmedien untersucht. Hierfür wurde das Spezialmedium der HRMVEC, das EGM-2, sowie die Spezialmedien AM der HRA und PM der HBVP getestet. Zusätzlich wurde als günstige Alternative das DMEM verwendet. Zur Untersuchung der Proliferation von HRMVEC, HRA und HBVP wurden diese jeweils in den zu testenden Medien ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Dabei wurde an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 die Zellzahl bestimmt. Die ermittelte Gesamtzellzahl ist in Abbildung 23 in Abhängigkeit des verwendeten Spezialmediums aufgetragen. In DMEM konnte die niedrigste Proliferation der drei Zelltypen beobachtet werden. Dagegen wiesen die Zellen in EGM-2 das stärkste Wachstum auf. In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung der HRMVEC in EGM-2 die Expression essentieller Barriere-Marker begünstigt (Kapitel 3.1.1.3.2). Aus diesem Grund wurde für eine Etablierung des iBRB-Modells inklusive Perizyten und Astrozyten das Spezialmedium EGM-2 für alle folgenden Versuche verwendet.

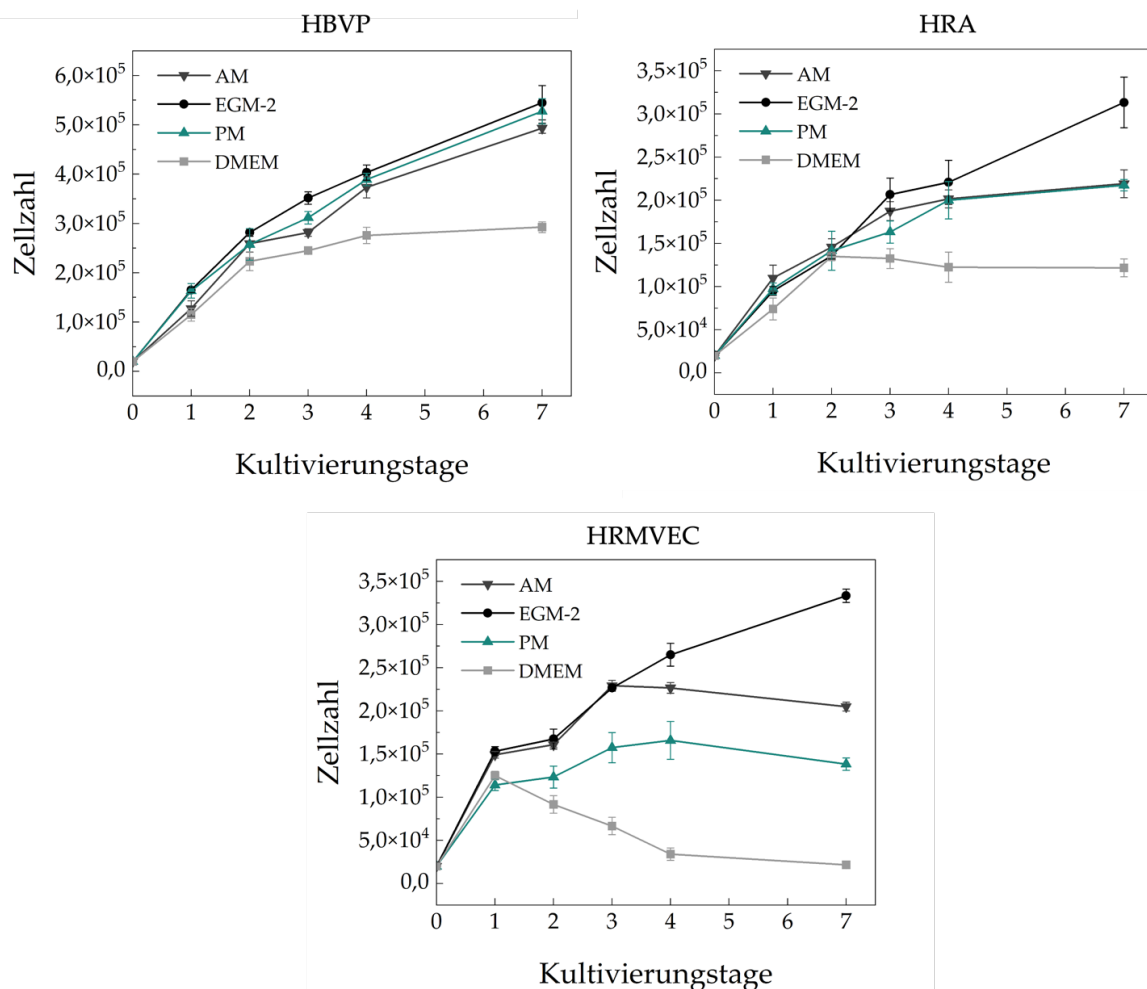


Abbildung 23: Wachstumskurven von HBVP, HRA und HRMVEC. $2 \cdot 10^4$ Zellen wurden jeweils in 1 ml der Spezialmedien AM, PM, EGM-2 und DMEM in die Wells einer 24-Well-Platte ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurden die Zellen in Triplikaten enzymatisch abgelöst, gezählt und die Gesamtzellzahl ermittelt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.1.2.2 Etablierung der iBRB inklusive Astrozyten und Perizyten im Transwell

Für eine Etablierung einer Kokultur aus HRMVEC, HRA und HBVP war es wichtig, die Anordnung der Zelltypen so naturgetreu wie möglich nachzubilden. *In vivo* ummanteln retinale Perizyten das Blutgefäß und liegen dicht an den Endothelzellen, sodass ein maximaler Abstand von 20 nm resultiert.¹¹³ Dabei beträgt das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen in der menschlichen Retina Verhältnis 1:1.⁹⁰ Somit ist der Anteil der Perizyten in der Retina höher als im Gehirn (1:3-4) oder anderen mikrovaskulären Barrieren (1:10).^{90,113} Währenddessen stehen die mobilen Astrozyten im retinalen Gewebe mit Endothelzellen sowie Perizyten, mithilfe ihrer langen zellulären Fortsätze in physischem Kontakt.²¹⁴

Zur Rekonstruktion eines naturgetreuen iBRB-Modells inklusive Astrozyten und Perizyten wurde als Vorversuch eine statische Kokultur in einem Transwell-System etabliert. Dieses System erlaubt eine vereinfachte Kultivierung von Zellen in planaren Zellschichten unter statischen

zweidimensionalen Bedingungen. Transwell-Systeme werden häufig zur *in vitro* Rekonstruktion verschiedener Barriere-Modelle, für Messungen der Barriereintegrität (TEER) sowie für Permeabilitätsstudien eingesetzt. Die Besonderheit der Transwell-Systeme ist, dass die Kultivierung der Zellen auf einer porösen PC-Membran dem sogenannten *Insert*, erfolgen kann. Das *Insert* trennt das apikale vom basalen Kompartiment. Im Folgenden wurden die HRMVEC apikal auf der „Blutseite“ und die HBVP zusammen mit den HRA basal auf der „GewebeSeite“ im Transwell eingebracht. Die Einbringung von HRA sowie HBVP erfolgte auf der PC-Membran im basalen Kompartiment. Dabei erlaubt die perforierte Membran eine physische Interaktion und einen Austausch wichtiger Faktoren wie beispielsweise PDGF- β , zwischen den Zellschichten in beiden Kompartimenten.¹⁸⁷ Bereits Yang *et al.* zeigten, dass der direkte Zellkontakt von Endothelzellen zu Perizyten für eine korrekte Barrierefunktion eines iBRB-Endothels notwendig ist.²¹⁵ Im Anschluss wurde im etablierten Kokultur-Modell die Ausbildung zelltypischer Marker sowie die Expression Barriere-spezifischer Proteine in den HRMVEC untersucht.

3.1.2.2.1 Nachweis zelltypischer Marker

Zur Kokultivierung der drei Zelltypen im Transwell-System wurde eine Porengröße von 3 μm gewählt. Im Vorversuch (Kapitel 3.1.1.2) konnte gezeigt werden, dass sich Porengrößen von 3 μm zur Kultivierung der HMRVEC über einen Zeitraum von 7 Tagen bewährten. Zur Beschichtung der porösen PC-Membran wurden die Matrixproteine Fibronectin (1 mg/ml im apikalen Bereich) und Kollagen I (0,6 mg/ml im basalen Bereich) eingesetzt. Dr. R. Pfister konnte zeigen, dass zur Adhäsion der HBVP auf einer PC-Membran eine Beschichtung mit 0,6 mg/ml Kollagen I geeignet ist.¹⁴ Dagegen konnte die Eignung von Fibronectin bereits in Kapitel 3.1.1.1 im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Um ein Anwachsen der HBVP im basalen Bereich auf der PC-Membran sicherzustellen wurden die Transwell-Systeme um 180° gedreht positioniert. Anschließend wurden $3 \cdot 10^4$ HBVP auf die beschichtete PC-Membran in EGM-2 ausgesät. Nach einer Inkubation von 3 h wurde das Transwell in die Ausgangsposition zurückgedreht und über Nacht bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte nach demselben Prinzip eine Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRA auf der Perizytenzellschicht. Um das *in vivo* Verhältnis (1:1) von Perizyten und Endothelzellen zu rekonstruieren, wurden nach 24 h $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in den apikalen Bereich auf der porösen Membran des Transwell-Systems ausgesät (Abbildung 24).

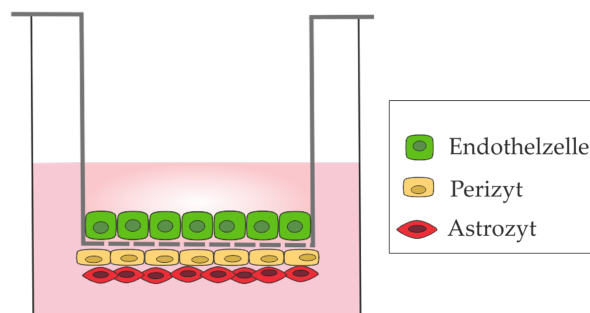


Abbildung 24: Schematische Darstellung des iBRB-Modells inklusive HRA und HBVP im statischen Transwell-System.

Es folgte eine Kultivierung bei 5 % CO₂ und 37 °C in EGM-2 über einen Zeitraum von 7 Tagen. Anschließend wurde die Ausbildung zelltypischer Marker mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Hierfür wurde der Barriere-Marker CD31 zur Überprüfung der konfluenten Endothelzellschicht sowie die Marker FABP7 (*Fatty Acid Binding Protein 7*) für HRA und α -SMA (*Alpha Smooth Muscle Actin*) für HBVP verwendet. FABP7, auch bekannt als *Brain Lipid Binding Protein* ist ein 14-15 kDa schweres hochkonserviertes zytoplasmatisches Protein und spielt im Lipidstoffwechsel, Energiehomöostase sowie in der Inflammation eine bedeutende Rolle.^{216,217} FABP7 wird von Astrozyten exprimiert und daher auch häufig als zelltypischer Marker eingesetzt.²¹⁷ α -SMA ist eine Aktin-Isoform, welche neben weiteren Aktin-Isoformen wie β -Aktin oder γ -Aktin von Perizyten exprimiert und daher als Marker verwendet wird.²¹⁸ Zusätzlich zur immunhistochemischen Färbung wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 visualisiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt und 3D-Projektionen sowie maximale Überlagerungen generiert (Abbildung 25). Zudem wurden Tiefenfärbungen erzeugt, welche anhand eines definierten Farbcodes die räumliche Lage der Zellen entlang der *z*-Ebene veranschaulichen. Dies ermöglicht eine bessere Visualisierung der Zellen im Transwell-System.

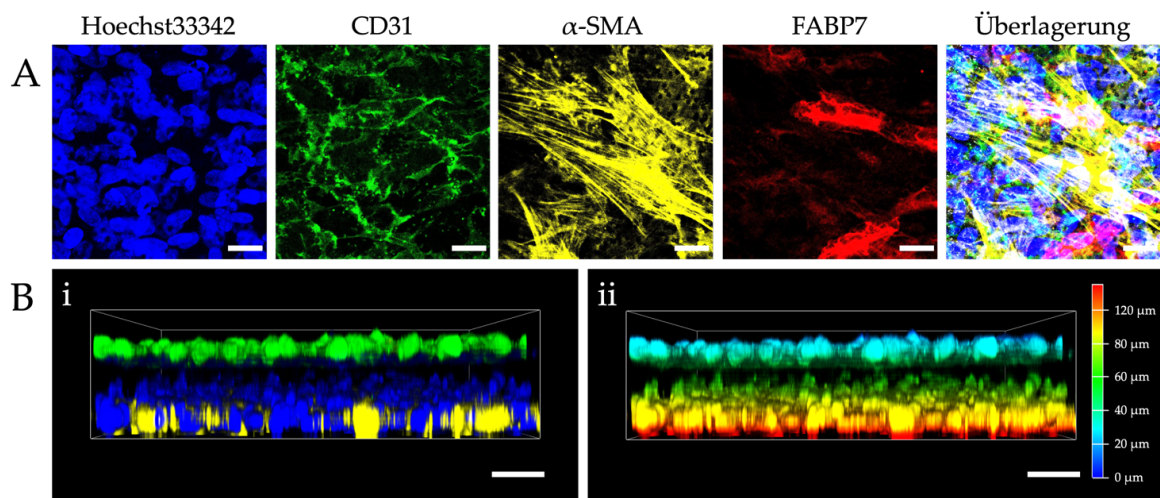


Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker von HRMVEC, HBVP und HRA im Transwell-System. Das basale Kompartiment des Transwell-Systems wurde mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit $3 \cdot 10^4$ HBVP für 3 h um 180° gedreht in EGM-2 besiedelt. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRA nach demselben Prinzip. Anschließend erfolgte 24 h später die Besiedlung des mit 1 mg/ml Fibronectin beschichteten apikalen Kompartiments mit $3 \cdot 10^4$ HRMVEC. Die Kokultur wurde für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in EGM-2 statisch kultiviert. Ein Mediumwechsel des apikalen und basalen Kompartiments wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen, fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mithilfe von konfokaler Mikroskopie konnten *z-stack* Messungen durchgeführt werden ($n = 25$, Abstand = 4 μ m, $h = 100 \mu$ m, Leica TCS SPE DMI4000B). (A) stellt die maximale Überlagerung und (B) generierte 3D-Projektionen in horizontaler Ansicht dar. (Bii) zeigt die mit der Leica LasX-Software erstellte Tiefencodierung von (Bi). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von FABP7. Der Maßstabsbalken entspricht für (A) 35 μ m und (B) 50 μ m.

Es konnte eine erfolgreiche Kokultivierung aller drei Zelltypen unter Ausbildung ihrer zelltypischen Marker nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten anhand der horizontalen 3D-Projektionen die zwei getrennten Zellschichten bestehend aus Endothelzellen sowie Astrozyten und Perizyten visualisiert werden.

3.1.2.2.2 Expression Barriere-spezifischer Proteine

Neben der Ausbildung zelltypischer Marker wurde die Expression der Barriere-relevanten Proteine in HRMVEC in Kokultivierung mit HRA und HBVP untersucht. Wie zuvor beschrieben haben Perizyten sowie Astrozyten einen großen Einfluss auf die Ausbildung der Barriereintegrität der HRMVEC. So ist bekannt, dass Perizyten an der Aufrechterhaltung und Ausbildung der Barrierefunktion in retinalen Endothelzellen beteiligt sind.^{116,171} Ein Ausfall der Perizyten, wie beispielsweise bei der diabetischen Retinopathie, führt somit zu einer erhöhten Permeabilität der Barriere.¹¹⁶ Währenddessen konnte Astrozyten eine Funktion zur erhöhten *Tight Junction* Expression sowie zur Lokalisierung spezifischer Transportproteine in retinalen Endothelzellen zugeschrieben werden.^{84,171,219} Auch Wisniewska-Kruk *et al.* konnten durch eine Kokultur mit isolierten retinalen Perizyten und Astrozyten im Transwell eine 1,57-fach höhere Barriereintegrität (TEER) und eine 1,89-fach erniedrigte Permeabilität in den HRMVEC feststellen.¹⁷¹

Um den Einfluss von Astrozyten und Perizyten auf die Expression verschiedener Barriere-Marker zu untersuchen, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Hierfür wurde das Kokultur-Modell aus HRA, HBVP und HRMVEC, wie in Kapitel 3.1.2.2.1 beschrieben, vorbereitet. Analog dazu wurden zur Kontrolle Transwell-Systeme mit ausschließlich HRMVEC verwendet. Nach einer Kultivierung von 7 Tagen bei 5 % CO₂ und 37 °C wurde die Expression essentieller Barriere-Proteine quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden auf die Kontrolle normiert und sind in Abbildung 26 dargestellt. Mit diesem Versuch konnte der Einfluss der umliegenden Zelltypen auf die Expression der Barriere-Proteine in den HRMVEC belegt werden. So wurde im Vergleich zur Kontrolle für alle Proteine eine Hochregulation detektiert. Dabei konnte für CD31 eine 1,35-fache, für Occludin eine 1,27-fache, für ZO-1 eine 1,65-fache, für VE-Cadherin 1,38-fache, für die beiden Efflux-Pumpen P-gp eine 1,26-fache und für BCRP eine 3,14-fache Expression ermittelt werden. Ähnliche Effekte konnten Yang *et al.* in einem Kokultur-Modell aus retinalen Perizyten und Endothelzellen im Transwell-System erzielen. Dabei konnte im Vergleich zur Kontrolle für ZO-1 eine 1,8-fache, für Occludin eine 1,5-fache und für VE-Cadherin eine 1,4-fache Expression detektiert werden.²¹⁵ Jedoch konnte anhand fehlender Charakterisierung in der Literatur kein Vergleich zur Expression der Efflux-Pumpen P-gp und BCRP bei Einfluss einer Kokultur gezogen werden. Dennoch ist bekannt, dass die beiden Efflux-Pumpen P-gp und BCRP zur Aufrechterhaltung der Barrierefunktion notwendig sind.^{85,100,102} Die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte der Kokultur von HRMVEC mit Astrozyten und Perizyten konnten damit in diesem Versuch belegt werden.

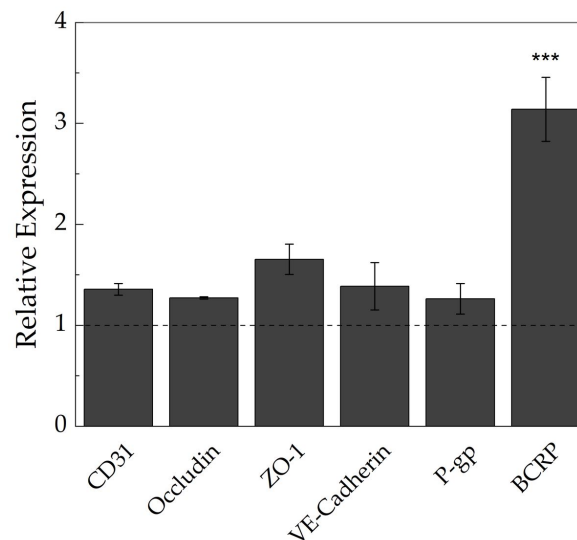


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression spezifischer Proteine in HRMVEC bei einer Kokultivierung mit HBVP und HRA im Transwell-System. $3 \cdot 10^4$ HBVP wurden in das basale Kompartiment des Transwell-Systems in EGM-2 besiedelt. Um das Anwachsen auf der mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten PC-Membran zu gewährleisten wurde das Transwell um 180° gedreht positioniert. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRA nach demselben Prinzip. 24 h später erfolgte die Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in das mit 1 mg/ml Fibronectin beschichtete apikale Kompartiment. Die Kokultur wurde für 7 Tage bei 5 % CO_2 und 37°C in EGM-2 statisch kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Als Referenz wurden Transwell-Systeme ausschließlich mit HRMVEC kultiviert. Im Anschluss wurde die RNA der HRMVEC isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression spezifischer Barriere-relevanter Proteine quantifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.1.2.2.3 Kapitelzusammenfassung Etablierung der iBRB inklusive Astrozyten und Perizyten im Transwell

In diesem Kapitel konnte ein statisches iBRB-Modell inklusive Astrozyten und Perizyten im Transwell-System etabliert werden. Dabei bewährte sich EGM-2 als Kultivierungsmedium der Kokultur. Darüber hinaus konnte mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung sowie Genexpressionsanalysen die Funktionalität der Barriere nachgewiesen werden. Damit erwies sich das etablierte statische Kokultur-Modell im nächsten Schritt als funktionelle Basis für eine Etablierung des iBRB-Modells im vasQchip.

3.1.2.3 Etablierung der iBRB inklusive Perizyten und Astrozyten im vasQchip

Im vorherigen Kapitel konnte erfolgreich ein iBRB-Modell inklusive Astrozyten und Perizyten im Transwell-System rekonstruiert werden. Jedoch handelt es sich hierbei um ein statisches Modell, welches keine dynamischen Faktoren des menschlichen Körpers wie einen Blutfluss abbilden kann. Im Vorversuch in Kapitel 3.1.1.3.2 konnte gezeigt werden, dass mechanische Reize wie das Anlegen eines Flusses und die daraus resultierende physiologische Scherkraft zur Ausbildung einer naturgetreuen Barrierefunktion in HRMVEC notwendig sind. Um dem Endothel

physiologische Scherkräfte auszusetzen, wurde das Kokultur-Modell aus HRMVEC, HRA und HBVP im vasQchip etabliert.

3.1.2.3.1 Nachweis spezifischer Marker

Für die Kokultivierung von HRMVEC, HRA und HBVP im vasQchip wurde eine Porengröße von 3 μm verwendet. In Kapitel 3.1.1.2 konnte eine konfluente Zellschicht der HRMVEC im Mikrokanal unter Verwendung von Poren der Größe 3 μm unter fluidischen Bedingungen erzielt werden. Für eine Adhäsion der Zellen im vasQchip wurde der Mikrokanal mit 1 mg/ml Fibronektin und das umgebende Kompartiment mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. In den Vorversuchen in Kapitel 3.1.1.1 und 3.1.2.2 konnte gezeigt werden, dass die gewählten Beschichtungen mit entsprechender Konzentration für eine Kultivierung der Zellen auf der PC-Membran geeignet sind. In Kapitel 3.1.1.2 wurde die Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ zur Etablierung des iBRB-Endothels im Mikrokanal verwendet. Um das 1:1 Verhältnis zwischen Perizyten und Endothelzellen aus der Retina naturgetreu abzubilden, wurde unter Bezugnahme der Kontaktfläche von Mikrokanal und Kompartiment im vasQchip eine benötigte Zellzahl von näherungsweise $9,5 \cdot 10^5$ für HBVP ermittelt. Somit wurden $9,5 \cdot 10^5$ HBVP in das umgebende Kompartiment eingebracht. Um ein Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran des Mikrokanals sicherzustellen, wurde der vasQchip um 180° gedreht. Nach 3 h konnte der vasQchip erneut in die Ausgangsposition gebracht werden. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert. Das Schema der Besiedlung des umgebenden Kompartiments ist in Abbildung 27 aufgeführt.

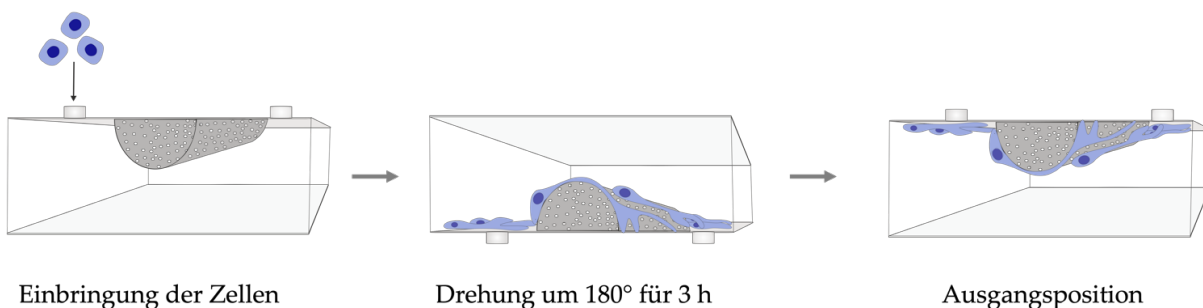


Abbildung 27: Schema der Besiedlung des umgebenden Kompartiments im vasQchip. Zur Besiedlung des umgebenden Kompartiments wurden Zellen durch die Anschlüsse eingebracht. Durch eine Drehung des vasQchips um 180° wurde das Anwachsen der Zellen auf dem Mikrokanal sichergestellt. Nach 3 h konnte der vasQchip in die Ausgangsposition gebracht und über Nacht bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert werden (modifiziert nach Pfister).¹⁴

Am nächsten Tag erfolgte nach demselben Prinzip die Einbringung von $9,5 \cdot 10^5$ HRA auf die ausgebildete Perizyten-schicht im umgebenden Kompartiment. Eine Besiedlung des Mikrokanals mit $1 \cdot 10^5$ HRMVEC erfolgte nach Kapitel 3.1.1.3.2. Anschließend wurden die vasQchips an die Peristaltikpumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ in EGM-2 fluidisch kultiviert. Nach 7 Tagen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei wurde überprüft, ob eine Kokultivierung von HRMVEC, HBVP und HRA im vasQchip unter Ausbildung der charakteristischen zelltypischen Marker möglich ist. Zur Visualisierung von HRMVEC wurde

CD31, für HBVP wurde α -SMA, und für HRA wurde GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) eingesetzt. GFAP ist das bedeutendste intermediäre Filamentprotein in Astrozyten und wird daher häufig als Marker verwendet.^{220,221} Die Detektion erfolgte über *z-stack* Messungen durch fluoreszente Konfokalmikroskopie (Abbildung 28).

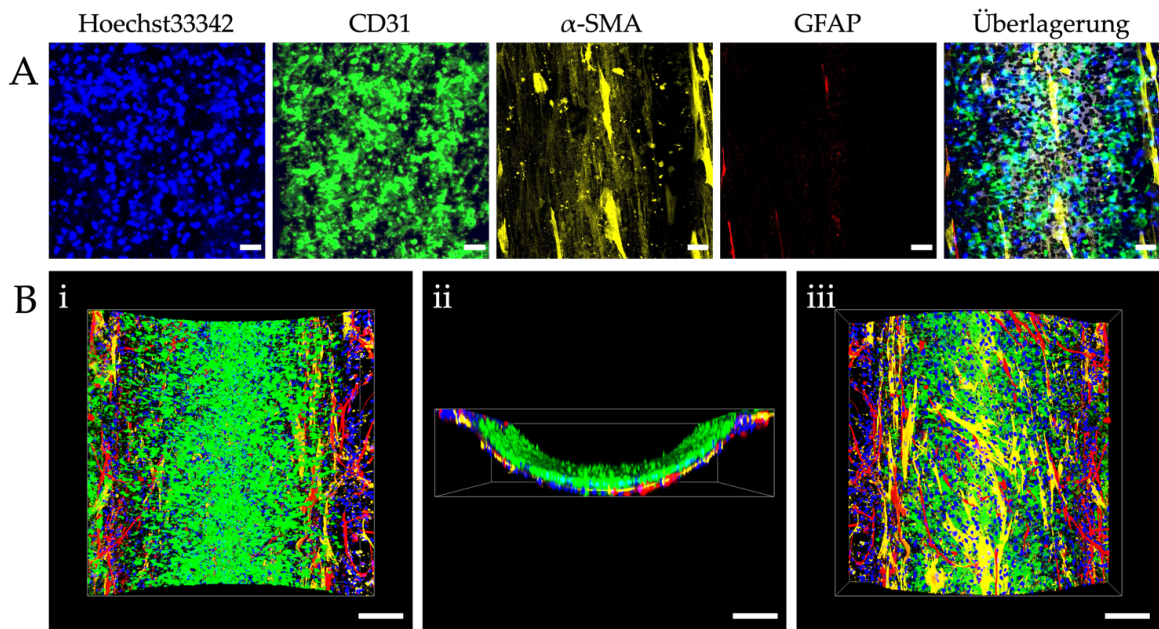


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker der Kokultur aus HRMVEC, HBVP und HRA unter fluidischer Kultivierung im vasQchip. $9,5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment besiedelt. Das Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran wurde durch eine Drehung des vasQchips um 180° gewährleistet. Die Einbringung von $9,5 \cdot 10^5$ HRA auf die Perizytenzellschicht erfolgte nach demselben Prinzip. Am dritten Tag wurden $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in $20 \mu\text{l}$ EGM-2 in den mit 1 mg/ml Fibronectin beschichteten Mikrokanal ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung im Mikrokanal sicherzustellen, wurde dieser für 1 h um seine eigene Achse gedreht. Im Anschluss wurden die vasQchips an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l}/\text{min}$, welche stufenweise erhöht wurde, bei 37°C und 5 % CO_2 fluidisch kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Daraufhin wurden mit inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 110$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 330 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Dadurch konnten maximale Überlagerungen (A) und 3D-Projektionen (B) der Mikrokanäle generiert werden. (Bi) zeigt die innere und (Biii) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (Bii) stellt die horizontale Ansicht des vasQchips dar. Maximale Überlagerung in (A) mit Hellfeld. 3D-Projektionen wurden mit der Leica LasX-Software erstellt. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP. Der Maßstabsbalken entspricht für (A) $50 \mu\text{m}$ und (B) $200 \mu\text{m}$.

Anhand der horizontalen 3D-Projektion sind durch die Membran zwei getrennte Zellschichten aus HRMVEC im Mikrokanal sowie Perizyten und Astrozyten im Kompartiment zu erkennen. Zudem konnte anhand der Immunfluoreszenzfärbung eine Kokultur der drei Zelltypen unter Ausbildung ihrer charakteristischen Marker erfolgreich evaluiert werden. Jedoch konnte nur ein geringer Anteil der HRA mit GFAP visualisiert werden. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass GFAP hauptsächlich durch Hirnverletzungen im ZNS in reaktiven Astrozyten exprimiert wird.²²¹

Damit ist die immunhistochemische Detektion von GFAP im gesundem Gewebe meist schwer nachweisbar.²²² Dieser in der Literatur beschriebene Effekt konnte in Abbildung 28 bestätigt werden.

3.1.2.3.2 Viabilität der Zellen im umgebenden Kompartiment

Für ein funktionsfähiges Kokultur-Modell ist die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zur Aufrechterhaltung ihrer Viabilität notwendig. Durch das Anlegen eines Flusses wird die Versorgung der Endothelzellen im Mikrokanal mit Nährstoffen gewährleistet. Dagegen erfolgt die Versorgung der Zellen im umgebenden Kompartiment durch die Zellschicht der Endothelzellen und der porösen PC-Membran. Um die Viabilität der HRA und HBVP im umgebenden Kompartiment zu untersuchen, wurde im Folgenden ein Viabilitätstest mithilfe eines XTT Assays durchgeführt. Dieser Viabilitätstest erlaubt die kolorimetrische Quantifizierung der metabolischen Aktivität der Zellen.²²³ Dabei wird das farblose Tetrazoliumsalz XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) durch die mitochondriale Dehydrogenase zu orangem wasserlöslichem Formazan reduziert (Abbildung 29).^{223,224} Anschließend kann das Formazan photometrisch quantifiziert werden. Diese Reduktion findet ausschließlich durch die mitochondriale Aktivität lebender Zellen statt, und ist somit ein Indikator für viable Zellen.^{223,224}

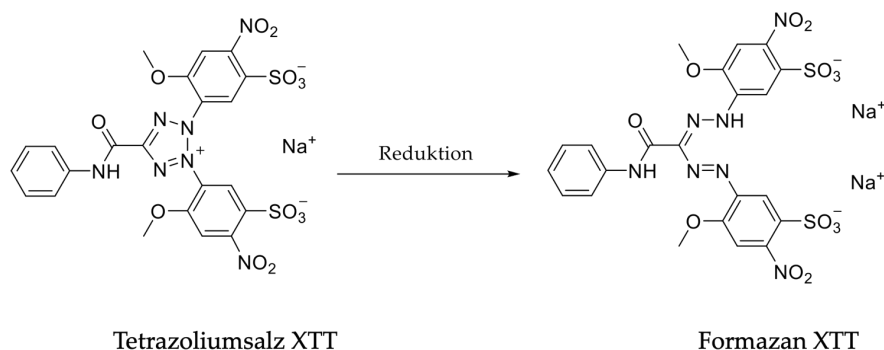


Abbildung 29: Reduktion des farblosen Tetrazoliumsalz XTT durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase zu orangem Formazan.

Für diesen Versuch wurden iBRB-Modelle inklusive HRA und HBVP nach Kapitel 3.1.2.3.1 vorbereitet. Es folgte eine fluidische Kultivierung bei einem Volumenstrom von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$. Zur Kontrolle wurden Kokultur-Modelle im vasQchip unter statischer Kultivierung verwendet. Um die Viabilität der Zellen zeitlich zu verfolgen, wurde an Tag 0, 3, 5 und 7 ein XTT Assay durchgeführt. Dafür wurde das XTT Reagenz ausschließlich in das umgebende Kompartiment eingebracht. Die vasQchips wurden dabei von der Fluidik getrennt und zur Messung der metabolischen Aktivität im XTT-Reagenz statisch inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung zur Quantifizierung der metabolischen Aktivität. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 dargestellt. Die erhaltenen Absorptionsmesswerte (α) wurden auf Tag 0 normiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen durch Integration einer Mikrofluidik eine höhere metabolische Aktivität und damit eine gesteigerte Viabilität aufweisen. So konnten an Tag 3 eine

1,23-fache, an Tag 5 eine 1,61-fache und an Tag 7 eine 1,62-fache Viabilität erzielt werden. Unabhängig davon, wurde in den statischen vasQchips eine Abnahme der Viabilität von Tag 5 auf Tag 7 um näherungsweise 60 % ermittelt. Dies könnte auf eine unzureichende Versorgung der Zellen durch eine statische Kultivierung zurückzuführen sein. Hingegen zeigte eine Kultivierung unter fluidischen Bedingungen eine zunehmende Viabilität der Zellen im umgebenden Kompartiment. So konnte eine gesteigerte Viabilität von Tag 0 auf Tag 5 beobachtet werden. Ab Tag 5 konnte keine signifikante Änderung der metabolischen Aktivität detektiert werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine ausreichende Versorgung der HRA und HBVP im umgebenden Kompartiment des vasQchips mit Nährmedium durch eine fluidische Kultivierung sichergestellt wird.

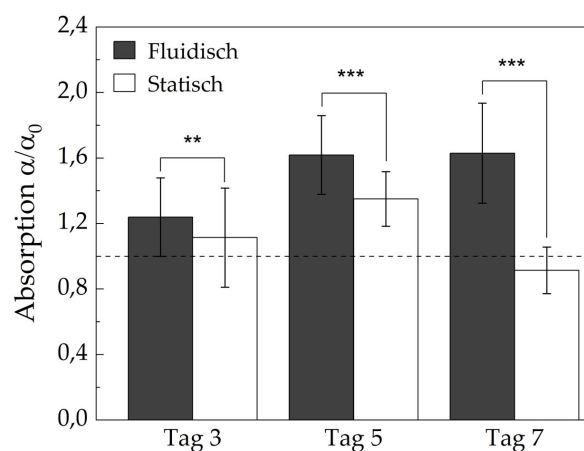


Abbildung 30: Untersuchung der Viabilität im umgebenden Kompartiment des vasQchips. $9,5 \cdot 10^5$ HBVP und HRA wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment ausgesät. Am dritten Tag erfolgte die Besiedlung des mit 1 mg/ml Fibronectin beschichteten Mikrokanal mit $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in EGM-2. Nach einer einstündigen Rotation im vasQturn wurde die Kokultur im vasQchip bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, welche stufenweise erhöht wurde, bei 37 °C und 5 % CO_2 in EGM-2 fluidisch kultiviert. Zur Kontrolle wurden Kokultur-Modelle unter statischer Kultivierung verwendet. An Tag 0, 3, 5 und 7 wurde die Viabilität im umgebenden Kompartiment durch Zugabe des XTT-Reagenz untersucht. Nach einer Inkubation von 5 h konnte die Absorption durch photometrische Messung ermittelt und damit die metabolische Aktivität und Viabilität quantifiziert werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf Tag 0 normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.1.2.3.3 Expression spezifischer Barriere-Marker

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass für eine Rekonstruktion eines *in vivo* artigen iBRB-Modells sowohl der Einfluss benachbarter Zellen der rNVU als auch mechanische Reize wie ein Fluss und daraus resultierende Scherkräfte entscheidend sind.^{150,178} So konnte bereits in Kapitel 3.1.2.2 im statischen Transwell-System nachgewiesen werden, dass Astrozyten und Perizyten einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung einer dichten Barriere im retinalen Endothel ausüben. Dies wurde anhand ähnlicher Resultate aus der Literatur bestätigt.²¹⁵ Im Folgenden wurde die Expression Barriere-spezifischer Proteine in HRMVEC in Kokultivierung mit HRA und HBVP im vasQchip unter fluidischen Bedingungen untersucht. Hierfür wurden

iBRB-Modelle inklusive HRA und HBVP, wie in Kapitel 3.1.2.3.1 beschrieben, vorbereitet und fluidisch kultiviert. Als Kontrolle fungierten vasQchips mit einer reinen HRMVEC-Zellschicht im Mikrokanal. Nach 7 Tagen wurde die Expression spezifischer Barriere-Marker untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend auf die Kontrolle referenziert. Dabei konnte im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Expression der *Tight Junction*-Proteine Occludin ($1,66 \pm 0,82$), ZO-1 ($3,10 \pm 0,94$) und der Efflux-Pumpe P-gp ($3,80 \pm 0,05$) sowie des *Junction*-assoziierten Proteins CD31 ($1,27 \pm 0,50$) ermittelt werden (Abbildung 31). Die stärkste Hochregulation wurde von dem *Adherens Junction*-Protein VE-Cadherin ($12,29 \pm 2,33$) detektiert. Lediglich bei der Efflux-Pumpe BCRP ($0,97 \pm 0,03$) konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dennoch wurde eine Hochregulation der Expression von fünf der untersuchten Proteine erzielt. Damit konnte auch im vasQchip der positive Einfluss von HRA und HBVP auf die Barriere der HRMVEC unter fluidischen Bedingungen bestätigt werden.

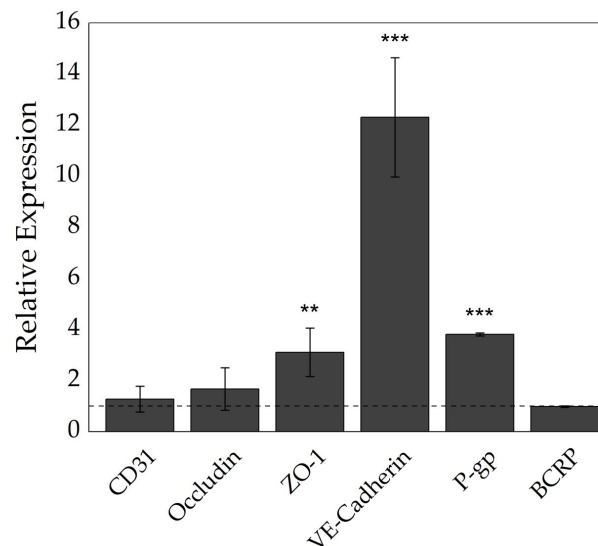


Abbildung 31: Relative mRNA-Expression spezifischer Proteine in HRMVEC bei einer Kokultivierung mit HBVP und HRA im vasQchip. $9,5 \cdot 10^5$ HBVP und HRA wurden nacheinander in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips in EGM-2 ausgesät. Daraufhin erfolgte die Besiedlung von $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in den mit 1 mg/ml Fibronectin beschichteten Mikrokanal. Zur Auskleidung des gesamten Mikrokanals mit HRMVEC wurden die vasQchips im vasQturn für 1 h um ihre eigene Achse rotiert. Im Anschluss folgte eine fluidische Kultivierung der Kokultur bei einer Flussrate von 100 μ l/min für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Zur Kontrolle wurden vasQchips ausschließlich mit HRMVEC besiedelt und ebenfalls fluidisch kultiviert. Daraufhin wurde die RNA der HRMVEC isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression spezifischer Barriere-Proteine mithilfe einer RT-qPCR quantifiziert. Die erhaltenen Werte wurden anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Kontrolle relativiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n=3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.1.2.3.4 Funktionalitätstest P-gp Transporter Assay

Im nächsten Schritt wurde das etablierte iBRB-Modell hinsichtlich seiner Funktion evaluiert. Dazu wurde ein P-gp Transporter Assay durchgeführt. Die Efflux-Pumpe P-gp gehört neben BCRP zu den bekanntesten Efflux-Pumpen der iBRB sowie der BBB.^{103,104} Beide Transporter sind dazu in der

Lage ihr Zielsubstrat aktiv aus der Zelle zu transportieren.¹⁰⁴ Dabei können eingedrungene Xenobiotika sowie therapeutische Wirkstoffe zurück ins Blutssystem befördert werden.¹⁰⁴ Demzufolge ist der Nachweis der Efflux-Pumpen-Aktivität zur Etablierung eines funktionalem iBRB-Modells hinsichtlich einer Wirkstoffuntersuchung von enormer Bedeutung.

Zunächst wurde zur Untersuchung der zellulären Verteilung und Lokalisierung von P-gp eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dafür wurden HRMVEC in Wells eines μ -Slide 8 Wells ausgesät. Nach einer Kultivierung von 7 Tagen wurden die Zellen anschließend zur Visualisierung von VE-Cadherin und P-gp immunhistochemisch gefärbt. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung von P-gp konnte eine Verteilung im Zytosol, Zellkern sowie erwartungsgemäß an den Zellkontaktpunkten in Kolokalisation mit VE-Cadherin detektiert werden (Abbildung 32).

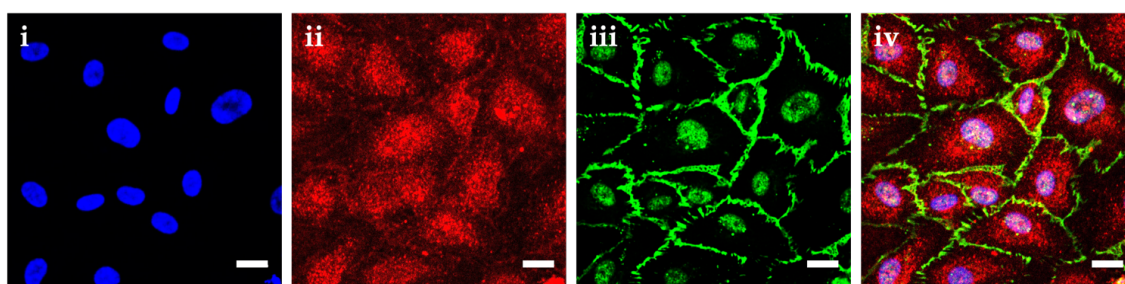


Abbildung 32: Immunfluoreszenzfärbung von P-gp und VE-Cadherin in HRMVEC. $4 \cdot 10^4$ HRMVEC wurden in Wells eines μ -Slide 8 Wells in EGM-2 eingebracht und für 7 Tage bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach erfolgter Kultivierung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Visualisierung der Zellkerne Hoechst33342 gefärbt. (i) Zellkernfärbung mit Hoechst33342, (ii) Immunfluoreszenzfärbung von P-gp, (iii) Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin, (iv) Überlagerung (Leica TCS SPE DMI4000B). Der Maßstabsbalken entspricht $20\ \mu\text{m}$.

Nachdem die Verteilung an den Zellkontaktpunkten nachgewiesen werden konnte, wurde der P-gp Transporter Assay durchgeführt. Hierbei wurde der aktive Transport von Calcein-AM im exzitatorischen und inhibierten Zustand untersucht. Calcein-AM ist ein nicht fluoreszierender lipophiler Ester, welcher in der Lage ist, ungehindert in Zellen zu penetrieren (Abbildung 33).^{225,226}

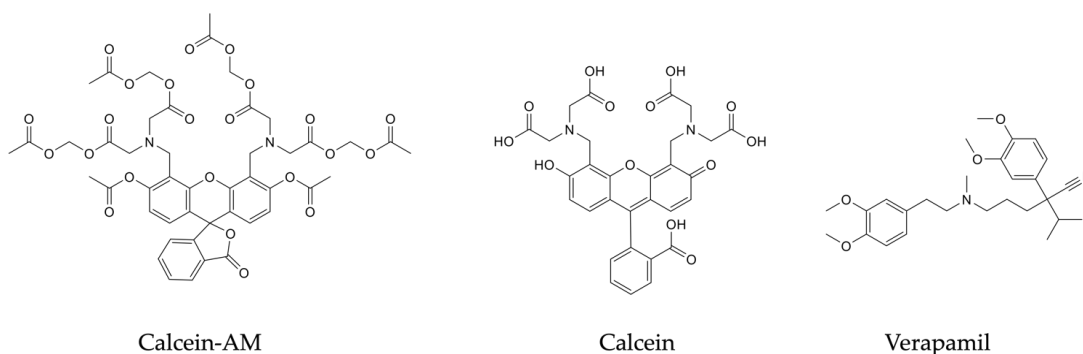


Abbildung 33: Strukturformeln von Calcein-AM, Calcein und Verapamil.

In der Zelle wird Calcein-AM durch die Aktivität von zytosolischen Esterasen zum hydrophilen grün fluoreszierenden Calcein gespalten (Abbildung 33).^{225,226} Im Gegensatz zu Calcein-AM kann Calcein aufgrund seiner Hydrophilität die Zellmembran nicht mehr durch Diffusion ungehindert passieren, sodass der grüne Fluoreszenzfarbstoff intrazellulär in der Zelle akkumuliert.²²⁶ Die Aktivität von P-gp gewährleistet einen Rücktransport von Calcein-AM bevor es zum grün fluoreszierenden Calcein gespalten wird.^{76,213} Durch eine Inhibition von P-gp mit einem affinen Inhibitor wie Verapamil wird der Transport von Calcein-AM aus der Zelle verhindert.^{14,28,213,227} Infolgedessen kann Calcein-AM zum grün fluoreszierenden Calcein gespalten werden. Dies führt zu einer verstärkten Akkumulation von Calcein im Zytosol der Zellen. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie und anschließender Quantifizierung mit Fiji konnte die Fluoreszenzsteigerung ermittelt werden. Das Prinzip des P-gp Transporter Assays ist in Abbildung 34 dargestellt.

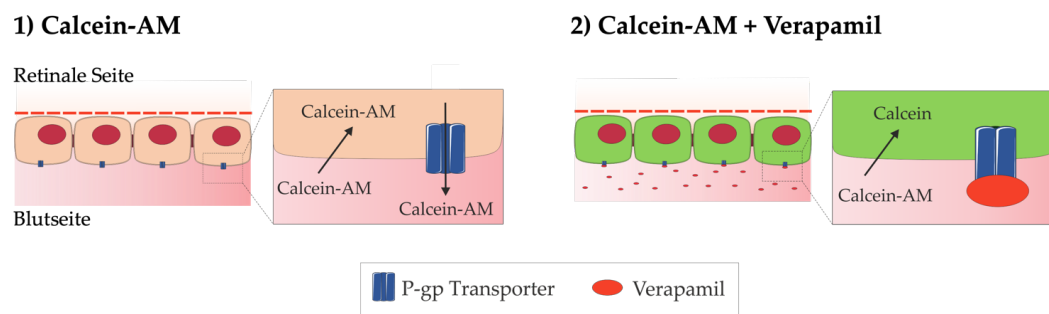


Abbildung 34: Schematische Darstellung des P-gp Transporter Assays. Das nicht fluoreszierende Calcein-AM kann ungehindert in die Zelle penetrieren. Im exzitatorischen Zustand wird das Calcein-AM bevor es durch Esterasen zum grün fluoreszierenden Calcein gespalten werden kann durch die Aktivität der Efflux-Pumpe P-gp zurück ins Blutsystem transportiert. Im inhibitorischen Zustand inhibiert Verapamil die Aktivität der Efflux-Pumpe, sodass der Rücktransport des Calcein-AMs verhindert wird. Dies resultiert in einer Akkumulation von Calcein-AM in der Zelle, welches folglich zu Calcein gespalten werden kann.

Für diesen Versuch wurde das iBRB-Modell inklusive HRA und HBVP nach Kapitel 3.1.2.3.1 rekonstruiert und fluidisch kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die Kokultur-Modelle zur Inhibition der P-gp Aktivität mit Verapamil behandelt. Im Anschluss wurde zum Inhibitor das Calcein-AM eingebracht und erneut bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Dabei erfolgte die Zugabe des Inhibitors sowie des Zielsubstrats ausschließlich im Mikrokanal. Um eine Fluoreszenzsteigerung quantifizieren zu können, wurden analog dazu Kokultur-Modelle ausschließlich mit Calcein-AM behandelt. Als Nullwert wurden unbehandelte iBRB-Modelle verwendet, um die Fluoreszenzsteigerung unabhängig von der Eigenfluoreszenz der Zellen ermitteln zu können. Nach erfolgter Inkubation wurde die Fluoreszenz der HRMVEC mithilfe inverser Konfokalmikroskopie visualisiert und anschließend mit Fiji quantifiziert. Die ermittelten relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in Differenz zum Nullwert sind in Abbildung 35 dargestellt. Werden die beiden Werte miteinander verglichen, so konnte durch die von Verapamil inhibierte P-gp Aktivität eine 1,27-fache Fluoreszenzintensität und eine damit erhöhte zelluläre Akkumulation von Calcein bestimmt werden.

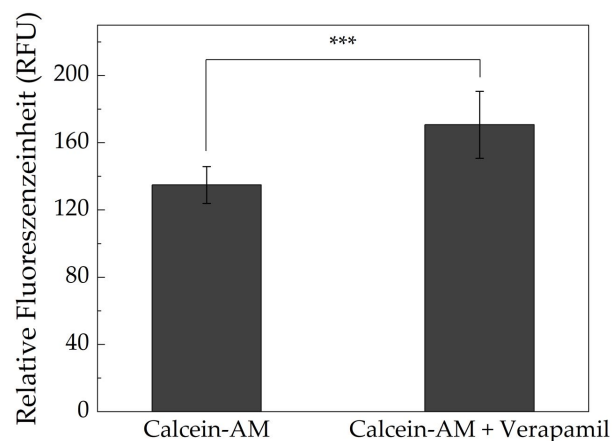


Abbildung 35: P-gp Transporter Assay mit Calcein-AM und dem Inhibitor Verapamil im vasQchip. $9,5 \cdot 10^5$ HBVP und HRA wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips in EGM-2 eingebracht. Am Folgetag konnten $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in den mit 1 mg/ml Fibronektin beschichteten Mikrokanal besiedelt werden. Nach einer einstündigen Rotation im vasQturn zur Auskleidung des gesamten Mikrokanals, erfolgte eine fluidische Kultivierung der Kokultur bei einem Volumenstrom von $100 \mu\text{l}/\text{min}$ für 7 Tage bei 37°C und 5 % CO_2 in EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Im Anschluss wurde ein P-gp Transporter Assay durchgeführt. Hierbei wurden vasQchips mit ausschließlich Calcein-AM sowie simultan mit Calcein-AM und Verapamil im Mikrokanal behandelt. Als Nullwert wurden unbehandelte vasQchips verwendet. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurde die Fluoreszenz von Calcein visualisiert und mithilfe von Fiji quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Anhand dieses Resultats konnte die Funktionalität der Efflux-Pumpe P-gp im etablierten iBRB-Modell inklusive HRA und HBVP validiert werden. Obwohl der P-gp Assay bereits häufig in der Literatur vorgestellt wurde, konnte aufgrund unterschiedlicher verwendeter Substrate sowie anderer Barriere-Modelle nur ein indirekter Vergleich zur Literatur erfolgen. So konnten Maines *et al.* im iBRB-Modell aus retinalen Rinderendothelzellen eine 3,66-fache Akkumulation des Substrats Taxol durch eine Verapamil-induzierte Inhibition von P-gp feststellen.²²⁸ Auch Chapy *et al.* konnten vergleichbare Erkenntnisse in Mäusen durch eine Inhibition der Efflux-Pumpe P-gp mit Valspodar sowie Elacridar erhalten.¹⁰⁴ Darüber hinaus erzielten Dr. R. Pfister und Dr. D. Ivannikov in ihren etablierten BBB-Modellen im vasQchip eine erhöhte zelluläre Akkumulation von Calcein durch Inhibition mit Verapamil.^{14,76} Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals der Nachweis einer P-gp Aktivität in einem fluidischen iBRB-Modell inklusive Astrozyten und Perizyten erbracht werden.

3.1.2.3.5 Kapitelzusammenfassung Etablierung der iBRB inklusive Perizyten und Astrozyten im vasQchip

Mithilfe von Genexpressionsanalysen, Immunfluoreszenzfärbungen, Viabilitätstests und einem Funktionalitätstest konnte das etablierte iBRB-Modell im vasQchip auf seine Funktion charakterisiert und evaluiert werden. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass für eine Rekonstruktion eines authentischen rNVU-Modells eine Integration weiterer Zelltypen wie Mikroglia und Neuronen erforderlich ist. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit ein iBRB-Modell bestehend

aus HRMVEC, HRA und HBVP rekonstruiert werden, welches als Basis für weitere Modifizierungen und Inkorporation weiterer Zelltypen fungieren kann.

3.1.3 Hydrogele als EZM-imitierende Stützmatrix

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein fluidisches iBRB-Modell inklusive HRA und HBVP erfolgreich im vasQchip rekonstruiert werden. Allerdings handelt es sich hierbei bislang um ein zweidimensionales Modell, welches die naturgetreue dreidimensionale Anordnung der Zellen in der Retina unzureichend repräsentiert. *In vivo* organisiert die EZM neben der Stütz- und Gerüstfunktion die Formgebung, Zugfestigkeit und die Elastizität eines Gewebes.²²⁹ Um eine dreidimensionale Anordnung der Zellen im vasQchip zu generieren, ist eine Stützmatrix, die der Funktion der natürlichen EZM nachkommt, essentiell. Dabei sollte diese spezifische Zell-Matrix-Kontakte begünstigen, wodurch ein Wachstum in unterschiedliche Ebenen der Gelmatrix zur Ausbildung eines dreidimensionalen zellulären Netzwerks erfolgen kann.^{57,230} Im Folgenden wurde ein natürliches Hydrogel basierend auf Kollagen I sowie das semi-synthetische Gelatine-basierte Hydrogel GelMA (Gelatine-Methacrylat) untersucht. Beide Hydrogelkandidaten eignen sich aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur EZM sowie ihrer Biokompatibilität zum Aufbau von dreidimensionalen Gewebemodellen.²³¹ *In vivo* umschließen Perizyten flach das von Endothelzellen gebildete Blutgefäß, wohingegen Astrozyten in der rNVU als dynamischer Bestandteil eines ausgeprägten zellulären Netzwerks vorliegen.²³² Daher wurden HRA gewählt, um die Eignung der beiden Hydrogele als Stützmatrizes für das etablierte iBRB-Modell zu überprüfen. Hierbei wurde die Zellviabilität, die zelluläre Ausrichtung sowie die Netzwerkbildung analysiert.

3.1.3.1 Kollagen I-Hydrogel

Die fibrillären Kollagene sind als natürliche Strukturproteine ein essentieller Bestandteil der EZM.¹⁹⁶ Aufgrund ihrer hochgradig organisierten Struktur besitzen sie eine hohe Elastizität und Zugfestigkeit.²³³ Kollagene weisen neben Spaltsequenzen für Matrix-Metalloproteasen (MMP), vielzählige RGD-Sequenzen auf, welche als Bindungsstellen eine Adhäsion der Zellen in der EZM ermöglichen.²³⁴ Infolgedessen finden natürliche Kollagen-basierte Hydrogele als Stützmatrix von dreidimensionalen Gewebemodellen häufig Verwendung. Dabei wird überwiegend das Kollagen Typ I aufgrund der einfachen Extraktion sowie der vielseitigen Anwendungsbereiche verwendet.²³⁵ Im Gegensatz zu semi-synthetischen Hydrogelen wird eine Vernetzung des Kollagen I-Hydrogels physikalisch durch Änderung des pH-Werts sowie der Temperatur induziert.¹⁴

3.1.3.1.1 Kultivierung der HRA im Kollagen I-Hydrogel

Zur Generierung der Kollagen I-Hydrogele wurden Kollagen I-Konzentrationen von 1 mg/ml sowie 2 mg/ml gewählt. Für eine dreidimensionale Einbettung der HRA, wurde eine Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in die Gelmatrix eingebracht. Im Anschluss erfolgte eine physikalische Polymerisation durch Zugabe von NaOH und einer 30-minütigen Inkubation

bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach konnten die vernetzten Kollagen I-Hydrogele mit EGM-2 überschichtet und für 14 Tage kultiviert werden. Um dabei die Viabilität, die Ausrichtung und die Netzwerkbildung der HRA beurteilen zu können, wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM und Propidiumiodid (PI) durchgeführt (Abbildung 36). Wie zuvor in Kapitel 3.1.2.3.4 beschrieben ist Calcein-AM ein nichtfluoreszierender Ester, welcher ungehindert in lebende Zellen penetrieren kann. In der Zelle wird Calcein-AM anschließend durch zytosolische Esterasen zum grün fluoreszierenden Calcein gespalten. Da dieser Vorgang ausschließlich in lebenden Zellen stattfindet, wird Calcein-AM häufig als Marker für viable Zellen verwendet.²²⁶ Neben Calcein-AM zur Detektion lebender Zellen kann Propidiumiodid (PI) zum Nachweis nekrotischer Zellen eingesetzt werden.²²⁶ Nekrotische Zellen weisen im Vergleich zu lebenden Zellen eine funktionsunfähige Zellmembran auf.²³⁶ Dies ermöglicht dem rot fluoreszierenden PI in die DNA nekrotischer Zellen zu interkalieren. Eine Penetration von PI in lebende Zellen kann damit nicht erfolgen.²³⁶ Die Kofärbung aus Calcein-AM sowie PI erlaubt somit eine simultane Charakterisierung von lebenden und nekrotischen Zellen.

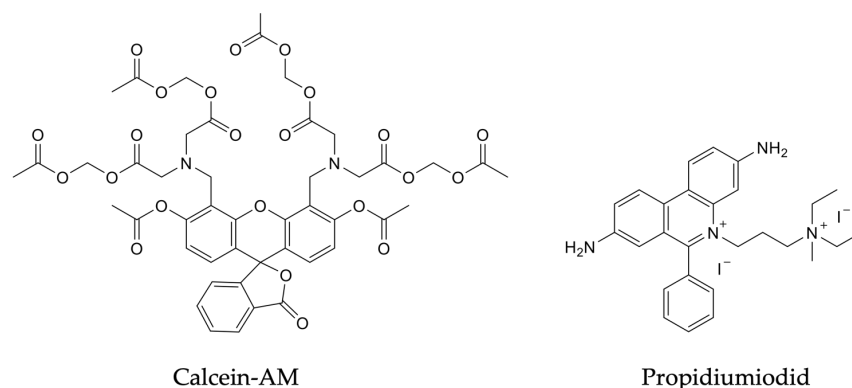


Abbildung 36: Strukturformeln von Calcein-AM und Propidiumiodid.

Eine Lebend-/Tot-Färbung der eingebetteten HRA wurde an Tag 1, 7 und 14 durchgeführt. Mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden *z-stack* Messungen in einer Höhe von 300 µm erzeugt. Anschließend konnten 3D-Projektionen sowie an Tag 14 eine Tiefenfärbung zur Visualisierung der HRA generiert werden (Abbildung 37). Zudem wurde mithilfe von Fiji der prozentuale Anteil der lebenden und nekrotischen Zellen quantifiziert (Abbildung 38). Es konnte in den 1 mg/ml sowie 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen eine hohe Viabilität von mindestens 89,18 % über einen Zeitraum von 14 Tagen erzielt werden. Darüber hinaus wurde bereits an Tag 1 eine leichte zelluläre Ausrichtung bei 2 mg/ml Kollagen I und eine starke zelluläre Ausrichtung bei 1 mg/ml Kollagen I beobachtet. Eine längere Kultivierung über weitere 13 Tage resultierte in einer Ausbildung eines dichten zellulären Netzwerks der HRA. Anhand der Tiefenfärbung an Tag 14 konnte jedoch eine Abnahme der Hydrogeldicke um 50-180 µm detektiert werden. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf die geringen mechanischen Eigenschaften des natürlichen Kollagen I-Hydrogels zurückzuführen.²³⁷ Dennoch konnte ein ausgeprägtes zelluläres Netzwerk der HRA über mehrere z-Ebenen in den 1 mg/ml sowie 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen erzielt werden.

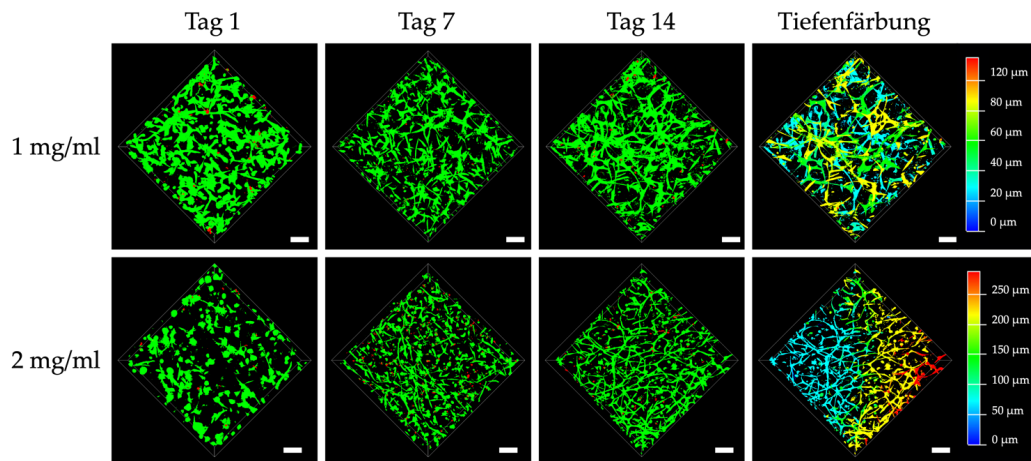


Abbildung 37: Lebend-/Tot-Färbung von HRA in 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen. HRA wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ Gelmatrix eingebettet. Anschließend folgte eine Kultivierung über 14 Tage bei 5 % CO_2 und 37°C in EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7 und 14 wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Mithilfe von inverser Konfokalmikroskopie konnten durch *z-stack* Messungen durchgeführt werden ($n = 60$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 300 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). 3D-Projektionen und Tiefenfärbung konnten mithilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$.

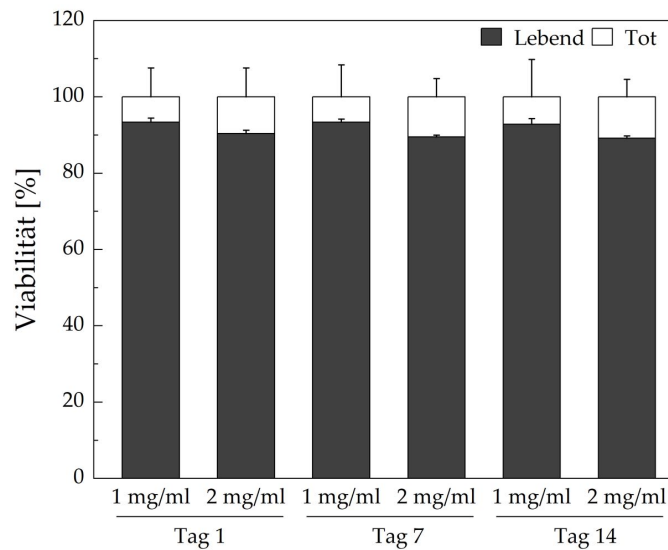


Abbildung 38: Viabilität der HRA in 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogele über 14 Tage. HRA wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ Gelmatrix eingebettet und über einen Zeitraum von 14 Tagen in EGM-2 kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7 und 14 erfolgte eine Visualisierung der nekrotischen und lebenden Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung mithilfe von Calcein-AM und PI. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurde die Viabilität visualisiert. Mithilfe von Fiji konnte der prozentuale Anteil nekrotischer und lebender Zellen in der Gelmatrix quantifiziert werden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.1.3.2 GelMA-Hydrogel

Eine Alternative zum Kollagen I-Hydrogel ist das semi-synthetische Gelatine-basierte GelMA-Hydrogel. Im Vergleich zum Kollagen I-Hydrogel, besitzt das GelMA-Hydrogel stabilere Eigenschaften, eine bessere Löslichkeit, geringere Herstellungskosten sowie eine niedrigere Antigenität.⁶⁵ Aufgrund der hohen Biokompatibilität und der biologischen und chemischen Modifizierbarkeit werden GelMA-Hydrogele zahlreich in der Literatur im *Tissue Engineering* vorgestellt.^{60,63,65} Durch Verwendung von Gelatine als Ausgangsstoff können Stützmatrizes mit zahlreichen RGD-Zelladhäsionsmotiven, MMP-Spaltsequenzen und EZM-ähnlichen Eigenschaften hergestellt werden.^{60,65}

3.1.3.2.1 Synthese und Charakterisierung des GelMA-Hydrogels

Die GelMA-Synthese wurde nach Van Den Bulcke *et al.* durchgeführt.²³⁸ Die anschließende chemische Charakterisierung erfolgte durch M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) und M. Sc. S. Leopold (IFG, KIT) durch Durchführung eines TNBSA Assays, wobei der prozentuale Anteil modifizierter freier Aminogruppen ermittelt wurde.²³⁹ Das Prinzip der GelMA-Synthese beruht auf der chemischen Funktionalisierung der Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid (MAA) zum Photopolymer GelMA. Hierbei werden die Lysin- sowie die Hydroxylsitenketten der Gelatine durch nucleophile Acylsubstitution mit MAA unter Abspaltung von Methacrylat als Abgangsgruppe, modifiziert (Abbildung 39).^{60,65,238} Eine Zugabe unterschiedlicher Mengen an MAA bestimmt dabei den Grad der Funktionalisierung der GelMA-Photopolymere. Diese beeinflussen zum einen die Steifigkeit und zum anderen den Vernetzungsgrad des GelMA-Hydrogels. Nach erfolgter Reaktion konnte durch eine Dialyse über 7 Tage überschüssiges nicht reagiertes MAA sowie das Abspaltprodukt Methacrylat durch Diffusion gegen destilliertes Wasser entfernt werden. Im Anschluss wurde durch Lyophilisation ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde.

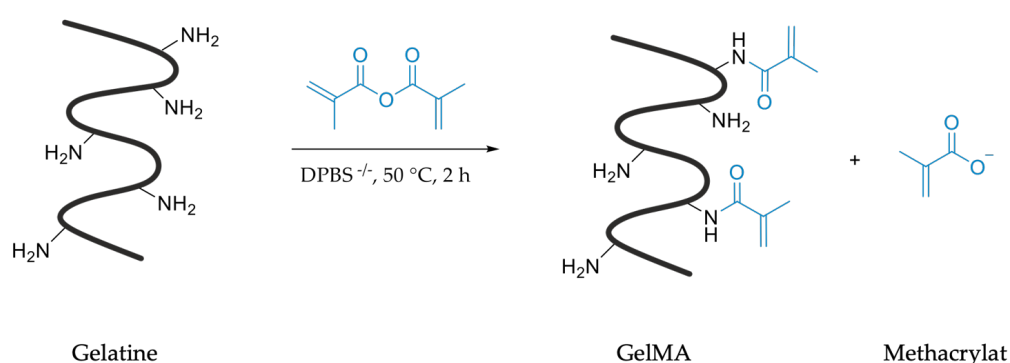


Abbildung 39: Funktionalisierung der Gelatine mit Methacrylsäureanhydrid (MAA) zum Photopolymer GelMA unter Abspaltung von Methacrylat als Abgangsgruppe. Nach Van Den Bulcke.²³⁸

Unter Zugabe eines Photoinitiators, sowie Bestrahlung mit Licht von geeigneter Wellenlänge (320-500 nm), kann eine kovalente Vernetzung der GelMA-Photopolymere photochemisch in kurzer Zeit induziert werden. Ein Vorteil dieser kovalenten Bindung zwischen den modifizierten

Gelatinesträngen ist unter anderem die thermische Stabilität unter physiologischen Bedingungen.²⁴⁰ In dieser Arbeit wurde als Photoinitiator Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP) verwendet (Abbildung 40). LAP ist ein radikalischer Photoinitiator, der häufig zur Initiierung der Kettenpolymerisation mit GelMA-Hydrogelen verwendet wird.^{241,242} Zudem weist LAP eine gute Wasserlöslichkeit sowie, im Vergleich zu anderen Photoinitiatoren, eine geringere Zytotoxizität auf, was zur Einbettung von Zellen in eine Gelmatrix von Vorteil ist.²⁴¹

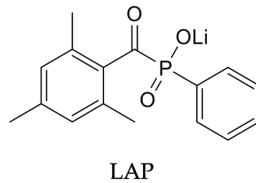


Abbildung 40: Strukturformel des Photoinitiators LAP.

Die Vernetzung der modifizierten Gelatinestränge durch Reaktion der Methacrylat-Gruppen untereinander nach Initiation durch LAP ist in Abbildung 41 dargestellt.

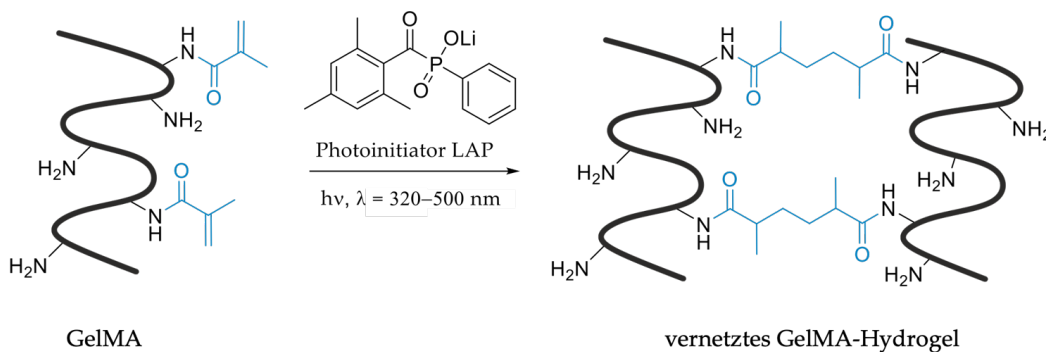


Abbildung 41: Vernetzung des GelMA-Hydrogelvorläufers zum GelMA-Hydrogel unter Bestrahlung von Licht und Zugabe eines Photoinitiators.

Im Folgenden wurden drei GelMA-Hydrogele unterschiedlicher Vernetzungsdichte verwendet, welche als GelMA *Low*, *Medium* und *High* bezeichnet werden. Mithilfe einer rheologischen Untersuchung konnten für die GelMA-Hydrogele *Low*, *Medium* und *High* Speichermodule (G') von 48 Pa, 325 Pa und 463 Pa bestimmt werden.²⁴³ Damit lagen die ermittelten Speichermodule (mit Ausnahme von GelMA *Low*) im Bereich der Steifigkeit von retinalem Gewebe (200-800 Pa).²⁴⁴

3.1.3.2.2 Toxizität von LAP

Neben den Vorteilen von LAP für die Zellkultur ist der Zerfall des Photoinitiators in freie, hochreaktive Radikale unter Lichteinwirkung, bezeichnet als Photolyse, von potentieller zytotoxischer und mutagener Wirkung.²⁴¹ Um die Zytotoxizität des Photoinitiators LAP ohne sowie unter Lichteinwirkung zu beurteilen, wurde ein Toxizitätstest mithilfe eines MTT Assays durchgeführt. Der MTT-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Quantifizierung der

metabolischen Zellaktivität von lebenden Zellen. Dabei wird ähnlich wie im XTT Assay in Kapitel 3.1.2.3.2 das wasserlösliche gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum unlöslichen violetten Formazan reduziert (Abbildung 42).^{224,245} Das unlösliche Formazan kann die Zellmembran nicht passieren und akkumuliert daher in der Zelle.²⁴⁵ Diese Reaktion findet ausschließlich in lebenden Zellen statt.²⁴⁵ Zur Quantifizierung der Zellviabilität wird die Absorption des unlöslichen Formazan photometrisch gemessen.²⁴⁶ Die erhaltenen Ergebnisse werden anschließend auf die Lebend- und Totkontrollen normiert, um den prozentualen Anteil der lebenden Zellen zu ermitteln.

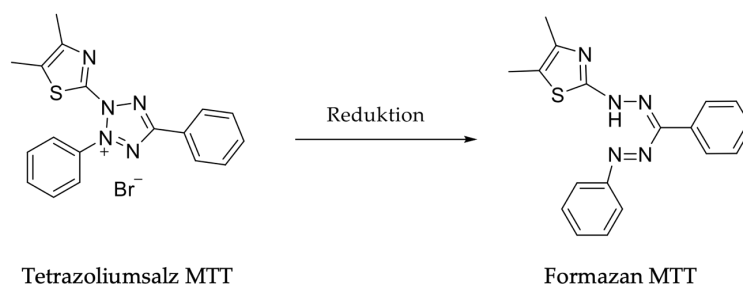


Abbildung 42: Reduktion des Tetrazoliumsalz MTT durch die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen zu Formazan.

Zur Untersuchung der Toxizität von LAP wurden HRA mit sechs unterschiedlichen LAP-Konzentrationen von 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % und 0,5 % behandelt und für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Wie zuvor erwähnt, zerfällt der Photoinitiator unter Lichtbestrahlung in potentiell zytotoxische Radikale. Daher wurden in einem separaten Versuch die mit LAP behandelten Zellen für 30 s mit einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² bestrahlt. Das Ergebnis der beiden Versuche ist in Abbildung 43 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der HRA durch Zunahme der LAP-Konzentration abnimmt. So konnten LD₅₀-Werte von 0,046 % (bestrahlt) und 0,091 % (unbestrahlt) ermittelt werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte zudem eine geringe Zunahme der Zytotoxizität des Photoinitiators durch Bestrahlung mit Licht festgestellt werden.²⁴⁷ Die Resultate des Versuches zeigten, dass die LAP-Konzentration möglichst geringgehalten werden sollte. Zur Vernetzung der GelMA-Hydrogelvorläufer wird herkömmlich eine LAP-Konzentration von 0,3 % verwendet. Bei dieser Konzentration konnte unter Bestrahlung eine Viabilität von 22,7 % erzielt werden. Jedoch ist hier zu beachten, dass die durch Photolyse entstandenen freien kurzlebigen Radikale des LAP durch den Mediumwechsel aus der Gelmatrix abgetragen werden und damit in ihrer Konzentration verdünnt werden. Dadurch könnten geringere zytotoxische Effekte erzielt werden. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Versuche eine LAP-Konzentration von 0,3 % verwendet.

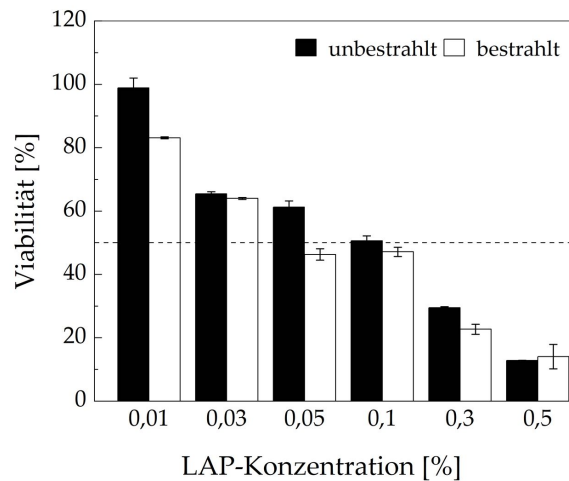


Abbildung 43: Toxizität des Photoinitiators LAP. $1 \cdot 10^4$ HRA wurden in Wells einer 96-Well-Platte in ihrem Spezialmedium AM ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit unterschiedlichen LAP-Konzentrationen für 72 h behandelt. Die Behandlung erfolgte mit sowie ohne Bestrahlung für 30 s bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 (Omniculture S2000, 320-500 nm). Die Viabilität wurde anschließend mithilfe eines MTT Assays quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ unabhängigen Proben ermittelt.

3.1.3.2.3 Toxizität der Bestrahlung

Um die Reaktion zur Vernetzung des GelMA-Hydrogels mithilfe von LAP zu initiieren, wird Licht der Wellenlänge 320-500 nm verwendet. Eine Bestrahlung dieser Wellenlänge kann in Zellen zu letalen DNA-Schäden, zur Bildung von ROS sowie zu Mutationen der DNA führen und damit eine verringerte Viabilität der Zellen induzieren.²⁴⁸ Zur Untersuchung möglicher zytotoxischer Einwirkungen der kurzwelligen Strahlung, wurde im Folgenden die Toxizität mithilfe eines MTT Assays untersucht. Hierfür wurden HRA in lichtundurchlässige 96-Well-Platten ausgesät, um eine unerwünschte Streuung des Lichts in angrenzende Wells zu verhindern. Anschließend wurden unterschiedliche Bestrahlungszeiten von 10 s, 30 s und 60 s in Kombination mit den Leistungsdichten 500 mW/cm^2 , 1000 mW/cm^2 und 5000 mW/cm^2 getestet. Dabei wurde überprüft, ob eine kürzere Bestrahlungszeit bei höherer Leistungsdichte eine geringere Toxizität aufweist. Anschließend folgte eine Kultivierung für 72 h bei 5 % CO_2 und 37°C . Die erhaltenen Viabilitätswerte des MTT Assays sind in Abbildung 44 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Bestrahlungszeiten sowie der Leistungsdichte detektiert werden. Somit lag die Viabilität stets zwischen 95,90 % und 97,17 %, sodass kein LD_{50} -Wert ermittelt werden konnte. Hierbei ist zu beachten, dass der MTT Assay lediglich die Viabilität der Zellen untersucht, und damit keine Informationen bezüglich potentiellen, nicht-letalen DNA-Schäden oder Mutationen liefern kann. Daher sollte die Leistungsdichte sowie Bestrahlungsdauer möglichst geringgehalten werden. Aus diesem Grund wurde die Leistungsdichte 500 mW/cm^2 und die Bestrahlungszeit 30 s für nachfolgende Versuche gewählt.

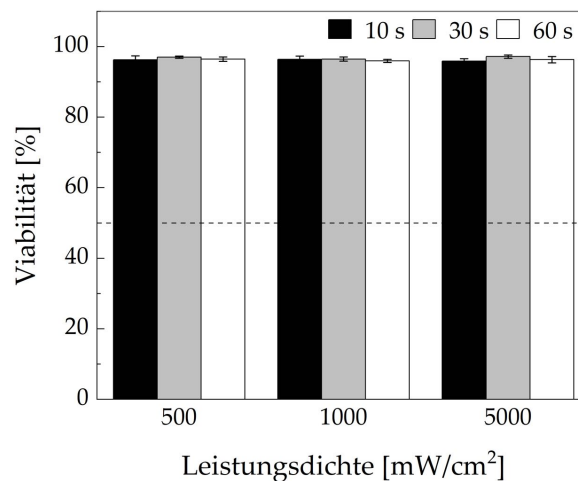


Abbildung 44: Toxizität der Bestrahlung. Für den Toxizitätstest wurden $1 \cdot 10^4$ HRA in lichtundurchlässige Wells einer 96-Well-Platte in ihrem Spezialmedium AM ausgesät. Nach 24 h folgte eine Bestrahlung (320-500 nm, Omnicure S2000) mit unterschiedlichen Leistungsdichten in Korrelation mit verschiedenen Bestrahlungszeiten. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mithilfe des MTT Assays quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.1.3.2.4 Kultivierung von HRA in GelMA

Nachdem eine geeignete LAP-Konzentration sowie Leistungsdichte und Bestrahlungszeit ermittelt werden konnten, wurden HRA in das GelMA-Hydrogel eingebracht. Hierfür wurden die drei unterschiedlichen Vernetzungsgrade von GelMA *Low*, *Medium* und *High* in einer Konzentration von 5 % verwendet. Bereits in der Literatur konnten Celikkin *et al.* zeigen, dass eine Polymer-Konzentration von 5 % für Geweberekonstruktionen geeignet ist.²⁴⁹ Zur Einbettung der HRA im Gel wurden Zellen einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in der entsprechenden Gelmatrix eingeschlossen. Eine Vernetzung des GelMA-Hydrogels wurde durch 0,3 % LAP initiiert und für 30 s bei 500 mW/cm^2 auspolymerisiert. Das Zeitintervall zur Vernetzung mit 30 s ist im Vergleich zum Kollagen I-Hydrogel mit 30 min wesentlich kürzer. Durch eine kürzere Vernetzungszeit wird das Absinken der Zellen verhindert, sodass eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen im Hydrogel sichergestellt wird. Nach erfolgter Vernetzung der GelMA-Hydrogele wurden diese mit EGM-2 überschichtet und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 über 14 Tage kultiviert. Um die Viabilität, zelluläre Ausrichtung und Netzwerkbildung der eingeschlossenen HRA zu beurteilen, wurde an Tag 1, 7 und 14 eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt. Durch fluoreszente Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen in einer Höhe von $300 \text{ }\mu\text{m}$ durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 aufgeführt. Um die Viabilität der eingebetteten HRA zu quantifizieren, wurde zusätzlich der prozentuale Anteil lebender und nekrotischer Zellen mithilfe von Fiji quantifiziert (Abbildung 46).

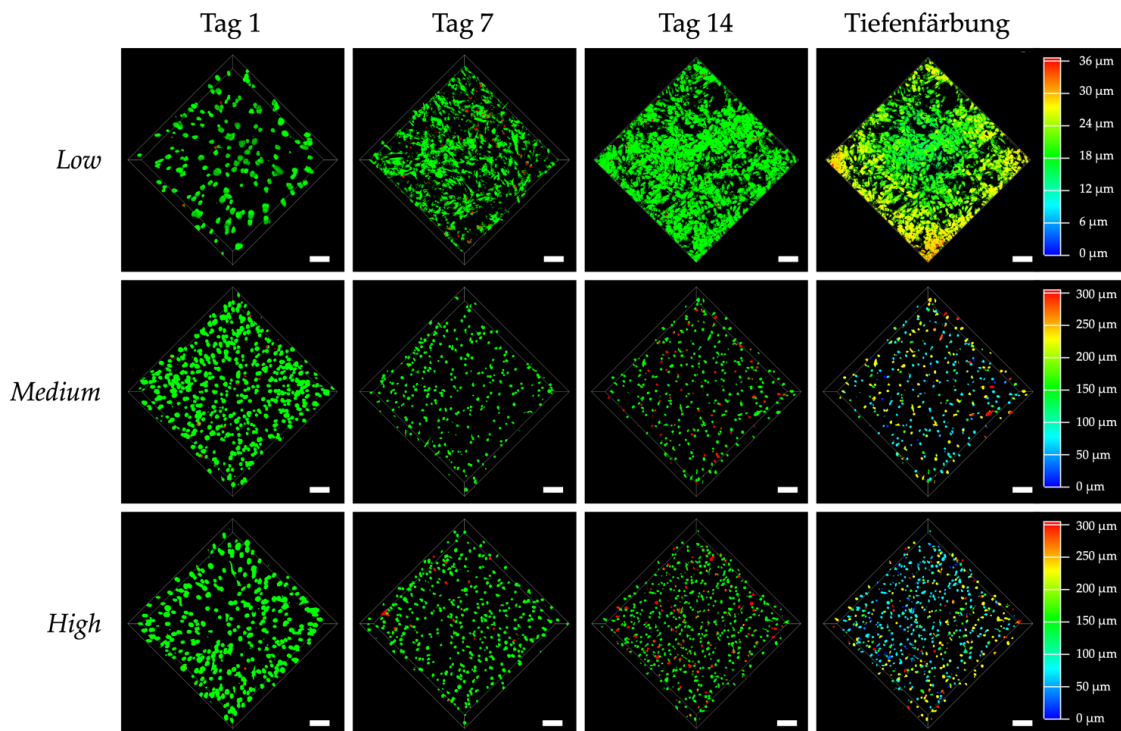


Abbildung 45: Lebend-/Tot-Färbung von HRA im GelMA-Hydrogel. HRA wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ der Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurden GelMA-Hydrogele der Vernetzungsgrade *Low*, *Medium* und *High* verwendet. Die kovalente Vernetzung wurde durch Zugabe von 0,3 % LAP und einer Bestrahlungsdauer von 30 s bei 500 mW/cm^2 induziert (Omniculture S2000, 320-500 nm). Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7 und 14 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 60$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 300 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Mit der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden. Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$.

Über den Zeitraum von Tag 1 bis einschließlich Tag 14 konnte eine hohe Viabilität zwischen 83,54 % und 99,09 % erzielt werden. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass eine LAP-Konzentration von 0,3 % keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der HRA ausübt. Damit wurde die Hypothese aus Kapitel 3.1.3.2.2, dass die in den Vorversuchen bestimmte Toxizität durch den Mediumwechsel erheblich verringert wird, bestätigt. Darüber hinaus konnte in GelMA *Low* ähnlich wie bei den Kollagen I-Hydrogelen eine Degradierung der Gelmatrix ab Tag 7 detektiert werden. Anhand der Tiefenfärbung wurde nach 14 Tagen nur noch eine planare Zellschicht festgestellt. Aufgrund des starken Degradationsverhaltens von GelMA *Low* ist dieses Hydrogel als Stützmatrix zur Kultivierung der HRA nicht geeignet. Im Vergleich dazu konnte bei GelMA *Medium* und *High* keine Degradierung der Hydrogele festgestellt werden. Somit blieb das Volumen der Gelmatrix in diesen beiden GelMA-Hydrogelen über 14 Tage konstant.

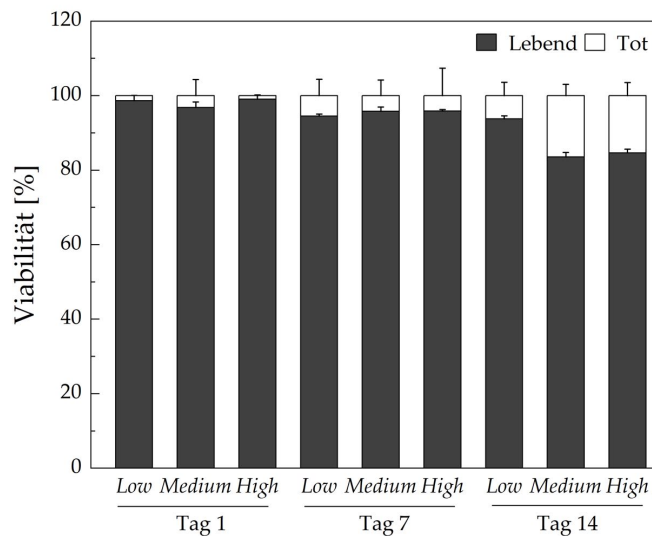


Abbildung 46: Viabilität der HRA in GelMA-Hydrogelen über einen Zeitraum von 14 Tagen. HRA der Konzentration $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden in 200 μ l Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurden GelMA-Hydrogele der Vernetzungsgrade *Low*, *Medium* und *High* verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % LAP und einer Bestrahlung von 30 s bei 500 mW/cm^2 wurde eine kovalente Vernetzung der Hydrogele induziert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7 und 14 erfolgte zur Beurteilung der Viabilität eine Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein AM und PI. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde die Färbung visualisiert und mithilfe von Fiji der prozentuale Anteil der nekrotischen und lebenden Zellen quantifiziert.

3.1.3.3 Kapitelzusammenfassung Hydrogele als EZM-imitierende Stützmatrix

Im Vergleich zum Kollagen I-Hydrogel konnte trotz hoher Viabilität und stabiler Stützmatrix keine zelluläre Ausrichtung sowie Netzwerkbildung in den GelMA-Hydrogelen *Medium* und *High* erzielt werden. Auch durch Einbringung von Kollagen I-Konzentrationen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml in die Gelmatrix des 5%igen GelMA *Medium* (Abbildung 135 Anhang) wurde keine zelluläre Ausrichtung der HRA beobachtet. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Polymer-Konzentration von 5 % zur Ausrichtung und Netzwerkbildung der HRA in den GelMA-Hydrogelen *Medium* und *High* trotz hoher Viabilität nicht geeignet ist. Zukünftig könnten geringere Polymer-Konzentrationen von GelMA *Medium* und *High* getestet werden. Des Weiteren könnte durch Zugabe weiterer EZM-Matrixproteine der Anteil an essentiellen RGD-Zelladhäsionsmotiven erhöht werden, um eine zelluläre Ausrichtung der Zellen im GelMA-Hydrogel zu begünstigen.

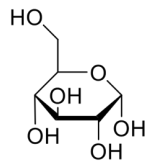
3.1.4 Modellierung der diabetischen Retinopathie

Die diabetische Retinopathie ist eine der Hauptursachen für starke Sehbeeinträchtigungen bis hin zur Erblindung bei Menschen der westlichen Zivilisation und ist bis heute nicht heilbar.^{102,113,151} Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, wird die diabetische Retinopathie durch die Hyperglykämie in Diabetes mellitus hervorgerufen. Diese führt zu einem Verlust der Barrierefunktion der iBRB, zu Mikroaneurysmen sowie zur Neovaskularisation durch den Kapillarverschluss. Darüber hinaus induziert die Hyperglykämie den Ausfall der Perizyten, was mit einer Degeneration der retinalen

Blutkapillaren korreliert.^{250,251} Im letzten Schritt wurde das in Kapitel 3.1.2.3 im vasQchip etablierte iBRB-Modell inklusive Astrozyten und Perizyten gezielt so verändert, dass es das Krankheitsbild einer diabetischen Retinopathie abbildet. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus zur Modellierung dieser degenerativen Erkrankung auf dem durch Hyperglykämie verursachtem Funktionsverlust der Barriere in den retinalen Endothelzellen. Um *in vitro* hyperglykämische Bedingungen zu schaffen, wurden die Zellen des etablierten Kokultur-Modells mit einer hohen Konzentration an D-(+)-Glucose (hyperglykämisch) behandelt. Anschließend wurde die Barriereintegrität der HRMVEC mithilfe von Genexpressionsanalysen und Permeabilitätsmessungen analysiert. Im letzten Schritt konnte durch Zugabe eines potentiellen Wirkstoffes die Wiederherstellung der Barrierefunktion in HRMVEC untersucht werden.

3.1.4.1 Toxizität von D-(+)-Glucose

Bevor der Einfluss der Hyperglykämie auf die Barrierefunktion des iBRB-Modells untersucht werden konnte, wurde zunächst die Toxizität von D-(+)-Glucose (Abbildung 47) auf HRMVEC, HRA sowie HBVP überprüft. Dabei war es wichtig, die Viabilität der HRMVEC trotz hoher Glucose-Konzentration sicherzustellen, um einen Verlust der Barrierefunktion durch ein Absterben der Zellen auszuschließen.



D-(+)-Glucose

Abbildung 47: Strukturformel von D-(+)-Glucose.

Um die Toxizität unterschiedlicher D-(+)-Glucose-Konzentrationen zu untersuchen wurde ein MTT Assay durchgeführt. Hierfür wurden HBVP, HRA und HRMVEC mit physiologischen sowie hyperglykämischen Glucose-Konzentrationen von 2,5 mM bis einschließlich 30 mM behandelt. Es folgte eine Inkubation für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C. Anschließend wurde die Viabilität ermittelt und auf die Lebend- und Tot-Kontrollen normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 48 aufgeführt. Dabei konnte stets eine hohe Viabilität der HRMVEC mit 91,12 % bis 133,47 % sowie der HRA von 84,54 % bis 107,73 % detektiert werden. Somit konnte ein LD₅₀-Wert > 30 µM ermittelt werden. *In vivo* kann eine Korrelation der Hyperglykämie mit einem Verlust der Perizyten beobachtet werden.¹¹⁵ Jedoch konnten Tarallo *et al.* zeigen, dass eine *in vitro* Kultivierung von Perizyten unter hyperglykämischen Bedingungen ohne den Einfluss anderer retinaler Zelltypen keinen apoptotischen Effekt zeigte.²⁵² Dies konnte anhand der Ergebnisse in diesem Versuch bestätigt werden. So konnte für HBVP trotz hyperglykämischer Konzentration (30 mM) eine Viabilität von 72,63 % erzielt werden.

Zusammenfassend konnte eine hohe Viabilität der Zelltypen HRMVEC, HRA sowie HBVP im Toxizitätstest festgestellt werden. Da in der Literatur häufig 30 mM D-(+)-Glucose zur

Modellierung der Hyperglykämie Verwendung findet, wurde diese Konzentration für zukünftige Experimente eingesetzt.^{185,253,254}

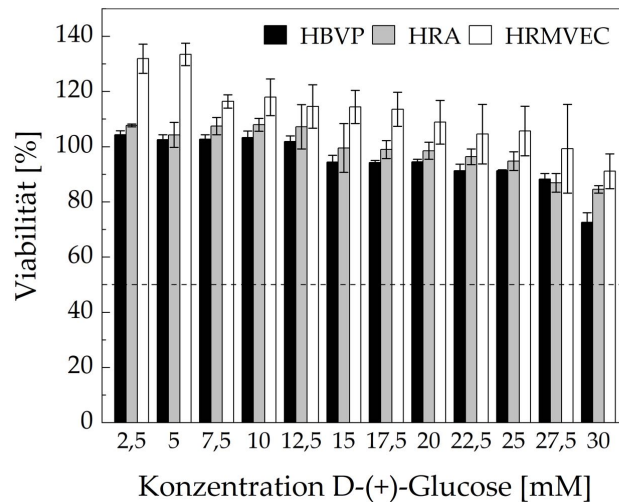


Abbildung 48: Toxizität von D-(+)-Glucose. Für den Toxizitätstest wurden $1 \cdot 10^4$ HRMVEC, HBVP und HRA in Wells einer 96-Well-Platte in ihren jeweiligen Spezialmedien EGM-2, PM, AM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Behandlung mit unterschiedlichen D-(+)-Glucose-Konzentrationen. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mit einem MTT Assay quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.1.4.2 Hyperglykämie im Transwell

Um die diabetische Retinopathie durch eine Hyperglykämie naturgetreu zu modellieren, ist die Verwendung eines iBRB-Gesamtmodells inklusive Astrozyten und Perizyten essentiell. So ist bekannt, dass Perizyten und Astrozyten neben der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion in den retinalen Endothelzellen auch zur Pathogenese der diabetischen Retinopathie und damit zum Funktionsverlust der Barriere beitragen können. *In vivo* verursacht die Hyperglykämie eine Aktivierung der Astrozyten, wodurch inflammatorische Prozesse sowie eine Sekretion pro-angiogener Wachstumsfaktoren eingeleitet werden. Dies resultiert in erhöhtem oxidativen Stress, sowie einer Sekretion von VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), wodurch die Permeabilität der iBRB erhöht wird.^{4,118} Auch der Verlust von Perizyten in der diabetischen Retinopathie resultiert *in vivo* in einer vaskulären Aberration, wodurch die Barriereintegrität von retinalen Endothelzellen negativ beeinflusst wird.¹¹⁴

Zur Untersuchung der Barrierefunktion des iBRB-Modells inklusive HBVP und HRA unter hyperglykämischen Bedingungen wurde zunächst eine Modellierung in statischer Kultivierung bevorzugt. Hierfür wurde das etablierte iBRB-Modell im Transwell-System verwendet.

3.1.4.2.1 Expression Barriere-spezifischer Marker

Im Folgenden wurde der Einfluss der Hyperglykämie auf die Barrierefunktion des iBRB-Modells mithilfe einer Genexpression untersucht. Hierfür wurde das iBRB-Modell inklusive HRMVEC, HBVP und HRA, wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben, im Transwell-System vorbereitet. Anschließend konnte eine Behandlung mit 30 mM D-(+)-Glucose apikal in EGM-2 erfolgen. Die

Behandlungsdauer betrug 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Anschließend wurde die Genexpression der *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteine ZO-1, Occludin und VE-Cadherin sowie des *Junction*-assoziierten Proteins CD31 mithilfe einer RT-qPCR untersucht. Die Expression in Relation zur unbehandelten Kontrolle ist in Abbildung 49 aufgeführt. Hierbei konnte eine Abnahme der Expression der Barriere-Proteine beobachtet werden. So wurde für CD31 eine 0,56-fache, für ZO-1 eine 0,47-fache, für Occludin eine 0,61-fache und für VE-Cadherin eine 0,73-fache Expression detektiert. Ähnliche Resultate erzielte Rochfort *et al.* bei einer Kultivierung von HRMVEC unter hyperglykämischen statischen Bedingungen. Dabei konnte bereits nach 72 h eine Abnahme der Expression von über 50 % der *Tight Junction*-Proteine Occludin, ZO-1 und VE-Cadherin ermittelt werden. Auch Leal *et al.* konnten in Diabetes-Mäusen eine näherungsweise erniedrigte Expression von 81,1 % sowie 74 % von Occludin und ZO-1 feststellen.²⁵⁵ Verglichen mit den Resultaten dieses Versuches konnten die in der Literatur beschriebenen Effekte der erhöhten Glucose-Konzentration auf die Integrität der Barriere bestätigt werden.

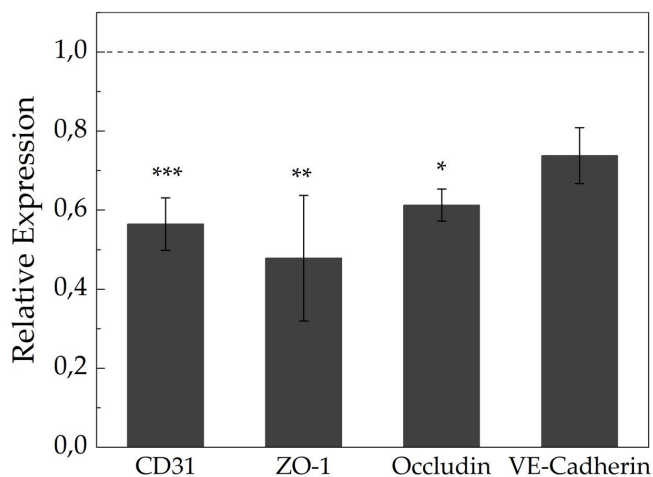


Abbildung 49: Relative mRNA-Expression spezifischer Proteine in HRMVEC bei einer Kokultivierung mit HBVP und HRA unter hyperglykämischen Bedingungen im Transwell-System. 3·10⁴ HBVP wurden auf die mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran im basalen Kompartiment des Transwells besiedelt. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von 3·10⁴ HRA nach demselben Prinzip auf die Perizytenzellschicht. 24 h später wurden 3·10⁴ HRMVEC in das mit 1 mg/ml beschichtete apikale Kompartiment ausgesät. Daraufhin wurde die Kokultur mit 30 mM D-(+)-Glucose behandelt. Anschließend wurde die Kokultur für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in EGM-2 statisch kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle im Transwell-System analysiert. Nach erfolgter Behandlung wurde die RNA der HRMVEC isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression essentieller Barriere-Proteine quantifiziert. Die erhaltenen Resultate wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die Kontrolle normiert (=1). Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet.

3.1.4.2.2 Permeabilitätstest

Neben der Expression wichtiger Barriere-Marker unter hyperglykämischen Bedingungen wurde ein Permeabilitätstest im Transwell-System durchgeführt. Der Permeabilitätstest ist eine häufig

verwendete Methode zur Untersuchung der Dichtigkeit einer Zellschicht, insbesondere von Endothelzellen. Hierfür wird die parazelluläre Diffusion eines fluoreszierenden Moleküls durch eine Endothelzellschicht über einen ausgewählten Zeitraum untersucht. Permeabilitätstests werden überwiegend in Transwell-Systemen durchgeführt. Dabei erfolgt eine apikale Zugabe des fluoreszierenden Moleküls. Anschließend kann die parazelluläre Diffusion des Moleküls durch das Endothel nach festgelegter Zeit durch eine Probenentnahme im basalen Kompartiment untersucht werden. Die Fluoreszenzmessung der diffundierten Moleküle im basalen Kompartiment ermöglicht die Ermittlung des Permeabilitätskoeffizienten P_{app} in Abhängigkeit der Diffusionsoberfläche A und der Anfangskonzentration ΔC mit folgender Formel (siehe Gleichung (1)).^{256,257}

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot \Delta C} \quad (1)$$

P_{app} :	Permeabilitätskoeffizient [cm/s]
dQ/dt :	transportierte Masse pro Zeit [$\mu\text{g/s}$]
A :	Diffusionsoberfläche [cm^2]
ΔC :	Anfangskonzentration [$\mu\text{g/ml}$]

Dabei ist zu beachten, dass eine Diffusion des Moleküls sowohl durch das konfluente Endothel als auch durch die beschichtete semipermeable Membran des Transwell-Systems stattfindet. Somit kann die Membran neben dem Endothel als Barriere zur Diffusion des Moleküls agieren. Um den Permeabilitätskoeffizienten unabhängig vom Membraneinfluss bestimmen zu können, erfolgte die Berechnung nach Gleichung (2).⁷⁶

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

Für die Wahl des fluoreszierenden Moleküls ist es wichtig, dass dieses zum einen nicht in die Zellen penetriert und zum anderen nicht als Substrat spezifischer Transporter oder Rezeptoren fungiert.²⁵⁸ In der Literatur wird das 450 Da schwere *Lucifer Yellow* (LY) häufig als Dichtigkeitsmarker in Permeabilitätsuntersuchungen insbesondere im Transwell-System verwendet.^{259,260} LY ist ein hydrophiles fluoreszierendes Molekül und besitzt parazelluläre Diffusionseigenschaften (Abbildung 50).²⁵⁹ Im Vergleich zu anderen kommerziell erwerblichen fluoreszierenden Dichtigkeitsmarkern weist LY eine *Stokes*-Verschiebung von 108 nm auf.²⁵⁹ Dadurch wird eine ausreichende spektrale Trennung erzielt, wodurch eine Messung der Fluoreszenz ohne Überlagerungen der Anregungs- sowie der Emissionswellenlänge gewährleistet wird.

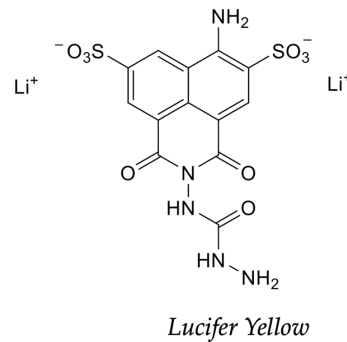


Abbildung 50: Strukturformel von *Lucifer Yellow*.

Zur Untersuchung der Permeabilität unter Einfluss von D-(+)-Glucose wurde das iBRB-Modell bestehend aus HRMVEC, HRA und HBVP, wie in Kapitel 3.1.2.2 beschrieben, im Transwell-System vorbereitet. Danach erfolgte eine apikale Zugabe von 30 mM D-(+)-Glucose. Die Behandlungsdauer betrug 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle eingesetzt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung von P_{app} unabhängig vom Membraneinfluss, der P_{app} der beschichteten Membranen ermittelt. Hierfür wurden Transwell-Systeme apikal mit 1 mg/ml Fibronectin und basal mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Danach folgte eine Kultivierung ohne Zugabe (unbehandelt) und mit Zugabe von 30 mM D-(+)-Glucose (behandelt) bei 5 % CO₂ und 37 °C. Nach 7 Tagen konnte der Permeabilitätstest mit LY in den behandelten und unbehandelten Kokultur-Modellen sowie den beschichteten Transwell-Systemen zur Bestimmung des P_{app} durchgeführt werden. Hierfür erfolgte eine apikale Zugabe von LY und eine Inkubation von 1 h. Im Anschluss wurde die Konzentration im apikalen sowie im basalen Kompartiment von LY durch die Messung der Fluoreszenz bestimmt. Infolgedessen konnte der Permeabilitätskoeffizient unabhängig vom Membraneinfluss ermittelt werden. Die Permeabilitätskoeffizienten der beschichteten Membranen sowie der iBRB-Modelle sind in Abbildung 51 aufgeführt. Zusätzlich wurde die *Mass Recovery* (auch als *Mass Balance* bezeichnet) von LY errechnet. Die *Mass Recovery* gibt die Massenfindungswerte des Diffusionsmoleküls an und ist als Summe der ermittelten LY-Werte im apikalen sowie im basalen Kompartiment in Relation zur Ausgangskonzentration ΔC definiert.²⁶¹ Für eine signifikante Approximation von P_{app} sollte die *Mass Recovery* von LY dementsprechend hoch sein und mindestens 80 % erzielen.²⁶¹ In diesem Versuch wurde eine *Mass Recovery* der beschichteten PC-Membranen sowie der iBRB-Modelle zwischen 91,18 % und 99,14 % bestimmt (Abbildung 51). Damit konnte eine akzeptable Approximation der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten bestätigt werden. Die beschichteten PC-Membranen in den Transwell-Systemen erzielten Permeabilitätskoeffizienten von $4,19 \cdot 10^{-5}$ cm/s (behandelt mit 30 mM D-(+)-Glucose) und $4,46 \cdot 10^{-5}$ cm/s (unbehandelt mit 0 mM D-(+)-Glucose). Im Kokultur-Modell konnte durch eine Behandlung mit 30 mM D-(+)-Glucose ein Permeabilitätskoeffizient von $3,72 \cdot 10^{-5}$ cm/s erzielt werden. Dagegen wurde im unbehandelten Kokultur-Modell mit $2,0 \cdot 10^{-5}$ cm/s ein niedrigerer Permeabilitätskoeffizient und damit eine geringere Diffusion von LY ermittelt. Damit konnte eine 1,86-fach höhere Permeabilität des

iBRB-Modells unter hyperglykämischen Bedingungen bestimmt werden. Auch in der Literatur konnten in statischen Permeabilitätsstudien in iBRB-Modellen Werte im Bereich von 10^{-6} - 10^{-5} erzielt werden.¹⁵⁰ Ein direkter Vergleich zur Literatur ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen iBRB-Modelle, der Porengrößen in den Transwell-Systemen sowie verschiedener Diffusionsmoleküle limitiert. Dennoch konnten in zahlreichen *in vitro* Permeabilitätsstudien eine erhöhte Permeabilität durch Behandlung mit einer hyperglykämischen Glucose-Konzentration festgestellt werden. So konnten Chronopoulos *et al.* unter hyperglykämischen Bedingungen eine 1,34-fach erhöhte Permeabilität in retinalen Endothelzellen aus der Ratte ermitteln.²⁵³ Ferner erzielten Tien *et al.* in einem ähnlichen Versuch eine 2-fach erhöhte Diffusion.²⁶² Vier Jahre später konnten Yun *et al.* eine ca. 1,2-fache Permeabilität unter Einfluss von Glucose in Kokultur-Modellen aus HRMVEC, Astrozyten, Perizyten und Mikroglia im Transwell-System detektieren.²⁶³ Somit stimmen die erzielten Resultate mit der Literatur überein und bekräftigen damit die Aussage des Versuches.

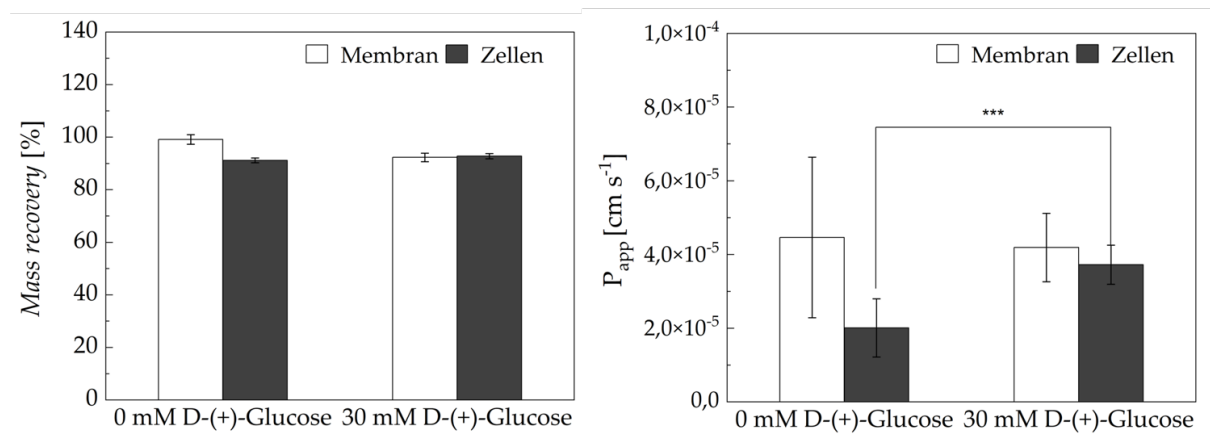


Abbildung 51: Einfluss der Hyperglykämie auf die Permeabilität der iBRB im Transwell-System. Zur Besiedlung des basalen Kompartiments des Transwells wurden $3 \cdot 10^4$ HBVP auf die mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran ausgesät. Am Folgetag wurden $3 \cdot 10^4$ HRA auf die ausgebildete Perizytenzellschicht besiedelt. 24 h später erfolgte die Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in das mit 1 mg/ml beschichtete apikale Kompartiment. Im Anschluss konnte die Kokultur mit 30 mM D-(+)-Glucose behandelt werden. Es folgte eine Kultivierung für 7 Tage bei 5 % CO_2 und 37 °C in EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle im Transwell-System verwendet. Zur Untersuchung der Permeabilität der iBRB-Modelle wurde LY apikal in das Transwell-System appliziert. Nach einer Inkubation von 1 h konnte anhand einer Fluoreszenzmessung die Konzentration von LY im apikalen und basalen Kompartiment bestimmt werden. Daraufhin wurde der Permeabilitätskoeffizient der beschichteten PC-Membranen und der iBRB-Modelle ermittelt. Zusätzlich wurde die *Mass recovery* von LY errechnet, um eine akzeptable Approximation der P_{app} -Werte sicherzustellen (> 80 %). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede der P_{app} -Werte wurden mit $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ gekennzeichnet.

Bei einem Permeabilitätstest ist ein konfluentes lückenloses Endothel zur Signifikanz der Aussage der Untersuchung maßgeblich. Daher wurde nach erfolgter Permeabilitätsuntersuchung eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zur Überprüfung der Konfluenz der HRMVEC wurde der Marker CD31 analysiert. Daneben wurde zur Visualisierung der HBVP α -SMA und zur

Detektion von HRA FABP7 verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbung ist in Abbildung 52 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das behandelte als auch das unbehandelte iBRB-Modell ein konfluentes Endothel aufweisen. Des Weiteren konnten HBVP und HRA in den iBRB-Modellen nachgewiesen werden. Damit wurde das iBRB-Modell auf seine Vollständigkeit der drei Zelltypen sowie der Funktionsfähigkeit durch ein konfluentes Endothel bestätigt.

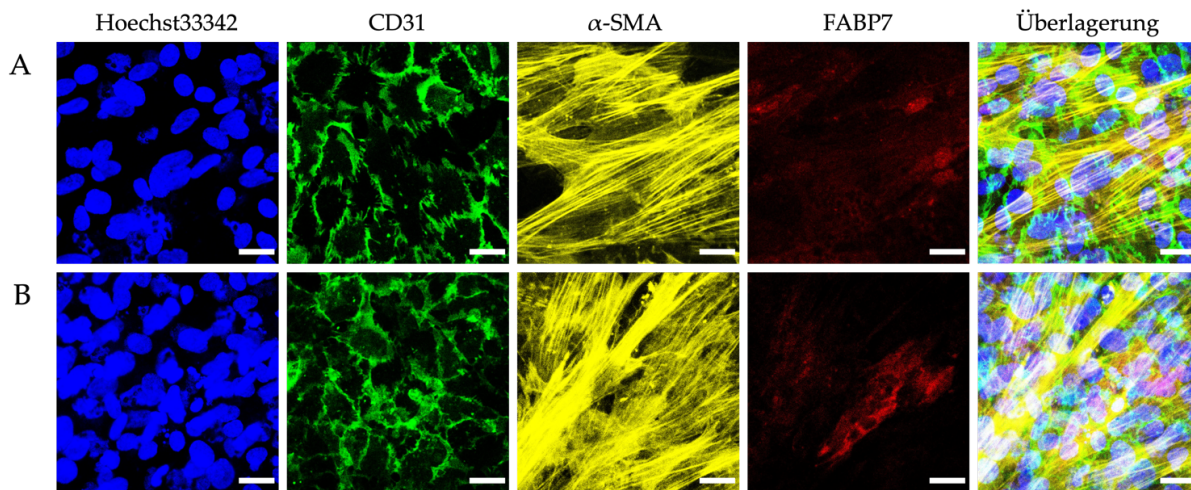


Abbildung 52: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker von HRMVEC, HBVP und HRA im Transwell-System. $3 \cdot 10^4$ HBVP wurden auf die mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran im basalen Kompartiment des Transwells eingebracht. Daraufhin konnten $3 \cdot 10^4$ HRA auf die ausgebildete Perizytenzellschicht ausgesät werden. Am Folgetag wurden $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in das mit 1 mg/ml Fibronektin beschichtete apikale Kompartiment besiedelt. Anschließend wurden die Kokultur-Modelle apikal mit 30 mM D-(+)-Glucose behandelt. Es folgte eine Kultivierung für 7 Tage bei 5 % CO_2 und 37 °C in EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Nach erfolgtem Permeabilitätsversuch wurden die Zellen im Transwell-System fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und immunhistochemisch gefärbt (ZEISS LSM 800). (A) zeigt das unbehandelte und (B) das mit 30 mM D-(+)-Glucose behandelte Kokultur-Modell. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von FABP7. Der Maßstabsbalken entspricht 25 μm .

3.1.4.2.3 Kapitelzusammenfassung Hyperglykämie im Transwell

Die erzielten Resultate der Genexpressionanalyse sowie der Permeabilitätsmessung stimmten überein. Somit konnte durch beide Untersuchungen eine verringerte Barrierefunktion des iBRB-Modells im Transwell-System unter hyperglykämischen Bedingungen nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass die erniedrigte Expression essentieller *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteine zwischen benachbarten Endothelzellen eine höhere parazelluläre Diffusion von Molekülen erlaubt. Dies resultiert in einer erhöhten Permeabilität des etablierten iBRB-Modells und damit schlussendlich in einem Ausfall der Barrierefunktion. Folglich konnten die hyperglykämischen Bedingungen einer diabetischen Retinopathie erfolgreich im statischen Kokultur-Modell modelliert werden.

3.1.4.3 Hyperglykämie im vasQchip und Behandlung mit COMP-Ang1

Als nächstes wurde untersucht, ob sich der Effekt der Hyperglykämie, in Form einer verringerten Barrierefunktion ebenso auf das fluidische iBRB-Modell im vasQchip übertragen lässt. Zusätzlich wurde überprüft, ob durch Zugabe des potentiellen therapeutischen Wirkstoffes COMP-Ang1 eine Wiederherstellung der Barriereintegrität im behandelten iBRB-Modell erzielt werden kann. COMP-Ang1 repräsentiert eine stabile lösliche Variante des Wachstumsfaktors Ang1 und wurde von Cho *et al.* im Jahr 2004 erstmals vorgestellt.²⁶⁴ COMP-Ang1 entsteht durch Fusion einer N-terminalen *Coiled-coil*-Domäne des COMP (*Cartilage oligomeric matrix protein*) aus der Ratte und der C-terminalen Fibrinogen-Domäne des menschlichen Angiopoietins-1 (Ang1) (Abbildung 53).^{185,264,265} Der Wachstumsfaktor Ang1 wird *in vivo* hauptsächlich von perivaskulären mesenchymalen Zellen, darunter Perizyten, exprimiert und interagiert mit dem zugehörigen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie-2 in Endothelzellen.¹¹³ Ang1 reduziert die vaskuläre Permeabilität von endothelialen Barrieren, stabilisiert Blutgefäße durch Rekrutierung von Perizyten und stellt die Viabilität und korrekte Anordnung von Endothelzellen sicher.^{113,114} Bereits in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen konnte das therapeutische Potential von COMP-Ang1 zur Behandlung der diabetischen Retinopathie verdeutlicht werden.^{185,265}

Für diesen Versuch wurden die iBRB-Modelle aus HRMVEC, HBVP und HRA, wie in Kapitel 3.1.2.3 beschrieben, im vasQchip vorbereitet und fluidisch kultiviert. Dabei wurden die Kokultur-Modelle mit 30 mM D-(+)-Glucose über den Mikrokanal behandelt. In einem separaten Ansatz wurde eine simultane Behandlung mit 30 mM D-(+)-Glucose und 200 ng/ml COMP-Ang1 durchgeführt (Abbildung 53). Die Behandlung erfolgte über 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Zur Kontrolle wurden unbehandelte iBRB-Modelle inklusive HBVP und HRA verwendet.

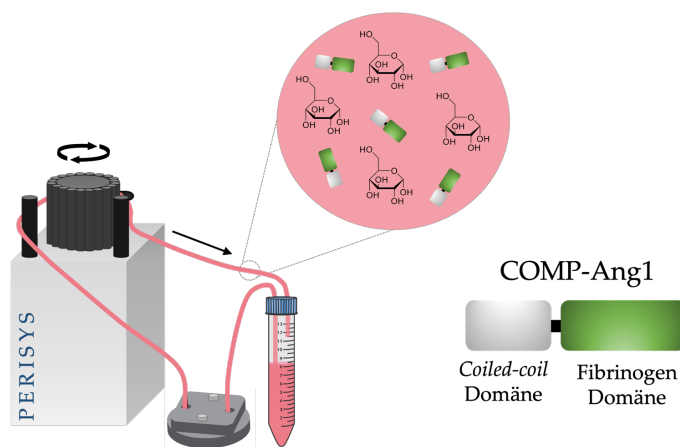


Abbildung 53: Schematische Darstellung der Behandlung der iBRB-Modelle im vasQchip mit 30 mM D-(+)-Glucose und 200 ng/ml COMP-Ang1. Die Zugabe der beiden Komponenten erfolgte ausschließlich über den Mikrokanal des vasQchips.

Nach einer einwöchigen fluidischen Kultivierung wurde die Genexpression verschiedener Barriere-relevanter Proteine ermittelt. Das Ergebnis der auf die Kontrolle normierten Expression ist in Abbildung 54 dargestellt.

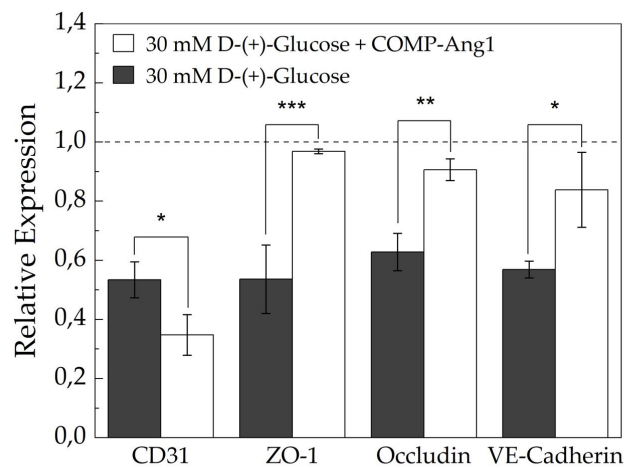


Abbildung 54: Relative mRNA-Expression essentieller Barriere-Marker unter hyperglykämischen Bedingungen und Behandlung mit COMP-Ang1 im vasQchip. Zur Besiedlung des umgebenden Kompartiments wurden $9,5 \cdot 10^5$ HBVP auf die mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran in EGM-2 ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $9,5 \cdot 10^5$ HRA auf die ausgebildete Perizytenzellschicht. Am dritten Tag wurden $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in den mit 1 mg/ml Fibronectin beschichteten Mikrokanal besiedelt. Nach einer einstündigen Rotation im vasQturn wurde das Kokultur-Modell bei einer Flussrate von 100 μ l/min fluidisch über 7 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Dabei erfolgte eine Behandlung der Kokultur mit 30 mM D-(+)-Glucose sowie eine simultane Behandlung mit 30 mM D-(+)-Glucose und 200 ng/ml COMP-Ang1. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle im vasQchip verwendet. Nach abgeschlossener Behandlung wurde die RNA der HRMVEC isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der RT-qPCR die Expression von CD31, ZO-1, Occludin und VE-Cadherin untersucht. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die unbehandelte Kontrolle normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung des fluidischen iBRB-Modells im vasQchip mit 30 mM D-(+)-Glucose eine Abnahme der Expression Barriere-relevanter Proteine induzierte. So wurde für CD31 eine 0,53-fach, für ZO-1 eine 0,62-fach, für Occludin eine 0,53-fach und für VE-Cadherin eine 0,56-fach verminderte Expression bestimmt. Ähnliche Resultate konnten zuvor im statischen Kokultur-Modell im Transwell-System in Kapitel 3.1.4.2.1 erzielt werden. Infolgedessen wurden die in der Literatur beschriebenen Effekte der Hyperglykämie auch im fluidischen iBRB-Modell im vasQchip bestätigt. Währenddessen erzielte eine simultane Behandlung mit D-(+)-Glucose und COMP-Ang1 im Vergleich zur Behandlung ausschließlich mit D-(+)-Glucose eine höhere Expression von ZO-1, Occludin und VE-Cadherin. Dabei konnte für ZO-1 eine 0,96-fache, für Occludin eine 0,90-fache und für VE-Cadherin eine 0,83-fache Expression ermittelt werden. Lediglich für CD31 ($0,35 \pm 0,06$) wurde durch Zugabe von COMP-1 eine verminderte Expression beobachtet. Dennoch konnte die Behandlung mit COMP-1 die Expression von drei der ausgewählten Marker unter hyperglykämischen Bedingungen steigern. Auch Rochfort *et al.* konnten in einem statischen iBRB-Modell durch Zugabe von COMP-1 eine vergleichsweise höhere Expression von Occludin, VE-Cadherin und ZO-1 trotz Behandlung mit 30 mM D-Glucose erzielen.¹⁸⁵ Ähnliche Effekte wurden *in vivo* von Cahoon *et al.* in Diabetes-Mäusen beobachtet.²⁶⁶ Dabei konnte durch eine intravitreale Injektion von COMP-Ang1

die pathologischen Merkmale der frühen diabetischen Retinopathie vaskulär rehabilitiert werden. So wurde durch die Behandlung mit COMP-Ang1 die vaskuläre Permeabilität der Blutgefäße wiederhergestellt.²⁶⁶ Daneben konnte durch COMP-Ang1 der Kapillarverlust, die neuroretinale Prädisposition und der Sehverlust verhindert werden.^{266,267}

3.1.4.3.1 Kapitelzusammenfassung Hyperglykämie im vasQchip und Behandlung mit COMP-Ang1

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung des iBRB-Modells im vasQchip sowie im Transwell-System mit 30 mM D-(+)-Glucose in einer verminderten Expression essentieller *Tight Junction*- und *Adherens Junction*-Proteine resultiert. Infolgedessen kann die Dichtigkeit zwischen benachbarten Endothelzellen nicht aufrechterhalten werden. Dies führt zu einer Verringerung der Barriereintegrität und erhöht damit die vaskuläre Permeabilität. Durch Behandlung mit COMP-Ang1 konnte die Expression von drei der vier untersuchten Barriere-Proteine unter hyperglykämischen fluidischen Bedingungen erhöht werden. Damit konnte das in der Literatur beschriebene Potential des Wachstumsfaktors zur Wiederherstellung einer intakten vaskulären Barriere bestätigt werden. Dennoch ist zu beachten, dass das Genexpressionsmuster einer intakten Barrierefunktion im iBRB-Modell, trotz Behandlung mit COMP-Ang1, nicht vollständig rehabilitiert werden konnte. Zukünftig könnte durch zusätzliche Behandlung mit einem Angiopoietin-2 (Ang2)-Inhibitor eine noch stärkere Expression essentieller Barriere-Proteine erzielt werden.²⁶⁵ Ang2 ist in degenerativen Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie in den Endothelzellen um ein Vielfaches höher exprimiert als Ang1.^{265,268} Ang2 gilt als Antagonist von Ang1 und induziert *in vivo* den Ausfall der Barrierefunktion der iBRB sowie eine Neovaskularisierung und den Verlust der Perizyten.^{113,268} Eine Inhibition neben einer Behandlung mit COMP-Ang1 hat somit das Potential das Genexpressionsmuster einer intakten iBRB wiederherzustellen.^{265,269} Um derartige Untersuchungen *in vitro* durchzuführen, bietet das hier etablierte iBRB-Modell ein ideales Instrument zur Testung potentieller Wirkstoffe unter kontrollierbaren physiologischen Parametern.

3.2 Neurovaskuläre Einheit im Gehirn

Zusammen mit der iBRB gehört die BBB zu den wichtigsten Barrieren im menschlichen Körper. Die BBB ist ein Bestandteil der NVU im Gehirn und zeichnet sich durch ein sehr dichtes Endothel aus. Die NVU ist für die Ausbildung sowie Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der BBB essentiell. Für eine Rekonstruktion der humanen NVU inklusive BBB wurden vasQchips mit einer Porengröße von 1-2 μm im Durchmesser verwendet. Erste BBB- und NVU-Modelle konnten bereits von Dr. D. Ivannikov⁷⁶, Dr. V. Kappings⁷² und Dr. R. Pfister¹⁴ im vasQchip etabliert werden. Sie beinhalten eine Kokultur aus den Hirnendothelzellen hCMEC/D3 im Mikrokanal und den Hirnperizyten HBVP und Hirnastrozyten HA im umgebenden Kompartiment. Eine funktionierende dichte Barriere der Endothelzellen, welche die BBB bildet, ist in solch einem Modell von essentieller Bedeutung. Die immortalisierten hCMEC/D3 werden häufig in der

Forschung für eine Modellierung der *in vivo* BBB eingesetzt.^{270,271} Im Vergleich zu primären Zellen ermöglichen immortalisierte Zellen eine stabile Kultivierung über mehrere Passagen, welche den Phänotyp bis in hohe Passagen erfolgreich abbilden können.²⁷⁰ hCMEC/D3 wurden aus zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen aus dem menschlichen Schläfenlappen hergestellt und mithilfe einer Transduktion eines lentiviralen Vektors (SV40 T Antigen) immortalisiert.²⁷⁰

Der Einsatz von hCMEC/D3 umfasst ein breites Anwendungsspektrum von Transportmittelstudien (*Drug delivery systems*) bis hin zu zahlreichen Krankheitsmodellierungen.^{270,272-274} Sie weisen *in vitro* ein sehr dichtes Hirnendothel auf, welches die Eigenschaften einer physiologischen, metabolischen Barriere der *in vivo* BBB widerspiegelt.^{274,275}

Im BBB-Modell von Dr. V. Kappings⁷² und Dr. R. Pfister¹⁴ konnte gezeigt werden, dass sich eine Kokultur im vasQchip von hCMEC/D3 mit Astrozyten und Perizyten positiv auf die Barriereintegrität der BBB auswirkt. Jedoch beinhaltet dieses Modell keine Neuronen und Mikroglia. Als fester Bestandteil der NVU sind Neuronen und Mikroglia für eine *in vivo* ähnliche Rekonstruktion essentiell. Mikroglia sind aufgrund ihrer Immunaktivität und Neuronen durch ihre Rolle in inflammatorischen Prozessen für eine Modellierung von degenerativen Hirnerkrankungen von enormer Bedeutung.^{276,277} Daher wurde im Folgenden ein NVU-Modell aus Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten, Mikroglia sowie Neuronen etabliert und hinsichtlich seiner Funktion charakterisiert. Das bestehende BBB-Modell von Dr. V. Kappings und Dr. R. Pfister diente dabei als Basis. Das neu etablierte NVU-Modell wurde im letzten Schritt so verändert, dass das Krankheitsmodell Parkinson abgebildet werden kann. Zusätzlich wurde das Modell auf seine Eignung als Testsystem für Wirkstoffe zur Therapie von Parkinson untersucht.

3.2.1 Neuronen

Für *in vitro* Experimente im Labor werden häufig isolierte, primäre oder differenzierte Neuronen eingesetzt. Isolierte Neuronen aus Mäusen oder Ratten sind kostengünstig und funktionsfähig. Aus Gründen der Tierethik sowie speziesspezifischer Unterschiede wurde diese Methode jedoch im Rahmen der Arbeit nicht angewendet. Primäre Neuronen aus dem Menschen können ohne langen Differenzierungsschritt direkt für den Versuchsaufbau verwendet werden. Allerdings können diese nur subkultiviert werden, sind teuer in der Anschaffung und aufgrund ihres Ursprungs begrenzt verfügbar. Dr. R. Pfister verwendete primäre Neuronen in ihrem *Proof of principle*-Experiment eines NVU-Modells im vasQchip.¹⁴ Jedoch konnte weder die charakteristische Zellmorphologie der Neuronen noch der zelltypische Marker Synapsin I nachgewiesen werden. Demnach war eine Etablierung primärer humaner Neuronen im vasQchip nicht erfolgreich.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Neuronen aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenziert (*induced Pluripotent stem cells*, iPSC). Der Vorteil dieser Methode ist, dass iPSC eine unbegrenzte Verfügbarkeit an Zellmaterial sowie eine gezielte Differenzierung in Neuronen ermöglichen. iPSC stehen heutzutage im Fokus der Forschung und könnten zukünftig

durch Bereitstellung patientenspezifischer Zellen therapeutische Anwendungen in der Humanmedizin erlauben.^{278,279} Sie entstehen durch eine künstliche Reprogrammierung mithilfe der sogenannten Yamanaka-Faktoren (OCT4, SOX2, KLF4, MYC) aus somatischen Zellen.²⁷⁹⁻²⁸¹ Durch ihre Pluripotenz sind iPSC in der Lage, ähnlich wie Krebszellen, unbegrenzt zu proliferieren ohne ihre Eigenschaften zu verlieren.²⁸² Außerdem ermöglicht die Pluripotenz der iPSC eine Differenzierung in jede Zelle des Mesoderms, Endoderms und Ektoderms des menschlichen Körpers mithilfe spezifischer Zusätze.^{279,281} In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die iPSC Linie HD11 verwendet. HD11 wurden mit einem Sendai Virus aus Fibroblasten reprogrammiert. Die Sendai Reprogrammierungsvektoren integrieren gemäß dem Hersteller nicht in das Wirtsgenom und verändern somit nicht die genetische Information der Wirtszelle. Im Folgenden wurden Neuronen aus der iPSC Linie HD11 differenziert.

3.2.1.1 Nachweis der Pluripotenz von iPSC

Bevor eine Differenzierung in Neuronen durchgeführt werden konnte, wurde die Pluripotenz der iPSC nachgewiesen. Dies erfolgte mit einer Immunfluoreszenzfärbung der Pluripotenzmarker sowie mit einer quantitativen fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie.

3.2.1.1.1 Immunfluoreszenzfärbung

iPSC der Linie HD11 wurden auf mit Matrigel hESC beschichteten Well-Platten in einem geeigneten iPSC Kultivierungsmedium (iPSC KM) bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Matrigel ist eine solubilisierte Basalmembranmatrix, die von Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkomzellen extrahiert wird.²⁸³⁻²⁸⁵ Die Hauptbestandteile von Matrigel sind vier essentielle Matrix-Proteine der Basalmembran: Laminin mit einem Anteil von 60 %, 30 % Kollagen IV, 8 % Entactin und 2-3 % Proteoglykan.²⁸³⁻²⁸⁵ Zudem enthält es auch zahlreiche Wachstumsfaktoren wie *Fibroblast growth factor* (FGF) oder *Transforming growth factor* (TGF), Metalloproteasen und weitere unbekannte Faktoren.^{283,285} Diese besondere Mischung der Komponenten ermöglicht eine *in vivo* ähnliche Zusammensetzung der EZM, auf der iPSC adhären können.²⁸³

iPSC wachsen *in vitro* häufig in Zellkolonien, um die Pluripotenz durch den engen Zellkontakt aufrecht zu erhalten.²⁸⁶ In Abbildung 55A sind mikroskopische Hellfeldaufnahmen der charakteristischen iPSC-Kolonien abgebildet. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die iPSC-Kolonien fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Zur Untersuchung der Pluripotenz wurden die Pluripotenzmarker Nanog und *Octamer-binding transcription factor-4* (Oct-4) gewählt. Nanog sowie Oct-4 sind wichtige Transkriptionsfaktoren, welche die Selbsterneuerung sowie die Pluripotenz von Stammzellen regulieren.^{287,288} Anhand der Ergebnisse in Abbildung 55 konnte die Morphologie typischer iPSC-Kolonien sowie die Ausbildung von Nanog und Oct-4 mikroskopisch nachgewiesen werden.

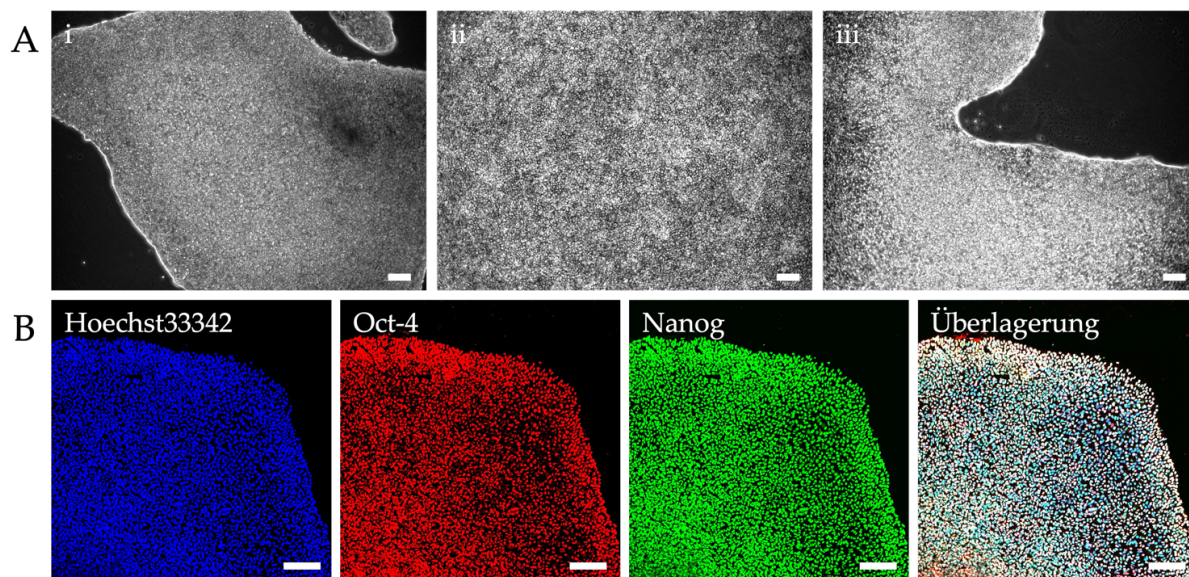


Abbildung 55: Morphologie und Immunfluoreszenzfärbung der iPSC-Linie HD11. iPSC der Linie HD11 wurden in mit Matrigel hESC beschichtete Wells einer 6-Well-Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 7 Tage in iPSC KM kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. In (Ai-iii) ist die charakteristische Morphologie der iPSC-Kolonien in der Hellfeldaufnahme abgebildet. iPSC-Kolonien wurden für eine Immunfluoreszenzfärbung fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. (B) Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung der Pluripotenzmarker Nanog und Oct-4 durchgeführt werden. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342, Rot: Immunfluoreszenzfärbung mit Oct-4, Grün: Immunfluoreszenzfärbung von Nanog (Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED und Leica Stellaris 5). Der Maßstabsbalken entspricht für (A) 75 µm und für (B) 200 µm.

3.2.1.1.2 Durchflusszytometrie

Allein durch eine Immunfluoreszenzfärbung kann keine Quantifizierung über den Anteil positiv gefärbter pluripotenter iPSC erfolgen. Dies ist besonders von Relevanz, da nicht-pluripotente Zellen zu einer unspezifischen Differenzierung führen und somit das Differenzierungsergebnis negativ beeinflussen. Um den Anteil der pluripotenten Zellen quantitativ bestimmen zu können, wurde in Kollaboration mit Dr. Y. Heneka (IBCS-FMS, KIT) eine Durchflusszytometrie (*Flow cytometry*) mithilfe eines *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Geräts durchgeführt. Diese Methode findet häufig Anwendung in der Zellbiologie und ermöglicht ein nahezu unbegrenzt Anwendungsspektrum in der Forschung sowie in der Diagnostik.^{289,290} Die Funktionsweise basiert auf einzelnen Zellen, die in hoher Geschwindigkeit in einem Flüssigkeitsstrom von Lasern bestrahlt werden.^{289,291} Dabei erzeugen unterschiedliche Zellen ein für sie charakteristisches Streulicht (*Light scatter*) und Fluoreszenz, welche von einem Detektor (*Photomultiplier* oder Photodiode) erfasst werden (siehe Abbildung 56).^{289,290,292} Somit können Zellen anhand ihrer Größe, Granularität sowie der Fluoreszenz charakterisiert werden.²⁹³

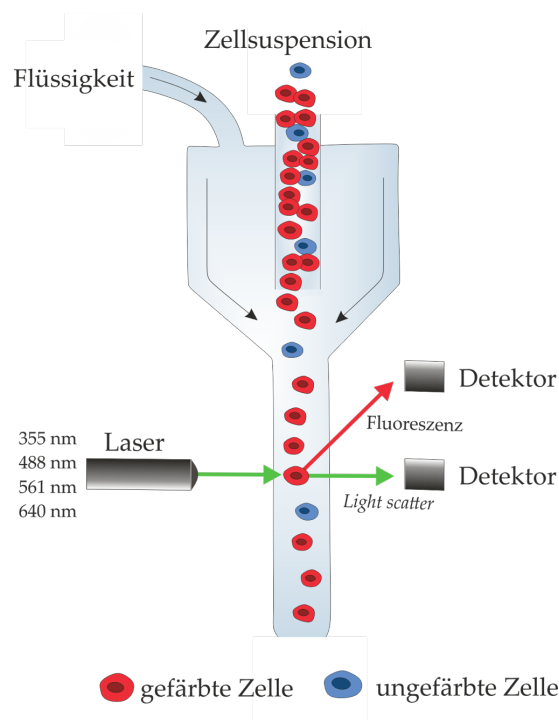


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie. Vereinzelt immunhistochemisch gefärbte Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom von einem Laser bestrahlt. Dabei wird ein charakteristisches Streulicht (*Light scatter*) sowie eine Fluoreszenz erzeugt, welche von einem Detektor erfasst werden. Dies ermöglicht eine Charakterisierung unterschiedlicher Zellen (modifiziert nach abcam).

Zur quantitativen Pluripotenz-Analyse der iPSC wurden HD11 bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert und anschließend enzymatisch vereinzelt. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Für eine Durchflusszytometrie wurde der Anti-Oct-4-PE Antikörper aus der Maus gewählt, an welchen der Fluorophor PE gekuppelt ist. Um

dabei eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, wurde der PE Mouse Anti-IgG1 Antikörper als Isotypkontrolle verwendet. Zur Negativkontrolle wurden unbehandelte iPSC eingesetzt. Nach erfolgter Analyse wurde ein Anteil von 95,4 % pluripotenter Zellen ermittelt (Abbildung 57).

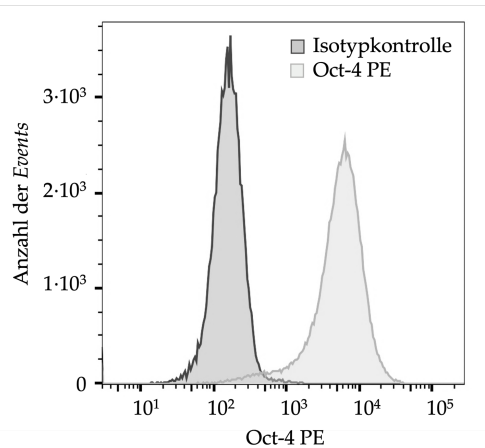


Abbildung 57: Durchflusszytometrie der iPSC. 3·10⁶ iPSC der Linie HD11 wurden fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Für eine anschließende Pluripotenzanalyse wurde der Anti-Oct-4-PE Antikörper aus der Maus gewählt. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen, wurde der PE Mouse Anti-IgG1 Antikörper als Isotypkontrolle verwendet. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle unbehandelte Zellen analysiert. In Kollaboration mit Dr. Y. Heneka konnte der Anteil der pluripotenten Zellen mithilfe eines FACS-Geräts quantitativ bestimmt werden.

3.2.1.1.3 Kapitelzusammenfassung Nachweis der Pluripotenz von iPSC

Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung sowie einer Genexpressionsanalyse konnte die Pluripotenz der iPSC-Linie HD11 nachgewiesen werden. Dieses Resultat stellte eine ideale Voraussetzung für die Differenzierung von Neuronen in den nachfolgenden Kapiteln dar.

3.2.1.2 EZ spheres

Um iPSC in Neuronen zu differenzieren, können zahlreiche Methoden angewendet werden. Eine herkömmliche Methode ist die Generierung sogenannter *Embryoid bodies* (EB). EB sind dreidimensionale kugelförmige, nicht adhärenz multizelluläre Aggregate, die sich spontan aus iPSC in einem geeigneten Differenzierungsmedium bilden.²⁹⁴⁻²⁹⁷ Dabei induziert die kugelförmige Kultivierung die frühe humane Embryogenese.²⁹⁶ Hierdurch besitzen EB Merkmale aller drei Keimblätter und weisen eine achsenpolare Ausrichtung der Zellen auf.²⁹⁸ Jedoch variiert die Effizienz der EB-Aggregatbildung sowie deren Differenzierung in Neuronen zwischen verschiedenen iPSC-Linien trotz gleicher Kultivierungsbedingungen.²⁹⁴ Außerdem sind EB nicht in der Lage zu expandieren, sodass stets eine hohe Zellzahl an iPSC zur Generierung der EB eingesetzt werden muss. Dies stellt jedoch einen zeitlichen und kostenintensiven Aufwand dar. Eine weitere Methode stellt die Generierung sogenannter *EZ spheres* nach Ebert *et al.* dar.²⁹⁴ *EZ spheres* sind, ähnlich wie EB, dreidimensionale kugelförmige nicht adhärenz Zellaggregate. Ein großer Vorteil der *EZ spheres* besteht darin, dass diese einfacher zu generieren und zu kultivieren

sind.^{294,299} Außerdem exprimieren sie stabil Marker neuronaler Stammzellen und weisen keine große Varianz in der Aggregatbildung bei unterschiedlichen Zelllinien auf.^{294,300} Des Weiteren ist im Gegensatz zu den EB keine manuelle Auswahl von neuroepithelialen Vorläufern nötig.²⁹⁴ Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Differenzierungsprotokoll nach Ebert *et al.* mithilfe der *EZ spheres* gewählt.

Für die Differenzierung wurden iPSC der Linie HD11 in mit Matrigel hESC beschichteten Wells einer 6-Well-Platte in iPSC KM kultiviert. Nachdem eine ca. 80%ige Konfluenz der iPSC-Kolonien erreicht wurde, konnte eine enzymatische Ablösung mit Dispase erfolgen. Dispase ist eine Dissoziationsreagenz, welches eine Ablösung ganzer Zellkolonien von der Kultivierungsoberfläche ermöglicht.³⁰¹ Die Zellkolonien wurden anschließend in ein *EZ sphere* Differenzierungsmedium überführt und in Suspension kultiviert (Passage 0). Um ein Anwachsen der Aggregate auf der Wachstumsfläche zu verhindern, wurden Zellkulturflaschen mit einer nicht-adhäsiven Oberfläche verwendet. Diese Kultivierungsoberfläche verhindert eine Adhäsion der Zellen und gewährleistet eine Aggregatbildung der Stammzellen (Abbildung 58).³⁰²

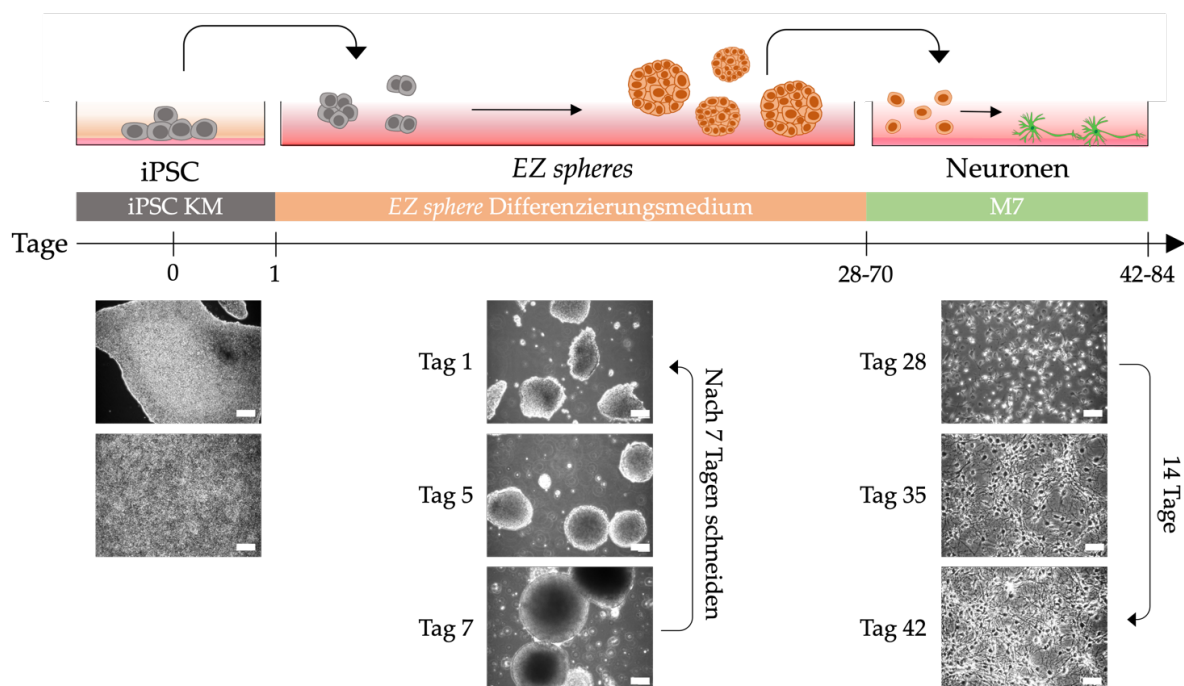


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Neuronendifferenzierung aus *EZ spheres*. iPSC wurden auf Matrigel hESC beschichtete Wells einer 6-Well-Platte in iPSC KM bis zu einer Konfluenz von 80 % Konfluenz kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dabei alle 2 bis 3 Tage. Anschließend wurden die iPSC-Kolonien mithilfe von Dispase enzymatisch von der Kultivierungsoberfläche abgelöst und ins *EZ sphere* Differenzierungsmedium überführt (Passage 0). Daraufhin konnten kugelförmige Zellaggregate generiert werden. Um die Bildung eines nekrotischen Kerns zu verhindern, wurden *EZ spheres* alle 7 Tage mit einer Rasierklinge geschnitten. Dabei wurde die Passage um 1 erhöht. Für eine Differenzierung zu Neuronen, wurden *EZ spheres* vereinzelt und auf einer Matrigel hESC -Beschichtung in M7 zu Neuronen innerhalb von 14 Tagen differenziert. Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED. Die Maßstabsbalken entsprechen 75 μm (*EZ spheres* und iPSC) und 50 μm (Neuronen) (modifiziert nach McQuade *et al.*).³⁰³

Bereits nach einer 24-stündiger Kultivierung in Suspension waren kugelförmige Zellaggregate detektierbar. Die Zellaggregate wurden alle 7 Tage geschnitten, um die Ausbildung eines nekrotischen Kerns zu verhindern. Dabei wurde die Passage der Aggregate um 1 erhöht. Nach vierwöchiger Kultivierung in Suspension (Passage 4) bilden *EZ spheres* neuronale Stammzellen (*Neural stem cell*, NSC).²⁹⁴ *EZ spheres* können über einen Zeitraum von ca. 10 Wochen mit beständigen NSC-Eigenschaften kultiviert und expandiert werden.²⁹⁴ Zur Differenzierung der Neuronen wurden *EZ spheres* enzymatisch in Zellen vereinzelt und in mit Matrigel hESC beschichtete Wells einer Well-Platte ausgesät. Mithilfe neuronaler Differenzierungs- sowie Kultivierungsmedien, wie beispielsweise M7, konnte innerhalb von 14 Tagen eine Differenzierung in Neuronen erfolgen.

3.2.1.2.1 Morphologie der *EZ spheres*

In der Literatur wurde von Sareen *et al.* beschrieben, dass *EZ spheres* durch eine Kultivierung in Suspension Zellfortsätze um das gesamte Aggregat bilden.²⁹⁹ Diese charakteristische Zellmorphologie konnte mithilfe inverser Lichtmikroskopie visualisiert werden (Abbildung 59). Des Weiteren wurden die Zellfortsätze in Kollaboration mit Dr. Irene Wacker (CAM, Universität Heidelberg) mithilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) genauer untersucht. Dazu wurden die Aggregate in Silikon eingebettet, mit einem Ultramikrotom geschnitten und anschließend mit einem REM visualisiert (Abbildung 59B). Anhand der Resultate konnte die charakteristische Zellmorphologie erfolgreich nachgewiesen werden.

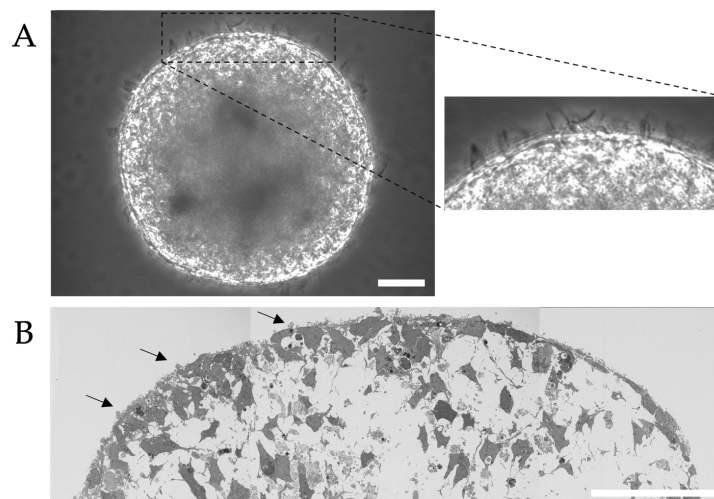


Abbildung 59: Nachweis der charakteristischen Zellfortsätze der *EZ spheres*. Die charakteristische Zellmorphologie der *EZ spheres* wurde mithilfe inverser Lichtmikroskopie (A) und einem REM in Kollaboration mit Dr. I. Wacker (B) untersucht. Zur Visualisierung mit einem REM wurden *EZ spheres* in Silikon eingebettet und mit einem Ultramikrotom geschnitten. In Schwarz sind die charakteristischen Zellfortsätze gekennzeichnet (B). Der Maßstabsbalken entspricht für (A) 200 μm und für (B) 50 μm .

3.2.1.3 Nachweis der NSC-Marker

Um eine Generierung der *EZ spheres* letztendlich validieren zu können, ist neben morphologischen Eigenschaften ein Nachweis von essentiellen NSC-Markern erforderlich. Der Nachweis der NSC-Marker wurde mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung, einer Durchflusszytometrie sowie einer Genexpressionsanalyse durchgeführt.

3.2.1.3.1 Genexpression und Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Genexpression in *EZ spheres* wurden die NSC-Marker *Paired box protein 6* (Pax-6) und Nestin gewählt. Nestin ist ein neuroepitheliales Stammzellprotein und wird herkömmlich zum Nachweis neuronaler Stammzellen verwendet.^{304,305} Bei einer Differenzierung zu Neuronen wird die Expression von Nestin vermindert, sodass Nestin in vollständig ausgereiften Neuronen nicht mehr exprimiert wird.³⁰⁶ Daher ist Nestin als NSC-Marker in der Lage neuronale Stammzellen von ausdifferenzierten Neuronen zu unterscheiden.³⁰⁷ Der NSC-Marker Pax-6 ist ein bei Wirbeltieren sowie wirbellosen Arten hoch konservierter Transkriptionsfaktor und ist für die Entwicklung des ZNS von essentieller Bedeutung.^{308,309} Dabei aktiviert dieser die Expression von neuronalen (ektodermalen) Genen und inhibiert gleichzeitig die Expression mesodermaler sowie endodermaler Gene, wodurch die neuronale Differenzierung initiiert wird.³¹⁰ Neben dem Nachweis der NSC-Marker war es notwendig die Expression von Pluripotenzmarkern sowie Neuronenmarker auszuschließen. Hierfür wurden die Pluripotenzmarker Nanog und Oct-4 sowie der Neuronenmarker *Microtubule-associated protein 2* (MAP2) gewählt. Der Neuronenmarker MAP2 ist im Vergleich zu den NSC-Markern Nestin und Pax-6 ausschließlich in ausdifferenzierten Neuronen exprimiert. Das Protein trägt zur Polarität von Neuronen bei, indem es mit den Mikrotubuli im Perikaryon sowie in den Dendriten assoziiert.³¹¹ Außerdem stabilisiert MAP2 die Mikrotubuli postmitotischer neuronaler Zellen.³¹² Für eine Untersuchung der Expression von Nanog, Nestin, Pax-6, Oct-4 und MAP2 wurden *EZ spheres* der Passage 0, 3, 4 und 10 sowie iPSC verwendet. Die RNA der Zellen wurde isoliert und anschließend in cDNA transkribiert. Mithilfe der RT-qPCR konnte die Expression der Proteine quantifiziert werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die Expression von *EZ spheres* der Passage 0 normiert. Analog dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Nestin und Nanog durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls *EZ spheres* der Passage 3, 4 und 10 sowie iPSC verwendet. Mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnten *z-stack* Messungen der Aggregate durchgeführt und Maximalüberlagerungen erstellt werden. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung sowie der Genexpression ist in Abbildung 60 dargestellt.

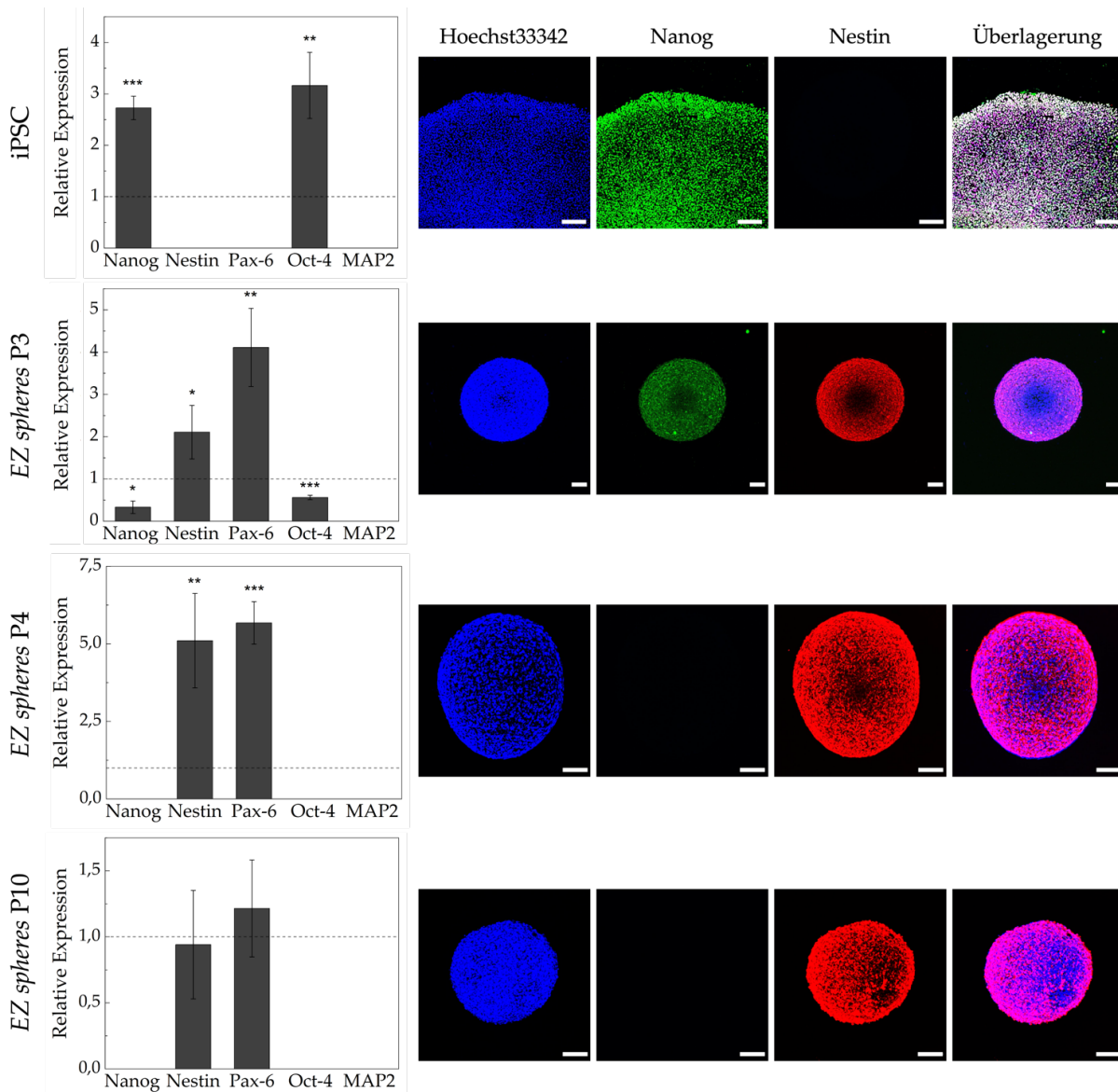


Abbildung 60: Relative mRNA-Expression und Immunfluoreszenzfärbung von EZ spheres und iPSC. iPSC und EZ spheres der Passage 0, 3, 4 und 10 wurden bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Für die Genexpressionsanalyse wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression verschiedener Marker quantifiziert. Als Referenzgen fungierte GAPDH. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die Passage 0 normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden iPSC sowie EZ spheres der Passage 3, 4 und 10 fixiert und anschließend zur Visualisierung von Nanog und Nestin immunhistochemisch gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden z-stack Messungen und anschließend Maximalüberlagerungen erzeugt (n = 75-125, Abstand = 4 µm, h = 300-500 µm, Leica TCS SPE DMI4000B und Leica Stellaris 5). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von Nanog. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von Nestin. Der Maßstabsbalken entspricht für iPSC 200 µm und für EZ spheres 100 µm.

Anhand der Genexpression konnte eine Hochregulation der NSC Marker Nestin und Pax-6 in EZ spheres der Passage 3 (Nestin: 2,10 ± 0,63, Pax-6: 4,11 ± 0,92) und Passage 4 (Nestin: 5,10 ± 1,52,

Pax-6: $5,67 \pm 0,68$) sowie in Passage 10 (Pax-6: $1,21 \pm 0,36$) detektiert werden. Zusätzlich wurde in Passage 3 eine Expression der Pluripotenzmarker Nanog und Oct-4 nachgewiesen. Doch im Vergleich zur Referenz (Passage 0) war die relative Expression von Oct-4 ($0,56 \pm 0,05$) und Nanog ($0,33 \pm 0,14$) vermindert, was auf eine mit zunehmender Zeit abnehmende Expression deutet. So konnte ab Passage 4 eine Expression der Pluripotenzfaktoren nicht mehr detektiert werden. Gemäß der Erwartung wurden in den iPSC die Pluripotenzmarker Nanog ($2,72 \pm 0,22$) und Oct-4 ($3,16 \pm 0,64$) exprimiert. Eine Expression der NSC-Marker Nestin und Pax-6 wurde in den iPSC nicht detektiert. Darüber hinaus konnte eine Expression des Neuronenmarkers MAP2 weder in *EZ spheres* noch in iPSC ermittelt werden.

Die Resultate der Genexpressionsanalyse wurden anhand der Immunfluoreszenzfärbung mit Nestin und Nanog bestätigt. Aufgrund fehlender Charakterisierung konnte kein direkter Vergleich zur Literatur herangezogen werden. Jedoch beschreiben Sareen *et al.*, dass *EZ spheres* ab Passage 4 NSC Eigenschaften aufweisen.²⁹⁹ Die Ergebnisse dieses Versuches konnten dies bestätigen. Zusammenfassend deuten diese Resultate auf eine erfolgreiche Generierung der *EZ spheres* mit NSC-Eigenschaften hin. So konnte die Expression wichtiger NSC-Marker in den *EZ spheres* bestätigt und die Expression von Pluripotenzmarkern (\geq Passage 4) sowie eines neuronalen Markers ausgeschlossen werden.

3.2.1.3.2 Durchflusszytometrie

Um eine quantitative Aussage über den Anteil der NSC in den *EZ spheres* zu erhalten, wurde wie in Kapitel 3.2.1.1.2 beschrieben, eine Durchflusszytometrie in Kollaboration mit Dr. Y. Heneka (IBCS-FMS, KIT) durchgeführt. Hierfür wurden *EZ spheres* der Passage 4 verwendet und der NSC-Marker Nestin gewählt. Mithilfe der Dissoziationsreagenz Accutase wurden Einzelzellen aus den *EZ spheres* generiert, welche anschließend immunhistochemisch gefärbt wurden. Da es sich bei dem verwendeten Anti-Nestin Antikörper aus dem Kaninchen um einen primären nicht fluoreszierenden Antikörper handelt, wurde zur Detektion ein mit Alexa Fluor® 488 gekuppelter Sekundärantikörper (A488) Donkey Anti-Rabbit verwendet. Dieser fungierte ebenfalls als Kontrolle, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen. Zur Negativkontrolle wurden ungefärbte Einzelzellen verwendet. Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist in Abbildung 61 aufgeführt. Anhand der quantitativen Analyse wurde ein prozentualer Anteil von 97,8 % Zellen, welche den NSC-Marker Nestin exprimieren, ermittelt.

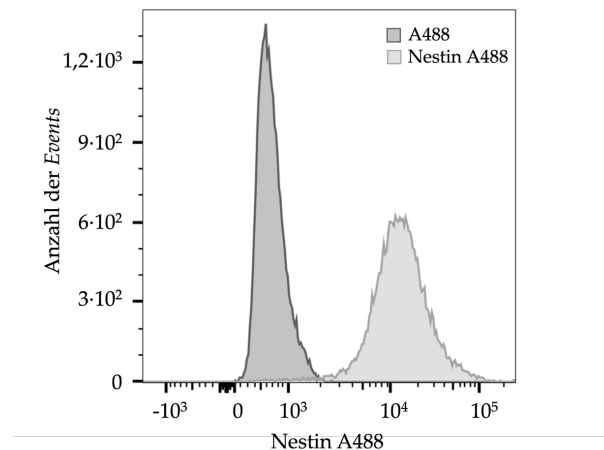


Abbildung 61: Durchflusszytometrie der EZ spheres. $3 \cdot 10^6$ vereinzelte Zellen der EZ spheres der Passage 4 wurden fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde der primäre Anti-Nestin Antikörper aus dem Kaninchen zur quantitativen Analyse mithilfe der Durchflusszytometrie gewählt. Dabei erlaubte der Alexa Fluor® 488 gekoppelte Sekundärantikörper (A488) Donkey Anti-Rabbit eine Detektion des primären Antikörpers. A488 fungierte ebenfalls zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindung. Zusätzlich wurden zur Negativkontrolle unbehandelte Zellen verwendet. In Kollaboration mit Dr. Y. Heneka.

3.2.1.3 Kapitelzusammenfassung EZ spheres

Es konnten NSC-Marker anhand der Immunfluoreszenzfärbung und der Durchflusszytometrie sowie der Genexpression in EZ spheres nachgewiesen werden. Damit wurden EZ spheres mit NSC-Eigenschaften erfolgreich validiert und für die Differenzierung in Neuronen in nachfolgenden Experimenten eingesetzt. Da in EZ spheres der Passage 4 eine Expression der Pluripotenzmarker Nanog und Oct-4 nicht länger detektierbar war, wurden für nachfolgende Versuche Passagen ≥ 4 eingesetzt.

3.2.1.4 Differenzierung von Neuronen

Für eine Differenzierung in Neuronen nach Ebert *et al.* wurden die EZ spheres gemäß dem Differenzierungsschema in Kapitel 3.2.1.2 enzymatisch vereinzelt.²⁹⁴ Danach wurden die Zellen in mit Matrigel hESC beschichtete Wells einer 24-Well-Platte mit einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in M7 ausgesät.²⁹⁴ In M7 begünstigen B-27 und N-2 neben vier weiteren Zusätzen eine Differenzierung und Kultivierung der Neuronen. Das verwendete Differenzierungsmedium der Neuronen setzt sich aus insgesamt sieben Komponenten zusammen und wird daher im Rahmen dieser Arbeit als M7 (Medium mit 7 Komponenten) bezeichnet. Die Differenzierung wurde an Tag 0, 1, 7 und 14 mithilfe eines inversen Lichtmikroskops visualisiert. Die Kultivierung der NSC in M7 erzielte innerhalb von 14 Tagen eine Differenzierung in Neuronen. Anhand der Hellfeldaufnahmen in Abbildung 62A wurden bereits ab Tag 7 eine für Neuronen charakteristische Zellmorphologie festgestellt. So konnten einzelne rundliche Somata (Perikaryon) detektiert werden, welche sich mit ihren langen dünnen Zellfortsätzen (Axone) sowie den kürzeren Zellfortsätzen (Dendriten) in dichten neuronalen Netzwerken vernetzen. Um eine detailliertere Ansicht auf die Morphologie einzelner Neuronen sowie eines Netzwerks zu erlangen, wurden in

Kollaboration mit M. Sc. T. Messer (APH, KIT) mikroskopische Aufnahmen mithilfe eines REM generiert. Die Aufnahmen sind Abbildung 62B zu entnehmen. Die Nahaufnahme eines Neurons in Abbildung 62B(i) zeigt die Instabilität eines neuronalen Netzwerks. Lediglich das Perikaryon adhärirt an der Wachstumsoberfläche, während die Zellfortsätze nicht auf der Wachstumsoberfläche anliegen.

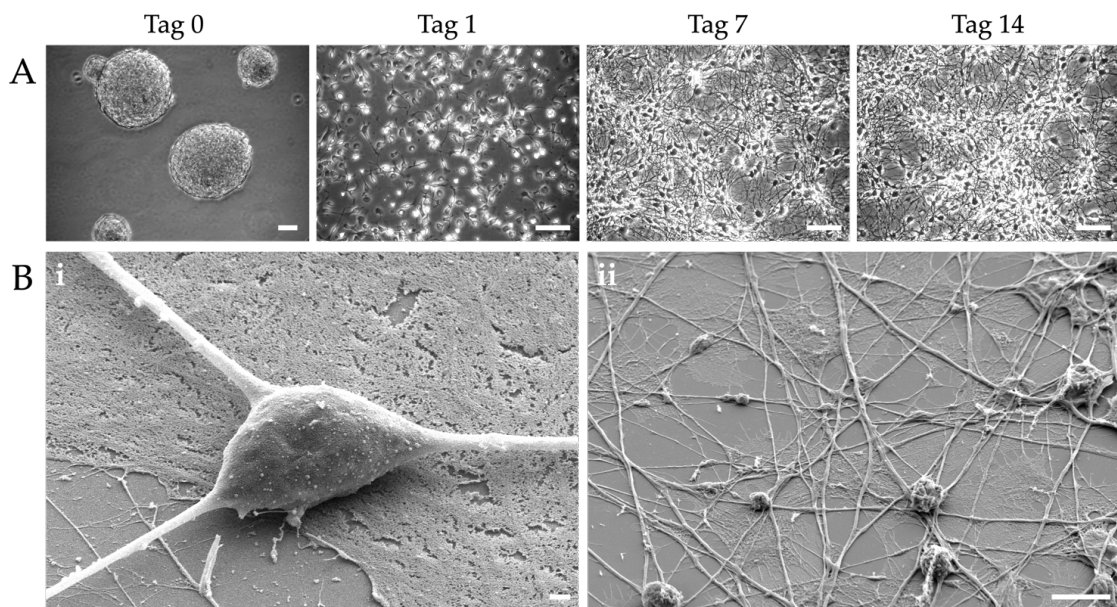


Abbildung 62: Hellfeld- und REM-Aufnahmen der Neuronendifferenzierung aus den EZ spheres. (A) EZ spheres wurden an Tag 0 mithilfe von Accutase in Einzelzellen enzymatisch gespalten. Diese wurden anschließend in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Matrigel hESC beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Die Differenzierung wurde an Tag 1, 7 und 14 zeitlich verfolgt (Inverses Lichtmikroskop Leica DMIL LED). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. (B) Um eine detaillierte Ansicht der differenzierten Neuronen und des neuronalen Netzwerks zu erhalten, wurden in Kollaboration mit M. Sc. T. Messer REM-Aufnahmen durchgeführt (45° Winkel, 5 keV, 8,8 nm Goldschicht, ZEISS Supra 55 VP LEO). (Bi) zeigt ein einzelnes Neuron und (Bii) das neuronale Netzwerk. Maßstabsbalken entspricht für (A) für EZ spheres 50 μ m und für Einzelzellen 75 μ m. Für (Bi) entspricht der Maßstabsbalken 1 μ m und für (Bii) 10 μ m.

3.2.1.5 Nachweis neuronaler Marker

Im vorherigen Kapitel konnte erfolgreich die für Neuronen charakteristische Zellmorphologie nachgewiesen werden. Um die Differenzierung letztendlich validieren zu können, wurde in den folgenden Kapiteln eine Immunfluoreszenzfärbung, Durchflusszytometrie sowie eine Genexpression anhand typischer Neuronen-Marker durchgeführt.

3.2.1.5.1 Immunfluoreszenzfärbung

Für eine Immunfluoreszenzfärbung der differenzierten Neuronen wurde die Differenzierung, wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben, vorbereitet und anschließend bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen zur Visualisierung der Neuronen-Marker β -III Tubulin, MAP2 sowie Synapsin I immunhistochemisch gefärbt. β -III Tubulin wird herkömmlich zum Nachweis neuronaler Zellen und deren Differenzierung eingesetzt.^{313,314} Als Hauptbestandteil der

Mikrotubuli gehört das Protein zu den tubulären Strukturen und unterstützt eine korrekte Ausbildung und Aufrechterhaltung der Axone.³¹³⁻³¹⁵ Im Gegenteil zum Marker MAP2, welcher hauptsächlich in den Dendriten sowie im Perikaryon exprimiert wird, kommt β -III Tubulin im gesamten Neuron vor.^{316,317} Synapsin I ist ein 80 kDa schweres Protein, welches zur Synapsinfamilie zählt.³¹⁸ Das Protein ist hochkonserviert und gehört zu den Phosphoproteinen, welche an die zytoplasmatische Oberfläche synaptischer Vesikel assoziieren.³¹⁸ Damit spielt Synapsin I sowohl in der Freisetzung verschiedener Neurotransmitter als auch in der Plastizität synaptischer Vesikel eine essentielle Rolle.^{319,320} Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung ist in Abbildung 63 dargestellt. Hierbei konnten die neuronalen Marker β -III Tubulin (Abbildung 63A), Synapsin I sowie MAP2 (Abbildung 63B) in den differenzierten Neuronen erfolgreich nachgewiesen werden. Anhand von Synapsin I konnte die Verteilung der synaptischen Vesikel in den Neuronen veranschaulicht werden. Diese sind für eine Verarbeitung und Weiterleitung elektrischer Signale zwischen einzelnen Neuronen und damit für die Funktionalität eines Neurons von enormer Bedeutung. Somit konnten mithilfe der neuronalen Marker morphologische Strukturen wie Axone, Dendriten und synaptische Vesikel in den differenzierten Neuronen nachgewiesen und damit die Identität dieser bestätigt werden.

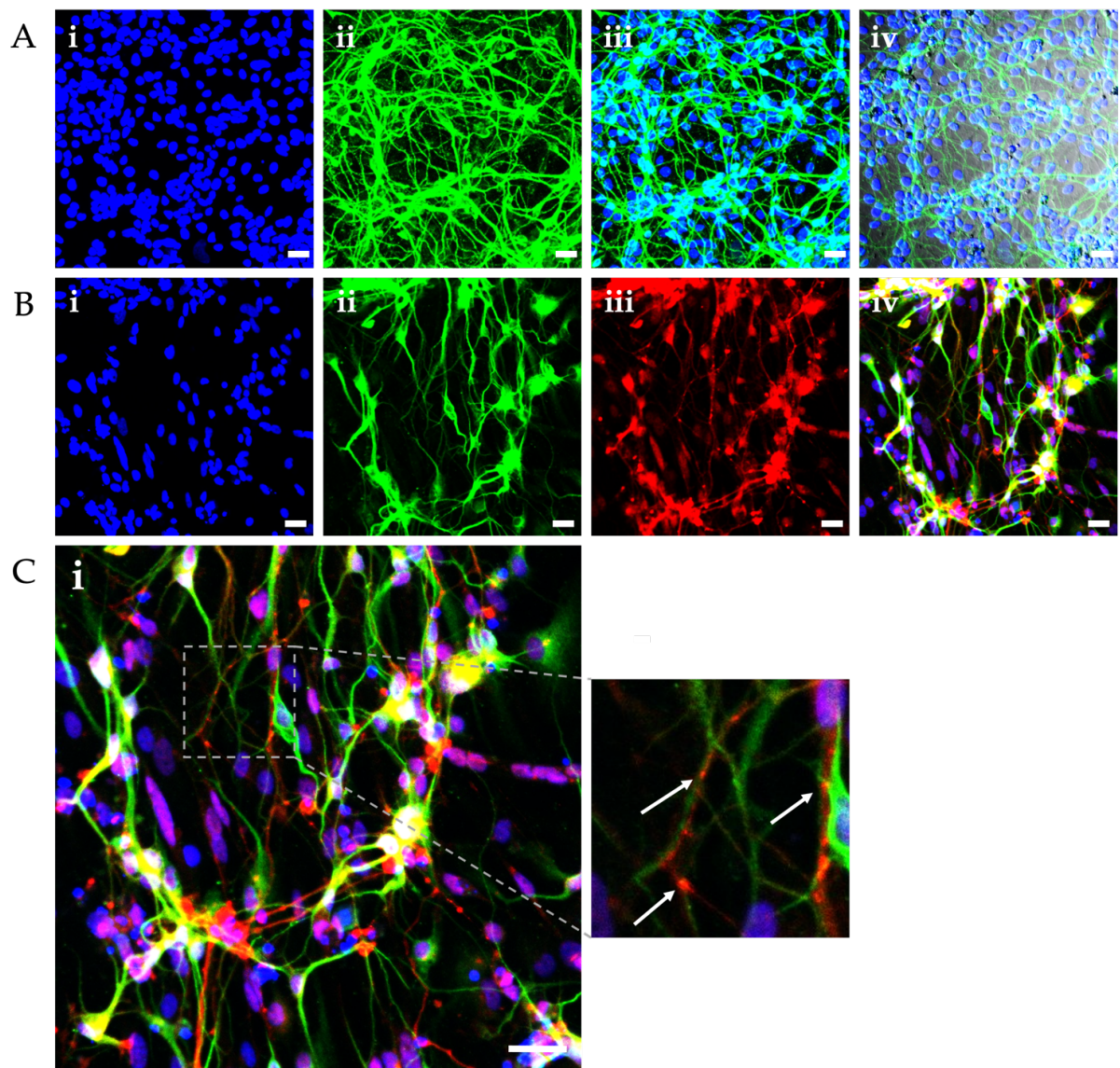


Abbildung 63: Immunfluoreszenzfärbung der differenzierten Neuronen. NSC wurden in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Matrigel hESC beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Es folgte eine Differenzierung über 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und zur Untersuchung der Neuronen-Marker β -III Tubulin, MAP2 sowie Synapsin I immunhistochemisch gefärbt. Zusätzlich zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden die Neuronen-Marker visualisiert (ZEISS LSM 800). (Ai) und (Bi) Zellkernfärbung mit Hoechst33342, (Aii) Immunfluoreszenzfärbung mit β -III Tubulin, (Aiii) Überlagerung ohne Hellfeld und (Aiv) zeigt die Überlagerung mit Hellfeld. (Bii) Immunfluoreszenzfärbung mit MAP2, (Biii) Immunfluoreszenzfärbung mit Synapsin, (Biv) Überlagerung. (Ci) zeigt (Biv) in Vergrößerung, Synapsin I gefärbte Vesikel sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

3.2.1.5.2 Durchflusszytometrie

Zur Quantifizierung des prozentualen Anteils an Neuronen wurde eine Durchflusszytometrie in Kollaboration mit Dr. Y. Heneka (IBCS-FMS, KIT) durchgeführt. Hierfür wurde der Neuronen-Marker β -III Tubulin eingesetzt. Zur Detektion des primären Anti- β -III Tubulin

Antikörpers aus der Maus wurde der an Alexa Fluor® 488 gekuppelte Sekundärantikörper (A488) Goat Anti-Mouse verwendet, welcher auch als Kontrolle fungierte. Hierfür wurden Neuronen, wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben, differenziert. Nach 14 Tagen konnte eine immunhistochemische Färbung von β -III Tubulin erfolgen. Zur Negativkontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet. Die quantitative Analyse der Durchflusszytometrie ist in Abbildung 64 dargestellt. Dabei konnte ein prozentualer Anteil von 55,3 % neuronaler Zellen, welche β -III Tubulin exprimieren, detektiert werden.

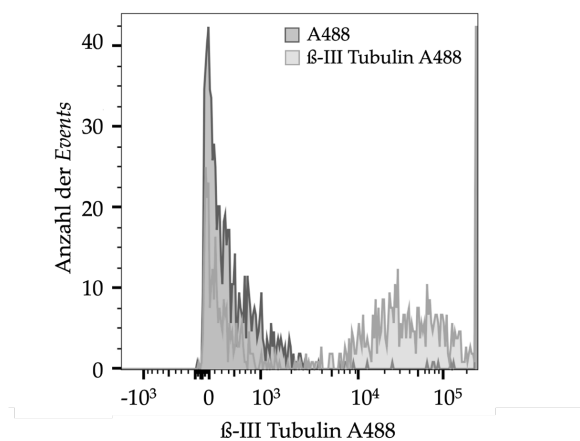


Abbildung 64: Durchflusszytometrie der differenzierten Neuronen. $1,8 \cdot 10^6$ differenzierte Neuronen wurden fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss wurde der primäre Anti- β -III Tubulin Antikörper aus der Maus zur quantitativen Analyse mithilfe der Durchflusszytometrie eingesetzt. Dabei erlaubte der Alexa Fluor® 488 gekuppelte Sekundärantikörper (A488) Goat Anti-Mouse eine Detektion des primären Antikörpers. Darüber hinaus fungierte A488 ebenfalls als Kontrolle, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen. Zudem wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle verwendet. In Kollaboration mit Dr. Y. Heneka.

Der detektierte prozentuale Anteil sowie die analysierte Zellzahl (Anzahl der *Events*) ist im Vergleich zu den vorherigen Durchflusszytometrien verringert. Letzteres liegt an den geringen proliferativen Eigenschaften sowie der Sensibilität der Neuronen. Es wurde zwar eine Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² zur Differenzierung eingesetzt, jedoch adhären nicht alle Zellen auf der Wachstumsoberfläche. NSC sowie Neuronen sind hochsensible Zellen, die für die Aufrechterhaltung ihres Wachstums und Funktion auf eine definierte Mikroumgebung angewiesen sind.^{321,322} Eine starke Veränderung äußerer Einflüsse führt zur Nekrose der Zellen. Zudem weisen NSC sowie Neuronen im Vergleich zu anderen Zelltypen begrenzt proliferative Eigenschaften auf.³²³ Diese beiden Eigenschaften erschweren einen hohen Zelldurchsatz, sodass für diesen Versuch nur eine Zellzahl von $1,8 \cdot 10^6$ Neuronen eingesetzt wurde.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine neuronale Differenzierung aufgrund derselben Vorläuferzellen stets einen Anteil von Gliazellen aufweist und damit den niedrigen Anteil positiver Neuronen begründet.²⁹⁹ Diese fördern das Wachstum sowie die Differenzierung von Neuronen und sind daher zu einem geringen Anteil essentiell.³²⁴ Aus zeitlichen Gründen konnte diese Analyse nicht wiederholt werden. Zukünftig sollte erneut eine Durchflusszytometrie

durchgeführt werden, um das Ergebnis zu überprüfen. Sollte der prozentuale Anteil an detektierten Neuronen erneut gering ausfallen, können Zusätze wie CultureOne™ beigefügt werden, die eine Proliferation unerwünschter Zellen um bis zu 75 % reduzieren.³²⁵

3.2.1.5.3 Genexpression neuronaler Marker

Im Folgenden wurde eine Genexpressionsanalyse der differenzierten Neuronen durchgeführt. Hierbei war es wichtig, die Expression der Pluripotenz- sowie NSC-Marker in ausgereiften Neuronen auszuschließen und die Expression eines neuronalen Markers nachzuweisen.

Dafür wurden Neuronen, wie in Kapitel 3.2.1.4 beschrieben, differenziert. Um die Expression der Marker zeitlich zu verfolgen, wurde an Tag 1, 7, 14 und 21 die Genexpression von Nanog, Oct-4, Nestin, Pax-6 sowie MAP2 mithilfe einer RT-qPCR untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dabei auf die Expression der Differenzierung von Tag 1 normiert (Abbildung 65). Analog erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin der neuronalen Differenzierung an Tag 7, 14 und 21 (Abbildung 65).

Es konnte an Tag 7 ($1,70 \pm 0,21$), Tag 14 ($2,41 \pm 0,22$) und Tag 21 ($0,50 \pm 0,13$) eine Expression des neuronalen Markers MAP2 detektiert werden. Darüber hinaus wurde neben MAP2 eine Expression des NSC-Markers Nestin ($0,37 \pm 0,23$) an Tag 7 festgestellt. Jedoch konnte hier im Vergleich zur Referenz (Tag 1) eine Abnahme der Expression ermittelt werden. Da der NSC-Marker Nestin in differenzierten Neuronen nicht länger exprimiert wird, wurde demzufolge ab Tag 14 eine Differenzierung ausgereifter Neuronen erzielt. Nach den Erkenntnissen von Sareen *et al.* und Ebert *et al.* werden aus *EZ spheres* differenzierte Neuronen ebenfalls ab Tag 14 als vollständig ausgereift definiert.^{294,299} Zudem wiesen die Neuronen an Tag 14 die höchste Expressionsrate von MAP2 auf ($2,41 \pm 0,22$). Dagegen konnte, gemäß den Erwartungen, eine Expression der Marker Nanog, Oct-4 sowie Pax-6 nicht detektiert werden. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung konnte bereits ab Tag 7 β -III Tubulin immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dennoch wurde aufgrund der erzielten Resultate in der Expressionsanalyse eine Differenzierungsdauer der Neuronen von 14 Tagen für weitere Versuche bevorzugt.

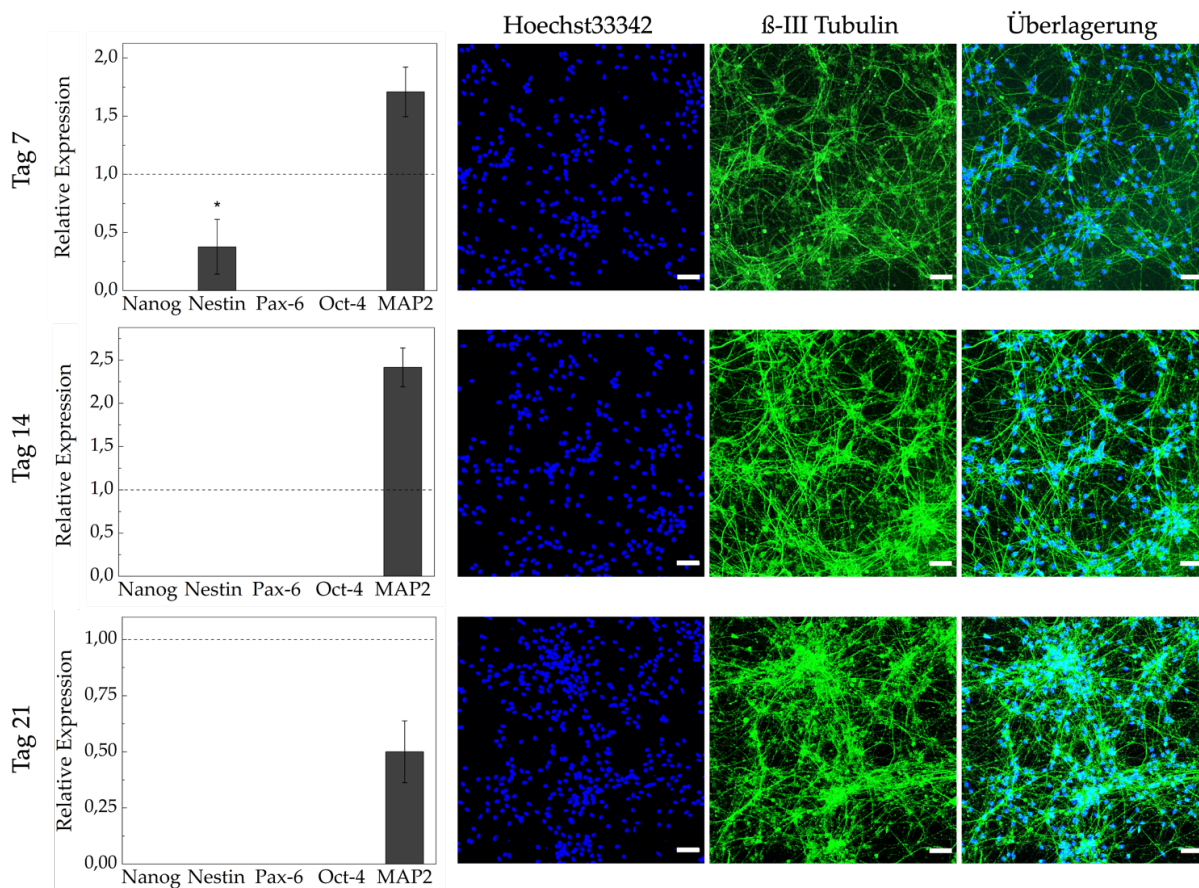


Abbildung 65: Relative mRNA-Expression und Immunfluoreszenzfärbung der differenzierten Neuronen. NSC wurden in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/cm² in mit Matrigel hESC beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Die Differenzierung in Neuronen erfolgte bei 5 % CO₂ und 37 °C. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Um die Expression verschiedener Marker zeitlich zu verfolgen, wurde die RNA der Zellen an Tag 1, 7, 14 und 21 isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR quantifiziert. Als Referenzen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf den Differenzierungstag 1 normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n=3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen an Tag 7, 14 und 21 fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und anschließend zur Visualisierung von β -III Tubulin immunhistochemisch gefärbt. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin (ZEISS LSM 800). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

3.2.1.6 Einfluss der Beschichtung auf die Expression neuronaler Marker

Für eine erfolgreiche Neuronendifferenzierung ist neben der Differenzierungsdauer und dem -medium, die Beschichtung zur Adhäsion neuronaler Zellen bedeutend. Herkömmlich wird Matrigel zur Beschichtung verschiedener Stammzellen verwendet.^{326,327} Daneben finden heutzutage immer mehr synthetische und semi-synthetische Beschichtungen als EZM-imitierende Substanz Verwendung.³²⁸ Diese haben den Vorteil, dass der Anteil verschiedener Komponenten im Vergleich zu Matrigel wesentlich beständiger ist und somit eine Reproduktion der Versuche sichergestellt wird.³²⁸⁻³³⁰ Neben Matrigel werden die semi-synthetischen Beschichtungen Poly-L-Ornithin zusammen mit Laminin (PLO/Lam) und Poly-L-Lysin zusammen mit Laminin

(PLL/Lam) häufig zur Beschichtung neuronaler Differenzierungen verwendet.³³¹⁻³³³ Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit PLO/Lam und PLL/Lam als Beschichtung zur neuronalen Differenzierung untersucht. Dabei wurde in diesem Versuch das Wachstumsverhalten sowie die Expression verschiedener neuronaler Marker auf den verschiedenen Beschichtungen analysiert. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die im Matrigel hESC enthaltenden Wachstumsfaktoren essentiell zur Differenzierung der Neuronen sind. Hierfür wurde das *Growth factor reduced* Matrigel (Matrigel GFR) verwendet. Im Vergleich zum bisher verwendeten Matrigel hESC, weist das Matrigel GFR einen geringeren Anteil an Wachstumsfaktoren auf.³³⁴

3.2.1.6.1 Immunfluoreszenzfärbung

Um den Einfluss der Beschichtungen auf die Zelladhäsion und das Wachstum sowie die Ausbildung neuronaler Marker zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Dafür wurden NSC auf den verschiedenen Beschichtungen (PLO/Lam, PLL/Lam, Matrigel hESC und Matrigel GFR) in M7 differenziert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurden die neuronalen Marker MAP2 und Synapsin I verwendet und mikroskopisch visualisiert (Abbildung 66). Es konnte gezeigt werden, dass Neuronen unter Ausbildung der Marker MAP2 und Synapsin I auf allen Beschichtungen adhären. Jedoch wies die herkömmliche Matrigelbeschichtung (Matrigel hESC) das stärkste homogene Wachstum und damit die höchste Dichte an neuronalen Zellen auf. Hingegen wiesen die Zellen auf der PLL/Lam Beschichtung die niedrigste Konfluenz auf. Ein signifikanter Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen den Beschichtungen konnte nicht beobachtet werden.

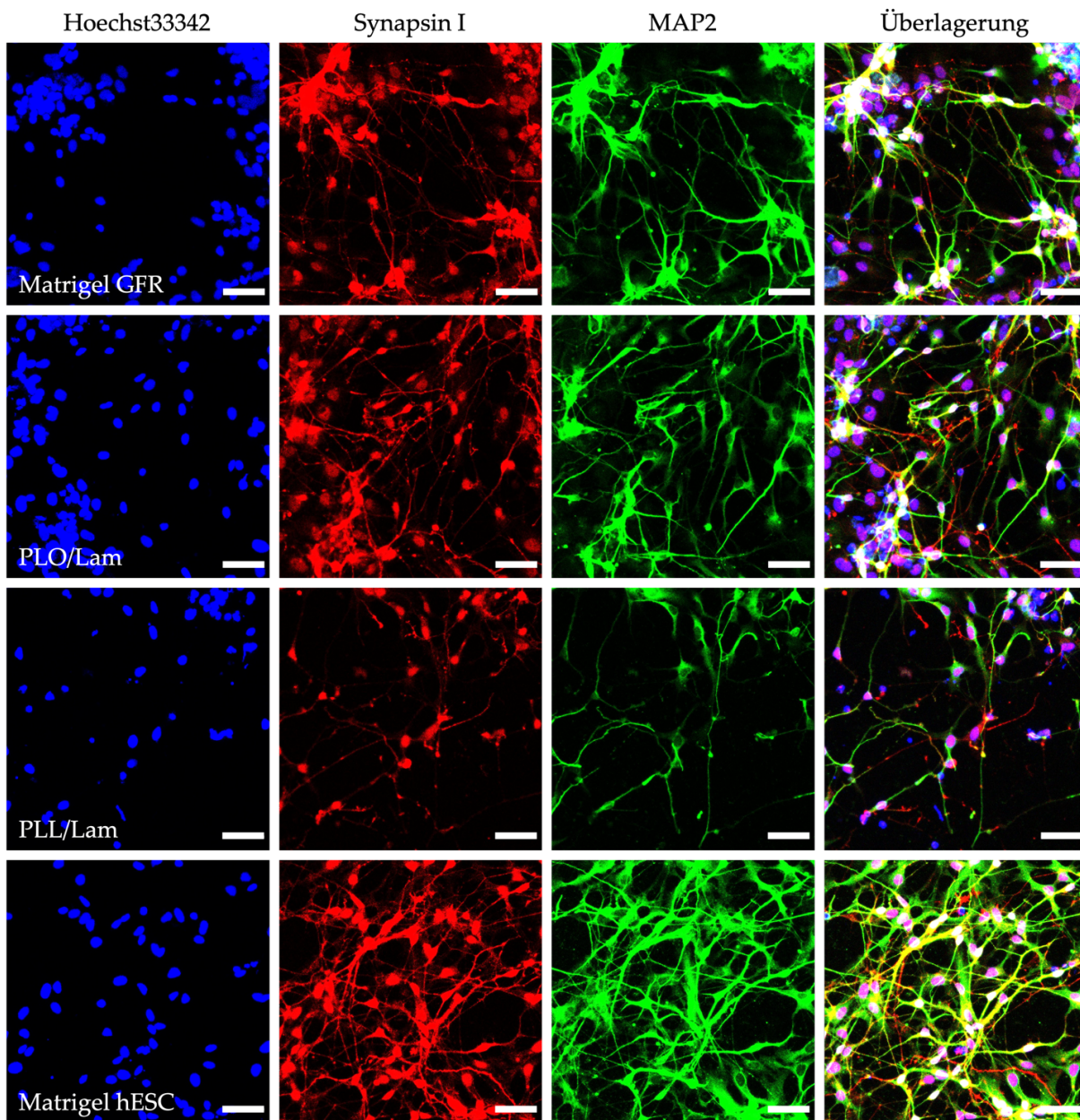


Abbildung 66: Immunfluoreszenzfärbung der neuronalen Differenzierung auf unterschiedlichen Beschichtungen. NSC wurden in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in unterschiedlich beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Hierfür wurden die Beschichtungen PLO/Lam, PLL/Lam, Matrigel GFR und Matrigel hESC verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden die spezifischen Zellstrukturen visualisiert (ZEISS LSM 800). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von Synapsin I. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von MAP2. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

3.2.1.6.2 Expression neuronaler Marker

Neben der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine molekularbiologische Untersuchung zur Expression der neuronalen Marker MAP2 und Tyrosinhydroxylase (TH) durchgeführt. Neuronen

können unter verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert werden, unter anderem nach ihren Neurotransmittern wie beispielsweise dem Dopamin (Katecholamin), Serotonin, Glutamat oder GABA.^{143,335-338} TH dient als Marker Dopamin-produzierender Neuronen (dopaminerge Neuronen).^{339,340} Als Schlüsselenzym katalysiert TH die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu Levodopa, einer Vorstufe von Dopamin.^{341,342} Dopaminerge Neuronen kommen unter anderem in der *Substantia nigra pars compacta* im ZNS vor.^{340,343,344} Sie spielen in vielen inflammatorischen neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson eine wichtige Rolle, und sind daher für Krankheitsmodellierungen und -untersuchungen essentiell.^{343,345} Eine Klassifizierung weiterer Neuronen anhand ihrer Neurotransmitter war im Rahmen dieser Arbeit nicht im Fokus. Daher wurde lediglich die Expression dopaminerger Neuronen und unspezifischer Neuronen mithilfe von MAP2 untersucht. Zukünftig könnten weitere Klassifizierungen der Neuronen durch ihre Neurotransmitter anhand einer umfangreichen Analyse verschiedener Marker charakterisiert werden.

Für den folgenden Versuch wurden die Neuronen auf den verschiedenen Beschichtungen (PLO/Lam, PLL/Lam, Matrigel GFR und Matrigel hESC) über 14 Tage in M7 differenziert und kultiviert. Anschließend wurde die Genexpression von MAP2 und TH mithilfe einer RT-qPCR untersucht und auf die Expression der bisher verwendeten Beschichtung (Matrigel hESC) normiert. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung ist in Abbildung 67 dargestellt.

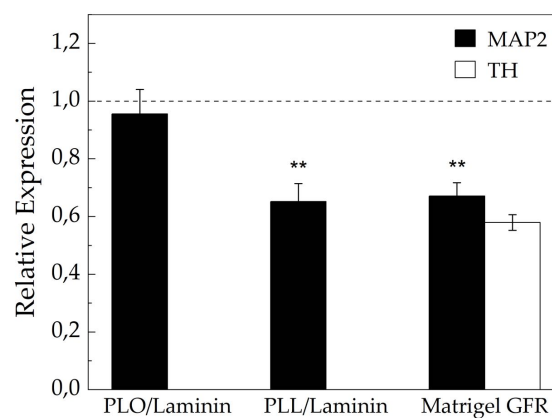


Abbildung 67: Relative mRNA-Expression neuronaler Marker durch Kultivierung auf unterschiedlichen Beschichtungen. NSC wurden in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/cm² in unterschiedlich beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Hierfür wurden die Beschichtungen PLO/Lam, PLL/Lam und Matrigel GFR verwendet. Es folgte eine Differenzierung für 14 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression von MAP2 und TH quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die Matrigel hESC-Beschichtung normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet.

Auf allen Beschichtungen konnte eine Expression von MAP2 in Neuronen nachgewiesen werden. Jedoch waren die Werte im Vergleich zur Referenzbeschichtung (Matrigel hESC) erniedrigt (PLO/Laminin: $0,95 \pm 0,08$, PLL/Laminin: $0,65 \pm 0,06$, Matrigel GFR: $0,67 \pm 0,04$). Damit konnte

gezeigt werden, dass eine Beschichtung der Kultivierungsoberfläche mit Matrigel hESC die Expression von MAP2 am stärksten begünstigt. Im Gegensatz zu den PLO/Lam und PLL/Lam Beschichtungen konnte eine Kultivierung auf Matrigel hESC sowie GFR eine Expression von TH in den Neuronen erzielen. Infolgedessen konnten dopaminerge Neuronen auf den Matrigel-Beschichtungen differenziert werden. Jedoch wiesen die differenzierten Neuronen auf Matrigel GFR im Vergleich zu Matrigel hESC eine verringerte Expression von TH auf ($0,57 \pm 0,02$). Möglicherweise könnte hierfür der geringere Anteil essentieller Wachstumsfaktoren ursächlich sein.

Jedoch beschrieben Sareen *et al.*, dass nur durch eine Kultivierung der *EZ spheres* mit *Fibroblast growth factor 8* (FGF-8) und *Sonic hedgehog* (Shh) eine Differenzierung von dopaminergen Neuronen erzielt werden kann.^{294,299} Allerdings wurden diese Faktoren im Rahmen dieser Arbeit nicht zugesetzt. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurde neben der Genexpressionsanalyse eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden Neuronen wie zuvor beschrieben vorbereitet und in M7 auf einer Matrigel hESC-Beschichtung differenziert. Nach 14 Tagen wurden die Neuronen auf die Ausbildung des dopaminergen Markers TH untersucht. Neben TH wurde β -III Tubulin als Marker zur Visualisierung verwendet. Das Ergebnis der Konfokalmikroskopie ist in Abbildung 68 dargestellt.

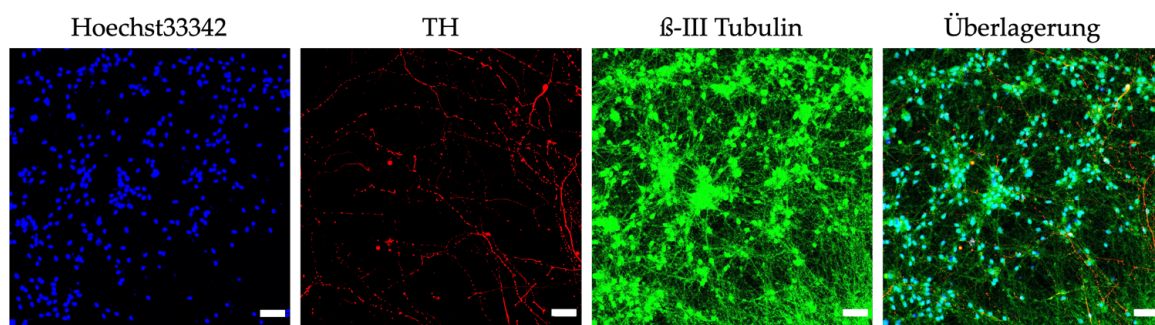


Abbildung 68: Immunfluoreszenzfärbung differenzierter Neuronen auf einer Matrigel hESC-Beschichtung. $2,5 \cdot 10^4$ NSC pro cm^2 wurden in Matrigel hESC-beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung zur Visualisierung von TH und β -III Tubulin. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten die spezifischen Zellstrukturen visualisiert werden (ZEISS LSM 800). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von Synapsin I. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin. Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$.

Dabei konnten in der Immunfluoreszenzfärbung analog zur Genexpressionsanalyse dopaminerge Neuronen nachgewiesen werden. Somit konnten die Erkenntnisse von Sareen *et al.* in diesem Versuch nicht bestätigt werden.²⁹⁹ Ursächlich für die Differenzierung dopaminergener Neuronen könnte die Verwendung einer unterschiedlichen iPSC Linie sein.

Anhand dieser Resultate konnte der Beschichtung ein signifikanter Einfluss auf die Expression neuronaler Marker zugewiesen werden. Auch in der Literatur wurde der Einfluss der Beschichtung in der neuronalen Differenzierung beschrieben. So konnten Setien *et al.* eine

unterschiedliche Expression neuronaler Marker, unter anderem von MAP2, auf verschiedenen Beschichtungen feststellen.³⁴⁶ In Bezugnahme zur Immunfluoreszenzfärbung in Kapitel 3.2.1.6.1 konnte gezeigt werden, dass Matrigel hESC mit einem höheren Anteil an Wachstumsfaktoren (Matrigel hESC) sowohl die Expression der neuronalen Marker MAP2 und TH, als auch das Wachstum der Neuronen am stärksten begünstigt. Aus diesem Grund wurde für folgende Versuche eine Beschichtung mit Matrigel hESC zur Differenzierung der Neuronen gewählt.

3.2.1.6.3 Kapitelzusammenfassung Differenzierung von Neuronen

In diesem Kapitel konnten differenzierte Neuronen anhand Immunfluoreszenzfärbungen sowie Genexpressionsanalysen charakterisiert werden. Dabei wurden spezifische Zellstrukturen der Neuronen wie Axone, Dendriten und synaptische Vesikel visualisiert, welche für eine korrekte Funktion der Neuronen essentiell sind. Zudem konnte anhand der molekularbiologischen Untersuchung gezeigt werden, dass Neuronen nach 14 Tagen vollständig in M7 ausdifferenziert sind. Des Weiteren erzielte eine Kultivierung der Neuronen auf Matrigel hESC eine Differenzierung dopaminergischer Neuronen, welche im späteren Verlauf dieser Arbeit zur Modellierung der degenerativen Parkinsonerkrankung eine bedeutende Rolle spielen. Diese Resultate fungierten als Basis zur Etablierung der Neuronen in einem NVU-Modell.

3.2.2 Etablierung der NVU im Transwell

Die dichte Barriere der BBB wird von Endothelzellen im Blutgefäß gebildet und gewährleistet einen kontrollierten Stoffaustausch zwischen dem zirkulierenden Blut und dem umliegenden Hirngewebe.^{347,348} Während Perizyten das Blutgefäß der Endothelzellen flach ummanteln, stehen Astrozyten mit ihren langen Ausläufern mit dem Endothel sowie mit Neuronen in Kontakt.^{18,97} Dabei beträgt das *in vivo* Verhältnis von Perizyten und Endothelzellen im ZNS im Vergleich zur Retina (1:1) 1:3-4.^{90,349} Währenddessen sind Mikroglia als wichtiger Bestandteil der NVU an der Immunantwort im Gehirn beteiligt.³⁵⁰ Es ist bekannt, dass Neuronen neben Astrozyten und Perizyten für die Aufrechterhaltung und Entwicklung der Barriereintegrität in der BBB von Bedeutung sind.^{97,351,352} So spielen Neuronen *in vivo* eine Schlüsselrolle in der Induktion und Aufrechterhaltung der BBB.^{117,353} Auch aktivierte Mikroglia können die Expression essentieller *Tight Junctions* beeinflussen.³⁵⁰ Darüber hinaus sind Neuronen und Mikroglia für eine Modellierung von inflammatorischen Prozessen wie in Parkinson von großer Bedeutung.^{350,354,355} Zur Rekonstruktion eines authentischen *in vitro* NVU-Modells erfolgte eine Inkorporation der iPSC differenzierten Neuronen zusammen mit Mikroglia, Astrozyten (HA), Perizyten (HBVP) sowie Endothelzellen (hCMEC/D3). Als Grundlage diente das etablierte BBB-Modell von Dr. R. Pfister und Dr. V. Kappings bestehend aus hCMEC/D3, HA und HBVP.^{14,72} Neben den iPSC differenzierten Neuronen aus Kapitel 3.2.1 wurden im Rahmen dieser Arbeit kommerziell erwerbliche immortalisierte humane Mikroglia (HM) verwendet. Primäre humane Mikroglia wurden (wie hCMEC/D3) mithilfe einer Transduktion eines lentiviralen Vektors (SV40 T Antigen) immortalisiert, womit eine Kultivierung von über 30 Passagen ermöglicht wird.^{356,357}

Da Neuronen eine definierte Mikroumgebung für eine korrekte Funktionalität und Wachstum benötigen, wurde angenommen, dass die von Dr. R. Pfister¹⁴ etablierten Kultivierungsbedingungen überprüft und entsprechend modifiziert werden müssen. Um verschiedene Bedingungen für eine Kokultur zu testen, wurden Vorversuche in planaren Well-Platten sowie Transwell-Systemen einer Porengröße von 0,4 µm durchgeführt. Bei einer Kultivierung im Transwell-System kann ähnlich wie im vasQchip ein Gewebemodell mit einer „Blutseite“ (apikal) und einer „Gewebe-seite“ (basal) integriert werden. Im NVU-Modell wurden Neuronen zusammen mit HM, HA und HBVP im basalen Kompartiment auf der „Hirngewebe-seite“ kultiviert. Dabei konnte eine Kultivierung der Zellen im basalen Kompartiment auf dem Boden der Well-Platte oder auf der porösen Membran erfolgen. In den folgenden Versuchen wurden die Kultivierungsbedingungen im Transwell-System mithilfe von Wachstumskurven, Genexpressionsanalysen, Immunfluoreszenzfärbung sowie Messungen zur Barriereintegrität überprüft. Dabei lag der Fokus auf das Wachstum der Zellen und der Ausbildung zelltypischer Marker sowie der Ausbildung einer dichten Barriere im Endothel. Die daraus resultierenden Ergebnisse wurden im nächsten Schritt auf ein NVU-Modell im vasQchip übertragen.

3.2.2.1 Untersuchung eines geeigneten Nährmediums

Für eine simultane Kultivierung aller fünf Zelltypen ist die Bestimmung eines geeigneten Nährmediums erforderlich. Das Nährmedium sollte ein Wachstum aller Zellen begünstigen und die Barrierefunktion der hCMEC/D3 unterstützen. Dr. V. Kappings und Dr. R. Pfister konnten bereits das KM als ideales Medium zur Kokultivierung von HBVP, HA und hCMEC/D3 ermitteln.^{14,40} Dabei war ein starkes Wachstum der Zelltypen sowie der Nachweis zelltypischer Marker möglich. KM ist das Kultivierungsmedium der hCMEC/D3 und wird nach 2 Tagen zur Differenzierung des Endothels vom Differenzierungsmedium (DM) ersetzt. Diese Nährmedien eignen sich speziell zur Kultivierung der Hirnendothelzellen und unterstützen die Ausbildung einer Barriere, welche für eine erfolgreiche Funktion der BBB ausschlaggebend ist. Dies konnte in der Arbeit von Dr. R. Pfister umfangreich belegt werden.¹⁴ Jedoch unterscheidet sich das Differenzierungsmedium der Neuronen wesentlich von dem bislang verwendeten Kultivierungsmedium der hCMEC/D3. Der entscheidende Unterschied liegt an der Komponente Fetalem Kälberserum (*Fetal bovine serum*, FBS), welches dem Medium der Neuronen (M7) nicht zugesetzt wird. FBS wird aus dem Blut des Rinderfötus gewonnen und zählt bis heute zu den wichtigsten Bestandteilen verschiedener Nährmedien.³⁵⁸ Es enthält zahlreiche wichtige Proteine und Wachstumsfaktoren, wobei eine genaue Zusammensetzung des FBS bislang nicht vollständig charakterisiert werden konnte.^{358,359} In den folgenden Kapiteln wurde zunächst untersucht, ob eine Kultivierung sowie Differenzierung von Neuronen in KM trotz FBS möglich ist.

3.2.2.1.1 Eignung von KM zur Kultivierung der Neuronen

Um eine Differenzierung und das Wachstum der Neuronen in KM zu überprüfen, wurden NSC in KM ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Zur Kontrolle wurden die Neuronen analog in ihrem Spezialmedium M7 ausgesät. Nach 14 Tagen konnten die Zellen mithilfe einer

Immunfluoreszenzfärbung auf die Ausbildung des neuronalen Markers β -III Tubulin mikroskopisch untersucht werden (Abbildung 69). Hierbei konnte der neuronale Marker β -III Tubulin in den mit KM kultivierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Da eine Detektion von β -III Tubulin in den mit M7 kultivierten Zellen möglich war, lässt dies auf eine Inkompatibilität von KM zur Kultivierung neuronaler Zellen schließen. Womöglich lag die Ursache an dem in KM enthaltenen FBS und den fehlenden essentiellen Wachstumsfaktoren zur neuronalen Differenzierung. Auch in der Literatur werden mögliche negative Auswirkungen auf die neuronale Differenzierung durch die in FBS enthaltenen Wachstumsfaktoren beschrieben.³⁶⁰⁻³⁶² Somit ist KM für eine Differenzierung und Kultivierung der Neuronen nicht geeignet.

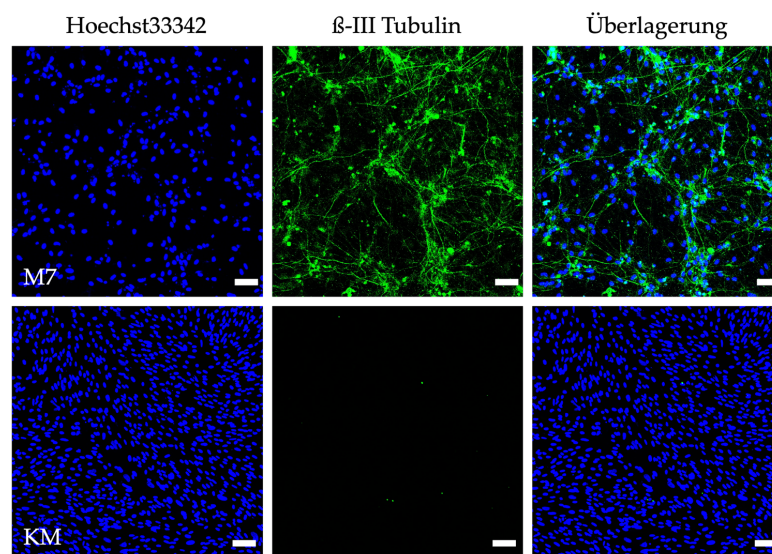


Abbildung 69: Immunfluoreszenzfärbung differenzierter Neuronen in M7 und KM. $2,5 \cdot 10^4$ NSC pro cm^2 wurden in Matrigel hESC beschichtete Wells einer 24-Well-Platte in M7 sowie in KM ausgesät. Es folgte eine Kultivierung von 14 Tagen bei 5 % CO_2 und 37 °C. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden die spezifischen Zellstrukturen visualisiert (ZEISS LSM 800). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

3.2.2.1.2 Wachstumskurve

Im Folgenden wurde ein geeignetes Nährmedium für eine Kokultivierung aller Zelltypen mithilfe von Wachstumskurven ermittelt. Dabei war es wichtig, dass das Nährmedium neben dem Wachstum der Zellen auch eine Differenzierung der Neuronen ermöglicht. Da Neuronen aufgrund ihrer Sensibilität spezifische Anforderungen an das Medium stellen, wurde die Verwendung des neuronalen Mediums für eine erfolgreiche Differenzierung und eine korrekte Funktion als notwendig erachtet. Jedoch ist zu beachten, dass eine Wachstumskurve keine konkrete Aussage über eine erfolgreiche Differenzierung von Neuronen vermittelt. Um eine neuronale Differenzierung zu validieren, müssen immunhistochemische oder molekularbiologische Untersuchungen zur Expression neuronaler Marker durchgeführt werden. Folglich wurden

lediglich hCMEC/D3, HBVP, HA und HM für Wachstumskurven verwendet. Dabei wurde das Wachstum der vier Zelltypen im Neuronenmedium M7 sowie in einem 1:1 Gemisch aus M7 und dem Basalmedium (BM), benannt als M7 1:1 BM, untersucht. BM dient als Basis für das KM und kann nach Zugabe weiterer Wachstumsfaktoren, Hydrocortison, FBS und Penicillin-Streptomycin zur Kultivierung der hCMEC/D3 verwendet werden. Bereits in der Literatur wird BM zur Kultivierung von NVU-Modellen herangezogen.^{363,364} Somit wäre denkbar, dass das BM, welches bereits essentielle Wachstumsfaktoren enthält, ein Wachstum der Zelltypen in Abwesenheit von FBS begünstigen könnte.

Schlussendlich wird die Adhäsion einer Zelle durch eine passende Mikroumgebung mit geeigneten Parametern gewährleistet. Dies lässt vermuten, dass ideale Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise ein geeignetes Nährmedium, die Viabilität sowie eine Adhäsion der Zellen auf einer Wachstumsoberfläche begünstigen. Daher wurde zusätzlich das Wachstum der vier Zelltypen in M7 1:1 BM untersucht, welche zunächst 3 h in KM kultiviert wurden. Eine Inkubation in KM sollte die Adhäsion begünstigen und damit ein schnelleres Wachstum der Zellen sicherstellen. Dazu wurden hCMEC/D3, HBVP, HA und HM in KM ausgesät, woraufhin nach 3 h das Medium durch M7 1:1 BM ausgetauscht wurde. Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Zelltypen in ihren eigenen Spezialmedien AM, MM, PM und KM kultiviert. MM ist das Medium der Mikroglia, AM das Medium der Astrozyten und PM das Medium der Perizyten. Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden HBVP, HA, HM sowie hCMEC/D3 in den zu untersuchenden Medien ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Die erhaltenen Wachstumskurven sind in Abbildung 70 aufgeführt. Alle Zelltypen erzielten in ihrem Spezialmedium die stärkste Proliferation. Gefolgt von M7 1:1 BM, welches das KM nach einer Kultivierung von 3 h ersetzte. Dagegen wies eine Kultivierung ausschließlich mit M7 1:1 BM ein vermindertes Wachstum auf. Das neuronale Medium M7 zeigte die niedrigsten Proliferationsraten. Zusammenfassend erzielte eine Kultivierung der vier Zelltypen in M7 1:1 BM (nach 3 h KM) eine starke Proliferation. Damit konnte gezeigt werden, dass ein dreistündiges Anwachsen der Zellen in KM die Proliferation der Zelltypen in M7 1:1 BM förderte und damit die Proliferationsraten an Tag 7 um 22-99 % steigerte.

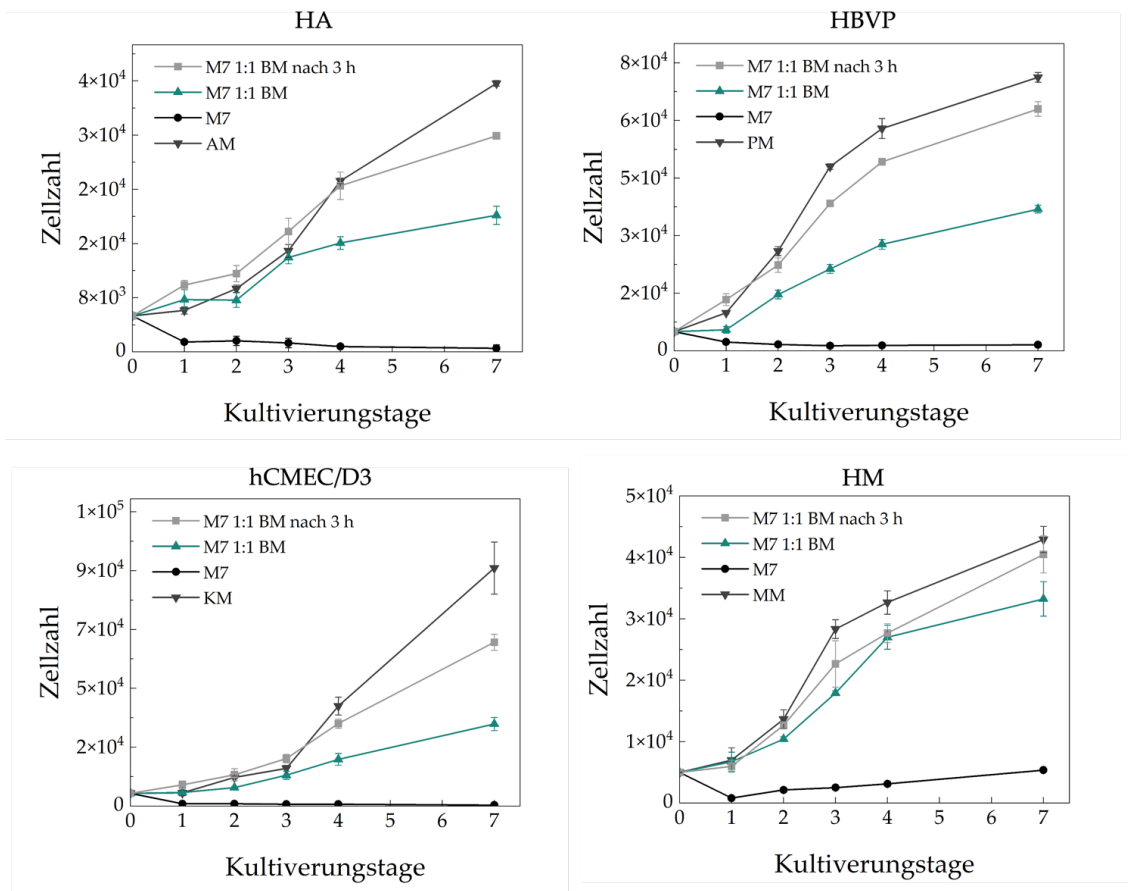


Abbildung 70: Wachstumskurven von HA, HBVP, hCMEC/D3 und HM. $5 \cdot 10^3$ Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ Nährmedium in Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Dabei wurden die Medien M7 und M7 1:1 BM untersucht. Des Weiteren wurde die Proliferation der Zelltypen in M7 1:1 BM analysiert, welche zunächst 3 h in KM kultiviert wurden (M7 1:1 BM nach 3 h). Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Spezialmedien der Zellen verwendet. Es folgte eine Inkubation über einen Zeitraum von 7 Tagen bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurde die Gesamtzellzahl ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ berechnet.

3.2.2.1.3 Nachweis zellspezifischer Marker der Zelltypen der NVU

In einem geeigneten Medium zur erfolgreichen Kokultivierung der Zellen müssen neben einer Proliferation auch die zelltypischen Marker für eine korrekte Funktion beibehalten werden. Folglich wurde analog zur Wachstumskurve die Morphologie sowie die Ausbildung spezifischer Marker in allen Zelltypen in M7 1:1 BM untersucht. Dafür wurden HBVP, HA, HM und hCMEC/D3 in $\mu\text{-Slide 8 Wells}$ in KM ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium durch M7 1:1 BM ersetzt. Um einen zusätzlichen Stressfaktor durch einen Mediumwechsel zu verhindern, wurden NSC direkt in M7 1:1 BM ausgesät und differenziert. Zur Kontrolle wurden alle fünf Zelltypen in ihren Spezialmedien ausgesät. Die Zellen wurden nach 14 Tagen anhand ihrer zellspezifischen Marker mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Hierfür wurden die Marker $\alpha\text{-SMA}$ für HBVP, GFAP für HA, CD11b für HM, $\beta\text{-III Tubulin}$ für Neuronen und CD31 sowie VE-Cadherin für die Ausbildung einer dichten Endothelzellschicht analysiert. CD11b ist ein

Zelladhäsionsmolekül und wird vor allem in Makrophagen, somit auch in Mikroglia, exprimiert und fungiert damit als zelltypischer Marker der Mikroglia.^{365,366} Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten die zellulären Strukturen visualisiert werden (Abbildung 71).

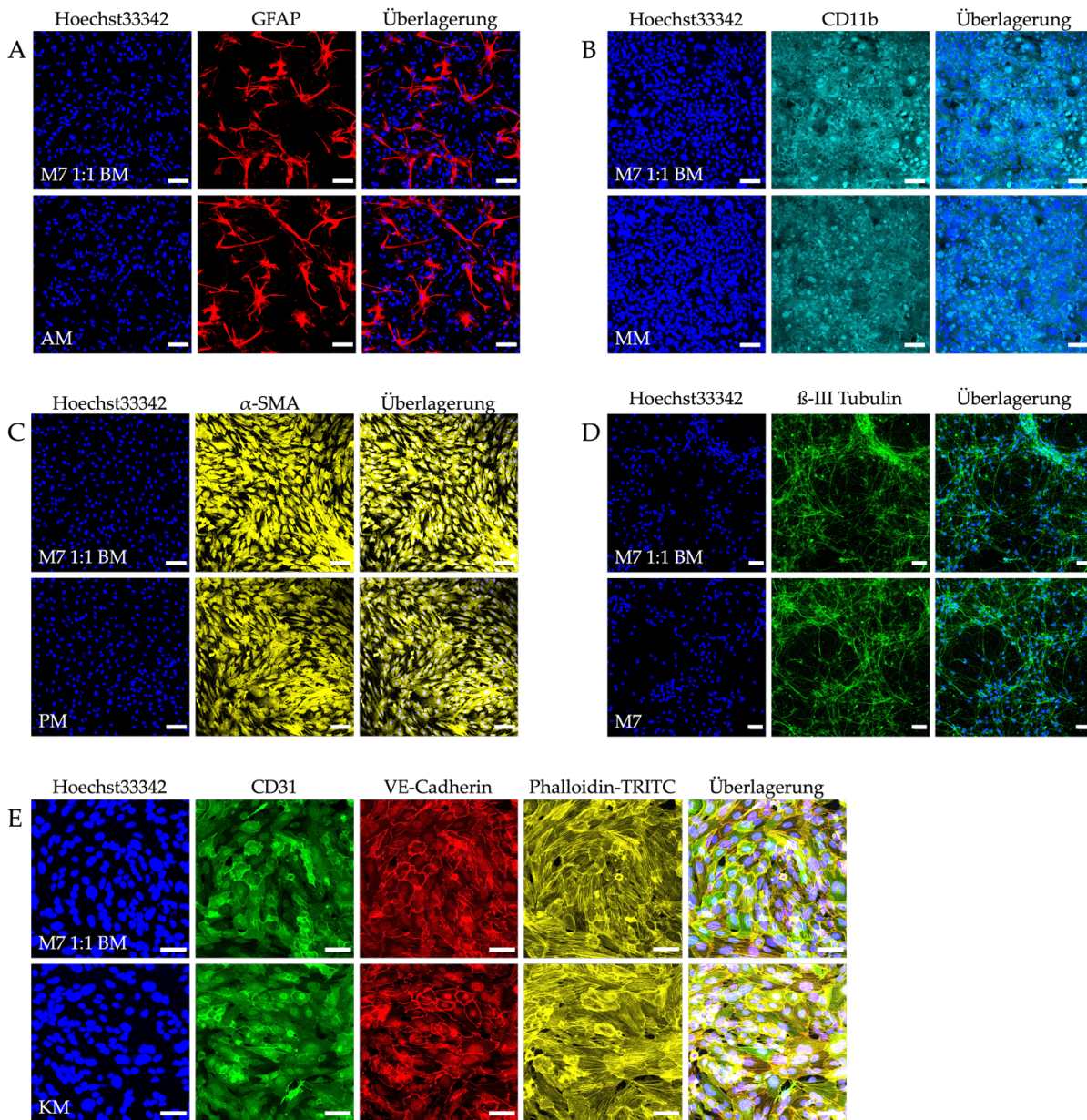


Abbildung 71: Visualisierung spezifischer Zellstrukturen von HA, HBVP, HM, hCMEC/D3 und Neuronen. $1 \cdot 10^4$ HBVP, HM und HA sowie $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in KM in μ -Slide 8 Wells ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium abgenommen und durch M7 1:1 BM ersetzt. $2,5 \cdot 10^4$ NSC wurden direkt in M7 1:1 BM ausgesät. Es folgte eine Kultivierung von 14 Tagen bei 5 % CO_2 und 37 °C. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Zur Visualisierung der zelltypischen Strukturen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 (blau) gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten die spezifischen Strukturen visualisiert werden (Leica Stellaris 5 und ZEISS LSM 800). (A) HA, (B) HM, (C) HBVP, (D) Neuronen und (E) hCMEC/D3. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Dabei konnten die zelltypischen Marker CD11b der Mikroglia, α -SMA der Perizyten und GFAP der Astrozyten in M7 1:1 BM detektiert werden. Die Morphologie und das Wachstum dieser Zellen wies ebenfalls keinen Unterschied zum jeweiligen Spezialmedium auf. Jedoch konnte im Vergleich zu den HBVP oder HM nur eine geringe Anzahl der HA immunhistochemisch mit GFAP gefärbt werden. Wie in Kapitel 3.1.2.3.1 beschrieben, wird GFAP nur von reaktiven Astrozyten durch Verletzungen im ZNS exprimiert.²²² Somit ist eine Detektion der Zellen in einem gesunden Gewebe erschwert. Dieser Effekt konnte bereits von Dr. D. Ivannikov und Dr. R. Pfister beobachtet werden.^{14,76}

Darüber hinaus konnte eine Differenzierung der Neuronen anhand des neuronalen Markers β -III Tubulin sowie der charakteristischen Morphologie in M7 1:1 BM bestätigt werden. Des Weiteren wurde mithilfe der immunhistochemischen Färbung von VE-Cadherin und CD31 ein dichtes Endothel der hCMEC/D3 nachgewiesen. Gemäß der Erwartung konnte dabei eine verstärkte Akkumulation der Färbung zwischen benachbarten Endothelzellen an den Zellkontaktpunkten detektiert werden.

Somit konnte die charakteristische Morphologie sowie die Ausbildung zelltypischer Marker in allen fünf Zelltypen erfolgreich in M7 1:1 BM nachgewiesen werden, nachdem sie 3 h in KM angewachsen sind.

3.2.2.1.4 Untersuchung der Barriereigenschaften von hCMEC/D3

Für eine *in vitro* Rekonstruktion der BBB ist ein besonders dichtes Endothel maßgeblich. Dr. R. Pfister konnte bereits mithilfe der hCMEC/D3 ein Endothel im vasQchip etablieren, welches die spezifischen Eigenschaften erfüllen konnte.¹⁴ Grundlage hierbei waren verschiedene Parameter wie Beschichtung, Zellzahl und die Wahl eines geeigneten Kultivierungsmediums. Letzteres kann aufgrund der Inkompatibilität mit der neuronalen Differenzierung nicht für eine Rekonstruktion des NVU Modells eingesetzt werden. Im vorherigen Kapitel war es möglich, M7 1:1 BM als ein geeignetes Medium für eine Kokultivierung ermitteln zu können. Anhand einer Immunfluoreszenzfärbung konnte die Expression essentieller Barriere-Proteine wie CD31 und VE-Cadherin in den hCMEC/D3 bei einer Kultivierung in M7 1:1 BM nachgewiesen werden. Jedoch ist die Ausbildung einer dichten physiologischen Barriere das entscheidende charakteristischste Attribut der BBB und sollte daher in einem größeren Ausmaß untersucht werden. Dafür wurden quantitative Methoden wie eine RT-qPCR und eine TEER (*Transendothelial electrical resistance*)-Messung eingesetzt.

3.2.2.1.4.1 TEER-Messung der Barriereintegrität von hCMEC/D3

TEER-Messungen finden neben Permeabilitätstests häufig zur *in vitro* Quantifizierung der Barriereintegrität von Zellen Verwendung. Der TEER-Wert beschreibt den elektrischen Widerstand eines endothelialen oder epithelialen Zelllayers und kann ohne eine Zerstörung des Zelllayers, direkt in Echtzeit ermittelt werden. Zur Messung des TEER-Wertes werden im apikalen und basalen Kompartiment jeweils eine Elektrode in einem leitfähigen Kultivierungsmedium positioniert. Dadurch wird ein elektrischer Fluss zwischen den beiden Elektroden ausschließlich durch den Zelllayer sowie der semipermeablen PC-Membran ermöglicht. Durch Anlegen einer

bekannten Wechselspannung ($f = 12,5 \text{ Hz}$) zwischen beiden Elektroden und des resultierenden Spannungsabfalls kann hierdurch der elektrische Widerstand ermittelt werden. Dieser ermöglicht eine Quantifizierung der Barriereintegrität eines Zelllayers in Transwell- sowie in *Organ-on-a-chip* Systemen.

Neben spezifischen Transportern ist die Ausbildung eines dichten Netzwerks aus *Adherens Junctions* sowie *Tight Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen für eine hohe Barriereintegrität der *in vivo* BBB maßgeblich.^{18,97} Dies gewährleistet einen selektiven und zielgerichteten Stoffaustausch zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Hirngewebe.⁹⁷ Für die *in vivo* BBB liegt der TEER-Wert zwischen $1200\text{-}1800 \Omega \text{ cm}^2$.³⁶⁷

Um die Barriereintegrität der hCMEC/D3 in M7 1:1 BM ermitteln zu können, wurde eine TEER-Messung durchgeführt. Dr. R. Pfister konnte zeigen, dass eine $0,1 \text{ mg/ml}$ Kollagen I ($10 \mu\text{g/cm}^2$) beschichtete PC-Membran zur Kultivierung von hCMEC/D3 geeignet ist und die Ausbildung einer dichten Barriere begünstigt.¹⁴ Daher wurden hCMEC/D3 in einem mit $0,1 \text{ mg/ml}$ Kollagen I beschichteten Transwell-System im Spezialmedium KM apikal ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium vollständig auf M7 1:1 BM gewechselt. Analog dazu wurden hCMEC/D3 ausschließlich in den zugehörigen Spezialmedien (KM/DM) zur Kontrolle kultiviert. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen an 9 Tagen der elektrische Widerstand des Endothels gemessen. Ein Schema zur Messung der TEER-Werte ist in Abbildung 72 dargestellt. Zu jeder Messung wurde dabei ein Blank durchgeführt. Hierfür wurde ein mit $0,1 \text{ mg/ml}$ Kollagen I beschichtetes Transwell-System im jeweiligen Medium verwendet.

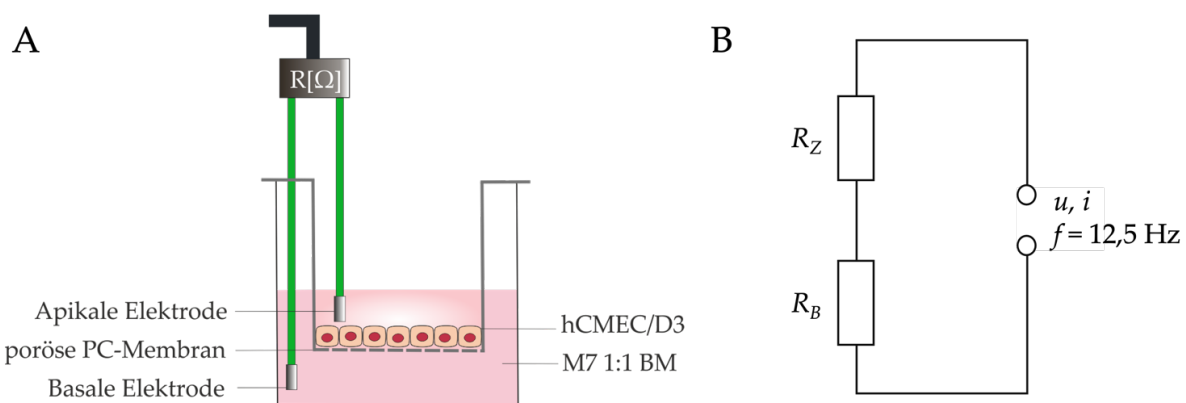


Abbildung 72: Schematische Darstellung der TEER-Messung. (A) $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in einem mit $0,1 \text{ mg/ml}$ Kollagen I beschichteten Transwell-System im Spezialmedium KM apikal ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium auf M7 1:1 BM vollständig ausgetauscht. Es folgte eine Kultivierung bei $5\% \text{ CO}_2$ und $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Zur TEER-Messung wurde eine apikale sowie eine basale Elektrode in ein Transwell-System integriert. Durch das Anlegen einer bekannten Wechselspannung ($12,5 \text{ Hz}$) konnte durch den Spannungsabfall zwischen beiden Elektroden der elektrische Widerstand des Endothels ermittelt werden. (B) Schaltkreis und Widerstände R_Z des Zelllayers und R_B des Blanks in der TEER-Messung (modifiziert nach Srinivasan *et al.*).³⁶⁷

Der Widerstand des Zelllayers R_Z ergibt sich durch die Differenz aus dem gemessenen Ersatz-Widerstand R_{Ers} und dem Blank-Widerstand R_B (siehe Gleichung (3) und Abbildung 72):

$$R_Z = R_{Ers} - R_B \quad (3)$$

Der Blank-Widerstand R_B beinhaltet dabei den Widerstand des Zellkulturmediums R_{Med} , der beschichteten semipermeablen Membran R_{Mem} sowie den Widerstand zwischen Elektrode und Zellmedium R_{EMI} („*Electrode medium interface*“).³⁶⁷ Anschließend kann der ermittelte Zelllayer-Widerstand R_Z auf die Oberfläche des Transwell-Systems A_{TW} normiert werden, um den flächenunabhängigen Widerstand r_z zu bestimmen (siehe Gleichung (4)).³⁶⁷ Dieser kann als geometrieunabhängiger Indikator für die Dichtigkeit der Zellschicht betrachtet werden.

$$r_z = R_Z \cdot A_{TW} \quad (4)$$

Anhand der ermittelten TEER-Werte konnte eine stärkere Barriereintegrität der hCMEC/D3 in M7 1:1 BM im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 73).

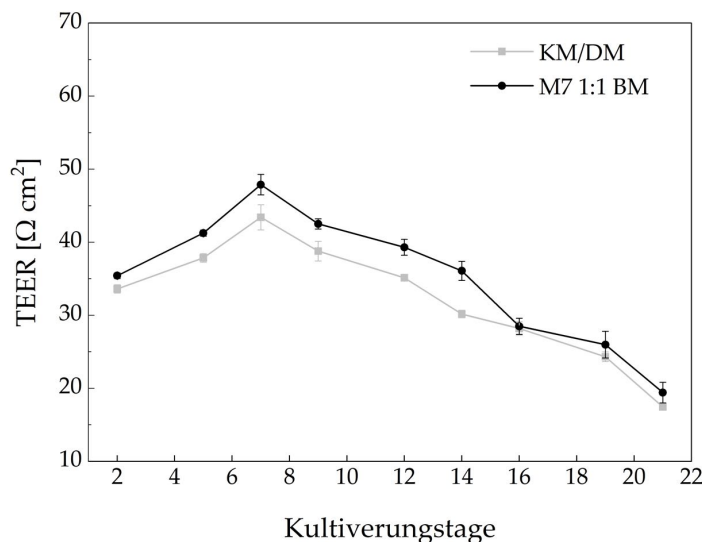


Abbildung 73: TEER-Messung von hCMEC/D3 in KM/DM und M7 1:1 BM. $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in einem mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Transwell-System im KM apikal ausgesät. Nach 3 h erfolgte ein Mediumwechsel mit M7 1:1 BM. Zur Kontrolle wurden hCMEC/D3 ausschließlich in KM und DM (nach 48 h) kultiviert. Anschließend folgte eine Kultivierung für 21 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 und 21 wurde die Barriereintegrität des Endothels mithilfe einer TEER-Messung ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Fläche des Transwell-Systems normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet aus $n = 3$.

Dabei wurden Messwerte zwischen $30,17 \pm 0,50 \Omega \text{ cm}^2$ und $47,88 \pm 1,40 \Omega \text{ cm}^2$ in den ersten 14 Tagen ermittelt. In der Literatur werden TEER-Werte der hCMEC/D3 im Bereich von $30\text{-}50 \Omega \text{ cm}^2$ beschrieben.³⁶⁷⁻³⁶⁹ Dies konnte anhand der Messungen validiert werden. Die stärkste Barriereichtigkeit konnte an Tag 7 mit $43,42 \pm 1,72 \Omega \text{ cm}^2$ für die Kontrolle und $47,88 \pm 1,40 \Omega \text{ cm}^2$ in M7 1:1 BM ermittelt werden. Jedoch ist eine deutliche Abnahme der Barriereintegrität in beiden Medien ab Tag 9 um bis zu 62,41 % zu beobachten. Um dieses Phänomen zu untersuchen und um Löcher im Zelllayer auszuschließen, wurden die Zellen nach dem Experiment zur

Charakterisierung der Barriere-Marker VE-Cadherin und CD31 immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 136 Anhang). Anhand der immunhistochemischen Färbung konnte ein konfluent und intakter Endothelzelllayer nachgewiesen werden. Infolgedessen wurde die Barriere der hCMEC/D3 an Tag 7 als ausgebildet definiert und für zukünftige Experimente eingesetzt.

3.2.2.1.4.2 Nachweis der Expression zelltypischer Marker von hCMEC/D3

Analog zu den TEER-Messungen wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden hCMEC/D3 und die entsprechende Kontrolle im Transwell-System, wie in Kapitel 3.2.2.1.4.1 beschrieben, vorbereitet. Nach 7 Tagen erfolgte eine Quantifizierung der Expression essentieller Barriere-Marker mithilfe der RT-qPCR. Die erhaltenen Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normiert und sind in Abbildung 74 aufgeführt.

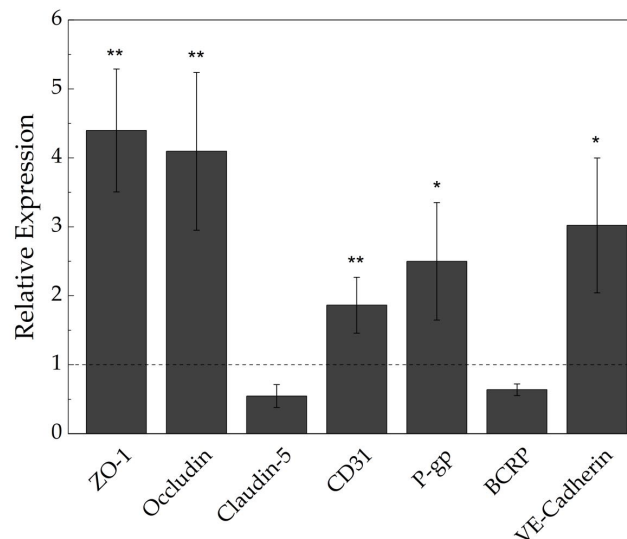


Abbildung 74: Relative mRNA-Expression essentieller Barriere-Proteine in hCMEC/D3 in M7 1:1 BM. $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtete Transwell-Systeme in KM ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium durch M7 1:1 BM ersetzt. Zur Kontrolle wurde eine Kultivierung der hCMEC/D3 in KM/DM verwendet. Es folgte eine Kultivierung für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Anschließend wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression der Proteine quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 gekennzeichnet.

Es zeigte sich in M7 1:1 BM eine erhöhte Expression von CD31 ($1,86 \pm 0,40$), Occludin ($4,09 \pm 1,14$), ZO-1 ($4,39 \pm 0,89$), P-gp ($2,5 \pm 0,85$) und VE-Cadherin ($3,02 \pm 0,97$). Lediglich die Expression von BCRP ($0,63 \pm 0,08$) und Claudin-5 ($0,54 \pm 0,16$) war erniedrigt. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung der hCMEC/D3 die Expression essentieller Barriere-Marker in M7 1:1 BM erhöht und somit die Ausbildung einer dichten Barriere begünstigt. Das Ergebnis wurde anhand der TEER-Messungen in Kapitel 3.2.2.1.4.1 bestätigt. Diese Erkenntnis diente als Grundlage zur Etablierung des NVU-Modells im Transwell-System in den folgenden Experimenten.

Auch Dr. R. Pfister konnte in einer Genexpressionsanalyse belegen, dass eine Kultivierung der hCMEC/D3 unter Reduktion von Wachstumsfaktoren und FBS in einer erhöhten Expression verschiedener Barriere-Marker resultiert.¹⁴ Dieser Effekt konnte von Weksler *et al.* und Vu *et al.* bestätigt werden.^{270,370} So konnte gezeigt werden, dass das Anlegen eines Flusses sowie die Reduktion essentieller Wachstumsfaktoren die Ausbildung einer dichten Barriere begünstigt.

3.2.2.2 Kokultur aus Astrozyten und Neuronen im 24-Well

Astrozyten bilden den größten Anteil der Gliazelltypen im ZNS.^{371,372} Neben der Ausbildung einer dichten Barriere in der BBB sind sie für eine korrekte Funktion sowie Signalweiterleitung der Neuronen notwendig.^{371,373} Sie unterstützen das neuronale Überleben sowie Differenzierung und spielen eine große Rolle im Neuritenwachstum und der Synaptogenese.^{371,373} Es ist bekannt, dass Astrozyten-konditioniertes Medium (*Astrocyte-conditioned medium*) das Wachstum neuronaler Zellen fördert, das Absterben unter hypoxischen Zuständen verringert und die elektrische Aktivität der Neuronen erhöht.^{374,375} Dies unterstreicht die Bedeutung der Astrozyten für ein funktionsfähiges ZNS.

Um eine korrekte Funktionsfähigkeit der Neuronen bedingt durch Astrozyten in einem *in vitro* NVU-Modell zu gewährleisten, wurde eine Kokultur aus Astrozyten und Neuronen etabliert. Dies erfolgte zunächst unter statischen Bedingungen. Anhand der Literatur konnte gezeigt werden, dass ein Neuronen-Astrozyten-Verhältnis von 1:3 eine erhöhte Expression essentieller Barriere-Proteine sowie höhere TEER-Werte in Kokultur mit einem Endothel erzielte.^{105,376} Daher wurde dieses Verhältnis zur Etablierung der Kokultur aus Astrozyten und Neuronen verwendet. Dafür wurden $5 \cdot 10^4$ HA in ein mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtetes Well einer 24-Well-Platte in KM ausgesät. Dr. R. Pfister konnte zeigen, dass sich eine Beschichtung mit 0,6 mg/ml Kollagen I zur Adhäsion von HA auf einer PC-Membran eignet.¹⁴ Am nächsten Tag wurde der Astrozytenlayer mit Matrigel hESC beschichtet und anschließend mit $1,6 \cdot 10^4$ NSC besiedelt. Die Kultivierung erfolgte in M7 1:1 BM bei 5 % CO₂ und 37 °C. Nach 14 Tagen wurden die Astrozyten sowie die ausdifferenzierten Neuronen immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch visualisiert. Dabei erlaubten die Marker GFAP und β -III Tubulin die Charakterisierung von Astrozyten und Neuronen. Das Ergebnis zeigte, dass eine Differenzierung der Neuronen sowie eine Kokultivierung der Zelltypen in M7 1:1 BM unter Ausbildung ihrer zelltypischen Marker möglich ist (Abbildung 75).

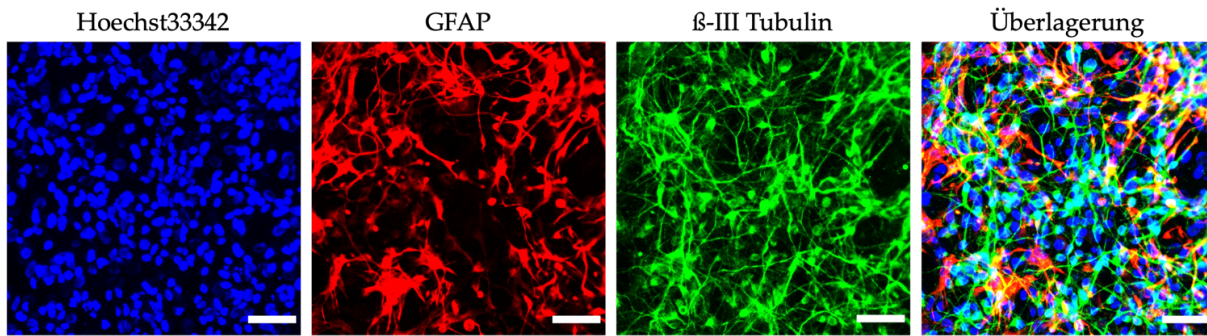


Abbildung 75: Immunfluoreszenzfärbung von HA und Neuronen in Kokultur in M7 1:1 BM. $5 \cdot 10^4$ HA wurden in ein mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtetes Well einer 24-Well-Platte in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Beschichtung mit Matrigel hESC auf dem Astrozytenlayer. Daraufhin wurden $1,6 \cdot 10^4$ Neuronen in M7 1:1 BM ausgesät. Es folgte eine Kultivierung bei 5 % CO_2 und 37 °C. Ein Mediumwechsel mit M7 1:1 BM erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden die spezifischen Zellstrukturen visualisiert (ZEISS LSM 800). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst 33342. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

3.2.2.3 Kokultur aus hCMEC/D3 und Neuronen im Transwell-System

Im Folgenden wurde eine Kokultur aus hCMEC/D3 und Neuronen etabliert. Dies diente zur Überprüfung, ob ein Wachstum der Neuronen auf der porösen PC-Membran des Transwell-Systems prinzipiell möglich ist. Diese Untersuchung war notwendig, da die Membran im vasQchip aus demselben Material besteht. Hierfür wurde die apikale Seite des Transwell-Systems mit 0,1 mg/ml Kollagen I und die basale Seite mit Matrigel hESC beschichtet. Anschließend wurden $0,6 \cdot 10^4$ NSC auf der basalen Seite der porösen Membran ausgesät. Um ein Anwachsen der NSC auf der porösen Membran zu gewährleisten, wurde das Transwell für 3 h um 180° gedreht positioniert. Wie in Kapitel 3.2.2.1.4.1 beschrieben, wurde die stärkste Barriereintegrität an Tag 7 der hCMEC/D3 in M7 1:1 BM ermittelt. Jedoch ist eine vollständige Differenzierung der Neuronen erst nach 14 Tagen gewährleistet. Aus diesem Grund wurden die hCMEC/D3 erst 7 Tage später in die apikale Seite des Transwell-Systems eingebracht. Dabei wurde, wie in den vorherigen Versuchen beschrieben, ein dreistündiges Anwachsen der hCMEC/D3 in ihrem Spezialmedium KM ermöglicht. Somit konnte zum einen eine korrekte Differenzierung der Neuronen und zum anderen eine starke Barriereintegrität der hCMEC/D3 an Tag 14 sichergestellt werden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in M7 1:1 BM für 14 Tage bei 5 % CO_2 und 37 °C. Anschließend wurden die Zelltypen der Kokultur mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Hierbei wurde für hCMEC/D3 der Barriere-Marker VE-Cadherin und für Neuronen β -III Tubulin gewählt. Die Detektion erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie und *z-stack* Messungen. Anhand der horizontalen 3D-Projektion des Transwell-Systems sind durch die PC-Membran zwei getrennte Zellschichten aus hCMEC/D3 und Neuronen zu erkennen (Abbildung 76). Damit konnte eine Adhäsion der Neuronen auf der PC-Membran nachgewiesen und eine erfolgreiche Kokultivierung der beiden Zelltypen unter Ausbildung ihrer spezifischen Marker bestätigt werden.

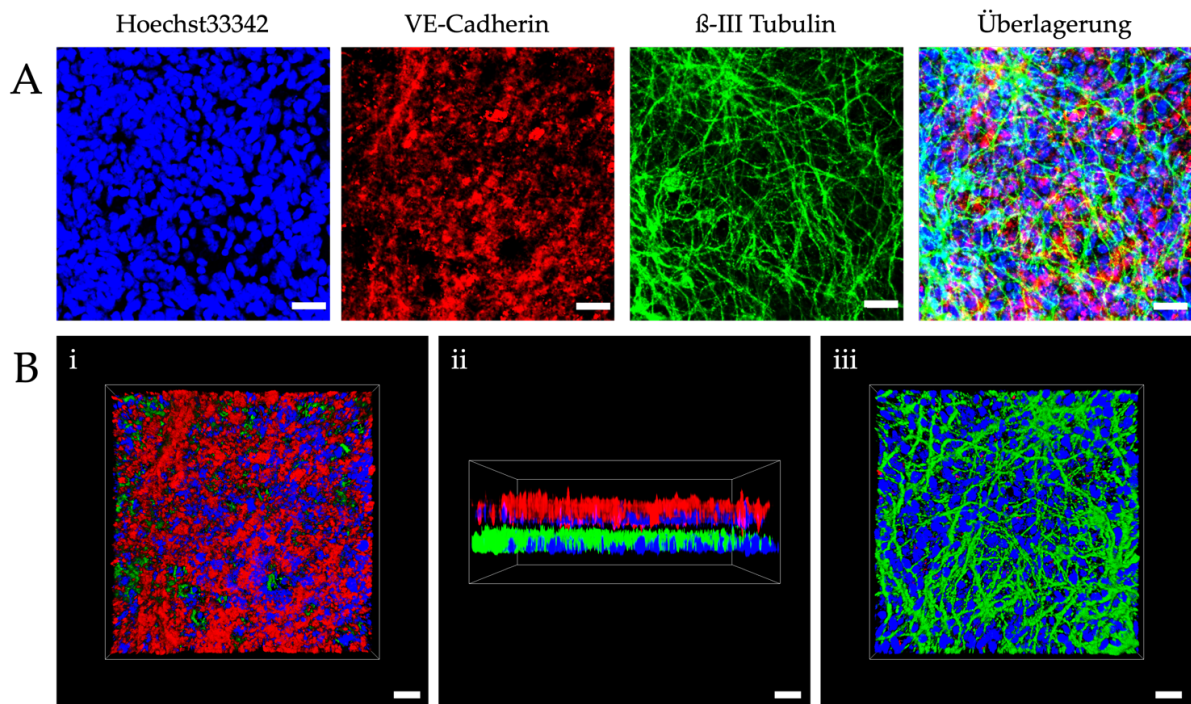


Abbildung 76: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker der Kokultur aus hCMEC/D3 und Neuronen im Transwell-System. Das Transwell-System wurde apikal mit 0,1 mg/ml Kollagen I und basal mit Matrigel hESC beschichtet. Anschließend wurden $0,6 \cdot 10^4$ NSC basal auf die PC-Membran in M7 1:1 BM ausgesät. Um das Anwachsen der NSC auf der Unterseite des Transwell-Systems zu gewährleisten, wurde eine Positionierung um 180° gedreht für 3 h vorgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 5 % CO_2 und 37°C . Nach 7 Tagen wurden $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 apikal eingebracht. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Daraufhin wurden mit inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 37$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 110 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Anschließend konnten Maximalüberlagerungen (A) und 3D-Projektionen (B) erstellt werden. (Bi) zeigt die innere und (Biii) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (Bii) stellt die horizontale Ansicht des Transwell-Systems dar. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin in hCMEC/D3. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. 3D-Projektionen wurden mit der Leica LasX-Software erstellt. Der Maßstabsbalken entspricht für (A) $25 \mu\text{m}$ und (B) $20 \mu\text{m}$.

3.2.2.4 Kokultur der NVU-Zelltypen im Transwell

Nachfolgend wurde ein vollständiges NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HA, HBVP, HM und iPSC differenzierten Neuronen im Transwell-System etabliert und auf seine Funktion evaluiert.

3.2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Etablierung des NVU-Modells im Transwell-System wurde die apikale Seite mit 0,1 mg/ml und die basale Seite mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Dr. V. Kappings und Dr. R. Pfister konnten zeigen, dass eine 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran das Anwachsen von HBVP sowie HA fördert. Zudem wird Kollagen I als Beschichtung zur Kultivierung von HM vom Hersteller empfohlen. Um ein *in vivo* 1:3 Verhältnis zwischen Endothelzellen und Perizyten zu erzielen, wurden $2 \cdot 10^4$ HBVP auf die basale Seite des Transwell-Systems in KM ausgesät. Wie zuvor

beschrieben, erfolgte eine Positionierung des Transwell-Systems um 180° gedreht, um ein Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran zu gewährleisten. Astrozyten erzielten einen Anteil von 20-40 % und Mikroglia 5-15 % der Gehirnzellen.³⁷⁷ Zudem wird laut Hersteller empfohlen, die immortalisierten HM in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auszusäen, da diese eine schnellere Proliferation als primäre Mikroglia aufweisen. Aus diesem Grund wurde ein Astrozyten-Mikroglia-Verhältnis von 5:1 gewählt. Am nächsten Tag wurden auf den Perizytenlayer $2 \cdot 10^4$ HA und $0,4 \cdot 10^4$ HM in KM simultan nach demselben Prinzip ausgesät. 24 h später konnte die basale Seite mit Matrigel hESC beschichtet, das Transwell um 180° positioniert und $0,6 \cdot 10^4$ NSC eingebracht werden. Ab hier erfolgte eine Kultivierung der Zellen in M7 1:1 BM bei 5 % CO₂ und 37 °C. 7 Tage nach Einbringung der NSC wurden in den apikalen Bereich des Transwell-Systems $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in KM ausgesät und das Medium nach 3 h durch M7 1:1 BM ersetzt. Eine schematische Darstellung der Besiedlung des Transwell-Systems ist in Abbildung 77A aufgeführt. Nach einer siebentägigen Kultivierung wurde das NVU-Modell mithilfe zelltypischer Marker immunhistochemisch gefärbt. Jedoch ist eine simultane mikroskopische Aufnahme aller Zelltypen aufgrund der Anregungs- sowie der Emissionswellenlängen der Antikörper gekuppelten Fluorophore auf drei begrenzt. Zudem erschwert die begrenzte Verfügbarkeit von Antikörpern aus verschiedenen Spezies eine simultane Kofärbung der Zelltypen. Aus diesem Grund wurde jeweils ein Zelltyp pro Transwell-System charakterisiert. Zum Nachweis der hCMEC/D3 wurde der zelltypische Marker CD31, für HBVP α -SMA, für HA GFAP, für HM *Ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1) und für Neuronen β -III Tubulin verwendet. Iba-1 ist ein 17 kDa schweres Zytoplasma-Protein, welches spezifisch von Makrophagen und Mikroglia exprimiert wird.^{378,379} Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eine Detektion der jeweiligen Zelltypen unter Ausbildung der zellspezifischen Marker im Kokultur-Modell erfolgreich war (Abbildung 77B). Da eine Besiedlung der Transwell-Systeme simultan unter denselben Parametern und die Auswahl zur immunhistochemischen Färbung zufällig erfolgte, kann von einer erfolgreichen Kokultivierung der Zellen im Transwell-System ausgegangen werden.

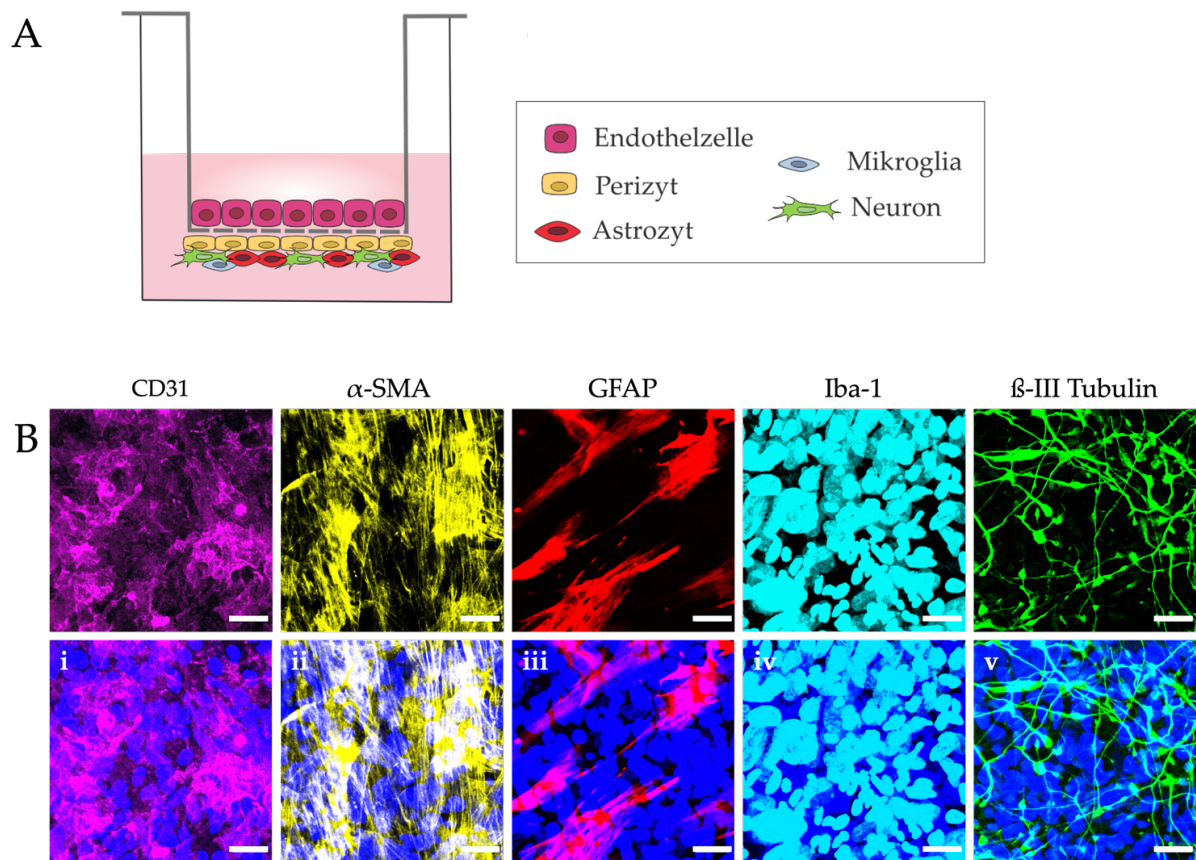


Abbildung 77: Schematische Darstellung und Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker der Kokultur aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen im Transwell-System. Das Transwell-System wurde apikal mit 0,1 mg/ml und basal mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Anschließend wurde das Transwell um 180° gedreht positioniert und mit $2 \cdot 10^4$ HBVP in KM auf die beschichtete PC-Membran ausgesät. Nach 3 h wurde das Transwell-System erneut in der Ausgangslage positioniert. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $2 \cdot 10^4$ HA und $0,4 \cdot 10^4$ HM nach demselben Prinzip in KM. Daraufhin wurde 24 h später das basale Kompartiment mit Matrigel hESC beschichtet und $0,6 \cdot 10^4$ NSC basal auf die PC-Membran in M7 1:1 BM nach demselben Prinzip ausgesät. Es folgte eine Inkubation bei 5 % CO₂ und 37 °C. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 apikal eingebracht. Die schematische Darstellung ist in (A) aufgeführt. Nach weiteren 7 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Daraufhin wurden mit inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen durchgeführt (n = 30, Abstand = 3 μ m, h = 90 μ m, ZEISS LSM 800). Anschließend konnten Maximalüberlagerungen (B) erstellt werden. (Bi) bis (Bv) zeigt die Maximalüberlagerung der zelltypischen Strukturen mit Hoechst33342. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Magenta: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin in hCMEC/D3. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Cyan: Immunfluoreszenzfärbung von Iba-1 in HM. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht 25 μ m.

3.2.2.4.2 Expression spezifischer Barriere-Marker

Es ist bekannt, dass Perizyten, Astrozyten, Mikroglia sowie Neuronen für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Barriereintegrität und -selektivität der BBB von Bedeutung sind.³⁸⁰ So konnte in mehreren TEER-Messungen und Permeabilitätsanalysen gezeigt werden, dass Astrozyten die Barriereichtigkeit der Endothelzellen *in vitro* durch Sekretion verschiedener löslicher Wachstumsfaktoren um den Faktor 2,5 erhöhen konnte.^{105,381} Ähnliche Effekte konnten

durch Neuronen, Mikroglia und Perizyten beobachtet werden.^{275,380,381} So ist bekannt, dass Perizyten die Bildung essentieller *Tight Junction*-Proteine fördern. Zudem resultiert ein Mangel an Perizyten in transgenen Mäusen zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität.³⁸²

Durch die poröse PC-Membran des Transwell-Systems ist ein direkter Zellkontakt zwischen den Endothelzellen und den Zellen des „Hirngewebes“ über Poren einer Größe von 0,4 μm gegeben. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass diese Porengröße in einem Transwell-System einen physischen Kontakt zwischen den Endfüßchen der Astrozyten und den Endothelzellen erlaubt (*Contact co-culture system*).²⁷⁵ Um den positiven Einfluss der umgebenden Zellen auf die Barriere in den hCMEC/D3 zu bestätigen, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dafür wurde ein NVU-Modell, wie zuvor in Kapitel 3.2.2.4.1 beschrieben, etabliert. Zur Kontrolle fungierte die Kultivierung von ausschließlich hCMEC/D3 im apikalen Kompartiment des Transwell-Systems. An Tag 14 wurde die Expression essentieller Barriere-Marker quantifiziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dabei auf die Expression der Kontrolle normiert (Abbildung 78).

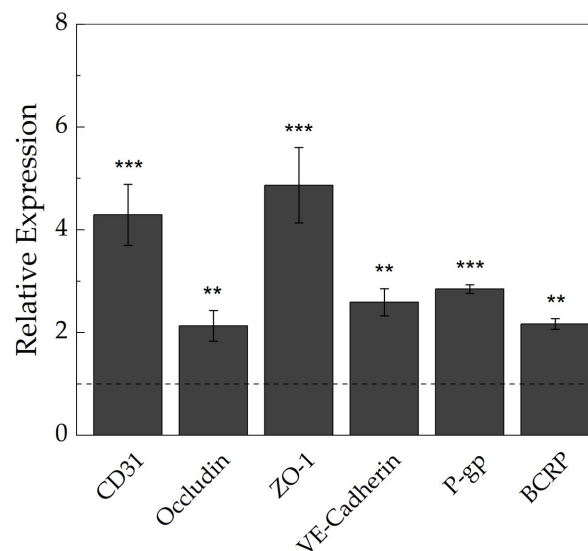


Abbildung 78: Relative mRNA-Expression der Barriere-Marker in hCMEC/D3 im NVU-Modell im Transwell-System. Zur Besiedlung des Transwell-Systems wurde das apikale Kompartiment mit 0,1 mg/ml und das basale Kompartiment mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Es folgte eine Besiedlung mit $2 \cdot 10^4$ HBVP in KM. Um ein Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran sicherzustellen, wurde das Transwell für 3 h um 180° gedreht positioniert. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $2 \cdot 10^4$ HA und $0,4 \cdot 10^4$ HM nach demselben Prinzip in KM. Nach 24 h wurde der Zelloyer im basalen Kompartiment mit Matrigel hESC beschichtet und $0,6 \cdot 10^4$ NSC basal auf die PC-Membran in M7 1:1 BM nach demselben Prinzip ausgesät. Im Anschluss folgte eine Kultivierung in M7 1:1 BM bei 5 % CO_2 und 37°C . Nach 7 Tagen wurden $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 apikal eingebracht. Als Kontrolle wurde eine Kultivierung ausschließlich mit hCMEC/D3 im Transwell-System verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Nach einer weiteren Kultivierung von 7 Tagen wurde die RNA der hCMEC/D3 isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression Barriere-relevanter Proteine quantifiziert. Als Referenzen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Dabei konnte eine erhöhte Expression aller spezifischer Barriere-Proteine (CD31: $4,29 \pm 0,59$, Occludin: $2,13 \pm 0,29$, VE-Cadherin: $2,59 \pm 0,26$, P-gp: $2,84 \pm 0,08$, BCRP: $2,16 \pm 0,10$) detektiert werden. Die stärkste Hochregulation wurde vom *Tight Junction*-Protein ZO-1 ($4,86 \pm 0,73$) erzielt. Ähnliche Resultate erzielten Malina *et al.*, hierbei konnte in einem Kokultur-Modell im Transwell eine Hochregulation der *Tight Junction*-Proteine ZO-1 sowie Occludin detektiert werden.³⁸³ Auch Gaillard *et al.* konnte eine erhöhte Expression der Efflux-Pumpe P-gp durch Einfluss von Astrozyten im Transwell-System feststellen.³⁸⁴ Delsing *et al.* waren auch in der Lage in einem NVU-Modell aus Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten und Neuronen bereits nach 3 Tagen eine erhöhte Expression von CD31 und VE-Cadherin zu detektieren.³⁸⁵ Damit konnte der in der Literatur beschriebene positive Einfluss der umliegenden Zelltypen auf die Barriere des Endothels im NVU-Modell bestätigt werden.

3.2.2.5 *Contact co-culture system und Non-contact co-culture system*

Die Kultivierung des „Hirngewebes“ im basalen Kompartiment des Transwell-Systems kann über zwei Methoden erfolgen. Einerseits die Kultivierung an der Unterseite der porösen PC-Membran, wodurch ein physischer Zellkontakt zu den Endothelzellen (*Contact co-culture system*) über die Poren ermöglicht wird (Kapitel 3.2.2.4.1). Andererseits die Kultivierung ohne Zellkontakt (*Non-contact co-culture system*) auf der Kultivierungsoberfläche einer Well-Platte. Hierbei erfolgt eine Kommunikation zwischen den Zellschichten lediglich durch Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren im Nährmedium. In diesem Versuch wurde neben dem etablierten *Contact co-culture system* das *Non-contact co-culture system* im Transwell-System integriert. Dabei wurde mithilfe von TEER-Messungen überprüft, ob der direkte physische Kontakt zwischen beiden Zellschichten im Transwell-System die Barriereintegrität der Endothelzellen beeinflusst. Hierfür wurde das etablierte NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen, wie in Kapitel 3.2.2.4.1 beschrieben, in einem Transwell-System vorbereitet (*Contact co-culture system*). Analog dazu wurden die Zelltypen der „Hirnseite“ für ein *Non-contact co-culture system* auf den Kultivierungsboden der mit Kollagen I beschichteten 24-Well-Platte ausgesät. Hierbei wurden Transwell-Systeme derselben Porengröße, Beschichtung sowie Zelltypen derselben Zellzahl verwendet. Ein Schema der beiden Kokultivierungs-Systeme ist in Abbildung 79 dargestellt. Neben den beiden NVU-Modellen wurde zur Kontrolle eine Monokultur aus hCMEC/D3 im Transwell-System verwendet. Die Kultivierung erfolgte über 21 Tage in M7 1:1 BM bei 5 % CO₂ und 37 °C. An Tag 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21 (nach Einbringung der hCMEC/D3) wurden TEER-Messungen durchgeführt. Anhand der ermittelten TEER-Werte konnte durch Kokultivierung mit HBVP, HA, HM und Neuronen eine höhere Barriereintegrität des Endothels im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Damit stimmt dieses Ergebnis mit der Genexpressionsanalyse aus Kapitel 3.2.2.4.2 überein. Die höchste Barriereintegrität konnte im *Contact co-culture system* mit einem TEER-Wert von $57,13 \pm 0,43 \Omega \text{ cm}^2$ an Tag 7 erzielt werden. Bereits in der Literatur konnte dieses Resultat in zahlreichen Studien gezeigt werden.^{275,376} So konnten Delsing *et al.* in einem NVU-Modell im Transwell höhere TEER-Werte sowie eine verminderte Permeabilität im Vergleich zur Monokultur mit hCMEC/D3 ermitteln.³⁸⁵ Ähnliche

Ergebnisse erzielten Stebbins *et al.* durch Kokultivierung mit iPSC-differenzierten Perizyten, Neuronen sowie Astrozyten.³⁸⁶ Auch Malina *et al.* und Vandenhaute *et al.* konnten diesen Effekt belegen.^{380,387,388} Hierbei wurde eine erhöhte Barriereintegrität mit TEER-Werten bis zu $60 \Omega \text{ cm}^2$ sowie eine verminderte parazelluläre Permeabilität festgestellt. Jedoch waren die TEER-Werte des *Non-contact co-culture systems* im Vergleich zum *Contact co-culture system* geringfügig vermindert. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls durch zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen NVU-Modellen im Transwell-System in der Literatur bestätigt werden.^{275,387,388} Ursächlich hierfür könnte die größere Distanz zwischen beiden Zellschichten sein, sodass instabile freigesetzte Faktoren der Zellen im basalen Bereich zerfallen bevor sie die Endothelzellschicht erreichen können.³⁸¹ Ähnlich wie in Kapitel 3.2.2.1.4.1 konnte die höchste Barriereintegrität aller drei Messreihen an Tag 7 sowie eine Abnahme um bis zu 64,99 % der Messwerte ab Tag 9 festgestellt werden. Aufgrund der höheren Barriereintegrität der hCMEC/D3 wurde das etablierte NVU-Modell aus Kapitel 3.2.2.4.1 als *Contact co-culture system* für zukünftige Experimente eingesetzt.

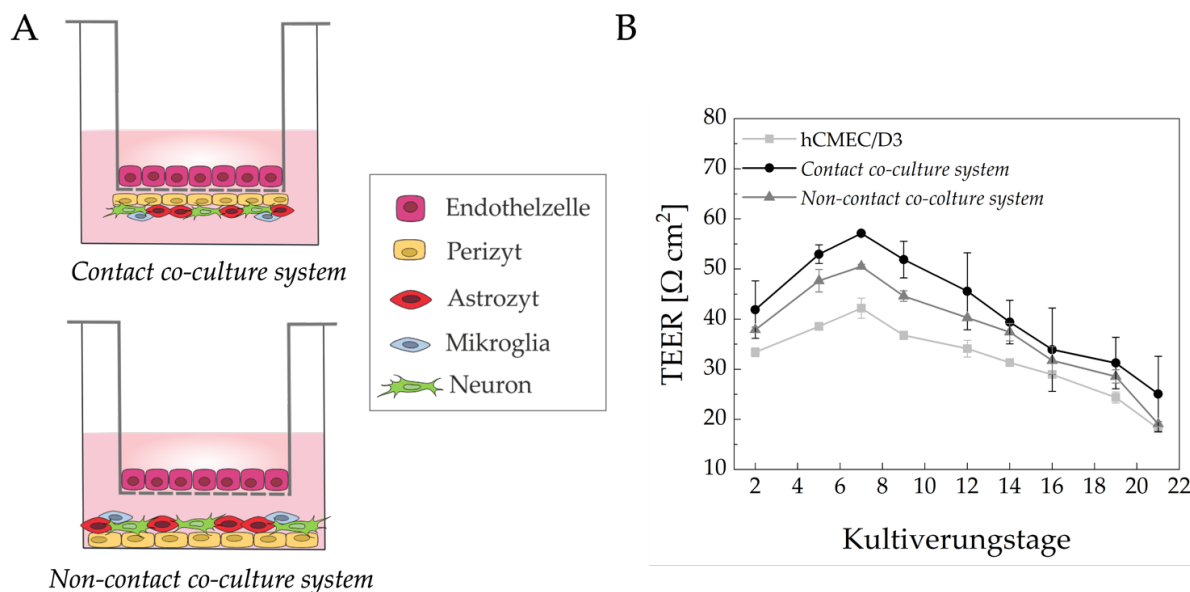


Abbildung 79: Schematische Darstellung und TEER-Messung des *Contact co-culture systems* und *Non-contact co-culture systems*. Für das *Contact co-culture system* wurde das Transwell-System apikal mit $0,1 \text{ mg/ml}$ und basal mit $0,6 \text{ mg/ml}$ Kollagen I beschichtet. Es folgte eine Besiedlung mit $2 \cdot 10^4$ HBVP in KM. Hierfür wurde das Transwell für 3 h um 180° gedreht positioniert, um das Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran zu gewährleisten. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $2 \cdot 10^4$ HA und $0,4 \cdot 10^4$ HM nach demselben Prinzip in KM. 24 h später wurde eine Beschichtung mit Matrigel hESC (1:100) im basalen Kompartiment durchgeführt und $0,6 \cdot 10^4$ NSC basal auf die PC-Membran in M7 1:1 BM nach demselben Prinzip ausgesät. Es folgte eine Kultivierung in M7 1:1 BM bei 5 % CO_2 und 37°C . Nach 7 Tagen konnten $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 apikal eingebracht werden. Für das *Non-contact co-culture system* erfolgte eine Einbringung von HBVP, HA, HM und Neuronen auf der Kultivierungsfläche einer 24-Well-Platte. Zur Kontrolle wurde eine Monokultur von hCMEC/D3 im Transwell-System verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Anschließend erfolgte an Tag 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19 und 21 (nach Einbringung der hCMEC/D3) eine TEER-Messung. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt. (A) zeigt die schematische Darstellung der beiden Kokultur-Systeme. (B) stellt die ermittelten TEER-Werte normiert auf die Kultivierungsfläche dar.

3.2.2.6 Kapitelzusammenfassung Etablierung der NVU im Transwell

Es konnte ein NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und iPSC-differenzierten Neuronen im Transwell-System etabliert und evaluiert werden. Hierfür wurden Wachstumskurven, Immunfluoreszenzfärbungen, Genexpressionsanalysen sowie TEER-Messungen eingesetzt. Dabei wurde M7 1:1 BM als ein geeignetes Kultivierungsmedium zur Kokultur des NVU-Modells ermittelt. Um das Wachstum der Zelltypen in M7 1:1 BM trotz Abwesenheit des essentiellen FBS zu steigern, wurde ein Anwachsen sowie eine Kultivierung der Zelltypen für mindestens 3 h in KM ermöglicht. Des Weiteren förderte M7 1:1 BM eine Differenzierung von Neuronen sowie die Ausbildung einer dichten Barriere der hCMEC/D3. Anschließend folgte im nächsten Schritt eine Inkorporation weiterer Zelltypen der NVU. Dabei konnte der in der Literatur beschriebene positive Einfluss der umliegenden Zelltypen der NVU auf die Ausbildung einer dichten Barriere im Endothel bestätigt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die höchste Barriereintegrität der hCMEC/D3 in einem Kultivierungszeitraum von 21 Tagen an Tag 7 erzielt wurde. Daher wurde das NVU-Modell 7 Tage nach Einbringung der hCMEC/D3 als ausgebildet definiert und in diesem Zustand für zukünftige Experimente verwendet. Zusätzlich resultierte eine Kultivierung im *Contact co-culture system* in einer höheren Barriereintegrität des Endothels. Aus diesem Grund wurde eine Kultivierung mit einem physiologischen Zellkontakt zwischen den beiden Zellschichten bevorzugt. Diese Erkenntnisse fungierten im nächsten Schritt als Grundlage für eine Etablierung der NVU im *Organ-on-a-chip* System vasQchip.

3.2.3 Etablierung der NVU im vasQchip

In vivo spielen neben dem Einfluss weiterer Zelltypen auch mechanische Reize wie der Blutfluss eine große Rolle in der Ausbildung einer dichten Barriere im Blutgefäß in der NVU.^{389,390} Wie bereits in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben, erzeugt der Blutfluss physiologische Scherkräfte, die sich auf die Funktion und Morphologie der Endothelzellen auswirken und die Barriereintegrität fördern.^{389,391} So konnten Poller *et al.* zeigen, dass die Exposition eines artifiziellen Blutstroms den TEER-Wert von hCMEC/D3 von 30 Ω cm² auf 1000-1200 Ω cm² erhöhte.²⁷³ Ferner beschrieben Weksler *et al.* dass physiologische Scherkräfte womöglich größere Auswirkungen auf die Barriereintegrität der Endothelzellen haben könnten als der Einfluss umliegender Zelltypen der NVU.²⁷⁰ Auch Dr. R. Pfister erzielte in den hCMEC/D3 eine erhöhte Expression der Barriere-Proteine CD31, VE-Cadherin, Claudin-5, Occludin sowie ZO-1 durch Exposition einer Mikrofluidik.¹⁹⁸

Bislang wurde das NVU-Modell aus Kapitel 3.2.2 statisch in einem Transwell-System kultiviert. Dagegen ermöglicht eine Kultivierung im vasQchip durch Integration einer Mikrofluidik eine künstliche „Durchblutung“ des NVU-Modells. Dieser artifizielle Blutstrom gewährleistet einerseits die für Endothelzellen relevanten physiologischen Scherkräfte und andererseits die Versorgung der Zellen im umgebenden Kompartiment mit Nährstoffen. Im Folgenden wurde das NVU-Modell nach Kapitel 3.2.2 im vasQchip etabliert. Das BBB-Modell im vasQchip nach

Dr. R. Pfister und Dr. V. Kappings diente dabei als Basis.^{14,72} Anschließend wurde das etablierte NVU-Modell mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen, Viabilitätsbestimmungen, Expressionsanalysen sowie einem Funktionalitätstest charakterisiert und auf seine Funktion überprüft.

3.2.3.1 Kokultur von Astrozyten und Neuronen im vasQchip

Neuronen reagieren hinsichtlich ihrer hohen Ansprüche an eine definierte Mikroumgebung sehr sensibel auf veränderte Parameter. Im Vergleich zu einer Kultivierung in einer Well-Platte oder einem Transwell-System, erfolgt im vasQchip die Kultivierung in einem geschlossenen Kompartiment. Dabei herrschen unter anderem ein veränderter Gasaustausch sowie Druckverhältnisse. Dies lässt vermuten, dass eine Kultivierung der sensiblen Neuronen im umgebenden Kompartiment des vasQchips erschwert sein könnte. Wie zuvor beschrieben, fördern Astrozyten *in vivo* das Wachstum und die korrekte Funktionalität von Neuronen.^{371,373} Dies gibt Grund zur Annahme, dass eine Kokultivierung mit Astrozyten das Wachstum der Neuronen im vasQchip begünstigen könnte. Daher erfolgte zunächst eine Kokultur aus Astrozyten und Neuronen im umgebenden Kompartiment des vasQchips. Um eine Adhäsion der Neuronen zu fördern, erfolgte die Beschichtung und Besiedlung des umgebenden Kompartiments zunächst „offen“ ohne Klebering und Deckglas. Dabei wurde der vasQchip um 180° gedreht positioniert und gewährleistete somit eine Adhäsion der Zellen am porösen Mikrokanal (siehe Abbildung 80). Ein Auslaufen des Mediums aus den Anschlüssen des vasQchips wurde durch *Plugs* verhindert. Durch die „offene“ Kultivierung kann eine für Neuronen schädigende Wirkung durch den beim Einsetzen der *Plugs* induzierten Druck im umgebenden Kompartiment ausgeschlossen werden. Nach erfolgter Beschichtung mit 0,6 mg/ml Kollagen I im umgebenden Kompartiment wurden $5 \cdot 10^5$ HA in KM eingebracht und bei 5 % CO₂ und 37 °C über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag folgte die Einbringung der Neuronen in einem Neuronen-Astrozyten-Verhältnis von 1:3 (wie in Kapitel 3.2.2). Dafür wurde die Astrozytenzellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach 48 h wurde durch Anbringung eines Kleberinges sowie Deckglases das umgebende Kompartiment geschlossen. Es folgte der Anschluss an eine Spritzenpumpe (Fusion 200 Chemyx), welche kontinuierlich das Nährmedium aus Spritzen über Schläuche in den Mikrokanal injiziert. Dabei wurde eine Flussrate von 1,7 µl/min (\cong 100 µl/h) und eine damit einhergehende Scherstress von 0,027 dyn/cm² erzeugt (siehe Abbildung 80). *In vivo* beträgt der Scherstress in Venen des Gehirns zwischen 1-4 dyn/cm² und in Kapillaren 10-20 dyn/cm².³⁹² Eine höhere Flussrate wurde zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen, um potentielle negative Einwirkungen auf die Neuronen zu verhindern. Ferner wurden in der Literatur zur mikrofluidischen Kultivierung von Neuronen in *in vitro Organ-on-a-chip* Modellen ebenfalls Flussraten von 1-3 µl/min verwendet.^{177,363}

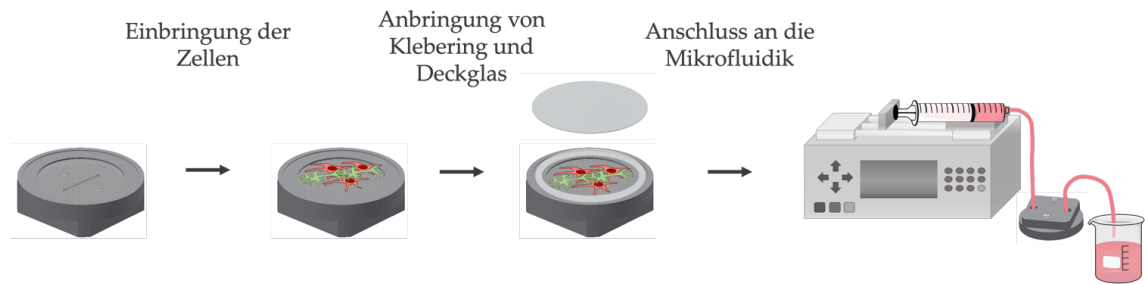


Abbildung 80: Schematische Darstellung der „offenen“ Besiedlung des umgebenden Kompartiments im vasQchip. Eine Beschichtung und Besiedlung des umgebenden Kompartiments des vasQchips erfolgte zunächst „offen“, ohne Klebering und Deckglas. Der vasQchip wurde um 180° gedreht positioniert. Die Anschlüsse des umgebenden Kompartiments wurden mit *Plugs* versehen, um ein Auslaufen des Mediums zu verhindern. Anschließend kann die PC-Membran beschichtet und die Zellen ausgesät werden. Nachdem das Anwachsen der Zellen im umgebenden Kompartiment nach 48 h sichergestellt wurde, konnte durch Anbringung von Klebering und Deckglas das Kompartiment geschlossen werden. Der vasQchip wurde nun in die Ausgangsposition zurückgedreht. Daraufhin folgte eine mikrofluidische Kultivierung durch Anschluss an eine Spritzenpumpe (Fusion 200 Chemyx) bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt.

Nach einer 14-tägigen mikrofluidischen Kultivierung wurden HA mit GFAP und Neuronen mithilfe von β -III Tubulin im vasQchip immunhistochemisch visualisiert. Durch inverse Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eine Kokultivierung der Zelltypen unter Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks über einen Zeitraum von 14 Tagen im vasQchip möglich war (Abbildung 81).

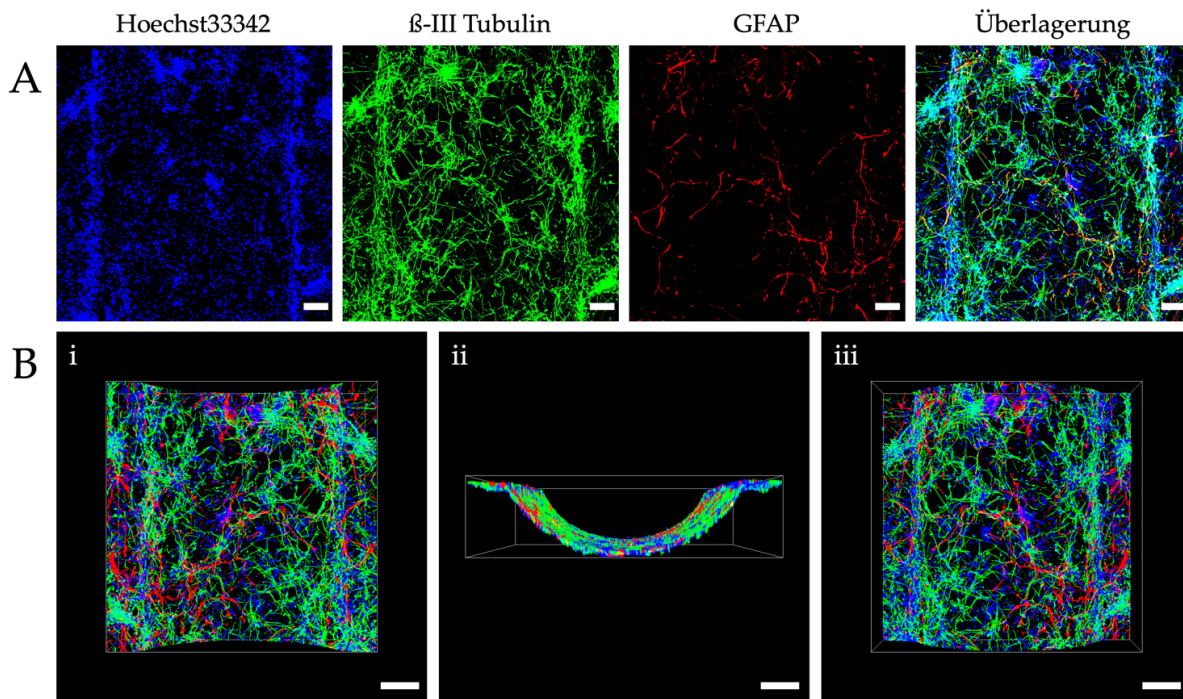


Abbildung 81: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker von HA und Neuronen im vasQchip. Eine Beschichtung und Besiedlung des vasQchips erfolgte „offen“. Dabei wurde das umgebende Kompartiment des vasQchips mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Anschließend wurden $5 \cdot 10^5$ HA in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Beschichtung des Astrozytenlayers mit Matrigel hESC und eine Einbringung von $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM. Nach 48 h wurde durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases das umgebende Kompartiment des vasQchips geschlossen. Daraufhin wurde der vasQchip an eine Spritzenpumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ fluidisch bei 5 % CO_2 und 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen im vasQchip fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Daraufhin wurden mit inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 114$, Abstand = 3 μm , $h = 339 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anschließend konnten Maximalüberlagerungen (A) und 3D-Projektionen (B) erstellt werden. (Bi) zeigt die innere und (Biii) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (Bii) stellt die horizontale Ansicht des vasQchips dar. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. 3D-Projektionen wurden mit der Leica LasX-Software erstellt. Der Maßstabsbalken entspricht für (A) 100 μm und für (B) 200 μm .

3.2.3.2 Kokultur der NVU im vasQchip und Immunfluoreszenzfärbung

Zur Rekonstruktion eines vollständigen NVU-Modells wurden weitere Zelltypen der NVU (HBVP, HM und hCMEC/D3) in den vasQchip eingebracht. Um das Wachstum der Neuronen im umgebenden Kompartiment des vasQchips sicherzustellen, bewährte sich die „offene“ Besiedlungsmethode aus Kapitel 3.2.3.1. In Kapitel 3.2.2.5 konnte gezeigt werden, dass ein physischer Zellkontakt zwischen dem Endothel und dem „Hirngewebe“ in einer höheren Barriereintegrität resultiert. Bei der „offenen“ Besiedlungsmethode ist durch die Kultivierung auf der porösen PC-Membran ein physischer Zellkontakt zwischen dem Endothel im Mikrokanal sowie den umliegenden Zellen im Kompartiment gegeben. Zur Integration des „Hirngewebes“ wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP im umgebenden Kompartiment auf die mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete PC-Membran in KM ausgesät und über Nacht kultiviert. Während die HBVP die gesamte Fläche

des Kompartiments ($4,52 \text{ cm}^2$) auskleiden, wird mit den hCMEC/D3 ausschließlich der Mikrokanal ($0,31 \text{ cm}^2$) besiedelt. Hierdurch konnte Dr. R. Pfister durch die Verwendung von $5 \cdot 10^5$ HBVP und $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 ein Verhältnis von 1:3,18 auf der Kontaktfläche erzielen. Dies kommt dem naturgetreuen *in vivo* Perizyten-Endothelzellen-Verhältnis der NVU nahe (1:3-4).^{90,113,114} Am Folgetag konnten $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in einem 5:1 Verhältnis (Kapitel 3.2.2.4.1) simultan auf die ausgebildete Perizyten-schicht in das umgebende Kompartiment in KM eingebracht und bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert werden. 24 h später wurde der Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Hierbei wurde das Astrozyten-Neuronen-Verhältnis von 3:1 beibehalten (Kapitel 3.2.2.4.1 und 3.2.3.1). Um ein Anwachsen der Neuronen auf dem Zellschicht sicherzustellen, erfolgte eine statische Kultivierung von 48 h. Anschließend wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Deckglases und Kleberinges versiegelt und bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$ mikrofluidisch kultiviert. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen, wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit $0,1 \text{ mg/ml}$ Kollagen I beschichteten Mikrokanal in KM ausgesät. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im halbrunden Mikrokanal sicherzustellen, wurde der vasQchip für 1 h mit $0,25 \text{ rpm}$ im vasQturn um die eigene Achse gedreht (Kapitel 3.1.1.2). Nach einer dreistündigen statischen Kultivierung in KM zur Regeneration der Zellen wurden die vasQchips erneut an die Spritzenpumpe angeschlossen und mikrofluidisch kultiviert. Als Kultivierungsmedium wurde M7 1:1 BM verwendet. Nach 7 weiteren Tagen waren die Neuronen ausdifferenziert und das NVU-Modell einsatzfähig. Anschließend wurden die zelltypischen Marker der Zelltypen mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung visualisiert. Wie in Kapitel 3.2.2.4.1 beschrieben, konnte aufgrund der Anregungs- sowie der Emissionswellenlängen der Antikörper gekoppelter Fluorophore keine simultane Visualisierung der fünf Zelltypen in einem vasQchip erfolgen. Somit wurde jeder Zelltyp anhand eines spezifischen Markers im Kokultur-Modell einzeln immunhistochemisch gefärbt. Hierfür wurde für hCMEC/D3 CD31, für HBVP α -SMA, für HA GFAP, für HM Iba-1 und für Neuronen β -III Tubulin gewählt. Die Visualisierung erfolgte durch inverse Konfokalmikroskopie und *z-stack* Messungen. Anhand der horizontalen Ansicht der generierten 3D-Projektionen in Abbildung 82 sind zwei durch die Membran getrennten Zellschichten im Mikrokanal sowie im umgebenden Kompartiment zu erkennen. Gemäß der Erwartung war die immunhistochemische Färbung von CD31 in den hCMEC/D3 verstärkt zwischen benachbarten Endothelzellen zu beobachten und bestätigte damit einen konfluenten Zellschicht im Mikrokanal. HBVP, HA, HM und Neuronen wurden ebenfalls durch ihre zellspezifischen Marker im umgebenden Kompartiment bestätigt. Zudem konnte ein dicht ausgebildetes neuronales Netzwerk festgestellt werden. Da eine Besiedlung der Kokultur-Modelle simultan unter denselben Parametern und die Auswahl zur immunhistochemischen Färbung zufällig erfolgte, kann von einer erfolgreichen mikrofluidischen Kokultivierung der fünf Zelltypen im vasQchip ausgegangen werden. Dieses Modell diene als Grundlage für weitere folgende Experimente. Analog dazu konnten HA, Neuronen und hCMEC/D3 mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung simultan in einem vasQchip visualisiert werden (Abbildung 138 Anhang).

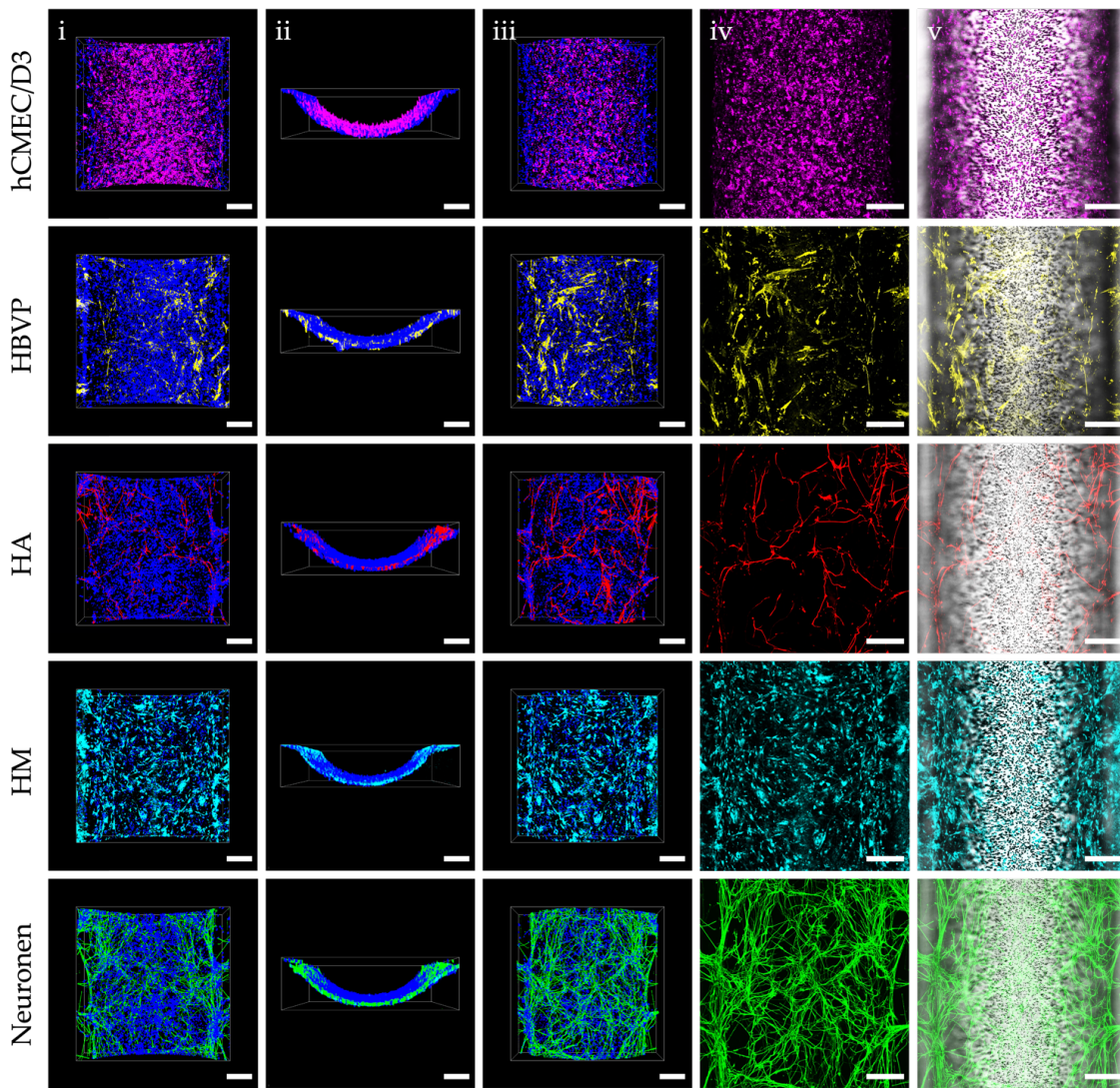


Abbildung 82: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen des NVU-Modells im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Folgetag wurden $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM eingebracht. 24 h später wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Daraufhin folgte eine fluidische Kultivierung mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen, wurde der Mikrokanal mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Es folgte eine fluidische Kultivierung über 7 Tage. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in den vasQchips fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine spezifische Antikörperfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker durchgeführt werden. Je vasQchip wurde ein Zelltyp immunhistochemisch gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten *z-stack* Messungen generiert werden ($n=103-113$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h=325-338 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Daraufhin konnte mithilfe der Leica LasX-Software 3D-Projektionen sowie Maximalüberlagerungen erzeugt werden. (i) stellt die innere laterale, (ii) stellt die horizontale und (iii) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. (iv) zeigt die Maximalüberlagerung und (v) die Maximalüberlagerung mit Hellfeld. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Magenta: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von $\alpha\text{-SMA}$ in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Cyan: Immunfluoreszenzfärbung von Iba-1 in HM. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von $\beta\text{-III Tubulin}$ in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$.

3.2.3.3 Viabilität und Proliferation der Zellen

Im menschlichen Gehirn wird eine Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen, Sauerstoff und Glucose über zahlreiche Blutgefäße sichergestellt.^{96,393} Dr. R. Pfister und Dr. D. Ivannikov konnten zeigen, dass die Versorgung der Zellen mit Nährmedium im Mikrokanal sowie im umgebenden Kompartiment des vasQchips durch die Exposition einer Mikrofluidik gewährleistet wird.^{14,72} Jedoch bestand das umliegende „Hirngewebe“ in diesen Experimenten lediglich aus Astrozyten und Perizyten. Zudem wurden Nährmedien mit FBS verwendet, welche ein Wachstum sowie die Viabilität der Zellen fördern.^{358,394} Darüber hinaus enthielten keine der verwendeten BBB-Modelle Neuronen, welche hinsichtlich ihrer Anforderungen an eine Mikroumgebung anspruchsvoll sind und eine Kultivierung in M7 1:1 BM (ohne FBS) benötigen. Folglich ist es erforderlich, die Viabilität sowie das Proliferationsverhalten der Zellen des Kokultur-Modells im vasQchip zu untersuchen. Hierfür wurde ein PrestoBlue Assay sowie eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt.

3.2.3.3.1 Lebend-/Tot-Färbung

Zur Untersuchung der Viabilität wurden die vasQchips, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, mit hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen besiedelt und über 14 Tage bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ in M7 1:1 BM mikrofluidisch kultiviert. Anschließend konnte die Viabilität der Zellen im vasQchip mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM und PI beurteilt werden. Das Funktionsprinzip der Lebend-/Tot-Färbung ist in Kapitel 3.2.5.1.1 beschrieben. Analog dazu, wurden die Zellkerne der Zellschichten im Mikrokanal sowie im umgebenden Kompartiment mit Hoechst33342 visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 83 aufgeführt. Anhand der horizontalen 3D-Projektion des vasQchips sind zwei durch die poröse PC-Membran getrennte Zellschichten im Mikrokanal sowie im Kompartiment erkennbar. Dabei wiesen beide Zellschichten durch PI detektierte nekrotische Zellen auf. Gleichzeitig konnte anhand der Calcein-AM Färbung eine deutlich überwiegende Viabilität der Zellen in beiden Kompartimenten beobachtet werden.

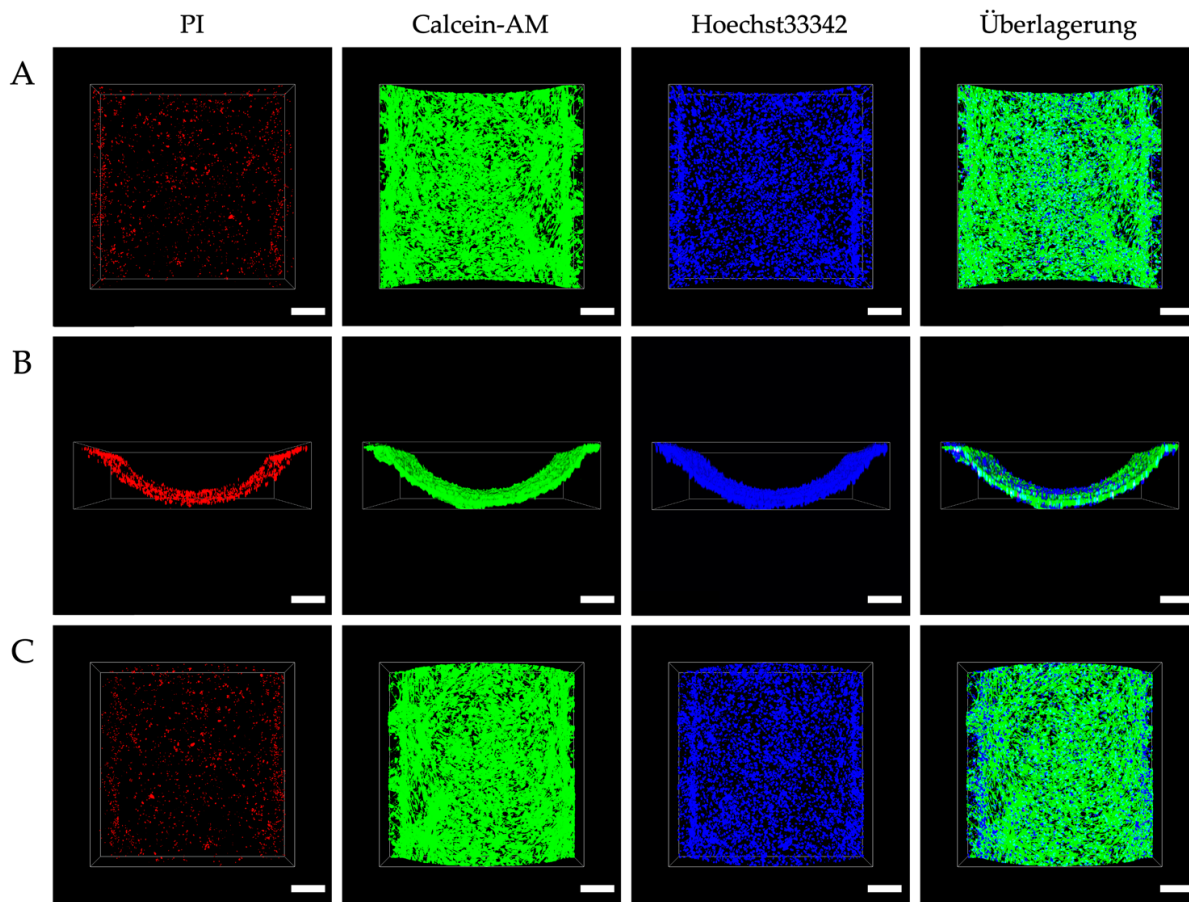


Abbildung 83: Lebend-/Tot-Färbung des NVU-Modells im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Daraufhin konnten 24 h später $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM eingebracht werden. Am Folgetag wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach einer Kultivierung von 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Es folgte eine fluidische Kultivierung mit einer Flussrate von 100 μ l/h. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in dem mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Im Anschluss erfolgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h über 7 Tage. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Daraufhin wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mithilfe von PI und Calcein-AM durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 visualisiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten *z-stack* Messungen generiert werden ($n = 105$, Abstand = 3 μ m, $h = 312$ μ m, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software wurden 3D-Projektionen erzeugt. (A) stellt die innere laterale, (B) stellt die horizontale und (C) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Rot: Nekrotische Zellen durch PI. Grün: Lebende Zellen durch Calcein-AM. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m.

3.2.3.3.2 PrestoBlue Assay

Neben dem Nachweis der Zellviabilität mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung erfolgte eine Quantifizierung des Proliferationsverhalten der Zellen im umgebenden Kompartiment anhand eines PrestoBlue Assays. Hierfür wurden vasQchips, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, mit hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen vorbereitet und 14 Tage bei einer Flussrate von 100 μ l/h mikrofluidisch kultiviert. Da eine Einbringung der hCMEC/D3 erst an Tag 7 erfolgte,

wurde an Tag 7, 9, 10, 12 und 14 ein PrestoBlue Assay im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Hierfür inkubierte das PrestoBlue Reagenz Resazurin für 3 h in M7 1:1 BM. Die Zugabe erfolgte dabei ausschließlich im umgebenden Kompartiment. Der im PrestoBlue Assay verwendete membrangängige blaue Farbstoff Resazurin wird in lebenden Zellen durch eine NADH-abhängige Reduktion zum rosafarbenen fluoreszierenden Resorufin umgesetzt (Abbildung 84).^{395,396} Eine Fluoreszenzmessung des Resorufins ermöglicht eine Quantifizierung der metabolischen Zellaktivität.^{395,397} Verglichen mit einer Referenz als Startwert kann eine Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen über einen ausgewählten Zeitraum erfolgen.

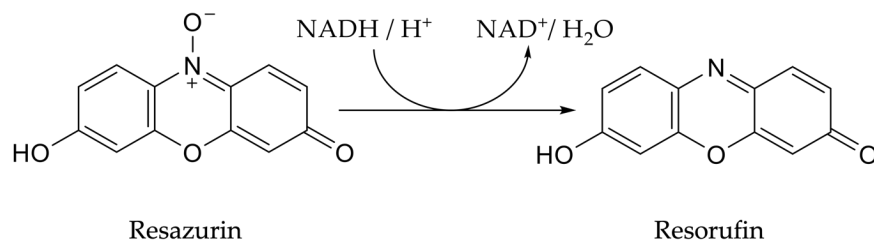


Abbildung 84: NADH-abhängige Reduktion des blauen Resazurins zum rosafarbenen fluoreszierenden Resorufin.

Im gemessenen Zeitraum von Tag 7 bis Tag 14 konnte keine signifikante Veränderung in der Proliferation festgestellt werden (Abbildung 85).

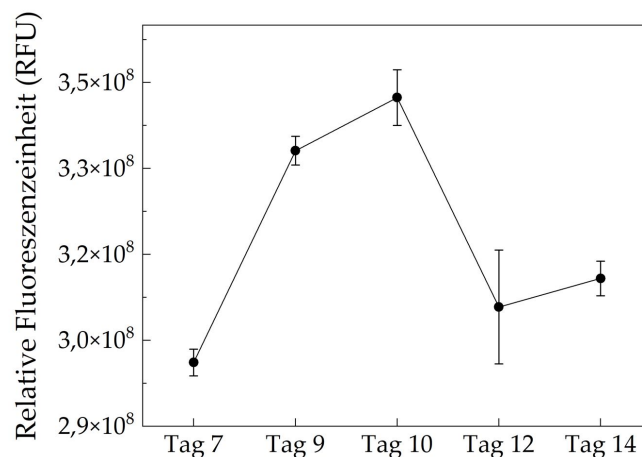


Abbildung 85: PrestoBlue Assay im umgebenden Kompartiment des NVU-Modells im vasQchip. 5·10⁵ HBVP sowie 5·10⁵ HA und 1·10⁵ HM wurden nacheinander in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips in KM eingebracht. Am Folgetag wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und 16,7·10⁴ NSC in M7 1:1 BM ausgesät. Nach 48 h folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 µl/h. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen, wurden 7,5·10⁴ hCMEC/D3 in dem mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. An Tag 7, 9, 10, 12 und 14 wurde ein PrestoBlue Assay durchgeführt. Hierfür wurde der Farbstoff Resazurin in das umgebende Kompartiment in M7 1:1 BM für 3 h inkubiert. Im Anschluss konnte mithilfe der Fluoreszenzmessung die metabolische Zellaktivität quantifiziert werden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt.

Allerdings zeigte sich eine leichte Zunahme der metabolischen Aktivität um 13,7 % an Tag 7 sowie eine moderate Abnahme um 12,3 % an Tag 10. Da die vasQchips für jede Fluoreszenzmessung erneut verwendet wurden, könnte dies eine Abnahme erklären. Möglicherweise verursachten die Waschschriffe in den vasQchips zum Abtragen des Resorufins eine Ablösung der Zellen im umgebenden Kompartiment. Dies könnte eine geringere metabolische Zellaktivität und die daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten erklären. Dennoch konnte ein nahezu konstantes Proliferationsverhalten der Zellen im umgebenden Kompartiment des vasQchips im gemessenen Zeitraum belegt werden.

Anhand der Lebend-/Tot-Färbung sowie des PrestoBlue Assays konnte trotz höherer Zellzahl, anspruchsvoller Neuronen sowie einer Kultivierung in M7 1:1 BM eine überwiegende Viabilität sowie ein nahezu konstantes Proliferationsverhalten der Zellen im vasQchip nachgewiesen werden. Damit konnte das etablierte NVU-Modell in den folgenden Versuchen weitergehend hinsichtlich seiner Funktion charakterisiert werden.

3.2.3.4 Expression spezifischer Barriere-Marker

Bereits in Kapitel 3.2.2.4.2 und 3.2.2.5 konnte der positive Einfluss der Zellen im umgebenden Kompartiment (HBVP, HA, HM und Neuronen) auf die Barriereintegrität sowie auf die Expression essentieller Barriere-Marker des Endothels im statischen Transwell-System gezeigt werden. Zahlreiche Studien konnten ähnliche Effekte, resultierend in einer erhöhten Expression, durch eine mikrofluidische Kultivierung in einem *in vitro* BBB- oder NVU-Modell belegen.^{123,398}

Um den Einfluss der umgebenden Zellen auf die Barriereintegrität der hCMEC/D3 im vasQchip unter fluidischen Bedingungen zu untersuchen, wurde die Genexpression verschiedener Barriere-relevanter Marker mithilfe einer RT-qPCR untersucht. Für diesen Versuch wurde das NVU-Modell im vasQchip, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, vorbereitet. Als Kontrolle wurde eine Monokultur aus hCMEC/D3 im vasQchip verwendet. Es folgte eine mikrofluidische Kultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Die ermittelte Expression in Relation zur Kontrolle ist in Abbildung 86 dargestellt. Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression der untersuchten Proteine CD31 ($1,98 \pm 0,35$), Occludin ($1,64 \pm 0,20$), VE-Cadherin ($1,43 \pm 0,30$), P-gp ($1,77 \pm 0,24$), BCRP ($1,44 \pm 0,22$) und Claudin-5 ($1,45 \pm 0,13$). Die stärkste Hochregulation konnte von ZO-1 ($2,57 \pm 0,11$) detektiert werden. Auch Walter *et al.* konnten in einem mikrofluidischen BBB-Modell aus Astrozyten, Perizyten und Endothelzellen eine 4-fach höhere Barriereintegrität sowie eine erhöhte Expression von ZO-1 im Vergleich zur Monokultur aus hCMEC/D3 detektieren.³⁹⁹ Ähnliche Resultate erzielten Campisi *et al.* und Wang *et al.* in einem mikrofluidischen BBB-Modell. So konnte durch eine Kokultur aus Astrozyten, Perizyten und Endothelzellen eine erhöhte Expression von ZO-1, Occludin, P-gp und Claudin-5 sowie eine verminderte Permeabilität festgestellt werden.^{87,400} Auch Bang *et al.* konnten durch Verwendung eines mikrofluidischen Kokultur-Modells aus Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen eine stärkere Barriereintegrität erzielen.⁴⁰¹ Des Weiteren ermittelten Wevers *et al.* eine erhöhte Expression der beiden Efflux-Pumpen BCRP und P-gp in ihrem mikrofluidischen NVU-Modell.⁴⁰² Damit konnte der in der Literatur beschriebene positive Einfluss der umgebenden Zellen auf die

Barriereintegrität des Endothels auch im vasQchip unter Einfluss einer Mikrofluidik bestätigt werden.

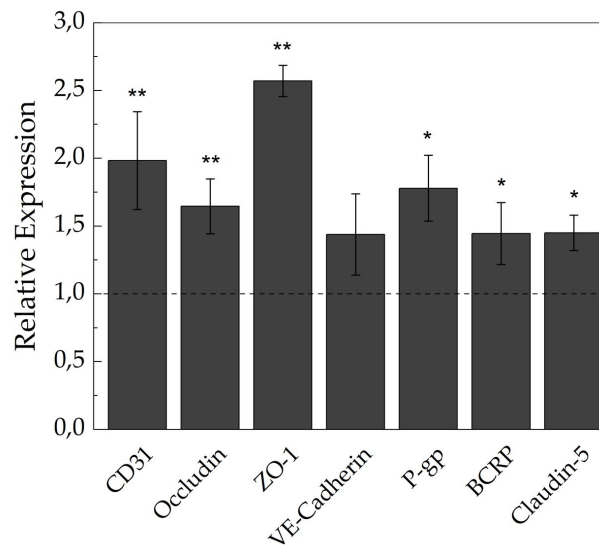


Abbildung 86: Relative mRNA-Expression essentieller Barriere-Marker in hCMEC/D3 im NVU-Modell im vasQchip. Zur Besiedlung des Kompartiments, wurde die PC-Membran „offen“ mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Daraufhin wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP in KM ausgesät. 24 h später erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM auf die ausgebildete Perizytenzellschicht. Am Folgetag wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Im Anschluss erfolgte eine fluidische Kultivierung mit einer Flussrate von 100 μ l/h. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurde der Mikrokanal mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 ausgesät. Nach 3 h folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h über 7 Tage in M7 1:1 BM. Zur Kontrolle wurde eine Kultivierung ausschließlich mit hCMEC/D3 im vasQchip in M7 1:1 BM verwendet. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Anschließend wurde die RNA der hCMEC/D3 isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression Barriere-relevanter Proteine quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Kontrolle referenziert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.2.3.5 Funktionalitätstest BCRP Transporter Assay

Die BBB sorgt für einen selektiven gerichteten Stoffaustausch zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Hirngewebe.^{18,97} Neben zahlreichen *Tight Junctions* und *Adherens Junctions* zwischen benachbarten Endothelzellen wird die Barrierefunktion der BBB durch spezifische „Gatekeeper“-Transporter, den Efflux-Pumpen, aufrecht erhalten.^{97,348} Diese sorgen für einen aktiven Rücktransport eingedrungener Xenobiotika sowie Wirkstoffe vom Hirn- ins Blutssystem.^{403,404} Daher ist eine Penetration von pharmazeutischen Wirkstoffen in das Hirngewebe zur Behandlung von beispielsweise neurodegenerativer Erkrankungen erschwert und somit die Wirksamkeit verringert.^{403,404} Infolgedessen liegt der Fokus bei der Entwicklung neuer Arzneimittel, welche die Barriere überwinden können, auf den Efflux-Pumpen der BBB.⁴⁰⁵ Somit ist der Nachweis der Funktionsfähigkeit dieser Transporter, um zukünftig potentielle Wirkstoffkandidaten im etablierten NVU-Modell zu testen, von enormer Bedeutung. Wie in

Kapitel 1.2.1 beschrieben, gehört BCRP neben P-gp zu den am häufigsten untersuchten Efflux-Pumpen der BBB.^{97,405} Ein bekanntes Zielsubstrat der Efflux-Pumpe BCRP ist das Zytostatikum Mitoxantron (MTX), welches vor allem in der Krebstherapie verwendet wird (Abbildung 87).⁴⁰⁶

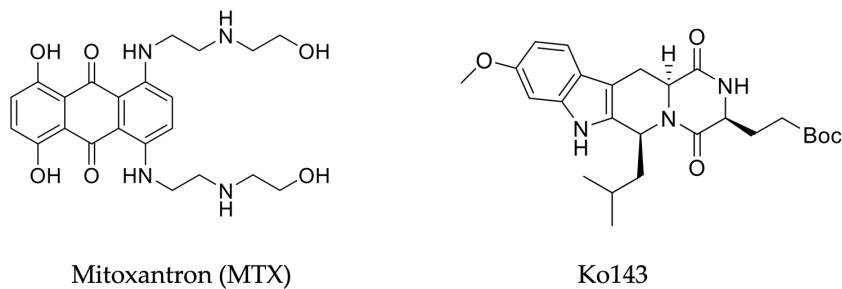
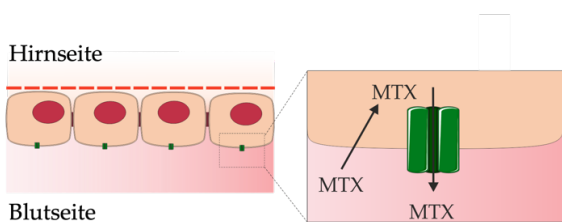


Abbildung 87: Strukturformel des BCRP-Substrats Mitoxantron (MTX) und des BCRP-Inhibitors Ko143.

Analog zum iBRB-Modell in Kapitel 3.1.2.3.4 wurde die Funktionalität der Barriere in dem im vasQchip etablierten NVU-Modell mithilfe eines BCRP Transporter Assays untersucht. Hierbei wurde der aktive Transport von MTX in den hCMEC/D3 im exzitatorischen und inhibierten Zustand analysiert.^{407,408} MTX kann durch Penetration ungehindert durch die Zellmembran in die Zellen eindringen. Mithilfe der Aktivität von BCRP kann ein Transport von MTX aus den Hirnendothelzellen erfolgen. Eine gezielte Inhibierung der Efflux-Pumpe BCRP hindert den Rücktransport und führt damit zu einer Akkumulation des MTX in den Zellen.⁴⁰⁹⁻⁴¹¹ Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften von MTX kann die Fluoreszenzsteigerung mithilfe von Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden. Als affiner Inhibitor von BCRP wird häufig Ko143 eingesetzt (Abbildung 87).^{407,412} Das Funktionsprinzip des BCRP Transporter Assays ist in Abbildung 88 dargestellt.

1) MTX



2) MTX + Ko143

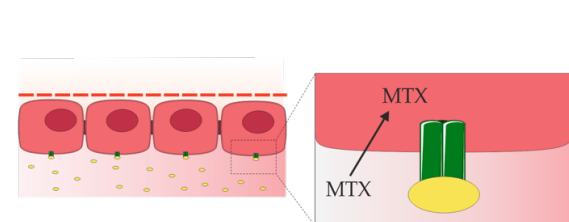


Abbildung 88: Schematische Darstellung des BCRP Transporter Assays. Das fluoreszierende MTX, ein Zielsubstrat der BCRP, kann ungehindert in die Zelle penetrieren. Im exzitatorischen Zustand wird das MTX durch die Aktivität der Efflux-Pumpe BCRP zurück ins Blutsystem transportiert. Im inhibitorischen Zustand inhibiert Ko143 die Aktivität der Efflux-Pumpe, sodass der Rücktransport des MTX verhindert wird. Dies resultiert in einer Akkumulation des fluoreszierenden MTX in der Zelle.

Für diesen Versuch wurden NVU-Modelle im vasQchip nach Kapitel 3.2.3.2 rekonstruiert und für 14 Tage bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ fluidisch kultiviert. Anschließend erfolgte eine Behandlung der NVU-Modelle mit dem BCRP Substrat MTX über den Mikrokanal. Zur Inhibition der BCRP Aktivität wurden NVU-Modelle neben MTX simultan mit dem affinen Inhibitor Ko143 behandelt. Als Nullkontrolle wurden unbehandelte NVU-Modelle verwendet. Nach erfolgter Inkubation konnte die Zellzahl der hCMEC/D3 im Mikrokanal bestimmt werden. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die Fluoreszenz anhand einer Fluoreszenzmessung ermittelt und auf die Zellzahl $1 \cdot 10^4$ normiert. Hierdurch konnte ein verfälschtes Ergebnis aufgrund einer abweichenden Zellzahl der hCMEC/D3 in den verschiedenen Mikrokanälen ausgeschlossen werden. In beiden ermittelten Werten wurde der Nullwert der unbehandelten Kokultur-Modelle abgezogen. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) sind in Abbildung 89 dargestellt.

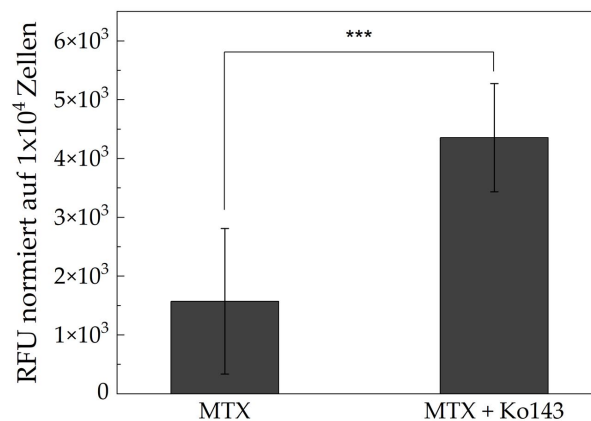


Abbildung 89: BCRP Transporter Assay mit MTX und Ko143 im NVU-Modell im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM auf die ausgebildete Perizytenzellschicht. 24 h später wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach einer Kultivierung von 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Daraufhin erfolgte eine fluidische Kultivierung mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Nach 3 h folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ über 7 Tage in M7 1:1 BM. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Anschließend wurde der BCRP Assay durchgeführt. Hierfür erfolgte eine Zugabe von MTX beziehungsweise MTX simultan mit Ko143 über den Mikrokanal der Kokultur-Modelle für 1 h. Als Blank wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Anschließend wurden die hCMEC/D3 aus dem Mikrokanal enzymatisch abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und es folgte eine Fluoreszenzmessung. Die erhaltenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) wurden auf die Zellzahl $1 \cdot 10^4$ normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Werden die beiden Werte verglichen, wurde durch die von Ko143 verursachte Inhibition von BCRP eine 2,77-fach erhöhte zelluläre MTX-Aufnahme bestimmt. Ähnliche Resultate konnten anhand der in der Literatur beschriebenen BCRP-Transporter Assays erzielt werden.^{273,403,413} Somit konnte die Funktionalität der Efflux-Pumpe BCRP im etablierten NVU-Modell nachgewiesen werden.

3.2.3.6 Kapitelzusammenfassung Etablierung der NVU im vasQchip

In diesem Kapitel konnte ein mikrofluidisches NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und iPSC-differenzierten Neuronen erfolgreich im vasQchip etabliert und auf seine Funktion validiert werden. Mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Kokultur der NVU-Zelltypen unter Ausbildung ihrer zelltypischen Marker bestätigt werden. Zur Kultivierung des Kokultur-Modells wurde das Nährmedium M7 1:1 BM verwendet, welches eine Differenzierung der Neuronen sowie die Ausbildung einer dichten Barriere in den hCMEC/D3 fördert (Kapitel 3.2.2.1). Des Weiteren konnte die Zellviabilität sowie eine nahezu konstante Proliferation der Zellen im umgebenden Kompartiment mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung und eines PrestoBlue Assays in M7 1:1 BM bestätigt werden. Zudem konnte durch eine Genexpressionsanalyse sowie eines Transporter Assays die Funktionalität der Barriere im NVU-Modell evaluiert werden.

Bislang wurde zum Aufbau des NVU-Modells eine Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ verwendet, welche einen korrespondierenden Scherstress von 0,027 dyn/cm^2 erzeugt. Allerdings herrschen *in vivo* im Gehirn Scherkräfte von 1-4 dyn/cm^2 in den Venen und 10-20 dyn/cm^2 in den Kapillaren.³⁹² Daher sollte dieses Modell zukünftig höheren Flussraten wie beispielsweise 500 $\mu\text{l/min}$ und einem korrespondierenden Scherstress von 7,92 dyn/cm^2 ausgesetzt werden, um physiologischere Bedingungen zu erzeugen. Jedoch müsste hierfür eine Peristaltikpumpe verwendet werden, da die Spritzenpumpe nur für sehr geringe Flussraten und Volumina geeignet ist. Da die Peristaltikpumpe das Medium kontinuierlich zirkulär im System pumpt, hätte dies neben einer erhöhten Flussrate auch den Vorteil einer Anreicherung von essentiellen sekretierten Wachstumsfaktoren. Auch für zukünftige Wirkstoffuntersuchungen können in diesem Pumpensystem geringere Mengen der potentiellen therapeutischen Wirkstoffe eingesetzt werden. Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit ein vaskularisiertes vollständiges NVU-Modell etabliert werden, welches mithilfe weiterer Modifizierungen zukünftig zur effizienteren Wirkstoffuntersuchung sowie zur Modellierung degenerativer Erkrankungen eingesetzt werden könnte.

3.2.4 Aktivität der Neuronen

Eine Reizweiterleitung im Gehirn wird in Form von Aktionspotentialen durch Neuronen ermöglicht.^{137,138,414} Dabei erfolgt die interneuronale Kommunikation hauptsächlich an den chemischen Synapsen.^{137,138,414} Wie in Kapitel 1.2.2.4.1 beschrieben, spielen Calcium-Ionen dabei eine bedeutende Rolle. Ca^{2+} ist als *Second messenger* an der Regulation zahlreicher neuronaler Prozesse beteiligt.^{415,416} Unter anderem induziert eine Signalweiterleitung an chemischen Synapsen eine Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies macht Ca^{2+} zum essentiellen Bestandteil der Reizweiterleitung in Neuronen.⁴¹⁶⁻⁴¹⁸

In den folgenden Kapiteln wurde die neuronale Aktivität der iPSC-differenzierten Neuronen anhand des *Calcium Imaging*s untersucht. Dabei wurde untersucht, ob die verwendeten Neuronen

im etablierten NVU-Modell in der Lage sind elektrische Signale zu übermitteln, um ein neuronal funktionsfähiges Modell abbilden zu können.

3.2.4.1 Calcium Imaging im μ -Slide 8 Well

Um die Aktivität von Neuronen zu untersuchen, werden häufig fluoreszierende Indikatorstoffe verwendet, die fähig sind Ca^{2+} zu binden. Hierfür findet meist der membrangängige lipophile Ester Fluo-4 AM Verwendung (Abbildung 90).^{419,420} Im Vergleich zu seinem Vorgänger Fluo-3 AM, ist Fluo-4 AM photostabiler, stärker in der Intensität und weist eine geringere Hintergrundabsorption auf.⁴²⁰ Das nicht-fluoreszierende Fluo-4 AM kann ungehindert in die Zelle penetrieren und anschließend durch intrazelluläre Esterasen in das fluoreszierende Fluo-4 gespalten werden (Abbildung 90).^{420,421} Aufgrund seines hydrophilen Charakters kann Fluo-4 die Zellmembran nicht mehr passieren und akkumuliert in der Zelle.⁴²⁰ Dabei ist das fluoreszierende Fluo-4 aufgrund seiner hohen negativen Polarisierung in der Lage freies intrazelluläres Ca^{2+} zu binden, wodurch die Fluoreszenzintensität mehr als 100-fach verstärkt wird.^{419,420,422,423} Mithilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie können somit Änderungen der Ca^{2+} -Ströme in lebenden Neuronen während einer Signalweiterleitung in Echtzeit detektiert werden.

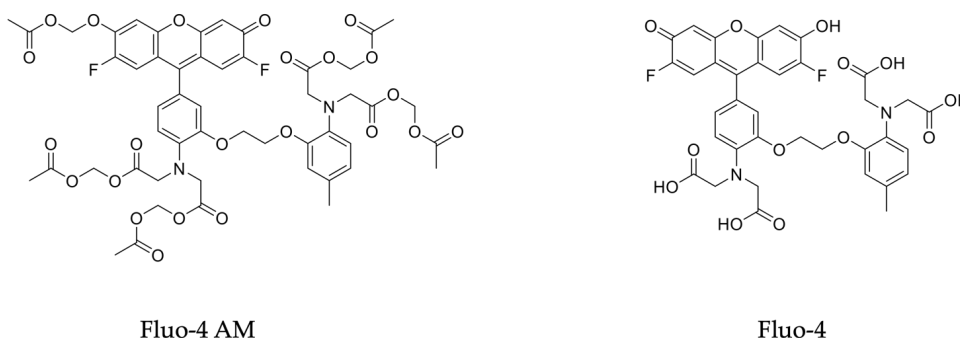


Abbildung 90: Strukturformel von Fluo-4 AM und Fluo-4.

Für ein *Calcium Imaging* der iPSC-differenzierten Neuronen wurden NSC für 14 Tage bei 5 % CO_2 und 37 °C in μ -Slide 8 Wells ausdifferenziert. Anschließend wurden die differenzierten Neuronen mit Fluo-4 AM behandelt. Daraufhin konnten mithilfe inverser Konfokalmikroskopie Fluo-4 gebundene Calcium-Ionen in den Neuronen detektiert werden. Zur Induktion einer höheren Aktivität der Neuronen folgte eine Zugabe von 80 mM KCl. Um die Änderung der Ca^{2+} -Ströme in einem längeren Zeitabschnitt zu untersuchen, wurde mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie eine Videosequenz von 15 min und 89 Bildsequenzen erstellt. Eine schematische Darstellung des *Calcium Imaging*s ist in Abbildung 91 dargestellt.

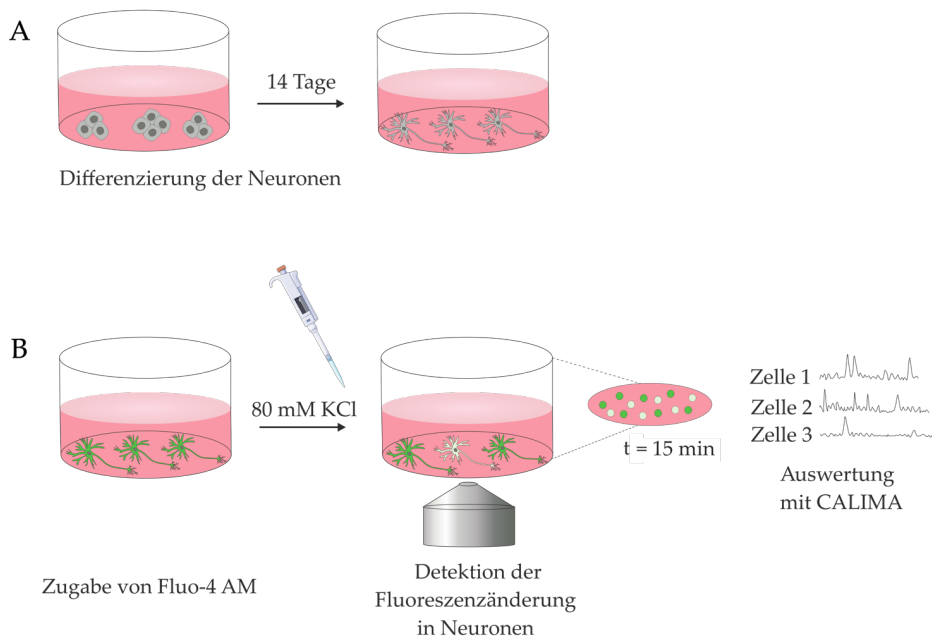


Abbildung 91: Schematische Darstellung des Calcium Imagings. (A) $3 \cdot 10^4$ NSC wurden zur Differenzierung in mit Matrigel hESC beschichteten μ -Slide 8 Wells für 14 Tage bei 5 % CO_2 und 37 °C in M7 1:1 BM kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. (B) Anschließend wurden die Neuronen mit Fluo-4 AM für 45 min bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Fluo-4 AM kann ungehindert in die Zellen penetrieren und wird dort von intrazellulären Esterasen zum fluoreszierenden Fluo-4 gespalten. Dieses akkumuliert in der Zelle und kann freie intrazelluläre Calcium-Ionen binden, wodurch die Fluoreszenzintensität gesteigert wird. Dadurch können die Ca^{2+} -Ströme in aktiven Neuronen visualisiert werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit einem Extrazellulärpuffer gewaschen. Daraufhin wurde der Puffer mit vorgewärmtem M7 1:1 BM ersetzt. Durch Zugabe von 80 mM KCl konnte eine erhöhte Aktivität der Neuronen induziert werden. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurde die Fluoreszenzänderung aufgrund der dynamischen Ca^{2+} -Ströme in den Neuronen detektiert. Dabei wurde eine Videosequenz von 15 min aufgezeichnet. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mithilfe der Software CALIMA.

Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe der Software CALIMA („*CalciumImagingAnalyser*“) ausgewertet. Dabei konnte die Änderung der Aktivität einzelner Neuronen über die Bildsequenz aufgetragen werden. In Abbildung 92B ist die Aktivitätsänderung der vier aktivsten Neuronen dargestellt. Es konnten bis zu drei Signale in einem Neuron detektiert werden. Um die Aktivität genauer zu untersuchen, wurde eine *Heatmap* sowie eine *Networking Map* mithilfe der CALIMA-Software generiert (Abbildung 92A). Anhand der *Networking Map* ist der Austausch der elektrischen Signale zwischen einzelnen Neuronen zu verfolgen. Hierfür wurden je zwei Neuronen mit einer Linie verbunden, falls diese elektrische Signale ausgetauscht haben. Die *Heatmap* illustriert örtliche Überlagerungen der elektrischen Signale, sodass Bereiche mit besonders hoher Neuronenaktivität visualisiert werden können. Die aufgetragene Neuronenaktivität wird hierbei in einem Farbcodem auf den aktivsten Bereich normiert, welchem der Aktivitätswert 1 zugewiesen wird. Anhand der *Networking Map* und *Heatmap* konnte eine gleichmäßige Verteilung der Neuronenaktivität über das gesamte neuronale Netzwerk detektiert werden.

In der Hellfeldaufnahme in Abbildung 92A ist eine für Neuronen charakteristische erhöhte Ansammlung der Somata zu beobachten. Auffällig ist, dass diese Ansammlungen nicht mit den Bereichen hoher Aktivität übereinstimmen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass in den Bereichen mit besonders hoher Zelldichte die Axone durch die dicht gewachsenen Neuronen optisch verdeckt werden. Hierdurch kann eine Fluoreszenzänderung der Axone, welche als Indikator für die Aktivität dient, durch das Bildauswertungsverfahren lokal schlechter erfasst werden. Zusammenfassend konnte jedoch eine hohe Aktivität der differenzierten Neuronen der iPSC-Linie HD11 nachgewiesen werden. Auch Schwab *et al.* konnten durch Verwendung von *EZ spheres* differenzierte Neuronen nach 14 Tagen generieren und die Aktivität mithilfe des *Calcium Imaging* bestätigen.⁴²⁴

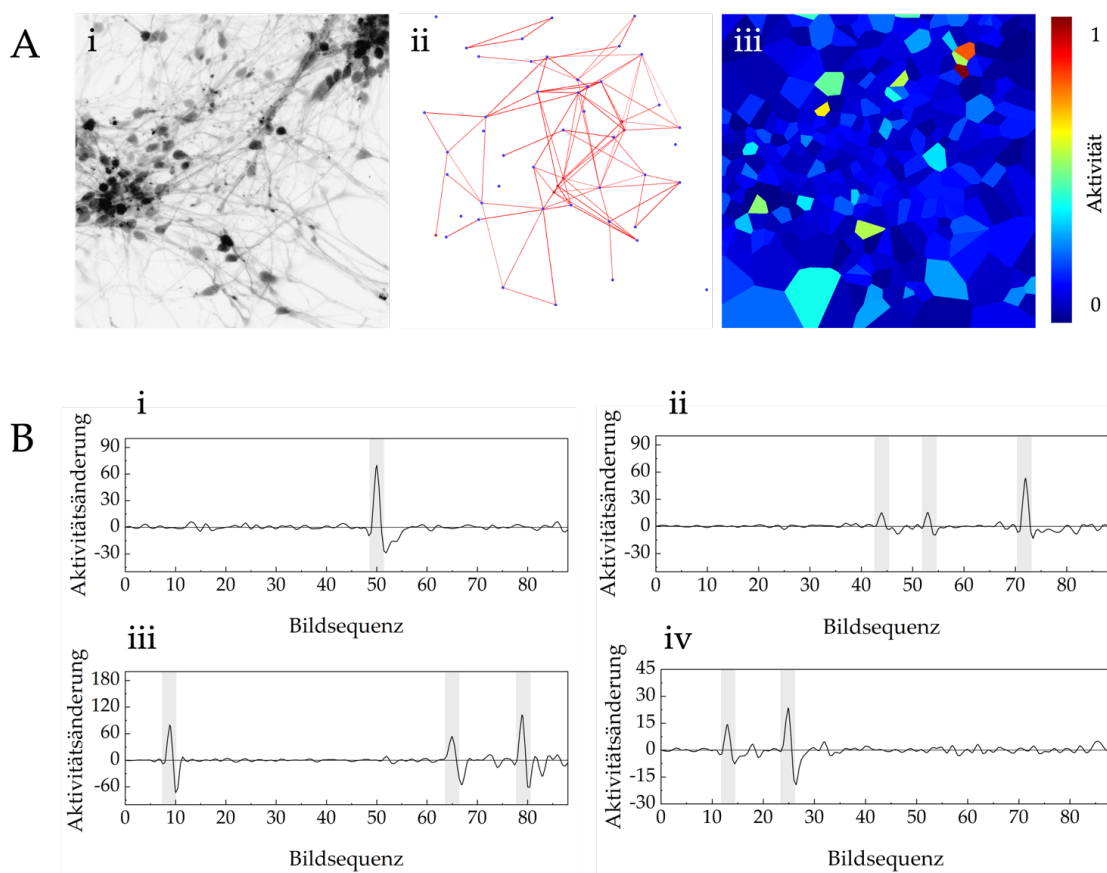


Abbildung 92: Neuronale Aktivität differenzierter Neuronen der iPSC-Linie HD11. $3 \cdot 10^4$ NSC wurden in M7 1:1 BM auf Matrigel hESC beschichtete μ -Slide 8 Wells ausgesät und für 14 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C ausdifferenziert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach erfolgter Differenzierung wurde zur Untersuchung der neuronalen Aktivität ein *Calcium Imaging* mithilfe von Fluo-4 AM durchgeführt. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnten Videosequenzen von 15 min und eine Bildsequenz von 89 Bildern generiert werden (ZEISS LSM 800). Die erhaltenen Rohdaten wurden anschließend mithilfe der Software CALIMA ausgewertet. In (Ai) ist das neuronale Netzwerk im inversen Hellfeld dargestellt. (Aii) zeigt die generierte *Networking Map* und (Aiii) die farbcodierte *Heatmap* des neuronalen Netzwerks aus (Ai). Die vier aktivsten Neuronen sind mit ihren Aktivitätsänderungen in (Bi)-(Biv) aufgeführt.

Analog dazu wurden differenzierte Neuronen einer anderen humanen iPSC-Linie WTC11NGN2 für einen Vergleich verwendet. Der Vorteil dieser Neuronen ist, dass die Differenzierung unter anderem durch eine induzierte Genexpression erfolgt. In diesem Fall resultiert eine Zugabe des Antibiotikums Doxycyclin in einer Überexpression von Neurogenin 2 (NGN2), was mithilfe spezifischer Zusätze zu einer neuronalen Differenzierung führt.³³¹ Hierbei ist eine Generierung von *EZ spheres* oder anderen Aggregaten mit NSC-Eigenschaften nicht notwendig. Diese Methode findet heutzutage häufig Verwendung und ist einfacher, effizienter und schneller, sodass eine vollständige Differenzierung der Neuronen bereits nach 7 Tagen erfolgt.^{331,425,426}

Zur Untersuchung der neuronalen Aktivität wurden in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT) NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 in μ -Slide 8 Wells ausgesät und für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Das *Calcium Imaging* wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt und die erhaltenen Rohdaten mithilfe der Software CALIMA ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 93 abgebildet. Im Vergleich zu Abbildung 92 konnte maximal nur ein Signal je Neuron detektiert werden. Zudem konnte anhand der *Heatmap* und der *Networking Map* eine geringere Aktivität der Neuronen sowie eine schlechtere Vernetzung der elektrischen Signale beobachtet werden. Damit wiesen die bisher verwendeten Neuronen (Abbildung 92) eine höhere Aktivität im gesamten neuronalen Netzwerk auf. Die verminderte Aktivität der Neuronen könnte durch eine geringere Kultivierungsdauer von 7 statt 14 Tagen begründet sein. Daher sollte diese Vermutung zukünftig überprüft werden. Darüber hinaus konnte in der Literatur eine hohe Aktivität der NGN2 differenzierten Neuronen von Ho *et al.* nachgewiesen werden.⁴²⁷

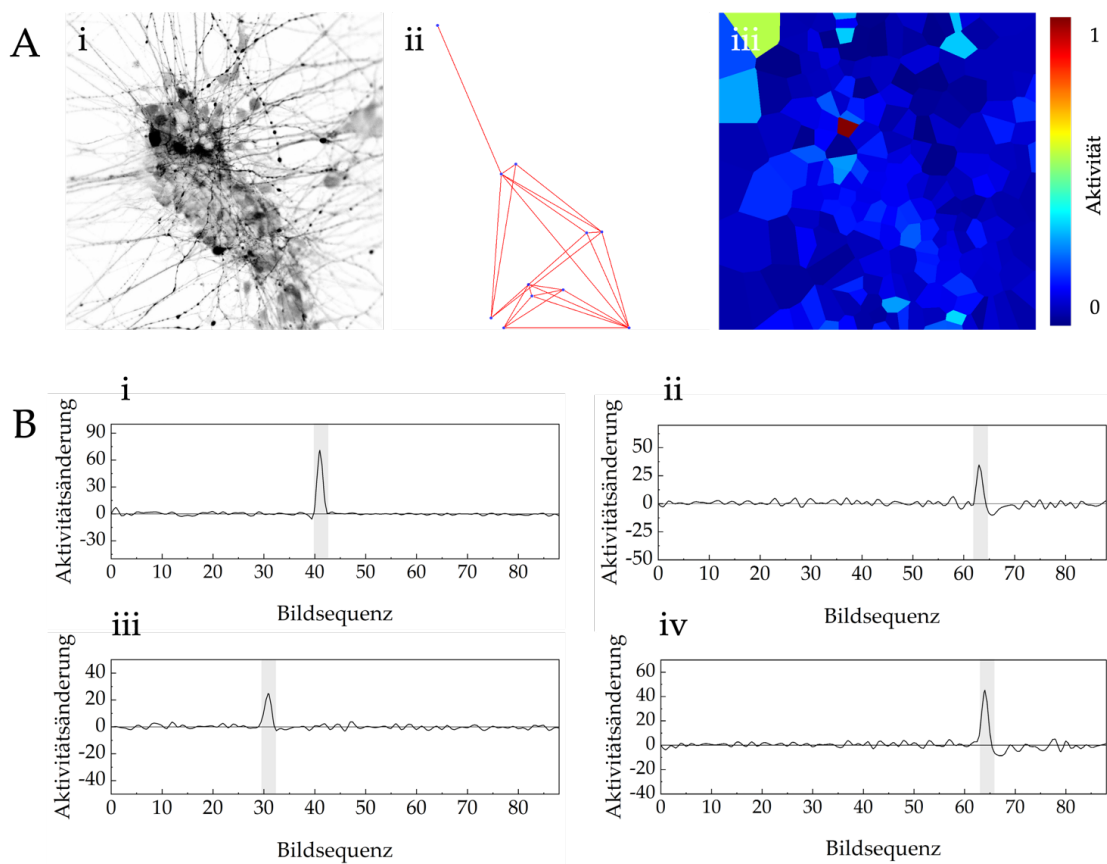


Abbildung 93: Neuronale Aktivität differenzierter Neuronen der iPSC-Linie WTC11NGN2. $3 \cdot 10^4$ NSC wurden in M7 1:1 BM auf Matrigel hESC beschichtete μ -Slide 8 Wells ausgesät und für 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C ausdifferenziert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Im Anschluss wurde zur Untersuchung der neuronalen Aktivität ein *Calcium Imaging* unter Verwendung von Fluo-4 AM durchgeführt. Mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnten Videosequenzen von 15 min und einer Bildsequenz von 89 erstellt werden (ZEISS LSM 800). Die Rohdaten wurden mithilfe der Software CALIMA ausgewertet. In (Ai) ist das neuronale Netzwerk im inversen Hellfeld dargestellt. (Aii) zeigt die generierte *Networking Map* und (Aiii) die farbcodierte *Heatmap* des neuronalen Netzwerks aus (Ai). Die vier aktivsten Neuronen sind mit ihren Aktivitätsänderungen in (Bi)-(Biv) aufgeführt. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

3.2.4.2 Calcium Imaging im vasQchip

Im vorherigen Kapitel konnte die Aktivität der Neuronen in einem μ -Slide 8 Well bestätigt werden. Da es sich hierbei um ein statisches System handelt, sollte die Aktivität der Neuronen zusätzlich im mikrofluidischen vasQchip untersucht werden. Doch wie in Kapitel 3.2.3.1 nachgewiesen, gestaltet sich eine Kultivierung der bisher verwendeten Neuronen (differenziert aus der iPSC-Linie HD11) ohne HA in den vasQchips schwierig. Eine Kokultur mit HA würde zwar das Wachstum der Neuronen im vasQchip fördern, doch HA enthalten wie Neuronen ebenfalls intrazelluläre Calcium-Ionen.^{108,428} Somit würden durch Fluo-4 auch die Ca²⁺-Ströme in den HA detektiert werden, was zu einem verfälschten Ergebnis führen würde.

Aus diesem Grund wurden für ein *Calcium Imaging* im vasQchip differenzierte Neuronen der iPSC-Linie WTC11NGN2 (aus Kapitel 3.2.4.1) verwendet. Hierbei konnte anhand einer Immunfluoreszenzfärbung mit β -III Tubulin gezeigt werden, dass diese als Monokultur ohne HA

im vasQchip unter Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks kultivierbar sind (Abbildung 139 Anhang).

Für ein *Calcium Imaging* im vasQchip wurden NSC in das umgebende Kompartiment ausgesät und über einen Zeitraum von 14 Tagen mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ bei 5 % CO_2 und 37 °C fluidisch kultiviert. Die Verwendung von WTC11NGN2 differenzierten Neuronen erlaubte dabei eine Besiedlung im „geschlossenen“ Kompartiment. Nach erfolgter Kultivierung wurde das *Calcium Imaging* mithilfe von Fluo-4 AM, wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben, durchgeführt und die erhaltenen Rohdaten mit der Software CALIMA ausgewertet (Abbildung 94).

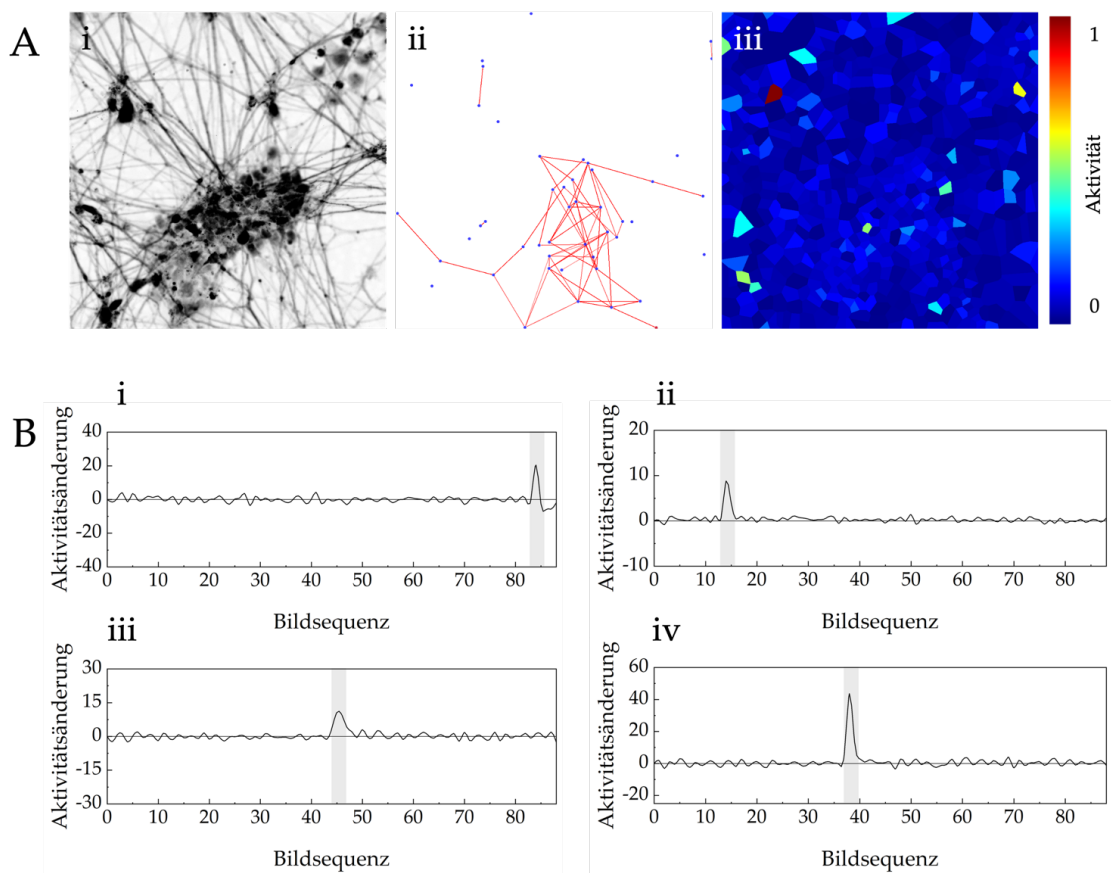


Abbildung 94: Neuronale Aktivität der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in M7 1:1 BM in das Matrigel hESC beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips ausgesät. Um ein Anwachsen auf der PC-Membran sicherzustellen, wurde der vasQchip um 180° gedreht positioniert. Am nächsten Tag folgte ein Anschluss an eine Mikrofluidik bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ für 14 Tage. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Im Anschluss wurde zur Untersuchung der neuronalen Aktivität ein *Calcium Imaging* unter Verwendung von Fluo-4 AM durchgeführt. Anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnten Videosequenzen von 15 min und eine Bildsequenz von 89 Bildern erstellt werden (ZEISS LSM 800). Die Rohdaten wurden mithilfe der Software CALIMA ausgewertet. In (Ai) ist das neuronale Netzwerk im inversen Hellfeld dargestellt. (Aii) zeigt die generierte *Networking Map* und (Aiii) die farbcodierte *Heatmap* des neuronalen Netzwerks aus (Ai). Die vier aktivsten Neuronen sind mit den zugehörigen Aktivitätsänderungen in (Bi)-(Biv) aufgeführt.

Wie bereits in Kapitel 3.2.4.1 konnte hier erneut nur maximal ein elektrisches Signal je Neuron detektiert werden. Damit wurde die Vermutung der verminderten Neuronenaktivität aufgrund einer kürzeren Differenzierungsdauer aus Kapitel 3.2.4.1 widerlegt. Die Aktivitätsänderungen der vier aktivsten Neuronen sind in Abbildung 94B dargestellt. Dabei konnte im Vergleich zum *Calcium Imaging* im μ -Slide 8 Well in Kapitel 3.2.4.1 anhand der *Networking Map* und *Heatmap* eine leichte Zunahme der Aktivität sowie eine gleichmäßigere Verteilung des Signalaustauschs über das Neuronennetzwerk detektiert werden. Die Ursache hierfür könnte neben einer mikrofluidischen Kultivierung sowie einer erhöhten Zelldichte in einer längeren Kultivierungsdauer (14 statt 7 Tage) liegen. Jedoch konnte eine genauere Untersuchung aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

Nach erfolgreichem *Calcium Imaging* wurde die Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks im umgebenden Kompartiment des vasQchips überprüft. Hierzu konnten mithilfe inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen der Fluo-4 Färbung durchgeführt werden. Die daraus generierten 3D-Projektionen sind in Abbildung 95 dargestellt. Damit konnte die Ausbildung eines ausgeprägten dichten neuronalen Netzwerks im vasQchip bestätigt werden.

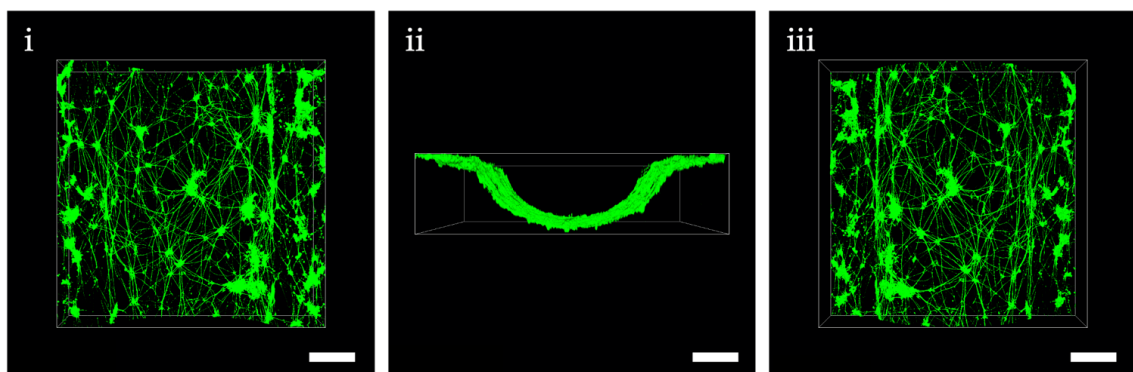


Abbildung 95: Fluo-4 AM Färbung der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in M7 1:1 BM in das Matrigel hESC beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips ausgesät. Um ein Anwachsen auf der PC-Membran sicherzustellen, wurde der vasQchip um 180° gedreht positioniert. 24 h später folgte eine mikrofluidische Kultivierung bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$ für 14 Tage. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Im Anschluss wurde zur Untersuchung der neuronalen Aktivität ein *Calcium Imaging* unter Verwendung von Fluo-4 AM durchgeführt. Anschließend wurden zur Beurteilung des neuronalen Netzwerks *z-stack* Messungen mithilfe inverser Konfokalmikroskopie durchgeführt ($n = 133$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 396 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Daraufhin wurden mithilfe der Leica LasX-Software 3D-Projektionen erzeugt. (i) stellt die innere laterale, (ii) stellt die horizontale und (iii) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$.

3.2.4.3 Kapitelzusammenfassung Aktivität der Neuronen

Anhand dieser Resultate konnte zum einen die Neuronenaktivität der bisher verwendeten HD11 differenzierten Neuronen statisch nachgewiesen werden. Zum anderen konnte eine Neuronenaktivität anhand der aus WTC11NGN2 differenzierten Neuronen erfolgreich im vasQchip unter mikrofluidischer Kultivierung belegt werden. Jedoch wiesen die bisher verwendeten HD11 differenzierten Neuronen eine höhere neuronale Aktivität sowie eine

gleichmäßigere Verteilung des Signalaustauschs über das gesamte neuronale Netzwerk auf. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Signalaustausch zwischen einzelnen Neuronen eines Netzwerks im umgebenden Kompartiment des fluidischen vasQchips ermöglicht wird.

3.2.5 Hydrogel als EZM-imitierende Stützmatrix

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein funktionales NVU-Modell mit aktiven Neuronen im vasQchip etabliert werden. Jedoch erfolgte die Kultivierung der Zellen im umgebenden Kompartiment bislang unter zweidimensionalen Bedingungen. Da eine planare Anordnung des „Hirngewebes“ nicht den naturgetreuen Bedingungen entspricht, wurde im Folgenden ein *in vivo* ähnliches dreidimensionales NVU-Modell etabliert. Zur Einbringung eines dreidimensionalen „Hirngewebes“ eignet sich das umgebende Kompartiment des vasQchips, um ein naturgetreues NVU-Modell erfolgreich abzubilden. Wie zuvor in Kapitel 3.1.3 beschrieben, wird für die Generierung einer Dreidimensionalität eine Stützmatrix benötigt, die der Beschaffenheit einer EZM nachkommt und die Ausbildung spezifischer Zell-Matrix-Kontakte begünstigt.^{57,230} Hierfür wurde das natürliche Kollagen I-Hydrogel sowie das semi-synthetische Hydrogel GelNB/GelS untersucht. Um die Eignung des Hydrogels zu überprüfen wurden die Zellviabilität, die zelluläre Ausrichtung sowie die Netzwerkbildung getestet. Da Perizyten *in vivo* das Blutgefäß flach ummanteln und Dr. R. Pfister in ihrer Arbeit bereits ausführlich das Verhalten der Astrozyten in den jeweiligen Hydrogelen untersucht hat, wurden hier Neuronen gewählt.^{14,97} Zudem gestaltet sich die Charakterisierung eines geeigneten Hydrogels für Neuronen wesentlich schwieriger, da diese im Vergleich zu primären Zellen eine definiertere Mikroumgebung benötigen. Für diesen Versuch wurden die bisher verwendeten HD11 differenzierten Neuronen, im Folgenden als Neuronen (HD11) benannt sowie die WTC11NGN2 differenzierten Neuronen aus Kapitel 3.2.4, im Folgenden als Neuronen (WT11NGN2) bezeichnet, verwendet und miteinander verglichen.

3.2.5.1 Kollagen I-Hydrogel

Kollagen ist ein fester Bestandteil des Gehirns.⁴²⁹ Wie bereits in Kapitel 3.1.3.1 erwähnt, weist Kollagen als natürlicher Bestandteil der EZM vielzählige RGD- sowie MMP-Sequenzen auf, welche eine Adhäsion der Zellen an der Matrix ermöglichen.²³⁴ Die dadurch resultierenden Zell-Matrix-Kontakte erlauben eine Ausbildung eines zellulären Netzwerks über einen dreidimensionalen Raum. Die Polymerisation des natürlichen Kollagen I-Hydrogels wird im Vergleich zu den Gelatine-basierten Hydrogelen durch Wärme und der Änderung des pH-Werts physikalisch induziert.⁴²⁹ Zudem bestimmt die Konzentration des Kollagens den Vernetzungsgrad.⁴²⁹

3.2.5.1.1 Kultivierung von Neuronen im Kollagen I-Hydrogel

Für eine Kultivierung von Neuronen im Kollagen I-Hydrogel wurden Kollagen I-Konzentrationen von 1 mg/ml sowie 2 mg/ml gewählt. Dabei wurden NSC der iPSC-Linie HD11 in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in die jeweilige Gelmatrix eingebracht. Eine Polymerisation der Hydrogele erfolgte durch Zugabe von NaOH und einer

30-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach der Inkubation wurden die vernetzten Hydrogele mit M7 1:1 BM überschichtet und über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. An Tag 21 wurde die Viabilität sowie die zelluläre Ausrichtung anhand einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM und PI untersucht. Mithilfe von inverser Konfokalmikroskopie konnten durch *z-stack* Messungen 3D-Projektionen in einer Höhe von 300 µm generiert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 96A dargestellt. Zusätzlich wurde mithilfe von Fiji der prozentuale Anteil detektierter lebender und toter Zellen quantifiziert (Abbildung 96B). Hierbei konnte eine sehr niedrige Viabilität der Neuronen im 1 mg/ml sowie im 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel beobachtet werden. Dabei wurde für das 1 mg/ml Kollagen I-Hydrogel eine Viabilität von 4,61 % und für das 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel eine marginal höhere Viabilität mit 8,72 % ermittelt. Somit konnte das Kollagen I-Hydrogel nicht den Ansprüchen an eine geeignete Mikroumgebung der Neuronen (HD11) für ein Wachstum nachkommen. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass das Kollagen I-Hydrogel für eine Kultivierung der Neuronen (HD11) nicht geeignet ist.

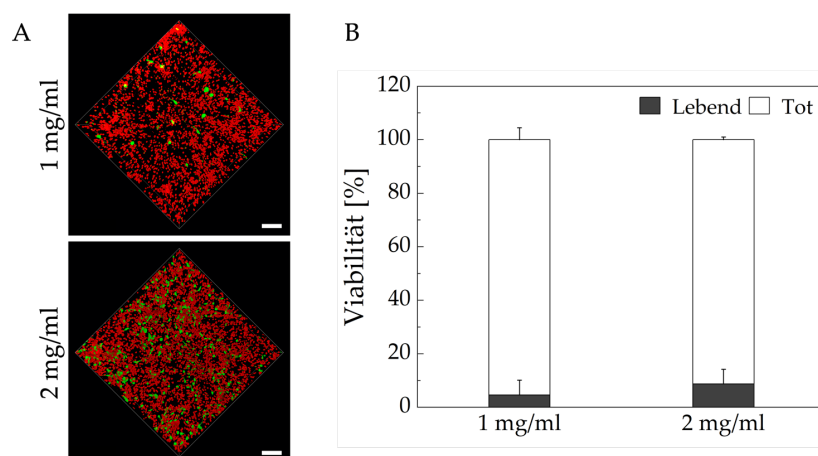


Abbildung 96: Viabilität der Neuronen (HD11) in 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen. NSC der iPSC-Linie HD11 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 200 µl Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurden Kollagen I-Hydrogele der Konzentration 1 mg/ml und 2 mg/ml verwendet. Anschließend folgte eine Kultivierung über 21 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in M7 1:1 BM. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 21 wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Mithilfe von inverser Konfokalmikroskopie konnten durch *z-stack* Messungen ($n = 61$, Abstan = 5 µm, $h = 300$ µm, Leica TCS SPE DMI4000B) 3D-Projektionen und eine Tiefenfärbung anhand der Leica LasX-Software erstellt werden. Anschließend wurden mithilfe von Fiji die prozentualen Anteile nekrotischer und lebender Zellen quantifiziert. (A) zeigt die 3D-Projektionen und (B) der ermittelte Anteil nekrotischer und lebender Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Analog dazu wurde in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT) die Kultivierung der Neuronen (WTC11NGN2) im Kollagen I-Hydrogel überprüft. Diese wurden bereits in Kapitel 3.2.4 auf ihre neuronale Aktivität untersucht und konnten ohne Kokultivierung mit HA im vasQchip unter Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks kultiviert werden. Damit wiesen die Neuronen (WTC11NGN2) im Vergleich zu den Neuronen (HD11) ein anpassungsfähigeres Wachstumsverhalten gegenüber einer variierenden Mikroumgebung auf.

Eine Einbringung dieser Neuronen in die Kollagen I-Hydrogele erfolgte wie zuvor beschrieben unter denselben Parametern. Anschließend wurden Lebend-/Tot-Färbungen an Tag 1, 7, 14 und 21 durchgeführt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten *z-stack* Messungen in einer Höhe von 300 μm sowie eine Tiefenfärbung an Tag 21 erzeugt werden, um eine bessere Visualisierung der Zellen im Hydrogel entlang der *z*-Ebene zu ermöglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 97 dargestellt. Es konnte bereits an Tag 1 im 1 mg/ml sowie im 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel eine Ausrichtung der Zellen beobachtet werden. Nach 7 Tagen wurden erste neuronale Netzwerke durch unterschiedliche Ebenen festgestellt. Jedoch erfolgt die zelluläre Ausrichtung im 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel schneller, sodass an Tag 21 ein dichteres ausgeprägteres dreidimensionales Neuronennetzwerk zu erkennen ist. Anhand der Tiefenfärbung an Tag 21 konnte ein beständiges Volumen der Gelmatrices sowie eine gleichmäßige Verteilung der Zellen über den gesamten Kultivierungszeitraum in beiden Gelmatrices festgestellt werden.

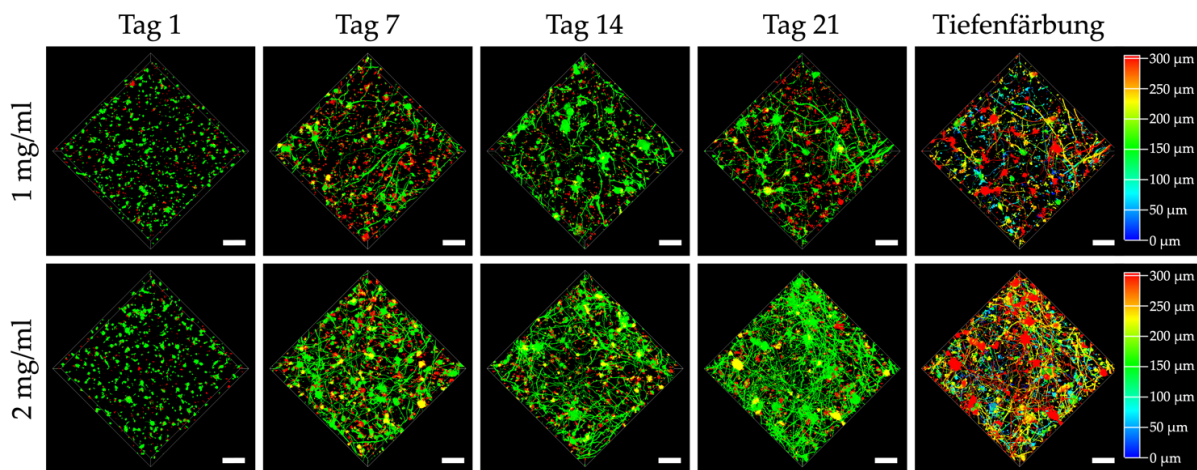


Abbildung 97: Lebend-/Tot-Färbung der Neuronen (WTC11NGN2) in 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ Gelmatrix eingebracht. Als Gelmatrix wurden Kollagen I-Hydrogele der Konzentration 1 mg/ml und 2 mg/ml verwendet. Im Anschluss folgte eine Kultivierung über 21 Tage bei 5 % CO_2 und 37°C in M7 1:1 BM. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 21 wurde eine Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Mithilfe von inverser Konfokalmikroskopie konnten durch *z-stack* Messungen ($n = 61$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 300 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5) 3D-Projektionen und eine Tiefenfärbung anhand der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

Zur Quantifizierung der Lebend-/Tot-Färbung wurden die prozentualen Anteile der nekrotischen und lebenden Zellen in den Hydrogelen mithilfe von Fiji ermittelt. Anhand Abbildung 98 konnte trotz hoher Anzahl von nekrotischen Zellen eine beständige Viabilität in den 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen über einen Zeitraum von 21 Tagen zwischen 39,41-57,53 % ermittelt werden. Verglichen mit den Neuronen (HD11) in Abbildung 96 konnte neben der Ausbildung von dreidimensionalen neuronalen Netzwerken eine bis zu 559,74 % höhere Viabilität festgestellt werden. Auch O'Connor *et al.* konnten bereits im Jahr 2000 durch Einbringung von murinen NSC in ein Kollagen I-Hydrogel die Ausbildung eines neuronalen Netzwerks

begünstigen.⁴³⁰ Ähnliche Ergebnisse erzielten Antill-O'Brien *et al.* mit iPSC-differenzierten Neuronen.⁴²⁹

Zusammenfassend eignet sich das Kollagen I-Hydrogel zur dreidimensionalen Kultivierung der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen und kann somit für weitere Versuche eingesetzt werden.

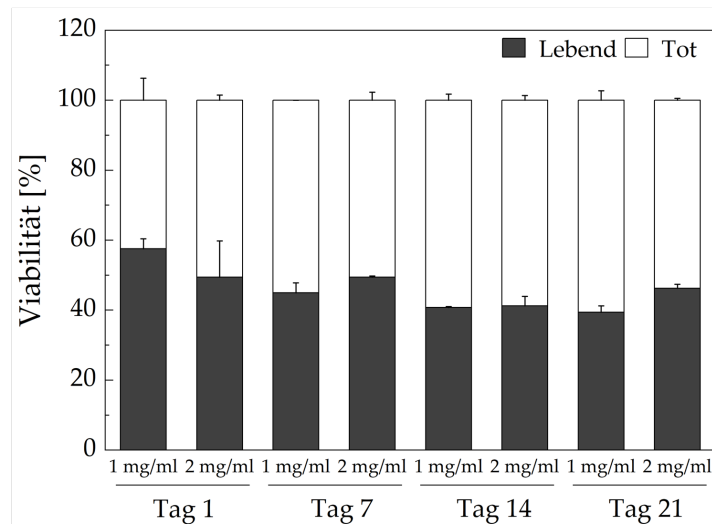


Abbildung 98: Viabilität der Neuronen (WTC11NGN2) in 1 mg/ml und 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogelen. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 200 μ l Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurden Kollagen I-Hydrogele der Konzentration 1 mg/ml und 2 mg/ml verwendet. Daraufhin erfolgte eine Kultivierung über 21 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in M7 1:1 BM. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 21 wurde eine Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) durchgeführt. Anschließend wurden mithilfe von Fiji die prozentualen Anteile nekrotischer und lebender Zellen quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt.

3.2.5.2 Zweikomponentenhydrogel GelNB/GelS

In Kapitel 3.1.3.2 wurde für eine Einbettung der retinalen Astrozyten in eine semi-synthetische Gelmatrix das Gelatine-basierte Hydrogel GelMA verwendet. Trotz zahlreichem Einsatz als Goldstandard in der Literatur weist dieses Hydrogel einige Nachteile auf.⁴³¹ Für eine ausreichende Aushärtung und Funktionalisierung des GelMA-Hydrogels wird eine hohe Konzentration an potentiell zytotoxischem Photoinitiator benötigt.^{14,432} Zudem können bei dieser Reaktion freie Radikale entstehen, welche sich negativ auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirken können.⁴³³ Darüber hinaus können durch unspezifische gegenseitige Methacrylatgruppenbindungen, sowie einer Homopolymerisation desselben Gelatinestrangs heterogene Gelmatrixstrukturen erzeugt werden, die einer Zell-Matrix-Interaktion entgegenwirken können.⁴³⁴ Um diese Aspekte zu umgehen, wurde das Gelatine-basierte Zweikomponenten-Hydrogel GelNB/GelS für eine dreidimensionale Kultivierung von Neuronen verwendet.

3.2.5.2.1 Synthese und Charakterisierung von GelNB/GelS

Die Synthese und Charakterisierung der Hydrogel-Komponenten GelNB und GelS wurde durch M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) und M. Sc. S. Leopold (IFG, KIT) durchgeführt. Als Grundlage diente eine Modifizierung der freien Aminogruppen der Gelatine.^{14,435} Die Synthese der Norbornen-funktionalisierenden Gelatine GelNB erfolgte durch eine Aminkupplungsreaktion mit 5-Norbornen-2-carboxylsäure (NBCA), welche zuvor durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid (EDC-HCl) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert wurde.^{243,435} Die Reaktion ist in Abbildung 99 dargestellt. Die Synthese der Thiol-funktionalisierten Gelatine (GelS) erfolgte durch die Reaktion mit N-Acetyl-DL-homocysteinthiolacton (AHCT) nach Van Vlierberghe *et al.* (Abbildung 99).^{247,436}

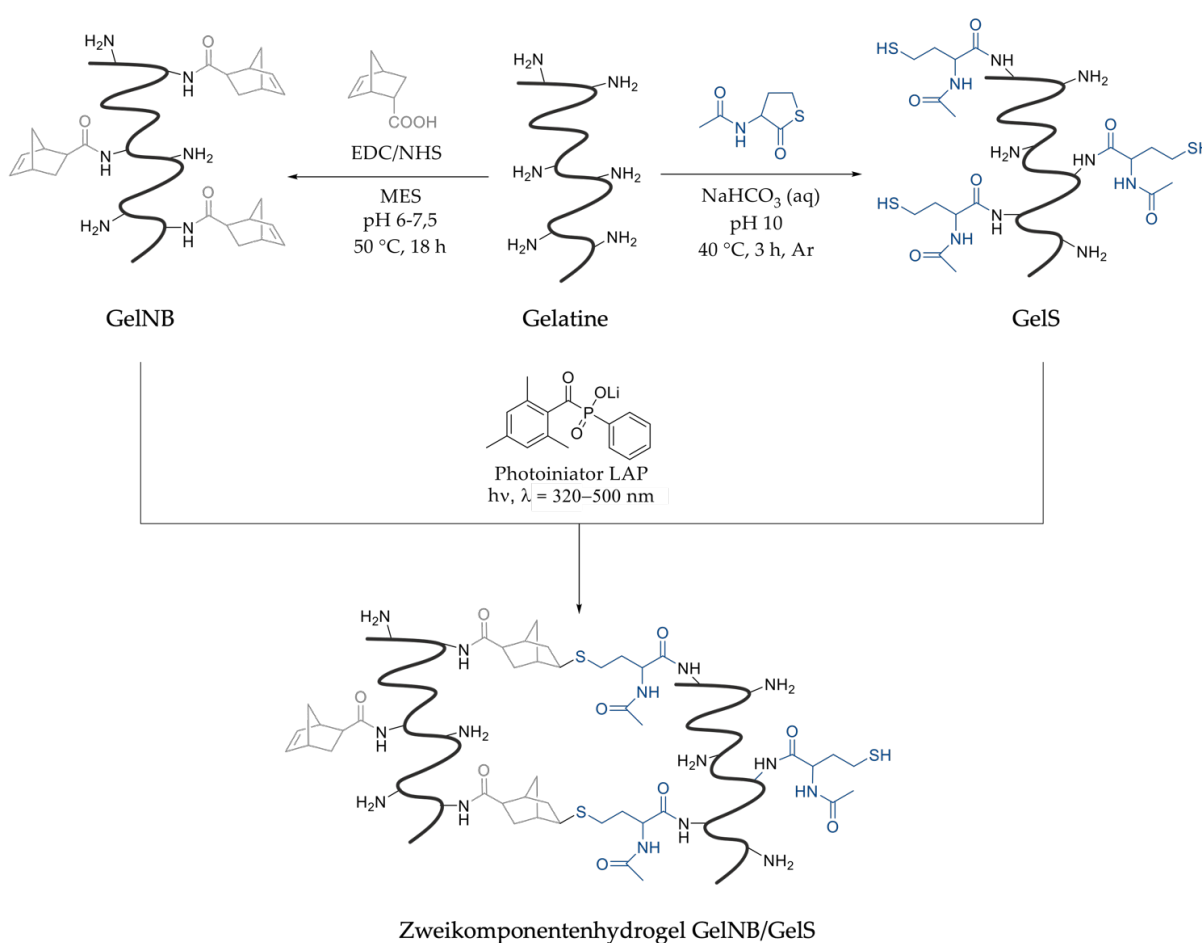


Abbildung 99: Synthese von GelNB sowie GelS und photochemische kovalente Vernetzung zum Zweikomponentenhydrogel GelNB/GelS (modifiziert nach Pfister und Göckler *et al.*).^{14,435}

Die eingesetzte Menge von NBCA sowie von AHCT bestimmte dabei den Funktionalisierungsgrad der beiden Photopolymere GelNB und GelS. Ein höherer Funktionalisierungsgrad resultierte in einem höheren Vernetzungsgrad sowie Steifigkeit des verwendeten Hydrogels.²⁴⁷

Eine kovalente Vernetzung der beiden Hydrogelkomponenten GelNB und Gels wurde durch Zugabe eines Photoinitiators und Anregung mit Licht der Wellenlänge 320-500 nm initiiert und erfolgte über eine Thiol-En-Reaktion (Abbildung 99). Im Folgenden wurden drei Hydrogele unterschiedlicher Vernetzungsdichte verwendet, welche als GelNB/Gels *Low*, *Medium* und *High* bezeichnet wurden.

3.2.5.2.2 Toxizitätstest LAP Bestrahlung

Zur Vernetzung des Zweikomponentenhydrogels GelNB/Gels wird ein Photoinitiator sowie eine Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge benötigt. Als Photoinitiator wurde wie in Kapitel 3.1.3.2 LAP verwendet. Im Vergleich zur Vernetzung von GelMA-Hydrogelen reicht eine geringere Konzentration des LAP zur Vernetzung der beiden Photopolymere GelNB/Gels aus. Statt 0,3 % werden 0,03 % des Photoinitiators verwendet. Um dennoch potentielle zytotoxische Einflüsse des LAPs auszuschließen, wurde ein MTT Assay durchgeführt. Das Funktionsprinzip erfolgte dabei wie in Kapitel 3.1.3.2.2 beschrieben. Hierfür wurden die Neuronen (HD11) sowie die Neuronen (WTC11NGN2) verwendet und miteinander verglichen. Dabei wurden die Neuronen mit sechs unterschiedlichen LAP-Konzentrationen von 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % und 0,5 % in M7 1:1 BM für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C behandelt. Da der Photoinitiator unter Bestrahlung von Licht in freie Radikale zerfällt (Photolyse) wurde in einem weiteren Versuch die mit LAP behandelten Zellen mit einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² für 30 s bestrahlt.²⁴¹ Die Ergebnisse des MTT Assays sind in Abbildung 100 dargestellt.

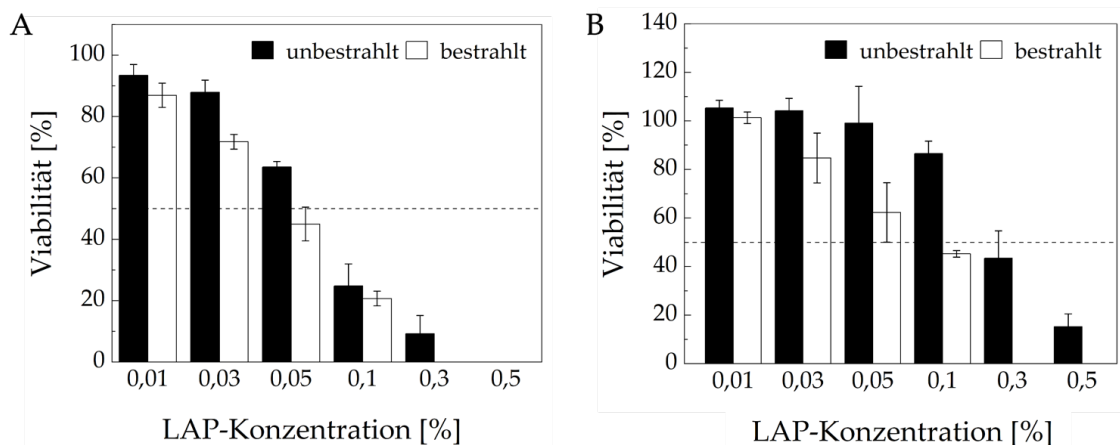


Abbildung 100: Toxizität des Photoinitiators LAP. $1 \cdot 10^4$ NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 sowie HD11 wurden in Matrigel hESC beschichtete Wells einer 96-Well-Platte in M7 1:1 BM ausgesät. Nach erfolgter Differenzierung wurden die Zellen mit unterschiedlichen LAP-Konzentrationen für 72 h behandelt. Dabei wurden in einem separaten Ansatz die mit LAP behandelten Proben für 30 s bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² bestrahlt (Omicure S2000, 320-500 nm). Die Viabilität konnte anschließend mithilfe eines MTT Assays quantifiziert werden. (A) zeigt den Toxizitätstest der Neuronen (HD11) und (B) der Neuronen (WTC11NGN2). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

Für die Neuronen (HD11) wurde ein LD₅₀-Wert von 0,05 % (bestrahlt) und 0,07 % (unbestrahlt) bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Zytotoxizität des Photoinitiators aufgrund seines

Zerfalls in freie Radikale durch eine Bestrahlung erhöht wird. Dieses Resultat konnte anhand der Literatur bestätigt werden.²⁴⁷ Für die Neuronen (WTC11NGN2) konnte ein LD₅₀-Wert von 0,09 % (bestrahlt) und 0,26 % (unbestrahlt) ermittelt werden. Auch hier wurde eine höhere Toxizität durch Bestrahlung des Photoinitiators beobachtet. Dennoch wiesen die Neuronen (WTC11NGN2) eine höhere Viabilität auf. Darüber hinaus konnte in beiden Toxizitätstest eine Abnahme der Viabilität mit zunehmender LAP-Konzentration beobachtet werden.

Zur Vernetzung des GelNB/GelS Hydrogels wird herkömmlich eine Photoinitiator-Konzentration von 0,03 % unter Bestrahlung verwendet. Anhand der Toxizitätstests konnte eine Viabilität von 71,77 % für Neuronen HD11 und 84,73 % für Neuronen WTC11NGN2 bei dieser Konzentration festgestellt werden. Zudem ist zu vermuten, dass die durch Photolyse entstehenden freien Radikale durch jeden Medienwechsel abgetragen und in ihrer Konzentration verdünnt werden. Somit könnte die Toxizität zusätzlich verringert werden. Dieses Phänomen konnte bereits anhand von retinalen Astrozyten in Kapitel 3.1.3.2.4 gezeigt werden.

3.2.5.2.3 Toxizität der Bestrahlung

Neben einer Toxizität von LAP wurde ebenfalls die Toxizität der Bestrahlung mithilfe eines MTT Assays untersucht. Wie zuvor in Kapitel 3.2.5.2.3 beschrieben, kann kurzweilige Strahlung zu letalen DNA-Schäden, zur Generierung von ROS sowie zu Mutationen in der DNA führen und damit die Viabilität von Zellen dezimieren.²⁴⁸

Die Untersuchung der Bestrahlungstoxizität erfolgte durch die Variation der beiden Parameter Bestrahlungszeit und Leistungsdichte. Dabei wurden die drei Leistungsdichten 500 mW/cm², 1000 mW/cm² und 5000 mW/cm² in Abhängigkeit von drei Bestrahlungszeiten 10 s, 30 s und 60 s untersucht. Hiermit konnte überprüft werden, ob eine kürzere Bestrahlungsdauer bei höherer Leistungsdichte in einer geringeren Toxizität resultiert. Für den MTT Assay wurden Neuronen der iPSC-Linien HD11 sowie WTC11NGN2 eingesetzt. Hierbei wurden lichtundurchlässige 96-Well-Platten verwendet, um eine unerwünschte Streuung von Licht in angrenzende Wells zu verhindern. Am Folgetag konnte das vorhandene Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit unterschiedlicher Leistungsdichte sowie Bestrahlungszeit behandelt werden. Es folgte eine Kultivierung für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C. Das Ergebnis des Toxizitätstests ist in Abbildung 101 dargestellt. Für die Neuronen (HD11) konnten LD₅₀-Werte von 3782,03 mW/cm² (10 s), 3366,33 mW/cm² (30 s) sowie 2355,15 mW/cm² (60 s) ermittelt werden. Damit konnte eine deutliche Abnahme der Viabilität der Neuronen (HD11) mit zunehmender Bestrahlungsdauer sowie Leistungsdichte beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurde bei den Neuronen (WTC11NGN2) stets eine Viabilität über 59,22 % nachgewiesen. Damit wiesen die Neuronen (WTC11NGN2) im Vergleich zu den Neuronen (HD11) eine höhere Viabilität auf. Dennoch konnte auch hier eine Abnahme der Viabilität mit zunehmender Bestrahlungsdauer sowie Leistungsdichte beobachtet werden.

Eine Vernetzung des Hydrogels GelNB/GelS erfolgt für gewöhnlich bei einer Bestrahlungsdauer von maximal 30 s und einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² (bei 320-500 nm). Hierfür konnte eine hohe Viabilität mit 72,92 % (Neuronen WTC11NGN2) und 86,24 % (Neuronen HD11) ermittelt

werden. Allerdings konnte anhand des Toxizitätstests über die Viabilität hinaus keine Aussage über potentielle Schädigungen der DNA getroffen werden.

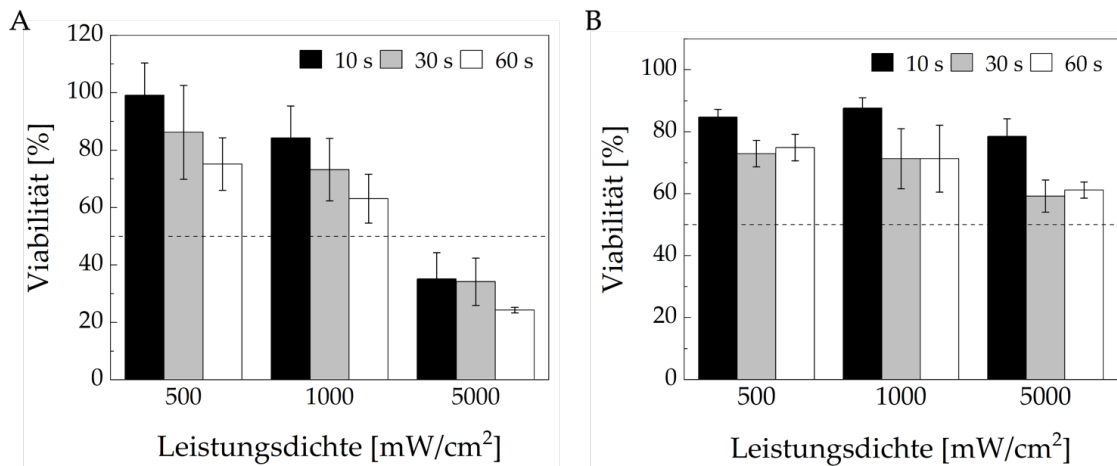


Abbildung 101: Toxizität der Bestrahlung. Für den MTT Assay wurden $1 \cdot 10^4$ NSC der iPSC-Linie HD11 sowie WTC11NGN2 in Wells einer 96-Well-Platte in M7 1:1 BM ausgesät. Nach erfolgter Differenzierung wurden die Neuronen mit unterschiedlichen Leistungsdichten in Korrelation mit verschiedenen Bestrahlungszeiten behandelt (320-500 nm, Omnicure S2000). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mithilfe des MTT Assays quantifiziert. (A) zeigt den Toxizitätstest der Neuronen (HD11) und (B) der Neuronen (WTC11NGN2). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.2.5.2.4 Kultivierung von Neuronen in GelNB/GelS

Zur Kultivierung von Neuronen (HD11) in einem GelNB/GelS Hydrogel wurden NSC in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in die Gelmatrix eingebettet. Hierbei wurde das GelNB/GelS Hydrogel mit der Vernetzungsdichte *Medium* in einer 5%igen Konzentration gewählt. Im vorherigen Kapitel konnte eine Viabilität von mindestens 70 % der Neuronen bei einer LAP-Konzentration von 0,03 % sowie einer 30 s Bestrahlungsdauer bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 erzielt werden. Somit wurden diese Größenwerte für eine Vernetzung des GelNB/GelS *Medium* Hydrogels verwendet. Nach der photochemischen Vernetzung wurde das Hydrogel mit M7 1:1 BM überschichtet und für 21 Tage bei 5 % CO_2 und 37°C kultiviert. Anschließend konnte die Viabilität und zelluläre Ausrichtung der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM und PI überprüft werden. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung der nekrotischen und lebenden Zellen im Hydrogel mithilfe von Fiji. Das Ergebnis ist in Abbildung 102 dargestellt. Dabei wurde eine niedrige Viabilität mit 10,33 % der Neuronen (HD11) ermittelt. Ähnliche Resultate konnten bereits in Kapitel 3.2.5.1.1 durch Kultivierung im Kollagen I-Hydrogel erzielt werden. Aufgrund der ermittelten Viabilität von 86,24 % und 71,77 % der Neuronen (HD11) in den Toxizitätstests in Kapitel 3.2.5.2.2 und 3.2.5.2.3 ist eine durch LAP oder Bestrahlung verursachte erhöhte Toxizität auszuschließen. Darüber hinaus konnte eine Kultivierung im Kollagen I-Hydrogel ohne Zugabe eines Photoinitiators sowie eine Bestrahlung mit Licht ebenfalls eine geringe Viabilität erzielen. Die Versorgung der eingebetteten Zellen im Hydrogel erfolgt durch Diffusion des Nährmediums in die Gelmatrix. Dies könnte zu

einer begrenzten Verfügbarkeit von essentiellen Wachstumsfaktoren geführt haben, was in einer geringeren Viabilität der Zellen resultierte. Zudem handelt es sich bei den Neuronen (HD11) um sehr anspruchsvolle Neuronen, welche im Vergleich zu den Neuronen (WTC11NGN2) eine definiertere Mikroumgebung benötigen (Kapitel 3.2.4 und 3.2.5.1.1).

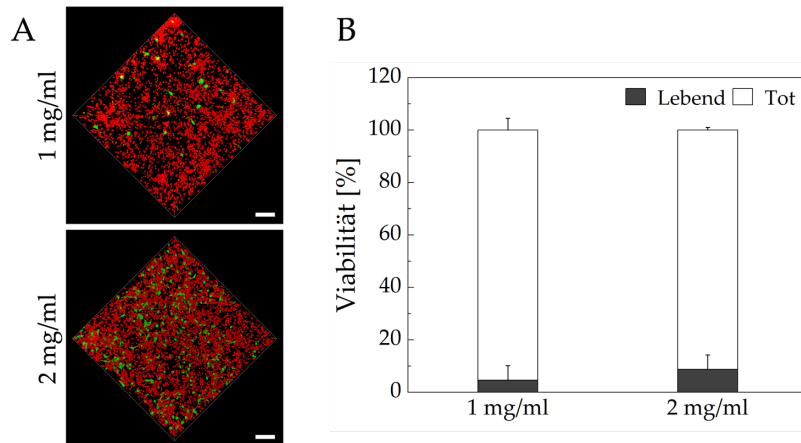


Abbildung 102: Viabilität der Neuronen (HD11) im GelNB/GelS-Hydrogel Medium. NSC der iPSC-Linie HD11 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ der Gelmatrix eingebettet. Die kovalente Vernetzung wurde durch Zugabe von 0,03 % LAP und einer Bestrahlungsdauer von 30 s bei $500 \text{ mW}/\text{cm}^2$ induziert (Omniscure S2000, 320-500 nm). Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 61$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 300 \mu\text{m}$, Leica TCS SPE DMI4000B). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden (A). Daraufhin wurde mithilfe von Fiji der prozentuale Anteil der nekrotischen und lebenden Zellen quantifiziert (B). Der Maßstabsbalken entspricht $100 \mu\text{m}$. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

Analog dazu wurden in Kooperation mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT) NSC der iPSC Linie WTC11NGN2 in die GelNB/GelS Hydrogele *Low*, *Medium* und *High* in derselben Zellkonzentration eingebracht. Eine Vernetzung der 5 % Hydrogele sowie die Kultivierung erfolgte wie zuvor beschrieben. Anschließend konnte die Viabilität an Tag 1, 7, 14 und 21 mithilfe der Lebend-/Tot-Färbung untersucht und die Viabilität der eingebetteten Zellen in den Hydrogelen mit Fiji quantifiziert werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 103 und Abbildung 104 dargestellt.

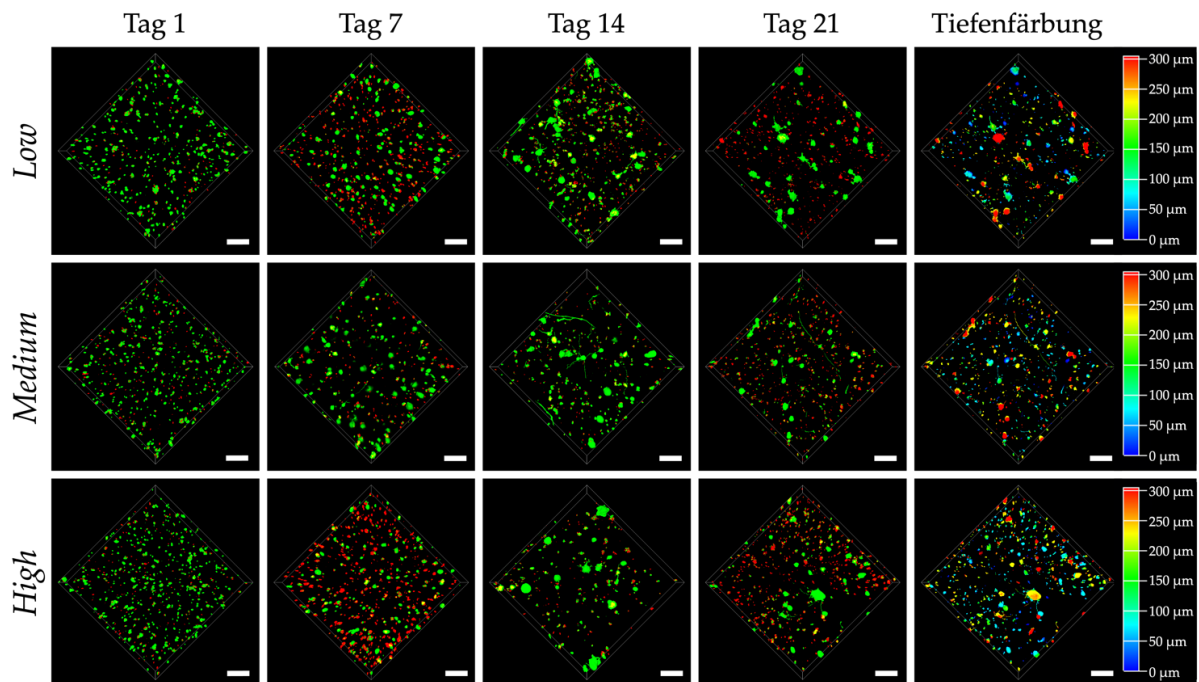


Abbildung 103: Lebend-/Tot-Färbung der Neuronen (WTC11NGN2) im GelNB/GelS-Hydrogel. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ der Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurden GelNB/GelS-Hydrogele der Vernetzungsgrade *Low*, *Medium* und *High* verwendet. Die kovalente Vernetzung wurde durch Zugabe von 0,03 % LAP und einer Bestrahlungsdauer von 30 s bei 500 mW/cm^2 induziert (Omnicure S2000, 320-500 nm). Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 61$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 300 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

Es konnte in den Hydrogelen aller Vernetzungsdichten eine beständige Viabilität zwischen 35,99 % und 53,33 % beobachtet werden. Damit konnte im Vergleich zu den Neuronen (HD11) eine bis zu 416,26 % höhere Viabilität der Neuronen (WTC11NGN2) im GelNB/GelS Hydrogel *Medium* erzielt werden. Darüber hinaus konnte eine Ausrichtung einzelner Zellen an Tag 7 in GelNB/GelS *Medium* sowie an Tag 14 in GelNB/GelS *Low* und GelNB/GelS *High* beobachtet werden. Die stärkste Ausrichtung der Zellen konnte in GelNB/GelS *Medium* festgestellt werden. Anhand der Tiefenfärbung an Tag 21 wurde eine homogene Verteilung der Zellen im Hydrogel bestätigt. Im Vergleich zur Kultivierung im Kollagen I-Hydrogel erfolgte jedoch keine Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks im GelNB/GelS Hydrogel. Das Kollagen I-Hydrogel weist gegenüber dem GelNB/GelS Hydrogel geringere mechanische Eigenschaften auf.²³⁷ Möglicherweise kommt diese Eigenschaft der benötigten Mikroumgebung der Neuronen (WTC11NGN2) nach.

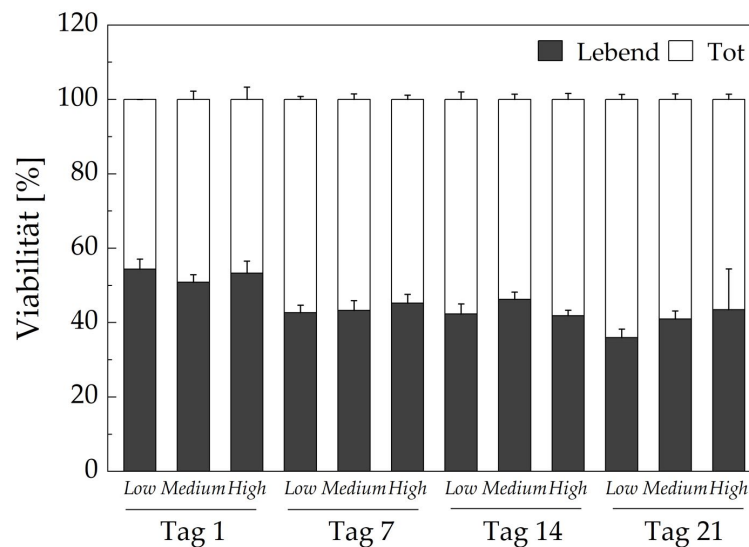


Abbildung 104: Viabilität der Neuronen (WTC11NGN2) in GelNB/GelS-Hydrogelen. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Konzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $200 \mu\text{l}$ Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurde GelNB/GelS-Hydrogele der Vernetzungsgrade *Low*, *Medium* und *High* verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % LAP und einer Bestrahlung von 30 s bei 500 mW/cm^2 wurde eine kovalente Vernetzung der Hydrogele induziert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 erfolgte zur Beurteilung der Viabilität eine Lebend-/Tot-Färbung. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurde die Färbung visualisiert und mithilfe von Fiji der prozentuale Anteil der nekrotischen und lebenden Zellen quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

3.2.5.3 Kapitelzusammenfassung Hydrogel als EZM-imitierende Stützmatrix

Das menschliche Gehirn besitzt ein sehr weiches Gewebe, sodass Speichermodule (G') von $< 1000 \text{ Pa}$ erzielt werden.^{429,437} So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Gelmatrices mit G' -Werten $< 500 \text{ Pa}$ eine Differenzierung von Neuronen fördert.⁴²⁹ Durch eine rheologische Charakterisierung der GelNB/GelS Hydrogele konnte für GelNB/GelS *Low*, *Medium* und *High* Speichermodule von 126 Pa , 400 Pa und 521 Pa bestimmt werden.²⁴³ Für Kollagen I-Hydrogel wurden G' -Werte zwischen $10\text{-}800 \text{ Pa}$, je nach Konzentration des Kollagens ermittelt.^{429,438} Sarrigiannidis *et al.* konnten durch Verwendung eines $1,37 \text{ mg/ml}$ Kollagen I-Hydrogel ein Speichermodul von 235 Pa bestimmen.⁴³⁸ Damit liegen die ermittelten G' -Werte der untersuchten Hydrogele im Bereich der Steifheit von Hirngewebe und eignen sich in der Theorie zur Rekonstruktion eines NVU-Modells. Doch eine Kultivierung der Neuronen (HD11) in den Kollagen I-Hydrogelen sowie in den GelNB/GelS-Hydrogelen resultierte in einer niedrigen Viabilität. Aus diesem Grund sind die untersuchten Hydrogele für eine Kultivierung der Neuronen (HD11) zur Rekonstruktion eines Hirngewebes nicht geeignet. Dennoch ist für eine *in vivo* ähnliche Rekonstruktion der NVU eine Dreidimensionalität unerlässlich. Daher wurden für nachfolgende Experimente zur Modellierung eines dreidimensionalen NVU-Modells die differenzierten Neuronen der iPSC-Linie WTC11NGN2 verwendet. Diese erzielten eine wesentlich höhere Viabilität in den untersuchten Hydrogelen. Zudem konnte die Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks im Kollagen I-Hydrogel sowie eine Ausrichtung einzelner Zellen in GelNB/GelS *Medium* detektiert werden. Des Weiteren konnten WTC11NGN2 differenzierte Neuronen zusammen mit hCMEC/D3,

HBVP, HA und HM im etablierten NVU-Modell im vasQchip mikrofluidisch kultiviert werden (Abbildung 140 Anhang). Zudem wurde anhand eines *Calcium Imagings* in Kapitel 3.2.4.2 die Aktivität der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen im vasQchip nachgewiesen. Außerdem ermöglicht die einfache und effizientere Differenzierungsmethode eine schnellere Verfügbarkeit von NSC für einen höheren Durchsatz an Untersuchungen.

3.2.6 NVU-Modell inklusive Neuronen im Kollagen I-Hydrogel

In der vorliegenden Arbeit konnte in Kapitel 3.2.3 erfolgreich ein NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen etabliert und charakterisiert werden. In Kapitel 3.2.5.1.1 wurde die Ausbildung eines dichten dreidimensionalen Netzwerks der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen im Kollagen I-Hydrogel erzielt. Im Folgenden wurden beide Elemente in einem mikrofluidischen dreidimensionalen NVU-Modell vereint. Dabei wurde die Viabilität der Zellen sowohl außerhalb als auch innerhalb der Gelmatrix sowie die Ausbildung eines neuronalen Netzwerks unter Einfluss einer mikrofluidischen Kultivierung im vasQchip überprüft. Hierfür wurde der Mikrokanal des vasQchips in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT), wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, mit hCMEC/D3 besiedelt. Am Folgetag wurden WTC11NGN2 differenzierte Neuronen in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml im 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel in das umgebende Kompartiment eingebracht. Für diesen Versuch wurde das höher konzentrierte Kollagen I-Hydrogel verwendet, da hier die Ausbildung eines dichten ausgeprägten neuronalen Netzwerks schneller erfolgte (Kapitel 3.2.5.1.1). Analog dazu wurde in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder in einem separaten Versuch ein NVU-Modell bestehend aus hCMEC/D3, HBVP, HA sowie HM (ohne Neuronen) nach Kapitel 3.2.3.2 im vasQchip rekonstruiert. Anschließend konnten WTC11NGN2 differenzierte Neuronen im 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel in das umgebende Kompartiment des Kokultur-Modells unter den zuvor beschriebenen Parametern eingebracht werden. Während die Kultivierung von HBVP, HA sowie HM planar auf der PC-Membran erfolgte, wurden Neuronen im umgebenden Kompartiment in die dreidimensionale Gelmatrix eingebettet. Damit konnte der Einfluss weiterer NVU-Zelltypen auf die Ausbildung eines neuronalen Netzwerks in der Gelmatrix analysiert werden. Nach einer 30-minütigen physikalischen Vernetzung des Kollagen I-Hydrogels konnten die Zellen durch Integration einer Mikrofluidik mit Nährmedium versorgt werden. Die Kultivierung erfolgte bei 5 % CO₂ und 37 °C bei einer Flussrate von 100 µl/h. Da die Anschlüsse des umgebenden Kompartiments aufgrund der Gelmatrix verschlossen waren, konnte kein Mediumwechsel durchgeführt werden. Somit erfolgte die Versorgung des umgebenden Kompartiments mit Nährstoffen ausschließlich über den Mikrokanal.

Zur Beurteilung der Zellviabilität und der zellulären Ausrichtung sowie Vernetzung der Neuronen im Kollagen I-Hydrogel wurde eine Lebend-/Tot-Färbung an Tag 1, 7, 14 und 21 durchgeführt. Eine Färbung der Zellen erfolgte für 1 h fluidisch über den Mikrokanal. Mithilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnten *z-stack* Messungen des umgebenden Kompartiments und des Mikrokanals in einer Höhe von 500 µm erzeugt werden. In Abbildung 105 ist die Kokultur aus

hCMEC/D3 und Neuronen, und in Abbildung 106 das vollständige NVU-Modell dargestellt. In Abbildung 105 und Abbildung 106 (ii-iii) ist die horizontale Ansicht in der 3D-Projektion der beiden Kokultur-Modelle im vasQchip zu erkennen. Der Mikrokanal wurde dabei visuell gekennzeichnet. Trotz einiger nekrotischen Zellen im umgebenden Kompartiment ist in beiden Kokultur-Modellen eine überwiegende Viabilität der Zellen innerhalb sowie außerhalb der Gelmatrix zu erkennen. Im Vergleich zu Kapitel 3.2.5.1.1 wurde eine leichte zelluläre Ausrichtung der Neuronen in beiden Kokultur-Modellen bereits an Tag 1 beobachtet. So konnte an Tag 7 bereits die Ausbildung eines dichten neuronalen Netzwerks über mehrere z-Ebenen detektiert werden. Damit könnte möglicherweise der mikrofluidischen Kultivierung eine unterstützende Funktion in der zellulären Ausrichtung sowie der Netzwerkbildung zugesprochen werden. An Tag 14 sowie 21 konnte eine dichtere Vernetzung der Somata über Axone und Dendriten beobachtet werden. Werden die beiden Kokultur-Modelle miteinander verglichen, wurde kein signifikanter Unterschied in der zellulären Ausbildung sowie Netzwerkbildung der Neuronen in der Gelmatrix festgestellt. Jedoch konnte anhand der Tiefenfärbung ab Tag 7 des vollständigen NVU-Modells (Abbildung 106) eine Abnahme der Gelmatrixhöhe um näherungsweise 300 μm ermittelt werden. Da dieser Effekt im anderen Kokultur-Modell (Abbildung 105) nicht beobachtet wurde, könnte die Ursache die simultane Kokultivierung mehrerer Zelltypen im umgebenden Kompartiment sein, welche die Gelmatrix enzymatisch abbauen. Eine simultane Einbettung von Neuronen und Astrozyten im Kollagen I-Hydrogel unter statischen Bedingungen zeigte bereits 24 h später einen kompletten Abbau der Gelmatrix (Abbildung 141 Anhang, in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder). Neben den retinalen Astrozyten in Kapitel 3.1.3.1.1 im Rahmen dieser Arbeit konnten Dr. V. Kappings und Dr. R. Pfister ebenfalls die Degradierung von Kollagen I-Hydrogelen unter Verwendung von Hautzellen und Hirnastrozyten bestätigen.^{14,40} Auch in der Literatur wurde die Degradierung sowie die geringeren mechanischen Eigenschaften des Kollagen I-Hydrogels anhand von verschiedenen Gewebemodellen beschrieben.^{237,439} Dennoch konnte eine überwiegende Viabilität der Zellen sowie eine Netzwerkbildung der Neuronen unter mikrofluidischen Bedingungen im vollständigen NVU-Modell im vasQchip nachgewiesen werden. Hierbei ist zu beachten, dass eine Charakterisierung sowie ein Nachweis der einzelnen Zelltypen mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Zukünftig sollte dies zur Validierung dieses Versuches umgesetzt werden.

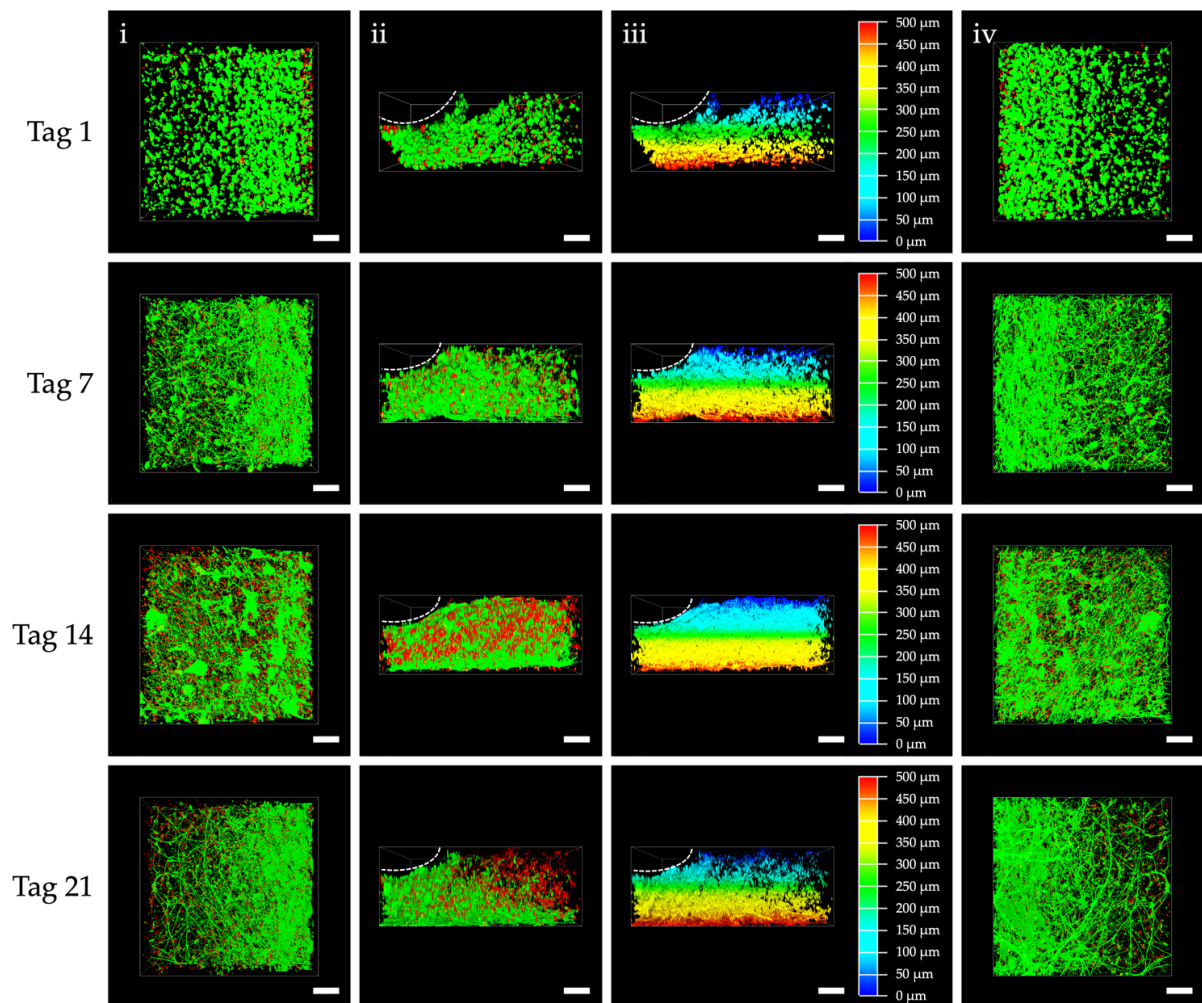


Abbildung 105: Lebend-/Tot-Färbung der Kokultur aus hCMEC/D3 und Neuronen (WTC11NGN2) im vasQchip. $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal in KM ausgesät (in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder). Am Folgetag wurden WTC11NGN2 differenzierte Neuronen in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 500 μl eines 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels im umgebenden Kompartiment eingebettet. Die physikalische Vernetzung wurde durch Änderung des pH-Werts sowie einer Inkubation für 30 min bei 37 °C und 5 % CO_2 induziert. Nach erfolgter Inkubation wurden die vasQchips an eine Mikrofluidik angeschlossen und eine Flussrate von 100 $\mu\text{l}/\text{h}$ angelegt. Als Kultivierungsmedium wurde M7 1:1 BM verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Die Zugabe der Färbelösung erfolgte über den Mikrokanal für 1 h. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 167$, Abstand = 3 μm , $h = 500 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie Tiefenfarbungen erstellt werden. (i) zeigt die innere laterale, (ii) die horizontale und (iv) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (iii) stellt die Tiefenfarbung von (ii) dar. Der Mikrokanal ist in weiß gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

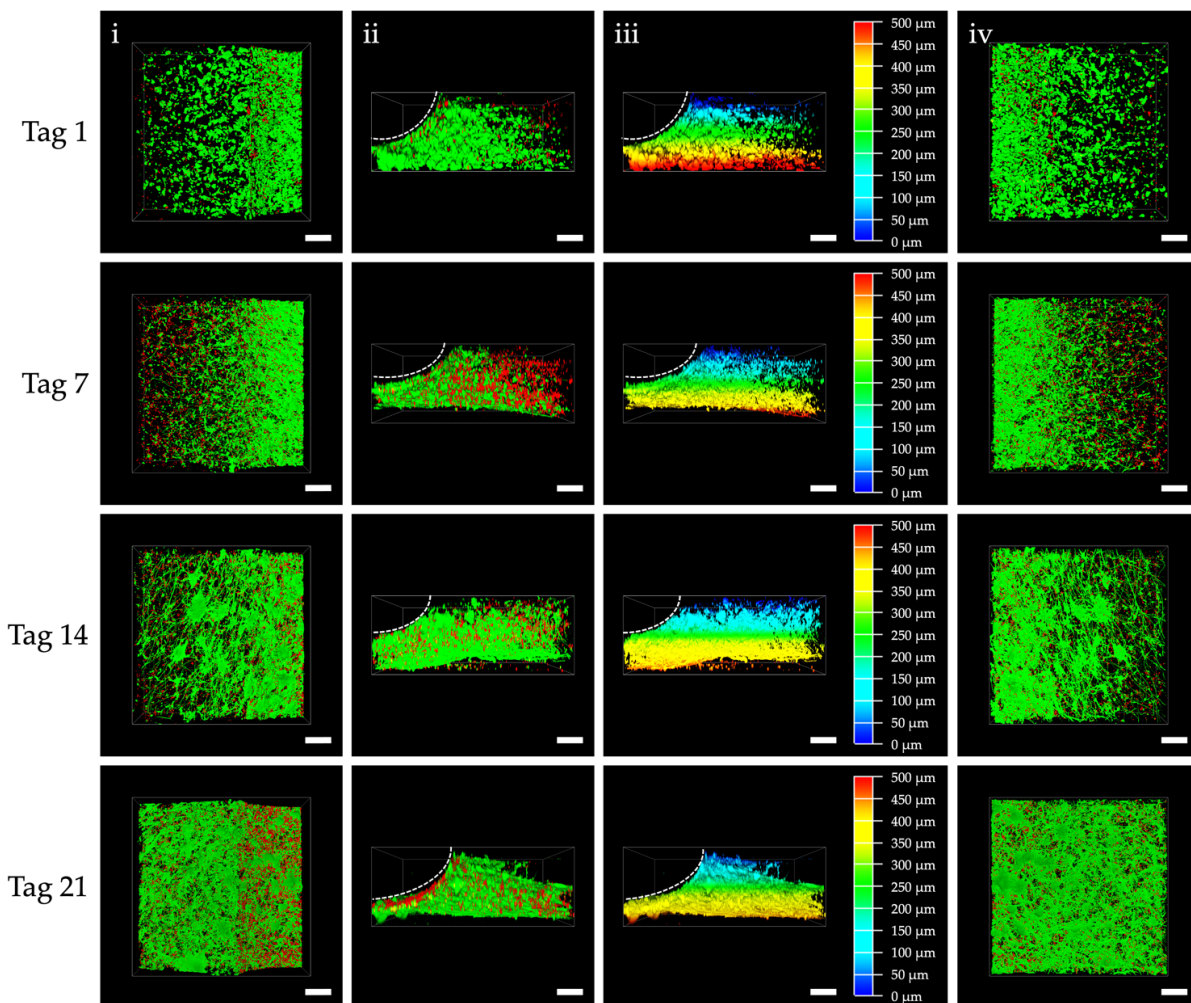


Abbildung 106: Lebend-/Tot-Färbung des vollständigen NVU-Modells inklusive Neuronen (WTC11NGN2) im vasQchip. Die Einbringung des NVU-Modells (ohne Neuronen) in den vasQchip erfolgte in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Um das Anwachsen der Zellen auf der porösen PC-Membran sicherzustellen, wurde der vasQchip um 180° gedreht positioniert. 24 h später wurden $5 \cdot 10^5$ HA sowie $1 \cdot 10^5$ HM auf den ausgebildeten Perizytenlayer nach demselben Prinzip eingebracht. Daraufhin erfolgte eine Einbringung von $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal in KM. Am nächsten Tag wurden WTC11NGN2 differenzierte Neuronen in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 500 μ l eines 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels im umgebenden Kompartiment eingebettet. Die physikalische Vernetzung wurde durch Änderung des pH-Werts sowie einer Inkubation für 30 min bei 37°C und 5 % CO_2 induziert. Nach erfolgter Inkubation wurden die vasQchips an eine Mikrofluidik angeschlossen und eine Flussrate von 100 μ l/h angelegt. Als Kultivierungsmedium wurde M7 1:1 BM verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Die Zugabe der Färbelösung erfolgte über den Mikrokanal für 1 h. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 167$, Abstand = 3 μ m, $h = 500$ μ m, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie Tiefenfärbungen erstellt werden. (i) zeigt die innere laterale, (ii) die horizontale und (iv) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (iii) stellt die Tiefenfärbung von (ii) dar. Der Mikrokanal ist in weiß gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m.

3.2.6.1 Kapitelzusammenfassung NVU-Modell inklusive Neuronen im Kollagen I-Hydrogel

Es wurden erste Versuche zur Etablierung eines vollständigen dreidimensionalen fluidischen NVU-Modell aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM sowie iPSC differenzierten Neuronen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Einbringung eines Kollagen I-Hydrogels mit Neuronen prinzipiell in einem vollständigen NVU-Modell möglich war, jedoch in einer Degradierung der Gelmatrix resultierte. Auch durch eine statische Kultivierung von HA und Neuronen konnte ein vollständiger Abbau festgestellt werden. Dieses Degradationsverhalten schließt das Kollagen I-Hydrogel als geeignete Stützmatrix zur dreidimensionalen Kultivierung des NVU-Modells zum jetzigen Zeitpunkt aus. Doch zukünftig könnten weitere Modifizierungen in einem stabileren Hydrogel resultieren. So konnten Seyedhassantehrani *et al.* durch Vernetzung des Kollagen I-Hydrogels mithilfe von Polyethylenglykol Succinimidyl Glutarat (4S-StarPEG) den Abbau der Gelmatrix verzögern.⁴³⁹ Die Zellviabilität von Astrozyten wurde dabei nicht beeinflusst.⁴³⁹

3.2.7 3D-Bioprinting der Neuronen

In den letzten 10 Jahren hat die Technologie des *3D-Bioprintings* sehr große Fortschritte erzielt, sodass diese immer häufiger zur Rekonstruktion von Gewebemodellen eingesetzt wird.^{440,441} Im *3D-Bioprinting* wird eine Biotinte, bestehend aus Zellen in einer geeigneten Gelmatrix schichtweise mithilfe von 3D-Druck zu einer 3D-Struktur aufgebaut.^{247,442} Dabei wird eine sehr präzise und kontrollierte Platzierung der Biotinte, auch ohne Verwendung von Gerüststrukturen (*scaffolds*), gewährleistet.^{441,443} Aufgrund der präzisen geometrischen Nachbildung von natürlichen 3D-Strukturen erlaubt das *3D-Bioprinting* die Diskrepanz zwischen konstruierten und natürlichen Gewebestrukturen zu überwinden.^{441,442,444}

Im folgenden Versuch wurde die *Organ-on-a-chip* Technologie mit dem *3D-Bioprinting* kombiniert. Der Vorteil des *3D-Bioprintings* auf dem vasQchip ist neben einer gezielten Platzierung das Übereinanderschichten von Zellen in einer gewünschten geometrischen 3D-Struktur. Dabei kann eine Freilegung der Anschlüsse im umgebenden Kompartiment gewährleistet werden, wodurch ein Mediumwechsel ermöglicht wird. In Kapitel 3.2.6 wurden durch händisches Einbringen einer Gelmatrix die Anschlüsse des Kompartiments verschlossen. Infolgedessen konnte kein Mediumwechsel durchgeführt werden. Somit erfolgte die Lebend-/Tot-Färbung der Zellen über die Mikrofluidik im Mikrokanal. Eine Immunfluoreszenzfärbung zur Charakterisierung der Zellen in der Gelmatrix könnte mit dieser Technik aufgrund des hohen Verbrauchs an teuren Antikörpern nicht durchgeführt werden. Zudem reduziert das *3D-Bioprinting* den Verbrauch an teuren Zellen, da nur ausgewählte Bereiche gezielt bedruckt werden können. Übertragen auf den vasQchip wird die Einbringung einer Gelmatrix statt der gesamten Fläche des umgebenden Kompartiments lediglich auf die Fläche um den Mikrokanal begrenzt. Darüber hinaus sollte durch Kombination beider Technologien überprüft werden, ob die Exposition einer Mikrofluidik die Viabilität sowie die Ausbildung eines Netzwerks von neuronalen Zellen steigert. Im Folgenden wurde das

3D-Bioprinting auf dem vasQchip sowie der Vorversuch in Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) durchgeführt. Dabei wurde der Extrusions-basierte Biodruck verwendet. Aufgrund der geringen mechanischen Eigenschaften ist das *3D-Bioprinting* von Kollagen I-Hydrogelen nicht möglich. Bei einer 30-minütigen Polymerisierung in der Druckerkartusche entsteht ein inhomogen vernetztes Hydrogel, welches nicht in der Lage war eine stabile druckbare Struktur zu erzielen (Abbildung 142 Anhang). Aus diesem Grund wurde als Photopolymer für die Biotinte das Zweikomponenten-Hydrogel GelNB/GelS mit dem Vernetzungsgrad *Medium* in einer Konzentration von 5 % eingesetzt. Dieses Hydrogel zeigte eine beständige Viabilität und eine moderate Ausrichtung der neuronalen Zellen über verschiedene Ebenen entlang der z-Achse (Kapitel 3.2.5.2.4). Darüber hinaus erzielt GelNB/GelS *Medium* einen Speichermodul von 400 Pa,^{429,437} was der Steifigkeit des Hirngewebes entspricht.

3.2.7.1 *3D-Bioprinting* der Neuronen auf einen Objektträger

Als Vorversuch wurde die Viabilität und die Netzwerkbildung der Neuronen in 3D-gedruckten Gitterstrukturen auf einem Objektträger ohne Einwirkung einer Mikrofluidik untersucht. Dafür wurden NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit der Photopolymerlösung (5 % GelNB/GelS *Medium* und 0,03 % LAP) vermischt. Die daraus resultierende Biotinte wurde in eine Druckerkartusche überführt und in den Extrusionsdruckkopf des *Bioprinters* Biospot BP eingesetzt. Anschließend konnte mithilfe von mechanischem Druck die Biotinte auf einen Objektträger extrudiert werden. Hierbei wurde eine Druckerkartusche mit einer Dosiernadel der Öffnung 250 μm verwendet, um den Druck auf die Neuronen so gering wie möglich zu halten. Die 3D-Gitterstruktur wurde mit zwei Schichten bei einer Extrusionsrate von 0,02 mm/s gedruckt. Anschließend erfolgte eine 20-sekündige photochemische Aushärtung der gedruckten Strukturen durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge (320-500 nm). Der schematische Druckprozess ist in Abbildung 107 dargestellt.

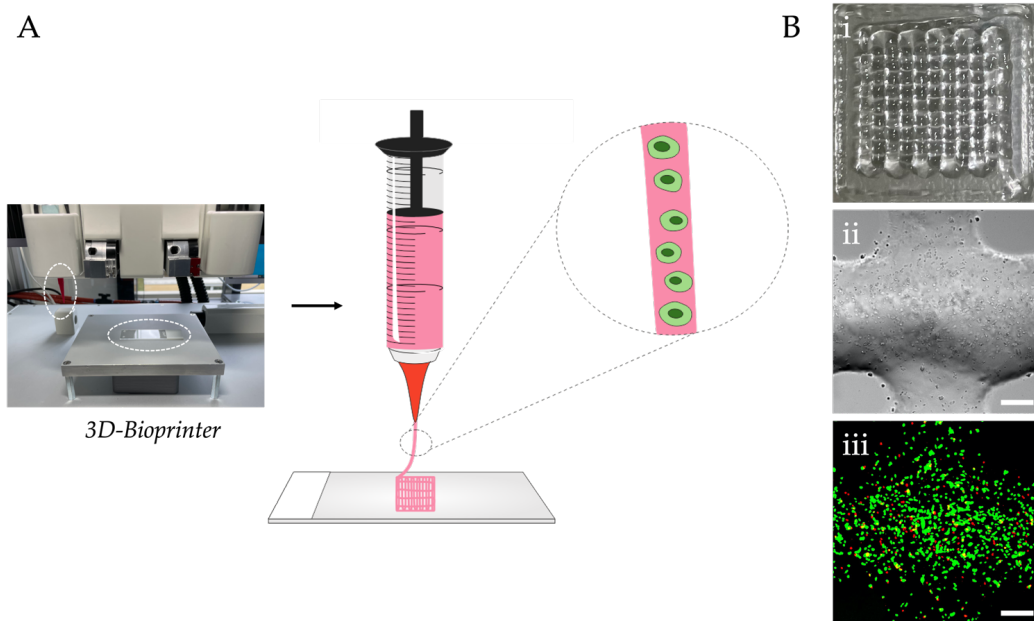


Abbildung 107: Schematische Darstellung des Druckprozesses mit Neuronen. (A) Die Biotinte bestehend aus WTC11NGN2 differenzierten Neuronen, Photoinitiator und Gelmatrix wurde vom *3D-Bioprinter* (Biospot BP) auf einen Objektträger in Form einer Gitterstruktur schichtweise extrudiert. Die Dosiernadel sowie der Objektträger sind in weiß gekennzeichnet. (Bi) zeigt die erzeugte Gitterstruktur, (Bii) stellt eine Nahaufnahme der Struktur im Hellfeld dar, (Biii) veranschaulicht eine Lebend-/Tot-Färbung der 3D-Struktur zur Beurteilung der Viabilität (Leica Stellaris 5). Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm . In Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm.

Nach dem Druckprozess erfolgte eine Kultivierung bei 5 % CO_2 und 37 °C über einen Zeitraum von 21 Tagen. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde zur Überprüfung der Viabilität sowie der zellulären Ausrichtung der Neuronen eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen derselben Zellkonzentration und Photopolymerlösung ohne Verwendung des *3D-Bioprintings* analysiert. Ein Vergleich zur 3D-gedruckten Struktur sollte den Einfluss des Druckprozesses auf die Viabilität der Neuronen veranschaulichen. Die Detektion erfolgte über konfokale Fluoreszenzmikroskopie und *z-stack* Messungen. Die generierten 3D-Projektionen sowie Tiefenfärbungen sind in Abbildung 108 dargestellt. Daneben wurden die Anteile nekrotischer und lebender Zellen in der Kontrolle sowie in den gedruckten Gitterstrukturen mithilfe von Fiji quantifiziert (Abbildung 109). Es konnte gezeigt werden, dass der Druckprozess keine Einflüsse auf die Viabilität der Neuronen ausübt (Abbildung 109). So konnte an Tag 1 im Vergleich zur ungedruckten Kontrolle mit 65,45 % eine höhere Viabilität in den 3D-gedruckten Strukturen detektiert werden. Ferner wurde eine Viabilität zwischen 43,98 % und 65,45 % in den gedruckten Strukturen ermittelt. Anhand der Tiefenfärbung konnten beständige Gitterstrukturen in der Höhe von 200 μm über den gesamten Zeitraum von 21 Tagen detektiert werden. Eine leichte Ausrichtung der Zellen wurde bereits an Tag 7 festgestellt. Jedoch konnte kein dichtes ausgeprägtes neuronales Netzwerk wie im Kollagen I-Hydrogel in Kapitel 3.2.5.1.1 erzielt werden. Dennoch konnten vitale Zellen sowie eine moderate zelluläre Ausrichtung der Neuronen in den 3D-gedruckten Gitterstrukturen beobachtet werden.

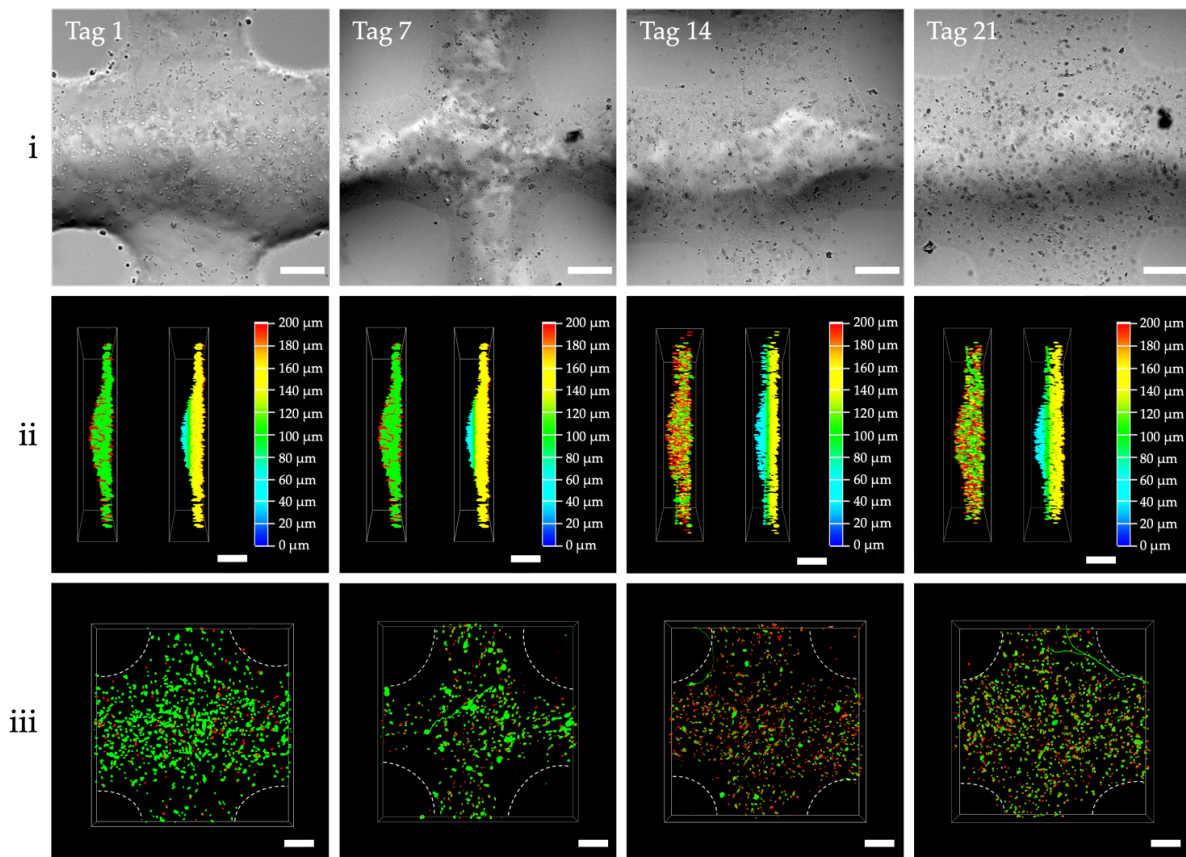


Abbildung 108: Lebend-/Tot-Färbung und Hellfeld der 3D-gedruckten Neuronen. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in einer Gelmatrix mithilfe von Extrusions-basiertem *3D-Bioprinting* in Gitterstrukturen schichtweise eingebracht. Als Gelmatrix wurde 5%iges GelNB/GelS *Medium* verwendet, welches durch 0,03 % LAP und einer 20-sekündigen Bestrahlung bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 vernetzt wurde (Omniculture S2000, 320-500 nm). Es folgte eine Kultivierung in M7 1:1 BM bei 5 % CO_2 und 37°C . Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 67$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 200 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden. (i) zeigt die Aufnahme des Hellfelds. (ii) stellt die horizontale und (iii) die laterale Ansicht der 3D-Projektion dar. Zusätzlich sind in (ii) die Tiefenfärbungen aufgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$. In Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm.

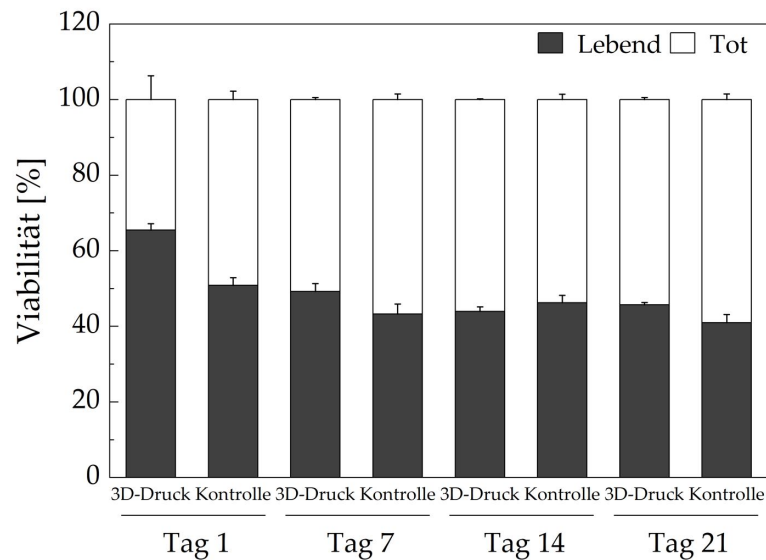


Abbildung 109: Viabilität der 3D-gedruckten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden durch Extrusions-basiertes *3D-Bioprinting* in Gitterstrukturen eingebracht. Zur Kontrolle wurden NSC ohne Verwendung von 3D-Druck in eine Gelmatrix eingebettet. Als Gelmatrix wurde 5%iges GelNB/GelS *Medium* verwendet. Die Vernetzung des Hydrogels erfolgte durch 0,03 % LAP sowie einer 20-sekündigen Bestrahlung bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² (Omnicure S2000, 320-500 nm). Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt, welche anschließend mithilfe von Fiji auf den Anteil nekrotischer und lebender Zellen quantifiziert wurden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. In Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm.

3.2.7.2 3D-Bioprinting von Neuronen auf dem vasQchip

Nachdem die Viabilität sowie die zelluläre Ausrichtung der Neuronen in einer 3D-gedruckten Struktur unter statischen Bedingungen überprüft wurde, konnte im nächsten Schritt in Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) das *3D-Bioprinting* der Neuronen auf dem vasQchip erfolgen. Hierfür wurden NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mit der Photopolymerlösung (5 % GelNB/GelS *Medium* und 0,03 % LAP) vermischt. Des Weiteren wurde eine quaderförmige 3D-Struktur gewählt, die den Mikrokanal flächenmäßig bedeckt und eine Freilegung der Anschlüsse im umgebenden Kompartiment sicherstellt. Für ein *3D-Bioprinting* im umgebenden Kompartiment, wurde der vasQchip „offen“ ohne Deckglas und Klebering (Abbildung 80 in Kapitel 3.2.3.1) bedruckt. Nachdem eine Schicht der Biotinte mithilfe von mechanischem Druck auf den Mikrokanal im vasQchip extrudiert wurde, folgte eine 20-sekündige photochemische Vernetzung durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge (320-500 nm). Anschließend wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen und mit M7 1:1 BM gefüllt. Danach erfolgte eine mikrofluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h über einen Zeitraum von 21 Tagen bei 5 % CO₂ und 37 °C. Das Schema des Druckprozesses ist in Abbildung 110 dargestellt.

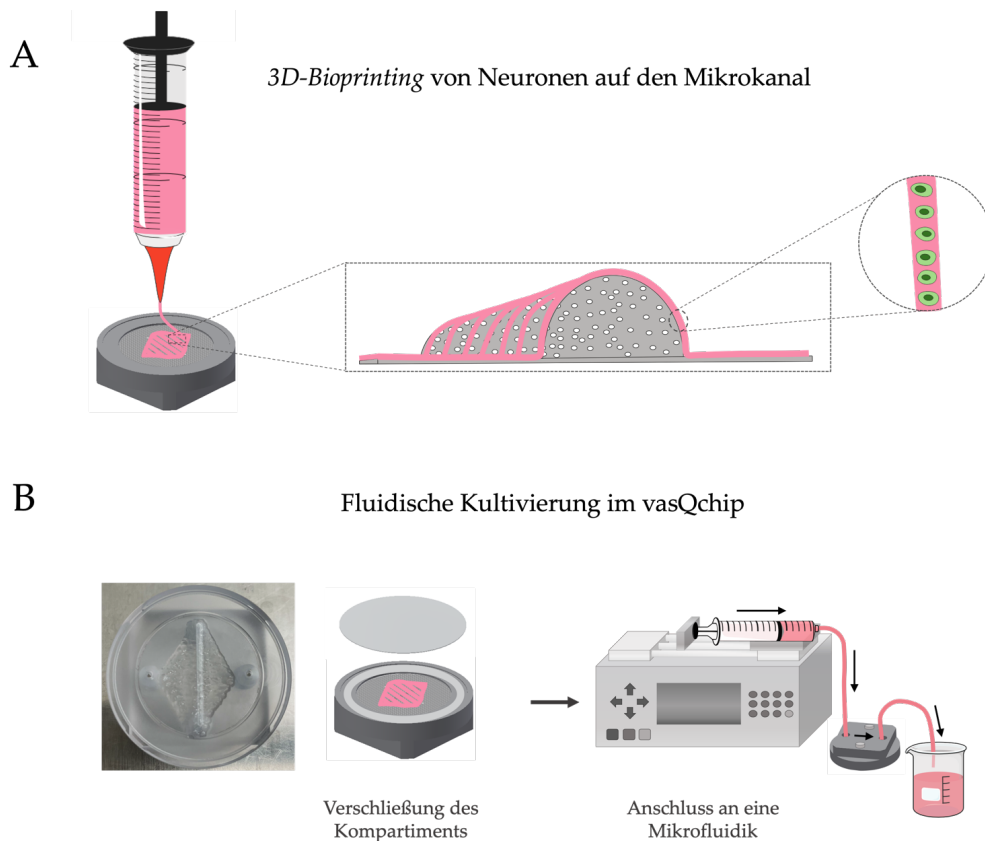


Abbildung 110: Schematische Darstellung des 3D-Bioprintings von Neuronen auf dem vasQchip. (A) Die Biotinte bestehend aus Neuronen und Gelmatrix wurde vom 3D-Bioprinter (Biospot BP) auf den Mikrokanal im umgebenden Kompartiment extrudiert. (B) Anschließend wurde durch Anbringung eines Kleberings sowie eines Deckglases das umgebende Kompartiment des vasQchips geschlossen. Das Kompartiment wurde mit M7 1:1 BM gefüllt und durch Anschluss an eine Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ mikrofluidisch kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. In Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm.

Nach erfolgtem Druckprozess und anschließender fluidischer Kultivierung wurde zur Beurteilung der Viabilität sowie der neuronalen Netzwerkbildung eine Lebend-/Tot-Färbung an Tag 1, 7, 14, und 21 durchgeführt. Die generierten 3D-Projektionen sowie Tiefenfärbungen sind Abbildung 111 zu entnehmen. In Abbildung 111(i-iii) wurde der Mikrokanal visuell gekennzeichnet. Im Vergleich zu Abbildung 108 konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der Zellen trotz Exposition der Mikrofluidik nicht gesteigert wurde. Bezüglich der zellulären Ausrichtung konnte eine stärkere Netzwerkbildung einzelner Zellen ab Tag 7 durch verschiedene Ebenen beobachtet werden. Jedoch konnte anhand der Tiefenfärbung eine Abnahme der Hydrogeldicke von 500 μm auf bis zu 250 μm festgestellt werden. Diese Degradierung könnte möglicherweise durch die verwendete Charge des Hydrogels verursacht sein. Um dieses Phänomen zu überprüfen, sollte dieser Versuch zukünftig wiederholt werden.

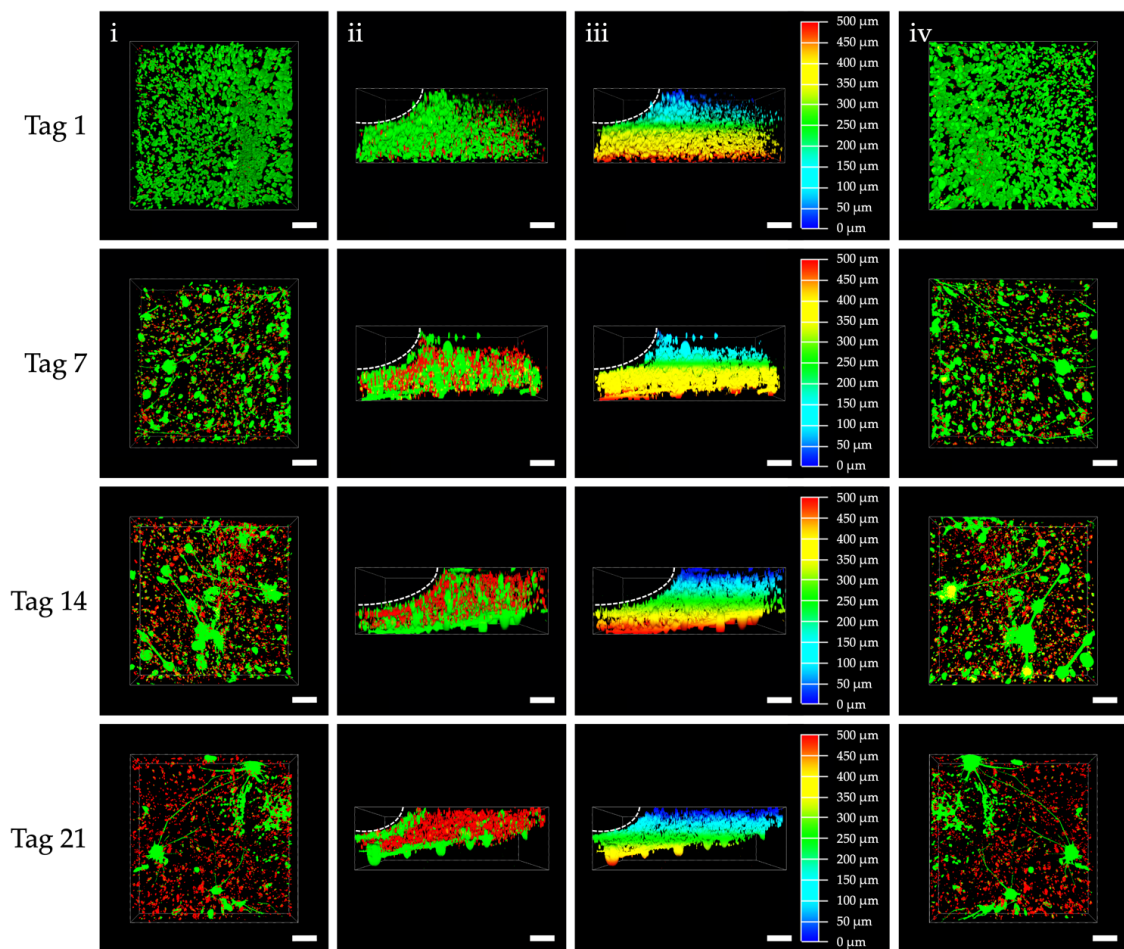


Abbildung 111: Lebend-/Tot-Färbung der 3D-gedruckten Neuronen (WTC11NGN2) im vasQchip. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml mithilfe von Extrusions-basiertem *3D-Bioprinting* in das umgebende Kompartiment des vasQchips eingebracht. Als Gelmatrix wurde 5%iges GelNB/GelS *Medium* verwendet. Eine Vernetzung wurde durch 0,03 % LAP und einer 20-sekündigen Bestrahlung bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 induziert (Omniculture S2000, 320-500 nm). Anschließend wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberings sowie Deckglas geschlossen. Es folgte eine mikrofluidische Kultivierung bei $100 \mu\text{l/h}$ in M7 1:1 BM. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. An Tag 1, 7, 14 und 21 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 167$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 500 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie Tiefenfarbungen erstellt werden. (i) zeigt die innere laterale, (ii) die horizontale und (iv) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (iii) stellt die Tiefenfarbung von (ii) dar. Der Mikrokanal ist in weiß gekennzeichnet (ii-iii). Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$. In Kollaboration mit M. Sc. A. Grimm.

3.2.7.3 Kapitelzusammenfassung *3D-Bioprinting* der Neuronen

Dieser Versuch konnte erste Erkenntnisse zum *3D-Bioprinting* von iPSC-differenzierten Neuronen auf dem vasQchip erzielen. So konnte gezeigt werden, dass durch Exposition einer Mikrofluidik im Vergleich zur statischen Kultivierung eine stärkere Ausbildung eines neuronalen Netzwerks der 3D-gedruckten Neuronen im vasQchip erzielt wurde. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der Druckprozess auf die Viabilität der Neuronen keinen signifikanten Einfluss ausübt. Daneben

konnte die Integration einer Mikrofluidik die Viabilität der eingebetteten Neuronen nicht steigern. Infolgedessen sollte die Viabilität der Neuronen zukünftig in den GelNB/GelS Hydrogelen durch Modifizierung des Hydrogels erhöht werden. Hierfür könnten verschiedene neuronale Zusätze wie B-27 oder N-2 für eine bessere Verfügbarkeit an das Photopolymer gekuppelt werden. Daneben könnte durch die Methacrylierung von Kollagen (ColMA), im Vergleich zum Kollagen I-Hydrogel ein stabileres druckbares Photopolymer synthetisiert werden, das die Ausbildung von dichten neuronalen Netzwerken fördert. Darüber hinaus ist für ein vollständiges *3D-Bioprinting* der NVU, eine Untersuchung der Viabilität sowie des Wachstumsverhaltens von HBVP, HA und HM in verschiedenen Gelmatrizes notwendig. Zukünftig könnten HBVP in einer geeigneten Gelmatrix mithilfe von Inkjet-basiertem *3D-Bioprinting* planar um den Mikrokanal eingebracht werden. Auch Kokulturen mehrerer Zelltypen simultan in einer 3D-gedruckten Schicht sind denkbar, sodass diese erfolgreich die komplexen dreidimensionalen interagierenden Netzwerkstrukturen im Gehirn abbilden können. Die Verknüpfung der *Organ-on-a-chip* Technologie mit dem *3D-Bioprinting* bietet dabei ein enormes Potential zur Rekonstruktion von dreidimensionalem vaskularisiertem Gewebe. Auch in der Literatur konnten erste Ansätze von *3D-Bioprinting* auf *Organ-on-a-chip* Systemen die Anwendungsmöglichkeiten verdeutlichen.^{14,437,445,446}

3.2.8 Modellierung der Neuroinflammation in Parkinson

Parkinson gehört zu den häufigsten neurodegenerativen Alterserkrankungen weltweit und ist bis heute nicht heilbar.¹¹⁻¹⁴ Infolgedessen stehen Modellsysteme, die neue Einblicke in die Pathogenese dieser Erkrankung auf zellulärer und molekularer Ebene ermöglichen, besonders im Fokus der Forschung. Im Folgenden wurde das in Kapitel 3.2.3 etablierte NVU-Modell inklusive Neuronen und Mikroglia gezielt so verändert, dass es das Krankheitsbild Parkinson abbilden konnte. Dabei wurde durch Zugabe von pro-inflammatorischen Zytokinen eine Neuroinflammation modelliert. Im Rahmen dieser Arbeit beinhaltete dies die Aktivierung der Mikroglia sowie den Verlust der Barrierefunktion der Endothelzellen. Zur Modellierung der Neuroinflammation wurden die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und LPS gewählt. Die Beteiligung von TNF- α und IFN- γ in inflammatorischen Prozessen von Parkinson wurde bereits zuvor in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Doch auch die Induktion einer *in vitro* Neuroinflammation wurde mithilfe von TNF- α sowie IFN- γ anhand zahlreicher Studien bestätigt.^{155,167} So konnte die Zugabe von TNF- α und IFN- γ die Aktivierung der Mikroglia sowie den Verlust von dopaminergen Neuronen *in vitro* induzieren.^{155,447,448} Neben TNF- α und IFN- γ wird auch LPS zur Modellierung der Neuroinflammation *in vitro* sowie *in vivo* verwendet.^{448,449} Das Lipopolysaccharid (LPS) ist die am häufigsten vorkommende Komponente der Zellwand in gram-negativen Bakterien und kann die Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine stimulieren.⁴⁴⁹ Mehrere Studien konnten belegen, dass eine Behandlung von Mäusen mit LPS zu einer Überaktivierung der Mikroglia sowie einem selektiven Absterben von dopaminergen Neuronen durch Neuroinflammation führt.⁴⁵⁰⁻⁴⁵²

Neben LPS, IFN- γ und TNF- α wurden für die nachfolgenden Versuche differenzierte Neuronen der iPSC-Linie HD11 (*EZ spheres* Generierung) aus Kapitel 3.2.1 eingesetzt. Die Verwendung der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen erfolgte zeitlich erst später.

3.2.8.1 Toxizität der pro-inflammatorischen Zytokine

Zur Modellierung der Neuroinflammation wurde zunächst die Toxizität der pro-inflammatorischen Zytokine untersucht. Hierbei sollte sichergestellt werden, dass hCMEC/D3, HBVP, HA und HM in den zukünftig verwendeten Zytokin-Konzentrationen lebensfähig sind.

Im Folgenden wurde ein MTT Assay zur Überprüfung der Toxizität von TNF- α , IFN- γ und LPS in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT) durchgeführt. Hierfür wurden HBVP, HA, HM, Neuronen und hCMEC/D3 mit den drei Zytokinen in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 150 ng/ml behandelt und für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Danach konnte die Viabilität mithilfe des MTT Assays ermittelt werden (Abbildung 112). Für HBVP, hCMEC/D3 und HM wurden keine signifikanten Auswirkungen der inflammatorischen Zytokine auf die Viabilität der Zellen detektiert. Dagegen zeigten die Neuronen bei einer Behandlung mit den Zytokinen eine sehr niedrige Viabilität, sodass ein LD₅₀-Wert von < 1 ng/ml erzielt wurde. In Kapitel 3.2.1.6 konnten dopaminerge Neuronen in der neuronalen Differenzierung aus *EZ spheres* nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass eine Behandlung der dopaminergen Neuronen mit den inflammatorischen Zytokinen in einem Absterben der Zellen resultiert. Doch anhand der Literatur konnte gezeigt werden, dass das Absterben von dopaminergen Neuronen nicht allein durch Zugabe von inflammatorischen Zytokinen, sondern auch durch eine simultane Kokultivierung mit überaktiven Mikroglia induziert wird.¹⁵⁵ Da die Neuronen im MTT Assay in einer Monokultur kultiviert wurden, konnte diese Aussage in diesem Versuch nicht bestätigt werden. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, sollten zukünftig weitere analytische Tests durchgeführt werden.

Des Weiteren wiesen HA eine hohe Viabilität in den verschiedenen Zytokin-Konzentrationen von LPS und TNF- α auf. Dagegen wurde in IFN- γ eine niedrigere Viabilität beobachtet, sodass bei einer Konzentration von 150 ng/ml eine Viabilität von 51,89 % ermittelt werden konnte. Da IFN- γ , neben den HA, auch die Viabilität der Neuronen am stärksten reduzierte, könnte ein ähnliches Viabilitätsverhalten auf gemeinsame Vorläuferzellen der beiden Zelltypen zurückzuführen sein.²⁹⁹ Zur Modellierung der Neuroinflammation wurden die Zytokin-Konzentrationen 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS gewählt. Diese Konzentrationen resultierten in einer hohen Viabilität der Zellen (ausgenommen der Neuronen) und wurden in der Literatur bereits mehrfach *in vitro* eingesetzt.^{167, 448}

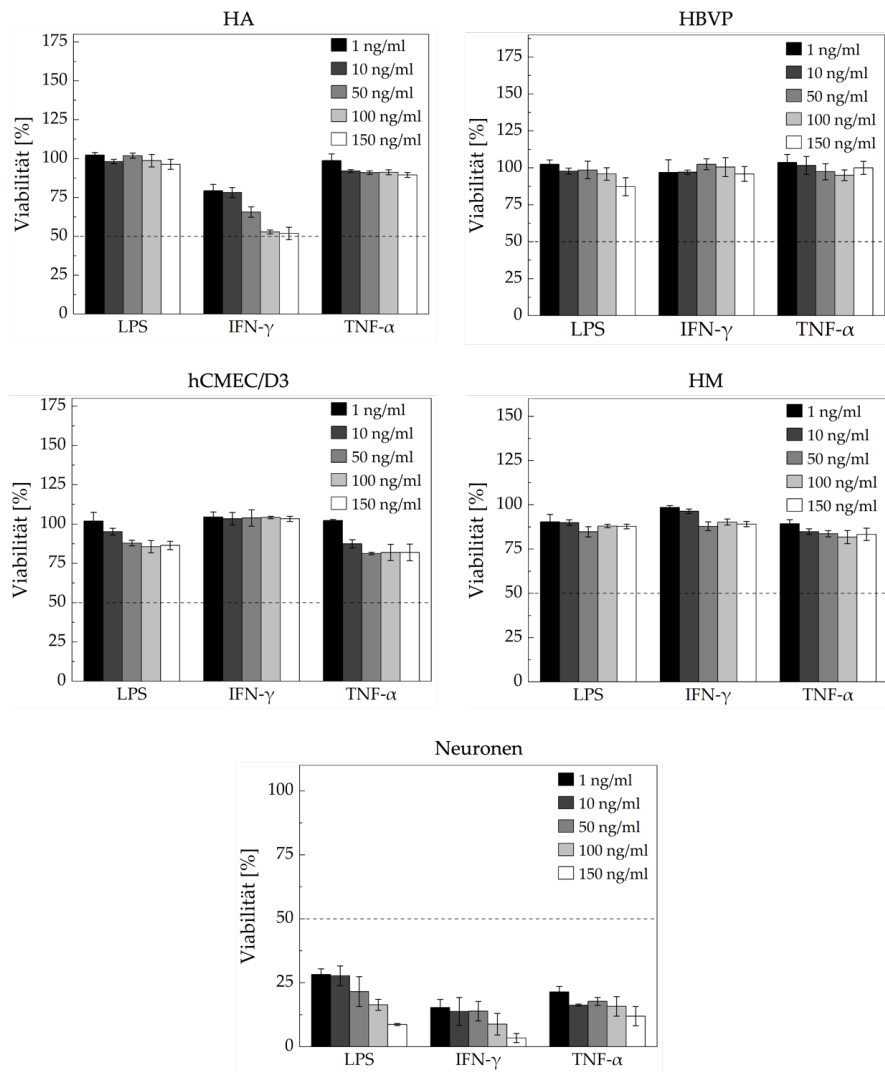


Abbildung 112: Toxizität der pro-inflammatorischen Zytokine. Für den MTT Assay wurden $1 \cdot 10^4$ NSC der iPSC-Linie HD11, HBVP, HM, HA sowie $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in Wells einer 96-Well-Platte in ihren Spezialmedien (M7 1:1 BM, PM, AM, KM) ausgesät. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit den pro-inflammatorischen Zytokinen LPS, IFN- γ sowie TNF- α . Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mithilfe des MTT Assays quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n=3$ ermittelt. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

3.2.8.2 Nachweis zelltypischer Marker unter Einfluss der Zytokine

Neben einer Überprüfung der Viabilität, war die Untersuchung der Morphologie und Ausbildung von zelltypischen Markern unter Einfluss der inflammatorischen Zytokine essentiell. Dabei sollte mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung sichergestellt werden, dass HA, HM, HBVP und Neuronen weiterhin ihre charakteristischen Marker aufweisen, um ihre Funktionalität beizubehalten. Dagegen konnten Daniels *et al.* anhand einer Immunfluoreszenzfärbung eine Abnahme der Expression des Barriere-Markers VE-Cadherin in hCMEC/D3 durch eine sechsstündige Behandlung mit TNF- α beobachten.⁴⁵³ Dieser Effekt konnte von anderen *in vitro* Untersuchungen bestätigt werden.⁴⁵⁴

Für diesen Versuch wurden hCMEC/D3, HA, HBVP, HM und Neuronen mit 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ sowie 100 ng/ml LPS für 72 h bei 5 % CO₂ und 37 °C behandelt. Analog dazu wurden als Kontrolle unbehandelte Zellen kultiviert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen zum Nachweis der zelltypischen Marker immunhistochemisch gefärbt. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung ist in Abbildung 113 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von GFAP in den HA sowie von α -SMA in den HBVP trotz Behandlung der inflammatorischen Zytokine nachgewiesen werden konnte. Jedoch konnte der von Dutra *et al.* beschriebene Effekt einer erhöhten Expression von GFAP durch Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine nicht beobachtet werden.⁴⁵⁵ Daneben wurde im Vergleich zur Kontrolle gezeigt, dass IFN- γ sowie TNF- α die Morphologie der HM beeinflussen. Ein ähnlicher Effekt konnte von Lively *et al.* bereits nach 24 h gezeigt werden, indem primäre Mikroglia aus der Ratte mit IFN- γ und TNF- α behandelt wurden. Dabei wurde eine veränderte Morphologie mit kurzen zellulären Fortsätzen in kettenartigen Gruppierungen beobachtet. Diese morphologische Veränderung weist auf eine durch inflammatorische Zytokine ausgelöste Aktivierung der Mikroglia hin.^{157,448} Eine Behandlung mit LPS dagegen führte zu runden und amöboiden zellulären Strukturen.⁴⁵⁶ Anhand Abbildung 113 konnte dieser Effekt aufgrund der hohen Konfluenz nicht mit eindeutiger Sicherheit bestätigt werden. Daher sollte dieses Phänomen im Weiteren untersucht werden. Dennoch konnte eine Expression von Iba-1 in HM in allen Proben festgestellt werden. Auch der Marker β -III Tubulin wurde ebenfalls in allen behandelten Neuronen exprimiert. Jedoch waren die neuronalen Netzwerke im Vergleich zur Kontrolle mangelhaft ausgebildet. Dieses Resultat stimmt mit dem Ergebnis des MTT Assays aus Kapitel 3.2.8.1 überein. Wie zuvor beschrieben konnte das Absterben von Neuronen durch inflammatorische Zytokine bislang nur in Kokultur mit Mikroglia beobachtet werden.¹⁵⁵ Daher sollte dies zukünftig genauer untersucht werden. Des Weiteren konnten die von Daniels *et al.* beschriebenen Effekte von TNF- α auf die Expression von VE-Cadherin in den hCMEC/D3 bestätigt werden.⁴⁵³ Jedoch konnten Daniels *et al.* den Effekt nicht durch Behandlung mit IFN- γ feststellen.⁴⁵³ Dagegen wurde in diesem Versuch eine geringere Expression von VE-Cadherin durch Behandlung mit allen drei pro-inflammatorischen Zytokinen erzielt (Abbildung 113). Hierbei wurde eine Abnahme um 24,7-67,8 % der Fluoreszenzintensität mithilfe von Fiji ermittelt. Dieses Phänomen wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kapitel 3.2.8.4 anhand von Genexpressionsanalysen genauer untersucht.

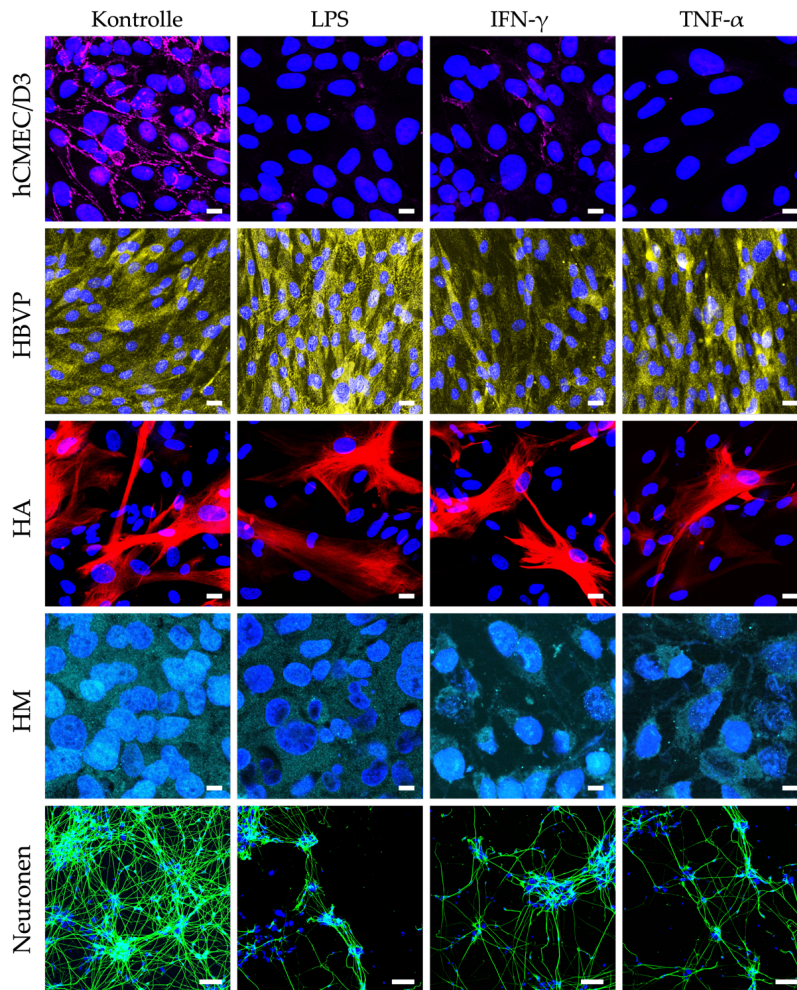


Abbildung 113: Immunfluoreszenzfärbung der NVU-Zelltypen unter Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine. Zur immunhistochemisch Färbung wurden $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 sowie $1 \cdot 10^4$ HBVP, HA, HM und NSC in Wells eines μ -Slide 8 Wells in ihren Spezialmedien eingebracht. Nach 3 h wurden die Spezialmedien durch M7 1:1 BM ersetzt. NSC wurden dabei direkt in M7 1:1 BM ausgesät und für 14 Tage ausdifferenziert. Anschließend wurden die Zellen mit den pro-inflammatorischen Zytokinen in Konzentrationen von 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS für 72 h behandelt. Daraufhin wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Es folgte eine spezifische Antikörperfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten die zellspezifischen Strukturen visualisiert werden (Leica Stellaris 5). Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Magenta: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin in hCMEC/D3. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Cyan: Immunfluoreszenzfärbung von Iba-1 in HM. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht für hCMEC/D3 und HM 10 μ m, für HA und HBVP 20 μ m und für Neuronen 100 μ m.

3.2.8.3 Aktivierung der Mikroglia

Zur Modellierung des neurodegenerativen Krankheitsbilds Parkinson ist für eine Abbildung der Neuroinflammation eine Aktivierung der Mikroglia essentiell. In den folgenden Experimenten wurde die Aktivierung der HM durch Behandlung der inflammatorischen Zytokine mithilfe eines ROS Assays sowie durch eine Genexpressionsanalyse untersucht.

3.2.8.3.1 ROS Bildung in Mikroglia

Anhand der Literatur konnte gezeigt werden, dass pro-inflammatorische Zytokine wie LPS, TNF- α und IFN- γ eine Aktivierung der Mikroglia *in vitro* und *in vivo* induzieren.^{124,161,457,458} So konnten Neniskyte *et al.* belegen, dass 50 ng/ml TNF- α sowie 100 ng/ml LPS eine Aktivierung der Mikroglia sowie ein Absterben der Neuronen induzierte.¹⁶⁷ Lively *et al.* konnten demonstrieren, dass 20 ng/ml IFN- γ *in vitro* eine Aktivierung der isolierten primären Mikroglia aus der Ratte induzieren konnten.⁴⁴⁸ Dabei korreliert die Aktivierung mit einer Bildung von ROS in den Mikroglia und trägt damit zur inflammatorischen Immunantwort bei.^{124,458} ROS sind Sauerstoff enthaltende Moleküle, häufig freie Radikale, die sehr reaktiv sind und zu oxidativem Stress in den Zellen führen können.⁴⁵⁹

Um die Aktivierung von Mikroglia durch die Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen zu untersuchen, wurde in Kooperation mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT) ein ROS Assay durchgeführt. Hierbei konnte die Bildung von ROS in den behandelten Mikroglia nachgewiesen und quantifiziert werden. Der Nachweis von ROS in den Zellen kann somit als Indiz für eine Aktivierung der Mikroglia betrachtet werden. Für diesen ROS Assay wurden HM mit den Zytokinen LPS, TNF- α und IFN- γ in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 150 ng/ml behandelt. Als Negativkontrolle (NK) wurden unbehandelte HM und als Positivkontrolle (PK) behandelte HM verwendet. Für die PK wurde der im Assay kommerziell erworbene *ROS-Inducer* verwendet. Nach einer Inkubation von 72 h wurden die Zellen zur Detektion von ROS mit einem fluoreszierenden *ROS-Label* Reagenz inkubiert. Anschließend erfolgte eine Fluoreszenzmessung der fluoreszenzmarkierten ROS (Abbildung 114).

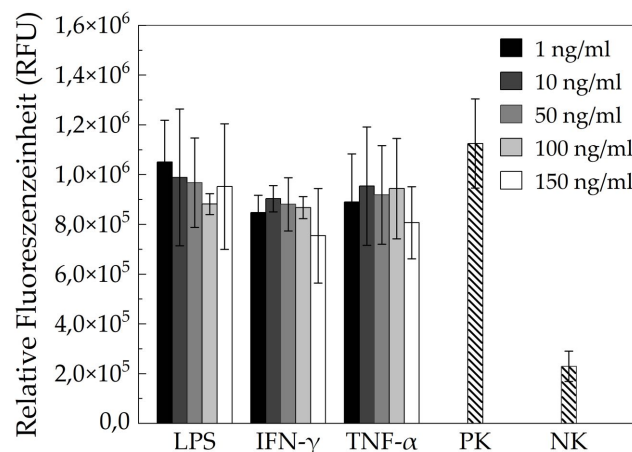


Abbildung 114: ROS Assay mit HM unter Einfluss von LPS, IFN- γ und TNF- α . 1·10⁴ HM wurden in Wells einer 96-Well-Platte in ihrem Spezialmedium MM ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit LPS, TNF- α sowie IFN- γ in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 150 ng/ml behandelt. Als Negativkontrolle (NK) wurden unbehandelte HM und als Positivkontrolle (PK) HM, welche mit einem *ROS-Inducer* behandelt wurden, verwendet. Nach 72 h wurden die Zellen zur Detektion von ROS mit einem fluoreszierenden *ROS-Label* Reagenz für 45 min inkubiert. Daraufhin konnten die fluoreszenzmarkierten ROS in den Zellen mithilfe einer Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe der pro-inflammatorischen Zytokine LPS, TNF- α und IFN- γ eine ROS-Bildung in den Mikroglia induziert. Dabei konnten zwischen den verschiedenen Konzentrationen nur geringe Abweichungen in der detektierten Fluoreszenz beobachtet werden. Dennoch liegen die Werte im Bereich der PK. Zudem konnte gezeigt werden, dass die aus Kapitel 3.2.8.1 gewählten Zytokin-Konzentrationen (50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS) zur Aktivierung der Mikroglia führen. Dagegen wurde für die NK eine vergleichsweise geringe Fluoreszenz und eine damit bis zu 78,2 % geringere ROS-Bildung detektiert. Mit diesem Versuch konnte eine erhöhte ROS-Bildung und damit eine Aktivierung der Mikroglia durch Zugabe der pro-inflammatorischen Zytokine nachgewiesen werden.

3.2.8.3.2 Expression von CD11b in Mikroglia

Neben dem ROS Assay wurde die Aktivierung der Mikroglia ebenfalls über eine Genexpressionsanalyse nachgewiesen. Anhand der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD11b in aktivierten Mikroglia hochreguliert wird.^{154,457,460} In diesem Versuch wurde die Expression des Markers CD11b in behandelten sowie unbehandelten HM untersucht. Dafür wurden HM mit den aus Kapitel 3.2.8.1 gewählten Zytokin-Konzentrationen 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS behandelt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Mikroglia verwendet. Nach 72 h wurde mithilfe der RT-qPCR die Expression von CD11b quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 115 dargestellt.

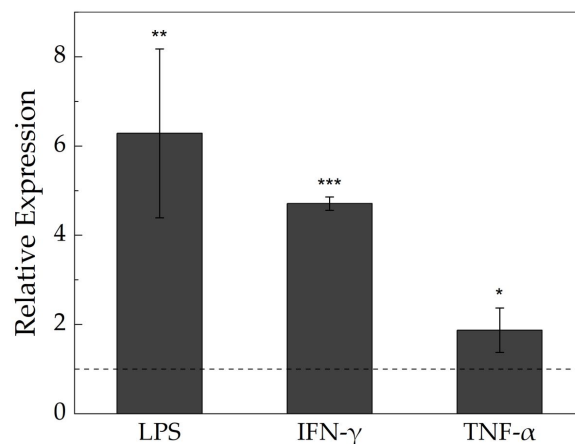


Abbildung 115: Relative mRNA-Expression von CD11b in HM unter Einfluss von LPS, IFN- γ und TNF- α . $4 \cdot 10^4$ HM wurden in Wells einer 48-Well-Platte in ihrem Spezialmedium MM ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen mit 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte HM analysiert. Nach 72 h wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression von CD11b quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die Kontrolle normiert (=1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD11b durch Behandlung der inflammatorischen Zytokine im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert wurde. Somit konnte für LPS eine 6,28-fache, für IFN- γ eine 4,71-fache und für TNF- α eine 1,87-fache Expression festgestellt

werden. Dieses Resultat deutet auf eine durch pro-inflammatorische Zytokine induzierte Aktivierung der HM hin. Auch Roy *et al.* konnten durch Behandlung mit 500 ng/ml LPS eine erhöhte Expression von CD11b in Mikroglia aus der Ratte detektieren.³⁶⁶ Dagegen konnten Mazzeo *et al.* durch Zugabe von TNF- α sowie IFN- γ eine Aktivierung von HM erzielen.³⁵⁷ Zusammenfassend konnte die Aktivierung der HM mithilfe eines ROS Assays sowie einer Expressionsanalyse von CD11b durch Behandlung mit inflammatorischen Zytokine bestätigt werden. Somit ist das Resultat mit den Erkenntnissen in der Literatur deckungsgleich und kann zur Modellierung der Neuroinflammation verwendet werden.

3.2.8.4 Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die Barriere der BBB

Es ist bekannt, dass eine Neuroinflammation neben einer Aktivierung von Mikroglia auch mit einem Verlust der Barriereintegrität in der BBB einhergeht.⁴⁶¹⁻⁴⁶³ So konnte dieser Effekt ebenfalls in Parkinsonpatienten festgestellt werden.^{461,464,154} Auch in verschiedenen *in vitro* Inflammations-Modellen wurde nachgewiesen, dass die Zugabe pro-inflammatorischer Zytokine den Verlust der Barrierefunktion der BBB sowie eine Überaktivierung der Mikroglia induziert.¹⁵⁶ So resultierte die Behandlung eines BBB-Modells mit TNF- α in einem Verlust der Barrierefunktion sowie in einer höheren Permeabilität.¹⁵⁶ Auch eine *in vivo* Injektion von LPS in Tierversuchen verringerte die Barriereintegrität, sodass Zellen der peripheren Immunantwort in das Hirngewebe eindringen konnten.¹⁵⁴ Daneben wies eine Behandlung von zerebralen Endothelzellen mit IFN- γ bereits nach 3 h eine höhere vaskuläre Permeabilität im Vergleich zur Kontrolle auf.⁴⁶⁵

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Kapitel 3.2.8.2 ein Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine auf die Ausbildung der Barriere beobachtet werden. Dabei konnte eine Abnahme der Expression des Barriere-Markers VE-Cadherin in hCMEC/D3 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Um dies genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden eine Genexpressionsanalyse und TEER-Messungen unter Einfluss der inflammatorischen Zytokine LPS, IFN- γ und TNF- α durchgeführt. Dabei sollte der in der Literatur beschriebene Verlust der Barrierefunktion des etablierten NVU-Modells sowohl im Transwell-System als auch im vasQchip untersucht werden. Für eine Untersuchung im Transwell-System wurde das NVU-Modell nach Kapitel 3.2.2 vorbereitet. 3 h nach Einbringung der hCMEC/D3 wurde das NVU-Modell durch apikale Zugabe von inflammatorischen Zytokinen behandelt. Hierbei wurden in drei getrennten Ansätzen die bereits zuvor verwendeten Zytokin-Konzentrationen 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS eingesetzt. Es folgte eine Behandlung über 7 Tage bei 5 % CO₂ und 37 °C in M7 1:1 BM. Dabei wurde an Tag 2, 3, 4, 5 und 7 nach der Behandlung der hCMEC/D3 eine TEER-Messung durchgeführt. Als Kontrolle fungierte ein unbehandeltes NVU-Modell. Analog dazu wurde nach erfolgter TEER-Messung mithilfe der RT-qPCR an Tag 7 die Expression spezifischer Barriere-Marker quantifiziert. Die Ergebnisse der relativen Expression sowie der TEER-Messungen sind in Abbildung 116 dargestellt.

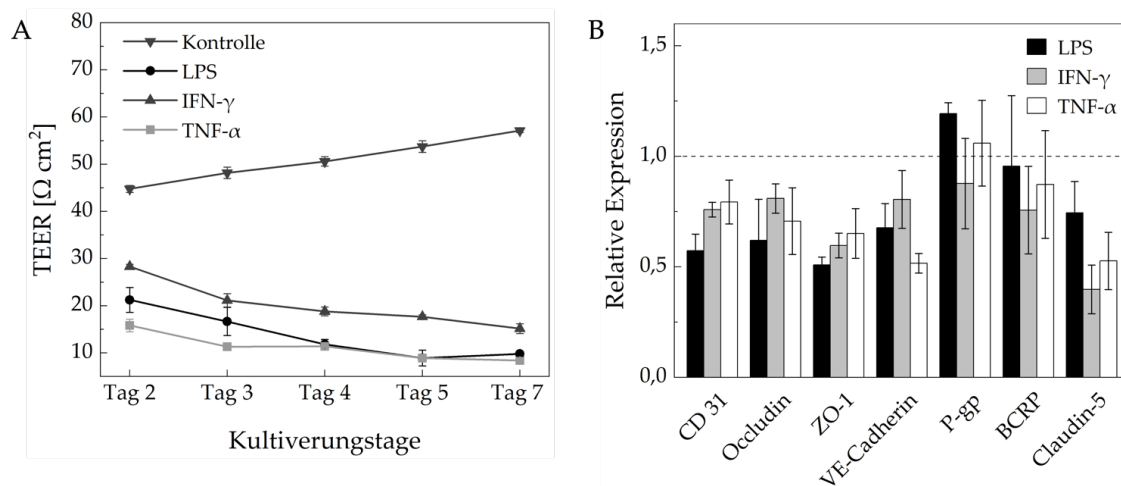


Abbildung 116: Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine LPS, IFN- γ und TNF- α auf die Barriere der hCMEC/D3 im etablierten NVU-Modell im Transwell-System. Das Transwell-System wurde apikal mit 0,1 mg/ml und basal mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Es folgte eine Besiedlung mit $2 \cdot 10^4$ HBVP in KM. Um das Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran zu gewährleisten, wurde das Transwell für 3 h um 180° gedreht positioniert. Am nächsten Tag folgte eine Einbringung von $2 \cdot 10^4$ HA und $0,4 \cdot 10^4$ HM nach demselben Prinzip in KM. 24 h später wurde eine Beschichtung mit Matrigel hESC im basalen Kompartiment durchgeführt und $0,6 \cdot 10^4$ NSC basal auf die PC-Membran in M7 1:1 BM nach demselben Prinzip ausgesät. Es erfolgte eine Kultivierung in M7 1:1 BM bei 5 % CO₂ und 37 °C. Nach 7 Tagen konnten $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 apikal eingebracht werden. 3 h nach Einbringung der hCMEC/D3 erfolgte eine Behandlung mit 50 ng/ml TNF- α , 20 ng/ml IFN- γ und 100 ng/ml LPS. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Anschließend erfolgte an Tag 2, 3, 4, 5 und 7 (nach Behandlung der hCMEC/D3) eine TEER-Messung. Nach erfolgter TEER-Messung wurde an Tag 7 die RNA der hCMEC/D3 isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression spezifischer Barriere-Marker quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). (A) zeigt die ermittelten TEER-Werte normiert auf die Kultivierungsfläche (0,33 cm²) und (B) die relative mRNA-Expression spezifischer Barriere-Marker an Tag 7. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt.

Anhand der TEER-Messung konnte bereits an Tag 2 im Vergleich zur Kontrolle ($44,77 \pm 0,72 \Omega \text{ cm}^2$) eine Abnahme der Barriereintegrität durch eine Behandlung mit den pro-inflammatorischen Zytokinen beobachtet werden. Dabei wurden TEER-Werte von $21,25 \pm 2,64 \Omega \text{ cm}^2$ (LPS), $28,32 \pm 0,46 \Omega \text{ cm}^2$ (IFN- γ) und $15,82 \pm 1,33 \Omega \text{ cm}^2$ (TNF- α) ermittelt. Ab Tag 2 konnte eine weitere Abnahme der Barriereintegrität der hCMEC/D3 ermittelt werden, sodass an Tag 7 TEER-Werte von $9,80 \pm 0,51 \Omega \text{ cm}^2$ (LPS), $15,24 \pm 1,03 \Omega \text{ cm}^2$ (IFN- γ) und $8,39 \pm 0,31 \Omega \text{ cm}^2$ (TNF- α) bestimmt wurden. Damit konnte eine Abnahme der Barrierefunktion in den hCMEC/D3 durch Behandlung der Zytokine bestätigt werden. Ähnliche Resultate erzielten Rahman *et al.* sowie Daniels *et al.*^{453,465} Hierbei wurde ebenfalls eine Abnahme der TEER-Werte von hCMEC/D3 sowie anderer zerebraler Endothelzellen in Kokultur mit anderen NVU-Zelltypen im Transwell-System durch Behandlung der Zytokine IFN- γ sowie TNF- α festgestellt.^{453,465} Anhand der erzielten Resultate der Genexpressionsanalyse konnte an Tag 7 im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Expression von CD31, Occludin, VE-Cadherin, ZO-1, Claudin-5 sowie der Efflux-Pumpe BCRP unter Einfluss der inflammatorischen Zytokine beobachtet werden. Dieses Resultat bestätigt die Ergebnisse der TEER-Messung. Jedoch konnte eine leichte Zunahme der Expression von P-gp im

mit LPS ($1,19 \pm 0,05$) sowie TNF- α ($1,05 \pm 0,19$) behandelten NVU-Modell detektiert werden. Eine Zunahme der Expression von P-gp in hCMEC/D3 aufgrund einer Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen konnte bereits von Poller *et al.* gezeigt werden.⁴⁶⁶ Hierbei wird vermutet, dass der Transporter P-gp dem Verlust der Barrierefunktion durch den aktiven Abtransport unerwünschter Moleküle entgegenwirkt, was in einer erhöhten Expression resultiert.⁴⁶⁶

Im nächsten Schritt wurde die Barriereintegrität im etablierten NVU-Modell im vasQchip aus Kapitel 3.2.3 unter inflammatorischer Bedingung untersucht. Hierfür wurde ein NVU-Modell aus hCMEC/D3, HBVP, HA, HM und Neuronen im vasQchip nach Kapitel 3.2.3 rekonstruiert. 3 h nach der Besiedlung mit hCMEC/D3 wurde das NVU-Modell durch Zugabe des inflammatorischen Zytokins TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml über den Mikrokanal behandelt. Da die Anzahl der vasQchips aufgrund der Spritzenpumpe für diesen Versuch limitiert war, wurde das Zytokin TNF- α gewählt, da dieses in der Literatur sowie in den vorherigen Versuchen die größten Effekte erzielte. Das Zytokin wurde in der entsprechenden Konzentration in M7 1:1 BM in die Spritzen eingebracht und es folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h über einen Zeitraum von 7 Tagen. Für eine Kontrolle wurden unbehandelte NVU-Modelle im vasQchip verwendet, die unter identischen Parametern kultiviert wurden. Am Tag 7 konnte eine Quantifizierung der Expression erfolgen. Das Ergebnis ist in Abbildung 117 dargestellt. Es konnte im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Expression von CD31 mit $0,76 \pm 0,20$, Occludin mit $0,58 \pm 0,11$, ZO-1 mit $0,58 \pm 0,11$, VE-Cadherin mit $0,67 \pm 0,24$, BCRP mit $0,82 \pm 0,03$ und Claudin-5 mit $0,46 \pm 0,18$ detektiert werden. Dieses Resultat stimmt mit den Ergebnissen aus Abbildung 116 im Transwell-System überein. Eine Abnahme der Expression verschiedener Barriere-Marker durch die Einwirkung inflammatorischer Zytokine konnte bereits anhand zahlreicher Untersuchungen in der Literatur bestätigt werden.⁴⁶⁷ So konnten Poller *et al.* nachweisen, dass eine Behandlung der hCMEC/D3 mit TNF- α in Kokultur mit Astrozyten in einer Abnahme der BCRP-Expression resultiert.⁴⁶⁶ Auch Kebir *et al.* waren in der Lage durch Zugabe eines pro-inflammatorischen Zytokins die verminderte Expression der *Tight Junction*-Proteine ZO-1 und Occludin in zerebralen Endothelzellen zu belegen.⁴⁶⁸ Zudem konnten Camire *et al.* und Christofidou-Solomidou *et al.* eine Abnahme der Expression des *Tight Junction*-Proteins Claudin-5 sowie des *Junction*-assoziierten Proteins CD31 durch Behandlung mit TNF- α in zerebralen Maus-Endothelzellen feststellen.^{469,470} Ähnliche Resultate erzielten Achyuta *et al.* in einem NVU-Modell aus Endothelzellen, Astrozyten, Neuronen und Mikroglia in einem *Organ-on-a-chip* System durch Behandlung mit TNF- α .¹⁷⁶ Verglichen mit der Genexpressionsanalyse im Transwell-System konnte auch hier eine erhöhte Expression der Transporter-Pumpe P-gp mit $1,27 \pm 0,24$ detektiert werden. Wie zuvor erläutert, wurde dieses Phänomen bereits von Poller *et al.* beschrieben.⁴⁶⁶

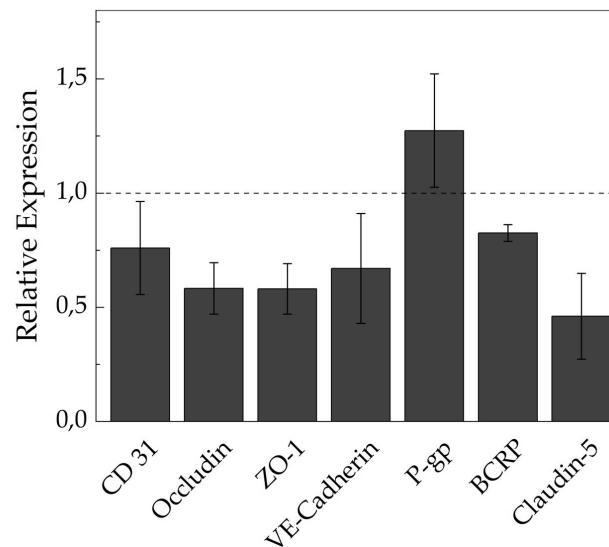


Abbildung 117: Relative mRNA-Expression essentieller Barriere-Marker in hCMEC/D3 im etablierten NVU-Modell im vasQchip unter Einfluss von TNF- α . Für eine Besiedlung des umgebenden Kompartiments wurde die PC-Membran mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtet. Daraufhin wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht. 24 h später wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC (Verdünnung 1:100) beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Anschließend erfolgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurde der Mikrokanal mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Nach 3 h erfolgte eine Behandlung mit TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/ml in M7 1:1 BM unter mikrofluidischen Bedingungen bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Zur Kontrolle wurde ein unbehandeltes Kokultur-Modell verwendet. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Nach 7 Tagen wurde die RNA der hCMEC/D3 isoliert, in cDNA transkribiert und mithilfe der farbstoffbasierten RT-qPCR die Expression Barriere-relevanter Proteine quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Die erhaltenen Resultate wurden anhand der $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die Kontrolle normiert (= 1). Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ gekennzeichnet.

3.2.8.5 Kapitelzusammenfassung Modellierung der Neuroinflammation in Parkinson

In diesem Kapitel konnte der Verlust der Barrierefunktion durch Behandlung mit pro-inflammatorischen Zytokinen im Transwell-System sowie im vasQchip mithilfe von TEER-Messungen und einer Genexpressionsanalyse nachgewiesen werden. Somit konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung aus Kapitel 3.2.8.2 bestätigt werden. Darüber hinaus stimmte das Resultat mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein. Zudem konnte in Kapitel 3.2.8.3 eine Aktivierung der Mikroglia durch Zugabe der pro-inflammatorischen Zytokine detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Modellierung der Neuroinflammation in den etablierten NVU-Modellen im Transwell sowie im vasQchip prinzipiell möglich ist. Jedoch wurde hierbei der Fokus lediglich auf die Aktivierung der Mikroglia sowie dem Funktionsverlust der BBB gelegt. So wurde in den behandelten NVU-Modellen im vasQchip und Transwell weder eine Aktivierung der Mikroglia noch ein Absterben der Neuronen aktiv nachgewiesen. Zukünftig sollte dies überprüft werden. Darüber hinaus gehen *in vivo* mit einer Neuroinflammation weitaus mehr zelluläre inflammatorische Prozesse einher wie die Rekrutierung verschiedener

Immunzellen aus dem zerebralen peripheren Blutgefäß. Daher muss hierbei beachtet werden, dass eine vollständige Abbildung der Neuroinflammation in Parkinson ein hochgradig komplexes System erfordert, mit dem es möglich ist, die Zusammenhänge zwischen den Zelltypen der NVU einschließlich der BBB sowie der peripheren Immunantwort korrekt abzubilden. Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals wichtige Erkenntnisse erbracht werden, die als Basis für ein solch komplexes System fungieren können. In ferner Zukunft könnten derartige Modelle neue Einblicke in die Pathogenese der Neuroinflammation ermöglichen und damit zur Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten beitragen.

3.2.9 Wirkstofftestung im vasQchip zur Behandlung von Parkinson

Organ-on-a-chip Systeme liegen heutzutage im Fokus der Forschung.^{471,472} Solche Systeme ermöglichen eine *in vitro* Rekonstruktion verschiedener Barrieren des menschlichen Körpers. Es ist bekannt, dass nur etwa 2 % der arzneilichen Wirkstoffe die BBB im Gehirn überwinden können.^{86,87} Damit haben zukünftige *in vitro* BBB-Modelle mit derartigen *in vivo* ähnlichen Barriereigenschaften das Potential neue Wirkstoffkandidaten zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zu validieren.^{72,472} Dabei kann spezifisch die Penetration von therapeutischen Wirkstoffen durch die dichte Barriere der BBB in das umliegende Hirngewebemodell untersucht werden. In den folgenden Kapiteln wurde das etablierte BBB-Modell im *Organ-on-a-chip* System vasQchip auf seine Eignung als Testsystem für therapeutische Wirkstoffe überprüft. Der Fokus lag dabei auf der Behandlung der neurodegenerativen Erkrankung Parkinson. Daher wurden im Folgenden Parkinson-relevante Wirkstoffe getestet.

3.2.9.1 Testung von Wirkstoffen zur Therapie von Parkinson im vasQchip

Um das etablierte NVU-Modell im vasQchip aus Kapitel 3.2.3 zukünftig als Wirkstoff-Testsystem einsetzen zu können, ist es von Bedeutung die Barrierefunktion einer *in vivo* BBB naturgetreu imitieren zu können. Hierbei ist es wichtig, dass das Barriere-Modell ein *in vivo* ähnliches Permeabilitätsverhalten sowie die damit verbundene Kontrollfunktion im vasQchip reproduzieren kann. Dafür wurden die Parkinson-relevanten Wirkstoffe Carbidopa und Levodopa eingesetzt (Abbildung 118).

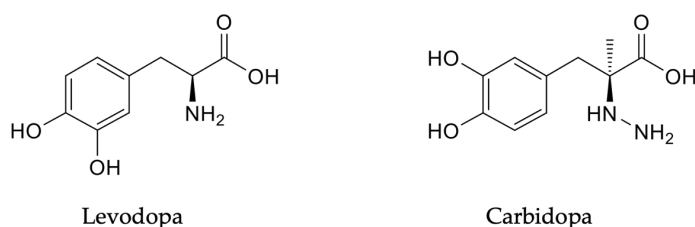


Abbildung 118: Strukturformel von Levodopa und Carbidopa.

Der Wirkstoff Levodopa war der erste und erfolgreichste Durchbruch zur Behandlung von Parkinson und wird seit fast 50 Jahren zur Therapie oral verwendet.^{473,474} Dabei kann Levodopa als Vorstufe von Dopamin *in vivo* die BBB überwinden und nach der Verstoffwechslung das Defizit des Dopamins im ZNS ausgleichen.^{474,475} Um einen vorzeitigen Abbau von Levodopa vor Erreichen des Zielgewebes zu verhindern, wird der Wirkstoff in Kombination mit dem Decarboxylase-Inhibitor Carbidopa verabreicht.^{473,475} Im Gegensatz zu Levodopa ist Carbidopa als Decarboxylase-Inhibitor nicht in der Lage die BBB zu überwinden.⁴⁷³ Der folgende Versuch beruhte auf dem charakteristischen Penetrationsverhalten der beiden Wirkstoffe. Hierbei wurde überprüft, ob Levodopa fähig ist die Barriere im NVU-Modell zu überwinden und zum anderen ob die Barriere eine Penetration von Carbidopa erlaubt. Das Ergebnis sollte zeigen, ob die Barriere des etablierten BBB-Modells in der Lage ist, die selektive Permeabilität der *in vivo* BBB zu repräsentieren.

Da eine Integration der Neuronen und Mikroglia zeitlich erst später erfolgte, wurde ein BBB-Modell inklusive hCMEC/D3, HBVP und HA verwendet. Bevor der Versuch durchgeführt werden konnte, wurde zuvor die Viabilität der Zellen mithilfe eines MTT Assays in unterschiedlichen Konzentrationen von Carbidopa sowie Levodopa untersucht. Die Durchführung des MTT Assays erfolgte in Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder (Masterstudentin, IFG, KIT). Hierfür wurden HBVP, HA sowie hCMEC/D3 mit Carbidopa und Levodopa in Konzentrationen von 1 μM , 20 μM , 60 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM und 2000 μM behandelt. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung der Viabilität. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 119 dargestellt. Es konnte in allen drei Zelltypen eine stark abnehmende Viabilität bei einer Wirkstoff-Konzentration von 500 μM beobachtet werden. Somit konnten LD₅₀-Werte von 194,83 μM für hCMEC/D3, 154,93 μM für HBVP und 144,56 μM für HA bei einer Behandlung mit Carbidopa ermittelt werden. Bei einer Behandlung mit Levodopa wurden LD₅₀-Werte von 326,34 μM für hCMEC/D3, 268,76 μM für HBVP und 600,54 μM für HA festgestellt. Ein ähnliches Viabilitätsverhalten konnte in der Literatur bei Neuronen detektiert werden, sodass bereits eine Levodopa-Konzentration ab 200 μM die Viabilität von Neuronen um 30-40 % reduzieren konnte.⁴⁷⁶ Zur Therapie von Parkinson wird kommerziell ein Levodopa-Carbidopa-Verhältnis von 4:1 verwendet.^{477,478} Daher wurden die Wirkstoff-Konzentrationen 100 μM Levodopa und 25 μM Carbidopa gewählt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Konzentrationen keinen großen Einfluss auf die Zellviabilität ausüben.

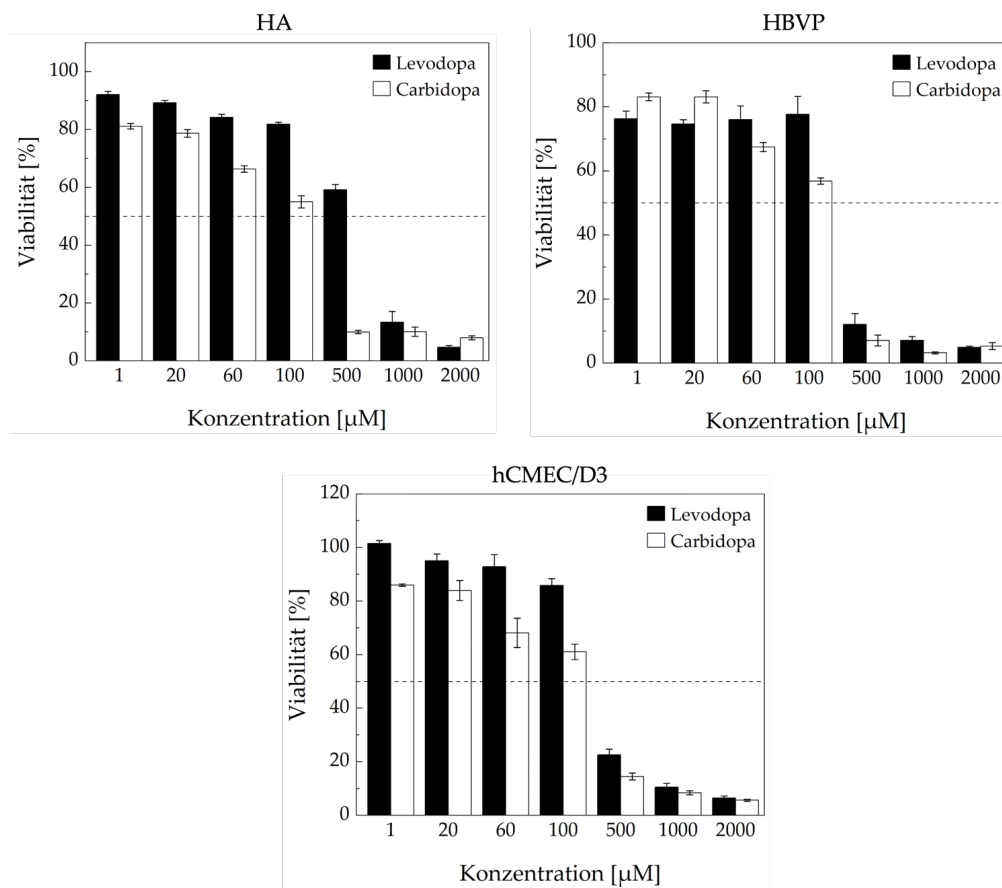


Abbildung 119: Toxizität der Wirkstoffe Levodopa und Carbidopa. Für den MTT Assay wurden $1 \cdot 10^4$ HBVP, HA sowie $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in Wells einer 96-Well-Platte in ihren Spezialmedien PM, AM und KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Behandlung mit Levodopa und Carbidopa. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mithilfe des MTT Assays quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. In Kollaboration mit B. Sc. K. Stauder.

Nachdem geeignete Konzentrationen von Levodopa und Carbidopa zur Wirkstofftestung im vasQchip ermittelt werden konnten, wurde ein Kokultur-Modell aus hCMEC/D3, HBVP und HA, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, in die vasQchips eingebracht. Es folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$ in M7 1:1 BM. Nach 7 Tagen war das BBB-Modell vollständig ausgebildet. Anschließend wurden $25 \mu\text{M}$ ($6,106 \cdot 10^3 \text{ ng/ml}$) Carbidopa und $100 \mu\text{M}$ ($1,9719 \cdot 10^4 \text{ ng/ml}$) Levodopa zusammen mit M7 1:1 BM in die Spritzen der Spritzenpumpe gefüllt und für 8 h durch den Mikrokanal des vasQchips gepumpt. Dabei wurde das Medium aus dem Mikrokanal in einem Reaktionsgefäß aufgefangen (Abbildung 120).

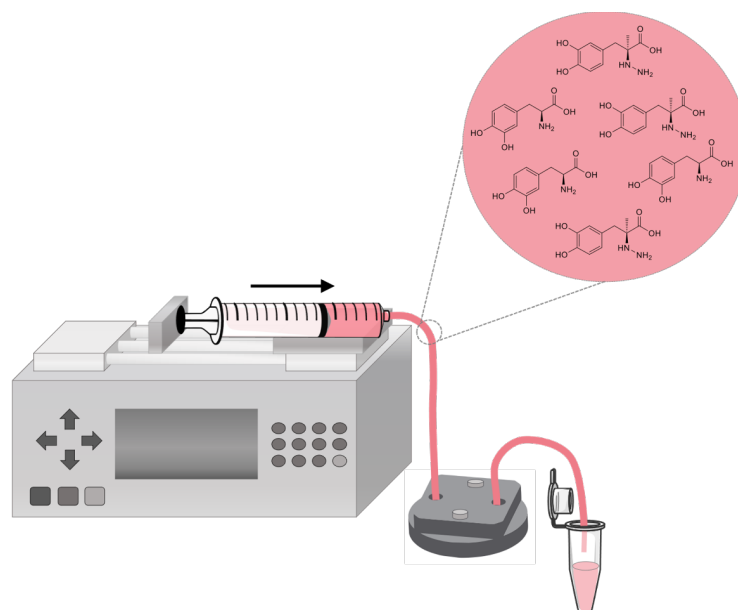


Abbildung 120: Versuchsaufbau der Wirkstofftestung mit Carbidopa und Levodopa im BBB-Modell im fluidischen vasQchip.

Um die Penetration der Wirkstoffe zeitlich zu verfolgen, wurden nach 2 h, 4 h und 8 h Proben aus dem Mikrokanal sowie aus dem umgebenden Kompartiment entnommen. Levodopa und Carbidopa weisen weder einen Fluorophor noch eine Eigenfluoreszenz auf. Daher wurde zur Ermittlung der Konzentration im Mikrokanal sowie im umgebenden Kompartiment in Kollaboration mit Dipl.-Ing. F. Kirschhöfer (IFG, KIT) eine Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (*Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 121 dargestellt. Hierbei sind die ermittelten Wirkstoff-Konzentrationen im Mikrokanal, im umgebenden Kompartiment sowie die Gesamtkonzentration über die Zeit aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass Levodopa die Barriere der hCMEC/D3 im vasQchip überwinden konnte. Nach 2 h wurde eine Konzentration von $3,03 \cdot 10^3$ ng/ml im umgebenden Kompartiment detektiert. Jedoch ist eine ca. 89,1%ige Abnahme der Gesamtkonzentration mit zunehmender Zeit zu beobachten, sodass diese nach 8 h bei $2,15 \cdot 10^3$ ng/ml lag. Darüber hinaus konnte Carbidopa in diesem Versuch nicht detektiert werden. Da die Carbidopa-Konzentration jedoch zum Zeitpunkt $t = 0$ h ermittelt werden konnte, lässt dies einen Abbau des Wirkstoffs vermuten. Es ist bekannt, dass Carbidopa gegenüber Oxidationsreaktionen anfällig reagiert.^{479,480} Es wurde zwar teilweise mit einer Schutzatmosphäre aus Stickstoff gearbeitet, um die Proben vor Sauerstoff aus der Luft zu schützen, jedoch war dies nicht im ganzen Versuchsaufbau möglich. Möglicherweise könnte dies den Abbau von Carbidopa erklären. Da Carbidopa als Decarboxylase-Inhibitor nicht mehr vorhanden war, könnte der Abbau von Levodopa durch Decarboxylasen ermöglicht worden sein. Bereits in der Literatur wurde die Anfälligkeit von Levodopa auf Decarboxylasen umfassend beschrieben.^{479,480} Zur weiteren Überprüfung der Vermutungen wird eine Wiederholung des Versuchs nahegelegt.

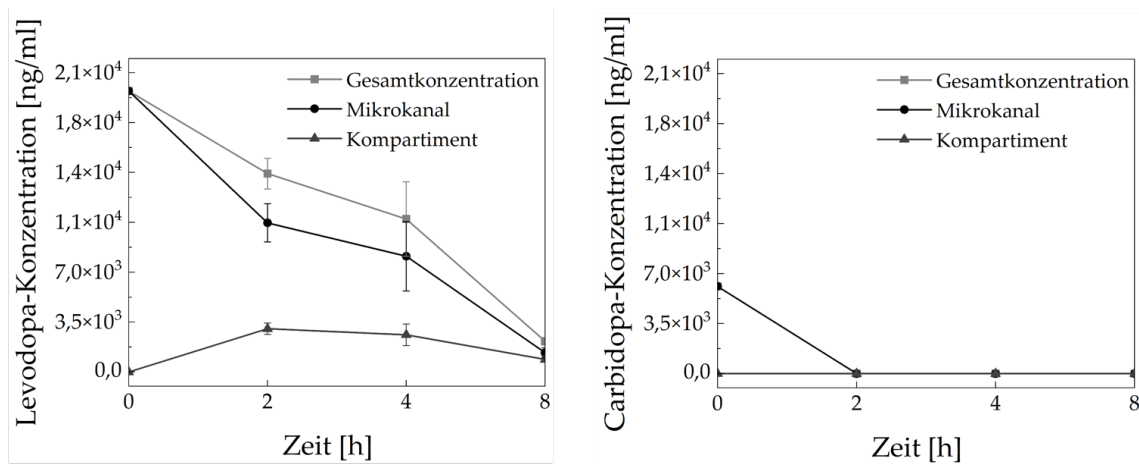


Abbildung 121: LC-MS/MS der Wirkstofftestung von Levodopa und Carbidopa im BBB-Modell des vasQchips. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA in KM auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht. Am Folgetag wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Es folgte eine fluidische Kultivierung in M7 1:1 BM bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen war das BBB-Modell vollständig ausgebildet. Daraufhin wurden die Spritzen mit $25 \mu\text{M}$ ($6,106 \cdot 10^3 \text{ ng/ml}$) Carbidopa und $100 \mu\text{M}$ ($1,9719 \cdot 10^4 \text{ ng/ml}$) Levodopa in M7 1:1 BM gefüllt und es folgte eine mikrofluidische Inkubation von 8 h bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$. Dabei wurde das Medium aus dem Mikrokanal in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Eine Probenentnahme erfolgte nach 2 h, 4 h sowie 8 h aus dem Mikrokanal sowie aus dem umgebenden Kompartiment, um die Penetration der Wirkstoffe zeitlich zu verfolgen. In Kollaboration mit Dipl.-Ing. F. Kirschhöfer wurde die Konzentration der Wirkstoffe im umgebenden Kompartiment mithilfe einer LC-MS/MS ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt.

Da Levodopa in das umgebende Kompartiment penetrieren konnte, wurde das Endothel im Mikrokanal auf seine Konfluenz überprüft. Dabei sollte untersucht werden, ob die Zellschicht homogen und lückenlos vorliegt, um eine unspezifische Penetration von Levodopa auszuschließen. Dafür wurden die Zellen in den vasQchips nach der Wirkstoffuntersuchung mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Zur Überprüfung der Konfluenz der hCMEC/D3 im Mikrokanal wurde der Barriere-Marker CD31 und für HA der Astrozytenmarker GFAP sowie für HBVP der Perizytenmarker α -SMA verwendet. Mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde ein *TileScan* in einer Höhe von $350 \mu\text{m}$ durchgeführt. Dies ermöglichte eine Betrachtung des nahezu gesamten Mikrokanals. Die generierte 3D-Projektion sowie Tiefenfärbung ist in Abbildung 122 dargestellt. Es konnte ein konfluenter Endothelzelllayer im Mikrokanal sowie eine HA/HBVP-Zellschicht im umgebenden Kompartiment beobachtet werden. Damit konnte ein Eindringen von Levodopa in das umgebende Kompartiment aufgrund eines löchrigen Endothelzelllayers ausgeschlossen werden.

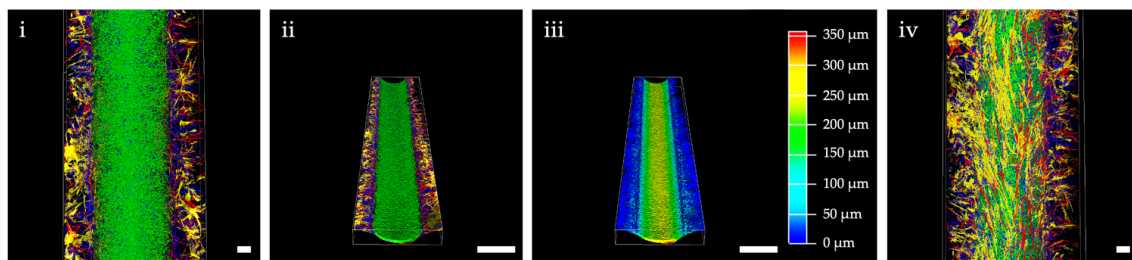


Abbildung 122: Immunfluoreszenzfärbung des BBB-Modells aus hCMEC/D3, HBVP und HA im vasQchip nach erfolgter Wirkstofftestung. Für die Besiedlung des mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichteten umgebenden Kompartiments wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP in KM ausgesät. Ein Tag später erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA in KM auf die ausgebildete Perizyten-Zellschicht. 24 h später wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Daraufhin erfolgte eine fluidische Kultivierung in M7 1:1 BM bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurde das BBB-Modell zur Wirkstofftestung mit 25 μ M Carbidopa und 100 μ M Levodopa in M7 1:1 BM für 8 h behandelt. Zur Beurteilung der Konfluenz der Zellschicht wurden die Zellen für eine Immunfluoreszenzfärbung fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Daraufhin konnte eine spezifische Antikörperfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker durchgeführt werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 visualisiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 119$, Abstand = 3 μ m, $h = 350$ μ m, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie Tiefenfärbungen erstellt werden. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3. (i) zeigt die innere, (ii) die horizontale und (iv) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektion. (iii) stellt die Tiefenfärbung der horizontalen Ansicht (ii) dar. Der Maßstabsbalken für (i) und (iv) entspricht 200 μ m, für (ii) und (iii) 1 mm.

3.2.9.1.1 Kapitelzusammenfassung Testung von Wirkstoffen zur Therapie von Parkinson im vasQchip

Anhand der Ergebnisse dieses Versuches wurde eine Penetration von Levodopa durch die Barriere der hCMEC/D3 in das umgebende Kompartiment detektiert. Gleichzeitig konnte aufgrund der Degradierung von Carbidopa nicht gezeigt werden, dass Carbidopa unfähig ist die Barriere des Kokultur-Modells zu überwinden. Damit konnte eine *in vivo* ähnliche Funktionalität des BBB-Modells inklusive HA und HBVP im vasQchip zunächst nur teilweise validiert werden. Jedoch wurden mit diesem Versuch erste wichtige Erkenntnisse gewonnen, die für strukturelle Anpassungen des vasQchips als Testsystem für Wirkstoffe fungieren.

Zukünftig könnte eine *in vivo* ähnliche Permeabilität des Barriere-Modells neben Levodopa und Carbidopa mit anderen Stoffen wie Mannitol (nur 2 % BBB-gängig) oder Metoprolol (BBB-gängig) untersucht werden.^{481,482} Hierfür sollte das vollständig etablierte NVU-Modell aus Kapitel 3.2.3 inklusive Neuronen und Mikroglia zur Wirkstofftestung eingesetzt werden.

3.2.9.2 Transport von Dopamin beladenem Nanogel im vasQchip

Nur 1 % des oral eingenommen Levodopa erreicht aufgrund der Decarboxylierung zu Dopamin das Gehirn. Daher wird Levodopa in Kombination mit dem Decarboxylase-Inhibitor Carbidopa verabreicht, wodurch die Verfügbarkeit im Gehirn um den Faktor 10 erhöht wird.⁴⁷⁴ Jedoch konnten klinische Studien belegen, dass Carbidopa in Kombination mit Levodopa häufig gastrointestinale Nebenwirkungen in Parkinson-Patienten auslöst.^{474,483,484} Zudem konnte gezeigt

werden, dass 75 % der Parkinson-Patienten durch eine regelmäßige Einnahme von Levodopa nach vier bis sechs Monaten Dyskinesien entwickeln.^{2, 473} Darüber hinaus wurde eine Wirksamkeit von Levodopa nach 2 Jahren Behandlung nur noch bei 20 % der Parkinson Patienten nachgewiesen.⁴⁷³ Dennoch wird Levodopa in Kombination mit Carbidopa als Goldstandard zur Behandlung von Parkinson verwendet.^{473,485} Inzwischen gibt es zahlreiche Untersuchungen zu alternativen Behandlungsmethoden. Dazu zählen nanopartikuläre *Drug-Delivery*-Systeme.^{159,486} Diese nanoskaligen Systeme erlauben einen zielgerichteten Transport verschiedener Wirkstoffe in ein Gewebe.^{486,487} Durch Integration der Wirkstoffe in den nanopartikulären *Drug-Delivery*-Systemen, ist es möglich diese vor einem unerwünschten Abbau zu schützen und potentielle Nebenwirkungen zu verhindern.^{486,487} Dabei ermöglicht eine Modifizierung der Oberfläche durch verschiedene Moleküle einen zielgerichteten Transport in das gewünschte Organ oder Gewebe. Des Weiteren sind nanopartikuläre *Drug-Delivery*-Systeme dafür bekannt sehr dichte Barrieren wie die BBB zu überwinden.^{488,489} Ein besonderes Augenmerk liegt auf den Nanogelen, welche in ihren grundlegenden Strukturen den Hydrogelen ähneln.^{487,490,491} Aufgrund ihrer hohen Wasserkapazität, biologischen Abbaubarkeit und Biokompatibilität finden Nanogele immer häufiger Verwendung.^{487,491} Zudem können Nanogele in Zellen durch Peptidasen enzymatisch abgebaut werden und somit die Wirkstoffe im Zielgewebe freisetzen.⁴⁹¹ Im Vergleich zu Levodopa ist Dopamin *in vivo* nicht in der Lage die BBB zu überwinden.⁴⁷⁴ In diesem Versuch sollte in Kollaboration mit M. Sc. J. Pfeifer (IFG, KIT) untersucht werden, ob Dopamin beladene Nanogele in der Lage sind den Wirkstoff zielgerichtet in das umgebende Kompartiment des *in vitro* BBB-Modells zu transportieren. Hierfür wurden P8@GNG[DP]-Nanogele verwendet, die durch Mikroemulsion aus GelNB/GelS Hydrogelen hergestellt und mit Dopamin beladen wurden (Abbildung 123). Um einen zielgerichteten Transport der Nanogele zur BBB zu gewährleisten, wurde ein organspezifisches Peptoid (Peptoid 8, Abbildung 123) über eine Thiol-En-Reaktion an die freien GelS-Thiolgruppen des Nanogels gekuppelt. Dr. I. Wehl konnte bereits in ihrer Dissertation bei der Charakterisierung einer Peptoidbibliothek zeigen, dass das Peptoid 8 mit der Peptoidsequenz Nprg-Nprg-Npcb-Nphe-RhodB im olfaktorischen System von Zebrafischen akkumuliert und damit für einen hirnspezifischen Transport geeignet ist.⁴⁸⁵

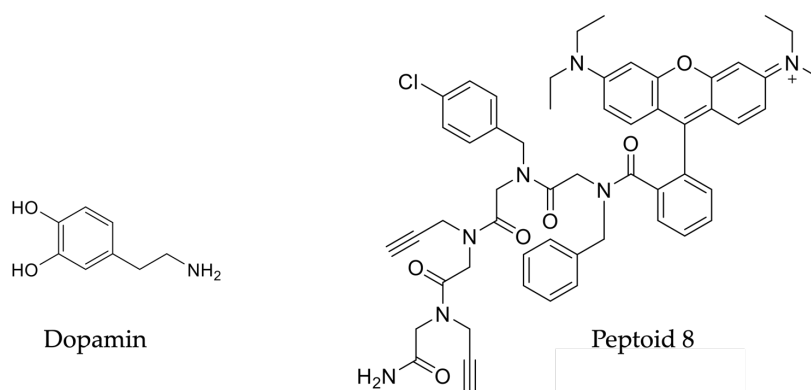


Abbildung 123: Strukturformel von Dopamin und Peptoid 8.

Eine Überprüfung des zielgerichteten Transports kann durch eine mikroskopische Visualisierung über das an das Peptoid gekuppelte Rhodamin B erfolgen. Die Synthese und Charakterisierung der beschriebenen Nanogele erfolgte durch M. Sc. J. Pfeifer. Eine REM-Aufnahme der P8@GNG-Nanogele sowie eine schematische Darstellung des P8@GNG[DP]-Nanogels ist in Abbildung 124 dargestellt.

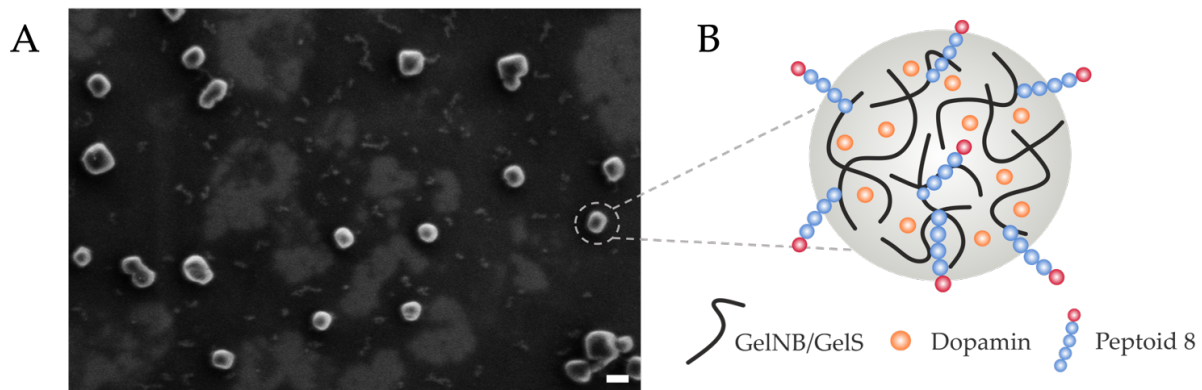


Abbildung 124: REM-Aufnahme der P8@GNG-Nanogele und schematische Darstellung der mit Dopamin beladenen P8@GNG[DP]-Nanogele. (A) zeigt die REM-Aufnahme der P8@GNG-Nanogele, dabei lag die durchschnittliche Größe bei ca. 85 nm (in Kollaboration mit M. Sc. J. Pfeifer). (B) zeigt die schematische Darstellung des mit Dopamin beladenen P8@GNG[DP]-Nanogels. Der Maßstabsbalken entspricht für (A) 100 nm. Die Synthese und Charakterisierung der Nanogele erfolgten durch M. Sc. J. Pfeifer.

Bevor dieser Versuch durchgeführt werden konnte, wurde zunächst die Toxizität der Nanogele sowie des Dopamins mithilfe eines MTT Assays in Kollaboration mit M. Sc. J. Pfeifer untersucht. Da eine Integration der Neuronen und Mikroglia zeitlich erst später erfolgte, wurde ein BBB-Modell inklusive hCMEC/D3, HBVP und HA verwendet. Daher wurden für den MTT Assay HBVP, HA sowie hCMEC/D3 mit unterschiedlichen Dopamin-Konzentrationen von 1 μM , 20 μM , 60 μM , 100 μM , 500 μM , 1000 μM und 2000 μM behandelt und für 72 h bei 5 % CO_2 und 37 $^\circ\text{C}$ kultiviert. Zudem erfolgte in einem separaten Experiment eine Behandlung mit unbeladenen Nanogelen (P8@GNG) in den Konzentrationen von 1 mg/ml, 5 mg/ml, und 10 mg/ml. Das Ergebnis ist in Abbildung 125 dargestellt. Ähnlich zum Dopamin-Derivat Levodopa in Kapitel 3.2.9.1 konnte eine deutliche Abnahme der Viabilität von HA und HBVP ab einer Dopamin-Konzentration von 500 μM festgestellt werden. Dabei wurde für HA ein LD_{50} -Wert von 435,10 μM und für HBVP ein LD_{50} -Wert von 337,13 μM ermittelt. Dagegen konnte für hCMEC/D3 bereits ab 100 μM eine deutlich geringere Viabilität werden, sodass ein LD_{50} -Wert von 98,30 μM bestimmt wurde.

Eine P8@GNG-Konzentration von 1 mg/ml führte bei hCMEC/D3, HBVP und HA zu einer Viabilität von 68,32 % bis 79,68 %. Dagegen konnten große Viabilitätsunterschiede bei 5 mg/ml beobachtet werden. Dies resultierte in einer 35,29%igen Abnahme der Viabilität von HA sowie in einer 90,91%igen Abnahme der Viabilität von hCMEC/D3 (LD_{50} -Wert: 2,18 mg/ml). Durch Erhöhung der P8@GNG-Konzentration auf 10 mg/ml konnte ein LD_{50} -Wert für HA mit 8,08 mg/ml ermittelt werden. Hingegen waren hCMEC/D3 bei dieser Konzentration nicht mehr lebensfähig.

Dagegen wurde für HBVP stets eine Viabilität von mindestens 69,23 % in den verwendeten P8@GNG-Konzentrationen ermittelt.

Für den anschließenden Versuch wurde eine P8@GNG[DP]-Konzentration von 1,12 mg/ml mit einer Dopamin-Konzentration von 2 μ M gewählt. Diese Werte erzielten in den Toxizitätstests eine hinreichende Viabilität.

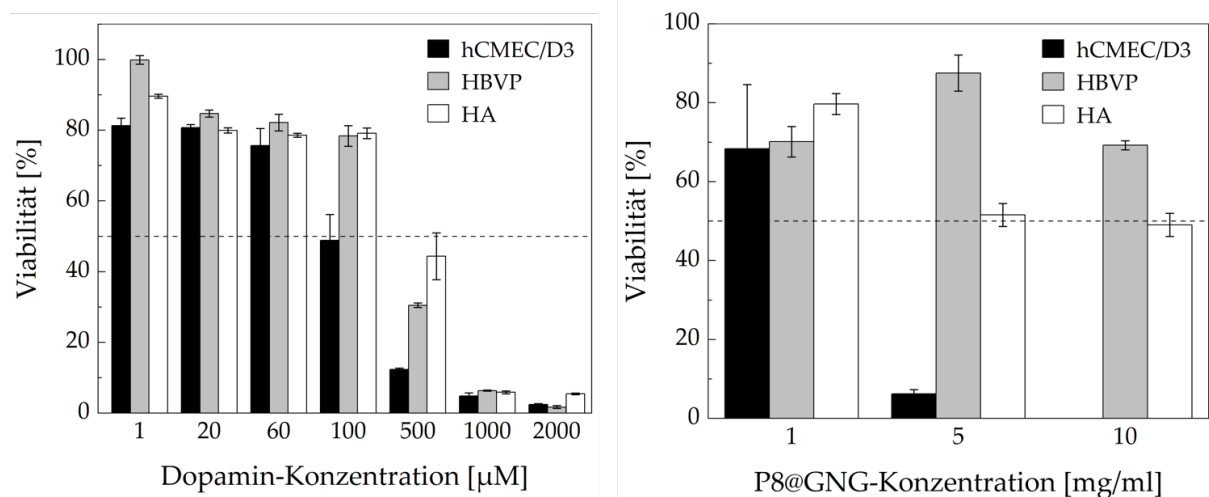


Abbildung 125: Toxizität des Wirkstoffs Dopamin und der unbeladenen P8@GNG. Für den MTT Assay wurden $1 \cdot 10^4$ HBVP, HA sowie $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in Wells einer 96-Well-Platte in ihren Spezialmedien (PM, AM, KM) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Behandlung mit Dopamin sowie mit unbeladenen P8@GNG. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mithilfe des MTT Assays quantifiziert. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus $n = 3$ ermittelt. In Kollaboration mit M. Sc. J. Pfeifer.

Im nächsten Schritt wurden in vasQchips BBB-Modelle inklusive hCMEC/D3, HBVP und HA nach Kapitel 3.2.9.1 rekonstruiert und für 7 Tage bei einer Flussrate von 100 μ l/h fluidisch kultiviert. Es erfolgte eine Behandlung mit P8@GNG[DP] in einer Konzentration von 1,12 mg/ml (2 μ M Dopamin). Dabei wurde das P8@GNG[DP]-Nanogel in M7 1:1 BM in die Spritzen gefüllt, und für 72 h durch den Mikrokanal des vasQchips gepumpt (Abbildung 126). Analog dazu wurden unbehandelte Kokultur-Modelle als Kontrolle verwendet. Anschließend erfolgte mithilfe inverser Konfokalmikroskopie eine Visualisierung der Rhodamin B gekuppelten P8@GNG[DP]-Nanogelee in den behandelten Kokultur-Modellen. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt, um die Konfluenz der Zellen zu revidieren. Das Ergebnis ist in Abbildung 127 dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die P8@GNG[DP]-Nanogelee fähig waren in die Zellen des BBB-Modells zu akkumulieren. Hingegen konnte in der Kontrolle, gemäß der Erwartung, kein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert werden. Durch eine Auswertung mithilfe von Fiji konnte zudem in den behandelten vasQchips ein 4,22-fach höheres Fluoreszenzsignal detektiert werden.

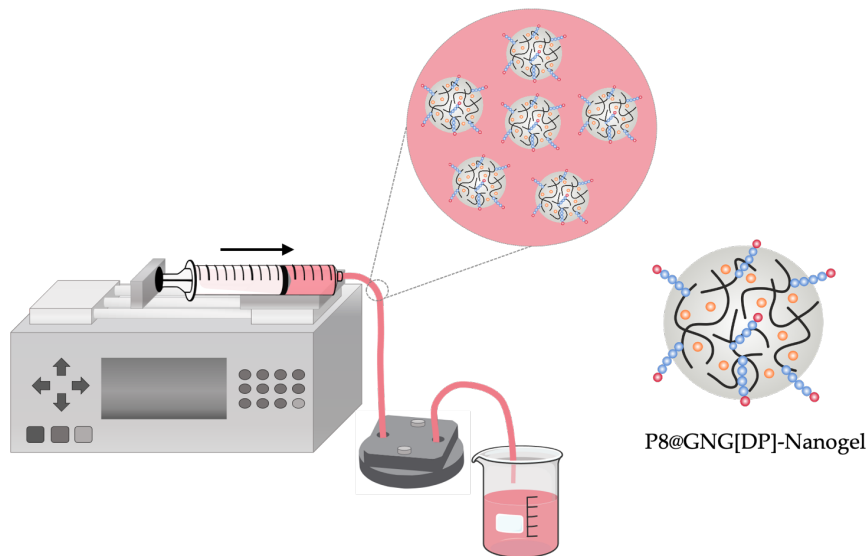


Abbildung 126: Behandlung des im vasQchip etablierten BBB-Modells mit P8@GNG[DP]-Nanogelen unter fluidischer Kultivierung.

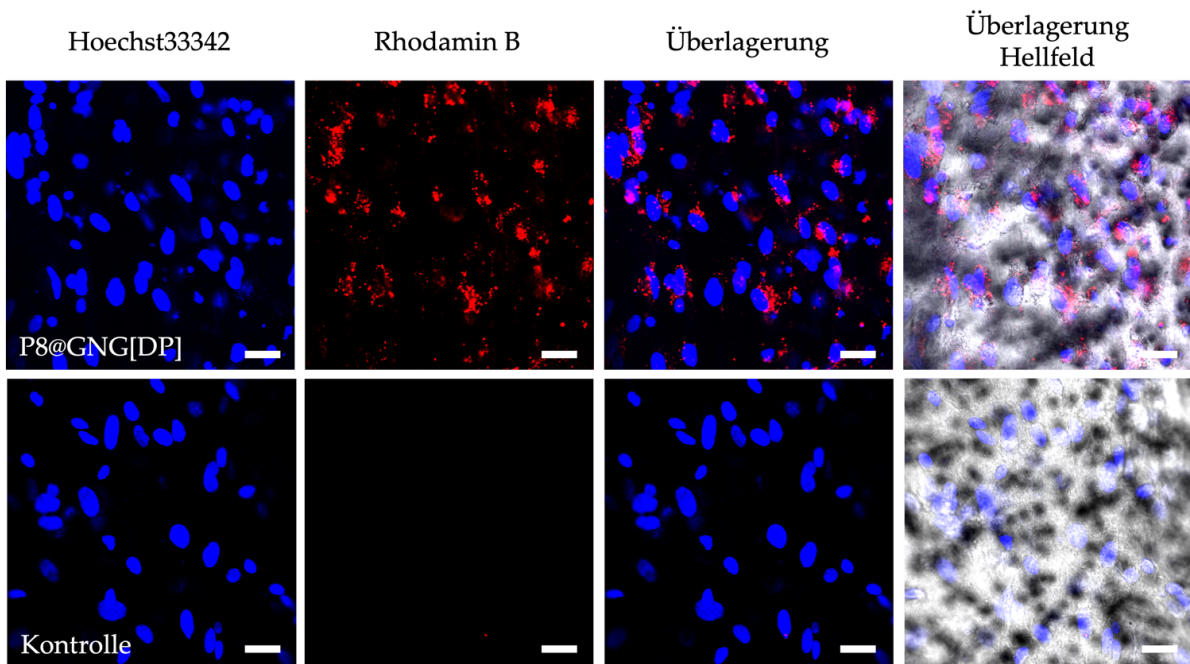


Abbildung 127: Visualisierung der Rhodamin B gekoppelten P8@GNG[DP]-Nanogeale im BBB-Modell des fluidischen vasQchips. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA in KM. Ein Tag später wurden $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in den mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Mikrokanal ausgesät. Daraufhin erfolgte eine fluidische Kultivierung in M7 1:1 BM bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen wurde das BBB-Modell mit einer P8@GNG[DP]-Konzentration von 1,12 mg/ml sowie eine Dopamin-Konzentration von 2 μ M für 72 h behandelt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Um die Penetration der Rhodamin B gekoppelten Nanogeale in die Zellen des Kokultur-Modells zu beurteilen, erfolgte eine Visualisierung mithilfe inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5). Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Rot: Rhodamin B gekoppelten P8@GNG[DP]-Nanogeale. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

Für eine genauere Lokalisierung der P8@GNG[DP]-Nanogelee wurden *z-stack* Messungen durchgeführt. In Abbildung 128 sind die getrennten Farbkanäle in unterschiedlichen Ebenen sowie die generierten 3D-Projektionen dargestellt. Anhand der horizontalen 3D-Projektion in Abbildung 128C die beiden von der porösen Membran getrennten Zellschichten der Endothelzellen im Mikrokanal sowie der Perizyten und Astrozyten im umgebenden Kompartiment deutlich zu erkennen.

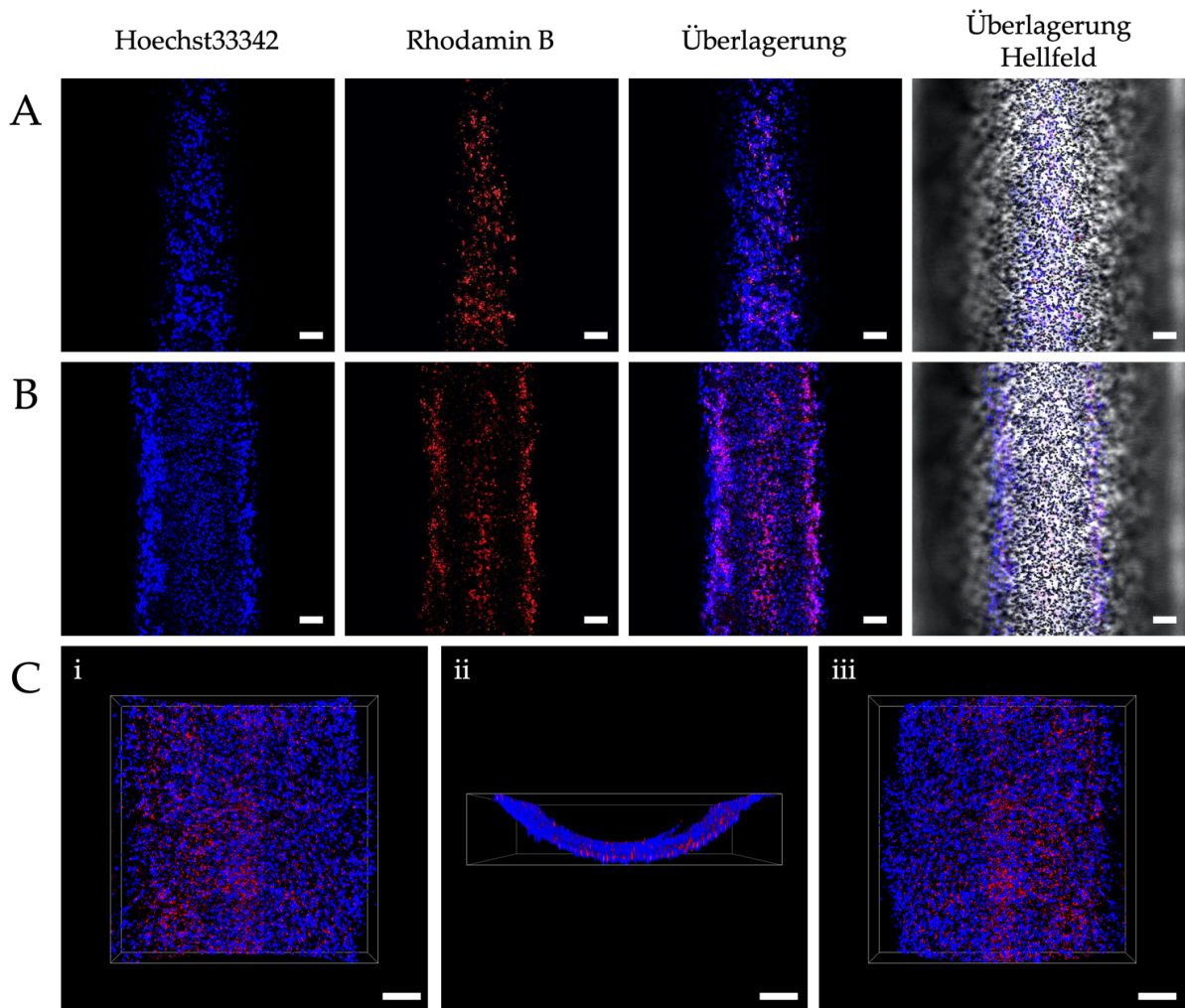


Abbildung 128: Visualisierung der Rhodamin B gekoppelten P8@GNG[DP]-Nanogelee im BBB-Modell des fluidischen vasQchips. vasQchips wurden mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3, $5 \cdot 10^5$ HBVP und $5 \cdot 10^5$ HA besiedelt und anschließend mit P8@GNG[DP]-Nanogelen der Konzentration von 1,12 mg/ml für 72 h behandelt. Nach erfolgter Inkubation konnten die Rhodamin B gekoppelten Nanogelee im Kokultur-Modell mithilfe inverser Konfokalmikroskopie visualisiert werden. Zusätzlich wurde zur Detektion der Zellkerne mit Hoechst33342 gefärbt. Anschließend wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 65$, Abstand = $4 \mu\text{m}$, $h = 256 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen erstellt werden. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung, Rot: Fluoreszenz der Rhodamin B gekoppelten P8@GNG[DP]-Nanogelee. (A) zeigt die *z*-Ebene des umgebenden Kompartiments und (B) illustriert die *z*-Ebene des Mikrokanals sowie des umgebenden Kompartiments. (Ci) stellt die innere laterale, (Ciii) die äußere laterale und (Cii) die horizontale Ansicht der 3D-Projektion dar. Der Maßstäbsbalken entspricht für (A), (B) $20 \mu\text{m}$ und für (C) $200 \mu\text{m}$. In Kollaboration mit M. Sc. J. Pfeifer.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die P8@GNG[DP]-Nanogele sowohl in die hCMEC/D3 im Mikrokanal als auch in die Zellen im umgebenden Kompartiment penetrierten. Dies deutet daraufhin, dass die Dopamin-beladenen Nanogele fähig waren die Barriere der hCMEC/D3 im Mikrokanal des Kokultur-Modells zu passieren.

Um einen unspezifischen Transport der P8@GNG[DP]-Nanogele durch eine lückenhafte inkonfluente Endothelzellschicht auszuschließen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in den vasQchips zu Überprüfung der Konfluenz der Endothelzellschicht mithilfe des Barriere-Markers CD31 in den behandelten Kokultur-Modellen immunhistochemisch gefärbt. Analog dazu wurde neben hCMEC/D3 eine Immunfluoreszenzfärbung der Zelltypen HBVP und HA in den unbehandelten Kokultur-Modellen durchgeführt. Da das Rhodamin B der Nanogele eine ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlänge wie die der sekundären Antikörper von HA sowie HBVP aufweist, wurde die unbehandelte Kontrolle verwendet. Eine Unterscheidung der Zellen im umgebenden Kompartiment konnte mit GFAP sowie α -SMA für HA und HBVP erfolgen. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in Abbildung 129A konnte ein konfluentes Endothel im Mikrokanal bestätigt und damit ein ungerichteter Transport der P8@GNG[DP]-Nanogele durch die Barriere der hCMEC/D3 ausgeschlossen werden. Neben dem konfluenten Endothel der hCMEC/D3 wurden HA und HBVP durch ihre zelltypischen Marker im umgebenden Kompartiment der Kontrolle nachgewiesen (Abbildung 129B). Da eine Besiedlung der Kontrolle simultan und unter denselben Parametern der behandelten vasQchips erfolgte, kann von einer erfolgreichen Kokultivierung der drei Zelltypen in allen vasQchips ausgegangen werden.

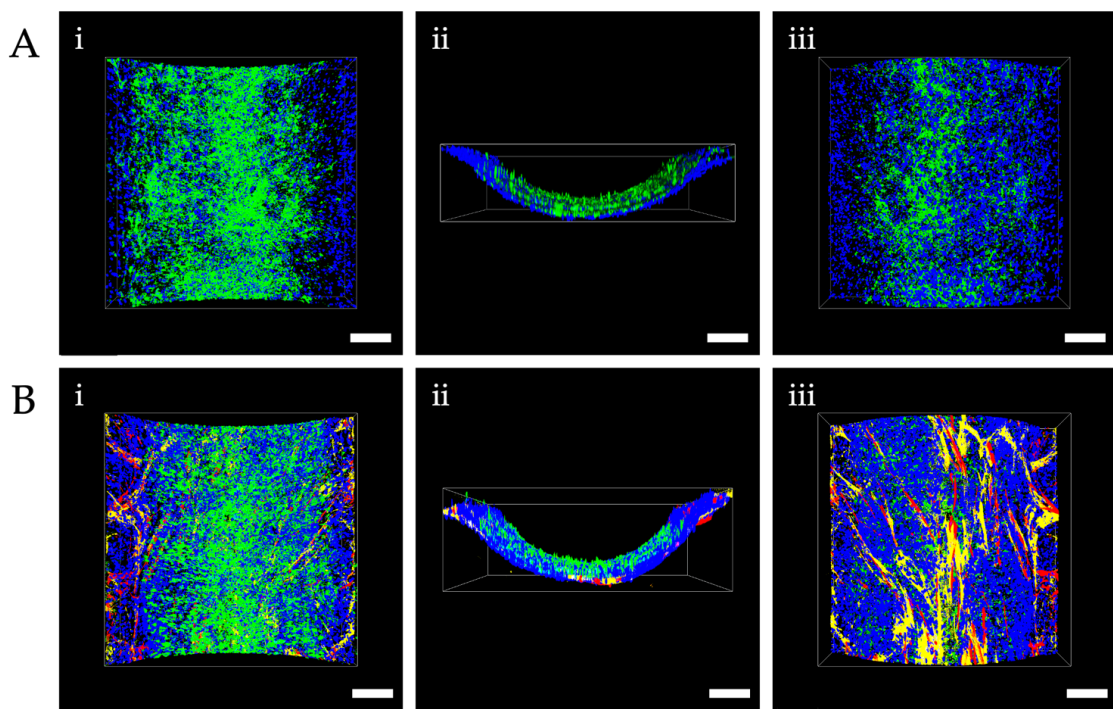


Abbildung 129: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Marker des BBB-Modells im vasQchip. vasQchips wurden mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3, $5 \cdot 10^5$ HBVP und $5 \cdot 10^5$ HA besiedelt und anschließend mit P8@GNG[DP]-Nanogelen der Konzentration 1,12 mg/ml für 72 h behandelt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Kokultur-Modelle verwendet. Nach erfolgreichem Versuch wurden die Zellen in den vasQchips fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Daraufhin erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 visualisiert. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 101-137$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 300-407 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen erstellt werden. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3. (A) stellt die behandelten und (B) die unbehandelten Kokultur-Modelle (Kontrolle) dar. (i) zeigt die innere, (ii) die horizontale und (iii) die äußere laterale Ansicht der 3D-Projektionen. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$.

3.2.9.2.1 Kapitelzusammenfassung Transport von Dopamin beladenem Nanogel im vasQchip

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass P8@GNG[DP]-Nanogelee fähig waren die Barriere der hCMEC/D3 zu überwinden, um in HBVP sowie HA im umgebenden Kompartiment zu akkumulieren. Hierbei muss beachtet werden, dass im vorherigen Kapitel 3.2.9.1 das verwendete BBB-Modell nicht auf eine *in vivo* ähnliche Permeabilität validiert werden konnte. Daher konnte mit diesem Versuch ein eindeutiger zielgerichteter Transport der Nanogelee durch die humane BBB nicht bestätigt werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass das *Organ-on-a-chip* System vasQchip grundlegend in der Lage ist potentielle Behandlungsmethoden für degenerative Erkrankungen *in vitro* auszutesten. Daher soll zukünftig das vollständige NVU-Modell auf eine *in vivo* ähnliche Permeabilität validiert werden, um das Potential des *Organ-on-a-chip* Systems vasQchip auszuschöpfen.

3.3 Abschlussdiskussion

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte das enorme Potential der *Organ-on-a-chip* Technologie in der Rekonstruktion von spezifischen „durchbluteten“ Gewebesystemen verdeutlicht werden. Durch Kombination verschiedener Ansätze des *Tissue Engineerings* wie Hydrogelen, *3D-Bioprinting* oder Stammzelltechnologien wird es zunehmend ermöglicht funktionelle miniaturisierte Organeinheiten exakt abzubilden und die Diskrepanz zwischen synthetischem und natürlichem Gewebe zu verringern. So konnten in dieser Arbeit funktionelle vaskularisierte Einheiten der Retina und des Gehirns auf Basis humaner gewebespezifischer Zellen rekonstruiert werden. Dabei wurden wichtige Ergebnisse zur Generierung eines dreidimensionalen Gewebes erzielt, um die physiologische *in vivo* Situation möglichst naturgetreu reproduzieren zu können. Zukünftig sind für ein vollständiges dreidimensionales *in vivo* Modell der Retina und des Gehirns weitere Modifizierungen der EZM-imitierenden Stützmatrizes zur Ausbildung zellulärer gewebeartiger Strukturen verschiedener Zelltypen angestrebt.

Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser Arbeit erste Erkenntnisse zur Wirkstofftestung im *Organ-on-a-chip* System *vasQchip* sowie zur Modellierung der degenerativen Erkrankungen Parkinson und der diabetischen Retinopathie erzielt werden. Diese Erkenntnisse fungieren dabei als Fundament zur Entwicklung von einsatzfähigen *in vitro* Organsystemen und ermöglichen neue Einblicke zur Pathogenese und Progression von degenerativen Erkrankungen.¹⁵¹ Darüber hinaus erlauben derartige Modellsysteme zukünftig eine effizientere Testung potentieller therapeutischer Wirkstoffe sowie eine Entwicklung spezifischerer und wirksamerer Behandlungsmethoden zur Prävention der Erkrankungen.^{150,151} Langfristig gesehen bieten *Organ-on-a-chip* Systeme Alternativen zu Tierversuchen sowie zu den herkömmlichen primitiven 2D-Zellkulturen. So gewährleisten diese Systeme auf Basis humaner Zellen eine höhere Übertragbarkeit potentieller Wirkstoffkandidaten in der präklinischen sowie eine bessere Patientensicherheit in der klinischen Phase.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellen

HA	Humane Astrozyten (1800, Provitro GmbH), Passage 5-8
HBVP	Humane vaskuläre Hirnperizyten (1200, Provitro GmbH), Passage 5-8
hCMEC/D3	Humane Mikrovaskuläre Hirndothelzellen (SC066, Merck), Passage 5-8
HD11	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC), Bereitgestellt von Prof. Dr. med. Jochen Utikal, DKFZ Heidelberg, Passage 169-192
HM	Immortalisierte humane Mikroglia (P10354-IM, Innoprot), Passage 2-8
HRA	Humane Retinale Astrozyten (1870, Provitro GmbH), Passage 4-8
HRMVEC	Humane Retinale Mikrovaskuläre Endothelzellen (PB-CH-160-8511, PELOBiotech), Passage 3-8
GFP-HRMVEC	Humane Retinale Mikrovaskuläre Endothelzellen gekuppelt an GFP (cAP-0010GFP, PELOBiotech), Passage 5-8
WTC11NGN2	Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) mit einem Doxycyclin induzierbaren Promoter zur Expression von NGN2, Bereitgestellt von Prof. Dr. Peter St George-Hyslop, University of Cambridge, England, Passage 27-32

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Carl Roth® GmbH
100x GlutaMAX™ Zusatz	Gibco® Life Technologies
100x Insulin-Transferrin-Selenium	Gibco® Life Technologies
100x N-2 Zusatz	Gibco® Life Technologies

100x NEAA (<i>Non-Essential Amino Acids</i>)	Lonza
2-Mercaptoethanol	Gibco® Life Technologies
5x RQ1 DNase Puffer	Promega
5-Norbornen-2-Carbonsäure	TCI Chemicals
50x B-27™ Zusatz	Gibco® Life Technologies
5x Green GoTaq Reaktionspuffer	Promega
AM, Astrozytenmedium mit Zusätzen, FBS und P/S	Provitro GmbH
BrainPhys™ Neuronales Medium	StemCell™ Technologies
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Carl Roth® GmbH
Calcein-AM	Invitrogen™
Carbidopa EP Standard	Sigma Aldrich® Merck KGaA
CasBlock™	Invitrogen™
Cell Proliferation Kit XTT	AppliChem GmbH
Chloroform	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Corning® Matrigel® <i>Growth Factor Reduced (GFR)</i>	Corning
Corning® Matrigel® <i>hESC-Qualified Matrix</i>	Corning
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich® Merck KGaA
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco® Life Technologies
DMEM/F12	Gibco® Life Technologies
DMEM/F12 + GlutaMAX™	Gibco® Life Technologies
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich® Merck KGaA

DNA Marker, 100 bp	New England Biolabs® GmbH
dNTP Solution Mix	New England Biolabs® GmbH
Dopamin EP Standard	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Dopamin-hydrochlorid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Doxycyclin-hyclat	Sigma Aldrich® Merck KGaA
DPBS ^{-/-} und ^{+/+} 1x / 10x (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	Gibco® Life Technologies
EBM®-2, <i>Endothelial Cell Basal Medium-2</i>	PromoCell®
EBM®-2, <i>Endothelial Cell Basal Medium-2</i> KIT mit Zusätzen und FBS	PromoCell®
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth® GmbH
Ethanol 99,8 %	VWR® Chemicals
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Carl Roth® GmbH
FBS (Fetales Kälberserum)	Gibco® Life Technologies
Fibronektinlösung, human 1 mg/ml	PromoCell®
Fluo-4 AM, membrangängig	Invitrogen™
Gelatine Typ A, aus der Schweinehaut	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich® Merck KGaA
GoTaq® qPCR MasterMix	Promega
Heparin	PromoCell®
HEPES	Gibco® Life Technologies
Hoechst33342, Trihydrochlorid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
<i>Human Fc Block</i>	BD Biosciences

Hydrocortison	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Isopropanol	Carl Roth® GmbH
KCl (Kaliumchlorid)	Carl Roth® GmbH
KnockOut™ DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco® Life Technologies
KnockOut™ Serumersatz	Gibco® Life Technologies
Ko143	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Kollagen Typ 1 aus dem Rattenschwanz, 5 mg/ml	Enzo Life Science
Konzentrierte Essigsäure	VWR® Chemicals
Laminin aus der Basalmembran des murinen Sarkoms	Sigma Aldrich® Merck KGaA
LAP (Lithium-Phenyl-(2,4,6- trimethylbenzoyl)phosphinat)	TCI Chemicals
Levodopa EP Standard	Sigma Aldrich® Merck KGaA
LPS (Lipopolysaccharid) aus <i>E. coli</i>	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Lucifer Yellow CH, Lithiumsalz	Invitrogen™
Methacrylsäureanhydrid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Carl Roth® GmbH
Mitoxantron Dihydrochlorid	Sigma Aldrich® Merck KGaA
MM, Mikrogliaemedium mit Zusätzen, FBS und P/S	Innoprot
mTeSR™ Plus Basalmedium mit 5x Zusätzen	StemCell™ Technologies
MTT Reagenz und Solubilization Solution/Stop Mix	Promega
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth® GmbH
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Carl Roth® GmbH
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth® GmbH

Neurobasal™ Medium	Gibco® Life Technologies
NHS (N-Hydroxysuccinimid)	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Normocin	InvivoGen
Nukleasefreies Wasser	Promega
PFA (Paraformaldehyd)	Carl Roth® GmbH
Penicillin/Streptomycin	Gibco® Life Technologies
Phalloidin-TRITC	Sigma Aldrich® Merck KGaA
PM, Perizytenmedium mit Zusätzen, FBS und P/S	Provitro GmbH
Poly-L-Lysin 10 mg/ml	Provitro GmbH
Poly-L-Ornithin-Lösung	Sigma Aldrich® Merck KGaA
PrestoBlue™ Zellviabilitätsreagenz	Invitrogen™
Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich® Merck KGaA
<i>Random Primer</i>	Promega
rCOMP-Angiopoietin-1, human	Enzo Life Science
ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>) <i>Detection Assay Kit</i>	PromoCell®
rhBDNF (<i>Recombinant human Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)	PeproTech®
rhbFGF (<i>Recombinant human basic Fibroblast Growth Factor</i>)	StemCell™ Technologies
rhEGF (<i>Recombinant human Endothelial Growth Factor</i>)	StemCell™ Technologies
rhNT-3 (<i>Recombinant human Neurotrophin-3</i>)	PeproTech®
rhTNF- α (<i>Recombinant human tumor necrosis factor alpha</i>)	PeproTech®

rhVitronektin	PeptoTech®
rmIFN- γ (<i>Recombinant murine Interferon-gamma</i>)	PeptoTech®
RNase AWAY®	VWR® International
RQ1 DNase Stop Solution	Promega
RT 5x Puffer	Promega
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth® GmbH
Stemline® Neural Stem Cell Expansion Medium	Sigma Aldrich® Merck KGaA
TRIS Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth® GmbH
Triton-X 100	Carl Roth® GmbH
TRIzol™ Reagenz	Invitrogen™
Universal-Agarose, peqGOLD	VWR® International
Verapamil	Sigma Aldrich® Merck KGaA
Y-27632 Dihydrochlorid (ROCK-Inhibitor)	PeptoTech®

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen ø 32 mm, #1,5	Menzel
Dialyseschläuche 12-14 kDa	Sigma Aldrich® Merck KGaA
<i>Female Luer Lock Coupler</i>	ibidi® GmbH
Hämacytometer-Deckgläser	VWR® International
Injektionsnadeln 0,25 mm rot, konisch	Vieweg GmbH
Klebeband VHB™	Scotch™

Kryoröhrchen 2 ml	VWR® International
<i>Luer Connector Male</i>	ibidi® GmbH
<i>Luer Lock Connector Female</i>	ibidi® GmbH
<i>Luer Plug Male</i>	ibidi® GmbH
Medienflasche Nalgene® quadratisch, PETG, 250 ml	Thermo Scientific™
Messpipetten 5 / 10 / 20 ml	Brand GmbH
<i>Mr. Frosty™ Freezing Container</i>	Thermo Scientific™
Multiwell-Platte 96 / 24 / 12 / 6-Well transparent	Greiner Bio-One™ CELLSTAR™
Multiwell-Platte 48-Well	VWR® International
Nunclon™ Sphera™ Flaschen 75 cm ²	Thermo Scientific™
Parafilm M 4 in.× 125 ft. Roll	Carl Roth® GmbH
Pasteurpipetten	Brand GmbH
Petrischale ø 94 mm, Höhe 16 mm	Greiner Bio-One™ CELLSTAR™
Pipettenspitzen 0,1-10 / 1-200 / 200-1000 µl	VWR® International
Polycarbonatfolie 10 ⁶ Ionen/cm ²	It4ip
Pumpenschlauch Tygon LMT-55 2 Stopper, ø innen 0,76 mm	VWR® International
Pumpenschlauch Tygon 3350 ø innen 0,76 mm	Saint-Gobain Performance Plastics
Rasierklingen	Wilkinson Sword

Reservoir 50 ml	VWR® International
Serologische Pipetten 5 / 10 / 25 ml	VWR® International
Spritzen Inkjet® 10 ml	B. Braun SE
Spritzen Omnifix® 1 ml	B. Braun SE
Sterilfilter Rotilabo® Porengröße 0,22 µm	Carl Roth GmbH
Zählkammer, Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG
Zell-/Gewebekultur Platte ø 100 mm, Höhe 20 mm	Greiner Bio-One™ CELLSTAR™
Zellkulturflaschen 75 cm², Filterschraubverschluss	Greiner Bio-One™ CELLSTAR™
Zentrifugenröhrchen konischer Boden, 15 / 50 ml	Greiner Bio-One™ CELLSTAR™
<i>µ-Slide 8 Well high ibiTreat</i>	ibidi® GmbH
<i>µ-Slide 8 Well ibiTreat</i>	ibidi® GmbH
Hartschalen qPCR Platten und <i>Microseal</i> Folien	Bio-Rad Laboratories GmbH
PCR Strips 8 Stück	Brand GmbH
Reaktionsgefäße farblos 1,5 / 2 ml	Eppendorf SE
Reaktionsgefäße schwarz, 1,5 ml	Eppendorf SE
Transwell® 24-Well, 0,33 cm², 0,4 µm Porengröße, PC-Membran, Transparent	VWR® International
Transwell® 24-Well, 0,33 cm², 3 µm Porengröße, PC-Membran, Transparent	VWR® International

4.1.4 Zellkulturmedien

4.1.4.1 Medien der immortalisierten und primären Zellen

HA, HRA	Astrozytenmedium AM	500 ml AM 5 ml AGS Zusätze 2 % FBS 1 % P/S
HBVP	Perizytenmedium PM	500 ml PM 5 ml PGS Zusätze 2 % FBS 1 % P/S
hCMEC/D3	Kultivierungsmedium KM	500 ml EBM [®] -2 125 µl Ascorbinsäure 125 µl bFGF 125 µl EGF 125 µl IGF-1 125 µl VEGF 1 % P/S 2,5 % FBS 0,55 µM Hydrocortison
hCMEC/D3	Differenzierungsmedium DM	500 ml EBM [®] -2 125 µl Ascorbinsäure 1 % P/S 0,25 % FBS 0,55 µM Hydrocortison
HM	Mikrogliaemedium MM	500 ml MM 5 ml MGS Zusätze 5 % FBS 1 % P/S
HRMVEC, HRMVEC-GFP	Endotheliales Medium EGM-2	500 ml EGM [®] -2 10 ml EGM [®] -2 Zusätze 5 % FBS 1 % P/S

HBVP	Einfriermedium	10 % DMSO 50 % FBS 40 % PM (mit Zusätzen, FBS und P/S)
------	----------------	--

Restliche Zellen	Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FBS
------------------	----------------	-----------------------

4.1.4.2 Stammzell- und Differenzierungsmedien

HD11	Kultivierungsmedium iPSC KM	400 ml mTeSR™ Plus Basalmedium 100 ml mTeSR™ Plus 5x Zusätze 1 µg/ml Doxycyclin-hyclat 50 µg/ml Normocin
------	--------------------------------	---

WTC11NGN2	Kultivierungsmedium iPSC KM	400 ml mTeSR™ Plus Basalmedium 100 ml mTeSR™ Plus 5x Zusätzen 1 % P/S 10 µM ROCK-Inhibitor (nur zum Passagieren)
-----------	--------------------------------	---

WTC11NGN2 differenzierte NSC	Differenzierungsmedium NIM	500 ml KnockOut™ DMEM 1 % N-2 Zusatz 1 % NEAA 1 % GlutaMAX™ Zusatz 1 % P/S 2 µg/ml Doxycyclin-hyclat 10 µM ROCK-Inhibitor (nur zum Passagieren)
---------------------------------	-------------------------------	---

<i>EZ spheres</i> differenziert aus HD11	Differenzierungsmedium <i>EZ sphere</i>	500 ml Stemline® Neural Stem Cell Expansion Medium 100 ng/ml rhEGF 100 ng/ml rhbFGF 2 µg/ml Heparin
---	--	---

HD11 und WTC11NGN2 differenzierte Neuronen	Differenzierungsmedium M7	500 ml 1:1 Neurobasal™ Medium und DMEM/F12 + GlutaMAX™ 2 % B-27™ Zusatz 1 % Insulin-Transferrin-Selenium 1 % N-2 Zusatz 1 % NEAA (Lonza) 1 % P/S 0,05 mM 2-Mercaptoethanol
HD11 und WTC11NGN2 differenzierte Neuronen	Differenzierungsmedium M7 1:1 BM	500 ml 1:1 M7 (mit Zusätzen und P/S) und EBM®-2 (ohne Zusätze, FBS sowie P/S) 0,5 % P/S
WTC11NGN2 differenzierte Neuronen	Differenzierungsmedium CM	500 ml BrainPhys™ Neuronal Medium 2 % B-27™ Zusatz 10 ng/ml BDNF 10 ng/ml NT-3 1 µg/ml Laminin 1 % P/S
HD11	Einfriermedium	70 % mTeSR™ Plus Basalmedium mit Zusätzen 20 % KnockOut™ Serumersatz 10 % DMSO 1 µg/ml Doxycyclin 50 µg/ml Normocin
WTC11NGN2	Einfriermedium	10 % DMSO 90 % FBS

4.1.5 Enzyme

Dispase (1 U/mL)	StemCell™ Technologies
GoTaq® G2 DNA-Polymerase	Promega
Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punktmutation)	Promega
RQ1 RNase-freie DNase	Promega
StemPro™ Accutase™ Zelldissoziationsreagenz	Gibco® Life Technologies
Trypsin-EDTA 0,25%	Gibco® Life Technologies

4.1.6 Puffer

10x TAE Puffer (pH 8,5)	48,4 g TRIS 37,2 g EDTA 11,4 ml konzentrierte Essigsäure Auf 1 l mit ddH ₂ O Wasser auffüllen
Extrazellulärpuffer	150 mM NaCl 10 mM HEPES 8 mM D-(+)-Glucose 5,6 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂ Mit ddH ₂ O auffüllen und steril filtrieren

4.1.7 Antikörper

4.1.7.1 Primärantikörper

Anti-β-III Tubulin produced in mouse	ab7751, abcam
Anti-CD11b produced in rat	ab8878, abcam
Anti-CD31 produced in sheep	AF806, R&D Systems
Anti-CD31-FITC produced in mouse	F8402, Sigma Aldrich® Merck KGaA
Anti-FABP7 produced in rabbit	ABN14, Sigma Aldrich® Merck KGaA
Anti-GFAP produced in rabbit	AB5804, Sigma Aldrich® Merck KGaA

Anti-Iba-1 produced in rabbit	A104332, antibodies.com
Anti-MAP2 produced in mouse	MAB3418, Sigma Aldrich® Merck KGaA
Anti-Nanog produced in mouse	ab62734, abcam
Anti-Nestin produced in rabbit	ab105389, abcam
Anti-Oct-4 produced in rabbit	ab181557, abcam
Anti-P-gp produced in mouse	C219, Enzo Life Sciences
Anti-PAX6 produced in mouse	ab78545, abcam
Anti-PAX6 produced in mouse	sc-81649, Santa Cruz Biotechnologies
Anti-Synapsin I produced in rabbit	ab64581, abcam
Anti-Synapsin I produced in rabbit	AB1543P, Sigma Aldrich® Merck KGaA
Anti-TH produced in rabbit	ab75875, abcam
Anti-VE-Cadherin produced in rabbit	ab33168, abcam
Anti-ZO-1 produced in rat	sc-33725, Santa Cruz Biotechnologies
Anti- α -SMA produced in mouse	ab54723, abcam
Anti- α -SMA produced in mouse	14976082, Invitrogen™

4.1.7.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit	A21206, Invitrogen™
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	A11001, Invitrogen™
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat	A11006, Invitrogen™
Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Sheep	A21099, Invitrogen™
Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse	A11031, Invitrogen™
Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Rabbit	A21443, Invitrogen™
Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rat	A21247, Invitrogen™
FITC Donkey Anti-Sheep	A16049, Invitrogen™

4.1.7.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Anti-Oct-4-PE produced in mouse	560186, BD Biosciences
PE Mouse Anti-IgG1, Isotypkontrolle	555749, BD Biosciences

4.1.8 *Primer*

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
BCRP	AGGCAGATGCCTTCTTCGTTA	ATGCTGCAAAGCCGTAAATCC
CD11b	TTCCAGGTTCTGGCTCCTTC	GTAGTCGCACTGGTAGAGGC
CD31	ATTGCAGTGGTATCATCGGAGTG	CTCGTTGTTGGAGTTCAGAAGTGG
Claudin-5	AGGCGTGCTCTACCTGTTTTG	AACTCGCGGACGACAATGTT
GAPDH	GCAAGAGCACAAAGAGGAAGAG	TCTACATGGCAACTGTGAGGA
MAP2	ACCTTCCTCCATTCTCCCTCC	AGTGCCTGGTGTGCGTGAAG
Nanog	GCAACCAGACCCAGAACATCC	CCAAGGCAGCCTCCAAGTCAC
Nestin	TCTCCAGAAACTCAAGCACCCTG	TCCTGATTCTCCTCTTCCAGGAGT
Occludin	AAGAGCACCTGCAAAGGGAAG	TCCTGTAGGCCAGTGTCAAAA
Oct-4	AGAAGGGCAAGCGATCAAGC	AGGGACCGAGGAGTACAGTG
P-gp	TTGACCCGCACTTCAGCTAC	CTCGGGGTTGATGCCGTATT
PAX6	GCCCGAGAAAGACTAGCAGC	TGTGGTGGGTTGTGGAATTGG
TH	GTGGAGTTCGGGCTGTGTAAG	TGAGCTTGTCTTGGCGTC
VE-Cadherin	AGGTGCTAACCTGCCAAC	GCCTCTCAATGGCGAACACG
ZO-1	AGAGGTGTTCCGTGTTGTGG	GTCTCCGCCTGCTGTTTTTG

4.1.9 **Geräte**

4.1.9.1 **Mikroskope**

Inverses Lichtmikroskop DMi1	Leica
Inverses Lichtmikroskop LED AE2000 Moticom	Motic®
Konfokalmikroskop TCS SPE DMI4000B	Leica
Konfokalmikroskop LSM 800	ZEISS
Konfokalmikroskop Stellaris 5	Leica
Rasterelektionenmikroskop (REM) Supra 55 VP LEO	ZEISS
Weitfeldmikroskop DMiL LED	Leica

4.1.9.2 Allgemeine Geräte

Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Bioscience GmbH
BD FACSAria™ Fusion	BD Biosciences
Biospot BP	Biofluidix GmbH
CFX Connect Real Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH
CO ₂ -Inkubator C170	Binder
ENVAIReco® Werkbank	ENVAIR
EVOM3 inklusive STX2-Plus Elektrode	WPI
Feinwaage LAG214i	Molecular Devices
Flockeneisautomat	WESSAMAT GmbH
Kritisch-Punkt-Trockner CPD300	Leica
Kühlsystem für BioSpot BP, Umlaufkühler ULK 602 0	Fryka-Kältetechnik GmbH
Kühlzentrifuge Microstar 17R	VWR®
Lyophilisator Christ Alpha 1-4	Christ GmbH
Magnetrührer VMS-C7 mit Heizplatte und Temperaturfühler PT1000	VWR® International
Mikroplatten-Reader SpectraMax® iD3	Molecular Devices
Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop™ Lite	Thermo Scientific™
Mikrowelle	OK.
Mikrozentrifuge Micro Star 17R	VWR® International
Omniculture S2000 mit Radiometer R2000	Excelitas Technologies Corp.
Peristaltikpumpe peRISYS	Cetoni
pH-Meter	VWR® International
Pipetten Eppendorf Research Plus 0,5-10 / 2-20 / 1-100 / 20-200 / 100-1000 µl	Eppendorf

Pipettierhelfer accu-jet pro 0,1-200 ml	Brand GmbH
Plattenzentrifuge Labofuge 400R	Heraeus
Power Supply Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH
Präzisionswaage PR Series	Ohaus®
Spritzenpumpe Fusion 200 Classic Syringe Pump	Chemyx
Sputter Coater	Cressington
Thermocycler peqSTAR	VWR®, peqlab
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge MicroStar 12	VWR®
Tischzentrifuge MiniStar	VWR®
Transferpipette 2,5 µl	Brand
vasQturn	AK Schepers
Vortex Genie 2	VWR®
Wärmeschränk UN55	Memmert GmbH + Co. KG
Wasserbad LSB Aqua Pro	GRANT
Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus

4.1.10 Software

CALIMA 2017

CETONI peRISYS Schlauchpumpensoftware

ChemDraw Professional 20.0

CorelDRAW X4

Fiji

FlowJo

Leica LasX3.5.7

Microsoft Office 365

OriginPro® 2022

ZEISS ZEN

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Zellkultur

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im zellspezifischem Nährmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ sowie in einer gesättigten Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % gesplittet und dabei die Passage um 1 erhöht. Eine Besonderheit stellt die iPSC-Linie WTC11NGN2 dar, hier wurde jeden Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

4.2.1.1 Beschichtung der Kultivierungsmaterialien

4.2.1.1.1 HBVP/HRA/HA

Zur Kultivierung von HBVP, HRA sowie HA wurden die Kultivierungsmaterialien mit 2 µg/cm² Poly-L-Lysin in ddH₂O über Nacht bei 5 % CO₂ und 37 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die so beschichteten Kultivierungsmaterialien konnten bei 4 °C für 2 Wochen gelagert werden.

4.2.1.1.2 hCMEC/D3

Die Materialien zur Kultivierung von hCMEC/D3 wurden mit 0,1 mg/ml Kollagen I in ddH₂O für 1 h bei 5 % CO₂ und 37 °C beschichtet und daraufhin einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Das beschichtete Kultivierungsmaterial konnte bei 4 °C für 1 Woche gelagert werden.

4.2.1.1.3 HM

Zur Kultivierung der HM wurden die Kultivierungsmaterialien mit 5 µg/cm² Kollagen I für 30 min bei 5 % CO₂ und 37 °C beschichtet und daraufhin einmal mit DPBS⁻ gewaschen.

4.2.1.1.4 HRMVEC

Die Kultivierung der HRMVEC erfolgte prinzipiell ohne Beschichtung. Jedoch wurde im Rahmen dieser Arbeit die Adhäsion sowie das Wachstum auf Fibronectin, Kollagen I, Gelatine, Vitronectin und Laminin getestet. Zur Herstellung der 0,1 mg/ml Kollagen I-Lösung, 1 mg/ml Gelatinelösung und 5 µg/ml Vitronectinlösung wurde DPBS⁻ verwendet. Dagegen wurde die 1 mg/ml Lamininlösung in DPBS^{+/+} angesetzt und die 1 mg/ml Fibronectinlösung unverdünnt verwendet. Die Lösungen wurden im 24-Well in einem Volumen von 400 µl und im *µ-Slide 8 Well* in einem Volumen von 200 µl eingesetzt und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend konnte die Lamininbeschichtung mit DPBS^{+/+} und die weiteren Beschichtungen mit DPBS⁻ gewaschen werden.

4.2.1.1.5 iPSC (HD11 und WTC11NGN2)

Die Materialien zur Kultivierung der iPSC-Linien HD11 und WTC11NGN2 wurden mit Matrigel hESC in einer Verdünnung von 1:100 in 1 ml DMEM/F12 (für HD11) sowie in 1 ml KnockOutTM DMEM (für WTC11NGN2) für 30-60 min bei RT oder bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Das Matrigel wurde dabei auf Eis aufgetaut. Bei einer Verdünnung in DMEM/F12 wurde zweimal mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen. Die Kultivierung der iPSC erfolgte in Wells einer 6-Well-Platte.

4.2.1.1.6 iPSC differenzierte Neuronen

Zur Differenzierung und Kultivierung von iPSC-differenzierten Neuronen wurden die Kultivierungsmaterialien (24-Well: 300 µl, *µ-Slide 8 Well*: 200 µl) mit Matrigel hESC in einer Verdünnung von 1:100 in DMEM/F12 für 30 min beschichtet. Das Matrigel wurde dabei auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde einmal mit DMEM/F12 gewaschen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten zur Kultivierung der Neuronen auch Beschichtungen mit PLO/Lam, PLL/Lam und Matrigel GFR (24-Well-Platte). Das Matrigel GFR wurde in einer Verdünnung von 1:100 in DMEM/F12 eingesetzt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Beschichtung des Kultivierungsmaterials mit PLL/Lam sowie PLO/Lam wurden PLL in einer Konzentration von 2 µg/cm² und PLO in einer Konzentration von 0,01 % (unverdünnt) verwendet. Es folgte eine Beschichtung der 24-Well-Platten mit einem Volumen von 300 µl für 1 h bei 5 % CO₂ und 37 °C. Anschließend wurde die Lösung abgenommen, dreimal mit ddH₂O gewaschen und die Beschichtung an der Luft getrocknet. Nach dem die Oberflächen trocken waren, konnte Laminin in einer Konzentration von 10 µg/ml in 300 µl ddH₂O hinzugefügt werden. Dies inkubierte für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Beschichtung wurde anschließend abgenommen und zur Differenzierung von Neuronen eingesetzt.

4.2.1.2 Kultivierung der Zellen

4.2.1.2.1 Immortalisierte und primäre Zellen

Nachdem die Zellen in den T75-Kultivierungsflaschen eine Konfluenz von 90 % erzielten, wurden diese passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium abgenommen und einmal mit 10 ml DPBS⁻ gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA und einer Inkubation von 2-5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ enzymatisch abgelöst. Durch Zugabe der doppelten Menge an Nährmedium wurde die Trypsinierung gestoppt und in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Anschließend wurde zweimal mit 2 ml Medium gespült, um die verbleibenden Zellen zu sammeln. Die Zellsuspension im Zentrifugen-Röhrchen wurde bei 1200 rpm für 2 min zentrifugiert. Währenddessen wurde die Zellzahl der Suspension mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach erfolgter Zentrifugation konnten die Zellen im benötigten Mediumvolumen resuspendiert und für Experimente oder einer Weiterkultivierung ausgesät werden.

4.2.1.2.2 iPSC-Linie HD11

Nachdem die Kolonien der iPSC-Linie HD11 eine Konfluenz von 80 % erzielten (nach ca. 7 Tagen), wurden diese manuell passagiert. Hierfür wurden mithilfe eines Lichtmikroskops die iPSC Kolonien mit einer 100 µl Pipettenspitze vorsichtig geteilt und abgelöst. Anschließend wurden diese in ein neues mit Matrigel hESC beschichtete Well einer 6-Well-Platte und iPSC KM in einem Volumen von 2 ml überführt. Darüber hinaus wurden alle 2 Tage differenzierte Ausläufer der Kolonien mithilfe einer 10 µl Pipette entfernt. Danach konnten die Kolonien jeweils zweimal mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen und in ihrem spezifischen Nährmedium weiterkultiviert werden.

4.2.1.2.3 iPSC-Linie WTC11NGN2

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 % erfolgte eine Passagierung der Kolonien der iPSC-Linie WTC11NGN2. Hierzu wurde das Medium abgenommen und einmal mit 2 ml DPBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml StemPro™ Accutase™ und einer Inkubation für 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ enzymatisch abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt, auf 10 ml mit DPBS^{+/+} aufgefüllt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Zellen in 1-2 ml DPBS^{+/+} resuspendiert, die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend für eine Differenzierung (Zellzahl $2 \cdot 10^5$) oder zur Weiterkultivierung (Zellzahl $3 \cdot 10^5$) in beschichtete Wells einer 6-Well-Platte im entsprechenden Medium ausgesät. Darüber hinaus wurde bei einer Passagierung der Zellen der ROCK Inhibitor in einer Konzentration von 10 µM hinzugefügt.

4.2.1.2.4 EZ spheres

EZ spheres wurden einmal wöchentlich geschnitten, um die Ausbildung eines nekrotischen Kerns im Zellaggregat zu verhindern. Hierfür wurden die Aggregate aus den Zellkulturflaschen in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nach 2-3 min setzten sich die Aggregate am Boden ab, sodass das überschüssige Medium abgenommen werden konnte. Daraufhin wurden die Aggregate in Plastikschaalen überführt und dort mithilfe einer Rasierklinge geschnitten. Die Platte wurde um

90° gedreht und anschließend erneut geschnitten, um würfelartige Fragmente herzustellen. Die Zellfragmente wurden daraufhin mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen, um vereinzelte nekrotische Zellen abzutragen. Danach wurden ca. 200 geschnittene Aggregate in eine neue Zellkulturflasche mit einer nicht-adhäsiven Oberfläche in 20 ml *EZ sphere* Differenzierungsmedium überführt. Die Passage wurde dabei um 1 erhöht.

4.2.1.3 Differenzierung von Neuronen

4.2.1.3.1 Differenzierung von Neuronen aus der iPSC-Linie HD11

Die Differenzierung der Neuronen erfolgte nach Ebert *et al.*²⁹⁴ Für die Generierung von *EZ spheres* wurden die iPSC-Kolonien aus mindestens einem Well einer 6-Well-Platte verwendet. Zur enzymatischen Ablösung der Kolonien wurde 1 ml Dispase hinzugegeben und für 8 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Koloniefragmente in Zellkulturflaschen mit einer nicht-adhäsiven Oberfläche in 20 ml spezifischem *EZ sphere* Differenzierungsmedium überführt. Nach einer Kultivierung von mindestens 4 Wochen wiesen *EZ spheres* NSC-Eigenschaften auf und konnten zur Differenzierung der Neuronen verwendet werden. Hierfür wurden die *EZ spheres* in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt. Nachdem sich die Aggregate am Boden absetzten, wurde das überschüssige Medium abgenommen. Anschließend konnte mit DPBS⁻ gewaschen werden. Zur Generierung von Einzelzellen, wurden die *EZ spheres* mit 2 ml StemPro™ Accutase™ für 10 min bei RT enzymatisch behandelt. Daraufhin wurden die Fragmente durch starkes Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Nachdem 4 ml vorgewärmtes Differenzierungsmedium der Neuronen (M7 oder M7 1:1 BM) hinzugefügt wurde, konnten die Zellen bei 1000 rpm für 4 min zentrifugiert werden. Das Pellet wurde in 1 ml Differenzierungsmedium der Neuronen resuspendiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Differenzierung in Neuronen wurden 2,5·10⁴ Zellen/cm² in beschichtete Kultivierungsmaterialien in M7 oder M7 1:1 BM ausgesät. Nach einer Kultivierung von 2 Wochen waren die Neuronen ausdifferenziert.

4.2.1.3.2 Differenzierung von Neuronen aus der iPSC-Linie WTC11NGN2

Die Differenzierung der Neuronen erfolgte nach Fernandopulle *et al.*³³¹ Zur Differenzierung der iPSC-Linie WTC11NGN2 in Neuronen wurden 2·10⁵ Zellen, wie in Kapitel 4.2.1.2.3 beschrieben, in einem beschichteten Well einer 6-Well-Platte in 2 ml des Differenzierungsmediums NIM ausgesät. Durch Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin wurde die Differenzierung initiiert. Nach einer dreitägigen Kultivierung der Zellen im NIM und täglichem Mediumwechsel konnten diese enzymatisch abgelöst werden. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellschicht mit 2 ml DPBS⁻ gewaschen. Anschließend wurde 1 ml StemPro™ Accutase™ hinzugefügt und für 2 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt, auf 10 ml mit DPBS^{+/+} aufgefüllt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in DPBS^{+/+} gelöst und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur endgültigen Differenzierung wurden 3·10⁵ Zellen in Wells einer 6-Well-Platte und 2-5·10⁴ Zellen in *µ-Slide 8 Wells* im Differenzierungsmedium CM ausgesät. Nach 7 Tagen waren die Neuronen ausdifferenziert.

4.2.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Eine langfristige Lagerung der Zellen wurde mithilfe eines Stickstoffreservetanks ermöglicht. Hierfür wurde ein Zellpellet ($1-2 \cdot 10^6$ Zellen) in 0,5-1 ml des spezifischen Einfriermediums resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Mithilfe des Nalgene® Mr. Frosty wurden die Zellen im Kryoröhrchen bei -80 °C sukzessive eingefroren und in Stickstoff bei -196 °C langfristig gelagert. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese entweder direkt ins spezifische Nährmedium zur Adhäsion überführt oder über einen Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 2-5 min) vom toxischen DMSO befreit. Bei erster Variante erfolgte ein Mediumwechsel frühestens nach 3 h, aber spätestens nach 12 h. Beim Auftauen der iPSC wurden $10\text{ }\mu\text{M}$ ROCK Inhibitor hinzugefügt. Generell wurde die Passage nach dem Auftauen um 1 erhöht.

4.2.2 Transwell-System

Zur Rekonstruktion der funktionellen Einheiten wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit transparenten Transwell-Systemen im 24-Well-Format gearbeitet. Die Porengröße betrug für iBRB/rNVU-Modelle $3\text{ }\mu\text{m}$ und für BBB/NVU-Modelle $0,4\text{ }\mu\text{m}$. Um die Zellen korrekt zu versorgen, wurde das zellspezifische Medium in einem Volumen von $300\text{ }\mu\text{l}$ (apikal) und 1 ml (basal) jeden 2. bis 3. Tag gewechselt.

4.2.2.1 Etablierung des iBRB/rNVU-Modells im Transwell

Zur Etablierung eines Kokultur-Modells der rNVU wurden HRMVEC (Passage 4-9), HRA (Passage 3-8) und HBVP (Passage 5-8) verwendet. Zur Beschichtung des Transwell-Systems, wurde dieses apikal mit $50\text{ }\mu\text{l}$ einer 1 mg/ml Fibronectinlösung und basal mit $400\text{ }\mu\text{l}$ einer $0,6\text{ mg/ml}$ Kollagen I-Lösung für 1 h bei 37 °C und 5% CO_2 beschichtet. Anschließend wurde das Transwell um 180° gedreht positioniert und mit $3 \cdot 10^4$ HBVP in $20\text{ }\mu\text{l}$ EGM-2 im basalen Bereich besiedelt. Nach 3 h wurde das Transwell in die Ausgangsposition gebracht, mit EGM-2 gefüllt und über Nacht bei 5% CO_2 und 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Einbringung von $3 \cdot 10^4$ HRA in $20\text{ }\mu\text{l}$ EGM-2 nach demselben Prinzip. Nach 3 h wurde das Transwell erneut in die horizontale Position gebracht und über Nacht in EGM-2 inkubiert. Daraufhin erfolgte die Besiedlung des apikalen Kompartiments mit $3 \cdot 10^4$ HRMVEC in $300\text{ }\mu\text{l}$ EGM-2. Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Nach 7 Tagen war das rNVU-Modell vollständig ausgebildet.

4.2.2.2 Etablierung des BBB/NVU-Modells im Transwell

Zur Rekonstruktion der BBB/NVU wurden hCMEC/D3 (Passage 5), HBVP (Passage 5), HA (Passage 5), HM (Passage 4-7) und Neuronen (aus iPSC P140-180 differenziert) verwendet. Zur Beschichtung des Transwell-Systems, wurde dieses zunächst apikal mit $200\text{ }\mu\text{l}$ einer $0,1\text{ mg/ml}$ sowie basal mit $400\text{ }\mu\text{l}$ einer $0,6\text{ mg/ml}$ Kollagen I-Lösung für 1 h bei 37 °C und 5% CO_2 beschichtet. Zur Einbringung von $2 \cdot 10^4$ HBVP in $20\text{ }\mu\text{l}$ KM in den basalen Bereich wurde das Transwell um 180° gedreht positioniert. Nach 3 h wurde das Transwell in die Ausgangsposition zurückgedreht und in KM über Nacht bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurden

$2 \cdot 10^4$ HA simultan mit $0,4 \cdot 10^4$ HM in 20 μ l KM nach demselben Prinzip in den basalen Bereich ausgesät und das Transwell nach 3 h in die Ausgangslage versetzt. 24 h später wurde der basale Bereich mit 300 μ l Matrigel hESC (1:100) für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet und mit $0,6 \cdot 10^4$ Neuronen in 20 μ l M7 1:1 BM nach demselben Prinzip besiedelt. Nach 3 h folgte eine Kultivierung in der Ausgangslage in M7 1:1 BM. Dabei wurde alle 2-3 Tage das Medium ausgetauscht. Nach 7 Tagen wurden $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in 300 μ l KM apikal eingebracht. Dabei konnte nach 3 h das Medium auf M7 1:1 BM gewechselt werden. Das so aufgebaute BBB/NVU-Modell war 7 Tage nach Einbringung der hCMEC/D3 ausgebildet.

Für das *Non-contact co-culture system* erfolgte neben der Beschichtung im apikalen Bereich eine Beschichtung im basalen Bereich. Zudem wurden dieselben Zellzahlen auf der Kultivierungsoberfläche der 24-Well-Platte (basal) in einem Volumen von 1 ml ausgesät. Die Besiedlung des apikalen Bereiches erfolgte wie zuvor beschrieben.

4.2.2.3 TEER-Messung

Zur TEER-Messung wurden die gewünschten vaskulären Modelle, inklusive Endothel in einem Transwell-System vorbereitet. Vor der Benutzung sollte das Messgerät (EVOM3 mit STX2-Plus Elektrode) mithilfe des beiliegenden Testwiderstands kalibriert und die Elektroden nach Bedarf mit herkömmlicher Bleiche für 15 min gesäubert werden. Danach wurden die Elektroden mit 70 % Ethanol desinfiziert und sterilem ddH₂O gespült. Anschließend konnten die präferierten Einstellungen am TEER-Gerät überprüft und gegebenenfalls angepasst werden (*Mode units: OHMS Rang: 100.000, Well-Platten-Größe: 24-Well, Open electrodes: Short*). Daraufhin wurde in das apikale beziehungsweise basale Kompartiment des Transwell-Systems jeweils eine Elektrode des TEER-Messgeräts platziert. Wichtig hierbei war, dass die Membran der Elektroden vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Die elektrischen Widerstände konnten anschließend ermittelt werden. Jede Probe wurde dabei in unabhängigen Triplikaten gemessen und jeweils ein Blank (beschichtetes Transwell-System ohne Zellen) verwendet. Nach Beendigung der Messung wurden die Elektroden erneut mit 70 % Ethanol gesäubert, mit ddH₂O gespült und an der Luft vor Licht geschützt getrocknet. Die erhaltenen Werte wurden in Differenz zum Blank ermittelt und anschließend auf die Oberfläche des Transwell-Systems normiert (Gleichung (3) und (4) in Kapitel 3.2.2.1.4.1).

4.2.3 Organ-on-a-chip System vasQchip

Zur Etablierung der iBRB/rNVU-Modelle im vasQchip wurde eine Porengröße von 3 μ m und für BBB/NVU-Modelle eine Porengröße von 1-2 μ m verwendet.

4.2.3.1 Herstellung

Die PC-Mikrokanäle wurden nach der am KIT entwickelten SMART-Technologie von der Firma 300 microns produziert.⁷³ Dazu wurden PC-Folien durch Schwerionenbeschuss modifiziert und anschließend halbrunde Mikrokanäle durch einen Druck von 4 bar sowie einer Temperatur von

147 °C (Thermoformen) geformt. Anschließend konnte die latente Ionenspur durch nasschemisches Ätzen sowie durch Zugabe von 0,01 % Dowfax 2A1™ geöffnet werden. Dabei bestimmte die Dauer der Ätzeit die Porengröße. Im Anschluss wurden die Mikrokanäle auf Spritzguss-geformte PC-Blöcke (Firma Hoffmann GmbH) mithilfe von Laserschweißen (Firma 300 microns) angebracht.

4.2.3.2 Handhabung

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die vasQchips mit einem Klebering (Ø: 34 mm) versehen und das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Deckglases (Ø: 32 mm) verschlossen (Abbildung 130). Vor Gebrauch wurde der vasQchip mithilfe von UV-Strahlung sterilisiert. Dagegen wurden die Schläuche der Mikrofluidik mit 70 % Ethanol gewaschen, für mindestens 24 h in 70 % Ethanol gelagert und anschließend autoklaviert.

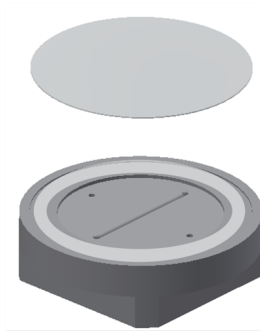


Abbildung 130: Assemblierung des vasQchips. Der vasQchip wurde mit einem 500 µm dicken Klebering versehen. Durch anschließende Anbringung eines Deckglases konnte das umgebende Kompartiment verschlossen werden.

4.2.3.2.1 Beschichtung des Mikrokanals

Die Beschichtung des Mikrokanals (Länge: 20 mm, Breite: 1 mm, Höhe: 300 µm, 10⁶ Poren/cm²) erfolgte unter Vermeidung von Luftblasen durch Zugabe von 50-200 µl einer Beschichtungslösung. Dies inkubierte für 1 h bei 5 % CO₂ und 37 °C oder RT. Danach wurde der Mikrokanal zweimal mit 200 µl DPBS⁻ gewaschen und anschließend mit 200 µl zellspezifischem Medium gespült. Anschließend wurden die Anschlüsse des vasQchips mit Medium gefüllt und der vasQchip über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert.

4.2.3.2.2 Beschichtung des umgebenden Kompartiments

Das umgebende Kompartiment (Ø: 24 mm, Höhe: 500 µm) wurde durch 500 µl Beschichtungslösung für 1 h bei 5 % CO₂ und 37 °C oder RT beschichtet. Anschließend wurde das Kompartiment zweimal mit 500 µl DPBS⁻ gewaschen und mit 1 ml zellspezifischem Medium durchspült. Daraufhin wurden die Anschlüsse des vasQchips mit Medium gefüllt und der vasQchip über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert.

4.2.3.2.3 Besiedlung des Mikrokanals

Zur Auskleidung des Mikrokanals wurden Endothelzellen der gewünschten Zellzahl in 20 µl zellspezifischem Medium in den Mikrokanal luftblasenfrei eingebracht. Dazu wurden die Anschlüsse des Kanals leer gezogen, und die Zellsuspension schnell in den Mikrokanal pipettiert. Daraufhin wurde der Fluss der Zellen im Mikrokanal lichtmikroskopisch kontrolliert. Für eine vollständige homogene Auskleidung des Mikrokanals wurde der vasQchip bei 5 % CO₂ und 37 °C für 1 h mit 0,25 rpm im vasQturn um seine eigene Achse gedreht. Anschließend konnte der Anschluss des Mikrokanals mit 200 µl Medium gefüllt und nach 2-3 h Regeneration an die Mikrofluidik angeschlossen werden.

4.2.3.2.4 Besiedlung des umgebenden Kompartiments

Zur Besiedlung des umgebenden Kompartiments wurde die gewünschte Zellkonzentration in 500 µl spezifischem Medium möglichst luftblasenfrei durch den Anschluss eingebracht. Um das Anwachsen der Zellen auf der PC-Membran (Rückseite des Mikrokanals) sicherzustellen, wurde nach Einbringung der Zellen der vasQchip um 180° gedreht positioniert und leicht auf das Deckglas geklopft. Das Anwachsen der Zellen wurde für mindestens 3 h in dieser Position bei 5 % CO₂ und 37 °C sichergestellt. Anschließend konnte der vasQchip in die Ausgangsposition gebracht werden und mit weiteren Zelltypen besiedelt oder an die Mikrofluidik angeschlossen werden. Ein Mediumwechsel erfolgte hierbei alle 2-3 Tage.

Zur Etablierung des NVU-Modells einschließlich Neuronen erfolgte eine Beschichtung sowie Besiedlung des umgebenden Kompartiments zunächst „offen“ um 180° gedreht ohne Klebering und Deckglas.

4.2.3.3 Anschluss an die Mikrofluidik

Alle verwendeten Schläuche, Spritzen sowie Zentrifugen-Röhrchen wurden am Vortag mit spezifischem Medium befüllt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Am nächsten Tag wurden sowohl die vasQchips als auch die Schläuche beziehungsweise Spritzen auf Luftblasen untersucht und diese nach Bedarf entfernt. Daraufhin konnte jeweils ein Schlauch mit dem Einlass und Auslass des Mikrokanals im vasQchip verbunden werden. Dagegen wurde das umgebende Kompartiment mit *Plugs* verschlossen. Anschließend konnte das Pumpensystem nach Einstellung der gewünschten Flussrate und weiterer Parameter gestartet werden. Für das iBRB/rNVU-Modell wurde die Peristaltikpumpe und für das BBB/NVU-Modell die Spritzenpumpe verwendet.

4.2.3.3.1 Spritzenpumpe Fusion 200 Chemyx

Zur Kultivierung bei niedrigen Flussraten (maximal 100 µl/h) wurde die Spritzenpumpe verwendet. Dabei wurde der dafür vorgesehene Schlauch mit dem Einlass des Mikrokanals verbunden. Am anderen Ende des Schlauches war eine 10 ml Spritze angeschlossen. Nach Einstellung des Spritzendurchmessers, gefülltem Volumen, Flussrate (100 µl/h) sowie dem Modus „*Infusion*“ konnte die Spritzenpumpe gestartet werden. Dabei wurde das Medium aus der Spritze konstant durch den Mikrokanal gepumpt. Ein Schlauch am Auslass des Mikrokanals führte in ein

Auffangbehälter (Abbildung 131), welcher alle 7 Tage ausgetauscht wurde, um Kontaminationen vorzubeugen. Das Medium in den Spritzen wurde alle 2-3 Tage nachgefüllt.

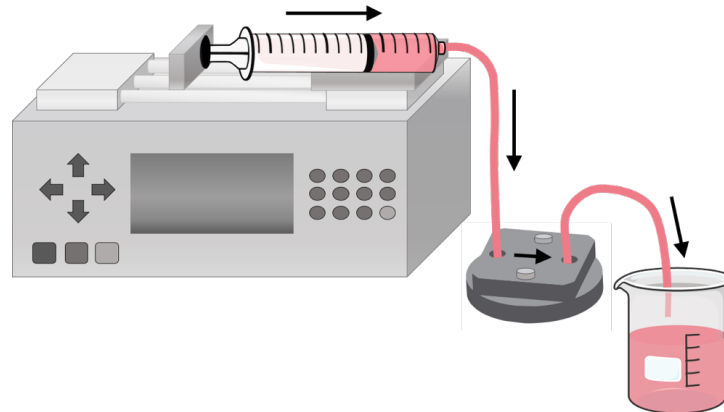


Abbildung 131: Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kultivierung von vasQchips mit der Spritzenpumpe.

4.2.3.3.2 Peristaltikpumpe perISYS Cetoni

Für höhere Flussraten wurde die Peristaltikpumpe verwendet. Hierzu wurde das vorgesehene Schlauchende mit dem Einlass des Mikrokanals im vasQchip verbunden. Das andere Ende des Schlauches führte in ein mit 5 ml befülltes Zentrifugen-Röhrchen, welches als Reservoir fungierte. Der Auslass des vasQchips wurde mit einem Schlauch verbunden, der in der Pumpe eingeklemmt wurde und im Reservoir endete (Abbildung 132). Somit konnte eine Art Luftblasenfalle erzeugt werden. Zur mikrofluidischen Kultivierung der iBRB/rNVU-Modelle wurde eine Flussrate von maximal 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt. Dabei wurde bei einem Volumenstrom von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ begonnen, welcher stündlich um 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ erhöht wurde. Das Reservoir sowie der vasQchip wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Das Medium im Reservoir wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

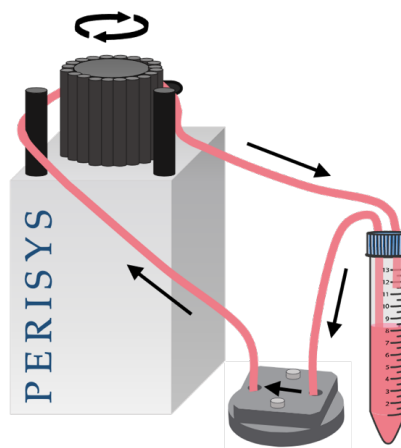


Abbildung 132: Schematische Darstellung der mikrofluidischen Kultivierung von vasQchips mit der Peristaltikpumpe.

4.2.3.4 Etablierung der iBRB/rNVU im vasQchip

Zur Etablierung eines Kokultur-Modells der rNVU wurden HRMVEC (Passage 4-9), HRA (Passage 3-8) und HBVP (Passage 5-8) verwendet. Hierzu wurde der Mikrokanal mit 50 μ l einer 1 mg/ml Fibronectinlösung und das umgebende Kompartiment mit 500 μ l einer 0,6 mg/ml Kollagen I-Lösung für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Anschließend wurde der Mikrokanal und das umgebende Kompartiment gewaschen und mit EGM-2 gefüllt. Daraufhin konnten $9,5 \cdot 10^5$ HBVP in das umgebende Kompartiment in EGM-2 ausgesät werden. Der vasQchip wurde hierfür um 180° gedreht positioniert und nach 3 h in die Ausgangsposition gebracht. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $9,5 \cdot 10^5$ HRA in EGM-2 nach demselben Prinzip (Drehung um 180°). 24 h später wurden $1 \cdot 10^5$ HRMVEC in den Mikrokanal eingebracht. Es folgte ein Anschluss an die Peristaltikpumpe bei einer maximalen Flussrate von 100 μ l/min. Als Kultivierungsmedium wurde EGM-2 verwendet.

4.2.3.5 Etablierung der BBB/NVU im vasQchip

Zur Rekonstruktion der BBB/NVU wurden hCMEC/D3 (Passage 5), HBVP (Passage 5), HA (Passage 5), HM (Passage 4-7) und Neuronen (aus iPSC P140-180 differenziert) verwendet. Hierfür wurde der vasQchip „offen“ um 180° gedreht positioniert und mit 500 μ l einer 0,6 mg/ml Kollagen I-Lösung für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Daraufhin wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP in 500 μ l KM ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte eine Einbringung von $5 \cdot 10^5$ HA sowie $1 \cdot 10^5$ HM in 500 μ l KM. 24 h später wurde mit 500 μ l Matrigel hESC für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ beschichtet. Anschließend wurden $16,7 \cdot 10^4$ NSC in 500 μ l M7 1:1 BM ausgesät. Nach 48 h wurde das umgebende Kompartiment verschlossen und bei einer Flussrate von 100 μ l/h mikrofluidisch kultiviert. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurde der Mikrokanal mit 200 μ l einer 0,1 mg/ml Kollagen I-Lösung für 1 h bei 5 % CO₂ und 37 °C beschichtet und mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in 20 μ l KM besiedelt. Anschließend erfolgte der Anschluss an die Spritzenpumpe und eine fluidische Kultivierung bei 100 μ l/h.

4.2.3.5.1 Einbringung eines 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels einschließlich Neuronen in das NVU-Modell

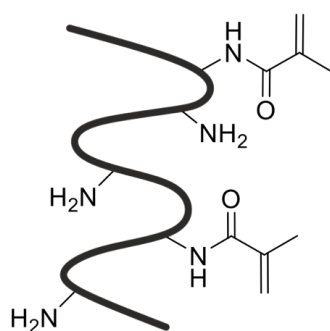
Nachdem das NVU-Modell (ohne Neuronen), wie in Kapitel 4.2.3.5 beschrieben, vorbereitet wurde, konnten 500 μ l eines 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels einschließlich NSC der Zellkonzentration $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml durch den Anschluss in das umgebende Kompartiment eingebracht werden. Die Vernetzung sowie die genaue Zusammensetzung des Hydrogels sind in Kapitel 4.2.4.2.3 aufgeführt. Anschließend wurden die vasQchips an die Spritzenpumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von 100 μ l/h fluidisch kultiviert.

4.2.4 Hydrogele

4.2.4.1 Chemische Synthesen der Gelatine-basierten Hydrogele

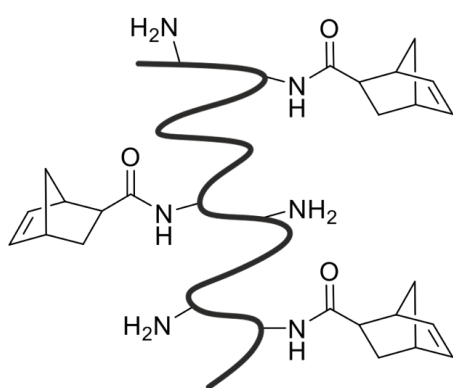
Die Synthesen von GelMA und GelNB/GelS erfolgten durch chemische Modifizierung der Lysinseitenketten der Gelatine.

4.2.4.1.1 GelMA



Die Synthese des Photopolymers GelMA erfolgte nach Van Den Bulcke *et al.*²³⁸ Hierfür wurde 1 g Gelatine (\approx 0,266 mmol NH₂-Gruppen) in 10 ml DPBS⁻ bei 50 °C unter ständigem Rühren gelöst. Daraufhin konnte das gewünschte Volumen an MAA 39,5 μ l (*Low*, 0,266 mmol, 1 Äq), 316 μ l (*Medium*, 2,128 mmol, 8 Äq) oder 790 μ l (*High*, 5,32 mmol, 20 Äq) tropfenweise hinzugefügt werden. Anschließend wurde das Gemisch für 2 h bei 50 °C gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde 10 ml erwärmtes DPBS⁻ hinzugefügt und weitere 10 min bei 50 °C gerührt. Daraufhin konnte die Reaktionslösung in vorbereitete Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt werden. Es folgte eine Dialyse gegen ddH₂O, wobei zweimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Nach 7 Tagen wurde die Lösung in Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei -80 °C tiefgefroren. Daraufhin konnte die gefrorene Lösung lyophilisiert werden bis ein weißer styroporartiger Feststoff entstand, der bei -20 °C gelagert wurde. Die Charakterisierung der GelMA-Hydrogele erfolgte durch M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) und M. Sc. S. Leopold (IFG, KIT). Dabei konnten verschiedene Funktionalisierungsgrade der GelMA-Polymere erzielt werden: *Low* (1 Äq, DoF 30 %), *Medium* (8 Äq, DoF 52 %) sowie *High* (20 Äq, DoF 70 %).

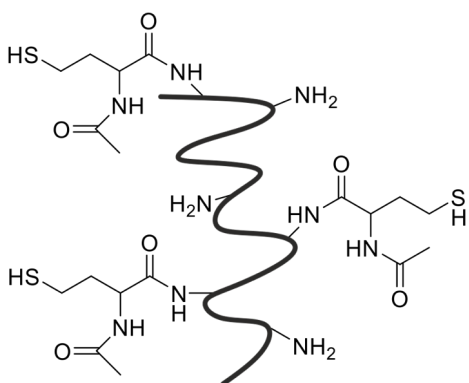
4.2.4.1.2 GelNB



Die Synthese und Charakterisierung von GelNB erfolgten ausschließlich durch M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) sowie M. Sc. S. Leopold (IFG, KIT). Zur Synthese von GelNB wurden 326 μ l 5-Norborne-2-Carbonsäure (368 mg, 2,66 mmol, 10 Äq) in 10-20 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst. Daraufhin konnte das Gemisch durch Zugabe von 1,02 g EDC-HCl (5,32 mmol, 20 Äq) und 0,31 g NHS (2,66 mmol, 10 Äq) aktiviert werden. Anschließend wurde das Gemisch 15 min bei einer Temperatur von 50 °C gerührt. Es folgte die Zugabe von 1 g Gelatine (0,266 mmol NH₂-Gruppen, 1 Äq), wobei mit 10 M NaOH ein pH-Wert von 7,5-7,8 eingestellt wurde. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 50 °C unter ständigem Rühren. Anschließend wurde die Reaktionslösung in vorbereitete Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt und für 7 Tage gegen ddH₂O bei 40 °C dialysiert. Dabei wurde das Wasser zweimal täglich gewechselt. Danach konnte die Lösung in Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert

werden. Die Lösung wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend lyophilisiert bis ein weißer styroporartiger Feststoff erhalten wurde, der bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde. Durch eine Variation der Mengen an NHS (0,3 Äq, 2 Äq, 10 Äq), 5-Norbornen-2-Carbonsäure (0,3 Äq, 2 Äq, 10 Äq) und EDC-HCl (0,6 Äq, 4 Äq, 20 Äq) konnten verschiedene Funktionalisierungsgrade der GelNB-Polymere erzielt werden: *Low* (DoF $20 \pm 2\%$), *Medium* (DoF: $53 \pm 1\%$) und *High* (DoF: $97 \pm 1\%$).

4.2.4.1.3 Gels



Die Synthese und Charakterisierung von Gels erfolgten ausschließlich durch M. Sc. A. Grimm (IFG, KIT) sowie M. Sc. S. Leopold (IFG, KIT) und wurde nach Van Vlierberghe *et al.* durchgeführt.⁴³⁶ Zur Synthese von Gels wurde 1 g Gelatine (0,266 mmol NH_2 -Gruppen, 1 Äq) unter Zugabe von 1 mM EDTA in 10-20 ml 0,1 M Natriumcarbonat-Bicarbonat-Puffer (entgast, CO_2 -frei, pH-Wert 10) bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Rühren gelöst. Anschließend wurden 0,212 g N-Acetyl-DL-Homocysteinthiolacton (1,33 mmol, 5 Äq) hinzugefügt und für 3 h bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter

Schutzgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 10 ml ddH₂O verdünnt und in vorbereitete Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt. Es folgte eine Dialyse für 24 h gegen ddH₂O unter einer Schutzgasatmosphäre bei einer Temperatur von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dabei wurde der Wasserwechsel drei bis viermal durchgeführt. Im Anschluss wurde die Lösung in Zentrifugen-Röhrchen überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren und anschließend lyophilisiert. Der erhaltene weiße Feststoff konnte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schutzgas gelagert werden. Durch Variation der Menge an N-Acetyl-DL-Homocystein-Thiolacton konnten zwei verschiedene Funktionalisierungsgrade der Gels-Polymere erhalten werden: *Low* (1 Äq, DoF: $20 \pm 3\%$) und *Medium* (5 Äq, DoF: $50 \pm 3\%$).

4.2.4.2 Herstellung und Vernetzung der Hydrogele

4.2.4.2.1 GelMA

Um eine 10%ige (w/v) Stammlösung herzustellen wurde das lyophilisierte GelMA mit gewünschtem Funktionalisierungsgrad in DPBS^{-/-} bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden GelMA-Hydrogele in einer Endkonzentration von 5% (w/v) und LAP in einer Endkonzentration von 0,3% (w/v) sowie ein Gesamtvolumen von 200 μl in $\mu\text{-Slide 8 Wells}$ eingesetzt. Zur Einbettung der Zellen wurde das gelöste GelMA, LAP sowie spezifisches Nährmedium inklusive der Zellsuspension ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml) vermischt (Tabelle 1). Die Vernetzung des Hydrogels erfolgte durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm^2 sowie einer Bestrahlungsdauer von 30 s (Omnicure S2000, 320-500 nm). Dabei wurde ein Abstand von 5 cm zur Strahlungsquelle eingestellt. Anschließend

wurden die ausgehärteten Hydrogele mit 200 µl spezifischem Medium überschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

Zur Generierung von GelMA-Hydrogelen gemischt mit Kollagen I, wurde das Volumen des Nährmediums angepasst.

Tabelle 1: Zusammensetzung für 1 ml Photopolymerlösung.

Stammlösungen	GelMA <i>Low, Medium, High</i> (10 %)	LAP (10 %)	Medium inkl. Zellen
(w/v) im Hydrogel	5 %	0,3 %	-
für 1 ml Hydrogel	500 µl	30 µl	470 µl

4.2.4.2.2 GelNB/GelS

Zunächst wurden Stammlösungen der lyophilisierten GelNB/GelS-Polymere in entsprechenden Konzentrationen (GelNB 10 % und GelS 5 % (w/v)) in DPBS^{-/-} bei 50 °C hergestellt. Je nach gewünschtem Funktionalisierungsgrad (*Low, Medium, High*), wurde das dafür vorgesehene Volumen der gelösten Polymere zusammen mit LAP (0,03 % (w/v)) sowie dem Nährmedium inklusive der Zellsuspension (2,5·10⁶ Zellen/ml) vermischt (Tabelle 2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer GelNB/GelS-Hydrogelkonzentration von 5 % (w/v) sowie einem Gesamtvolumen von 200 µl in Wells einer 48-Well-Platte gearbeitet. Eine Vernetzung des Hydrogels wurde durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² sowie einer Bestrahlungsdauer von 30 s (Omniculture S2000, 320-500 nm) induziert. Hierbei wurde stets ein Abstand von 5 cm zur Strahlungsquelle beibehalten. Anschließend konnten die vernetzten Hydrogele mit 400 µl zellspezifischem Medium überschichtet werden. Ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung für 1 ml Photopolymerlösung.

Low

Stammlösungen	GelNB <i>Low</i> (0,3 Äq, 10 %)	GelS <i>Low</i> (1 Äq, 5 %)	LAP (10 %)	Medium inkl. Zellen
(w/v) im Hydrogel	2,5 %	2,5 %	0,03 %	-
für 1 ml Hydrogel	250 µl	500 µl	3 µl	247 µl

Medium

Stammlösungen	GelNB <i>Medium</i> (2 Äq, 10 %)	GelS <i>Medium</i> (5 Äq, 5 %)	LAP (10 %)	Medium inkl. Zellen
(w/v) im Hydrogel	2,5 %	2,5 %	0,03 %	-
für 1 ml Hydrogel	250 µl	500 µl	3 µl	247 µl

High

Stammlösungen	GelNB High (10 Äq, 10 %)	GelS Medium (5 Äq, 5 %)	LAP (10 %)	Medium inkl. Zellen
(w/v) im Hydrogel	1,73 %	3,27 %	0,03 %	-
für 1 ml Hydrogel	173 µl	655 µl	3 µl	169 µl

4.2.4.2.3 Kollagen I-Hydrogel

Zur Herstellung der Kollagen I-Hydrogele wurde Kollagen I (5 mg/ml), 10x DPBS^{-/-}, 1 M NaOH sowie das zellspezifische Medium inklusive der Zellsuspension (2,5·10⁶ Zellen/ml) im entsprechenden Volumen auf Eis vermischt (Tabelle 3). Dabei wurde in den *µ-Slide 8 Wells* sowie in den 48-Well-Platten mit einem Gesamtvolumen von 200 µl gearbeitet. Anschließend erfolgte eine Polymerisierung des Hydrogels für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach erfolgter Vernetzung wurden die Hydrogele mit jeweils 200 µl (*µ-Slide 8 Wells*) beziehungsweise 400 µl (48-Well-Platte) Medium überschichtet. Der Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tag durchgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung für 1 ml Kollagen I-Hydrogellösung.

Stammlösungen	Kollagen I (5 mg/ml)	DPBS ^{-/-} (10x)	NaOH (1 M)	Medium inkl. Zellen
1 mg/ml Kollagen I-Hydrogel	200 µl	100 µl	5 µl	695 µl
2 mg/ml Kollagen I-Hydrogel	400 µl	100 µl	5 µl	495 µl

4.2.5 3D-Bioprinting

Für das 3D-Bioprinting wurden NSC, wie in Kapitel 4.2.1.3.2 beschrieben, vorbereitet. Anschließend wurden diese in eine 5%ige GelNB/GelS-Hydrogellösung mit dem Funktionalisierungsgrad *Medium* (wie in Kapitel 4.2.4.2.2 beschrieben) eingebracht. Diese Biotinte wurde anschließend in eine Druckerkartusche überführt und bis zur Weiterverwendung 20 min bei RT gelagert. Danach konnte die Kartusche in den Extrusionsdruckkopf des 3D-Bioprinters (Biospot BP) eingesetzt werden. Es folgte die Anbringung einer Dosiernadel der Öffnung 250 µm. Daraufhin wurde die Temperatur mithilfe des Kühlsystems auf 22 °C eingestellt. Anschließend konnte die Biotinte mit einer Extrusionsrate von 0,02 mm/s und einer Druckgeschwindigkeit von 5 mm/s auf das gewünschte Objekt extrudiert werden. Danach wurden die gedruckten Strukturen durch eine 20-sekündige Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge (Omniculture S2000, 320-500 nm) bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm² photochemisch vernetzt.

Der 3D-Druck der Gitterstruktur erfolgte mithilfe von zwei Schichten auf einem Deckglas. Nach der photochemischen Aushärtung wurde das Deckglas in einer geeigneten Kultivierungsschale mit M7 1:1 BM kultiviert. Für den 3D-Druck auf dem vasQchip wurde dieser „offen“ ohne Klebering und Deckglas einschichtig bedruckt. Nach der Aushärtung konnte durch Anbringung

des Kleberings und des Deckglases das Kompartiment verschlossen werden. Anschließend wurde das umgebende Kompartiment mit M7 1:1 BM befüllt und bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ fluidisch kultiviert.

4.2.6 Visualisierung von Zellen und zellulären Strukturen

4.2.6.1 Fixierung der Zellen

Zur Fixierung der Zellen wurden diese zweimal mit eiskaltem DPBS^{+/+} gewaschen und mit einer 4%igen PFA-Lösung für 10 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen, um die restlichen Rückstände der PFA-Lösung abzutragen. Die Zellen konnten bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert werden. Das verwendete Volumen ist in Kapitel 4.2.6.6 aufgeführt.

4.2.6.2 Permeabilisierung der Zellen

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese nach der Fixierung mit einer 0,1%igen Triton-X-Lösung für 4 min bei RT behandelt. Anschließend wurde zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Die Zellen konnten bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert werden. Das verwendete Volumen ist in Kapitel 4.2.6.6 aufgeführt.

4.2.6.3 Färbung der Zellkerne

Zur Visualisierung der Zellkerne wurde eine Färbelösung mit Hoechst33342 in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ in DPBS^{-/-} (fixierte Zellen) oder Medium (vitale Zellen) angesetzt. Anschließend wurden die Zellen mit der Färbelösung für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Danach konnten die Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen werden. Daraufhin wurden die Zellkerne mithilfe inverser Konfokalmikroskopie visualisiert (λ_{ex} : 405 nm, λ_{em} : 415-480 nm). Das verwendete Volumen ist in Kapitel 4.2.6.6 aufgeführt.

4.2.6.4 Färbung des Aktinzytoskelett

Zur Färbung des Aktinzytoskeletts wurden die Zellen nach der Fixierung sowie Permeabilisierung mit Phalloidin-TRITC (100 nM in DPBS^{-/-}) für 40 min bei RT behandelt und zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Daraufhin konnte das Aktinzytoskelett der Zellen mithilfe inverser Konfokalmikroskopie visualisiert werden (λ_{ex} : 532 nm, λ_{em} : 545-625 nm). Das verwendete Volumen ist in Kapitel 4.2.6.6 aufgeführt.

4.2.6.5 Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen

Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden nach erfolgter Fixierung und Permeabilisierung der Zellen die unspezifischen Bindungsstellen mit CasBlock™ für 30 min bei RT blockiert. Anschließend konnte der primäre Antikörper in entsprechender Konzentration und Volumen in CasBlock™ zur Bindung der zelltypischen Strukturen hinzugefügt werden. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Daraufhin wurde die Antikörperlösung abgenommen und die

Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen. Im Anschluss konnte der sekundäre Antikörper in entsprechender Konzentration und Volumen zur spezifischen Bindung des primären Antikörpers in CasBlock™ hinzugegeben werden. Es folgte ebenfalls eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Auch der Anti-CD31-FITC Antikörper wurde zur Verstärkung des Signals mit einem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung abgenommen, die Zellen zweimal mit DPBS^{-/-} gewaschen und anschließend die zelltypischen Strukturen mithilfe inverser Konfokalmikroskopie visualisiert. Das verwendete Volumen ist in Tabelle 5 Kapitel 4.2.6.6 aufgeführt. In Tabelle 4 ist die Übersicht der verwendeten Antikörper dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten primären und sekundären Antikörper und ihre Konzentrationen sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Antikörper	Konzentration	λ_{ex}	λ_{em}
Anti- β -III Tubulin produced in mouse (ab7751, abcam)	1:1000	-	-
Anti-CD11b produced in rat (ab8878, abcam)	1:200	-	-
Anti-CD31 produced in sheep (AF806, R&D Systems)	5 μ g/ml	-	-
Anti-CD31-FITC produced in mouse (F8402, Sigma Aldrich® Merck KGaA)	1:100	488 nm	500-550 nm
Anti-FABP7 produced in rabbit (ABN14, Sigma Aldrich® Merck KGaA)	1:250	-	-
Anti-GFAP produced in rabbit (ab5804, Sigma Aldrich® Merck KGaA)	1:1000	-	-
Anti-Iba-1 produced in rabbit (A104332, antibodies.com)	1:2000	-	-
Anti-MAP2 produced in mouse (MAB3418, Sigma Aldrich® Merck KGaA)	5 μ g/ml	-	-
Anti-Nanog produced in mouse (ab62734, abcam)	1:1000	-	-
Anti-Nestin produced in rabbit (ab105389, abcam)	1:200	-	-
Anti-Oct-4 produced in rabbit (ab181557, abcam)	1:250	-	-
Anti-P-gp produced in mouse (C219, Enzo Life Sciences)	1:100	-	-
Anti-PAX6 produced in mouse (ab78545, abcam)	1:50	-	-

Anti-PAX6 produced in mouse (sc-81649, Santa Cruz Biotechnologies)	1:100	-	-
Anti-Synapsin I produced in rabbit (ab64581, abcam)	1:200	-	-
Anti-Synapsin I produced in rabbit (AB1543P, Sigma Aldrich® Merck KGaA)	1:500	-	-
Anti-TH produced in rabbit (ab75875, abcam)	1:50	-	-
Anti-VE-Cadherin produced in rabbit (ab33168, abcam)	5 µg/ml	-	-
Anti-ZO-1 produced in rat (sc-33725, Santa Cruz Biotechnologies)	1:500	-	-
Anti-α-SMA produced in mouse (ab54723, abcam)	10 µg/ml	-	-
Anti-α-SMA produced in mouse (14976082, Invitrogen™)	1:500	-	-

Sekundärantikörper	Konzentration	λ_{ex}	λ_{em}
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit (A21206, Invitrogen™)	1:500	488 nm	500-550 nm
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse (A11001, Invitrogen™)	1:1000	488 nm	500-550 nm
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat (A11006, Invitrogen™)	1:500	488 nm	500-550 nm
Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Sheep (A21099, Invitrogen™)	1:500	532 nm	600-630 nm
Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse (A11031, Invitrogen™)	4 µg/ml	532 nm	600-630 nm
Alexa Fluor® 647 Chicken Anti-Rabbit (A21443, Invitrogen™)	4 µg/ml	635 nm	650-700 nm 640-750 nm
Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rat (A21247, Invitrogen™)	1:500	635 nm	650-700 nm 640-750 nm
FITC Donkey Anti-Sheep (A16049, Invitrogen™)	1:500	488 nm	500-550 nm

4.2.6.6 Verwendete Volumina

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Volumina in den Kapiteln 4.2.6.1-4.2.6.5.

Waschschritte

Kultivierungsmaterial	Menge
<i>μ</i> -Slide 8 Wells	200 μ l
48-Well-Platte	200 μ l
24-Well-Platte	400 μ l
Transwell <i>Insert</i>	200 μ l
vasQchip Mikrokanal	400 μ l
vasQchip Kompartiment	1000 μ l

Fixierung, Permeabilisierung, Blockierung, Färbung von Zellkernen und Aktinzytoskelett

Kultivierungsmaterial	Menge
<i>μ</i> -Slide 8 Wells	200 μ l
48-Well-Platte	200 μ l
24-Well-Platte	400 μ l
Transwell <i>Insert</i>	200 μ l
vasQchip Mikrokanal	200 μ l
vasQchip Kompartiment	500 μ l

Immunfluoreszenzfärbung

Kultivierungsmaterial	Menge
<i>μ</i> -Slide 8 Wells	200 μ l
48-Well-Platte	200 μ l
24-Well-Platte	400 μ l
Transwell <i>Insert</i>	200 μ l
vasQchip Mikrokanal	200 μ l
vasQchip Kompartiment	500 μ l

4.2.6.7 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden mindestens $3 \cdot 10^6$ Zellen benötigt. Hierfür wurden die Zellen mithilfe der StemPro™ Accutase™ für 2-5 min enzymatisch abgelöst, wie in Kapitel 4.2.6.1 fixiert und wie in Kapitel 4.2.6.2 permeabilisiert. Für die Waschschritte wurde dabei statt DPBS^{-/-} 2 ml eiskalter FACS-Puffer (2 % FBS in DPBS^{-/-}) verwendet und die Zellen nach jedem einzelnen Waschschritt für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugationszeit konnten die Zellen auf drei Proben mit jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μ l eiskaltem FACS-Puffer in Zentrifugen-Röhrchen aufgeteilt werden. Es folgte eine Zugabe von Fc-Block in einer Verdünnung

von 1:50 und eine Inkubation von 30 min auf Eis, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die darauffolgenden Schritte sind jeweils in Kapitel 4.2.6.7.1 (iPSC) sowie in Kapitel 4.2.6.7.2 (EZ spheres und Neuronen) beschrieben.

4.2.6.7.1 Durchflusszytometrie von iPSC

Nach erfolgter Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen konnte der direkt gekuppelte Antikörper (PE Mouse anti-Oct3/4) in einer Konzentration von 1:5 zur ersten Probe hinzugefügt werden (Tabelle 6). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Zeitgleich wurden die Zellen in der zweiten Probe mit dem PE Mouse IgG1 (1:5) für eine Isotypkontrolle behandelt (Tabelle 6). Die Zellen in der dritten Probe blieben als Negativkontrolle unbehandelt. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und in 2 ml eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert/gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die drei Proben (Negativkontrolle, Isotypkontrolle und Antikörperfärbung) in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und danach mithilfe des FACS-Geräts (BD FACSAria™ Fusion) analysiert.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnungen sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Durchflusszytometrie mit iPSC.

iPSC

Antikörper	Verdünnung	λ_{ex}	λ_{em}
Anti-Oct-4-PE produced in mouse (560186, BD Biosciences)	1:5	565 nm	571-620 nm
PE Mouse Anti-IgG1, Isotypkontrolle (555749, BD Biosciences)	1:5	565 nm	571-620 nm

4.2.6.7.2 Durchflusszytometrie von Neuronen/EZ spheres

Nach erfolgter Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde der primäre Antikörper in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt (Tabelle 7). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und in 2 ml eiskaltem FACS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Daraufhin konnten die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert werden. Es folgte eine Zugabe des sekundären Antikörpers in entsprechender Konzentration (Tabelle 7) und eine Inkubation für 1 h auf Eis (vor Licht geschützt). Zeitgleich wurde die zweite Probe mit dem sekundären Antikörper (ohne primären Antikörper) behandelt. Die Zellen in der dritten Probe blieben als Negativkontrolle unbehandelt. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen erneut dreimal mit 2 ml eiskaltem FACS-Puffer und durch anschließende Zentrifugationsschritte gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die drei Proben (Negativkontrolle, sekundärer Antikörper (Kontrolle) und primäre/sekundäre Antikörperfärbung) mithilfe des FACS-Geräts (BD FACSAria™ Fusion) analysiert.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper, Verdünnungen sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Durchflusszytometrie mit *EZ spheres* und Neuronen.

EZ spheres

Antikörper	Verdünnung	λ_{ex}	λ_{em}
Anti-Nestin produced in rabbit (ab105389, abcam)	1:50	-	-
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Rabbit (A21206, Invitrogen™)	1:400	488 nm	500-550 nm

Neuronen

Antikörper	Verdünnung	λ_{ex}	λ_{em}
Anti- β -III Tubulin produced in mouse (ab7751, abcam)	1:20	-	-
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse (A11001, Invitrogen™)	1:400	488 nm	500-550 nm

4.2.6.8 REM

Um Neuronen mit einem REM visualisieren zu können, wurden diese auf einem mit Matrigel hESC (1:100) beschichtetem Deckglas in M7 für 14 Tage differenziert (\varnothing : 32 mm, Höhe: 1,5 mm). Anschließend wurde dieses für 1 h in einer eiskalten Lösung aus 2 % PFA und 2 % Glutaraldehyd in DPBS⁻ bei RT inkubiert. Danach konnten die Proben entwässert werden. Hierfür wurden diese dreimal mit je 1 ml einer Aceton-Verdünnungsreihe gewaschen (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 % Aceton, in ddH₂O). Daraufhin wurden die Proben für 1 h bei 1 bar und 38 °C mit Aceton und CO₂ in einem Kritisch-Punkt-Trockner (Leica CPD300) überkritisch getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben mithilfe einer leitfähigen Silberlösung auf einen Metalladapter fixiert und im Exsikkator 20 min lang bei 200 mbar erneut getrocknet. Im Anschluss wurden die Proben mit Goldpartikeln (Cressington Sputter Coater, 8,8 nm Dicke) besputtert (Abbildung 133) und mit einem REM (Supra 55 VP LEO) visualisiert (Einstellung: 5 keV und 45° Winkel).



Abbildung 133: Probe mit besputterten Goldpartikeln (8,8 nm Dicke). Maßstabsbalken entspricht 5 mm.

4.2.7 Molekularbiologische Methoden

4.2.7.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation der Zellen wurde mithilfe von TRIzol® nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Hierzu wurde das Medium der Probe abgenommen und 400 µl TRIzol® hinzugefügt. Dabei wurde das TRIzol® auf- und abpipettiert, beziehungsweise gespült. Im Anschluss wurde das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Es folgte eine Zugabe von 80 µl Chloroform. Anschließend wurden die Proben 15 s invertiert, 3 min bei RT inkubiert und für 15 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugationszeit wurden drei Phasen sichtbar: eine wässrige RNA-enthaltende Phase, eine Interphase und eine Phenol-Chloroform-Phase. Die wässrige Phase wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die zwei anderen Phasen verworfen. Daraufhin konnten 200 µl Isopropanol hinzugefügt werden. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT und eine anschließende Zentrifugation für 10 min (12.000 g) bei 4 °C. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet in 400 µl 70 % Ethanol resuspendiert. Im Anschluss wurde für 5 min bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen und das RNA-Pellet für 30 min bei RT luftgetrocknet werden. Um das Pellet zu lösen, wurden 50 µl nukleasefreies Wasser hinzugefügt und für 15 min bei 60 °C geschüttelt. Im Anschluss konnte die Konzentration an isolierter RNA mithilfe des Nanodrops ermittelt werden.

4.2.7.2 DNA-Verdau

Zum enzymatischen Verdau der genomischen DNA wurden die Komponenten (RNA, DNase, DNase-Puffer und nukleasefreies Wasser) nach Tabelle 8 in ein Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert. Dabei wurde ein doppelter Ansatz sowie eine *No-Template-Control* verwendet, in der statt RNA Wasser eingesetzt wurde, um potentielle Kontaminationen der verwendeten Komponenten auszuschließen. Anschließend folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C im *Thermocycler*. Nach erfolgter Inkubation wurde jeweils 2 µl DNase *Stop Solution* (einfacher Ansatz 1 µl) hinzugefügt und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um den enzymatischen Verdau zu stoppen. Daraufhin wurde eine reverse Transkription (Kapitel 4.2.7.3) durchgeführt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des einfachen Ansatzes für einen DNA-Verdau.

Komponente	Menge
RNA	1 µg
DNase	1 µl (1U)
DNase-Puffer 10x	1 µl
Nukleasefreies Wasser	Auf 10 µl auffüllen

4.2.7.3 Reverse Transkription

Für eine reverse Transkription der RNA aus Kapitel 4.2.7.2 in cDNA wurden zunächst jeweils 2 μl *Random Primer* (200 ng/ μl , einfacher Ansatz 1 μl) auf Eis hinzugefügt und für 5 min bei 70 °C im *Thermocycler* inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die doppelten Ansätze aufgeteilt. Einem Ansatz wurde 10 μl des Mastermix inklusive Reverse Transkriptase (+ RT) und dem anderen Ansatz wurden 10 μl des Mastermix ohne Reverse Transkriptase hinzugefügt (- RT). Der Mastermix setzte sich aus den Komponenten von Tabelle 9 zusammen (Endvolumen 22 μl).

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermix + RT sowie - RT für die reverse Transkription.

Komponente	+ RT	- RT
RT-Puffer 5x	4 μl	4 μl
dNTP (10 mM)	2 μl	2 μl
Reverse Transkriptase	0,3 μl	-
Nukleasefreies Wasser	3,7 μl	4 μl

Nach Zugabe der Reaktionslösung wurde die reverse Transkription von RNA in cDNA mit folgendem Programm im *Thermocycler* gestartet:

10 min bei 25 °C
 60 min bei 42 °C
 10 min bei 70 °C
 RT ∞

Im Anschluss wurde jeweils 100 μl nukleasefreies Wasser zu den Proben hinzugefügt. Daraufhin wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt oder die Proben wurden bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.7.4 Kontroll-PCR

Bevor eine Genexpressionsanalyse mithilfe der RT-qPCR durchgeführt werden konnte, wurde zunächst eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Komponenten (Puffer, dNTP, *Primer*, Polymerase und nukleasefreies Wasser) nach Tabelle 10 mit der cDNA aus Kapitel 4.2.7.3 auf Eis zusammengefügt (Endvolumen: 20 μl).

Tabelle 10: Zusammensetzung der Komponenten für die Kontroll-PCR.

Komponente	Menge
Puffer 5x	4 μ l
dNTP (10 mM)	0,5 μ l
<i>Forward Primer</i> (10 pmol/ μ l)	1 μ l
<i>Reverse Primer</i> (10 pmol/ μ l)	1 μ l
GoTaq® Polymerase	0,25 μ l
Nukleasefreies Wasser	10,25 μ l
cDNA	3 μ l

Anschließend wurde die Kontroll-PCR nach folgendem Programm gestartet:

2 min bei 95 °C	(1x)
30 s bei 95 °C	
30 s bei 60 °C	(40x)
30s bei 72 °C	
5 min bei 72 °C	(1x)
RT	∞

Nach erfolgter Kontroll-PCR wurden die Amplifikate in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 4.2.7.5).

4.2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Anhand der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Dazu wurde ein 2%iges Agarosegel (3 g Agarose in 150 ml 1x TAE-Puffer und 0,25 μ g/ml Ethidiumbromid) mit den in Kapitel 4.2.7.4 generierten Amplifikaten beladen. Um dabei die Größe der aufgetrennten cDNA-Fragmente beurteilen zu können, wurde ebenfalls 3 μ l eines Größenmarkers (100 bp, zusammengesetzt aus: 1 μ l Marker, 1 μ l *Loading dye*, 4 μ l ddH₂O) in das Agarosegel hinzugefügt. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die Proben für ca. 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss konnte eine Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente mithilfe von UV-Licht erfolgen.

4.2.7.6 RT-qPCR

Für eine RT-qPCR wurden die Komponenten (qPCR Mastermix, *Primer*, nukleasefreies Wasser) zusammen mit der synthetisierten cDNA aus Kapitel 4.2.7.3 nach Tabelle 11 auf Eis in Wells einer geeigneten 96-Well-Platte verteilt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Komponenten für eine RT-qPCR.

Komponente	Menge
<i>GoTaq® qPCR Mastermix</i>	10 µl
<i>Forward Primer</i> und <i>Reverse Primer</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	5 µl
cDNA	4 µl

Dabei wurde für jede Probe in Triplikaten gearbeitet. Als Referenzgen fungierte GAPDH. Danach konnte die Platte mit einer hitzestabilen Folie versiegelt und für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert werden. Anschließend wurde folgendes Programm im RT-qPCR-*Thermocycler* gestartet:

2 min bei 95 °C	(1x)
30 s bei 95 °C	
30 s bei 60 °C	(40x)
30 s bei 72 °C	
5 min bei 72 °C	(1x)

Zeitgleich wurden die so amplifizierten Fragmente mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse überprüft. Anschließend konnten die erhaltenen Ergebnisse mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet und dabei auf das Referenzgen GAPDH normiert werden.

4.2.8 Wachstums- und Viabilitätsanalysen

4.2.8.1 Wachstumskurve

Für die Wachstumskurven wurden die Zellen entweder mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ in Wells einer 24-Well-Platte (1 ml Medium) oder mit einer Zellzahl von $5 \cdot 10^3$ in Wells einer 96-Well-Platte (100 µl Medium) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dabei wurde in Triplikaten gearbeitet und ein Mediumwechsel wurde alle 2-3 Tage durchgeführt. Anschließend konnten die Zellen an Tag 1, 2, 3, 4 und 7 mit DPBS⁻ (24-Well: 500 µl, 96-Well: 100 µl) gewaschen und mit 100 µl 0,25 % Trypsin/EDTA für 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ enzymatisch abgelöst werden. Bei einer Verwendung von 24-Well-Platten wurde auf 1 ml mit DPBS⁻ aufgefüllt. Im Anschluss konnte die Zellsuspension resuspendiert und die Zellzahl bestimmt werden.

4.2.8.2 PrestoBlue Assay

Zur Bestimmung der Viabilität im umgebenden Kompartiment des vasQchips wurde das NVU-Modell, wie in Kapitel 4.2.3.5 beschrieben, vorbereitet und fluidisch bei einer Flussrate von 100 µl/h kultiviert. An Tag 7, 9, 10 und 12 nach Einbringung der Neuronen konnte der PrestoBlue Assay im umgebenden Kompartiment durchgeführt werden. Hierfür wurden die vasQchips von der Mikrofluidik getrennt, das Medium abgenommen und mit 500 µl M7 1:1 BM inklusive PrestoBlue Reagenz (1:10 Verhältnis) für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch behandelt.

Als Blank wurde die Mischung in die Wells einer 24-Well-Platte (ohne Zellen) hinzugefügt. Bei allen Proben wurde in Triplikaten gearbeitet. Nach erfolgter Inkubation wurde das Gemisch zusammen mit dem Blank in Wells einer 96-Well-Platte verteilt und die Fluoreszenz mithilfe eines Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3) bestimmt (λ_{em} : 560 nm, λ_{ex} : 600 nm). Danach konnten die vasQchips dreimal vorsichtig mit DPBS^{-/-} gewaschen, mit M7 1:1 BM befüllt und erneut bis zur nächsten Messung fluidisch kultiviert werden.

4.2.8.3 XTT Assay

Zur Untersuchung der Viabilität der Zellen im umgebenden Kompartiment wurde neben einem PrestoBlue Assay ein XTT Assay durchgeführt. Hierfür wurde das rNVU-Modell, wie in Kapitel 4.2.3.4 beschrieben vorbereitet, und fluidisch bei einer Flussrate von 100 μ l/min kultiviert. Als Referenz dienten statische rNVU-Modelle. An Tag 0, 3, 5 und 7 nach Einbringung der HRMVEC erfolgte eine Analyse der Viabilität im umgebenden Kompartiment. Dazu wurden die vasQchips von der Mikrofluidik getrennt und das Medium aus dem Kompartiment vorsichtig abgenommen. Danach konnte 400 μ l des XTT Reagenz in einem 1:2 Verhältnis in EGM-2 eingebracht und für 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch inkubiert werden. Dabei wurde in Triplikaten gearbeitet und zur Kontrolle erfolgte eine Inkubation in Wells einer 24-Well-Platte (ohne Zellen). Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Reaktionslösung in Wells einer 96-Well-Platte verteilt und die Absorption bei 450-500 nm mithilfe eines Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3) bestimmt. Dagegen wurde die Absorption der Kontrolle (ohne Zellen) bei 630-690 nm ermittelt. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden in Differenz zur Kontrolle gesetzt und auf Tag 0 referenziert. Nach erfolgter Messung konnten die vasQchips mit DPBS^{-/-} gewaschen und mit EGM-2 befüllt werden. Es folgte eine fluidische Kultivierung bis zur nächsten Messung.

4.2.8.4 MTT Assay

Zur Bestimmung der Toxizität eines Stoffes wurden MTT Assays durchgeführt. Hierfür wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen beziehungsweise $2 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 in Wells einer 96-Well-Platte in 100 μ l ihres Spezialmediums ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und für 72 h inkubiert. Zusätzlich wurden Lebend- sowie Totkontrollen verwendet, bei denen zunächst lediglich das Medium gewechselt wurde. Hierbei wurde bei jeder Konzentration der Substanz sowie bei den Kontrollen in Triplikaten gearbeitet. Nach erfolgter Inkubation wurde jeweils 5 μ l einer 20%igen Triton-X-Lösung in die Wells der Totkontrolle hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss konnten 15 μ l des MTT Reagenz in alle Proben verteilt werden. Es folgte eine Inkubation für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Daraufhin konnte zur Lösung des Farbstoffes aus den Zellen jeweils 100 μ l *Solubilization/ Stop Mix* in jede Probe hinzugefügt und über 1-3 Nächte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Im letzten Schritt wurde die Absorption bei 595 nm mithilfe eines Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3) bestimmt und zur Quantifizierung der Viabilität auf die Lebend- und Totkontrollen referenziert.

4.2.8.5 Lebend-/Tot-Färbung

Zur mikroskopischen Bestimmung der Viabilität der Zellen wurde eine Färbelösung aus Calcein-AM und PI eingesetzt. Dabei setzte sich die Färbelösung aus den Komponenten wie in Tabelle 12 beschrieben zusammen. Zur Visualisierung der nekrotischen Zellen wurde PI (λ_{ex} : 532 nm, λ_{em} : 610-700 nm) und zur Detektion der lebenden Zellen Calcein-AM (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 500-580 nm) verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Komponenten für die Lebend-/Tot-Färbung.

Komponente	Menge	Endkonzentration
Medium	996 μl	-
Calcein-AM (1 mg/ml)	4 μl	4 μM
PI (2 mg/ml)	10 μl	20 $\mu\text{g/ml}$

4.2.8.5.1 Lebend-/Tot-Färbung im Hydrogel

Zur Lebend-/Tot-Färbung im Hydrogel wurde die Färbelösung nach Tabelle 12 angesetzt. Daraufhin konnte das Medium der Probe abgenommen und mit 250 μl der Färbelösung für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt werden. Nach erfolgter Inkubation wurde mit 200 μl DPBS⁻ gewaschen und die Zellen anschließend mikroskopisch visualisiert.

4.2.8.5.2 Lebend-/Tot-Färbung im vasQchip

Für einen Lebend-/Tot-Nachweis im vasQchip wurde dieser zunächst von der Mikrofluidik getrennt. Anschließend wurde das Medium aus dem Mikrokanal und dem umgebenden Kompartiment vorsichtig abgenommen und mit 500 μl Färbelösung (Tabelle 12) im Kompartiment sowie mit 200 μl (Tabelle 12) Färbelösung im Mikrokanal versetzt. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgenommen und vorsichtig mit warmem M7 1:1 BM ersetzt. Daraufhin konnten die vasQchips mikroskopiert werden.

Bei einer Verwendung eines Kollagen I-Hydrogels im umgebenden Kompartiment erfolgte die Zugabe der Färbelösung mithilfe des Pumpensystems über den Mikrokanal und einer Inkubation von 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Ein Waschriff erfolgte im Anschluss nicht.

4.2.9 Funktionalitätstests

4.2.9.1 P-gp Transporter Assay

Das rNVU-Modell wurde nach Kapitel 4.2.3.4 vorbereitet und bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/min}$ fluidisch kultiviert. Anschließend wurden die vasQchips von der Mikrofluidik getrennt und im Mikrokanal mit 200 μl einer 100 $\mu\text{g/ml}$ Verapamillösung (in EGM-2) für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch behandelt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ Calcein-AM simultan mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Verapamil in EGM-2. Zudem wurden vasQchips ausschließlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Calcein-AM in EGM-2 inkubiert. Es folgte eine Inkubation für weitere 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Daraufhin

wurden die vasQchips mit DPBS⁻ gewaschen und mit warmem EGM-2 befüllt. Anschließend konnten die Endothelzellen in den vasQchips mikroskopisch in Triplikaten visualisiert (λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 500-580 nm) und mithilfe der Software Fiji quantifiziert werden.

4.2.9.2 BCRP Transporter Assay

Das NVU-Modell wurde nach Kapitel 4.2.3.5 im vasQchip vorbereitet und fluidisch bei einer Flussrate von 100 $\mu\text{l/h}$ kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die vasQchips von der Mikrofluidik entfernt und im Mikrokanal mit 15 μM Mitoxantron in M7 1:1 BM für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch behandelt. Zudem wurden vasQchips neben 15 μM Mitoxantron simultan mit 10 μM Ko143 inkubiert. Als Blank wurden unbehandelte vasQchips verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurden die vasQchips einmal mit DPBS⁻ gewaschen und die Zellen im Mikrokanal für 10 min mit 200 μl 0,25 % Trypsin/EDTA enzymatisch bei 37 °C und 5 % CO₂ abgelöst. Die Suspension wurde vorsichtig aus dem Mikrokanal entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Zugabe von 200 μl einer 20%igen Triton-X-Lösung wurden die Zellen lysiert und in Wells einer 96-Well-Platte in Triplikaten überführt. Es folgte eine Fluoreszenzmessung (λ_{ex} : 607 nm, λ_{em} : 684 nm) der Proben anhand eines Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3). Die erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden als Differenz zum Blank ermittelt und anschließend auf eine definierte Zellzahl normiert.

4.2.9.3 Permeabilitätstest im Transwell-System

Das rNVU-Modell wurde wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben im Transwell-System vorbereitet und unter hyperglykämischen (30 mM D-(+)-Glucose) sowie normoglykämischen Bedingungen (0 mM D-(+)-Glucose) in EGM-2 kultiviert. Zur Ermittlung des Permeabilitätskoeffizienten der Transwell-Membran wurden beschichtete Transwell-Systeme ohne Zellen verwendet. Nach 7 Tagen wurde das iBRB-Modell für den Permeabilitätsversuch eingesetzt. Hierzu wurde der Farbstoff *Lucifer Yellow* (LY) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in EGM-2 (jeweils mit und ohne Glucose) in einem Volumen von 400 μl apikal appliziert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ statisch inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen aus dem apikalen und basalen Kompartiment in Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Zeitgleich wurden zur Ermittlung der LY-Konzentration Standardkurven im entsprechenden Medium hergestellt und ebenfalls auf die Multiwell-Platte überführt. Daraufhin konnte die Fluoreszenz der Proben (λ_{ex} : 428 nm, λ_{em} : 536 nm) in Triplikaten mithilfe des Mikroplattenlesers (SpectraMax iD3) ermittelt werden. Die erhaltenen Werte konnten danach anhand der generierten Verdünnungsreihe und der Gleichung (1) sowie (2) in Kapitel 3.1.4.2.2 bestimmt werden.

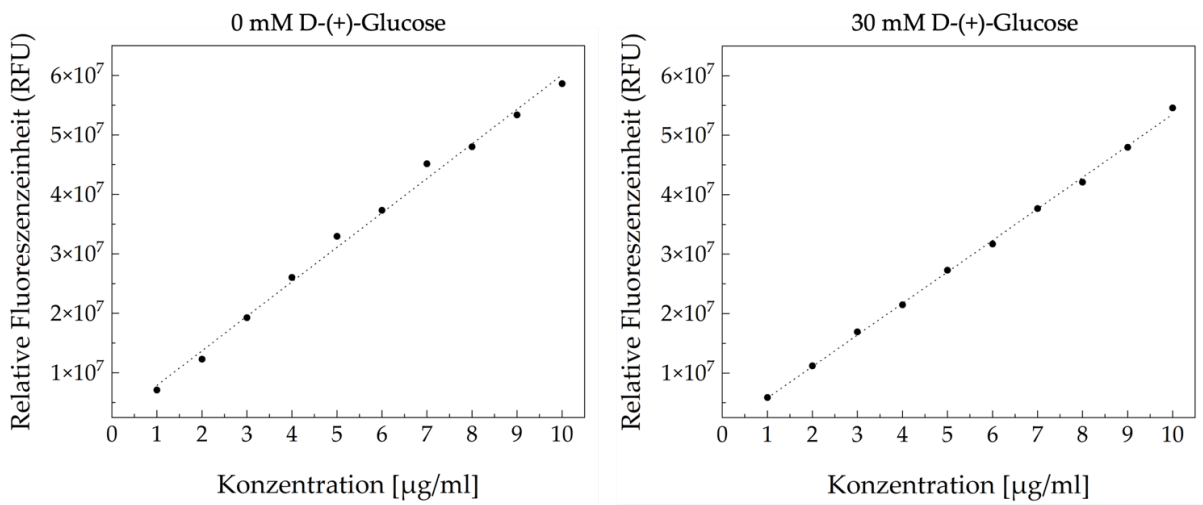


Abbildung 134: Standardkurven der LY-Verdünnungsreihen zur Auswertung des Permeabilitätstests.

4.2.9.4 Calcium Imaging in Neuronen

Für ein *Calcium Imaging* der Neuronen wurden NSC in der nach Kapitel 4.2.1.3.1 und Kapitel 4.2.1.3.2 vorgesehenen Zellkonzentration in ein Well eines μ -Slide 8 Wells ausgesät und entsprechend in M7 1:1 BM differenziert. Anschließend wurden die ausdifferenzierten Neuronen mit 200 μ l einer 10 μ M Fluo-4 AM-Lösung für 45 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in M7 1:1 BM behandelt. Danach konnten die Zellen in 200 μ l Extrazellulärpuffer für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert werden. Nach erfolgter Inkubation wurde der Puffer vorsichtig abgenommen und mit 200 μ l vorgewärmten M7 1:1 BM ausgetauscht. Um eine höhere neuronale Aktivität zu induzieren, wurde eine sterile KCl-Lösung in einer Endkonzentration von 80 mM hinzugefügt. Danach konnten die veränderten Ca²⁺-Ströme mithilfe inverser Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (λ_{ex} : 495 nm, λ_{em} : 528 nm). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Videosequenzen mit 15 min und 89 Bildfolgen generiert. Diese wurden anschließend mithilfe der kostenfreien Software CALIMA ausgewertet.

Für das *Calcium Imaging* im vasQchip wurde ein Volumen von jeweils 500 μ l im umgebenden Kompartiment verwendet und die Zellkonzentration nach Kapitel 4.2.1.3. angepasst.

4.2.10 Wirkstofftestung im vasQchip

4.2.10.1 Levodopa und Carbidopa

Für eine Wirkstoffuntersuchung mit Levodopa und Carbidopa wurde ein BBB-Modell inklusive hCMEC/D3, HBVP und HA nach Kapitel 4.2.3.5 vorbereitet und für 7 Tage bei einer Flussrate von 100 μ l/h fluidisch kultiviert. Anschließend wurden 100 μ M Levodopa und 25 μ M Carbidopa (in M7 1:1 BM) in 10 ml Spritzen gefüllt, welche über einen Schlauch mit dem Einlass des Mikrokanals verbunden wurden. Es folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Dabei wurde das Wirkstoff-enthaltende Medium durch den Mikrokanal über den Auslass in ein Reaktionsgefäß gepumpt. Auf diese Weise wurden die Proben des Mikrokanals jeweils nach

2 h, 4 h und 8 h entnommen. Nach jeder einzelnen Probenentnahme wurde der Mikrokanal mit 200 μ l M7 1:1 BM gespült und das Medium des umgebenden Kompartiments in ein Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin konnte der mit M7 1:1 BM befüllte vasQchip für die nächste Probenentnahme erneut an die Mikrofluidik angeschlossen werden. Die gesammelten Proben des Mikrokanals sowie des umgebenden Kompartiments wurden im flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bis zur LC-MS/MS-Messung bei -80 °C gelagert. Des Weiteren wurde in diesem Experiment im Rahmen der Möglichkeit im Dunkeln sowie mit einer Schutzatmosphäre gearbeitet. Die gesammelten Proben wurden in Kollaboration mit Dipl.-Ing. F. Kirschhöfer mithilfe einer LC-MS/MS in einer Verdünnung von 1:100 analysiert. Dabei wurden sechs unabhängige Stichproben verwendet.

4.2.10.2 Nanogel

Zunächst wurde ein BBB-Modell inklusive hCMEC/D3, HBVP und HA nach Kapitel 4.2.3.5 vorbereitet und für 7 Tage fluidisch bei einer Flussrate von 100 μ l/h kultiviert. Anschließend wurde eine Konzentration von 1,12 mg/ml des Dopamin-beladenen P8@GNG[DP]-Nanogels (mit 2 μ M Dopamin) in M7 1:1 BM in die Spritzen überführt. Nachdem die Spritze mit dem Einlass des Mikrokanals verbunden wurde, folgte eine fluidische Kultivierung für 72 h bei einer Flussrate von 100 μ l/h bei 5 % CO₂ und 37 °C. Als Kontrolle wurden unbehandelte vasQchips verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurden die vasQchips von der Mikrofluidik getrennt und anschließend die Nanogele über das Rhodamin B mikroskopisch detektiert (λ_{ex} : 546 nm, λ_{em} : 568 nm). Dabei wurde in diesem Versuch jeweils in Triplikaten gearbeitet.

4.2.11 Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung vorgestellt. Dabei wurde n als Anzahl der unabhängigen Stichproben definiert. Sofern gekennzeichnet, erfolgte der statistische Vergleich der Mittelwerte zweier Stichproben mithilfe von OriginPro® 2022 durch Anwendung des Student's t-Tests. Dabei wurde der statistische Signifikanzwert p (p-Wert) gekennzeichnet mit * für $p < 0,05$, mit ** für $p < 0,01$ und mit *** für $p < 0,001$.

5 Abkürzungsverzeichnis

Δ	Differenz
Ω	Ohm, Einheit des elektrischen Widerstands
ΔC	Anfangskonzentration
%	Prozent
$^{\circ}C$	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Diffusionsoberfläche
A488	Alexa Fluor [®] 488 gekuppelter Sekundärantikörper
ABC	ATP-bindende Kasette (engl. <i>ATP-binding cassette</i>)
AGEs	Glykationsendprodukte (engl. <i>Advanced glycation endproducts</i>)
AGS	Astrozyten-Wachstumsfaktoren (engl. <i>Astrocyte growth supplements</i>)
AHCT	N-Acetyl-DL-homocysteinthiolacton
AK	Arbeitskreis
AM	Astrozytenmedium (engl. <i>Astrocyte medium</i>)
AM	Acetoxymethylester
Ang1	Angiopoietin-1
Ang2	Angiopoietin-2
APH	Institut für Angewandte Physik
aq	<i>aqueous</i> (in wässriger Lösung)
Äq	Äquivalent
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
A _{tw}	Oberfläche des Transwell-Systems
BBB	Blut-Hirn-Schranke (engl. <i>Blood-brain barrier</i>)
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>

BM	Basalmedium
BRB	Blut-Retina-Schranke (engl. <i>Blood-retinal barrier</i>)
ca.	circa
CAM	<i>Centre for Advanced Materials</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ColMA	Kollagen-Methacrylat
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DM	hCMEC/D3 Differenzierungsmedium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DoF	Funktionalisierungsgrad (engl. <i>Degree of functionalization</i>)
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dQ/dt	transportierte Masse pro Zeit
dyn	Dyn, Einheit der Kraft
EBM	Endotheliales Basal Medium (engl. <i>Endothelial basal medium</i>)
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiaminteratessigsäure
EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i>
EGM-2	Endotheliales Wachstumsmedium-2 (engl. <i>Endothelial growth medium-2</i>)
et al.	et alia
EZM	Extrazellulärmatrix (engl. <i>Extracellular matrix</i>)
<i>f</i>	Frequenz
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G'	Speichermodul
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GelMA	Gelatine-Methacrylat
GelNB	Norborenen-funktionalisierte Gelatine
GelS	Thiol-funktionalisierte Gelatine
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Höhe
h	Stunde/n
h ν	Photonenenergie
H ₂ O	Wasser
HA	Humane Astrozyten (engl. <i>Human astrocytes</i>)
HBVP	Humane vaskuläre Hirnperizyten (engl. <i>Human brain vascular pericytes</i>)
hCMEC/D3	Humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzellen (engl. <i>Human cerebral microvascular endothelial cells</i>)
HM	Humane immortalisierte Mikroglia (engl. <i>Human microglia</i>)
HRA	Humane retinale Astrozyten (engl. <i>Human retinal astrocytes</i>)
HRMVEC	Humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen (engl. <i>Human retinal microvascular endothelial cell</i>)
hTERT	<i>human telomerase reverse transcriptase</i>
HUVEC	humane Nabelvenenendothelzellen (engl. <i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)
Hz	Hertz
i	(Wechsel-)Stromstärke
IBCS-FMS	Institut für Biologische und Chemische Systeme - Funktionelle molekulare Systeme
iBRB	Innere Blut-Retina-Schranke (engl. <i>inner Blood-retinal barrier</i>)

IFG	Institut für Funktionelle Grenzflächen
IFN- γ	Interferon- γ
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen (engl. <i>induced Pluripotent stem cells</i>)
iPSC KM	Kultivierungsmedium der iPSC
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
kg	Kilogramm
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
KM	hCMEC/D3-Kultivierungsmedium
Lam	Laminin
LAP	Lithium-Phenyl-(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (engl. <i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)
LD ₅₀	Letale Dosis 50 %
LED	lichtemittierende Diode (engl. <i>Light-emitting diode</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
m	Masse
M	Molar
m ²	Quadratmeter
M7	Neuronendifferenzierungsmedium
MAA	Methacrylsäureanhydrid
MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MGS	Mikroglia-Wachstumsfaktoren (engl. <i>Microglia growth supplements</i>)
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar

MM	Mikrogliaedium (engl. <i>Microglia medium</i>)
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Mitoxantron
MW	Mittelwert
mW	Milliwatt
n	Anzahl
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBCA	5-Norbonen-2-carboxylsäure
ng	Nanogramm
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NSC	Neuronale Stammzellen (engl. <i>Neural stem cell</i>)
NSF	<i>National Science Foundation</i>
NVU	Neurovaskuläre Einheit (engl. <i>Neurovascular unit</i>)
oBRB	Äußere Blut-Retina-Schranke (engl. <i>outer Blood-retinal barrier</i>)
Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor-4</i>
P	Passage
p	Druck
P/S	Penicillin/Streptomycin
P8@GNG	Unbeladene Peptoid8 gekuppelte Nanogelee
P8@GNG[DP]	Peptoid8 gekuppelte Dopamin beladene Nanogelee
Pa	Pascal
P _{app}	Permeabilitätskoeffizient
PC	Polycarbonat
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
P-gp	P-Glykoprotein

PGS	Perizyten-Wachstumsfaktoren (engl. <i>Pericyte growth supplements</i>)
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
PLL	Poly-L-Lysin
PLO	Poly-L-Ornithin
PM	Perizytenmedium (engl. <i>Pericyte medium</i>)
qPCR	quantitative Polymerasenkettenreaktion (engl. <i>Real-Time quantitative Polymerase chain reaction</i>)
R_B	Blank-Widerstand
REM	Rasterlektronenmikroskop
R_{EMI}	Widerstand zwischen Elektrode und Nährmedium
R_{Ers}	Ersatzwiderstand
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
rNVU	Retinale neurovaskuläre Einheit (engl. <i>Retinal neurovascular unit</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>Reactive oxygen species</i>)
RPE	retinale Pigmentepithelzelle (engl. <i>Retinal pigment epithelial cell</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>Revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
R_z	Widerstand des Zelllayers
r_z	Flächenunabhängiger Widerstand
s	Sekunde/n
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMART	<i>Substrate modification and replication by thermoforming</i>
T	Temperatur
TEER	Transendothelialer elektrischer Widerstand (engl. <i>Transendothelial electrical resistance</i>)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRITC	Tetramethylrhodamin

u	(Wechselstrom-)Spannung
UV	Ultraviolettstrahlung
VE-Cadherin	<i>Vascular endothelial cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>Weight per volume</i>)
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	<i>Zonula occludens</i>
α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
λ_{em}	Emissionswellenlänge (engl. <i>Emission wavelength</i>)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (engl. <i>Excitation wavelength</i>)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

6 Literaturverzeichnis

- [1] Reynaud, E. Protein misfolding and degenerative diseases. *Nature Education* **2010**, 3, 28.
- [2] Antonini, A.; Poewe, W.; Chaudhuri, K. R.; Jech, R.; Pickut, B.; Pirtošek, Z.; Szasz, J.; Valldeoriola, F.; Winkler, C.; Bergmann, L.; Yegin, A.; Onuk, K.; Barch, D.; Odin, P. Levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's: Final results of the GLORIA registry. *Parkinsonism & Related Disorders* **2017**, 45, 13-20.
- [3] Teixeira, M. I.; Amaral, M. H.; Costa, P. C.; Lopes, C. M.; Lamprou, D. A. Recent Developments in Microfluidic Technologies for Central Nervous System Targeted Studies. *Pharmaceutics* **2020**, 12.
- [4] Mi, X. S.; Yuan, T. F.; Ding, Y.; Zhong, J. X.; So, K. F. Choosing preclinical study models of diabetic retinopathy: key problems for consideration. *Drug Des Devel Ther* **2014**, 8, 2311-9.
- [5] Dorsey, E.; Sherer, T.; Okun, M. S.; Bloem, B. R. The emerging evidence of the Parkinson pandemic. *Journal of Parkinson's disease* **2018**, 8, S3-S8.
- [6] Rahmani, J.; Roudsari, A. H.; Bawadi, H.; Clark, C.; Ryan, P. M.; Salehisahlabadi, A.; Rahimi Sakak, F.; Goodarzi, N.; Razaz, J. M. Body mass index and risk of Parkinson, Alzheimer, Dementia, and Dementia mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies among 5 million participants. *Nutr neurosci* **2022**, 25, 423-431.
- [7] Saeedi, P.; Petersohn, I.; Salpea, P.; Malanda, B.; Karuranga, S.; Unwin, N.; Colagiuri, S.; Guariguata, L.; Motala, A. A.; Ogurtsova, K.; Shaw, J. E.; Bright, D.; Williams, R. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* **2019**, 157, 107843.
- [8] Poewe, W.; Seppi, K.; Tanner, C. M.; Halliday, G. M.; Brundin, P.; Volkman, J.; Schrag, A.-E.; Lang, A. E. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primer* **2017**, 3, 17013.
- [9] Soria Lopez, J. A.; González, H. M.; Léger, G. C. Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* **2019**, 167, 231-255.
- [10] Guariguata, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Res Clin Pract* **2012**, 98, 524-5.
- [11] Bhonde, R.; Mishra, G. Regenerative medicine for degenerative diseases. *Journal of Cell and Tissue Research* **2005**, 5, 483-486.
- [12] Rossanez, A.; dos Reis, J. C. In *Generating Knowledge Graphs from Scientific Literature of Degenerative Diseases*, **2019**, 12-23.
- [13] Sánchez-Villegas, A.; Martínez-Lapiscina, E. H., A healthy diet for your heart and your brain. **2018**.
- [14] Pfister, R. In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit auf dem Chip. *Dissertation* **2020**.
- [15] Gordon, E. M.; Barrett, R. W.; Dower, W. J.; Fodor, S. P.; Gallop, M. A. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *J med chem* **1994**, 37, 1385-1401.

- [16] Potyrailo, R.; Rajan, K.; Stoewe, K.; Takeuchi, I.; Chisholm, B.; Lam, H. Combinatorial and high-throughput screening of materials libraries: review of state of the art. *ACS combinatorial science* **2011**, *13*, 579-633.
- [17] Hajar, R. Animal testing and medicine. *Heart Views* **2011**, *12*, 42-42.
- [18] van der Helm, M. W.; van der Meer, A. D.; Eijkel, J. C.; van den Berg, A.; Segerink, L. I. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue Barriers* **2016**, *4*, e1142493.
- [19] Gregory, N. S.; Harris, A. L.; Robinson, C. R.; Dougherty, P. M.; Fuchs, P. N.; Sluka, K. A. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *The Journal of Pain* **2013**, *14*, 1255-1269.
- [20] Doke, S. K.; Dhawale, S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2015**, *23*, 223-229.
- [21] Robert, A. Toxicologic Pathology in the 21st Century. *Toxicologic Pathology* **2013**, *41*, 689.
- [22] Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* **2011**, *162*, 1239-1249.
- [23] Akhtar, A. The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb Q Healthc Ethics* **2015**, *24*, 407-19.
- [24] Green, S. B. Can animal data translate to innovations necessary for a new era of patient-centred and individualised healthcare? Bias in preclinical animal research. *BMC Med Ethics* **2015**, *16*, 53.
- [25] Mak, I. W.; Evaniew, N.; Ghert, M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* **2014**, *6*, 114-118.
- [26] Chapekar, M. S. Tissue engineering: challenges and opportunities. *J Biomed Mater Res*, **2000**, *53*, 617-620.
- [27] Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface* **2006**, *3*, 589-601.
- [28] Bauer, M.; Karch, R.; Tournier, N.; Cisternino, S.; Wadsak, W.; Hacker, M.; Marhofer, P.; Zeitlinger, M.; Langer, O. Assessment of P-Glycoprotein Transport Activity at the Human Blood-Retina Barrier with (R)-(11)C-Verapamil PET. *J Nucl Med* **2017**, *58*, 678-681.
- [29] Vacanti, C. A. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* **2006**, *10*, 569-76.
- [30] Langer, R.; Lanza, R.; Langer, R. S.; Vacanti, J. P. Principles of tissue engineering. *Academic Press* **2000**.
- [31] Karp, J. M.; Langer, R. Development and therapeutic applications of advanced biomaterials. *Current opinion in biotechnology* **2007**, *18*, 454-459.
- [32] Berthiaume, F.; Maguire, T. J.; Yarmush, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2011**, *2*, 403-30.
- [33] Khademhosseini, A.; Langer, R. A decade of progress in tissue engineering. *Nature Protocols* **2016**, *11*, 1775-1781.
- [34] Osaki, T.; Sivathanu, V.; Kamm, R. D. Vascularized microfluidic organ-chips for drug screening, disease models and tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **2018**, *52*, 116-123.

- [35] Caddeo, S.; Boffito, M.; Sartori, S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol* **2017**, *5*.
- [36] Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science: AMS* **2018**, *14*, 910.
- [37] Haycock, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. *3D cell culture* **2011**, 1-15.
- [38] Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov* **2013**, *18*, 240-249.
- [39] Lv, D.; Hu, Z.; Lu, L.; Lu, H.; Xu, X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncol Lett* **2017**, *14*, 6999-7010.
- [40] Kappings, V. Tumormodelle in vitro: von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System. *Dissertation* **2017**.
- [41] Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl Microbiol Biotechnol* **2015**, *99*, 623-636.
- [42] Zhu, W.; Ma, X.; Gou, M.; Mei, D.; Zhang, K.; Chen, S. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr opin biotechnol* **2016**, *40*, 103-112.
- [43] Huh, D.; Matthews, B. D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Hsin, H. Y.; Ingber, D. E. Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science* **2010**, *328*, 1662-8.
- [44] Kim, S.; Kim, W.; Lim, S.; Jeon, J. S. Vasculature-on-a-chip for in vitro disease models. *Bioengineering* **2017**, *4*, 8.
- [45] Huh, D.; Hamilton, G. A.; Ingber, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol* **2011**, *21*, 745-54.
- [46] Gamboa, J. M.; Leong, K. W. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, *65*, 800-810.
- [47] Kim, B. S.; Lee, J.-S.; Gao, G.; Cho, D.-W. Direct 3D cell-printing of human skin with functional transwell system. *Biofabrication* **2017**, *9*, 025034.
- [48] Zhang, B.; Korolj, A.; Lai, B. F. L.; Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials* **2018**, *3*, 257-278.
- [49] Azizipour, N.; Avazpour, R.; Rosenzweig, D. H.; Sawan, M.; Aji, A. Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip. *Micromachines* **2020**, *11*, 599.
- [50] Chen, L.-J.; Raut, B.; Kaji, H. On-chip disease models of the human retina. *Microfluidic Cell Culture Systems* **2019**, 351-372.
- [51] Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *97*, 4-27.
- [52] McKee, T. J.; Perlman, G.; Morris, M.; Komarova, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 10542.
- [53] Bowers, S. L. K.; Banerjee, I.; Baudino, T. A. The extracellular matrix: At the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2010**, *48*, 474-482.

- [54] Walma, D. A. C.; Yamada, K. M. The extracellular matrix in development. *Development* **2020**, 147.
- [55] Mecham, R. The extracellular matrix: an overview. **2011**.
- [56] Ruoslahti, E. Brain extracellular matrix. *Glycobiology* **1996**, 6, 489-492.
- [57] Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* **2015**, 6, 105-21.
- [58] Sharma, S.; Tiwari, S. A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **2020**, 162, 737-747.
- [59] Gyles, D. A.; Castro, L. D.; Silva, J. O. C.; Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *European Polymer Journal* **2017**, 88, 373-392.
- [60] Xiao, S.; Zhao, T.; Wang, J.; Wang, C.; Du, J.; Ying, L.; Lin, J.; Zhang, C.; Hu, W.; Wang, L.; Xu, K. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Reviews and Reports* **2019**, 15, 664-679.
- [61] Chandy, T.; Sharma, C. P. Chitosan--as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs* **1990**, 18, 1-24.
- [62] Fatimi, A.; Okoro, O. V.; Podstawczyk, D.; Siminska-Stanny, J.; Shavandi, A. Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review. *Gels* **2022**, 8, 179.
- [63] Sun, M.; Sun, X.; Wang, Z.; Guo, S.; Yu, G.; Yang, H. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers* **2018**, 10, 1290.
- [64] Gonzalez, L.; Wess, T. The importance of understanding the terminology of collagen and gelatine in the study of parchment. *Journal of the Institute of Conservation* **2013**, 36, 104-108.
- [65] Yue, K.; Trujillo-de Santiago, G.; Alvarez, M. M.; Tamayol, A.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **2015**, 73, 254-271.
- [66] Grosshäuser, B. Engineered Three Dimensional Neuro-Environment for Organ-On-Chip Applications. *Dissertation* **2016**.
- [67] Nguyen, N. T.; Shaegh, S. A.; Kashaninejad, N.; Phan, D. T. Design, fabrication and characterization of drug delivery systems based on lab-on-a-chip technology. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, 65, 1403-19.
- [68] Wu, Q.; Liu, J.; Wang, X.; Feng, L.; Wu, J.; Zhu, X.; Wen, W.; Gong, X. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *BioMedical Engineering OnLine* **2020**, 19, 9.
- [69] Harris, S. G.; Shuler, M. L. Growth of endothelial cells on microfabricated silicon nitride membranes for an in vitro model of the blood-brain barrier. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 8, 246-251.
- [70] Carraro, A.; Hsu, W.-M.; Kulig, K. M.; Cheung, W. S.; Miller, M. L.; Weinberg, E. J.; Swart, E. F.; Kaazempur-Mofrad, M.; Borenstein, J. T.; Vacanti, J. P. In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomedical microdevices* **2008**, 10, 795-805.

- [71] Jang, K.-J.; Suh, K.-Y. A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells. *Lab on a Chip* **2010**, *10*, 36-42.
- [72] Kappings, V.; Grün, C.; Ivannikov, D.; Hebeiss, I.; Kattge, S.; Wendland, I.; Rapp, B. E.; Hettel, M.; Deutschmann, O.; Schepers, U. vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Advanced Materials Technologies* **2018**, *3*.
- [73] Giselbrecht, S.; Gottwald, E.; Truckenmueller, R.; Trautmann, C.; Welle, A.; Guber, A.; Saile, V.; Gietzelt, T.; Weibezahn, K. F. Microfabrication of chip-sized scaffolds for three-dimensional cell cultivation. *J Vis Exp* **2008**.
- [74] Grün, C.; Pfister, R.; Haase, S.; Schepers, U. Durchblutete Organe auf dem Chip. Entwicklung eines vaskularisierten Organ-on-Chip System. *Git* **2018**, 2-4.
- [75] Mullin, J. M.; Agostino, N.; Rendon-Huerta, E.; Thornton, J. J. Keynote review: Epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 395-408.
- [76] Ivannikov, D. In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren. *Dissertation* **2015**.
- [77] Aird, W. C. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, *2*, a006429.
- [78] Setyawati, M. I.; Tay, C. Y.; Docter, D.; Stauber, R. H.; Leong, D. T. Understanding and exploiting nanoparticles' intimacy with the blood vessel and blood. *Chem Soc Rev* **2015**, *44*, 8174-99.
- [79] Kolka, C. M. The vascular endothelium plays a role in insulin action. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2020**, *47*, 168-175.
- [80] Rodrigues, S. F.; Granger, D. N. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* **2015**, *3*, e978720.
- [81] Quignot, N. Modeling bioavailability to organs protected by biological barriers. *In Silico Pharmacology* **2013**, *1*, 8.
- [82] Tachikawa, M.; Hosoya, K.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T. A novel relationship between creatine transport at the blood-brain and blood-retinal barriers, creatine biosynthesis, and its use for brain and retinal energy homeostasis. *Subcell Biochem* **2007**, *46*, 83-98.
- [83] Hosoya, K.; Tomi, M. Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of cell lines and transport functions. *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 1-8.
- [84] Cunha-Vaz, J.; Bernardes, R.; Lobo, C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* **2011**, *6*, S3-9.
- [85] Díaz-Coránguez, M.; Ramos, C.; Antonetti, D. A. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* **2017**, *139*, 123-137.
- [86] Pardridge, W. M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular interventions* **2003**, *3*, 90-105.
- [87] Wang, J. D.; Khafagy, E.-S.; Khanafer, K.; Takayama, S.; ElSayed, M. E. Organization of endothelial cells, pericytes, and astrocytes into a 3D microfluidic in vitro model of the blood-brain Barrier. *Molecular pharmaceutics* **2016**, *13*, 895-906.
- [88] Pamies, D.; Hartung, T.; Hogberg, H. T. Biological and medical applications of a brain-on-a-chip. *Exp Biol Med (Maywood)* **2014**, *239*, 1096-1107.
- [89] Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **2008**, *57*, 178-201.

- [90] van der Wijk, A. E.; Vogels, I. M. C.; van Veen, H. A.; van Noorden, C. J. F.; Schlingemann, R. O.; Klaassen, I. Spatial and temporal recruitment of the neurovascular unit during development of the mouse blood-retinal barrier. *Tissue Cell* **2018**, *52*, 42-50.
- [91] Persidsky, Y.; Ramirez, S. H.; Haorah, J.; Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **2006**, *1*, 223-236.
- [92] Spadoni, I.; Fornasa, G.; Rescigno, M. Organ-specific protection mediated by cooperation between vascular and epithelial barriers. *Nat Rev Immunol* **2017**, *17*, 761-773.
- [93] Gardner, T. W.; Antonetti, D. A.; Barber, A. J.; Lieth, E.; Tarbell, J. A. The molecular structure and function of the inner blood-retinal barrier. *Documenta Ophthalmologica* **1999**, *97*, 229-237.
- [94] Giebel, S. J.; Menicucci, G.; McGuire, P. G.; Das, A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* **2005**, *85*, 597-607.
- [95] Perry, V.; Anthony, D.; Bolton, S.; Brown, H. The blood-brain barrier and the inflammatory response. *Molecular medicine today* **1997**, *3*, 335-341.
- [96] Persidsky, Y.; Ramirez, S. H.; Haorah, J.; Kanmogne, G. D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* **2006**, *1*, 223-36.
- [97] Abbott, N. J.; Patabendige, A. A.; Dolman, D. E.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **2010**, *37*, 13-25.
- [98] Lertkiatmongkol, P.; Liao, D.; Mei, H.; Hu, Y.; Newman, P. J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* **2016**, *23*, 253-9.
- [99] Wimmer, I.; Tietz, S.; Nishihara, H.; Deutsch, U.; Sallusto, F.; Gosselet, F.; Lyck, R.; Muller, W. A.; Lassmann, H.; Engelhardt, B. PECAM-1 Stabilizes Blood-Brain Barrier Integrity and Favors Paracellular T-Cell Diapedesis Across the Blood-Brain Barrier During Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology* **2019**, *10*.
- [100] Cockerill, I.; Oliver, J. A.; Xu, H.; Fu, B. M.; Zhu, D. Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of Amyloid- β from the BBB. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1097*, 261-278.
- [101] Li, W.; Chen, Z.; Chin, I.; Chen, Z.; Dai, H. The role of VE-cadherin in blood-brain barrier integrity under central nervous system pathological conditions. *Current neuropharmacology* **2018**, *16*, 1375-1384.
- [102] Yang, X.; Yu, X. W.; Zhang, D. D.; Fan, Z. G. Blood-retinal barrier as a converging pivot in understanding the initiation and development of retinal diseases. *Chin Med J (Engl)* **2020**, *133*, 2586-2594.
- [103] Iorio, A. L.; Ros, M.; Fantappiè, O.; Lucchesi, M.; Facchini, L.; Stival, A.; Becciani, S.; Guidi, M.; Favre, C.; Martino, M.; Genitori, L.; Sardi, I. Blood-Brain Barrier and Breast Cancer Resistance Protein: A Limit to the Therapy of CNS Tumors and Neurodegenerative Diseases. *Anticancer Agents Med Chem* **2016**, *16*, 810-5.
- [104] Chapy, H.; Saubaméa, B.; Tournier, N.; Bourasset, F.; Behar-Cohen, F.; Declèves, X.; Scherrmann, J. M.; Cisternino, S. Blood-brain and retinal barriers show dissimilar ABC transporter impacts and concealed effect of P-glycoprotein on a novel verapamil influx carrier. *Br J Pharmacol* **2016**, *173*, 497-510.

- [105] Gastfriend, B. D.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. Modeling the blood-brain barrier: Beyond the endothelial cells. *Curr Opin Biomed Eng* **2018**, *5*, 6-12.
- [106] Zhou, X.; Smith, Q. R.; Liu, X. Brain penetrating peptides and peptide-drug conjugates to overcome the blood-brain barrier and target CNS diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2021**, *13*, e1695.
- [107] Goriely, A.; Budday, S.; Kuhl, E., Chapter Two - Neuromechanics: From Neurons to Brain. *Advances in Applied Mechanics* **2015**, *48*, 79-139.
- [108] Muoio, V.; Persson, P. B.; Sendeski, M. M. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica* **2014**, *210*, 790-798.
- [109] Mink, J. W.; Blumenschine, R. J.; Adams, D. B. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **1981**, *241*, 203-212.
- [110] Yao, Y. Basement membrane and stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2019**, *39*, 3-19.
- [111] Xu, L.; Nirwane, A.; Yao, Y. Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke and vascular neurology* **2019**, *4*.
- [112] Kang, M.; Yao, Y. Basement membrane changes in ischemic stroke. *Stroke* **2020**, *51*, 1344-1352.
- [113] Geevarghese, A.; Herman, I. M. Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Transl Res* **2014**, *163*, 296-306.
- [114] Hammes, H. P. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* **2005**, *37*, 39-43.
- [115] Hammes, H.-P.; Lin, J.; Renner, O.; Shani, M.; Lundqvist, A.; Betsholtz, C.; Brownlee, M.; Deutsch, U. Pericytes and the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **2002**, *51*, 3107-3112.
- [116] Park, D. Y.; Lee, J.; Kim, J.; Kim, K.; Hong, S.; Han, S.; Kubota, Y.; Augustin, H. G.; Ding, L.; Kim, J. W.; Kim, H.; He, Y.; Adams, R. H.; Koh, G. Y. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat Commun* **2017**, *8*, 15296.
- [117] Gastfriend, B. D.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. Modeling the blood-brain barrier: beyond the endothelial cells. *Current opinion in biomedical engineering* **2018**, *5*, 6-12.
- [118] Sorrentino, F. S.; Allkabes, M.; Salsini, G.; Bonifazzi, C.; Perri, P. The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci* **2016**, *162*, 54-9.
- [119] Takahashi, S. Metabolic compartmentalization between astroglia and neurons in physiological and pathophysiological conditions of the neurovascular unit. *Neuropathology* **2020**, *40*, 121-137.
- [120] Verkhatsky, A.; Zorec, R.; Parpura, V. Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol* **2017**, *27*, 629-644.
- [121] Luna, G.; Keeley, P. W.; Reese, B. E.; Linberg, K. A.; Lewis, G. P.; Fisher, S. K. Astrocyte structural reactivity and plasticity in models of retinal detachment. *Exp Eye Res* **2016**, *150*, 4-21.

- [122] Vecino, E.; Rodriguez, F. D.; Ruzafa, N.; Pereiro, X.; Sharma, S. C. Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in retinal and eye research* **2016**, 51, 1-40.
- [123] Bicker, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Falcão, A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm* **2014**, 87, 409-32.
- [124] Ye, J.; Jiang, Z.; Chen, X.; Liu, M.; Li, J.; Liu, N. The role of autophagy in pro-inflammatory responses of microglia activation via mitochondrial reactive oxygen species in vitro. *J-Neurochem* **2017**, 142, 215-230.
- [125] DiSabato, D. J.; Quan, N.; Godbout, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry* **2016**, 139, 136-153.
- [126] Streit, W. J.; Mrak, R. E.; Griffin, W. S. T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of Neuroinflammation* **2004**, 1, 14.
- [127] Herrera, A. J.; Tomás-Camardiel, M.; Venero, J. L.; Cano, J.; Machado, A. Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm (Vienna)* **2005**, 112, 111-9.
- [128] Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* **2009**, 3, 31.
- [129] Pereda, A. E. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* **2014**, 15, 250-63.
- [130] Holt, C. E.; Martin, K. C.; Schuman, E. M. Local translation in neurons: visualization and function. *Nature structural & molecular biology* **2019**, 26, 557-566.
- [131] Jan, Y.-N.; Jan, L. Y. Dendrites. *Genes & development* **2001**, 15, 2627-2641.
- [132] Stojić, D.; Radošević, D.; Rajković, N.; Marić, D. L.; Milošević, N. T. Classification by morphology of multipolar neurons of the human principal olivary nucleus. *Neuroscience Research* **2021**, 170, 66-75.
- [133] de Courten, C.; Garey, L. J. Morphology of the neurons in the human lateral geniculate nucleus and their normal development. *Experimental Brain Research* **1982**, 47, 159-171.
- [134] Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Essential Cell Biology, Garland Science. *Taylor & Francis Group, LLC, an informa business* **2003**, 711.
- [135] Lovinger, D. M. Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol. *Alcohol Res Health* **2008**, 31, 196-214.
- [136] Zlokovic, B. V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Reviews Neuroscience* **2011**, 12, 723-738.
- [137] Keene, S. T.; Lubrano, C.; Kazemzadeh, S.; Melianas, A.; Tuchman, Y.; Polino, G.; Scognamiglio, P.; Cinà, L.; Salleo, A.; van de Burgt, Y.; Santoro, F. A biohybrid synapse with neurotransmitter-mediated plasticity. *Nature Materials* **2020**, 19, 969-973.
- [138] Fon, E. A.; Edwards, R. H. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electromyography and Clinical Neurophysiology* **2001**, 24, 581-601.
- [139] Manolov, S.; Ovtcharoff, W., Structure and Cytochemistry of the Chemical Synapses. In *International Review of Cytology* **1982**, 77, 243-284.

- [140] Gundelfinger, E. D.; tom Dieck, S. Molecular organization of excitatory chemical synapses in the mammalian brain. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 513-523.
- [141] Vanbatalo, S.; Soinila, S. The concept of chemical neurotransmission—variations on the theme. *Annals of medicine* **1998**, *30*, 151-158.
- [142] Kourrich, S.; Calu, D. J.; Bonci, A. Intrinsic plasticity: an emerging player in addiction. *Nat Rev Neurosci* **2015**, *16*, 173-84.
- [143] Zhou, Y.; Danbolt, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *Journal of Neural Transmission* **2014**, *121*, 799-817.
- [144] Luján, R.; Shigemoto, R.; López-Bendito, G. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* **2005**, *130*, 567-580.
- [145] Graw, J.; Koopman, P. Ed. Chapter Ten - Eye Development. *Academic Press* **2010**, *90*, 343-386.
- [146] Archibald, N. K.; Clarke, M. P.; Mosimann, U. P.; Burn, D. J. The retina in Parkinson's disease. *Brain* **2009**, *132*, 1128-1145.
- [147] Masland, Richard H. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron* **2012**, *76*, 266-280.
- [148] Masland, R. H. The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience* **2001**, *4*, 877-886.
- [149] Lorber, B.; Hsiao, W.-K.; Martin, K. R. Three-dimensional printing of the retina. *Curr Opin Ophthalmol* **2016**, *27*, 262-267.
- [150] Ragelle, H.; Dernick, K.; Khemais, S.; Keppler, C.; Cousin, L.; Farouz, Y.; Louche, C.; Fauser, S.; Kustermann, S.; Tibbitt, M. W.; Westenskow, P. D. Human Retinal Microvasculature-on-a-Chip for Drug Discovery. *Adv Healthc Mater* **2020**, *9*, e2001531.
- [151] Shin, E. S.; Sorenson, C. M.; Sheibani, N. Diabetes and retinal vascular dysfunction. *Journal of ophthalmic & vision research* **2014**, *9*, 362.
- [152] Coughlin, B. A.; Feenstra, D. J.; Mohr, S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res* **2017**, *139*, 93-100.
- [153] Pun, P. B.; Lu, J.; Mochhala, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* **2009**, *43*, 348-64.
- [154] Ferrari, C. C.; Tarelli, R. Parkinson's Disease and Systemic Inflammation. *Parkinson's Disease* **2011**, *2011*, 436813.
- [155] Yan, J.; Fu, Q.; Cheng, L.; Zhai, M.; Wu, W.; Huang, L.; Du, G. Inflammatory response in Parkinson's disease. *Mol Med Rep* **2014**, *10*, 2223-33.
- [156] Tufekci, K. U.; Meuwissen, R.; Genc, S.; Genc, K., Chapter Four - Inflammation in Parkinson's Disease. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **2012**, *88*, 69-132.
- [157] Ransohoff, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **2016**, *353*, 777-83.
- [158] Balestrino, R.; Schapira, A. H. V. Parkinson disease. *Eur J Neurol* **2020**, *27*, 27-42.
- [159] Paul, A.; Yadav, K. S. Parkinson's disease: Current drug therapy and unraveling the prospects of nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, *58*, 101790.
- [160] McGeer, P. L.; McGeer, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* **2004**, *10*, S3-S7.

- [161] Nolan, Y. M.; Sullivan, A. M.; Toulouse, A. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol Med* **2013**, *19*, 187-96.
- [162] Politis, M.; Wu, K.; Molloy, S.; G. Bain, P.; Chaudhuri, K. R.; Piccini, P. Parkinson's disease symptoms: the patient's perspective. *Movement Disorders* **2010**, *25*, 1646-1651.
- [163] Scott, B.; Borgman, A.; Engler, H.; Johnels, B.; Aquilonius, S. Gender differences in Parkinson's disease symptom profile. *Acta Neurologica Scandinavica* **2000**, *102*, 37-43.
- [164] Abudi, S.; Bar-Tal, Y.; Ziv, L.; Fish, M. Parkinson's disease symptoms-‘patients’ perceptions. *Journal of advanced nursing* **1997**, *25*, 54-59.
- [165] Gao, L.; Brenner, D.; Llorens-Bobadilla, E.; Saiz-Castro, G.; Frank, T.; Wieghofer, P.; Hill, O.; Thiemann, M.; Karray, S.; Prinz, M.; Weishaupt, J. H.; Martin-Villalba, A. Infiltration of circulating myeloid cells through CD95L contributes to neurodegeneration in mice. *Journal of Experimental Medicine* **2015**, *212*, 469-480.
- [166] Hirsch, E. C.; Vyas, S.; Hunot, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* **2012**, *18*, S210-S212.
- [167] Neniskyte, U.; Vilalta, A.; Brown, G. C. Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Lett* **2014**, *588*, 2952-6.
- [168] Barber, A. J.; Baccouche, B. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: Potential for novel therapies. *Vision Res* **2017**, *139*, 82-92.
- [169] Simó, R.; Hernández, C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab* **2014**, *25*, 23-33.
- [170] Lechner, J.; O'Leary, O. E.; Stitt, A. W. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res* **2017**, *139*, 7-14.
- [171] Wisniewska-Kruk, J.; Hoeben, K. A.; Vogels, I. M.; Gaillard, P. J.; Van Noorden, C. J.; Schlingemann, R. O.; Klaassen, I. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res* **2012**, *96*, 181-90.
- [172] Pfeiffer, R. L.; Marc, R. E.; Kondo, M.; Terasaki, H.; Jones, B. W. Müller cell metabolic chaos during retinal degeneration. *Exp Eye Res* **2016**, *150*, 62-70.
- [173] Sinha, K.; Kala, B.; Nayaka, A.; Ahmed, N., *An improvement on binocular indirect ophthalmoscopy for diabetic retinopathy.* **2017**, 1807-1815.
- [174] Churm, R.; Dunseath, G. J.; Prior, S. L.; Thomas, R. L.; Banerjee, S.; Owens, D. R. Development and characterization of an in vitro system of the human retina using cultured cell lines. *Clin Exp Ophthalmol* **2019**, *47*, 1055-1062.
- [175] Kilic, O.; Pamies, D.; Lavell, E.; Schiapparelli, P.; Feng, Y.; Hartung, T.; Bal-Price, A.; Hogberg, H. T.; Quinones-Hinojosa, A.; Guerrero-Cazares, H. Brain-on-a-chip model enables analysis of human neuronal differentiation and chemotaxis. *Lab on a Chip* **2016**, *16*, 4152-4162.
- [176] Achyuta, A. K.; Conway, A. J.; Crouse, R. B.; Bannister, E. C.; Lee, R. N.; Katnik, C. P.; Behensky, A. A.; Cuevas, J.; Sundaram, S. S. A modular approach to create a neurovascular unit-on-a-chip. *Lab Chip* **2013**, *13*, 542-53.
- [177] Booth, R.; Kim, H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier. *Lab Chip* **2012**, *12*, 1784-92.

- [178] Yeste, J.; García-Ramírez, M.; Illa, X.; Guimerà, A.; Hernández, C.; Simó, R.; Villa, R. A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood-retinal barrier. *Lab Chip* **2017**, *18*, 95-105.
- [179] Maoz, B. M.; Herland, A.; FitzGerald, E. A.; Grevesse, T.; Vidoudez, C.; Pacheco, A. R.; Sheehy, S. P.; Park, T. E.; Dauth, S.; Mannix, R.; Budnik, N.; Shores, K.; Cho, A.; Nawroth, J. C.; Segrè, D.; Budnik, B.; Ingber, D. E.; Parker, K. K. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol* **2018**, *36*, 865-874.
- [180] Grifno, G. N.; Farrell, A. M.; Linville, R. M.; Arevalo, D.; Kim, J. H.; Gu, L.; Searson, P. C. Tissue-engineered blood-brain barrier models via directed differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* **2019**, *9*, 13957.
- [181] Wang, J. D.; Khafagy, E.-S.; Khanafer, K.; Takayama, S.; ElSayed, M. E. H. Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Molecular Pharmaceutics* **2016**, *13*, 895-906.
- [182] Ohkura, Y.; Akanuma, S.-i.; Tachikawa, M.; Hosoya, K.-i. Blood-to-retina transport of biotin via Na⁺-dependent multivitamin transporter (SMVT) at the inner blood-retinal barrier. *Experimental eye research* **2010**, *91*, 387-392.
- [183] Perrière, N.; Yousif, S.; Cazaubon, S.; Chaverot, N.; Bourasset, F.; Cisternino, S.; Declèves, X.; Hori, S.; Terasaki, T.; Deli, M.; Scherrmann, J.-M.; Tamsamani, J.; Roux, F.; Couraud, P.-O. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Research* **2007**, *1150*, 1-13.
- [184] Meurs, J.; Alexander, M. R.; Levkin, P. A.; Widmaier, S.; Bunch, J.; Barrett, D. A.; Kim, D. H. Improved Extraction Repeatability and Spectral Reproducibility for Liquid Extraction Surface Analysis-Mass Spectrometry Using Superhydrophobic-Superhydrophilic Patterning. *Anal Chem* **2018**, *90*, 6001-6005.
- [185] Rochfort, K. D.; Carroll, L. S.; Barabas, P.; Curtis, T. M.; Ambati, B. K.; Barron, N.; Cummins, P. M. COMP-Ang1 Stabilizes Hyperglycemic Disruption of Blood-Retinal Barrier Phenotype in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2019**, *60*, 3547-3555.
- [186] Molins, B.; Mora, A.; Romero-Vázquez, S.; Pascual-Méndez, A.; Rovira, S.; Figueras-Roca, M.; Balcells, M.; Adán, A.; Martorell, J. Shear stress modulates inner blood retinal barrier phenotype. *Exp Eye Res* **2019**, *187*, 107751.
- [187] Naranjo, O.; Osborne, O.; Torices, S.; Toborek, M. In Vivo Targeting of the Neurovascular Unit: Challenges and Advancements. *Cell Mol Neurobiol* **2021**.
- [188] Lahaie, I.; Wirt, M.; Chemtob, S. Michel Desjarlais¹, Jose Carlos Rivera^{1, 2}. *Annals of Eye Science* **2019**, *1*.
- [189] Ito, Y.; Kotera, S.; Inaba, M.; Kono, K.; Imanishi, Y. Control of pore size of polycarbonate membrane with straight pores by poly(acrylic acid) grafts. *Polymer* **1990**, *31*, 2157-2161.
- [190] Balcells, M.; Edelman, E. R. Effect of pre-adsorbed proteins on attachment, proliferation, and function of endothelial cells. *J Cell Physiol* **2002**, *191*, 155-61.
- [191] Young, E. W.; Wheeler, A. R.; Simmons, C. A. Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells in microfluidic channels. *Lab Chip* **2007**, *7*, 1759-66.

- [192] Deissler, H.; Deissler, H.; Lang, S.; Lang, G. E. VEGF-induced effects on proliferation, migration and tight junctions are restored by ranibizumab (Lucentis) in microvascular retinal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* **2008**, *92*, 839-43.
- [193] Romberger, D. J. Fibronectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1997**, *29*, 939-943.
- [194] Schwartz, I.; Seger, D.; Shaltiel, S. Vitronectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **1999**, *31*, 539-544.
- [195] Colognato, H.; Yurchenco, P. D. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* **2000**, *218*, 213-34.
- [196] Avila Rodríguez, M. I.; Rodríguez Barroso, L. G.; Sánchez, M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol* **2018**, *17*, 20-26.
- [197] Wang, H.; Smith, G. W.; Yang, Z.; Jiang, Y.; McCloskey, M.; Greenberg, K.; Geisen, P.; Culp, W. D.; Flannery, J.; Kafri, T.; Hammond, S.; Hartnett, M. E. Short Hairpin RNA-Mediated Knockdown of VEGFA in Müller Cells Reduces Intravitreal Neovascularization in a Rat Model of Retinopathy of Prematurity. *The American Journal of Pathology* **2013**, *183*, 964-974.
- [198] Pfister, R. Entwicklung eines dreidimensionalen Hirntumormodells. *Masterarbeit* **2017**.
- [199] Kumar, R.; Singh, N. K.; Rao, G. N. Proline-rich tyrosine kinase 2 via enhancing signal transducer and activator of transcription 3-dependent cJun expression mediates retinal neovascularization. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26480.
- [200] Tornavaca, O.; Chia, M.; Dufton, N.; Almagro, L. O.; Conway, D. E.; Randi, A. M.; Schwartz, M. A.; Matter, K.; Balda, M. S. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *Journal of Cell Biology* **2015**, *208*, 821-838.
- [201] Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J.-D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T.; Tsukita, S. Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Molecular Biology of the Cell* **2000**, *11*, 4131-4142.
- [202] Gray, B. L.; Lieu, D. K.; Collins, S. D.; Smith, R. L.; Barakat, A. I. Microchannel Platform for the Study of Endothelial Cell Shape and Function. *Biomedical Microdevices* **2002**, *4*, 9-16.
- [203] Vecchione, R.; Pitingolo, G.; Guarnieri, D.; Falanga, A. P.; Netti, P. A. From square to circular polymeric microchannels by spin coating technology: a low cost platform for endothelial cell culture. *Biofabrication* **2016**, *8*, 025005.
- [204] Ojima, T.; Takagi, H.; Suzuma, K.; Oh, H.; Suzuma, I.; Ohashi, H.; Watanabe, D.; Suganami, E.; Murakami, T.; Kurimoto, M.; Honda, Y.; Yoshimura, N. EphrinA1 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Intracellular Signaling and Suppresses Retinal Neovascularization and Blood-Retinal Barrier Breakdown. *The American Journal of Pathology* **2006**, *168*, 331-339.
- [205] Lin, K.; Hsu, P.-P.; Chen, B. P.; Yuan, S.; Usami, S.; Shyy, J. Y.-J.; Li, Y.-S.; Chien, S. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 9385-9389.
- [206] Lakshminarayanan, S.; Gardner, T. W.; Tarbell, J. M. Effect of shear stress on the hydraulic conductivity of cultured bovine retinal microvascular endothelial cell monolayers. *Current Eye Research* **2000**, *21*, 944-951.

- [207] Schnittler; H.-J.; Drenckhahn, D. Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress. *the American Physiological Society* **1997**, *97*, 2396-2405.
- [208] Ishibazawa, A.; Nagaoka, T.; Takahashi, T.; Yamamoto, K.; Kamiya, A.; Ando, J.; Yoshida, A. Effects of Shear Stress on the Gene Expressions of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Endothelin-1, and Thrombomodulin in Human Retinal Microvascular Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2011**, *52*, 8496-8504.
- [209] Jochen Seebach, P. D., Fei Luo, Hermann Schillers, Dietmar Vestweber, Hans Oberleithner, Hans-Joachim Galla, and Hans-Joachim Schnittler. Endothelial Barrier Function under Laminar Fluid Shear Stress. *Laboratory Investigation* **2000**, *80*, 1819-1831.
- [210] Garhofer, G.; Werkmeister, R.; Dragostinoff, N.; Schmetterer, L. Retinal blood flow in healthy young subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2012**, *53*, 698-703.
- [211] Wong, A. D.; Ye, M.; Levy, A. F.; Rothstein, J. D.; Bergles, D. E.; Searson, P. C. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* **2013**, *6*, 7.
- [212] Hosoya, K.; Tachikawa, M. Inner blood-retinal barrier transporters: role of retinal drug delivery. *Pharm Res* **2009**, *26*, 2055-65.
- [213] Kubo, Y.; Kusagawa, Y.; Tachikawa, M.; Akanuma, S.; Hosoya, K. Involvement of a novel organic cation transporter in verapamil transport across the inner blood-retinal barrier. *Pharm Res* **2013**, *30*, 847-56.
- [214] Jiang, B.; Bezhadian, M. A.; Caldwell, R. B. Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on endothelial cell differentiation. *Glia* **1995**, *15*, 1-10.
- [215] Yang, T.; Guo, L.; Fang, Y.; Liang, M.; Zheng, Y.; Pan, M.; Meng, C.; Liu, G. Pericytes of Indirect Contact Coculture Decrease Integrity of Inner Blood-Retina Barrier Model In Vitro by Upgrading MMP-2/9 Activity. *Disease Markers* **2021**, *2021*, 7124835.
- [216] Kipp, M.; Clarner, T.; Gingele, S.; Pott, F.; Amor, S.; van der Valk, P.; Beyer, C. Brain lipid binding protein (FABP7) as modulator of astrocyte function. *Physiol Res* **2011**, *60*, S49-60.
- [217] Killoy, K. M.; Harlan, B. A.; Pehar, M.; Vargas, M. R. FABP7 upregulation induces a neurotoxic phenotype in astrocytes. *Glia* **2020**, *68*, 2693-2704.
- [218] Verbeek, M. M.; Otte-Höller, I.; Wesseling, P.; Ruiter, D. J.; de Waal, R. M. Induction of alpha-smooth muscle actin expression in cultured human brain pericytes by transforming growth factor-beta 1. *The American journal of pathology* **1994**, *144*, 372-382.
- [219] Antonia M. Jousen, T. W. G., Bernd Kirchhof, Stephen J. Ryan. Retinal Vascular Disease. *Springer* **2007**.
- [220] Eng, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* **1985**, *8*, 203-214.
- [221] Middeldorp, J.; Hol, E. M. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* **2011**, *93*, 421-443.
- [222] Hausmann, R.; Rieß, R.; Fieguth, A.; Betz, P. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *International Journal of Legal Medicine* **2000**, *113*, 70-75.

- [223] Roehm, N. W.; Rodgers, G. H.; Hatfield, S. M.; Glasebrook, A. L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods* **1991**, *142*, 257-265.
- [224] Wang, S.; Yu, H.; Wickliffe, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicology in Vitro* **2011**, *25*, 2147-2151.
- [225] Uggeri, J.; Gatti, R.; Belletti, S.; Scandroglio, R.; Corradini, R.; Rotoli, B. M.; Orlandini, G. Calcein-AM is a detector of intracellular oxidative activity. *Histochemistry and Cell Biology* **2000**, *122*, 499-505.
- [226] Bratosin, D.; Mitrofan, L.; Palii, C.; Estaquier, J.; Montreuil, J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry A* **2005**, *66*, 78-84.
- [227] Aszalos, A.; Thompson, K.; Yin, J. J.; Ross, D. D. Combinations of P-glycoprotein blockers, verapamil, PSC833, and cremophor act differently on the multidrug resistance associated protein (MRP) and on P-glycoprotein (Pgp). *Anticancer Res* **1999**, *19*, 1053-64.
- [228] Maines, L. W.; Antonetti, D. A.; Wolpert, E. B.; Smith, C. D. Evaluation of the role of P-glycoprotein in the uptake of paroxetine, clozapine, phenytoin and carbamazepine by bovine retinal endothelial cells. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 610-617.
- [229] Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **2010**, *123*, 4195-200.
- [230] Bardsley, K.; Deegan, A. J.; El Haj, A.; Yang, Y. Current State-of-the-Art 3D Tissue Models and Their Compatibility with Live Cell Imaging. *Adv Exp Med Biol* **2017**, *1035*, 3-18.
- [231] Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941-53.
- [232] Kim, J. H.; Kim, J. H.; Yu, Y. S.; Kim, D. H.; Kim, K. W. Recruitment of pericytes and astrocytes is closely related to the formation of tight junction in developing retinal vessels. *J Neurosci Res* **2009**, *87*, 653-9.
- [233] Walters, B. D.; Stegemann, J. P. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater* **2014**, *10*, 1488-501.
- [234] Davis, G. E. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *182*, 1025-31.
- [235] Antoine, E. E.; Vlachos, P. P.; Rylander, M. N. Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport. *Tissue Eng Part B Rev* **2014**, *20*, 683-96.
- [236] Stoddart, M. J., Cell Viability Assays: Introduction. In *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, Stoddart, M. J., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 1-6.
- [237] Utech, S.; Boccaccini, A. R. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. *Journal of Materials Science* **2015**, *51*, 271-310.

- [238] Van Den Bulcke, A. I.; Bogdanov, B.; De Rooze, N.; Schacht, E. H.; Cornelissen, M.; Berghmans, H. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31-38.
- [239] Kuhlmann, M.; Reimann, O.; Hackenberger, C. P.; Groll, J. Cysteine-functional polymers via thiol-ene conjugation. *Macromol Rapid Commun* **2015**, *36*, 472-6.
- [240] Loessner, D.; Meinert, C.; Kaemmerer, E.; Martine, L. C.; Yue, K.; Levett, P. A.; Klein, T. J.; Melchels, F. P. W.; Khademhosseini, A.; Hutmacher, D. W. Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms. *Nature Protocols* **2016**, *11*, 727-746.
- [241] Nguyen, A. K.; Goering, P. L.; Elespuru, R. K.; Sarkar Das, S.; Narayan, R. J. The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays. *Polymers (Basel)* **2020**, *12*.
- [242] Lim, K. S.; Galarraga, J. H.; Cui, X.; Lindberg, G. C. J.; Burdick, J. A.; Woodfield, T. B. F. Fundamentals and Applications of Photo-Cross-Linking in Bioprinting. *Chemical Reviews* **2020**, *120*, 10662-10694.
- [243] Haase, S. Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck. *Dissertation* **2020**.
- [244] Davis, J. T.; Foster, W. J. Substrate Stiffness Influences the Time Dependence of CTGF Protein Expression in Müller Cells. *Int Physiol J* **2018**, *1*, 1.
- [245] Fotakis, G.; Timbrell, J. A. 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**, *160*, 171-177.
- [246] Ahmadian, S.; Barar, J.; Saei, A. A.; Fakhree, M. A. A.; Omid, Y. Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: MTT assay. *JoVE* **2009**, e1191.
- [247] Göckler, T. Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering. **2020**.
- [248] Pustisek, N.; Situm, M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Coll Antropol* **2011**, *35*, 339-41.
- [249] Celikkin, N.; Mastrogiacomo, S.; Jaroszewicz, J.; Walboomers, X. F.; Swieszkowski, W. Gelatin methacrylate scaffold for bone tissue engineering: The influence of polymer concentration. *J Biomed Mater Res A* **2018**, *106*, 201-209.
- [250] Klaassen, I.; Van Noorden, C. J.; Schlingemann, R. O. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res* **2013**, *34*, 19-48.
- [251] Engerman, R. L. Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **1989**, *38*, 1203-1206.
- [252] Tarallo, S.; Beltramo, E.; Berrone, E.; Porta, M. Human pericyte-endothelial cell interactions in co-culture models mimicking the diabetic retinal microvascular environment. *Acta Diabetol* **2012**, *49* Suppl 1, S141-51.
- [253] Chronopoulos, A.; Trudeau, K.; Roy, S.; Huang, H.; Vinos, S. A.; Roy, S. High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* **2011**, *36*, 747-53.

- [254] Kim, D.; Mouritzen, U.; Larsen, B. D.; Roy, S. Inhibition of Cx43 gap junction uncoupling prevents high glucose-induced apoptosis and reduces excess cell monolayer permeability in retinal vascular endothelial cells. *Exp Eye Res* **2018**, 173, 85-90.
- [255] Leal, E. C.; Manivannan, A.; Hosoya, K.-I.; Terasaki, T.; Cunha-Vaz, J.; Ambrósio, A. n. F.; Forrester, J. V. Inducible Nitric Oxide Synthase Isoform Is a Key Mediator of Leukostasis and Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2007**, 48, 5257-5265.
- [256] Pleschka, N. Untersuchung der selektiv permeablen Barriere eines humanen in vitro Blut-Hirn-Schranke Modells im vasQchip. *Masterarbeit* **2019**.
- [257] Garberg, P.; Ball, M.; Borg, N.; Cecchelli, R.; Fenart, L.; Hurst, R. D.; Lindmark, T.; Mabondzo, A.; Nilsson, J. E.; Raub, T. J.; Stanimirovic, D.; Terasaki, T.; Öberg, J. O.; Österberg, T. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicology in Vitro* **2005**, 19, 299-334.
- [258] Deli, M. A.; Ábrahám, C. S.; Kataoka, Y.; Niwa, M. Permeability Studies on In Vitro Blood-Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2005**, 25, 59-127.
- [259] Zhao, W.; Han, L.; Bae, Y.; Manickam, D. S. Lucifer Yellow - A Robust Paracellular Permeability Marker in a Cell Model of the Human Blood-brain Barrier. *J Vis Exp* **2019**.
- [260] Hanani, M. Lucifer yellow-an angel rather than the devil. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2012**, 16, 22-31.
- [261] Hubatsch, I.; Ragnarsson, E. G.; Artursson, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc* **2007**, 2, 2111-9.
- [262] Tien, T.; Barrette, K. F.; Chronopoulos, A.; Roy, S. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2013**, 54, 6518-25.
- [263] Yun, J. H.; Park, S. W.; Kim, K. J.; Bae, J. S.; Lee, E. H.; Paek, S. H.; Kim, S. U.; Ye, S.; Kim, J. H.; Cho, C. H. Endothelial STAT3 Activation Increases Vascular Leakage Through Downregulating Tight Junction Proteins: Implications for Diabetic Retinopathy. *J Cell Physiol* **2017**, 232, 1123-1134.
- [264] Cho, C.-H.; Kammerer, R. A.; Lee, H. J.; Steinmetz, M. O.; Ryu, Y. S.; Lee, S. H.; Yasunaga, K.; Kim, K.-T.; Kim, I.; Choi, H.-H.; Kim, W.; Kim, S. H.; Park, S. K.; Lee, G. M.; Koh, G. Y. COMP-Ang1: A designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, 101, 5547-5552.
- [265] Wallace, R. G.; Rochfort, K. D.; Barabas, P.; Curtis, T. M.; Uehara, H.; Ambati, B. K.; Cummins, P. M. COMP-Ang1: Therapeutic potential of an engineered Angiopoietin-1 variant. *Vascul Pharmacol* **2021**, 141, 106919.
- [266] Cahoon, J. M.; Rai, R. R.; Carroll, L. S.; Uehara, H.; Zhang, X.; O'Neil, C. L.; Medina, R. J.; Das, S. K.; Muddana, S. K.; Olson, P. R.; Nielson, S.; Walker, K.; Flood, M. M.; Messenger, W. B.; Archer, B. J.; Barabas, P.; Krizaj, D.; Gibson, C. C.; Li, D. Y.; Koh, G. Y.; Gao, G.; Stitt, A. W.; Ambati, B. K. Intravitreal AAV2.COMP-Ang1 Prevents Neurovascular Degeneration in a Murine Model of Diabetic Retinopathy. *Diabetes* **2015**, 64, 4247-4259.

- [267] Carroll, L. S.; Uehara, H.; Fang, D.; Choi, S.; Zhang, X.; Singh, M.; Sandhu, Z.; Cummins, P. M.; Curtis, T. M.; Stitt, A. W.; Archer, B. J.; Ambati, B. K. Intravitreal AAV2.COMP-Ang1 Attenuates Deep Capillary Plexus Expansion in the Aged Diabetic Mouse Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2019**, *60*, 2494-2502.
- [268] Khan, M.; Aziz, A. A.; Shafi, N. A.; Abbas, T.; Khanani, A. M. Targeting Angiopoietin in Retinal Vascular Diseases: A Literature Review and Summary of Clinical Trials Involving Faricimab. *Cells* **2020**, *9*.
- [269] Gurnik, S.; Devraj, K.; Macas, J.; Yamaji, M.; Starke, J.; Scholz, A.; Sommer, K.; Di Tacchio, M.; Vutukuri, R.; Beck, H.; Mittelbronn, M.; Foerch, C.; Pfeilschifter, W.; Liebner, S.; Peters, K. G.; Plate, K. H.; Reiss, Y. Angiopoietin-2-induced blood-brain barrier compromise and increased stroke size are rescued by VE-PTP-dependent restoration of Tie2 signaling. *Acta Neuropathologica* **2016**, *131*, 753-773.
- [270] Weksler, B.; Romero, I. A.; Couraud, P. O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10*, 16.
- [271] Ohtsuki, S.; Ikeda, C.; Uchida, Y.; Sakamoto, Y.; Miller, F.; Glacial, F.; Decleves, X.; Scherrmann, J. M.; Couraud, P. O.; Kubo, Y.; Tachikawa, M.; Terasaki, T. 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 Pharm* **2013**, *10*, 289-96.
- [272] Vu, K.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O.; Gelli, A. Immortalized human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **2009**, *8*, 1803-7.
- [273] Poller, B.; Gutmann, H.; Krähenbühl, S.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P.-O.; Tuffin, G.; Drewe, J.; Huwyler, J. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of Neurochemistry* **2008**, *107*, 1358-1368.
- [274] Markoutsas, E.; Pampalakis, G.; Niarakis, A.; Romero, I. A.; Weksler, B.; Couraud, P. O.; Antimisiaris, S. G. Uptake and permeability studies of BBB-targeting immunoliposomes using the hCMEC/D3 cell line. *Eur J Pharm Biopharm* **2011**, *77*, 265-74.
- [275] Banerjee, J.; Shi, Y.; Azevedo, H. S. 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 Discov Today* **2016**, *21*, 1367-1386.
- [276] Norden, D.; Trojanowski, P.; Villanueva, E.; Navarro, E.; Godbout, J. Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity following Systemic Immune Challenge. *Glia* **2015**, *64*.
- [277] Phani, S.; Loike, J. D.; Przedborski, S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* **2012**, *18*, S207-S209.
- [278] Liu, S. V. iPS cells: a more critical review. *Stem Cells Dev* **2008**, *17*, 391-7.
- [279] Medvedev, S. P.; Grigor'eva, E. V.; Shevchenko, A. I.; Malakhova, A. A.; Dementyeva, E. V.; Shilov, A. A.; Pokushalov, E. A.; Zaidman, A. M.; Aleksandrova, M. A.; Plotnikov, E. Y.; Sukhikh, G. T.; Zakian, S. M. Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. *Stem Cells Dev* **2011**, *20*, 1099-112.

- [280] Cevallos, R. R.; Edwards, Y. J. K.; Parant, J. M.; Yoder, B. K.; Hu, K. Human transcription factors responsive to initial reprogramming predominantly undergo legitimate reprogramming during fibroblast conversion to iPSCs. *Sci Rep* **2020**, *10*, 19710.
- [281] Yan, X.; Qin, H.; Qu, C.; Tuan, R. S.; Shi, S.; Huang, G. T. iPSCs reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* **2010**, *19*, 469-80.
- [282] Smith, K. P.; Luong, M. X.; Stein, G. S. Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPSC cells. *J Cell Physiol* **2009**, *220*, 21-9.
- [283] Aisenbrey, E. A.; Murphy, W. L. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* **2020**, *5*, 539-551.
- [284] Kleinman, H. K.; Martin, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology* **2005**, *15*, 378-386.
- [285] Benton, G.; Kleinman, H. K.; George, J.; Arnaoutova, I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* **2011**, *128*, 1751-7.
- [286] Joutsijoki, H.; Haponen, M.; Rasku, J.; Aalto-Setälä, K.; Juhola, M. Machine Learning Approach to Automated Quality Identification of Human Induced Pluripotent Stem Cell Colony Images. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **2016**, *2016*, 3091039.
- [287] Kashyap, V.; Rezende, N. C.; Scotland, K. B.; Shaffer, S. M.; Persson, J. L.; Gudas, L. J.; Mongan, N. P. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the Nanog, Oct4, and Sox2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* **2009**, *18*, 1093-108.
- [288] van Schaijik, B.; Davis, P. F.; Wickremesekera, A. C.; Tan, S. T.; Itinteang, T. Subcellular localisation of the stem cell markers Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 and c-Myc in cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology* **2018**, *71*, 88.
- [289] McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **2018**, *120*, 5.1.1-5.1.11.
- [290] Rieseberg, M.; Kasper, C.; Reardon, K. F.; Scheper, T. Flow cytometry in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *56*, 350-360.
- [291] Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol* **2017**, *37*, 163-176.
- [292] Shapiro, H. M. Multistation multiparameter flow cytometry: a critical review and rationale. *Cytometry* **1983**, *3*, 227-43.
- [293] Mattanovich, D.; Borth, N. Applications of cell sorting in biotechnology. *Microb Cell Fact* **2006**, *5*, 12.
- [294] Ebert, A. D.; Shelley, B. C.; Hurley, A. M.; Onorati, M.; Castiglioni, V.; Patitucci, T. N.; Svendsen, S. P.; Mattis, V. B.; McGivern, J. V.; Schwab, A. J.; Sareen, D.; Kim, H. W.; Cattaneo, E.; Svendsen, C. N. EZ spheres: a stable and expandable culture system for the generation of pre-rosette multipotent stem cells from human ESCs and iPSCs. *Stem Cell Res* **2013**, *10*, 417-427.
- [295] Brickman, J. M.; Serup, P. Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2017**, *6*.

- [296] Kurosawa, H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2007**, 103, 389-398.
- [297] Bratt-Leal, A. M.; Carpenedo, R. L.; McDevitt, T. C. Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol Prog* **2009**, 25, 43-51.
- [298] Morgani, S. M.; Hadjantonakis, A. K. Signaling regulation during gastrulation: Insights from mouse embryos and in vitro systems. *Curr Top Dev Biol* **2020**, 137, 391-431.
- [299] Sareen, D.; Gowing, G.; Sahabian, A.; Staggenborg, K.; Paradis, R.; Avalos, P.; Latter, J.; Ornelas, L.; Garcia, L.; Svendsen, C. N. Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *J Comp Neurol* **2014**, 522, 2707-28.
- [300] Hosoyama, T.; McGivern, J. V.; Van Dyke, J. M.; Ebert, A. D.; Suzuki, M. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *Stem cells translational medicine* **2014**, 3, 564-574.
- [301] Beers, J.; Gulbranson, D. R.; George, N.; Siniscalchi, L. I.; Jones, J.; Thomson, J. A.; Chen, G. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat Protoc* **2012**, 7, 2029-40.
- [302] Strathearn, K. E.; Rothenberg, M. E.; Kennebunk, M. Corning® Ultra-Low Attachment Surface Promotes Spheroid Formation in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Line. *Maine: Corning Inc* **2012**.
- [303] McQuade, A.; Coburn, M.; Tu, C. H.; Hasselmann, J.; Davtyan, H.; Blurton-Jones, M. Development and validation of a simplified method to generate human microglia from pluripotent stem cells. *Mol Neurodegener* **2018**, 13, 67.
- [304] Wiese, C.; Rolletschek, A.; Kania, G.; Blyszczuk, P.; Tarasov, K.; Tarasova, Y.; Wersto, R.; Boheler, K.; Wobus, A. Nestin expression—a property of multi-lineage progenitor cells? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **2004**, 61, 2510-2522.
- [305] Gilyarov, A. Nestin in central nervous system cells. *Neuroscience and behavioral physiology* **2008**, 38, 165-169.
- [306] Sarnat, H. B.; Flores-Sarnat, L. Neuropathology of pediatric epilepsy. *Handb Clin Neurol* **2013**, 111, 399-416.
- [307] Bernal, A.; Arranz, L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* **2018**, 75, 2177-2195.
- [308] Sansom, S. N.; Griffiths, D. S.; Faedo, A.; Kleinjan, D. J.; Ruan, Y.; Smith, J.; van Heyningen, V.; Rubenstein, J. L.; Livesey, F. J. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* **2009**, 5, e1000511.
- [309] Callaerts, P.; Halder, G.; Gehring, W. J. Pax-6 in development and evolution. *Annual Review of Neuroscience* **1997**, 20, 483-532.
- [310] Thakurela, S.; Tiwari, N.; Schick, S.; Garding, A.; Ivanek, R.; Berninger, B.; Tiwari, V. K. Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discovery* **2016**, 2, 15045.

- [311] Gumy, L. F.; Katrukha, E. A.; Grigoriev, I.; Jaarsma, D.; Kapitein, L. C.; Akhmanova, A.; Hoogenraad, C. C. MAP2 Defines a Pre-axonal Filtering Zone to Regulate KIF1- versus KIF5-Dependent Cargo Transport in Sensory Neurons. *Neuron* **2017**, *94*, 347-362.
- [312] Soltani, M. H.; Pichardo, R.; Song, Z.; Sangha, N.; Camacho, F.; Satyamoorthy, K.; Sanguenza, O. P.; Setaluri, V. Microtubule-associated protein 2, a marker of neuronal differentiation, induces mitotic defects, inhibits growth of melanoma cells, and predicts metastatic potential of cutaneous melanoma. *Am J Pathol* **2005**, *166*, 1841-50.
- [313] Mariani, M.; Karki, R.; Spennato, M.; Pandya, D.; He, S.; Andreoli, M.; Fiedler, P.; Ferlini, C. Class III β -tubulin in normal and cancer tissues. *Gene* **2015**, *563*, 109-114.
- [314] Janke, C.; Kneussel, M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in Neurosciences* **2010**, *33*, 362-372.
- [315] Chacon, J.; Rogers, C. D. Early expression of Tubulin Beta-III in avian cranial neural crest cells. *Gene Expr Patterns* **2019**, *34*, 119067.
- [316] Lin, S.; Liu, M.; Mozgova, O. I.; Yu, W.; Baas, P. W. Mitotic motors coregulate microtubule patterns in axons and dendrites. *Journal of Neuroscience* **2012**, *32*, 14033-14049.
- [317] Liu, Y.; Lee, J. W.; Ackerman, S. L. Mutations in the microtubule-associated protein 1A (Map1a) gene cause Purkinje cell degeneration. *Journal of Neuroscience* **2015**, *35*, 4587-4598.
- [318] Song, S.-H.; Augustine, G. J. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. *Mol Cells* **2015**, *38*, 936-940.
- [319] Greengard, P.; Valtorta, F.; Czernik, A. J.; Benfenati, F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* **1993**, *259*, 780-5.
- [320] Nestler, E. J.; Greengard, P., Chapter 25 Synapsin I: A review of its distribution and biological regulation. In *Progress in Brain Research*, Gispen, W. H.; Routtenberg, A., Eds. Elsevier: 1986; Vol. 69, pp 323-339.
- [321] Boulant, J. Hypothalamic Neurons: Mechanisms of Sensitivity to Temperature a. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1998**, *856*, 108-115.
- [322] Dean, J. B.; Mulkey, D. K.; Henderson III, R. A.; Potter, S. J.; Putnam, R. W. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of applied physiology* **2004**, *96*, 784-791.
- [323] Lee, S. W.; Clemenson, G. D.; Gage, F. H. New neurons in an aged brain. *Behavioural Brain Research* **2012**, *227*, 497-507.
- [324] Vernodokis, A., Neuron-Glia Interrelations. *International Review of Neurobiology* **1988**, *30*, 149-224.
- [325] Derr, M. A.; Beacham, D.; Kaur, N.; Yan, Y.; Kuninger, D. Regulated control of glial cell outgrowth in primary rodent neuronal cultures by CultureOne™ supplement.
- [326] Lam, M. T.; Longaker, M. T. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **2012**, *6*, s80.
- [327] Sasaki, K.; Suzuki, O.; Takahashi, N. Interface Oral Health Science. *Springer Nature* **2015**.

- [328] Braam, S. R.; Zeinstra, L.; Litjens, S.; Ward-van Oostwaard, D.; van den Brink, S.; van Laake, L.; Lebrin, F.; Kats, P.; Hochstenbach, R.; Passier, R.; Sonnenberg, A.; Mummery, C. L. Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via $\alpha V\beta 5$ Integrin. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2257-2265.
- [329] Yavitt, F. M.; Brown, T. E.; Hushka, E. A.; Brown, M. E.; Gjorevski, N.; Dempsey, P. J.; Lutolf, M. P.; Anseth, K. S. The effect of thiol structure on allyl sulfide photodegradable hydrogels and their application as a degradable scaffold for organoid passaging. *Advanced Materials* **2020**, *32*, 1905366.
- [330] Wormstone, Y.; Wormstone, M. Generating lentoids from human iPSCs using an alternative substrate to Matrigel. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2019**, *60*, 4296-4296.
- [331] Fernandopulle, M. S.; Prestil, R.; Grunseich, C.; Wang, C.; Gan, L.; Ward, M. E. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr Protoc Cell Biol* **2018**, *79*, e51.
- [332] Gerrard, L.; Rodgers, L.; Cui, W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem cells* **2005**, *23*, 1234-1241.
- [333] Pellett, S.; Schwartz, M. P.; Tepp, W. H.; Josephson, R.; Scherf, J. M.; Pier, C. L.; Thomson, J. A.; Murphy, W. L.; Johnson, E. A. Human induced pluripotent stem cell derived neuronal cells cultured on chemically-defined hydrogels for sensitive in vitro detection of botulinum neurotoxin. *Scientific reports* **2015**, *5*, 1-12.
- [334] Patel, R.; Alahmad, A. J. Growth-factor reduced Matrigel source influences stem cell derived brain microvascular endothelial cell barrier properties. *Fluids and Barriers of the CNS* **2016**, *13*, 1-7.
- [335] Fesce, R.; Grohovaz, F.; Valtorta, F.; Meldolesi, J. Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? *Trends in Cell Biology* **1994**, *4*, 1-4.
- [336] Waagepetersen, H. S.; Sonnewald, U.; Schousboe, A. The GABA paradox: multiple roles as metabolite, neurotransmitter, and neurodifferentiative agent. *Journal of neurochemistry* **1999**, *73*, 1335-1342.
- [337] Franco, R.; Reyes-Resina, I.; Navarro, G. Dopamine in health and disease: Much more than a neurotransmitter. *Biomedicines* **2021**, *9*, 109.
- [338] Murphy, D. L.; Andrews, A. M.; Wichems, C. H.; Li, Q.; Tohda, M.; Greenberg, B. Brain serotonin neurotransmission: an overview and update with an emphasis on serotonin subsystem heterogeneity, multiple receptors, interactions with other neurotransmitter systems, and consequent implications for understanding the actions of serotonergic drugs. *Journal of Clinical Psychiatry* **1998**, *59*, 4-12.
- [339] Huot, P.; Parent, A. Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *Journal of neurochemistry* **2007**, *101*, 1441-1447.
- [340] Maxwell, S. L.; Ho, H.-Y.; Kuehner, E.; Zhao, S.; Li, M. Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Developmental biology* **2005**, *282*, 467-479.

- [341] Dunkley, P. R.; Bobrovskaya, L.; Graham, M. E.; Von Nagy-Felsobuki, E. I.; Dickson, P. W. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *Journal of neurochemistry* **2004**, 91, 1025-1043.
- [342] Daubner, S. C.; Le, T.; Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **2011**, 508, 1-12.
- [343] Tabrez, S.; R Jabir, N.; Shakil, S.; H Greig, N.; Alam, Q.; M Abuzenadah, A.; A Damanhour, G.; A Kamal, M. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets* **2012**, 11, 395-409.
- [344] Zhu, Y.; Zhang, J.; Zeng, Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* **2012**, 11, 350-358.
- [345] Chinta, S. J.; Andersen, J. K. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, 37, 942-946.
- [346] Setien, M. B.; Smith, K. R.; Howard, K.; Williams, K.; Suhr, S. T.; Purcell, E. K. Differentiation and characterization of neurons derived from rat iPSCs. *Journal of Neuroscience Methods* **2020**, 338, 108693.
- [347] Rubin, L.; Staddon, J. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual review of neuroscience* **1999**, 22, 11-28.
- [348] Daneman, R.; Prat, A. The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2015**, 7, a020412.
- [349] Dore-Duffy, P.; Cleary, K. Morphology and properties of pericytes. *The blood-brain and other neural barriers* **2011**, 49-68.
- [350] da Fonseca, A. C. C.; Matias, D.; Garcia, C.; Amaral, R.; Geraldo, L. H.; Freitas, C.; Lima, F. R. S. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2014**, 8.
- [351] Abbott, N. J. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat* **2000**, 629–638.
- [352] Armulik, A.; Genové, G.; Mäe, M.; Nisancioglu, M. H.; Wallgard, E.; Niaudet, C.; He, L.; Norlin, J.; Lindblom, P.; Strittmatter, K. Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* **2010**, 468, 557-561.
- [353] Bauer, H.-C.; Bauer, H. Neural Induction of the Blood–Brain Barrier: Still an Enigma. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2000**, 20, 13-28.
- [354] Wu, X.-l.; Wang, P.; Liu, Y.-h.; Xue, Y.-x. Effects of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide on blood–brain barrier and dopaminergic neurons of rats with lipopolysaccharide-induced Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **2014**, 53, 1-9.
- [355] Dudvarski Stankovic, N.; Teodorczyk, M.; Ploen, R.; Zipp, F.; Schmidt, M. H. Microglia-blood vessel interactions: a double-edged sword in brain pathologies. *Acta neuropathologica* **2016**, 131, 347-363.
- [356] Sellgren, C.; Sheridan, S.; Gracias, J.; Xuan, D.; Fu, T.; Perlis, R. Patient-specific models of microglia-mediated engulfment of synapses and neural progenitors. *Molecular psychiatry* **2017**, 22, 170-177.

- [357] Mazzeo, A.; Beltramo, E.; Porta, M. In *Characterization of a New Immortalized Human Microglial Cell Line and its Pro-Inflammatory Activation*. 31st Meeting of the European Association for the Study of Diabetes Eye Complications Study Group (EASDec) Odense, Denmark, 28th–30th October 2021, 1-2.
- [358] Subbiahanadar Chelladurai, K.; Selvan Christyraj, J. D.; Rajagopalan, K.; Yesudhasan, B. V.; Venkatachalam, S.; Mohan, M.; Chellathurai Vasantha, N.; Selvan Christyraj, J. R. S. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon* **2021**, 7, e07686.
- [359] van der Valk, J.; Bieback, K.; Buta, C.; Cochrane, B.; Dirks, W. G.; Fu, J.; Hickman, J. J.; Hohensee, C.; Kolar, R.; Liebsch, M.; Pistollato, F.; Schulz, M.; Thieme, D.; Weber, T.; Wiest, J.; Winkler, S.; Gstraunthaler, G. Fetal Bovine Serum (FBS): Past-Present-Future. *Altex* **2018**, 35, 99-118.
- [360] Kitayama, T.; Yoneyama, M.; Tamaki, K.; Yoneda, Y. Regulation of neuronal differentiation by N-methyl-D-aspartate receptors expressed in neural progenitor cells isolated from adult mouse hippocampus. *Journal of neuroscience research* **2004**, 76, 599-612.
- [361] Yoneyama, M.; Kawada, K.; Gotoh, Y.; Shiba, T.; Ogita, K. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochemistry international* **2010**, 56, 740-746.
- [362] Fukui, M.; Nakamichi, N.; Yoneyama, M.; Ozawa, S.; Fujimori, S.; Takahata, Y.; Nakamura, N.; Taniura, H.; Yoneda, Y. Modulation of cellular proliferation and differentiation through GABAB receptors expressed by undifferentiated neural progenitor cells isolated from fetal mouse brain. *Journal of cellular physiology* **2008**, 216, 507-519.
- [363] Brown, J. A.; Pensabene, V.; Markov, D. A.; Allwardt, V.; Neely, M. D.; Shi, M.; Britt, C. M.; Hoilett, O. S.; Yang, Q.; Brewer, B. M.; Samson, P. C.; McCawley, L. J.; May, J. M.; Webb, D. J.; Li, D.; Bowman, A. B.; Reiserer, R. S.; Wikswow, J. P. Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor. *Biomicrofluidics* **2015**, 9.
- [364] Moscariello, P. In vitro and in vivo investigation of dendronized streptavidin and fluorescent nanodiamonds, two flexible nanosystems efficiently crossing the blood-brain barrier to improve nanotheranostics in neurological disease treatment. **2019**.
- [365] Roy, A.; Fung, Y. K.; Liu, X.; Pahan, K. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281, 14971-14980.
- [366] Roy, A.; Jana, A.; Yatish, K.; Freidt, M. B.; Fung, Y. K.; Martinson, J. A.; Pahan, K. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, 45, 686-699.
- [367] Srinivasan, B.; Kolli, A. R.; Esch, M. B.; Abaci, H. E.; Shuler, M. L.; Hickman, J. J. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **2015**, 20, 107-26.
- [368] Dauchy, S.; Miller, F.; Couraud, P. O.; Weaver, R. J.; Weksler, B.; Romero, I. A.; Scherrmann, J. M.; De Waziers, I.; Decleves, X. Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **2009**, 77, 897-909.

- [369] Gericke, B.; Römermann, K.; Noack, A.; Noack, S.; Kronenberg, J.; Blasig, I. E.; Löscher, W. A face-to-face comparison of claudin-5 transduced human brain endothelial (hCMEC/D3) cells with porcine brain endothelial cells as blood–brain barrier models for drug transport studies. *Fluids and Barriers of the CNS* **2020**, *17*, 1-16.
- [370] Vu, K.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P.-O.; Gelli, A. Immortalized Human Brain Endothelial Cell Line HCMEC/D3 as a Model of the Blood-Brain Barrier Facilitates In Vitro Studies of Central Nervous System Infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **2009**, *8*, 1803-1807.
- [371] Jessen, K. R. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2004**, *36*, 1861-1867.
- [372] Giovannoni, F.; Quintana, F. J. The role of astrocytes in CNS inflammation. *Trends in immunology* **2020**, *41*, 805-819.
- [373] Slezak, M.; Pfrieger, F. W. New roles for astrocytes: Regulation of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosciences* **2003**, *26*, 531-535.
- [374] Yan, J. W.; Tan, T. Y.; Huang, Q. L. Protective effect of astrocyte-conditioned medium on neurons following hypoxia and mechanical injury. *Chin J Traumatol* **2013**, *16*, 3-9.
- [375] Zhu, Z.-H.; Yang, R.; Fu, X.; Wang, Y.-Q.; Wu, G.-C. Astrocyte-conditioned medium protecting hippocampal neurons in primary cultures against corticosterone-induced damages via PI3-K/Akt signal pathway. *Brain research* **2006**, *1114*, 1-10.
- [376] Canfield, S. G.; Stebbins, M. J.; Morales, B. S.; Asai, S. W.; Vatine, G. D.; Svendsen, C. N.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J Neurochem* **2017**, *140*, 874-888.
- [377] Kirkley, K. S.; Popichak, K. A.; Afzali, M. F.; Legare, M. E.; Tjalkens, R. B. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J Neuroinflammation* **2017**, *14*, 99.
- [378] Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* **1998**, *57*, 1-9.
- [379] Korzhhevskii, D.; Kirik, O. Brain microglia and microglial markers. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **2016**, *46*, 284-290.
- [380] Stone, N. L.; England, T. J.; O'Sullivan, S. E. A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells. *Front Cell Neurosci* **2019**, *13*, 230.
- [381] Shayan, G.; Choi, Y. S.; Shusta, E. V.; Shuler, M. L.; Lee, K. H. Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci* **2011**, *42*, 148-55.
- [382] Dalkara, T.; Gursoy-Ozdemir, Y.; Yemisci, M. Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathologica* **2011**, *122*, 1.
- [383] Malina, K. C.-K.; Cooper, I.; Teichberg, V. I. Closing the gap between the in vivo and in vitro blood–brain barrier tightness. *Brain Research* **2009**, *1284*, 12-21.
- [384] Gaillard, P. J.; van der Sandt, I. C. J.; Voorwinden, L. H.; Vu, D.; Nielsen, J. L.; de Boer, A. G.; Breimer, D. D. Astrocytes Increase the Functional Expression of P-Glycoprotein in an In Vitro Model of The Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 1198-1205.

- [385] Delsing, L.; Dönnes, P.; Sánchez, J.; Clausen, M.; Voulgaris, D.; Falk, A.; Herland, A.; Brolén, G.; Zetterberg, H.; Hicks, R.; Synnergren, J. Barrier Properties and Transcriptome Expression in Human iPSC-Derived Models of the Blood–Brain Barrier. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1816-1827.
- [386] Stebbins, M. J.; Gastfriend, B. D.; Canfield, S. G.; Lee, M.-S.; Richards, D.; Faubion, M. G.; Li, W.-J.; Daneman, R.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. Human pluripotent stem cell derived brain pericytes like cells induce blood-brain barrier properties. *Science Advances* **2019**, *5*, eaau7375.
- [387] Cohen-Kashi Malina, K.; Cooper, I.; Teichberg, V. I. Closing the gap between the in vivo and in vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res* **2009**, *1284*, 12-21.
- [388] Vandenhoute, E.; Dehouck, L.; Boucau, M. C.; Sevin, E.; Uzbekov, R.; Tardivel, M.; Gosselet, F.; Fenart, L.; Cecchelli, R.; Dehouck, M. P. Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr Neurovasc Res* **2011**, *8*, 258-69.
- [389] Griep, L. M.; Wolbers, F.; de Wagenaar, B.; ter Braak, P. M.; Weksler, B. B.; Romero, I. A.; Couraud, P. O.; Vermes, I.; van der Meer, A. D.; van den Berg, A. BBB ON CHIP: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. *Biomedical Microdevices* **2012**, *15*, 145-150.
- [390] Oddo, A.; Peng, B.; Tong, Z.; Wei, Y.; Tong, W. Y.; Thissen, H.; Voelcker, N. H. Advances in Microfluidic Blood–Brain Barrier (BBB) Models. *Trends in Biotechnology* **2019**, *37*, 1295-1314.
- [391] Reinitz, A.; DeStefano, J.; Ye, M.; Wong, A. D.; Searson, P. C. Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress. *Microvasc Res* **2015**, *99*, 8-18.
- [392] DeStefano, J. G.; Xu, Z. S.; Williams, A. J.; Yimam, N.; Searson, P. C. Effect of shear stress on iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells (dhBMECs). *Fluids Barriers CNS* **2017**, *14*, 20.
- [393] Cornford, E. M.; Cornford, M. E. In *Nutrient transport and the blood-brain barrier in developing animals*, Federation Proceedings, **1986**, 2065-2072.
- [394] Lehrich, B. M.; Liang, Y.; Fiandaca, M. S. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. *Journal of Extracellular Vesicles* **2021**, *10*.
- [395] Sonnaert, M.; Papantoniou, I.; Luyten, F. P.; Schrooten, J. Quantitative validation of the presto blue™ metabolic assay for online monitoring of cell proliferation in a 3D perfusion bioreactor system. *Tissue Engineering Part C: Methods* **2015**, *21*, 519-529.
- [396] Terrasso, A. P.; Silva, A. C.; Filipe, A.; Pedroso, P.; Ferreira, A. L.; Alves, P. M.; Brito, C. Human neuron-astrocyte 3D co-culture-based assay for evaluation of neuroprotective compounds. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2017**, *83*, 72-79.
- [397] Hernandez-Patlan, D.; Solis-Cruz, B.; Méndez-Albores, A.; Latorre, J.; Hernandez-Velasco, X.; Tellez, G.; López-Arellano, R. Comparison of PrestoBlue and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of Applied Microbiology* **2018**, *124*, 423-430.
- [398] Bell, R. D.; Winkler, E. A.; Sagare, A. P.; Singh, I.; LaRue, B.; Deane, R.; Zlokovic, B. V. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* **2010**, *68*, 409-27.
- [399] Walter, F. R.; Valkai, S.; Kincses, A.; Petneházi, A.; Czeller, T.; Veszélka, S.; Ormos, P.; Deli, M. A.; Dér, A. A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *222*, 1209-1219.

- [400] Campisi, M.; Shin, Y.; Osaki, T.; Hajal, C.; Chiono, V.; Kamm, R. D. 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Biomaterials* **2018**, *180*, 117-129.
- [401] Bang, S.; Lee, S.-R.; Ko, J.; Son, K.; Tahk, D.; Ahn, J.; Im, C.; Jeon, N. L. A low permeability microfluidic blood-brain barrier platform with direct contact between perfusable vascular network and astrocytes. *Scientific reports* **2017**, *7*, 1-10.
- [402] Wevers, N. R.; Nair, A. L.; Fowke, T. M.; Pontier, M.; Kasi, D. G.; Spijkers, X. M.; Hallard, C.; Rabussier, G.; van Vught, R.; Vulto, P.; de Vries, H. E.; Lanz, H. L. Modeling ischemic stroke in a triculture neurovascular unit on-a-chip. *Fluids and Barriers of the CNS* **2021**, *18*, 59.
- [403] Garg, P.; Dhakne, R.; Belekar, V. Role of breast cancer resistance protein (BCRP) as active efflux transporter on blood-brain barrier (BBB) permeability. *Mol Divers* **2015**, *19*, 163-72.
- [404] Mahringer, A.; Fricker, G. BCRP at the blood-brain barrier: genomic regulation by 17beta-estradiol. *Mol Pharm* **2010**, *7*, 1835-47.
- [405] Nakanishi, T.; Ross, D. D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer* **2012**, *31*, 73-99.
- [406] Volk, E. L.; Schneider, E. Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res* **2003**, *63*, 5538-43.
- [407] Helms, H. C.; Hersom, M.; Kuhlmann, L. B.; Badolo, L.; Nielsen, C. U.; Brodin, B. 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**, *16*, 1046-1055.
- [408] Poller, B.; Drewe, J.; Krähenbühl, S.; Huwyler, J.; Gutmann, H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cellular and molecular neurobiology* **2010**, *30*, 63-70.
- [409] Ceckova, M.; Libra, A.; Pavek, P.; Nachtigal, P.; Brabec, M.; Fuchs, R.; Staud, F. Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* **2006**, *33*, 58-65.
- [410] Plasschaert, S. L.; Van Der Kolk, D. M.; De Bont, E. S.; Vellenga, E.; Kamps, W. A.; De Vries, E. G. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in acute leukaemia. *Leukemia & lymphoma* **2004**, *45*, 649-654.
- [411] Ni, Z.; Bikadi, Z.; F Rosenberg, M.; Mao, Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Current drug metabolism* **2010**, *11*, 603-617.
- [412] Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H.; Koomen, G. J.; Schinkel, A. H. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1*, 417-25.
- [413] Doyle, L.; Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **2003**, *22*, 7340-58.
- [414] Ovsepian, S. V.; O'Leary, V. B.; Vesselkin, N. P., Chapter One-Evolutionary origins of chemical synapses. *Vitamins and Hormones* **2020**, *114*, 1-21.

- [415] Brini, M.; Cali, T.; Ottolini, D.; Carafoli, E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* **2014**, *71*, 2787-814.
- [416] Michaelsen, K.; Lohmann, C. Calcium dynamics at developing synapses: mechanisms and functions. *European Journal of Neuroscience* **2010**, *32*, 218-223.
- [417] Grienberger, C.; Konnerth, A. Imaging calcium in neurons. *Neuron* **2012**, *73*, 862-85.
- [418] Greer, P. L.; Greenberg, M. E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* **2008**, *59*, 846-860.
- [419] Martin, V. V.; Beierlein, M.; Morgan, J. L.; Rothe, A.; Gee, K. R. Novel fluo-4 analogs for fluorescent calcium measurements. *Cell Calcium* **2004**, *36*, 509-514.
- [420] Paredes, R. M.; Etzler, J. C.; Watts, L. T.; Zheng, W.; Lechleiter, J. D. Chemical calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 143-151.
- [421] Zhao, Q.; Yang, M.; Guo, H.; Peng, R.; Liao, J.; Diwu, Z. The Bright Calbryte 520 Enables the Probenecid-Free Intracellular Calcium Assays. *Biophysical Journal* **2018**, *114*, 288a.
- [422] Gee, K. R.; Brown, K. A.; Chen, W. N.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* **2000**, *27*, 97-106.
- [423] Blenn, C.; Wyrsh, P.; Althaus, F. R. Messung von zytosolischem Ca²⁺ als Indikator toxischer Zellschädigung. *Biospektrum* **2010**, *16*, 438-440.
- [424] Schwab, A. J.; Ebert, A. D. Sensory neurons do not induce motor neuron loss in a human stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS one* **2014**, *9*, e103112.
- [425] Lin, H. C.; He, Z.; Ebert, S.; Schörnig, M.; Santel, M.; Nikolova, M. T.; Weigert, A.; Hevers, W.; Kasri, N. N.; Taverna, E.; Camp, J. G.; Treutlein, B. NGN2 induces diverse neuron types from human pluripotency. *Stem Cell Reports* **2021**, *16*, 2118-2127.
- [426] Wang, C.; Ward, M. E.; Chen, R.; Liu, K.; Tracy, T. E.; Chen, X.; Xie, M.; Sohn, P. D.; Ludwig, C.; Meyer-Franke, A.; Karch, C. M.; Ding, S.; Gan, L. Scalable Production of iPSC-Derived Human Neurons to Identify Tau-Lowering Compounds by High-Content Screening. *Stem Cell Reports* **2017**, *9*, 1221-1233.
- [427] Ho, S.-M.; Hartley, B. J.; Tcw, J.; Beaumont, M.; Stafford, K.; Slesinger, P. A.; Brennand, K. J. Rapid Ngn2-induction of excitatory neurons from hiPSC-derived neural progenitor cells. *Methods* **2016**, *101*, 113-124.
- [428] Hirase, H.; Qian, L.; Barthó, P.; Buzsáki, G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol* **2004**, *2*, E96.
- [429] Antill-O'Brien, N.; Bourke, J.; O'Connell, C. D. Layer-By-Layer: The Case for 3D Bioprinting Neurons to Create Patient-Specific Epilepsy Models. *Materials (Basel)* **2019**, *12*.
- [430] O'Connor, S. M.; Stenger, D. A.; Shaffer, K. M.; Maric, D.; Barker, J. L.; Ma, W. Primary neural precursor cell expansion, differentiation and cytosolic Ca²⁺ response in three-dimensional collagen gel. *Journal of Neuroscience Methods* **2000**, *102*, 187-195.
- [431] Klotz, B. J.; Gawlitta, D.; Rosenberg, A. J. W. P.; Malda, J.; Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology* **2016**, *34*, 394-407.

- [432] Tibbitt, M. W.; Kloxin, A. M.; Sawicki, L.; Anseth, K. S. Mechanical Properties and Degradation of Chain and Step Polymerized Photodegradable Hydrogels. *Macromolecules* **2013**, *46*, 2785-92.
- [433] Burdick, J. A.; Peterson, A. J.; Anseth, K. S. Conversion and temperature profiles during the photoinitiated polymerization of thick orthopaedic biomaterials. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1779-86.
- [434] Muñoz, Z.; Shih, H.; Lin, C. C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomater Sci* **2014**, *2*, 1063-1072.
- [435] Göckler, T.; Haase, S.; Kempfer, X.; Pfister, R.; Maciel, B. R.; Grimm, A.; Molitor, T.; Willenbacher, N.; Schepers, U. Tuning Superfast Curing Thiol-Norbornene-Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials* **2021**, *10*, 2100206.
- [436] Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1387-408.
- [437] Potjewyd, G.; Moxon, S.; Wang, T.; Domingos, M.; Hooper, N. M. Tissue Engineering 3D Neurovascular Units: A Biomaterials and Bioprinting Perspective. *Trends in Biotechnology* **2018**, *36*, 457-472.
- [438] Sarrigiannidis, S. O.; Rey, J. M.; Dobre, O.; González-García, C.; Dalby, M. J.; Salmeron-Sanchez, M. A tough act to follow: collagen hydrogel modifications to improve mechanical and growth factor loading capabilities. *Materials Today Bio* **2021**, *10*, 100098.
- [439] Seyedhassantehrani, N.; Li, Y.; Yao, L. Dynamic behaviors of astrocytes in chemically modified fibrin and collagen hydrogels. *Integrative Biology* **2016**, *8*, 624-634.
- [440] Tan, B.; Gan, S.; Wang, X.; Liu, W.; Li, X. Applications of 3D bioprinting in tissue engineering: advantages, deficiencies, improvements, and future perspectives. *J Mater Chem B* **2021**, *9*, 5385-5413.
- [441] Hong, N.; Yang, G. H.; Lee, J.; Kim, G. 3D bioprinting and its in vivo applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2018**, *106*, 444-459.
- [442] Ozbolat, I. T.; Peng, W.; Ozbolat, V. Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today* **2016**, *21*, 1257-1271.
- [443] Decante, G.; Costa, J. B.; Silva-Correia, J.; Collins, M. N.; Reis, R. L.; Oliveira, J. M. Engineering bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication* **2021**, *13*, 032001.
- [444] Murphy, S. V.; De Coppi, P.; Atala, A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nature biomedical engineering* **2020**, *4*, 370-380.
- [445] De la Vega, L.; A. Rosas Gómez, D.; Abelseth, E.; Abelseth, L.; Allisson da Silva, V.; Willerth, S. M. 3D Bioprinting Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Tissues Using a Novel Lab-on-a-Printer Technology. *Applied Sciences* **2018**, *8*, 2414.
- [446] Fetah, K.; Tebon, P.; Goudie, M. J.; Eichenbaum, J.; Ren, L.; Barros, N.; Nasiri, R.; Ahadian, S.; Ashammakhi, N.; Dokmeci, M. R. The emergence of 3D bioprinting in organ-on-chip systems. *Progress in Biomedical Engineering* **2019**, *1*, 012001.
- [447] Mizuno, T.; Zhang, G.; Takeuchi, H.; Kawanokuchi, J.; Wang, J.; Sonobe, Y.; Jin, S.; Takada, N.; Komatsu, Y.; Suzumura, A. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *Faseb j* **2008**, *22*, 1797-806.

- [448] Lively, S.; Schlichter, L. C. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2018**, *12*.
- [449] Ngkelo, A.; Meja, K.; Yeadon, M.; Adcock, I.; Kirkham, P. A. LPS induced inflammatory responses in human peripheral blood mononuclear cells is mediated through NOX4 and G α dependent PI-3kinase signalling. *J Inflamm (Lond)* **2012**, *9*, 1.
- [450] Mount, M. P.; Lira, A.; Grimes, D.; Smith, P. D.; Faucher, S.; Slack, R.; Anisman, H.; Hayley, S.; Park, D. S. Involvement of interferon-gamma in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* **2007**, *27*, 3328-37.
- [451] Liu, M.; Bing, G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* **2011**, *2011*, 327089.
- [452] Barnum, C. J.; Tansey, M. G., Chapter 6 - Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. In *Progress in Brain Research* **2010**, *184*, 113-132.
- [453] Daniels, B. P.; Cruz-Orengo, L.; Pasiaka, T. J.; Couraud, P. O.; Romero, I. A.; Weksler, B.; Cooper, J. A.; Doering, T. L.; Klein, R. S. Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier. *J Neurosci Methods* **2013**, *212*, 173-9.
- [454] Voirin, A. C.; Perek, N.; Roche, F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd.3 endothelial cells in vitro BBB model. *Brain Res* **2020**, *1730*, 146647.
- [455] Dutra, M. F.; Jaeger, M.; Ilha, J.; Kalil-Gaspar, P. I.; Marcuzzo, S.; Achaval, M. Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurol Sci* **2012**, *33*, 1137-44.
- [456] Lively, S.; Schlichter, L. C. The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. *J Neuroinflammation* **2013**, *10*, 75.
- [457] Chuang, D. Y.; Simonyi, A.; Kotzbauer, P. T.; Gu, Z.; Sun, G. Y. Cytosolic phospholipase A2 plays a crucial role in ROS/NO signaling during microglial activation through the lipoxygenase pathway. *J Neuroinflammation* **2015**, *12*, 199.
- [458] Qin, L.; Li, G.; Qian, X.; Liu, Y.; Wu, X.; Liu, B.; Hong, J. S.; Block, M. L. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia* **2005**, *52*, 78-84.
- [459] Simpson, D. S. A.; Oliver, P. L. ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel)* **2020**, *9*.
- [460] Roy, A.; Fung, Y. K.; Liu, X.; Pahan, K. Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 14971-80.
- [461] Kim, M.; Mok, H.; Yeo, W. S.; Ahn, J. H.; Choi, Y. K. Role of ginseng in the neurovascular unit of neuroinflammatory diseases focused on the blood-brain barrier. *J Ginseng Res* **2021**, *45*, 599-609.
- [462] Candelario-Jalil, E.; Taheri, S.; Yang, Y.; Sood, R.; Grossetete, M.; Estrada, E. Y.; Fiebich, B. L.; Rosenberg, G. A. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **2007**, *323*, 488-98.

- [463] Pajares, M.; A, I. R.; Manda, G.; Boscá, L.; Cuadrado, A. Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cells* **2020**, *9*.
- [464] Gray, M. T.; Woulfe, J. M. Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* **2015**, *35*, 747-50.
- [465] Rahman, M. T.; Ghosh, C.; Hossain, M.; Linfield, D.; Rezaee, F.; Janigro, D.; Marchi, N.; van Boxel-Dezaire, A. H. H. IFN- γ , IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **2018**, *507*, 274-279.
- [466] Poller, B.; Drewe, J.; Krähenbühl, S.; Huwyler, J.; Gutmann, H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-Glycoprotein (ABCB1) by Cytokines in a Model of the Human Blood-Brain Barrier. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2009**, *30*, 63-70.
- [467] Qin, L.-h.; Huang, W.; Mo, X.-a.; Chen, Y.-l.; Wu, X.-h. LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, *2015*, 120641.
- [468] Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B.; Prat, A. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **2007**, *13*, 1173-5.
- [469] Camire, R. B.; Beaulac, H. J.; Willis, C. L. Transitory loss of glia and the subsequent modulation in inflammatory cytokines/chemokines regulate paracellular claudin-5 expression in endothelial cells. *J Neuroimmunol* **2015**, *284*, 57-66.
- [470] Christofidou-Solomidou, M.; Nakada, M. T.; Williams, J.; Muller, W. A.; DeLisser, H. M. Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol* **1997**, *158*, 4872-8.
- [471] Lee, S.; Ko, J.; Park, D.; Lee, S. R.; Chung, M.; Lee, Y.; Jeon, N. L. Microfluidic-based vascularized microphysiological systems. *Lab Chip* **2018**, *18*, 2686-2709.
- [472] Bhatia, S. N.; Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 760-72.
- [473] Hauser, R. A. Levodopa: past, present, and future. *Eur Neurol* **2009**, *62*, 1-8.
- [474] Whitfield, A. C.; Moore, B. T.; Daniels, R. N. Classics in chemical neuroscience: levodopa. *ACS Chem Neurosci* **2014**, *5*, 1192-7.
- [475] Wirdefeldt, K.; Odin, P.; Nyholm, D. Levodopa-Carbidopa Intestinal Gel in Patients with Parkinson's Disease: A Systematic Review. *CNS Drugs* **2016**, *30*, 381-404.
- [476] Jeon, S. M.; Cheon, S. M.; Bae, H. R.; Kim, J. W.; Kim, S. U. Selective susceptibility of human dopaminergic neural stem cells to dopamine-induced apoptosis. *Exp Neurobiol* **2010**, *19*, 155-64.
- [477] Jorga, K.; Fotteler, B.; Sedek, G.; Nielsen, T.; Aitken, J. The effect of tolcapone on levodopa pharmacokinetics is independent of levodopa/carbidopa formulation. *J Neurol* **1998**, *245*, 223-30.
- [478] Nyholm, D. Enteral levodopa/carbidopa gel infusion for the treatment of motor fluctuations and dyskinesias in advanced Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* **2006**, *6*, 1403-11.

- [479] Rosebraugh, M.; Voight, E. A.; Moussa, E. M.; Jameel, F.; Lou, X.; Zhang, G. G. Z.; Mayer, P. T.; Stolarik, D.; Carr, R. A.; Enright, B. P.; Liu, W.; Facheris, M. F.; Kym, P. R. Foslevodopa/Foscarbidopa: A New Subcutaneous Treatment for Parkinson's Disease. *Ann Neurol* **2021**, *90*, 52-61.
- [480] Subramanian, V. B.; Konduru, N.; Katari, N. K.; Dongala, T.; Gundla, R. A simple high-performance liquid chromatography method development for Carbidopa and Levodopa impurities: Evaluation of risk assessment before method validation by Quality by Design approach. *Separation science plus* **2020**, *3*, 530-539.
- [481] Franke, H.; Galla, H.-J.; Beuckmann, C. T. An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. *Brain Research* **1999**, *818*, 65-71.
- [482] Adhikary, R. R.; Koppaka, O.; Banerjee, R. Development of color changing polydiacetylene-based biomimetic nanovesicle platforms for quick detection of membrane permeability across the blood brain barrier. *Nanoscale* **2020**, *12*, 8898-8908.
- [483] García, J. J.; Fernandez, N.; Calle, Á. P.; Diez, M. J.; Sahagun, A.; Sierra, M. Effects of Plantago ovata husk on levodopa (with carbidopa) bioavailability in rabbits with autonomic gastrointestinal disorders. *Drug metabolism and disposition* **2009**, *37*, 1434-1442.
- [484] Krüger, R.; Lingor, P.; Doskas, T.; Henselmans, J. M.; Danielsen, E. H.; de Fabregues, O.; Stefani, A.; Sensken, S.-C.; Parra, J. C.; Onuk, K. An observational study of the effect of levodopa-carbidopa intestinal gel on activities of daily living and quality of life in advanced Parkinson's disease patients. *Advances in therapy* **2017**, *34*, 1741-1752.
- [485] Wehl, I. High-throughput screening and evaluation of combinatorial cell penetrating peptoid libraries to identify organelle and organ specific drug delivery molecules. *Dissertation* **2019**.
- [486] Modi, G.; Pillay, V.; Choonara, Y. E. Advances in the treatment of neurodegenerative disorders employing nanotechnology. *Ann N Y Acad Sci* **2010**, *1184*, 154-72.
- [487] Zhang, H.; Zhai, Y.; Wang, J.; Zhai, G. New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2016**, *60*, 560-568.
- [488] Vinogradov, S. V. Polymeric nanogel formulations of nucleoside analogs. *Expert Opin Drug Deliv* **2007**, *4*, 5-17.
- [489] Cuggino, J. C.; Blanco, E. R. O.; Gugliotta, L. M.; Alvarez Igarzabal, C. I.; Calderón, M. Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance. *Journal of Controlled Release* **2019**, *307*, 221-246.
- [490] Sultana, F.; Manirujjaman, M.; Imran-Ul-Haque, M. A.; Sharmin, S. An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci* **2013**, *3*, 95-105.
- [491] Pfeifer, J. Charakterisierung multimodaler Hybrid-Nanosysteme für den gezielten Wirkstofftransport in der Krebstherapie. *Masterarbeit* **2020**.

7 Anhang

Kapitel 3.1.3.2.4: Kultivierung von HRA in GelMA

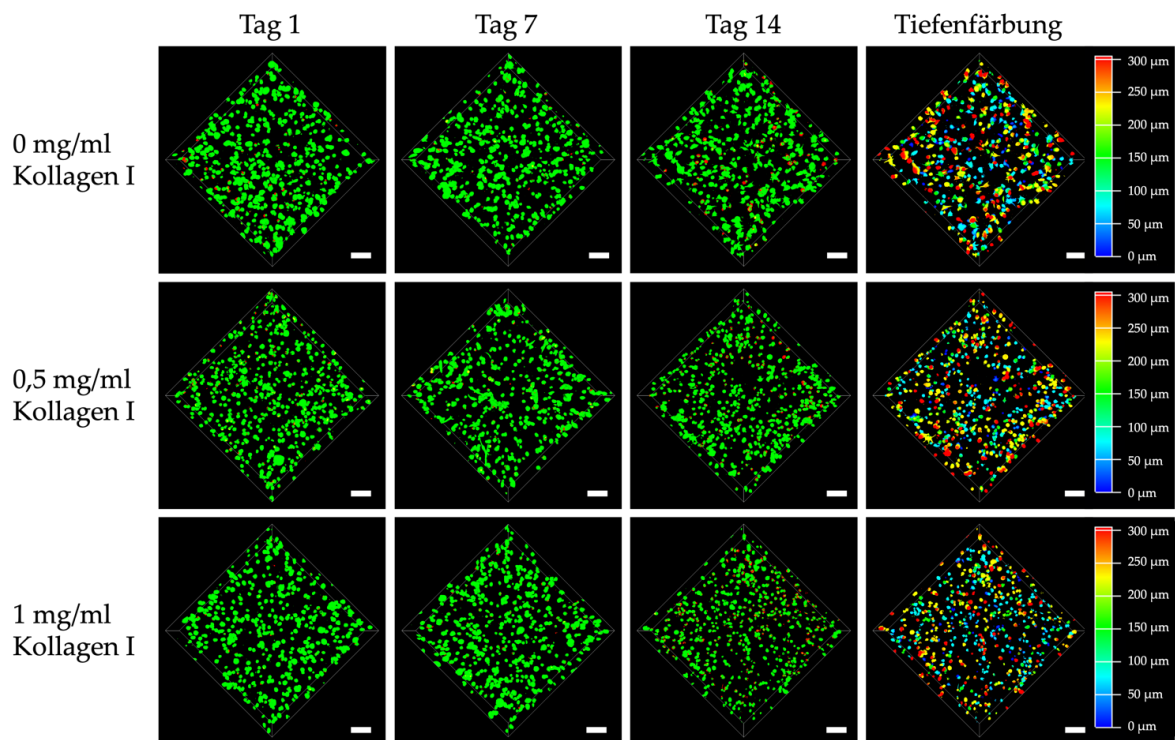


Abbildung 135: Lebend-/Tot-Färbung von HRA im GelMA-Hydrogel mit 0,5 mg/ml und 1 mg/ml Kollagen I. HRA wurden in einer Zellkonzentration von $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 200 μ l der Gelmatrix mit oder ohne Kollagen I eingebettet. Als Gelmatrix wurden GelMA-Hydrogele der Vernetzungsgrade *Low*, *Medium* und *High* verwendet. Die kovalente Vernetzung wurde durch Zugabe von 0,3 % LAP und einer Bestrahlungsdauer von 30 s bei 500 mW/cm² induziert (Omniscure S2000, 320-500 nm). An Tag 1, 7 und 14 konnte die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht werden. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 60$, Abstand = 5 μ m, $h = 300$ μ m, Leica TCS SPE DMI4000B). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden. Der Maßstab beträgt 100 μ m.

Kapitel 3.2.2.1.4.1: TEER-Messung der Barriereintegrität von hCMEC/D3

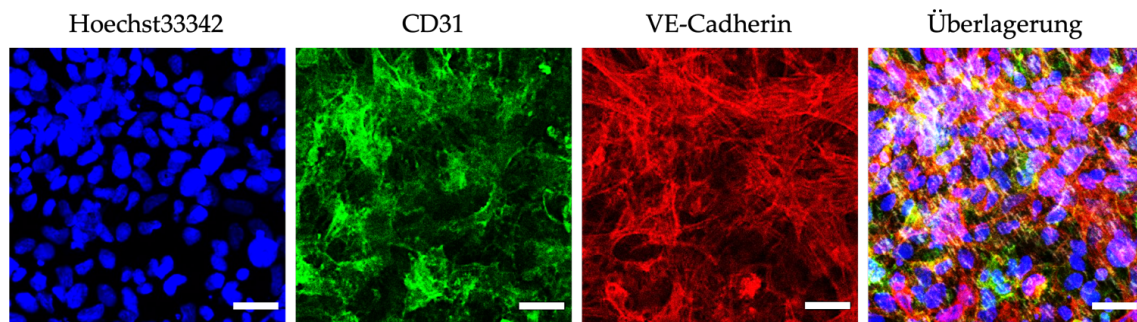


Abbildung 136: Immunfluoreszenzfärbung von hCMEC/D3 in M7 1:1 BM im Transwell-System. $6 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 wurden in einem mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichteten Transwell-System im Spezialmedium KM apikal ausgesät. Nach 3 h wurde das Medium auf M7 1:1 BM vollständig ausgetauscht. Es folgte eine Kultivierung bei 5 % CO₂ und 37 °C, dabei wurde ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage durchgeführt. Nach 21 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Zur Visualisierung der zelltypischen Strukturen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie wurden die spezifischen Zellstrukturen visualisiert (ZEISS LSM 800). Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von CD31. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Kapitel 3.2.3.1: Kokultur von Astrozyten und Neuronen im vasQchip

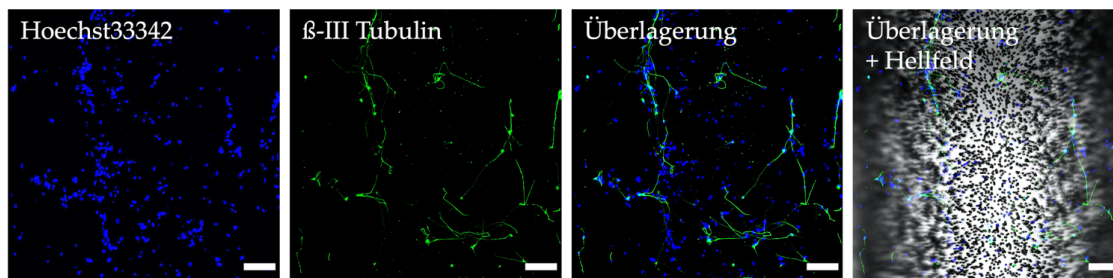


Abbildung 137: Immunfluoreszenzfärbung von Neuronen im vasQchip nach fluidischer Kultivierung. Eine Beschichtung und Besiedlung des vasQchips erfolgte „offen“. Dabei wurde das umgebende Kompartiment des vasQchips mit Matrigel hESC beschichtet. Anschließend wurden $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM eingebracht. Nach 48 h wurde durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases das umgebende Kompartiment des vasQchips geschlossen. Daraufhin wurde der vasQchip an eine Spritzenpumpe angeschlossen und bei einer Flussrate von 100 µl/h bei 5 % CO₂ und 37 °C fluidisch kultiviert. Nach 14 Tagen wurden die Zellen im vasQchip fixiert, permeabilisiert, die unspezifischen Bindungsstellen blockiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Daraufhin wurden mit inverser Konfokalmikroskopie *z-stack* Messungen durchgeführt ($n = 114$, Abstand = 3 µm, $h = 339$ µm, Leica Stellaris 5). Anschließend konnten Maximalüberlagerungen erstellt werden. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β-III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Kapitel 3.2.3.2: Kokultur der NVU im vasQchip und Immunfluoreszenzfärbung

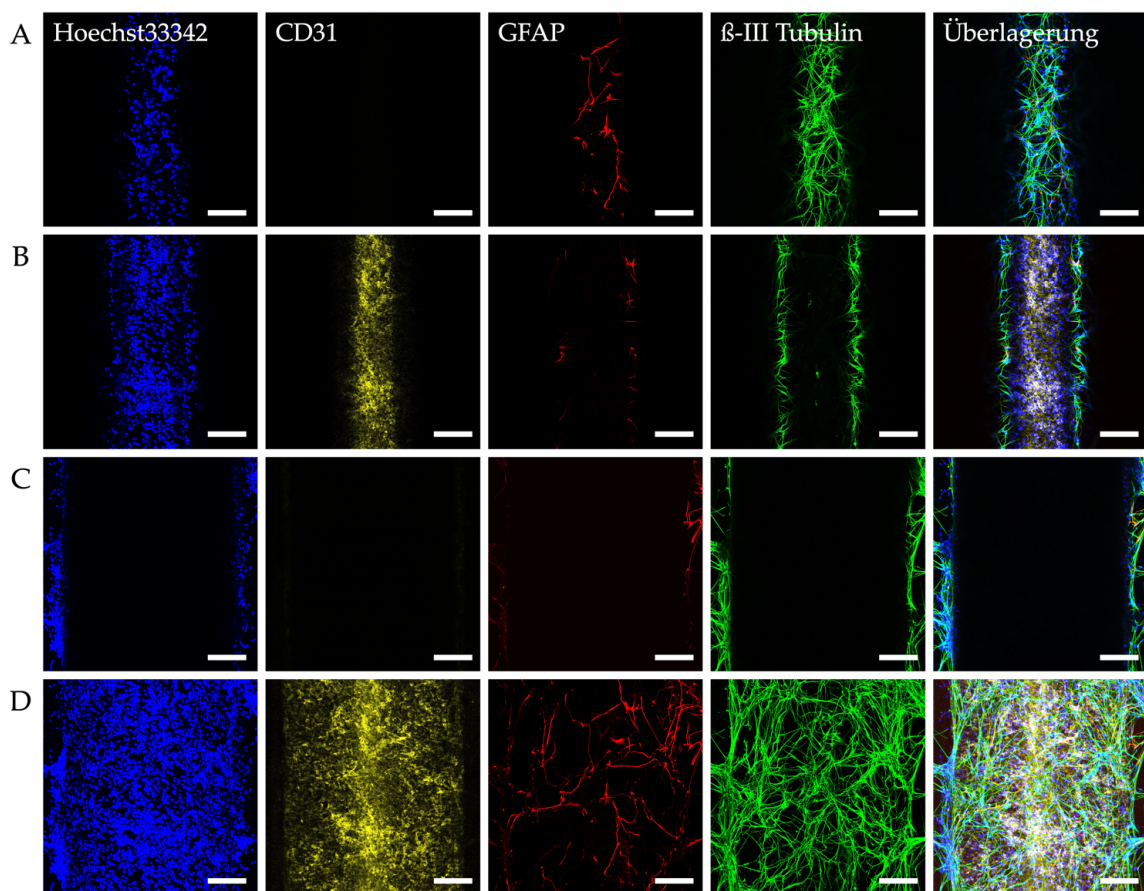


Abbildung 138: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen des NVU-Modells im vasQchip. Eine Beschichtung und Besiedlung des umgebenden Kompartiments erfolgte „offen“ im vasQchip auf der PC-Membran. Hierfür wurden $5 \cdot 10^5$ HBVP in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurden $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM eingebracht. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 5 % CO₂ und 37 °C. 24 h später wurde die Zellschicht mit Matrigel hESC beschichtet und mit $16,7 \cdot 10^4$ NSC in M7 1:1 BM besiedelt. Nach 48 h wurde das umgebende Kompartiment durch Anbringung eines Kleberinges und Deckglases geschlossen. Daraufhin erfolgte eine fluidische Kultivierung mit einer Flussrate von 100 µl/h. 7 Tage nach Einbringung der Neuronen wurde der Mikrokanal mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtet und mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Es folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 µl/h über 7 Tage. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Für eine Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in den vasQchips fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker durchgeführt werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 gefärbt. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten *z-stack* Messungen generiert werden ($n = 103-113$, Abstand = 3 µm, $h = 325-338$ µm, Leica Stellaris 5). Daraufhin konnte mithilfe der Leica LasX-Software 3D-Projektionen sowie Maximalüberlagerungen erzeugt werden. (i) stellt die innere laterale, (ii) stellt die horizontale und (iii) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. (iv) zeigt die Maximalüberlagerung und (v) die Maximalüberlagerung mit Hellfeld. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β-III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 µm.

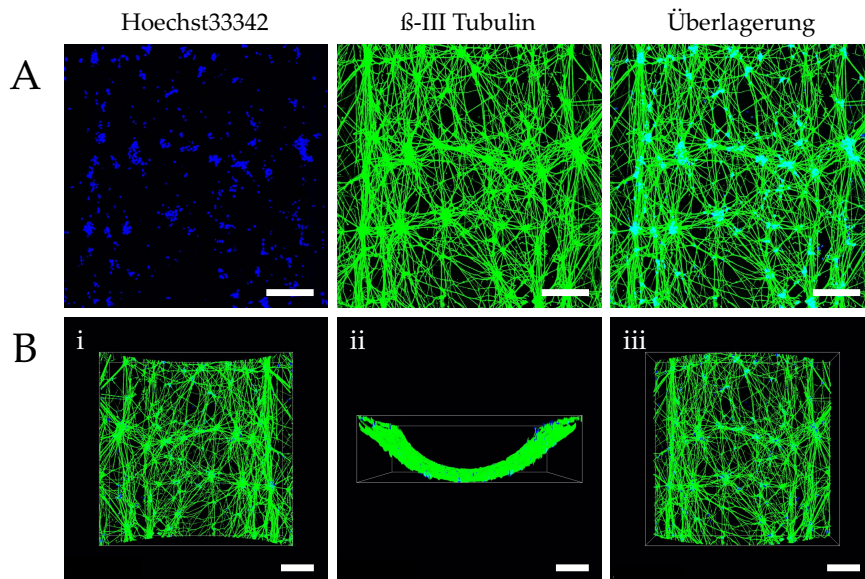
Kapitel 3.2.4.2: *Calcium Imaging* im vasQchip

Abbildung 139: Immunfluoreszenzfärbung der WTC11NGN2 differenzierten Neuronen im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 wurden in M7 1:1 BM in das Matrigel hESC beschichtete umgebende Kompartiment des vasQchips ausgesät. Um ein Anwachsen auf der PC-Membran sicherzustellen, wurde der vasQchip um 180° gedreht positioniert. 24 h später folgte eine mikrofluidische Kultivierung bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l/h}$ für 14 Tage. Im Anschluss wurden die Zellen im vasQchips fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Daraufhin konnte eine Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin durchgeführt werden. Hierfür wurden *z-stack* Aufnahmen mithilfe inverser Konfokalmikroskopie durchgeführt ($n = 133$, Abstand = $3 \mu\text{m}$, $h = 396 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Daraufhin wurden mithilfe der Leica LasX-Software 3D-Projektionen erzeugt. (A) zeigt die Maximalüberlagerung. (Bi) stellt die innere laterale, (Bii) die horizontale und (Biii) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. Blau: Zellkernfärbung mit Hoechst33342. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht $200 \mu\text{m}$.

Kapitel 3.2.5.2.4: Kultivierung von Neuronen in GelNB/GelS

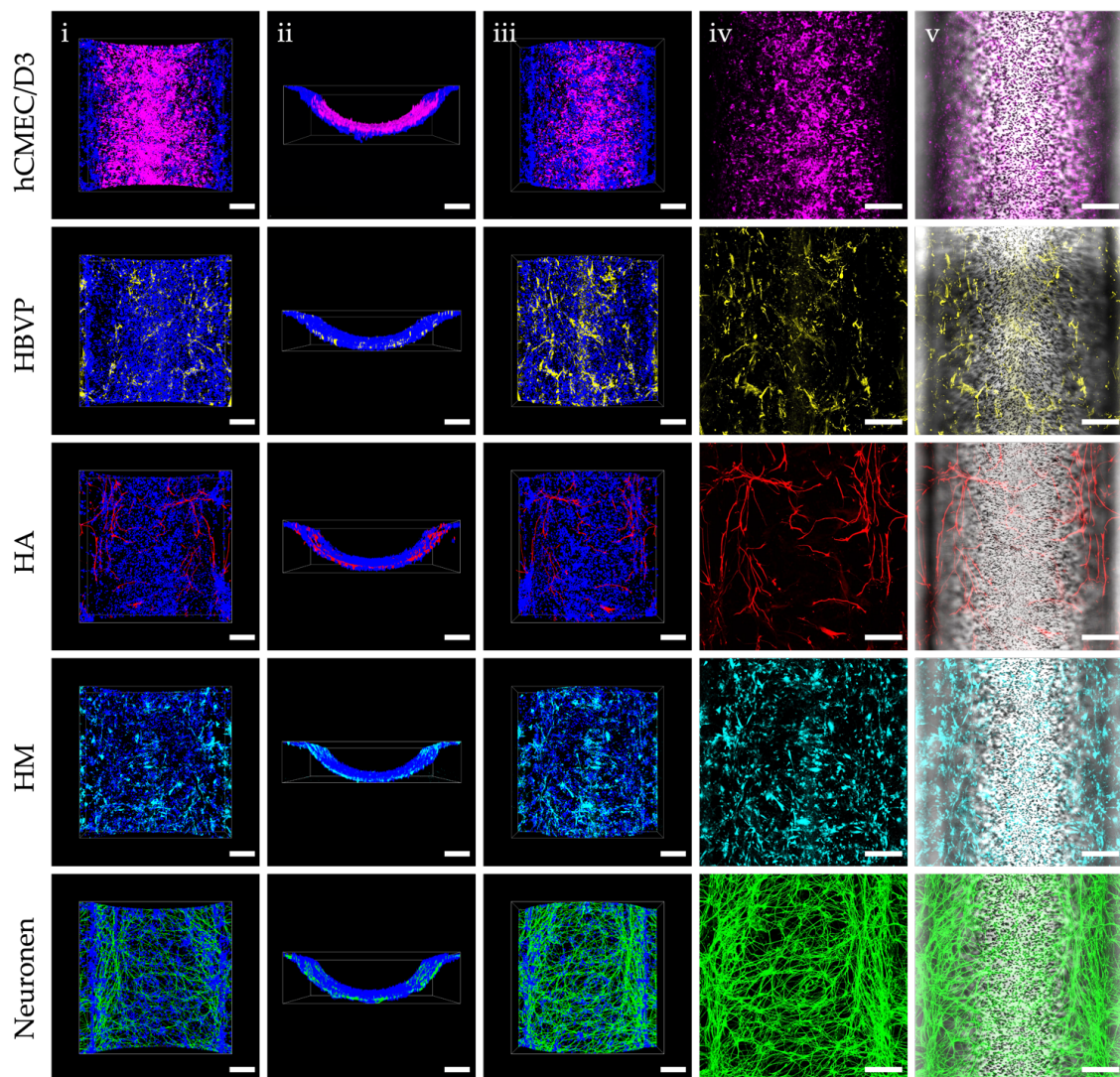


Abbildung 140: Immunfluoreszenzfärbung zelltypischer Strukturen des NVU-Modells im vasQchip. $5 \cdot 10^5$ HBVP wurden in das mit 0,6 mg/ml Kollagen I beschichtete umgebende Kompartiment in KM ausgesät. Am Folgetag wurden $5 \cdot 10^5$ HA und $1 \cdot 10^5$ HM in KM eingebracht. 24 h später wurde der mit 0,1 mg/ml Kollagen I beschichtete Mikrokanal mit $7,5 \cdot 10^4$ hCMEC/D3 besiedelt. Am nächsten Tag wurde das umgebende Kompartiment mit Matrigel hESC beschichtet und mit $5 \cdot 10^5$ NSC der iPSC Linie WTC11NGN2 in M7 1:1 BM besiedelt. Nach einer Inkubation über Nacht folgte eine fluidische Kultivierung bei einer Flussrate von 100 μ l/h. Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Mediumwechsel im umgebenden Kompartiment durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen in den vasQchips fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzfärbung der jeweiligen zellspezifischen Marker durchgeführt werden. Mithilfe inverser Konfokalmikroskopie konnten *z-stack* Messungen generiert werden ($n = 103-113$, Abstand = 3 μ m, $h = 325-338$ μ m, Leica Stellaris 5). Daraufhin wurde mithilfe der Leica LasX-Software 3D-Projektionen sowie Maximalüberlagerungen erzeugt. (i) stellt die innere laterale, (ii) die horizontale und (iii) die äußere laterale 3D-Projektion des Mikrokanals dar. (iv) zeigt die Maximalüberlagerung und (v) die Maximalüberlagerung mit Hellfeld. Blau: Hoechst33342-Zellkernfärbung. Magenta: Immunfluoreszenzfärbung von CD31 in hCMEC/D3. Gelb: Immunfluoreszenzfärbung von α -SMA in HBVP. Rot: Immunfluoreszenzfärbung von GFAP in HA. Cyan: Immunfluoreszenzfärbung von Iba-1 in HM. Grün: Immunfluoreszenzfärbung von β -III Tubulin in Neuronen. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m.

Kapitel 3.2.6: NVU-Modell inklusive Neuronen im Kollagen I-Hydrogel

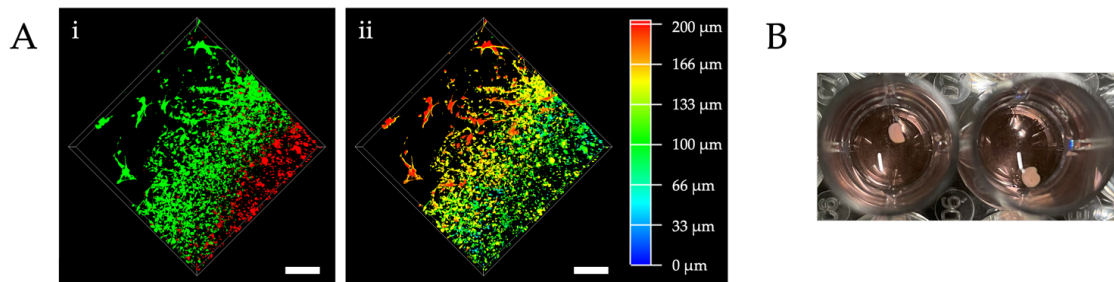


Abbildung 141: Lebend-/Tot-Färbung von NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 mit HA im 1 mg/ml Kollagen I-Hydrogel. NSC der iPSC-Linie WTC11NGN2 sowie HA wurden jeweils in einer Zellkonzentration von $1,25 \cdot 10^6$ Zellen/ml in $400 \mu\text{l}$ der Gelmatrix simultan eingebettet. Als Gelmatrix wurde ein 1 mg/ml Kollagen I-Hydrogel verwendet. Die physikalische Vernetzung wurde durch Zugabe von 1 M NaOH sowie durch eine 30-minütige Inkubation bei 37°C und 5 % CO_2 induziert. (A) An Tag 1 wurde die Viabilität der Zellen mithilfe einer Lebend-/Tot-Färbung unter Verwendung von Calcein-AM (grün) und PI (rot) untersucht. Durch inverse Konfokalmikroskopie wurden *z-stack* Messungen generiert ($n = 40$, Abstand = $5 \mu\text{m}$, $h = 200 \mu\text{m}$, Leica Stellaris 5). Anhand der Leica LasX-Software konnten anschließend 3D-Projektionen sowie eine Tiefenfärbung erstellt werden. Der Maßstab beträgt $100 \mu\text{m}$. (B) zeigt die degradierte Gelmatrix nach einer Kultivierung von einem Tag.

Kapitel 3.2.7: 3D-Bioprinting der Neuronen



Abbildung 142: Polymerisierung des 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels in der Druckerkartusche. Nach einer 30-minütigen Polymerisierung des 2 mg/ml Kollagen I-Hydrogels entsteht ein inhomogen vernetztes nicht-druckbares Hydrogel.