

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

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