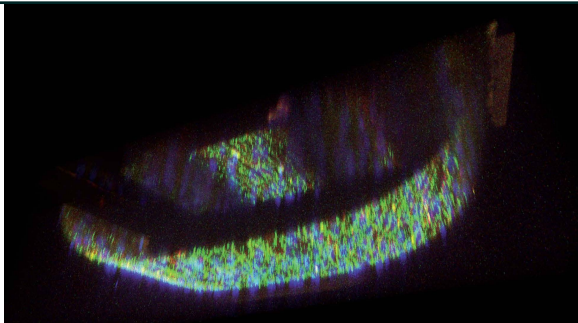




Isabella Hebei (Autor)

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



Isabella Hebei

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



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

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

Copyright:

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

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



2 EINLEITUNG

Trotz einer rasanten Entwicklung in der Synthese und Evaluierung neuer Wirkstoffe stellen deren gezielte Applikation immer noch große Herausforderungen für die Entwicklung von Wirkstoffen und auch ‚Drug Delivery‘ Systemen dar. Die Erhöhung der Bioverfügbarkeit und Halbwertszeit im Blut, die Resorption im Darm oder die Aufnahme über die Blut-Hirnschranke stehen daher im Fokus vieler Forschergruppen.^[1] ‚Drug Delivery‘ Systeme dienen nicht nur der Verpackung von Wirkstoffen und damit dem Schutz vor vorzeitigem Abbau, sondern können auch mit Affinitätsliganden für eine Organ-spezifische Anwendung modifiziert werden. Dennoch sind viele Faktoren sowohl für die reinen Wirkstoffe als auch für die ‚Drug Delivery‘ Systeme, die den transendothelialen und die anderen transepithelialen Transportwege beeinflussen, noch nicht bekannt. Auch heute ist es noch nicht einfach, im Screening den transendothelialen Transport, die Verteilung im Interstitium und die weitere Aufnahme durch verschiedene Zellen zu visualisieren. Eine weitere Herausforderung ist es die Faktoren aus dem Blut zu bestimmen, die diesen Transport verzögern oder beschleunigen, ohne dabei den Blutfluss zu unterbinden.

Die überwiegenden Studien zur Untersuchung von Wirkstoffaufnahme, Akkumulation, Bioverfügbarkeit, Halbwertszeit und Abbauweg werden im Tiermodell durchgeführt, da dieses die natürliche Umgebung widerspiegelt. Pharmakokinetische Aspekte wie Aufnahme, Verteilung, Abbau sowie Ausscheidung der Wirkstoffe (ADME, engl. absorption, distribution, metabolism, excretion) sind so in einem Modell beinhaltet. Nachteile der *in vivo*-Modelle sind beispielsweise, dass eine genaue Analyse der Bioverfügbarkeit durch Modulation der Blutfaktoren und Gewebe unter konstanten Flussbedingungen nicht möglich ist. Eine Modulation von Blutfaktoren könnte beispielsweise Aufschluss über deren Einfluss auf Aufnahmeprozesse geben. Schwierig ist hier auch die Visualisierung des interstitiellen Transports. Zudem sind Tiermodelle aufgrund von Spezies-spezifischen Unterschieden oft nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Die meisten *in vitro*-Modelle beruhen auf Boyden Chambers oder Transwell-Kammern.^[2, 3] Dabei werden Blutgefäßendothelzellen in einer oberen Kammer als Monolayer auf einer porösen Membran ausplattiert und der Durchtritt des Wirkstoffs in die sich darunter befindende, mit Medium gefüllte Kammer gemessen. Dieses Modell erlaubt allerdings weder einen transendothelialen Wirkstofftransport bei konstanter Zirkulation noch repräsentiert es die Krümmung eines Blutgefäßes und die damit verbundene Dreidimensionalität des Gefäßes und des Gewebes, welches sich um das Blutgefäß formiert. Zudem verlieren viele Zellen unter konventionellen Zellkulturbedingungen (z.B. statische Monolayer-Kultur) ihre phenotypischen Eigenschaften.^[4] Es ist bekannt, dass Zellen, die in einer dreidimensionalen Umgebung kultiviert werden, viel näher die *in vivo*-Gegebenheiten widerspiegeln als Zellen in zweidimensionaler Zellkultur.^[5, 6] Weiterhin sekretiert 3D-Gewebe, welches in unmittelbarer Nachbarschaft des Blutgefäßes lokalisiert ist, Faktoren, die den transendothelialen Transport



verstärken können. Das ist besonders bei Tumorgewebe relevant, da diese Proteasen sekretieren bzw. rekrutieren, die eine kurzzeitige Auflösung der endothelialen Konnektivität durch Proteolyse der Tight Junctions fördern und somit das Blutgefäß für den Wirkstofftransport durchlässig machen.^[7-12] Auch für die Entwicklung neuer Wirkstoffe für kardiovaskuläre Krankheiten oder die Untersuchung der vaskulären Toxizität pharmakologischer Einheiten ist die Etablierung verlässlicher *in vitro*-Modelle für die Mikrozirkulation sehr wichtig.^[13]

Deshalb wurde ein mikrofluidischer Bioreaktor entwickelt, der aus einer dreidimensionalen Anordnung von artifiziellen Blutgefäßen umgeben von einem weiteren Kompartiment besteht. Dieses angrenzende Kompartiment kann zur Kultivierung einer Ko-Kultur, beispielsweise in Form eines organotypischen 3D-Zellverbandes, eingesetzt werden. Mit Hilfe der SMART-Technologie wurden gekrümmte, poröse Mikrokanäle als künstliche Blutgefäße hergestellt, die das Herzstück des Bioreaktors darstellten. Der Bioreaktor erlaubt *in vitro* die Visualisierung des transendothelialen Transports durch die porösen Mikrokanäle ins Interstitium unter konstanten Flussraten und unter Verwendung unterschiedlicher Medien. Das Promotionsvorhaben umfasste die Entwicklung des mikrofluidischen Bioreaktors und die Etablierung der Kultivierung von Endothelzellen im mikrofluidischen Kanal, sowie die Analyse der Zellkulturparameter, der Nährstoffzufuhr und der Verwendung der Medien. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Bioreaktors, wie beispielsweise Flussprofile, wurden durchgeführt.

Nach Etablierung des Bioreaktors wurde dessen Einsetzbarkeit als *in vitro*-Modell eines Blutgefäßes zur Untersuchung des vaskulären Systems getestet. Hierbei wurde die Reaktion der Endothelzellen auf angelegte Schwerkraft untersucht. Zudem wurde eine Entzündungsreaktion im mikrofluidischen Bioreaktor simuliert und die Rekrutierung von Immunzellen beobachtet. Eine weitere Anwendung des Bioreaktors war die Untersuchung der endothelialen Aufnahme, sowie des transendothelialen Transports von polykationischen Peptiden und deren Anreicherung im Gewebe mit Hilfe von 3D- und 4D-konfokaler Mikroskopie und HPLC (Hochleistungsflüssigchromatographie)-Analytik. Sowohl die qualitative als auch die quantitative endotheliale Aufnahme verschiedener polykationischer Peptide wurde unter normalen, statischen Zellkulturbedingungen untersucht.



2.1 Vaskuläres System

2.1.1 Aufbau des Endothels

Das Endothel ist eine dünne einschichtige Zellschicht, welche die gesamte innere Oberfläche von Blutgefäßen (Arterien, Venen und Kapillaren), des Herzens und somit des gesamten Herz-Kreislauf-Systems auskleidet (Abbildung 1). Es bildet die Schnittstelle zwischen dem Blut und dem darunter liegenden Gewebe.^[14] Man unterscheidet zwischen vaskulären Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit dem Blut stehen und lymphatischen Endothelzellen, die in Kontakt mit der Lymphe stehen. Neben Blutzellen sind Endothelzellen der einzige Zelltyp, der in direktem Kontakt mit Blut bzw. Lympheflüssigkeit steht. Die luminalen Seite der Endothelzellen ist mit der sogenannten Glykokalyx ausgestattet; einer Schicht, bestehend aus Polysacchariden, die kovalent mit den Membranproteinen und -lipiden der Zellen verbunden sind.^[15]

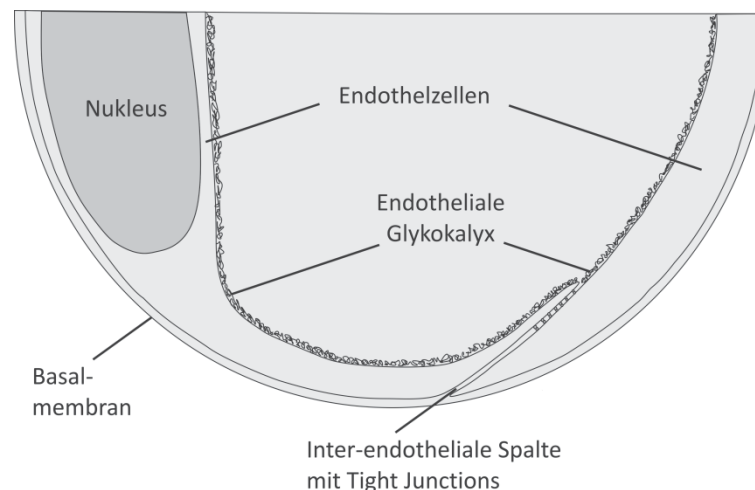


Abbildung 1: Querschnitt durch eine Blutkapillare. Gezeigt wird das Größenverhältnis der Glykokalyx auf der luminalen Seite der Endothelzellen zu den Endothelzellen selbst (modifiziert nach Flessner, 2008).^[15]

Der Aufbau von Blutgefäßen unterscheidet sich je nach Größe und Funktion. Die fünf wichtigsten Blutgefäße sind Arterien (Durchmesser größer als 1 cm bei elastischen Arterien, 0,1 – 10 mm bei muskulösen Arterien), Arteriolen (10 – 100 µm), Kapillaren (4 – 10 µm), Venolen (10 – 100 µm) und Venen (0,1 mm bis zu mehr als 1 mm).^[16] Die innerste Schicht einer Arterie (Tunica intima) besteht aus dem Endothel und der daran anschließenden Basalmembran (Abbildung 2). Im Anschluss daran findet sich elastisches Gewebe (Membrana elastica interna). Die mittlere Schicht (Tunica media) ist aus elastischen Fasern sowie glattem Muskelgewebe aufgebaut. Sie stellt die dickste Schicht dar. Die äußere Schicht (Tunica externa) besteht aus elastischen Fasern und Kollagenfasern (Abbildung 2). Die glatte Muskulatur der Tunica media ist mit sympathischen Neuronen des vegetativen Nervensystems ausgestattet und vermittelt dadurch bei einer Stimulierung die Kontraktion des Blutgefäßes (Vasokonstriktion). Eine Verringerung dieser Stimulierung oder die



Anwesenheit bestimmter Stoffe, wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO), bewirken das Entspannen der glatten Muskelfasern (Vasodilatation).^[16]

Venen sind ebenfalls dreischichtig aufgebaut. Allerdings unterscheiden sich die relativen Dicken dieser Schichten im Gegensatz zu Arterien (Abbildung 2). Tunica intima und Tunica media sind in Venen sehr viel dünner. Durch die höhere elastische Dehnbarkeit der Gefäßwände können sich Venen an die fluiddynamischen Verhältnisse des Blutflusses, wie Scherkräfte und Drücke, anpassen.^[16] Die Wände von Kapillaren weisen hingegen nur eine Endothelschicht und die Basalmembran auf. Dadurch ermöglichen sie einen schnellen Substanztausch.^[16]

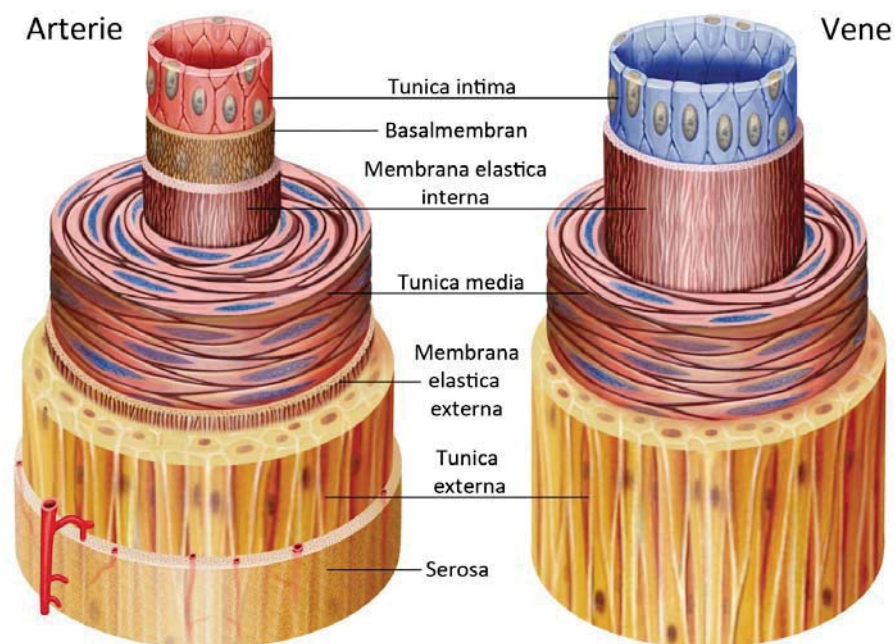


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von Arterien und Venen (modifiziert nach Geisler, 2012).^[17]

Je nach Gewebe bilden Endothelzellen in Kapillaren eine mehr oder weniger durchlässige Barriere. Das sogenannte „kontinuierliche“ Endothel, das im glatten Muskel, Herz- und Skelettmuskel, Bindegewebe, in Lungen und im ZNS vorkommt, lässt nur lipophile Stoffe penetrieren.^[16, 18] In Gehirn (Blut-Hirn-Schranke) und Rückenmark finden sich zusätzlich zum kontinuierlichen Endothel Gliazellen, die eine zusätzliche Barriere darstellen und nur noch hoch lipophile Stoffe passieren lassen. Andere Gewebe, wie im Magen-Darm-Trakt oder in der Niere, haben „fenestrierte“ Endothelien, bei denen die Endothelzellen Öffnungen („Fenestrationen“) besitzen, sodass sie auch für weniger lipophile Stoffe permeabel sind.^[16, 18] Die dritte Gruppe ist das sogenannte „diskontinuierliche“ Endothel, welches in Blutgefäßen von Leber, Milz und rotem Knochenmark zu finden ist. Endothelzellen und Basalmembran zeigen hier offene Löcher, die auch einen Durchtritt von polaren Substanzen zulassen (Abbildung 3).^[16, 18]

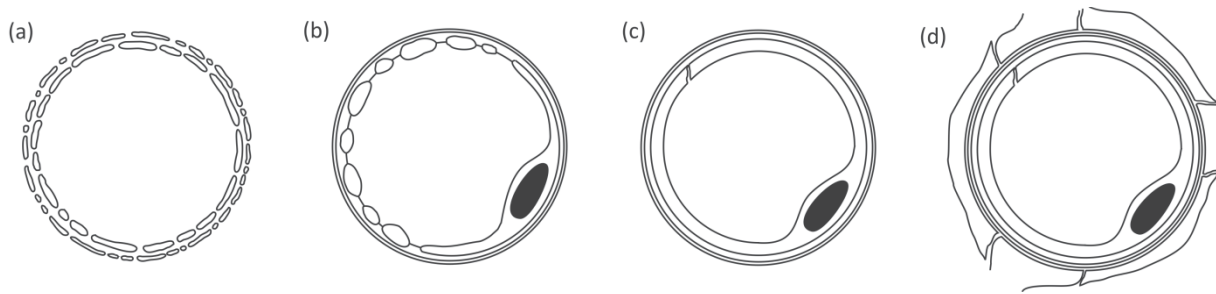


Abbildung 3: Darstellung unterschiedlicher Kapillartypen. (a) „diskontinuierlich“: Endothel und Basalmembran sind lückenhaft. (b) „fenestriert“: Endothel besitzt durch Membran verschlossene Öffnungen. (c) „kontinuierlich“: Endothel und Basalmembran sind lückenlos. (d) „kontinuierliches“ Endothel mit zusätzlich aufgelagerten Gliazellen. (modifiziert nach Tortora und Derrickson, 2006).^[16]

2.1.2 Aufgaben des Endothels

Das Endothel reguliert den Transport von löslichen Substanzen (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Hormone) sowie Immunzellen und ist damit verantwortlich für den Stoffaustausch zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum.^[19] Verschiedene Mechanismen stehen hierzu zur Verfügung (siehe 2.2). Andererseits besitzt das Endothel aber auch eine Barrierefunktion gegenüber Substanzen, die nicht aufgenommen werden sollen.^[15] Hierbei spielen adhäsive Strukturen und Zell-Zell-Verbindungen (Tight Junctions, Adherence Junctions und Gap Junctions) eine wichtige Rolle.^[12] Diese werden durch transmembrane Adhäsionsmoleküle gebildet, die mit einem Netzwerk von Proteinen des Zytoskeletts verbunden sind.^[20-22]

Eine weitere Aufgabe des Endothels ist die Aufrechterhaltung eines konstanten „inneren Milieus“, die sogenannte vaskuläre Homöostase.^[23, 24] Endothelzellen in einem gesunden Blutgefäß sekretieren verschiedene Faktoren, die unter anderem für ein antikoagulatives und antithrombogenes Milieu sorgen und somit die Adhäsion von Thrombozyten und die Bildung eines Thrombus verhindern. Beispiele solcher vasoprotektiver Faktoren sind Prostazyklin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO). Durch die Aktivität verschiedener antikoagulativer Signalwege sorgen Endothelzellen für die Aufrechterhaltung des Blutflusses. Im Fall einer Verletzung des Blutgefäßes können Endothelzellen die Blutgerinnung bzw. Thrombozytenaggregation erwirken.^[23, 25] Auch bei der Steuerung des Gefäßtonus, dem Blutdruck, ist das Endothel maßgeblich beteiligt. Die Produktion von NO, dem Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), in den Endothelzellen führt zur Entspannung der glatten Muskulatur im Blutgefäß. Die Produktion ist konstitutiv, kann aber auch durch verschiedene Moleküle wie Acetylcholin oder Angiotensin verstärkt werden. Zudem wird die NO-Freisetzung auch durch Scherstress ausgelöst (siehe Abschnitt 2.1.3).^[23] Auch Prostazyklin (PGI_2), das ebenfalls im Endothel gebildet wird, führt zur Relaxation der angrenzenden glatten Muskelzellen. Im Gegensatz dazu können Endothelzellen unter bestimmten pathophysiologischen Umständen sogenannte vasokonstriktorische Faktoren freisetzen. Ein Beispiel hierfür ist das Peptid Endothelin.^[23]



Auch bei der Immunabwehr spielt das Endothel eine wichtige Rolle. Endothelzellen regulieren die Rekrutierung von Immunzellen zur Entzündungsstelle in das Gewebe und setzen, stimuliert durch Faktoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Zytokine und Wachstumsfaktoren frei. An einer lokalen Verletzung oder Entzündung im Gewebe werden Zytokine gebildet. Auch diese stimulieren die angrenzenden Endothelzellen, welche auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle der Selektin- und Integrin-Familien ausbilden.^[26, 27] Die Selektine sorgen für das Anhaften von Immunzellen wie Lymphozyten und Monozyten an der Endotheloberfläche. Die Immunzellen rollen aufgrund der Selektin-vermittelten Bindung anschließend entlang der Gefäßwand. Durch Chemokine aktivierte Immunzellen binden an die Endothelzellen und transmigrieren schließlich in das verletzte oder entzündete Gewebe (Abbildung 4).^[26, 27] In stimulierten Endothelzellen finden sich hochregulierte pro-inflammatorische Gene wie Zytokine (IL-1 (Interleukin-1), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α)), Chemokine (IL-8, MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1‘)) und Adhäsionsmoleküle ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1‘), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1‘), PECAM-1 („platelet/endothelial cell adhesion molecule-1‘), E-Selektin, P-Selektin).^[23, 27-32]

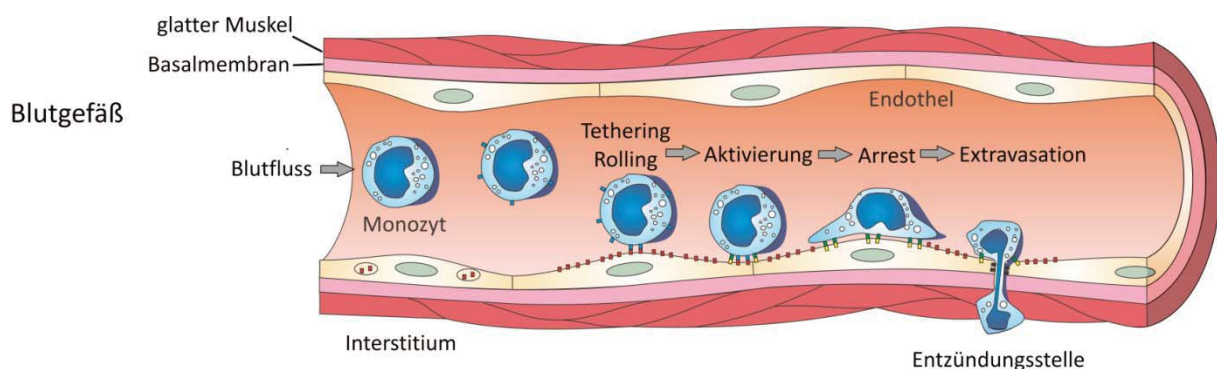


Abbildung 4: Rekrutierung von Immunzellen (Monozyten) im Blutgefäß zum Entzündungsherd im Gewebe. Aktiviertes Endothel bindet über Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche Monozyten („Tethering“) während der „Rolling“-Phase der Immunzellen. Durch Präsentation von Chemokinen werden die Immunzellen aktiviert und bewegen sich entlang der Gefäßwand zum Entzündungsherd. Nach festem Anhaften (Arrest) am aktivierten Endothel, transmigrieren die Immunzellen durch die Endothelschicht in das verletzte bzw. entzündete Gewebe (Extravasation).

2.1.3 Reaktion von Endothelzellen auf Scherstress

Die luminalen Oberfläche der Blutgefäße und deren endotheliale Oberfläche sind ständig dem Blutfluss und damit verbundenen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt.^[33]

Der Scherstress (engl. shear stress) ist die Zugkraft pro Fläche, die auf die Oberfläche des Endothels im Inneren eines Blutgefäßes in Richtung des Blutflusses wirkt. Die folgende Formel beschreibt nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille für laminare Strömungen die Scherkraft τ in einem zylinderförmigen Rohr mit dem Radius r , Volumenstrom Q und der Viskosität der Flüssigkeit μ .^[34]



$$\tau = \frac{4 \mu Q}{\pi r^3}$$

τ = Scherstress (dyn cm⁻²)

μ = Viskosität der Flüssigkeit (0,01 dyn s cm⁻²)

Q = Volumenstrom (ml s⁻¹)

r = Innerer Radius des Blutgefäßes (cm)

Die Reynoldszahl (Re), eine dimensionslose Kenngröße, gibt an, ob eine Strömung laminar oder turbulent ist. Sie wird durch die nachfolgende Formel beschrieben.

$$Re = \frac{\rho v l}{\eta}$$

Re = Reynoldszahl

ρ = Dichte des Fluids (kg m⁻³)

v = Strömungsgeschwindigkeit (m s⁻¹)

l = Länge (m)

η = dynamische Viskosität (kg m⁻¹ s⁻¹)

Die kritische Reynoldszahl (Re_{krit}) beschreibt den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung. Die Strömung in einem Rohr mit kreisförmigem Durchmesser ist laminar für $Re_{krit} < 2320$. Diese Rohrströmung stellt ein zwar vereinfachtes aber dennoch geeignetes Modell für die Strömung in Blutgefäßen dar. Je nach Lage im Gefäßsystem können unterschiedliche Strömungsformen vorliegen. In Arterien finden sich beispielsweise laminare Strömungsformen, in Gefäßgabelungen hingegen turbulente. Auch die Strömungsgeschwindigkeiten variieren stark in unterschiedlichen Blutgefäßen. Um die Scherkräfte möglichst konstant zu halten, können sich Blutgefäße bei erhöhter Flussrate erweitern. In Arterien finden sich Scherkräfte von 10–70 dyn cm⁻², in Venen 1–6 dyn cm⁻².^[35, 36] Lokale Veränderungen im Fließverhalten und Scherstress in arteriellen Verzweigungen werden häufig mit der Entstehung arteriosklerotischer Plaques in Verbindung gebracht.^[37, 38]

Endothelzellen sind in der Lage einwirkende Kräfte wahrzunehmen und darauf zu reagieren.^[14] Verschiedene Studien zeigten bereits eine Vielzahl zellulärer Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress im Gegensatz zu Zellen, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Diese Reaktionen auf Scherstress umfassen neben einer Änderung der Zellmorphologie auch Veränderungen in der Genexpression.^[39] Unter fluidischen Bedingungen richten sich Endothelzellen in Flussrichtung des Blutes bzw. Mediums aus und zeigten eine langgestreckte Morphologie.^[40, 41] Damit verbunden war eine Modifikation des Zytoskeletts sowie der fokalen Adhäsionspunkte. Endothelzellen, die unter Scherstress-Bedingungen kultiviert wurden, zeigten eine vermehrte Bildung von Fibrillenbündeln, sogenannter Stress Fibers.^[42] Stress Fibers sind hoch geordnete Strukturen bestehend aus Aktin-Filamenten, vernetzenden Proteinen und Myosin II. Als kontraktile Aktomyosin-Bündel



spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Beweglichkeit und Morphogenese der Zelle. Stress Fibers sind die schnellsten Aktomyosin-basierten, kontraktile Elemente in Nicht-Muskelzellen.^[42] In Säugerzellen unterscheidet man zwischen ventralen, dorsalen und transversalen Stress Fibers.^[43, 44] Diese unterscheiden sich in der Zusammensetzung, Lokalisation in der Zelle, sowie deren Funktion bei zellulären Prozessen.^[44] Eine weitere Reaktion auf Scherstress ist eine erhöhte Produktion von NO. NO ist als intrazelluläres Schlüssel-Messenger-Molekül an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, beispielsweise an der Relaxation von Blutgefäßen und dadurch an der Regulation des Blutdrucks.^[45] Daneben konnten auch Änderungen in der Bildung verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine beobachtet werden.^[39, 46]

2.2 Endotheliale Aufnahme und transendothelialer Transport

2.2.1 Barrierefunktion des Endothels

Die Austauschfläche zwischen Plasma und Gewebe, die durch die mikrovaskulären Wände der Arterien und Venen dargestellt wird, ist hoch durchlässig für kleine Moleküle wie Sauerstoff (O₂) oder Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser, die durch Diffusion aufgenommen bzw. abgegeben werden. Für größere Moleküle hingegen sind sie nahezu undurchlässig.^[16, 18] Dies ist wichtig, um ein gewisses Gleichgewicht zwischen Plasma und Interstitium aufrecht zu erhalten.^[23, 24] Dennoch ist es unerlässlich, dass auch große Moleküle diese Barriere überwinden, um das Gewebe mit Antikörpern, Protein-gebundenen Hormonen, Zytokinen, Chemokinen und weiteren hoch molekularen Substanzen zu versorgen.^[47, 48] Hierbei spielen nicht nur der passive Transport durch große Poren oder Kanäle sondern auch der vesikuläre Transport z.B. durch Endozytose eine wichtige Rolle.^[19, 49-51]

2.2.2 Endozytose

Gerade für die Internalisierung höher molekularer hydrophiler Moleküle ist aufgrund ihrer Polarität die Endozytose der einzige Weg, das Endothel zu passieren.^[52] Diese werden über Vesikel aus dem Extrazellulärraum durch die Plasmamembran ins Innere der Zelle geschleust. Hierbei erfolgt ein Abschnüren von Membranvesikeln ins Innere der Zelle. Abbildung 5 zeigt die verschiedenen Arten der Endozytose. Clathrin-abhängige bzw. Clathrin-unabhängige Endozytose, Caveolin-vermittelte Endozytose, Phagozytose sowie Makropinozytose unterscheiden sich dabei in Größe und Ausstattung der Vesikel.^[49, 51] Zellen nutzen diese Vielfalt an Mechanismen, um verschiedenste Aufgaben zu bewältigen. Dabei spielt auch die Größe der internalisierten Moleküle eine wichtige Rolle, die die Effizienz der zellulären Aufnahme stark beeinflussen kann.^[19, 47, 49, 53, 54]

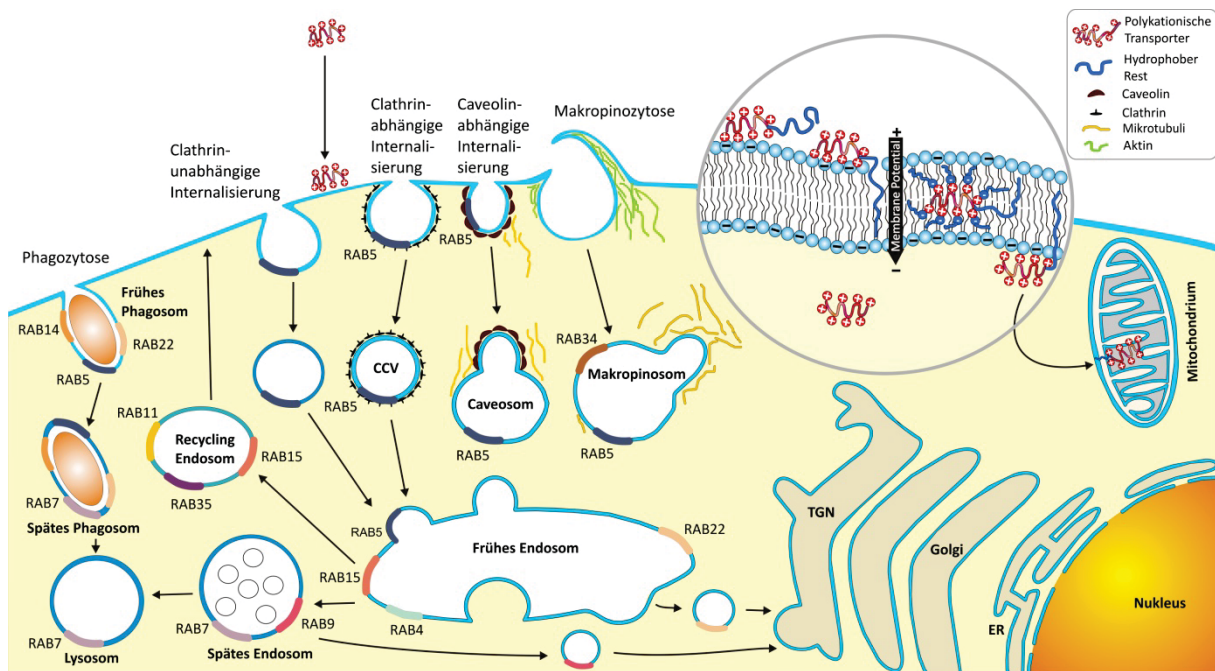


Abbildung 5: Lokalisierung und Funktion von Rab GTPasen. Ausschnitt einer Zelle mit vesikulären Transportwegen und der Lokalisation ausgewählter Rab GTPasen. Rab22 steuert den Transport zwischen dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und frühen Endosomen und umgekehrt. Rab5, das sich in frühen Endosomen, Phagosomen, Caveosomen und der Plasmamembran befindet, steuert Endozytose und endosomale Fusion Clathrin-gebundener Vesikel (clathrin-coated vesicles, CCVs), Makropinozytose (mit Rab34) und das Reifen von frühen Phagosomen (mit Rab14 und Rab22). Rab11 und Rab35 steuern das langsame endosomale Recycling über Recycling-Endosomen. Das mit späten Endosomen verbundene Rab7 steuert die Entwicklung von späten Endosomen und Phagosomen und deren Fusion mit Lysosomen. Rab9, eine weitere späte endosomale GTPase, steuert den Transport von späten Endosomen zum TGN (modifiziert nach Stenmark, 2009).^[49]

2.2.3 Vesikulärer Transport

Als vesikulärer Transport wird sowohl die Aufnahme größerer Moleküle über Endozytose (siehe 2.2.2) in die Zelle als auch deren Ausschleusen aus der Zelle (Exozytose) bezeichnet.^[51] Der spezifische Transport zwischen bestimmten Membran-umhüllten Organellen ist ein zentrales Element in eukaryotischen Zellen.^[49, 53] Durch Endozytose aufgenommene Substanzen gelangen in den gebildeten Transportvesikeln ins Innere der Zelle. Die Transportvesikel fusionieren dabei mit den Endosomen und bilden die sogenannten frühen (early) Endosomen.^[48, 55] Nach Reifen zu späten (late) Endosomen können Teile der endosomalen Membran mit den Lysosomen fusionieren, was zum Abbau bzw. zur Freisetzung der darin enthaltenen Substanzen führt. Auf der anderen Seite führen Recycling-Endosomen zu einem Recycling z.B. membranständiger Rezeptoren und damit zu einem direkten Rücktransport der internalisierten Substanzen an die Zelloberfläche.^[19, 53, 56] Endosomen sind an zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion,^[50] Zellpolarität oder -migration beteiligt.^[57]



Eine wichtige Rolle beim Transfer von Substanzen zwischen bestimmten Membranumschlossenen Organellen spielen die Rab GTPasen („Ras-related in brain“).^[58] Diese gehören zur Ras Superfamilie und bilden die größte Familie unter den kleinen GTPasen.^[59] Sie dienen als molekulare Schalter, die zwischen zwei Konformationen, GTP-gebunden und GTP-ungebunden wechseln. Verschiedene Effektormoleküle wie ‚Sorting‘ Adaptoren, ‚Tethering‘ Faktoren, Kinasen, Phosphatasen und Motorproteine können durch GTP-gebundene Rabs aktiviert oder rekrutiert werden.^[49, 56] Im menschlichen Organismus finden sich über 60 verschiedene Rabs, die an bestimmten intrazellulären Membranen sitzen.^[60] Durch die indirekte Interaktion mit Mantel („Coat“)-Komponenten, Motorproteinen und SNAREs („soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors“) dienen sie als Organisatoren nahezu aller Membran-abhängige Transportprozesse.^[19, 49, 60] Abbildung 5 zeigt die Beteiligung verschiedener Rabs an der Endozytose.^[49] Welche Wege des vesikulären Transports genutzt werden hängt von der Struktur und den physikochemischen Eigenschaften der entsprechenden Substanzen ab. Bis heute ist das für viele Substanzen immer noch nicht vollständig geklärt.

2.3 ‚Drug Delivery‘ Systeme

2.3.1 Zell-penetrierende Peptide

Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe stellt der Transport durch den Endothellayer in den Blutgefäßen und damit verbunden, eine erfolgreiche Aufnahme in das vaskuläre System immer noch eine große Herausforderung dar. Biologische Membranen sind in der Regel undurchlässig für große oder hochgeladene Moleküle.^[19] Viele hydrophile Substanzen wie Peptide, Proteine oder Oligonukleotide werden daher nur in einem geringen Umfang von Zellen aufgenommen, da sie die Lipidschicht der Plasmamembran weder durch Endozytose noch durch andere der oben erwähnten Transportwege überwinden können. Dadurch ist der Einsatz dieser Moleküle als therapeutische Wirkstoffe eingeschränkt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass kurze polykationische Peptidsequenzen mit einer Länge von 10 – 30 Aminosäuren die Aufnahme dieser Substanzen erhöhen können.^[52, 61, 62] Diese Peptide können die Membran Rezeptor-unabhängig und meist Energie-unabhängig passieren.^[62, 63] Grundlage dieser Zell-penetrierenden Peptide (cell-penetrating peptides, CPPs) sind RNA- oder DNA-bindende Proteine wie das Tat-Protein^[64] oder künstliche Peptide wie beispielsweise Transportan^[52] oder Penetratin.^[65-67] Die Aminosäurezusammensetzung der CPPs zeichnet sich häufig durch das Vorkommen vieler positiv geladener Aminosäuren wie Arginin und Lysin oder aber einer amphipathischen Struktur aus.^[68] Erstmals konnten Frankel und Pabo (1988) zeigen, dass das Tat-Protein aus dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) aus dem umgebenden Medium in verschiedenen Zellen aufgenommen wurde.^[69] CPPs sind somit wirksame Trägerstoffe, um kovalent oder nicht-kovalent gebundene Moleküle wie Fluoreszenz-Farbstoffe,^[61, 67] Wirkstoffe,^[61] Proteine,^[70-72] Nukleinsäuren,^[63, 73] Nanopartikel^[74, 75] oder Liposomen^[61] in Zellen zu schleusen.^[61, 63, 76] Heute sind bereits über hundert solcher CCP-Sequenzen bekannt.



2.3.2 Peptoide

Arginin-reiche Peptide wie die CPPs sind empfindlich gegenüber Oxidation und Degradation durch Proteasen. Diese Empfindlichkeit kann deren Bioverfügbarkeit und Blutzirkulationszeit *in vivo* herabsetzen. Dadurch steigt das Interesse an sogenannten Peptid-Mimetika, die diese Nachteile umgehen. Die Fähigkeit Wirkstoffe oder andere biologisch aktive Moleküle in Zellen zu transportieren wurde bei verschiedenen Peptid-Mimetika wie β -Peptiden^[77, 78] und Peptoiden nachgewiesen.^[79] Eine hohe Dichte an positiv geladenen Seitenketten scheint die Effizienz der zellulären Aufnahme maßgeblich zu erhöhen, sodass die Ausstattung der Peptid-Mimetika mit basischen funktionellen Gruppen, wie Amin- oder Guanidin-Gruppen, die Zell-penetrierenden Eigenschaften begünstigt.^[77, 80, 81]

Peptoide sind *N*-Alkylglyzine. Im Gegensatz zu Peptiden befinden sich bei Peptoiden die Aminosäureseitenketten am Stickstoffatom anstatt am Kohlenstoffatom (Abbildung 6). Dies macht Peptoide widerstandsfähiger gegen den enzymatischen Abbau durch Proteasen.^[82, 83] Es konnte gezeigt werden, dass Peptoide mit Guanidin-Gruppen an der Alkylkette in Säugetierzellen aufgenommen wurden.^[80, 81, 84] Peptoide könnten sich so als effektive Transporter erweisen, um Wirkstoffe oder andere Substanzen in Zellen zu schleusen. Weiterhin konnte Peptoiden eine enzyminhibitorische, antibiotische und peptidhormonelle Wirkung sowie ein Anbinden an Rezeptoren und Proteine nachgewiesen werden.^[85] Sie konnten erfolgreich als Mimetika von Peptid-Hormonen, Antibiotika und Rezeptor-Liganden eingesetzt werden.^[77, 80, 81, 85]

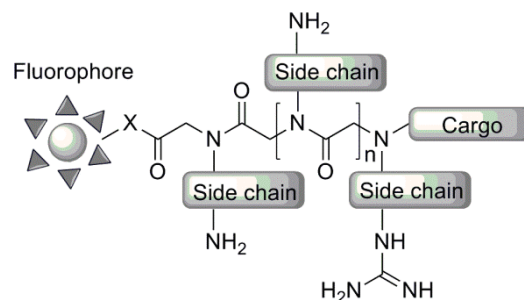


Abbildung 6: Allgemeine Strukturformel eines Fluorophor- und Wirkstoff-gekoppelten, polykationischen Peptoids.

Viele weitere ‚Drug Delivery‘ Systeme nutzen besonders polykationische Liganden und damit die positiven Ladungen, um mit den negativ geladenen Proteoglykanen der Plasmamembran, wie sie z.B. in Heparansulfaten auftreten, zu interagieren und somit in engen Kontakt mit der Plasmamembran z.B. von Endothelzellen zu treten. Meist werden sie mit den Proteoglykanen endozytiert oder tunneln in inversen Mizellen durch die Membran (Abbildung 5). Dabei sind heute insbesondere polykationische Liposomen, Polyethylenimin (PEI) Systeme, polykationische Dendrimere und weitere Blockcopolymere bereits im Einsatz. Obwohl bereits viel über die Aufnahme der polykationischen ‚Drug Delivery‘ Systeme im Tiermodell erforscht ist, ist über ihre Interaktion mit Komponenten des vaskulären Systems



wenig bekannt. Das Gleiche gilt für die Beeinflussung der Halbwertszeiten und der Bioverfügbarkeit der entsprechenden Moleküle. Das Tiermodell erlaubt keine Depletion der Blutfaktoren und somit auch kein einfaches Monitoring der entsprechenden Wirkstoff- bzw. ‚Drug Delivery‘ System Modulierung durch bestimmte Blutfaktoren. Daher gewannen mikrofluidische Systeme, die nicht nur Blutgefäße nachahmen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung.^[86-89]

2.4 Mikrofluidische Systeme

Im Gegensatz zu gängigen *in vitro*-Zellkultursystemen, in denen Zellen unter statischen Bedingungen kultiviert werden, spiegeln mikrofluidische Systeme^[86-89] eher die *in vivo*-Bedingungen wider.^[90] Dadurch können Zellen unter fluidischen Bedingungen kultiviert und deren Reaktion auf Scherstress-Bedingungen untersucht werden. Beobachtete Reaktionen von Endothelzellen auf Scherstress sind in Abschnitt 2.1.3 dargestellt. Mikrofluidische Systeme finden unter anderem einen weiten Einsatz in der regenerativen Medizin im Bereich Tissue Engineering zur Versorgung komplexer künstlicher Gewebe und Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen^[13, 87, 91-93] oder bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.^[1] Hierzu ist es wichtig, funktionsfähige mikrovaskuläre Netzwerke, die die Physiologie des Blutgefäßsystems imitieren, zu entwickeln.^[13, 94]

Techniken zur Herstellung von Mikrokanälen sind: Lithografie (X-ray, UV, Laser, etc.), mechanische Mikrostrukturierung, Laserstrukturierung, Soft Lithografie, Mikro-Replikationsmethoden wie Spritzguss oder Heißprägen, Rapid Prototyping-Verfahren etc.^[87, 88, 95-97] Viele der mikrofluidischen Systeme wurden mit Hilfe von Soft Lithographie unter Verwendung von Poly-(dimethylsiloxan) (PDMS) hergestellt (siehe auch Abschnitt 5).^[96] Die Soft Lithographie, die in der Gruppe von Whitesides entwickelt wurde, verwendet strukturierte Elastomere, meist aus PDMS, um spezifische Strukturen auf ein Substrat zu überführen. Diese können in Form von Gussformen, aber auch Masken oder Stempel, verwendet werden. Dadurch können reproduzierbare Mikro- und Nanostrukturen, beispielsweise auch in Form von Mikrokanälen, hergestellt werden.^[98-100] Mit diesen Techniken wurden hauptsächlich Mikrokanäle mit rechteckigen Querschnitten hergestellt. Grund dafür ist, dass sich die Mikrostrukturtechnik aus der Halbleitertechnologie abgeleitet hat, bei der nur 2D-Strukturen erforderlich sind. So besitzen die meisten derzeit verwendeten mikrofluidischen Kanäle zur Untersuchung von Endothelzellen unter fluidischen Bedingungen rechteckige Querschnitte.^[33, 101-103] Bei der *in vitro*-Darstellung des vaskulären Systems mit Hilfe dieser Strukturen wachsen Endothelzellen somit auf flachen Oberflächen, die nicht die *in vivo*-Gegebenheiten der gekrümmten inneren Oberflächen von Blutgefäßen widerspiegeln.

Es konnte gezeigt werden, dass sich beispielsweise die Flussprofile in rechteckigen Mikrokanälen von denen in Kanälen mit runden Querschnitten unterscheiden.^[104, 105] Diese Krümmung zeigte weiterhin einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion vorbeiströmender Zellen und Endothelzellen an der Gefäßwand.^[106] Zudem konnten Veränderungen in der