
**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Christina Leinweber
geboren am 10.12.1981 in Räckelwitz

Tag der mündlichen Prüfung:
24.02.2012

Chemotaxis von hämatopoietischen Stammzellen und Leukozyten in Mikrostrukturen

Gutachter: Prof. Dr. Michael Grunze
Prof. Dr. Anthony D. Ho

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	1
Abstract.....	3
1 Wissenschaftlicher Hintergrund	5
1.1 Medizinisch-biologischer Hintergrund	5
1.1.1 Die Stammzellnische	5
1.1.2 Das Stammzellhoming.....	7
1.1.3 Das SDF-1/CXCR4 Botenstoffsystem	7
1.2 Verwendete Modellsysteme.....	9
1.2.1 MSC - HSC.....	10
1.2.2 Jurkat - SDF-1	10
1.2.3 HL-60 und neutrophile Granulozyten.....	11
1.3 Chemotaxisassays	12
1.3.1 Einkammer-Experimente.....	12
1.3.2 Agarose-Assays	13
1.3.3 Zweikammer-Experimente	14
1.3.4 Chipbasierte Experimente	16
1.4 Mikrofluidische Systeme	17
1.4.1 Grundlagen der Mikrofluidik	17
1.4.2 Anfertigung von Mikrostrukturen	19
2 Experimenteller Teil	21
2.1 Humane Zellen und Zellkultur.....	21
2.1.1 HSC	22
2.1.2 MSC.....	23
2.1.3 Zelllinien – Jurkat, Kasumi, KG-1a, HL-60.....	23
2.1.4 Neutrophile Granulozyten	24

2.2	Mikrostrukturen und Chipherstellung.....	25
2.2.1	Design und Belichtungsmasken	25
2.2.2	Von der Maske zur Mikrostruktur in PDMS	27
2.2.3	Chipherstellung.....	29
2.2.4	Partikel- und Farbstoffexperimente	31
2.2.5	Simulation der Gradientenausbildung	33
2.3	Chemotaxisexperimente.....	35
2.3.1	Übersicht.....	35
2.3.2	Langzeitmikroskopie von Zellen	36
2.3.3	Filopodienassay und Microwell-Experimente.....	37
2.3.4	Transwell-Experimente	39
2.3.5	Zellmigration in Mikrostrukturen.....	40
2.4	ELISA und Immunofluoreszenzfärbungen	43
2.4.1	Zellkultur der MSC.....	43
2.4.2	Durchführung der ELISA-Experimente	45
2.4.3	Auswertung der ELISA-Experimente	47
2.4.4	Immunofluoreszenzfärbungen.....	48
3	Ergebnisse und Diskussion.....	49
3.1	Ziele und Konzept dieser Arbeit.....	49
3.1.1	Ziel dieser Arbeit	49
3.1.2	Konzept zunehmender Komplexität	51
3.2	Diffusive Ausbildung der Konzentrationsgradienten	53
3.2.1	Konvektionsströmungen.....	53
3.2.2	Farbstoffausbreitung.....	54
3.2.1	Simulation der Farbstoffdiffusion	59
3.2.2	Diskussion des Versuchsaufbaus.....	59
3.3	SDF-1-Ausschüttung durch mesenchymale Stromazellen.....	62
3.3.1	Einfluss des Kulturmediums.....	62
3.3.2	Einfluss der Zellkonzentration und Inkubationsdauer.....	63
3.3.3	Einfluss von AMD3100.....	65
3.3.4	Diskussion der SDF-1-Sekretion.....	67

3.4	Chemotaxis der Zelllinien gegenüber MSC.....	70
3.4.1	Zellinientest im Microwell	70
3.4.2	Analyse der Jurkat-Migration.....	70
3.4.3	Diskussion der Migration der Zelllinien.....	72
3.5	Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten	74
3.5.1	Filopodienbildung.....	74
3.5.2	Neutrophile im Transwell-Assay.....	75
3.5.3	Migration in Mikrostrukturen.....	76
3.5.4	Diskussion der Neutrophil-Chemotaxis	87
3.6	Chemotaxis hämatopoietischer Stammzellen	89
3.6.1	HSC-Migration im Microwell-Assay	89
3.6.2	HSC-Migration im Transwell-Experiment.....	90
3.6.3	HSC-Migration in den Mikrostrukturen.....	91
3.6.4	Diskussion der HSC-Chemotaxis	93
4	Zusammenfassung	97
5	Anhang	101
5.1	Entwürfe hergestellter Belichtungsmasken.....	101
5.2	Eigene Publikationen	107
5.3	Abkürzungs- und Größenverzeichnis	108
5.4	Tabellenverzeichnis	111
5.5	Abbildungsverzeichnis.....	112
5.6	Literaturverzeichnis	122
	Danksagung	135

Kurzfassung

Die hämatopoietischen Stammzellen (HSC) zeigen beispielsweise nach einer Stammzelltransplantation eine chemokingesteuerte Wanderung aus dem Blutkreislauf heraus hin zu ihrem Anknüpfungspunkt im Knochenmark, der hämatopoietischen Stammzellnische. Dieses Verhalten von Zellen, einem Konzentrationsgradienten aktiv nachzufolgen, wird allgemein als Chemotaxis und speziell im Falle der Stammzellwanderung als „*homing*“ bezeichnet. Neben der Suche nach relevanten Botenstoffsystemen und Einflussfaktoren auf die gerichtete Wanderung der HSC, besteht vor allem bei der Quantifizierung des Migrationsverhaltens und der Sensitivität der HSC noch großer Forschungsbedarf. Selbst für das bereits seit längerem bekannte Botenstoffsystem bestehend aus dem Chemokin Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) und dessen zugehörigen Rezeptor CXCR4 sind der Einfluss von Absolutkonzentration, Gradientensteilheit und Konzentrationsschwellwerten, sowie die Wirkungsweise des CXCR4-Inhibitors AMD3100 noch weitgehend ungeklärt.

Das Migrationsverhalten von humanen hämatopoietischen Stammzellen im Bezug auf das SDF-1/CXCR4-Botenstoffsystem wurde daher im Rahmen dieser Arbeit anhand von *in vitro*-Experimenten näher untersucht. Zur Quantifizierung der HSC-Wanderung wurden zunehmend komplexere Chemotaxisexperimente angewandt, Microwell-Experimente, ein Transwell-Assay und ein in dieser Arbeit neu entwickelter Mikrofluidikaufbau. Die diffusive Ausbildung der Botenstoffgradienten in diesen Mikrostrukturen wurde mittels Farbstoff- und Partikelexperimenten überprüft und zusätzlich durch numerische Simulationsrechnungen verifiziert.

Neutrophile Granulozyten, die den Leukozyten und dem Immunsystem des Körpers zugeordnet werden, sind eine bereits gut erforschte und ebenfalls chemotaktisch migrierende Blutzellspezies. Sie wurden als Modellsystem anstelle der raren und aufwändig zu isolierenden HSC zum Test der Chemotaxisexperimente und vor allem des neuen Mikrostruktursystems eingesetzt. Dabei wurden Möglichkeiten zur Bestimmung der einzelnen Wanderungsparameter ermittelt und die Neutrophilmigration anhand der Mikrofluidikexperimente detailliert untersucht.

Für die Untersuchung der Stammzellchemotaxis wurden vorrangig primäre Knochenmarkszellen, die mesenchymalen Stromazellen (MSC), als Modell für die Stammzellnische und als Botenstoffdonoren verwendet. Die Ausschüttung des Chemokins SDF-1 sowie der Einfluss von AMD3100 auf die SDF-1-Sekretion der MSC wurden in dieser Arbeit anhand von ELISA-Tests und Immunofluoreszenzfärbungen ausführlich erforscht. Dadurch wurden eine genaue Definition der diffusionsbasierten Chemokingradienten und eine absolute Berechnung der Mindestkonzentration für die HSC-Migration

möglich. Schließlich konnte für die Chemotaxisexperimente in den Mikrostrukturen ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Botenstoffgradienten und der HSC-Wanderung gefunden werden, der zu einer Bestimmung des Schwellwertes für die Sensitivität der HSC gegenüber einem SDF-1-Gradienten führte.

Anhand der Korrelation des Wanderungsverhaltens der Neutrophile und HSC mit den durch die Mikrostrukturen definierten Botenstoffgradienten konnte die chemotaktische Zellmigration quantifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insgesamt, dass durch die Anwendung des entwickelten Mikrofluidikexperimentes neue Erkenntnisse über die Chemotaxis von Blutzellen gewonnen werden können.

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSC) are able to migrate out of the blood vessels towards their contact site within the bone marrow, the hematopoietic stem cell niche. This behavior of cells to actively follow a concentration gradient is generally called chemotaxis and particularly in the case of stem cell migration referred to as *homing*. Besides the search for relevant messenger systems and factors influencing the directed HSC migration still much research for quantification of the HSC chemotaxis and sensitivity of the cells has to be done. Even for the messenger system of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and its corresponding chemokine receptor CXCR4, which is known to be involved in stem cell chemotaxis for already longer time, the influence of absolute concentrations, gradient stiffness and concentration thresholds are yet unclear. Also the effect of the CXCR4 inhibitor AMD3100 on stem cell mobilization and homing is still not completely unraveled.

Within this work the migration behavior of human hematopoietic stem cells with regard to the SDF-1/CXCR4 attractant system was investigated by in vitro experiments. To quantify the HSC migration several chemotaxis experiments with increasing complexity were applied, microwell experiments, the Transwell assay and a microfluidic setup, that had been newly developed in this thesis. The diffusional development of the attractant gradient within these microstructures was proven due to experiments with dyes and particles and was additionally verified by numerical simulations.

Neutrophil granulocytes are a leukocyte cell species and belong to the immune system. The chemotactic migration of these blood cells is already studied well. HSC are rare and laborious to isolate from cord blood or peripheral blood. Therefore neutrophils were used as a model instead of the HSC for testing of the chemotaxis experiments and especially the new microstructured systems. Thereby possibilities for the determination of the individual migration parameters were ascertained and neutrophil migration was analyzed in detail by applying the microfluidic experiments.

For the investigation of the stem cell chemotaxis primary bone marrow cells, the mesenchymal stromal cells (MSC), were used as model of the stem cell niche and as direct donors of the messenger molecules. For the MSCs secretion of the chemokine SDF-1 and the influence of AMD3100 on SDF-1-secretion was studied by the use of ELISA tests and immunofluorescence staining. Thereby the exact definition of diffusional chemokine gradients and the absolute evaluation of the threshold concentrations for the HSC migration became feasible. Finally, a correlation between the development of the attractant gradient and the HSC migration was identified for the chemotaxis experiments in the microstructures, which enabled a threshold determination of the HSC sensitivity concerning the SDF-1 gradient.

The chemotactic cell migration could be quantified by the correlation of the migration behavior of neutrophils and HSC with the defined messenger gradients inside the microstructures. Hence, the results of this thesis demonstrate that new insights about the chemotaxis of blood cells can be elucidated by the application of the developed microfluidic experiment.

1 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.1 Medizinisch-biologischer Hintergrund

Im menschlichen Körper sterben pro Tag Milliarden verschiedener Blutzellen ab und müssen ständig neu im Knochenmark nachgebildet werden. Bei einer Erkrankung wie der Leukämie ist der komplizierte Mechanismus der Zellerneuerung gestört, es werden durch einen „Differenzierungsblock“ [1] nicht mehr genügend funktionstüchtige weiße Blutkörperchen gebildet. Bei der Leukämiebehandlung wird das erkrankte Knochenmark durch Chemotherapie und Bestrahlung vollkommen zerstört und durch gesunde Spenderzellen ersetzt. Hierfür wird heutzutage aber nicht mehr das Knochenmark im eigentlichen Sinne transplantiert, sondern dem Blutkreislauf des Patienten werden in einer Blutstammzelltransplantation isolierte adulte hämatopoietische Stammzellen zugeführt [2]. Die hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (kurz: HSC), die sind zur Differenzierung in Blutbestandteile befähigte Zellen [3], werden zuvor medikamentös im Blut eines Spenderpatienten angereichert und von diesem durch Dialyse gewonnen. Diese blutbildenden Stammzellen finden dann im Transplantatempfänger selbständig ihren Weg aus der Blutbahn zum Anknüpfungspunkt am Knochengewebe, die sogenannte Stammzellnische [4-6]. Die Anreicherung und das Anwachsen des neuen blutbildenden Gewebes am Knochen, das *engraftment* [7], ist die Grundlage zur Wiederherstellung der Blutbildung. Für eine erfolgreiche Behandlung von Leukämien sind also Kenntnisse über die Stammzellnische als Sitz der Blutstammzellen unentbehrlich. Insbesondere die zielgerichtete Wanderung der transplantierten blutbildenden Stammzellen zur Stammzellnische, genannt *homing* [8, 9], oder das gezielte Herauslösen, genannt *Mobilisierung* [10, 11], auch von kranken leukämischen Blutstammzellen aus deren Nische [12], sind dabei wichtige aktuelle Forschungsgegenstände. In dieser Arbeit wird das Stammzellhoming und als Modellsystem die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten experimentell in neuartigen mikrostrukturierten Kanalsystemen untersucht.

1.1.1 Die Stammzellnische

Die hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSC) befinden sich vornehmlich in ihrer geschützten Nische im Knochenmark, wobei sie nur einen Anteil von etwa 0,01 % aller Knochenmarkszellen ausmachen. Das Konzept der Stammzellnische als eine räumlich beschränkte Mikroumgebung wurde schon 1978 von Schofield et al. erstmals entwickelt [13]. Da die Stammzellen nur in dieser Umgebung ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung erhalten können, sind die Erforschung der Stammzellnische und deren künstliche Nachbildung von großem Interesse.

Osteopontin, definieren die Zellform und Beweglichkeit und beeinflussen den Zellzyklus [28, 29]. Die löslichen Nischenfaktoren wie Morphogene (z.B. Wnt, FGF) und Chemokine (z.B. SDF-1, IL8) bestimmen ähnlich wie Hormone das aktuelle Stammzellschicksal, Steuern das Stammzellhoming oder führen zur Differenzierung [30].

1.1.2 Das Stammzellhoming

Die hämatopoietischen Stammzellen können ihre Stammzellnische beispielsweise unter Stress oder nach einer Mobilisierungsbehandlung verlassen. Nach einer Trennung von der Stammzellnische oder nach einer Stammzelltransplantation wiederum finden die HSC durch eine zielgerichtete Wanderung, das *homing*, den Ort ihrer Nische im Knochenmark wieder. Da im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen im Körper auch die Zahl der Stromazellen verschwindend gering ist, kann die Anlagerung der Stammzellen an exakt den Ort der Stammzellnische kein zufälliger Prozess sein, sondern wird vermutlich über chemische Gradienten gesteuert [8]. Die Wanderung der Zellen wird dabei durch chemische Botenstoffe, die Chemokine, gesteuert. Die Chemokine werden von den Zellen der Nische produziert, wodurch sich ein Konzentrationsgradient ausbildet, dem die Stammzellen zur Nische hin nachfolgen. Diese Eigenschaft von Zellen, einem Konzentrationsgradienten durch gerichtete Bewegung zu folgen, nennt man auch Chemotaxis [31, 32]. Allerdings fehlt bislang eine Quantifizierung der Botenstoffsysteme und der Stammzellsensitivität noch völlig, auch die Frage unter welchen Einflüssen und wie die HSC überhaupt die Schranke aus Epithelzellen zwischen Blutgefäß und Knochenmark überwinden ist noch unklar. Ein wichtiges und vergleichsweise gut erforschtes Botenstoffsystem für die Stammzellwanderung bildet dabei das unter anderem von den MSC gebildete Chemokin SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 alpha) mit dessen zugehörigen Rezeptor CXCR4. Auf das Stammzellhoming nehmen jedoch noch andere Botenstoffsysteme Einfluss, z.B. IL6, CD26 (Dipeptidyl peptidase-4) oder CD44 [33-36], deren Gewichtung im Vergleich zur CXCR4/SDF-1 Achse, beziehungsweise der molekulare Zusammenhang mit dieser, ist ebenfalls noch nicht geklärt.

1.1.3 Das SDF-1/CXCR4 Botenstoffsystem

Im Hinblick auf die Chemotaxis von CD34⁺-Zellen wurde das Chemokin SDF-1 (stromal cell derived factor 1) mit dessen Rezeptor CXCR4 bereits 1997 durch Aiuti erwähnt [37] und ist bis heute das entscheidende chemische Botenstoffsystem für die Stammzellchemotaxis [38, 39]. Die Untersuchung dieses Botenstoffsystems und von Möglichkeiten zu dessen Unterbrechung steht damit auch häufig im Mittelpunkt bei der Erforschung neuer Strategien zur Stammzellmobilisierung und Leukämie-therapie [40-43]. Das von den Stromazellen ausgeschüttete SDF-1 bindet an die CXCR4-Rezeptoren der HSC, induziert die Aktinbildung [44] und führt vermutlich vor allem über den

PI3K-Signalweg zur Aktivierung einer Zellbewegung entlang des chemischen Gradienten [45-48]. Dabei führt die molekulare Signalkaskade vermehrt zur Ausbildung von Zytoplasmaausstülpungen (Filopodien und Lamellipodien), die zur Fortbewegung der Zelle nötig sind [49, 50]. Eine Darstellung der bislang in Zusammenhang mit SDF-1/CXCR4 erforschten Signaltransduktionswege zeigt die Abbildung von Teicher et al. [43] (Abbildung 2). Eine Blockade der CXCR4 Rezeptoren kann im Gegenexperiment zu einer Mobilisierung von HSC ins Peripherblut führen und die Adhäsion zur Nische schwächen. Im Fokus neuerer Forschungen steht dabei besonders AMD3100 (Plerixafor), ein Bicyklam, das als CXCR4-Antagonist wirkt [51]. AMD3100 verhindert reversibel das Anbinden von SDF-1 an den CXCR4-Rezeptor [52] und wird bereits in Kombination mit G-CSF zur Mobilisierung von Stammzellen verwendet [34, 53-55].

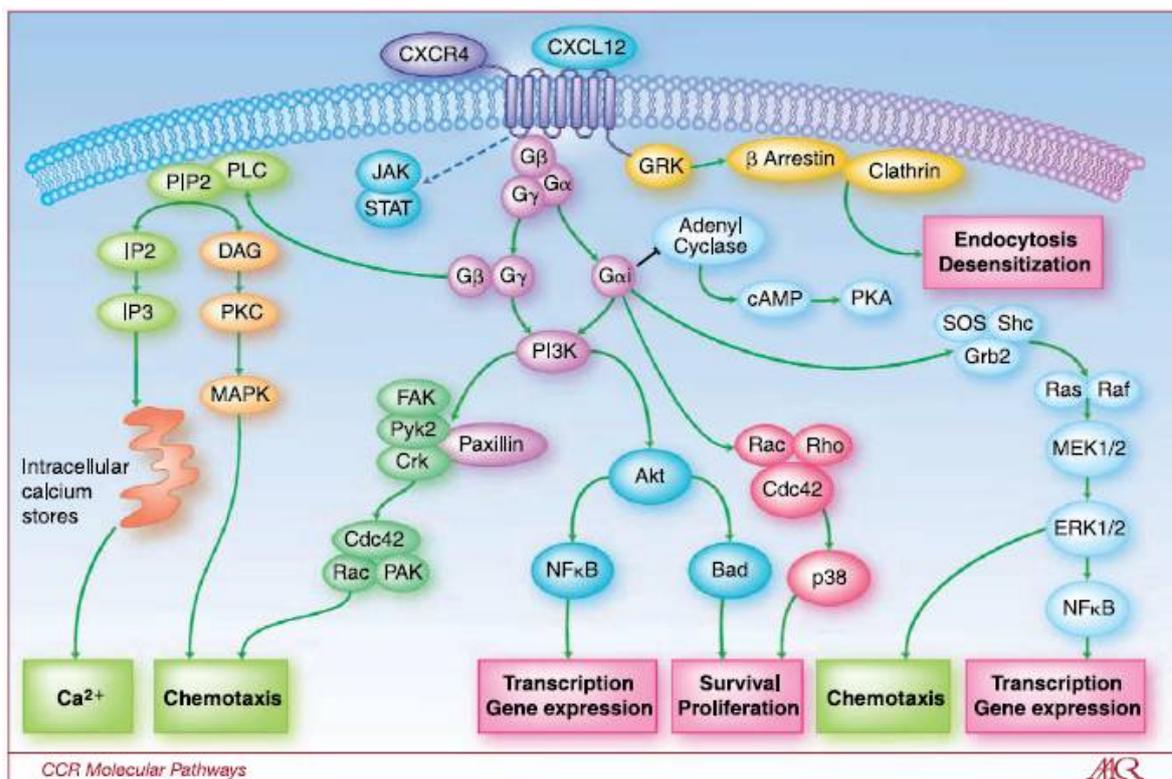


Abbildung 2: Übersicht der SDF-1/CXCR4-Signaltransduktionswege, vor allem über den PI3K-Weg führt die Anlagerung von SDF-1 zu gerichteter Zellmigration; Abbildung entnommen aus [43].

1.2 Verwendete Modellsysteme

Neben der sehr komplexen Möglichkeit einer kompletten Nachbildung der Stammzellnische in vitro [26, 56, 57] können auch repräsentativ einzelne Zelltypen der Nische im Knochenmark als in vitro-Modell einer Stammzellnische verwendet werden. Da sie sowohl in der endostealen als auch vaskulären Nische vorkommen, wurden für diese Arbeit mesenchymale Stammzellen zur Darstellung der Stammzellnische und als Chemokindonor verwendet. Für die Entwicklung und den Test neuer Migrationsexperimente ist die Nutzung von bereits erforschten, leicht verfügbaren und gut migrierenden Zell-/Botenstoffsystemen anstatt der raren HSC sinnvoll. Bei der Auswahl der T-Zelllinie Jurkat und den ausdifferenzierten neutrophilen Granulozyten als Modellsystem waren deren Zugehörigkeit zum menschlichen Blutsystem (Abbildung 3), die ähnliche Zellgröße sowie das vergleichbare Migrationsverhalten die ausschlaggebenden Eigenschaften.

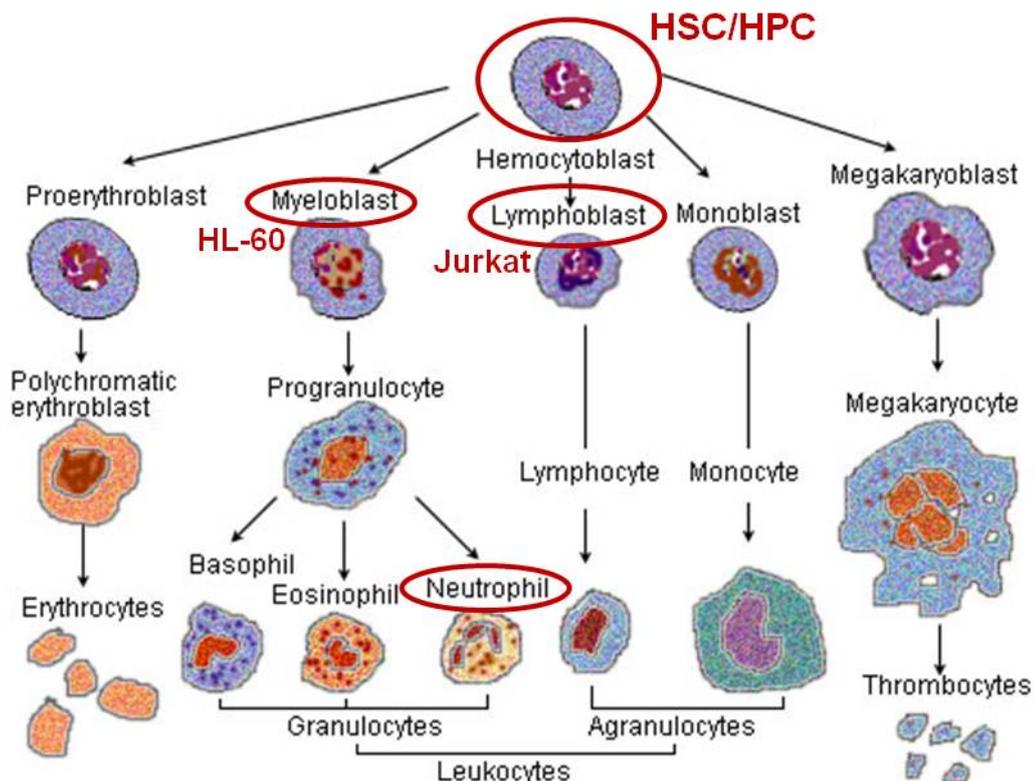


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des hämatopoietischen Stammbaums ausgehend von der hämatopoietischen Progenitorzelle (HSC) mit einer Eingruppierung der als Modellsystem gewählten Zelllinien Jurkat und HL-60, letztere wird zu den neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) ausdifferenziert; (Abbildung modifiziert aus http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illu_blood_cell_lineage.jpg, den 19.11.2011).

1.2.1 MSC - HSC

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind ein bereits etabliertes in vitro Modell für die hämatopoietische Stammzellnische. Deren Anwendung ist standardisiert und umfassend von der kooperierenden Arbeitsgruppe um Professor Ho beschrieben worden [58-62]. Eine Reihe von Experimenten hat gezeigt, dass die Präparation humaner MSC ausgehend von verschiedenen Gewebetypen wesentliche Unterschiede in deren HSC unterstützender Funktion zur Folge hat [63]. Die optimalen Quellen zur MSC-Kultivierung bieten dieser Studie zufolge Nabelschnurblut oder adultes Knochenmark (BM), mit anschließender Kultur in herkömmlichen Medien mit fötalem Kälberserum (FCS) und mit einer Zellexpansion von 5 bis 7 Passagen.

Als ein passendes Modell für die humanen HSC kann die CD34+-Fraktion aus Nabelschnurblut isolierter Stammzellen genutzt werden [64-66]. Das Oberflächenantigen CD34 ist einer der wichtigsten Marker zur Charakterisierung von humanen HSC, andere häufig verwendete Stammzellfraktionen sind die CD133+-Zellen [67] oder die weiter aufgereinigte Zellfraktion CD34+/CD38- [68]. Aber auch die Verwendung von funktionellen Markern, wie den Aldehyddehydrogenasen (ALDH), zur Stammzellaufreinigung nimmt immer mehr zu [69-71]. Da beispielsweise ALDH auch von leukämischen Stammzellen (LSC) stark exprimiert wird, gewinnt die ALDH+-Zellfraktion in der Stammzellforschung immer mehr zur Definition von HSC bzw. LSC an Bedeutung [72].

1.2.2 Jurkat - SDF-1

Die lymphoide T-Progenitorzelllinie Jurkat wurde 1977 von Schneider isoliert [73] und 1984 von Weiss et al. aufgrund ihrer hohen IL-2-Expression geklont [74, 75]. T-Zellen gehören zur erworbenen Immunabwehr des Körpers und weisen wie alle Immunzellen eine hohe Beweglichkeit auf, welche sich auch bei der Jurkat-Zelllinie durch die vielzählig ausgebildeten Filopodien zeigt. Sie bewegen sich ständig im Blutkreislauf und den lymphatischen Geweben [76] und identifizieren krankhafte Veränderungen der Körperzellen. Finden die naiven T-Zellen krankhafte Membranveränderungen auf einer Körperzelle, reagieren sie je nach Aktivierung folgendermaßen [77]: sie zerstören die kranke Zelle direkt (T-Killerzellen), oder sekretieren Zytokine (T-Helferzellen), um andere Immunzellen anzulocken und zu aktivieren, oder sie Verhindern Übergriffe auf intakte Körperzellen der Umgebung (regulatorische T-Zellen). Bei Überempfindlichkeit oder falscher Stimulans sind T-Zellen aber auch oft für das Auftreten allergischer Reaktionen verantwortlich.

Zur Ausübung ihrer immunrelevanten Funktionen sind auch T-Zellen in der Lage aktiv einem Chemokingradienten nachzufolgen [78, 79]. Die SDF-1-Chemotaxis von primären

T-Zellen [80] wurde beispielsweise durch Munk et al. [81] im Transwell-Experiment und durch Lin und Butcher [82] in einem Mikrofluidikexperiment erforscht. Die Adhäsion von Jurkat-Zellen als Reaktion auf SDF-1 wurde durch Zepeda-Moreno et al. [83] untersucht. Als Modell für die SDF-1 induzierte HSC-Migration eignet sich die Jurkatzelllinie insbesondere, da sie sich ebenfalls noch im Stadium der Progenitorzellen befinden und eine ähnliche Zellgröße sowie ein ähnliches Migrationsverhalten aufweisen.

1.2.3 HL-60 und neutrophile Granulozyten

Aus den multipotenten hämatopoietischen Stammzellen entwickeln sich unter dem Einfluss von Zytokinen oligopotente hämatopoietische Stammzellen. Zu ihnen gehören die myeloische Progenitorzelle und die lymphoide Progenitorzelle (Abbildung 3). Die kanzerogene humane Zelllinie HL-60 [84] im Stadium der myeloischen Vorläuferzelle kann unter Zugabe von Reagenzien, z.B. DMSO und/oder G-CSF [85, 86] oder durch Ethanol [87], zu neutrophilen Granulozyten ausdifferenziert werden. Neutrophile gehören zur Immunabwehr und dienen der Identifizierung und Zerstörung von Mikroorganismen [88]. Migration ist eine essentielle Funktion der Zellen des Immunsystems. Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten migrieren aus Blutgefäßen durch das Gewebe zu den Infektionsstellen [89]. Die Neutrophile erreichen dabei die entzündete Stelle innerhalb der ersten 30-60 min nach der Verletzung und sammeln sich dort. Als Fresszellen [90] phagozytieren sie Bakterien und Fremdmaterial und sekretieren Substanzen gegen die infektiösauslösenden Organismen. Eine lokale Verletzung des Gewebes verursacht eine Oberflächenveränderung der Blutgefäßwände. Die Neutrophile bewegen sich im Blutstrom und binden an die veränderten Oberflächenmoleküle der Blutgefäßwand. Anschließend verändern die Neutrophile ihre Form und migrieren durch die endotheliale Schicht in das Gewebe, um infektionserregende Bakterien zu töten. Der Prozess wird durch Chemoattraktanden, wie z.B. bakterielle N-Formyl-Peptide vermittelt [91], die an der Infektionsstelle von Bakterien ausgeschüttet werden und für welche die Neutrophile passende Rezeptoren besitzen. Vom verletzten Gewebe selbst werden zusätzlich körpereigene Lockstoffe ausgeschüttet, denen die Neutrophile zur Entzündungsstelle hin nachfolgen. Dazu zählen beispielsweise der Plättchen aktivierende Faktor (PAF) und Chemokine wie Interleukin-8 (IL-8). An der Entzündungsstelle angelangt, sekretieren die Neutrophile Hydrolasen und Proteinasen, was zur Tötung der Fremdorganismen führt.

Das Tripeptid N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) ist ein starker Chemoattraktand und entsteht beim Abbau von Bakterien- oder Mitochondrienproteinen nach Gewebeverletzungen. FMLP ist in Entzündungsprozessen eine Schlüsselkomponente im Heranlocken neutrophiler Granulozyten und Monozyten, und wird in experimentellen Studien zur Zellmigration von neutrophilen Granulozyten häufig angewendet [92, 93]. Interleukin-8 (IL-8) ist ein Chemokin der CXC-Familie und stimuliert unter anderem

ebenfalls die Chemotaxis von Neutrophilen [94]. Eine erhöhte Expression von IL-8 wurde bei Krebszellen, endothelialen Zellen und Tumor-assoziierten Makrophagen festgestellt. Plättchenaktivierender Faktor (PAF) ist ein Phospholipid, das durch Neutrophile, Thrombozyten und Endothelzellen gebildet wird. Es löst Zellaggregation aus und tritt bei Entzündungen und Wundheilungsprozessen auf.

1.3 Chemotaxisassays

Für die Untersuchung der Chemotaxis von eukariotischen Zellen stehen diverse bereits entwickelte Migrationsexperimente mit verschiedener Komplexität zur Verfügung [31, 95-97]. Je nach zu untersuchender Zellspezies oder Botenstoffsystem muss das passende Chemotaxisexperiment ausgewählt und meist nochmals an die spezifischen Erfordernisse der Zellspezies angepasst werden. In den nachfolgenden Absätzen wird ein Überblick über bisher entwickelte Versuche dargestellt und deren Vor- und Nachteile erläutert.

1.3.1 Einkammer-Experimente

Experimente in nur einer Kammer, z.B. in gewöhnlichen Multiwellplatten oder den Microwells einer Terasaki-Platte, eignen sich besonders zum Test der Migrationsfähigkeit verschiedener Zelltypen [98]. Das spezifische Merkmal der Einkammer-Experimente ist, dass der Botenstoff und die Zellen nicht voneinander getrennt vorliegen, und daher auch keine eindeutigen Chemoattraktantgradienten definiert werden können. Allerdings eignen sich diese schnell und einfach ausführbaren Experimente ausgezeichnet für die Feststellung, ob die Zellen überhaupt eine Reaktion auf den potentiellen Chemoattraktant zeigen, das heißt beispielsweise eine verstärkte Filopodienbildung oder Beweglichkeit aufweisen. Besonders für stark protrusionsbildende Zellen wie die neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) oder migrierende Endothelzellen eignen sich *Filopodienbildungsexperimente* zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit [99, 100]. Filopodien und Lamellipodien sind dynamische Strukturen aus Aktin, die sich auf der Oberfläche der Zellen ausbilden und bei Prozessen wie Zellinvasion, Zellmigration und Phagozytose eine wichtige Rolle spielen. Zu den in den Kammern einer Wellplatte vorinkubierten Zellen wird der jeweilige, zu untersuchende Chemoattraktand zugegeben. Die Reaktion der Zellen auf den Zusatzstoff wird durch zeitversetzte Aufnahme der Bilder mit einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und mit der negativen Kontrolle, also der Filopodienbildung der Zellen in einer Kammer ohne Chemoattraktant, verglichen.

Für Migrationsexperimente in nur einer Kammer, die *Migration in Microwells* (siehe auch 2.3.3) können dagegen nur Zellsysteme verwendet werden, bei denen der Botenstoff direkt in der Kammer durch Zellen sekretiert oder beispielsweise langsam aus Gelpartikeln

freigesetzt wird. Das bedeutet, in der Kammer muss es eine lokale Attraktant-Quelle geben, von der durch Diffusion ein Botenstoffgradient ausgeht und in deren Richtung dann die Zellbewegung erfolgt. Für das MSC/HSC-Zellsystem wurde diese Art der Chemotaxisexperimente bereits durch Wagner et al. demonstriert [101] (Abbildung 4).

Bei einem weiteren Einkammer-Experiment, dem *Micropipette-Assay*, wird der Attraktantgradient durch das Einbringen einer Mikropipettenspitze, aus der die Attraktantlösung strömt bzw. diffundiert, in die Zelllösung erzeugt. Hier wird besonders die Filopodienbildung einzelner Zellen und deren chemotaktische Migration mikroskopisch beobachtet [102]. Das Micropipette-Assay erfordert allerdings ein aufwändiger ausgestattetes Mikroskop mit Mikromanipulator und ist durch die wechselnde Form der selbst gezogenen Mikropipettenspitzen eher schlecht reproduzierbar.

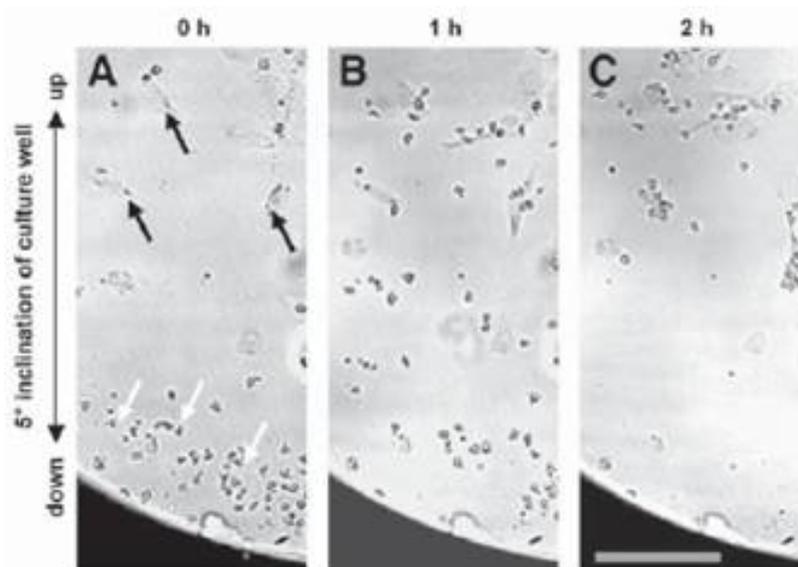


Abbildung 4: Microwell-Experiment (Terasaki-Platte) zur in vitro Migration von humanen hämatopoietischen Stamm-/Progenitorzellen (HSC, durch die weißen Pfeile gekennzeichnet) zu adhärenenten Maus-AFT024-Zellen (durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet), welche vermutlich einen SDF-1-Gradienten durch Sekretion generieren; Maßstab entspricht 100 µm (Abbildung entnommen aus [101]).

1.3.2 Agarose-Assays

Eine Verbesserung der Einkammer-Experimente stellen Agarose-Assays oder andere gelbasierte Chemotaxisversuche dar [96, 103]. Diese werden zwar ebenfalls zumeist in einer Petrischale ausgeführt, diese große Kammer ist jedoch mit einem Hydrogel ausgegossen, in dem durch Ausstanzen oder Ausschneiden mehrere kleinere Kammern erzeugt wurden. Damit kann eine räumliche Trennung von Attraktantquelle und migrierenden Zellen erreicht werden, wodurch auch Lösungen mit künstlichen Botenstoffen als Quelle benutzt werden können und was auch den Einsatz von mehreren Attraktanten gleichzeitig zum Vergleich ihrer Wirkung ermöglicht [104]. Die Ausbildung

des chemischen Gradienten erfolgt dann ringförmig um das Attraktant-Reservoir herum durch das Agarosegel hindurch. Dadurch wird eine Konvektion bei der Gradientenausbildung effektiv vermieden, allerdings müssen nun auch die migrierenden Zellen unter bzw. durch das Gel hindurch migrieren, wozu nicht alle Zellspezies in der Lage sind. Aus diesem Grund muss das Agarosegel ebenfalls an die spezifischen Migrationsversuche angepasst werden, in der Regel werden sehr wasserhaltige Gele mit etwa 1 % bis 2 % Agarose verwendet. Diese müssen dann vor jedem Chemotaxisexperiment frisch hergestellt und vor Austrocknung, welche zu einer Veränderung des Gradienten führen würde, geschützt werden. Bei den Agarose-Chemotaxisexperimenten erreichen die migrierenden Zellen das Attraktantreservoir in der Regel nicht, es wird lediglich mikroskopisch beobachtet, wann und wie viele Zellen welche Strecke weit ins Gel migriert sind, wobei die Beobachtung und Auswertung der Migration durch das opake Gel hindurch und durch die Reservoirränder erschwert sein kann (Abbildung 5A).

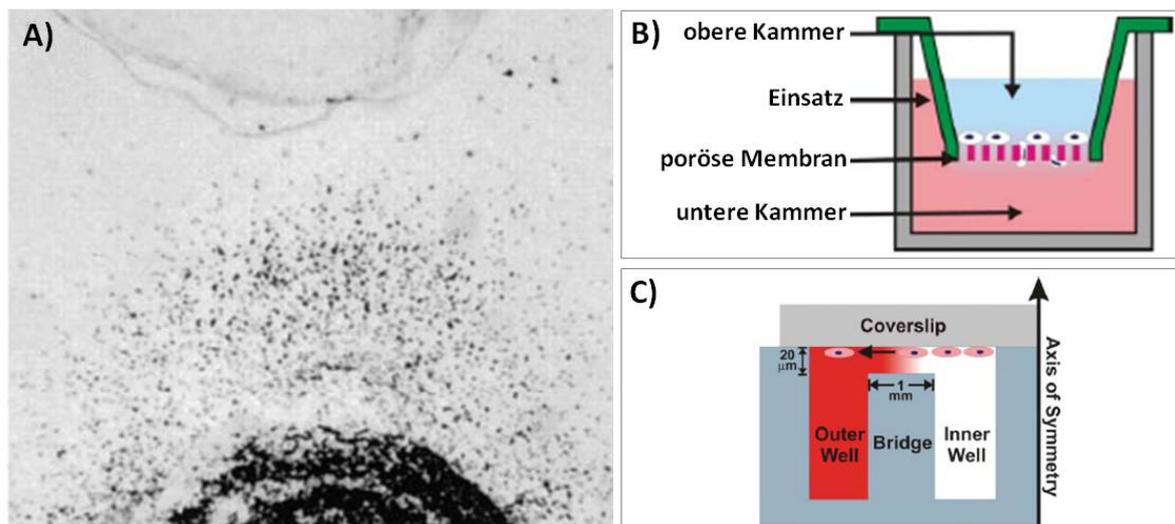


Abbildung 5: Etablierte Versuche zur Untersuchung der Zellchemotaxis: A) Agarose-Assay mit Neutrophilen (schwarze Punkte), die sich in Richtung eines IL-8/LeukotrienB4-Reservoirs (runde Ausstanzung oben) bewegen, B) schematische Darstellung des Boyden-Kammer/Transwell-Experimentes und C) der Dunn-Chemotaxiskammer (Seitenansicht); (Abbildungen entnommen aus [96], teilweise modifiziert).

1.3.3 Zweikammer-Experimente

Die *Zigmond-Kammer*, entwickelt 1977 von Sally Zigmond [105], und die 1991 von Zicha und Dunn daraus weiterentwickelte *Dunn-Kammer* [106] beruhen beide auf dem Prinzip der horizontalen Anordnung von zwei durch eine Mediumbrücke verbundenen Kammern (Abbildung 5C). Bei der Zigmond-Kammer sind die beiden Kammern linear und bei der Dunn-Kammer ringförmig angeordnet. Durch das abschließende Deckgläschen, an dem die Zellen anhaften, ist die Zellmigration einzelner Zellen und von Zellpopulationen in diesen Chemotaxisexperimenten gut mikroskopisch beobachtbar. Die generierten chemischen

Gradienten sind allerdings nur über einen Zeitraum von maximal zwei Stunden stabil, so dass lediglich sehr schnell wandernde Spezies wie Spermien oder Neutrophile [107, 108] untersucht werden können. Besonders die Zigmond-Kammer ist außerdem sehr verdunstungsanfällig und daher nur für etwa einstündige Experimente geeignet. Die Steilheit des chemischen Gradienten kann nur anhand der Botenstoffkonzentration verändert werden, dies erfordert für jedes Experiment eine komplette Neubefüllung der Kammern.

Das *Transwell-Migrationsassay* (Die Bezeichnung Transwell ist eigentlich eine geschützte Marke der Firma Corning Incorporated, die jedoch für diesen Versuchstyp in den Sprachgebrauch übergegangen ist.) ist das meistgenutzte Chemotaxisexperiment und stellt eine Weiterentwicklung der 1962 von Boyden entwickelten Boyden-Kammer dar [109]. In diesen Migrationsexperimenten bewegen sich die Zellen nicht mehr in der horizontalen Ebene, sondern vertikal von einer oberen Kammer, dem Transwell-Einsatz, zu einer unteren Kammer mit Chemoattraktant (Abbildung 5B). Diese beiden Kammern sind durch eine perforierte Polymermembran voneinander getrennt, wobei die Porengröße für Zellmigrationsversuche zwischen 3 und 12 μm liegt. Das Transwell-Experiment ist deshalb so universell einsetzbar, da es in der unteren Kammer (meist eine einfache Wellplatte) sowohl vorinkubierte Zellen als auch artifizielle Botenstofflösungen als Attraktantquelle zulässt. Außerdem ist es mit der Standard-Zellkulturausstattung anwendbar, der Gebrauch der Transwell-Einsätze ist an herkömmliche Multiwellplatten und Pipettierausstattung angepasst. Zumeist wird für die Auswertung des Experimentes die Anzahl der durch die Membran in die untere Kammer gewanderten Zellen nach ein bis zwei Stunden Laufzeit durch Auszählung ermittelt (mikroskopisch oder Durchflusszytometrie).

Kritisch anzusehen ist bei diesem Migrationsexperiment allerdings die Ausbildung des chemischen Gradienten, welcher sich nur über die 10 μm dicke Membranschicht einstellt und sehr schnell zwischen oberer und unterer Kammer ausgleicht. Zellen, bei denen die Aktivierung der Migration etwas länger benötigt oder die sehr langsam migrieren, haben somit kaum eine Chance auf den Botenstoffgradienten zu reagieren. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Fehler kann bei der Auszählung der migrierten Zellen unterlaufen. Da oftmals Zellmigration auch mit verstärkter Adhäsion einhergeht [110], bleiben die Zellen auch in den Poren der Membran oder an der Membranunterseite haften und entgehen damit der Zellzählung. Dynamische Parameter wie der Konzentrationsschwellwert für die Migration oder der zeitliche Migrationsverlauf bzw. –beginn können mit dem Transwell-Assay nur durch aufwendige Konzentrations- und Zeitserien ermittelt werden.

1.3.4 Chipbasierte Experimente

Seit der Entwicklung der *Soft Lithography* durch die Gruppe um George Whitesides [111, 112] wurden vielfältige mikrofluidische Systeme zur Generierung von chemischen Gradienten für die Anwendung in der biologischen und biomedizinischen Forschung entwickelt [113-115]. Allen mikrofluidischen Ansätzen ist eine sehr gut kontrollierbare Mikroumgebung der Zellen und ein definiert ausgebildeter, langzeitstabiler chemischer Gradient gemein. Oftmals können mehrere verschieden steile Gradienten, so zum Beispiel im *Leiter-Assay* [116-118] (Abbildung 6A), nebeneinander mit derselben Zellcharge in einem Experiment getestet werden. Oder die Variation der Botenstoffkonzentration und der Gradientensteilheit kann mit mikrofluidischen *Gradientengeneratoren* [119-121], durch eine einfache Veränderung des Flussprofils erreicht werden (Abbildung 6B). Die zeitliche Antwort von sowohl Einzelzellen als auch von Zellkollektiven auf den Botenstoff kann durch die Verwendung von durchsichtigen Materialien wie Glas, PDMS, PMMA oder Polystyrol gut mikroskopisch dokumentiert werden, oftmals wird ein Einzelzelltracking zur Auswertung angewendet. Auch *Experimente an der Schnittstelle von Transwell- und Mikrofluidik-Konfigurationen* [122, 123] erlangen immer mehr an Bedeutung, da sie die großen in der reinen Mikrofluidik benötigten Materialmengen an Zellen und Botenstoff umgehen und oft leichter handhabbar sind. Die wesentlichen Vor- und Nachteile mikrofluidischer Systeme werden ausführlich in Absatz 1.4.1 beschrieben.

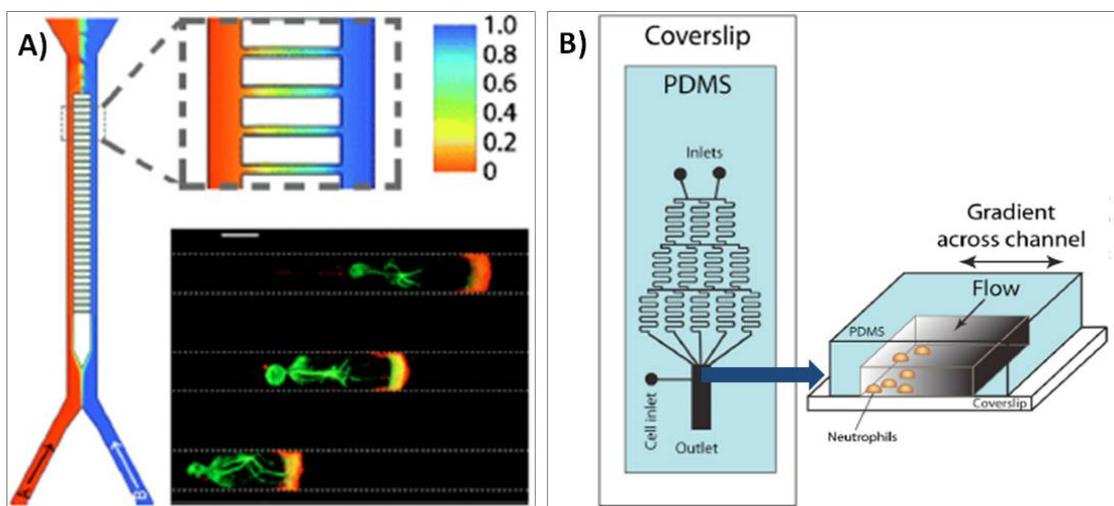


Abbildung 6: Ausgewählte Mikrofluidikexperimente zur Untersuchung der Chemotaxis: A) Das Leiter-Assay [117] beruht auf der diffusiven Ausbildung eines Botenstoffgradienten in kleinen Kapillaren, welche einen Quellkanal mit Botenstoff und einen Zellen enthaltenden Kanal ohne Botenstoff verbinden. Durch die Variation der Kapillarlänge, d.h. die fluidischen Kanäle laufen nicht mehr parallel, kann die Gradientensteilheit innerhalb eines Versuches variiert werden; B) Ein mikrofluidischer Gradientengenerator [120] an dessen Ende sich ein Analysefeld mit dem generierten chemischen Gradienten befindet, in das von der Seite die migrierenden Zellen eingespült werden. Je nach Konzentration der zu mischenden Botenstofflösungen ändert sich die Steilheit des Gradienten im Analysefeld; (Abbildungen entnommen aus [114]).

1.4 Mikrofluidische Systeme

1.4.1 Grundlagen der Mikrofluidik

Mikrofluidik bezeichnet die Handhabung von zumeist Flüssigkeiten in speziellen miniaturisierten Kanalsystemen. Die Dimensionen dieser Kanalsysteme liegen in der Regel im Bereich von 1 – 100 μm Kanalhöhe, 10 – 500 μm Kanalbreite und einer Länge der Kanäle, die bis in den Zentimeterbereich gehen kann [124]. Die Mikrofluidik basiert im Wesentlichen auf den gleichen physikalischen Grundlagen wie die herkömmliche Fluidodynamik [125], allerdings kommen durch die kleinen charakteristischen Größen und Geometrien neuartige Kombinationen der fluidodynamischen Eigenschaften zustande [126].

Das erste Charakteristikum von mikrofluidischen Systemen ist die generell kleine Reynolds-Zahl für Flüsse deren Kanälen. Die Reynolds-Zahl Re ist definiert als der Quotient des Impulstransports durch Konvektion beziehungsweise Strömung des Mediums dividiert durch den Impulstransport durch viskose Reibung, oder anders ausgedrückt dem Verhältnis von Trägheits- zu Zähigkeitskräften:

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} = \frac{v d}{\nu} \quad (1)$$

mit v = Fließgeschwindigkeit, d der charakteristischen Länge (in der Mikrofluidik zumeist die Kanalbreite) und ν die Viskosität der Flüssigkeit. Für mikrofluidische Systeme liegt die Reynolds-Zahl im Allgemeinen kleiner als 1. Damit ist sie sehr weit entfernt von den kritischen Reynolds-Zahlen, die den Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung angeben, und das Flussregime in der Mikrofluidik kann generell als laminar betrachtet werden.

Das zweite Charakteristikum ist die im Allgemeinen kleine thermische und diffusive Peclet-Zahl Pe für Wärme- und Stofftransport in mikrofluidischen Systemen. Die diffusive Peclet-Zahl gibt das Verhältnis von Stofftransport durch Konvektion dividiert durch den Transport durch Diffusion an:

$$Pe = \frac{v d}{D} \quad (2)$$

mit v = Fließgeschwindigkeit, d der charakteristischen Länge (in der Mikrofluidik zumeist die Kanalbreite) und D dem Diffusionskoeffizienten des zu untersuchenden Stoffes in der Flüssigkeit. Sind die Fließgeschwindigkeiten sehr klein und die charakteristischen Längen, über die der Stofftransport beobachtet werden soll, relativ groß, so ergeben sich im

allgemeinen Peclet-Zahlen von weitaus kleiner als 1. Dies bedeutet, dass der Stofftransport fast ausschließlich über Diffusion abläuft.

Ein weiteres Merkmal mikrofluidischer Systeme ist, dass mindestens eine Dimension im unteren Mikrometerbereich und damit in einem Bereich liegt, in dem die Kapillarkräfte einen signifikanten Anteil am Verhalten der Flüssigkeiten im Kanal haben können [125, 126]. Durch die hohe Oberflächenspannung der wässrigen Lösungen und den kleinen Kontaktwinkeln zwischen der wässrigen Lösung und den in der Mikrofluidik verwendeten Materialien wie Glas oder hydrophiliertem Polydimethylsiloxan (PDMS) können sich hohe Drücke ausbilden, die normalerweise zu großen Steighöhen hier aber zu hohen Drücken innerhalb der Kanäle führen. Dies kann beispielsweise dazu führen, dass durch Kapillarkräfte der Stofftransport realisiert wird [127], aber auch dazu, dass bis zum Erreichen eines stationären Zustands auch in rein diffusiv ausgelegten Systemen Konvektion im Kanalsystem herrschen kann.

Einer der wesentlichen Vorteile von mikrofluidischen Systemen ist aber, dass die Geometrien der Kanalsysteme quasi beliebig im zweidimensionalen Raum erstellt werden können. Dies bietet die Möglichkeit, sowohl die Kanalgeometrien wie Länge, Breite und Höhe als auch deren Verbindungen und Kombinationen frei wählen zu können. Da meistens mindestens eine Trägerplatte der Mikrofluidikchips aus Glas besteht, können durch Einsatz geeigneter Mikroskope die Transportvorgänge in den Kanalsystemen in Echtzeit beobachtet werden. Diese Vorteile werden auch in dieser Dissertation zur Beobachtung des Wanderungsverhaltens von Zellen ausgenutzt. Außerdem wird durch die Mikrostrukturierung eine räumliche Trennung der Reservoirs von Botenstoffquelle und den zu untersuchenden Zellen erreicht. Die Weglänge zwischen den Reservoirs kann gezielt verändert werden, um den Einfluss der Gradientensteilheit auf die Zellmigration zu testen. Es wurde in dieser Arbeit ein Chipsystem entwickelt, das auf Basis obiger Betrachtung rein auf Diffusion beruht (siehe Kapitel 2.2).

Doch um die Vorteile der Mikrofluidik richtig nutzen zu können, muss man gewisse Schwierigkeiten in der Handhabung überwinden. So ist zum einen auf ein absolut sauberes/staubfreies Arbeiten bei der Chipherstellung zu achten, um unbeabsichtigtes Blockieren der Kanäle zu vermeiden. Zum anderen ist darauf zu achten, dass durch eine zuverlässige Verbindung von Trägerplatte und mikrostrukturierter PDMS-Schicht keine Undichtigkeiten und damit Auftreten unerwünschter Kapillarkräfte auftreten. Zudem muss das mit nur wenigen Mikrolitern an Flüssigkeit befüllte System durch Abdeckung der Reservoirs und geeignete Flüssigkeitszufuhr vor dem Austrocknen geschützt werden. Dies ist insbesondere bei Experimenten mit lebenden Zellen ein nicht zu unterschätzender Punkt, da diese oft über mehrere Tage andauern können. Trotz sehr kleiner Flüssigkeitsmengen in den mikrofluidischen Systemen kann das Gesamtvolumen in

Zuleitungen, Pumpsystem und Chip für einige Anwendungen mit sehr seltenen Zellmaterial oder teuren Substanzen immer noch zu hoch sein. Jeder Mikrofluidikaufbau muss individuell und anwendungsbezogen optimiert werden.

1.4.2 Anfertigung von Mikrostrukturen

Mikrofluidische Systeme werden in herkömmlicher Art und Weise durch Ätzen der gewünschten Kanäle in Glas oder Silizium hergestellt. Dabei wird nach Erstellen der Kanalstrukturen über ein CAD-Programm eine Chrommaske erstellt, die für die Entwicklung des Fotolacks benötigt wird. Das Herstellen der Chrommaske ist aufgrund der hohen Auslastung der Reinräume oft sehr zeitintensiv. Danach wird in einem mehrstufigen Reinraumprozess der eigentliche Chip hergestellt [124]. Erst wird der Fotolack aufgebracht (häufig SU-8, ein Epoxydlack), dieser wird entwickelt und die nicht entwickelten Lack-Monomere werden abgespült. Dann werden in verschiedenen nasschemischen Schritten die Kanäle in das Trägermaterialien eingeätzt. Schließlich werden die Reste des Fotolacks entfernt und der Chip verschlossen. Zusammengefasst lässt sich das konventionelle Herstellungsverfahren derart charakterisieren: Es ist technisch sehr ausgereift, bedarf aber einer guten Reinrauminfrastruktur, mit 1-3 Monaten Gesamtherstellzeit ist es eher zeitintensiv und mit mehreren hundert Euro Kosten pro Wafer relativ teuer.

Werden allerdings solch kleine Strukturen, die mit Hilfe der konventionellen Reinraumtechnik zugänglich sind, gar nicht benötigt, bieten sich alternative Herstellprozesse an. Der in dieser Arbeit verwendete Prozess wird als *soft lithography* bezeichnet (siehe Abbildung 7) [111]. Dabei wird im ersten Schritt ein Fotolack auf einen Siliziumwafer aufgetragen. Danach werden mittels hochauflösender Foliendrucke oder einer Chrommaske die benötigten Strukturen zunächst durch UV-Belichtung auf den Fotolack übertragen. Dieser stellt nach dem Entwickeln einen wiederverwendbaren Master (Negativ) für die Herstellung der Einweg-Chips dar. Dieses Templat aus Fotolack kann danach mit einem elastomeren Kunststoff wie PDMS übergossen werden [128], wobei die Form der Kanäle und Reservoirs durch die Struktur des Masters als Negativ vorgegeben wird. Die Strukturen werden anschließend im Sauerstoffplasma hydrophiliert und über ein Plasmabonding-Verfahren mit Glasobjektträgern versiegelt. Danach werden in der Regel Anschlüsse oder Öffnungen zum Befüllen der Reservoirs angebracht. Die Vorteile dieses *soft lithography*-Verfahrens sind, dass alle Herstellungsschritte am Computerarbeitsplatz und im normalen chemischen Labor durchgeführt werden können, und man lediglich einen Zugang zu einem hochauflösenden Drucker braucht. Dadurch sinkt der Kosten- und Zeitaufwand für den gesamten Prozess, für Design, Master- und Chipherstellung auf wenige hundert Euro und wenige Tage. Man nennt diese Art der Chipherstellung deshalb auch *rapid prototyping* [129].

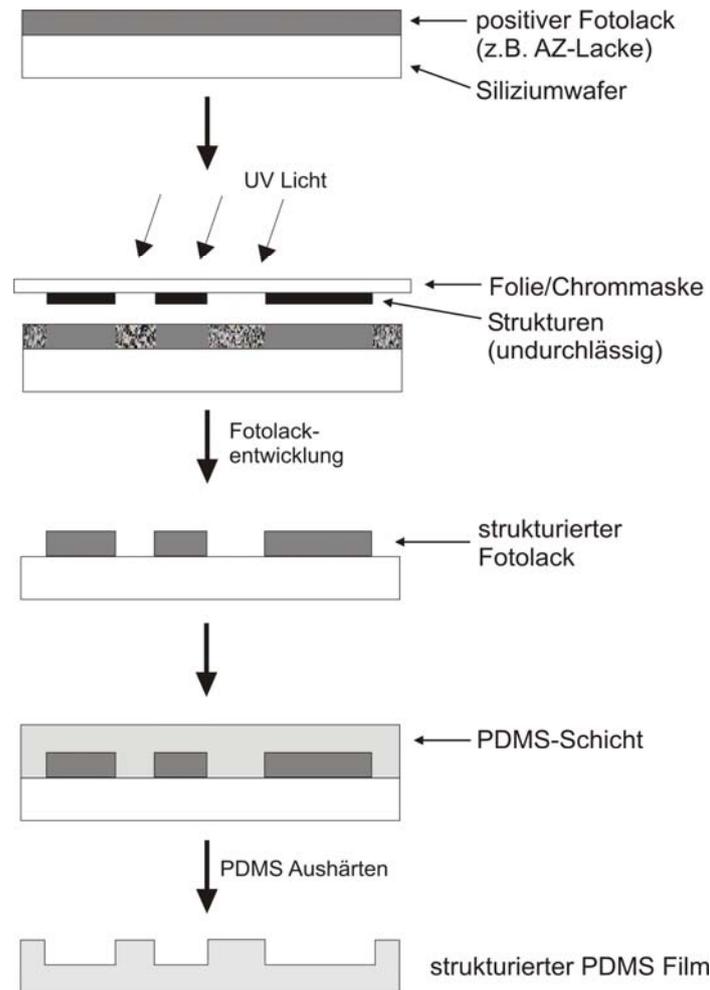


Abbildung 7: Herstellprozess von Mikrostrukturen in PDMS mittels *soft lithography*. Gezeigt ist der Ablauf eines Positiv-Fotolackverfahrens, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde (Kapitel 2.2.2).

Durch die Möglichkeit der Hydrophilierung des PDMS im Sauerstoffplasma lassen sich Anwendungen im wässrigen Milieu sehr leicht durchführen und durch die elastomeren Eigenschaften des PDMS bekommt man bruch sichere und gut haftende Verbindungen von Träger und Kanalstruktur im PDMS. Allerdings hat dieses vereinfachte Verfahren auch gewisse Beschränkungen. So können sinnvolle Kanalbreiten ohne allzu große Rauigkeit nur oberhalb 10 μm realisiert werden und die Kanalhöhen sind an die Dicke der Fotolackschicht gekoppelt. Für die vorliegende Arbeit der Untersuchung von Zellen, deren Durchmesser ca. 5 – 20 μm beträgt, sind diese Dimensionen aber vollkommen ausreichend. Nimmt man die Vorteile des *rapid prototyping* hinzu, so stellt dies die Methode der Wahl dar, um unter den gegebenen Bedingungen die Experimente durchzuführen.

2 Experimenteller Teil

Die im Rahmen dieser interdisziplinären Promotion durchgeführten experimentellen Arbeiten umfassen neben den physikalisch-chemischen Versuchen und Auswertungen zur Zellmigration auch Methoden aus den Gebieten Medizin, Biologie, Mathematik und der Mikrostrukturtechnik. So wird in den nachfolgenden Kapiteln neben den biologisch-medizinischen Arbeiten mit verschiedenen Zellkulturen und Bioassays auch die Herstellung von Mikrostrukturen, sowie die Durchführung und Auswertung der Chemotaxisexperimente beschrieben. Weitergehend werden auch die Grundlagen der numerischen Simulation der diffusiven Gradientenausbildung in den Mikrostrukturen erläutert, welche die Durchführung von Partikel- und Farbstoffexperimenten verifiziert.

2.1 Humane Zellen und Zellkultur

Für die Experimente dieser Doktorarbeit wurden Zelllinien und Primärzellen verwendet (Tabelle 1). Mit Ausnahme der AFT024-Zelllinie (Maus) handelt es sich ausschließlich um menschliches Zellmaterial. Die Primärzellen HSC und MSC wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Ho (Innere Medizin V, Universitätsklinikum Heidelberg) isoliert und bereitgestellt.

Tabelle 1: Verwendete Zellspezies und Kulturbedingungen

Zellspezies (ATCC Nummer)	Herkunft, Gewebe und Zelltyp	Kulturbedingungen [130]	Literatur
KG-1a (CCL-246.1)	Human, Knochenmark, Myeloblasten	Suspension RPMI 1640, 5 % CO ₂	[131]
HL-60 (CCL-240)	Human, Peripherblut, Promyeloblasten	Suspension RPMI 1640, 5 % CO ₂	[84]
Kasumi-1 (CRL-2724)	Human, Peripherblut, Myeloblasten	Suspension RPMI 1640, 5 % CO ₂	[132]
Jurkat (TIB-152)	Human, T-Zell Leukämie, Lymphoblasten	Suspension RPMI 1640, 5 % CO ₂	[73, 75]
AFT024 (SCRC-1007)	Maus, fetale Leber, Stromazellen	adhärent DMEM, 33°C, 5 % CO ₂	[133, 134]
MSC (primär)	Human, Knochenmark, Stromazellen	adhärent Medien siehe Tabelle	[58, 63]
HSC (primär)	Human, Nabelschnurblut, Blutzellen	Suspension LTBMC, 5 % CO ₂	[59]

2.1.1 HSC

Die hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (kurz: HSC) wurden aus Nabelschnurblut entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Heidelberg isoliert. Aus dem Nabelschnurblut von ein bis drei Neugeborenen wurden zunächst durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll®-Hypaque (Dichte: 1,077, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) die mononuklearen Zellen (MNC) und Lymphozyten abgesondert. Durch ihre geringere Dichte im Vergleich zu Granulozyten und Erythrozyten (Sediment) befinden sich diese nach der Zentrifugation ($1200 \times g$, 20 min, 20°C) an der Grenzschicht zwischen Ficoll®-Hypaque (unten) und Blutplasma (oben). Dieser Leukozytenring wird abgenommen und nochmals zuerst mit PBS und ein weiteres Mal mit MACS-Puffer (PBS + 1 % FCS + 2 mM EDTA) zentrifugiert. Aus den MNC wurden anschließend die CD34⁺-Zellen durch magnetische Zellseparation (kurz: MACS, magnetic activated cell sorting) herausgefiltert. Dafür werden die MNC mit einem monoklonalen anti-CD34 Antikörper (Ak Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, MiltenyiBiotech), welcher mit einem magnetischen Partikel markiert ist, für 30 min bei 4°C inkubiert, einmal mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend unter Nutzung einer magnetischen Affinitätssäule (MIDI MACS Separation Unit, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) vom Rest der MNC abgetrennt. Dieser Schritt wird noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend können die CD34⁺-Zellen mittels FACS (kurz für: Fluorescence activated cell sorting) noch weiter aufgereinigt werden, indem man sie mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper, z.B. CD38- oder nochmals CD34, markiert und sortiert. Allerdings sinkt die Ausbeute an Zellen mit jedem weiteren Sortierschritt drastisch. Die Reinheit der durch zweifache magnetische Zellseparation angereicherten HSC kann mittels Durchflusszytometrie überprüft werden [135] und liegt bei einem Anteil von etwa 98 % CD34⁺ exprimierender Zellen. Für die Experimente dieser Arbeit wurden deshalb meist nur die zweifach MACS-sortierten HSC verwendet. Dabei erhält man in der Regel 10^5 bis 10^6 CD34⁺-Zellen pro Nabelschnurblut-Probe. Bei sofortiger Verwendung am Tag der Gewinnung wurden die HSC nur in MACS-Puffer oder PBS gelagert, bei Verwendung am darauffolgenden Tag in LTBMCMedium (long-term bone marrow culture, siehe Tabelle 6). Nach der Isolation sind die Zellen höchstens 3 Tage verwendbar, wobei die Motilität in diesem Zeitraum stark abnimmt und eine eventuelle Differenzierung stattfindet. Andererseits sind die Zellen direkt nach dem Sortieren stark gestresst und sollten mindestens zwei Stunden ruhen, bevor sie verwendet werden. Für die Migrationsexperimente wurden die HSC daher zumeist über Nacht in LTBMCMedium inkubiert, kurz vor der Verwendung abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min), der Medienüberstand verworfen und das Pellet in PBS aufgenommen, um die gewünschte Zellkonzentration (meist 1000 Zellen/ μ l) zu erhalten.

2.1.2 MSC

Die mesenchymalen Stromazellen (Abbildung 8) wurden aus dem Knochenmark von gesunden Spendern isoliert [63]. Um die MSC aus der Knochenmarkprobe zu isolieren wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll®-Hypaque (Dichte: 1,077, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt und die mononuklearen Zellen (MNC) in eine Zellkulturflasche überführt (10^6 Zellen/cm², Passage 1). Alle adhärennten Zellen nach zwei Tagen Inkubationszeit werden als MSC-Zelllinie weiter kultiviert. Als Hauptkulturmedium wurde das käufliche Medium MSC GM von Lonza, Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, (kurz: M1; PT-3001, Lonza, Walkersville, MD, USA; vgl. Absatz 2.4.1) verwendet. Dieses Medium ist für die Langzeitkultur von MSC in größerer Anzahl geeignet und verhindert deren Differenzierung. Die MSC wurden bei 95 % Luftfeuchte, 5 % CO₂ und 37°C in Standard-Zellkulturflaschen ohne Fibronektinbeschichtung kultiviert. Für die Zellteilung wurden die MSC bei circa 80 % Konfluenz nach zweimaligen Waschen mit PBS unter zweimaliger Zugabe von 0,25 % Trypsin/1Mm EDTA trypsinert, abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und mit einer Dichte von etwa 1×10^4 Zellen/cm² neu ausgesät. Aufgrund der Herkunft von verschiedenen Spendern hatten die MSC sehr unterschiedliche Wachstumsraten, und das Erreichen der Konfluenz dauerte somit sehr variabel zwischen 3 und 14 Tagen. Es wurden die Passagen 3 bis 10 für Migrationsexperimente verwendet.

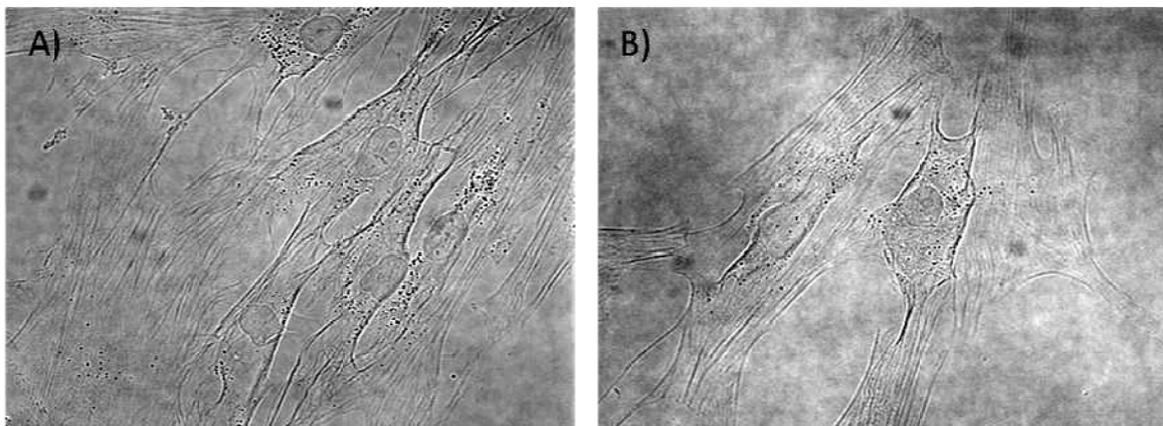


Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) von MSC (M1) der Passage 6, A) Zellen mit etwa 80 % Konfluenz, B) zwei miteinander in Kontakt stehende Zellen; Aufnahmen: R. Saffrich.

2.1.3 Zelllinien – Jurkat, Kasumi, KG-1a, HL-60

Die humanen Zelllinien Jurkat, Kasumi, KG-1a (Quelle: alle Arbeitskreis Prof. Ho, ATCC) und HL-60 (Quellen: Arbeitskreis Prof. Ho, aus ATCC; und Arbeitsgruppe Dr. K. Schmitz, (KIT), aus DSMZ) wurden alle im Medium RPMI, versetzt mit 10 % FBS, 1 mM L-Glutamin und 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, bei 37°C und 5 % CO₂ im

befeuchteten Inkubator kultiviert. Zur Teilung wurde bei diesen Suspensionszelllinien etwa alle 4 Tage das komplette Volumen (10 ml bei T-25 Kulturflasche oder 20 ml bei T-75 Kulturflasche) bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, das Pellet in RPMI aufgenommen und die Zellen mit einer Dichte von 10^5 Zellen/ml wieder ausgesät. Die maximale Zelldichte sollte 1×10^7 Zellen/ml nicht übersteigen.

2.1.4 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) wurden durch Differenzierung aus der HL-60-Zelllinie gewonnen. Hierfür wurden dem oben beschriebenen Kulturmedium RPMI1640 zusätzlich 1,25 % DMSO und 0,025 % G-CSF zugesetzt und die Zellen ebenso inkubiert. Die Zugabe von G-CSF ist dabei nicht essentiell, da die Zellen auch nur mit DMSO ausdifferenzieren, Motilitätsunterschiede und Unterschiede in den vorhandenen Biomarkern (Arbeitsgruppe K. Schmitz, KIT) konnten dabei nicht festgestellt werden. 10^5 HL-60 Zellen/ml wurden in diesem Differenzierungsmedium ausgesät und nach 4-6 Tagen die ausdifferenzierten neutrophilen Granulozyten verwendet. Die finale Zellkonzentration beträgt dabei stets in etwa 10^6 Zellen/ml, da sich die ausdifferenzierten Granulozyten nicht mehr weiter teilen können. Der Fortschritt der Differenzierung lässt sich am zunehmenden Anteil adhärenter Zellen am Kulturflaschenboden erkennen. Diese leicht anhaftenden Zellen wurden vor dem Ernten mit einem Zellschaber abgeschabt, danach ein Teil der Zellen abgenommen, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet erneut in RPMI entsprechend der gewünschten Verdünnung, zumeist 1000 Zellen/ μ l, aufgenommen.

2.2 Mikrostrukturen und Chipherstellung

Die Mikrostrukturen wurden in Zusammenarbeit mit und unter Nutzung des Reinraumbereiches des Instituts für Mikrostrukturtechnik (IMT) am Karlsruhe Institut für Technologie (KIT) gefertigt. Der Aufbau der endgültigen Chipsysteme erfolgte dann im eigenen Labor in Heidelberg. Um die Funktionalität der Migrationskammern zu überprüfen, wurden Partikel- und Farbstoffexperimente durchgeführt, sowie in Zusammenarbeit mit den Mathematikern Dr. M. Neuss-Radu und Dr. N. Neuss (beide Universität Erlangen-Nürnberg) eine numerische Simulation der diffusiven Gradientenausbildung berechnet.

2.2.1 Design und Belichtungsmasken

Da der Herstellungsprozess von Mikrostrukturen nach wie vor sehr aufwendig und kostspielig ist, spielt der Entwurf der Maskenstrukturen eine übergeordnete Rolle. Dabei muss zum einen der geometrische Aufbau der Mikrostrukturen in Hinblick auf das gewünschte Experiment und unter mikrofluidischen Gesichtspunkten angepasst werden, zum anderen sollte eine möglichst optimale Nutzung des Siliziumwafers gegeben sein, welche auch die Herstellungstechnik der Strukturen berücksichtigt. So wurden beispielsweise die kleinsten Strukturen jeweils in der Wafermitte angeordnet. Am Waferrand kommt es bei der Belackung, Belichtung und Entwicklung zu ganz leichten Abweichungen von den optimalen Prozessparametern, so dass beim rapid prototyping-Verfahren, also der Nutzung von Folien als Maske, sehr kleine Strukturen von 10 μm Breite dort nicht mehr realisiert werden können. Da die Größe der verwendeten Zellen zwischen 5 μm (HSC) und 20 μm (Neutrophile) liegt, beträgt die optimale Breite der Kanäle 20 μm bis maximal 100 μm . Für das luftblasenfreie Befüllen der Strukturen sind runde Reservoirs weitaus praktikabler als eckige Formen. Abbildung 9 zeigt die Entwicklung einer Mikrostruktur vom Ideelayout bis zur optimierten Mikrostruktur mit gleicher Funktion.

Für den Entwurf der Masken wurden die vektorbasierten Grafikprogramme CleWin (WieWeb Software, Hengelo, Niederlande) und CorelDRAW (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) verwendet (alle entworfenen Masken im Anhang 5.1). Für die Anfertigung der Chrommaske wurden die Dateien dann im dxf-Format exportiert, für den Druck von Folienmasken im pdf-Format. Die Chrommaske wurde vom IMT angefertigt. Die Folienmasken für das rapid prototyping wurden entweder in der Druckerei am KIT oder in der Druckerei Stober (Eggenstein-Leopoldshafen) über ein Filmbelichtungsverfahren entwickelt (Abbildung 10).

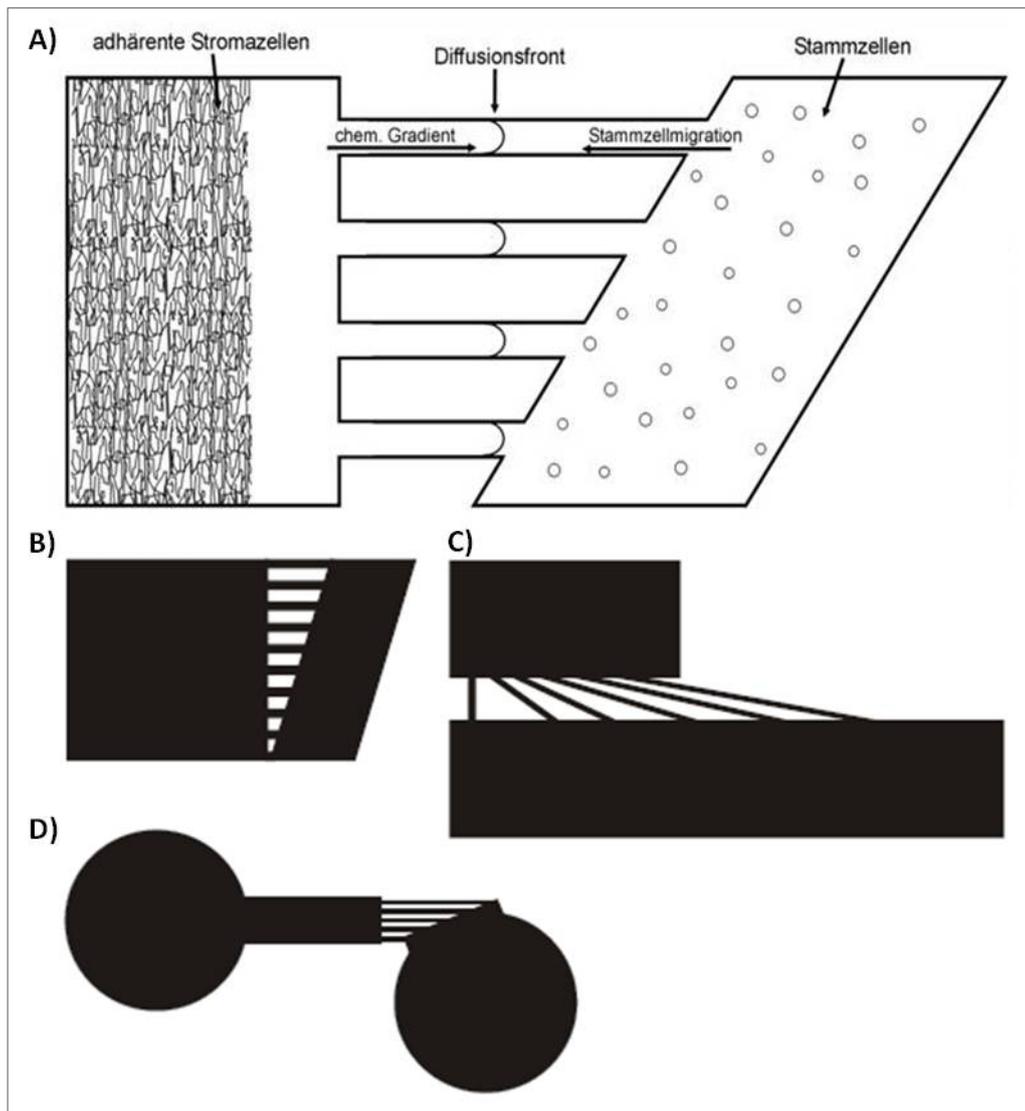


Abbildung 9: Entwürfe einer Mikrostruktur mit zwei getrennten Kammern, welche durch verschiedene lange Kanäle verbunden sind, in 6facher Vergrößerung. A) Schematische Darstellung des ursprünglichen Entwurfes für das Mikrofluidiksetup. Die verschiedenen Kanallängen bilden definierte Diffusionswege für die Chemoattraktanden und die Grundlage einer zeitversetzten HSC Migrationsreaktion, B) hier wurde die Ursprungsidee direkt in ein CAD-Layout umgesetzt, Kanalbreite 100 µm, C) Da die Zellen den Kanalbereich nicht als solchen wahrnahmen, wurde er deutlicher von den Reservoiren abgegrenzt und die Kanäle verlängert, D) Runde Reservoire erleichtern das Befüllen, die Kanalbreite wurde deutlich verringert und eine mikrofluidische Pufferzone (breiter Kanalbereich) eingebaut.

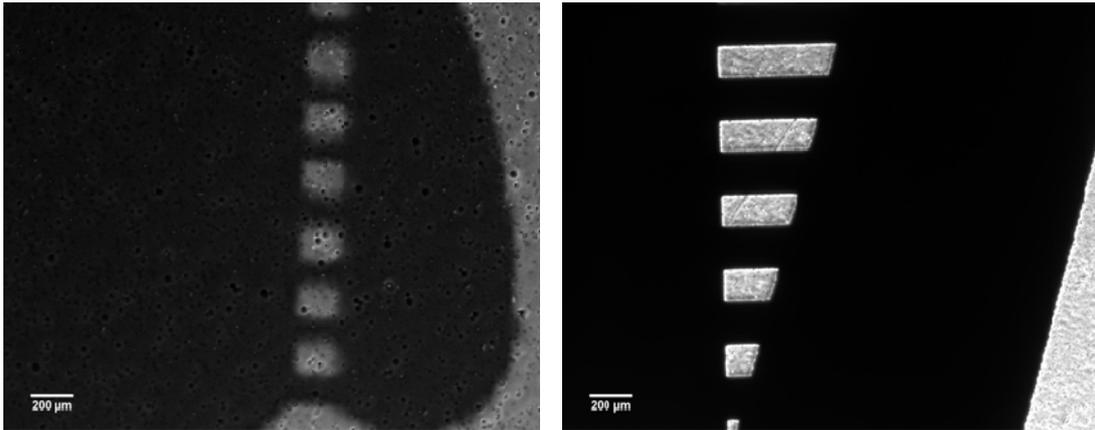


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen von Folienmasken bei gleicher Vergrößerung. A) eine mit herkömmlichen Laserdrucker (1200 dpi) auf Laserfolie gedruckte Struktur, B) eine über das Filmbelichtungsverfahren hergestellte Folienmaske, schwarze Flächen sind hier komplett undurchsichtig und es ist keine Pixelung erkennbar (>3600 dpi).

2.2.2 Von der Maske zur Mikrostruktur in PDMS

Mit Hilfe der Chrommaske beziehungsweise den Folienmasken wurden im Reinraum des IMT am KIT Siliziumwafer mit Fotolack strukturiert. Dabei wurde stets das nachfolgende Protokoll angewendet, wobei es sich um ein positiv-Fotolackverfahren (siehe Absatz 1.4.2) handelt.

Auf einen 4-Zoll Siliziumwafer mit Titanbeschichtung, welche später ein zu starkes Anhaften des PDMS verhindert, werden zwei Schichten des Fotolacks AZ9260 (Novolak basierter positiver Fotolack, AZ Electronic Materials GmbH, Wiesbaden, Deutschland) durch Aufschleudern (Spinning) aufgebracht. Novolake sind Phenolharze, welche aus Formaldehyd und Phenol polymerisiert werden, wobei das Verhältnis von Formaldehyd zu Phenol kleiner als 1:1 ist. Die erste AZ-Lackschicht hat nach Aufschleudern (1110 rpm, 40 s) und Trocknen eine Dicke von 6 µm und dient als Haftvermittler. Nach 6 min Aushärten (softbake) bei 95°C auf einer Heizplatte wird die zweite Lackschicht durch Aufschleudern (500 rpm) aufgebracht, diese ist circa 65 µm dick. Es folgt ein weiterer softbake über 4 Stunden bei 90°C im Umluftofen. Die danach resultierende Fotolackschicht hat eine Höhe von circa 65 µm. Nach der Schichtdickenmessung wird der positive Fotolack durch optische Lithographie (Dosis: 6500 mJ/cm², Intensität der UV-Lampe: 17,1 mW/cm², Belichtungszeit: 371,4 s) strukturiert. In diesem Fall entsprechen die dunklen Bereiche der Fotomaske bereits den resultierenden Strukturen und werden nicht belichtet, in den umgebenden durchscheinenden Bereichen wird die Struktur des Lackes durch die Belichtung zerstört und anschließend durch einen Entwickler (AZ400K, Verdünnung 1:4 mit destilliertem Wasser) entfernt. Für die Entwicklung wird der belackte Wafer in eine 6-Zoll Kristallierschale mit Entwickler eingelegt und etwa eineinhalb Stunden lang sanft geschüttelt, bis kein belichteter Fotolack mehr sichtbar ist. Dabei wird

drei- bis viermal der Entwickler gewechselt. Als letzter Schritt wird der Wafer mit den Fotolackstrukturen im Sprühentwickler, mit Aceton und Wasser gereinigt und getrocknet. Die so hergestellten Fotolackstrukturen (Abbildung 11) werden direkt als Master für die Strukturierung von PDMS benutzt. Da sich der AZ-Lack sehr leicht in Lösemitteln auflöst, ist der Kontakt zu solchen unbedingt zu vermeiden. Auch höhere Temperaturen führen durch die hohe Schichtdicke des Lackes schnell zu Rissen und zum Abbröckeln des Lackes vom Wafer. Aus diesem Grund wurde das PDMS stets bei Raumtemperatur ausgehärtet. Bei Beachtung der vorigen Punkte können die Fotolackmaster jeweils für mehr als 20 PDMS-Abgüsse verwendet werden.

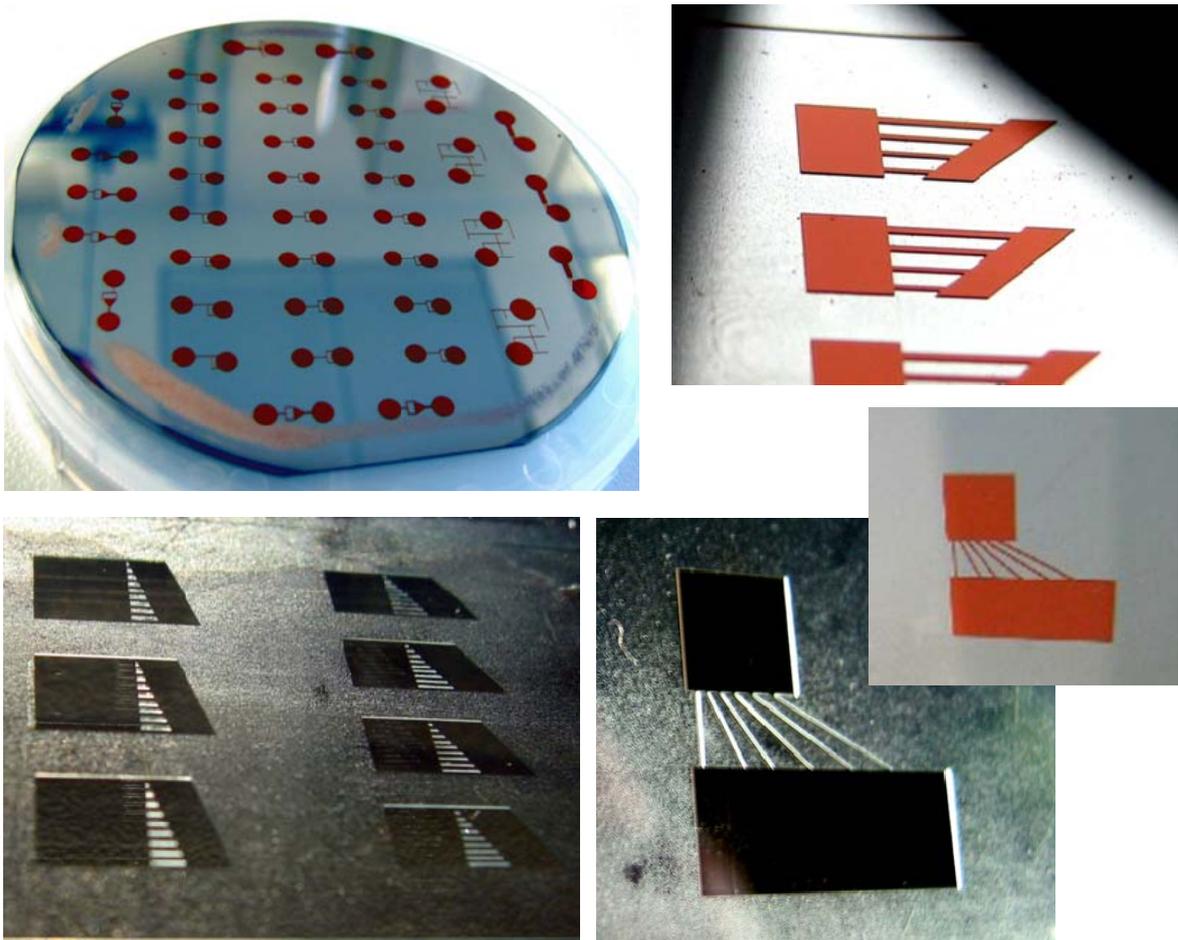


Abbildung 11: Fotografien von Fotolackmastern und PDMS-Abgüssen. A) Titanbeschichteter Siliziumwafer mit Strukturen aus AZ-Fotolack als Master zur PDMS-Chipherstellung, B) Kanalstruktur aus Fotolack, Strukturhöhe 60 μm , C) PDMS-Abguss von Kanalstrukturen, D) Fotolackstruktur und korrespondierender Abguss in PDMS, Gesamtgröße der Struktur: 1cm x 1cm.

Für die Herstellung der PDMS-Strukturen wurde das zweikomponentige Sylgard184-Kit (Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde ein Mischungsverhältnis von 9,15:1 von Elastomer zu Härter verwendet, also mit einem leichten Überschuss an Härter gearbeitet. Diese Mischung lieferte nach einer Testreihe die

optimale Elastizität zum Abziehen der PDMS-Schicht vom Wafer. Elastomer/Base und Härter werden in einer Einmal-Wägeschale mit einem Einwegrührspatel (#4893.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gemischt und für eine Stunde im Exsikkator unter Vakuum entgast. Danach wird möglichst blasenfrei ausgehend von der Wafermitte eine etwa 1 mm dicke PDMS-Schicht, dies entspricht circa 8 g angerührtem PDMS, auf die Fotolackstrukturen gegossen und für zwei Tage bei Raumtemperatur aushärten gelassen. Das PDMS läuft dabei durch seine Zähflüssigkeit und aufgrund der Titanbeschichtung des Wafers, welche den Kontakt zur SiO₂-Oberfläche verhindert, nicht vom Wafer. Dieser wird zusätzlich erhöht gelagert, so dass der Waferrand keinen Kontakt zum Untergrund (Petrischale) hat, dadurch kann ebenfalls das Herunterlaufen des PDMS und ein Ankleben des Wafers am Untergrund vermieden werden. Anschließend wird das PDMS vorsichtig vom Wafer abgezogen (Abbildung 11) und die Abgüsse bis zur Benutzung in 14,5 cm Plastikpetrischalen mit der strukturierten Seite nach oben gelagert. Ein Nachhärten des PDMS bei 60°C (4 Stunden) im Trockenschrank ist nun noch möglich, aber nicht zwingend erforderlich.

2.2.3 Chipherstellung

Zur Verwendung der PDMS-Mikrostrukturen als Migrationskammer für Chemotaxisexperimente müssen diese noch mit einem Glasträger versiegelt und anschließend mit Medium gefüllt werden. Die folgende Vorgehensweise wurde hierzu entwickelt und erwies sich als am besten praktikabel (Abbildung 12).

Ein zusammenhängender Block mehrerer Strukturen, am besten zwei bis sechs, wird aus dem PDMS-Abguss mit einem Skalpell herausgeschnitten, wobei mindestens ein Rand von circa 2 mm zur Struktur verbleiben sollte. In die Reservoirs der Strukturen werden anschließend mit Hilfe von Aderendhülsen (DIN-Größe: 2,5 mm² - blau) Löcher für die Befüllung und als Medienreservoir gestanzt. Danach wird das PDMS mit absolutem Ethanol gereinigt, im Stickstoffstrom getrocknet und wieder mit der strukturierten Seite nach oben in einer sauberen Petrischale zwischengelagert. Für die Versiegelung mit einem Objektträger werden sowohl die PDMS-Strukturen als auch die gereinigten Objektträger (Aceton abs. oder i-Propanol abs.) mit der zu versiegelnden Seite nach oben in eine Plasmakammer (TePla AG, Feldkirchen, Deutschland – jetzt: PVA TePla AG, Wettenberg, Deutschland; oder Diener electronic GmbH + Co. KG, Ebhausen, Deutschland) eingelegt und im Sauerstoffplasma oxidiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Prozessparameter für die Plasmaoxidation von PDMS zur Versiegelung bei der Chipherstellung.

Gerät	Gas und Druck	Leistung	Oxidationsdauer
TePla 100E PS	O ₂ ; 0,5 mbar	150 W	90 s
Diener Pico	O ₂ ; 0,5 mbar	200 W	60 s

Nach der Oxidation werden die aktivierten Oberflächen schnellstmöglich miteinander in Kontakt gebracht, da die entstandenen Sauerstoffradikale und -ionen augenblicklich durch Reaktion mit dem in der Luft vorhandenen Wasserdampf wieder abgesättigt werden, und so die Oberflächen bereits nach 5 min deutlich weniger aktiv sind. Bei gut aktiviertem PDMS ist ein regelrechtes „Ansaugen“ von diesem an die Glasoberfläche zu beobachten, somit können Lufteinschlüsse und damit spätere Undichtigkeiten vermieden werden. Ebenfalls direkt nach dem Oxidieren und Versiegeln des PDMS werden die so entstanden Migrationskammern durch die Reservoirlöcher mit MilliQ-Wasser befüllt. Aufgrund der Aktivierung durch das Plasma füllen sich die Kanalstrukturen über Kapillarkräfte fast immer blasenfrei.

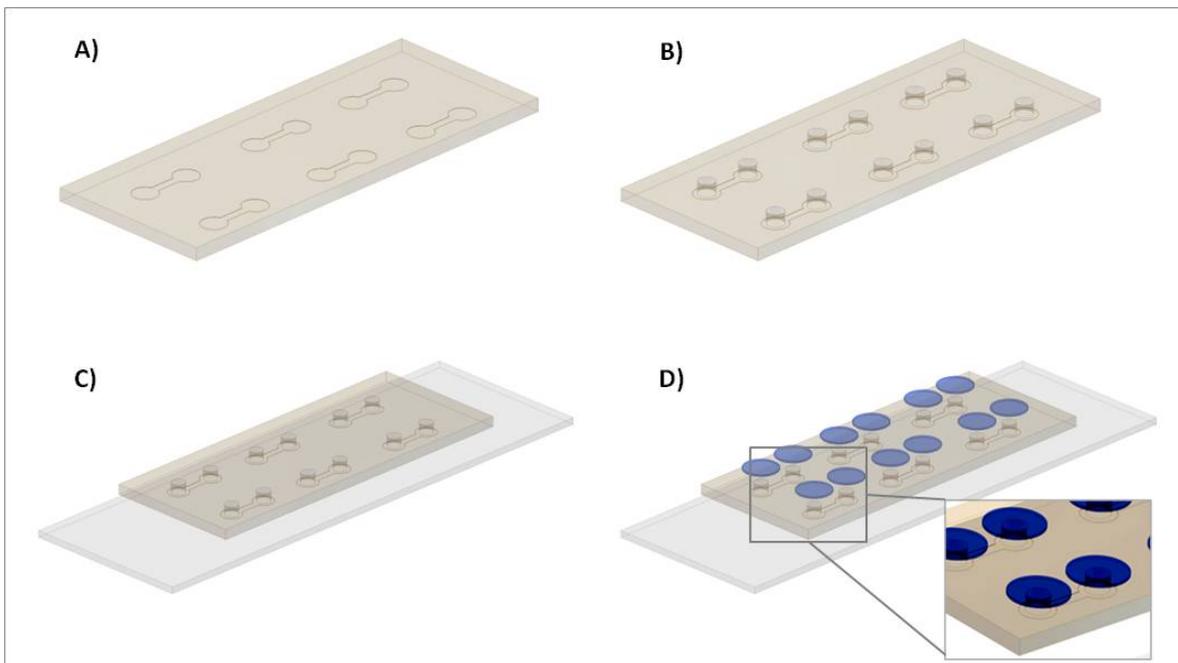


Abbildung 12: Ablauf der Chipherstellung. A) durch *soft lithography* strukturiertes PDMS, B) Ausstanzen der Reservoirlöcher, C) Plasmaversiegelung des PDMS mit einem Objektträger, D) Deckeln der Reservoirlöcher mit Deckgläschen nach dem Befüllen der Kammern; (mit Dank an C. Christophis).

Zur Anwendung der Migrationskammern wird das MilliQ-Wasser erst durch PBS-Lösung (zweimal Spülen) und schließlich Medium (zweimal Spülen) ersetzt, und die Zellen sowie erforderliche Reagenzien zugegeben. In einem letzten Schritt müssen die Reservoirlöcher durch kleine Objektträger (rund $d=5$ mm, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) gedeckelt werden, um übermäßige Verdunstung und daraus resultierende Konvektion zu vermeiden. Durch die Wasserlamelle zwischen Glasdeckel und PDMS werden die Zellen ausreichend mit Kohlenstoffdioxid versorgt, so dass Zellinkubation bis zu einer Woche in den Kammern möglich ist.

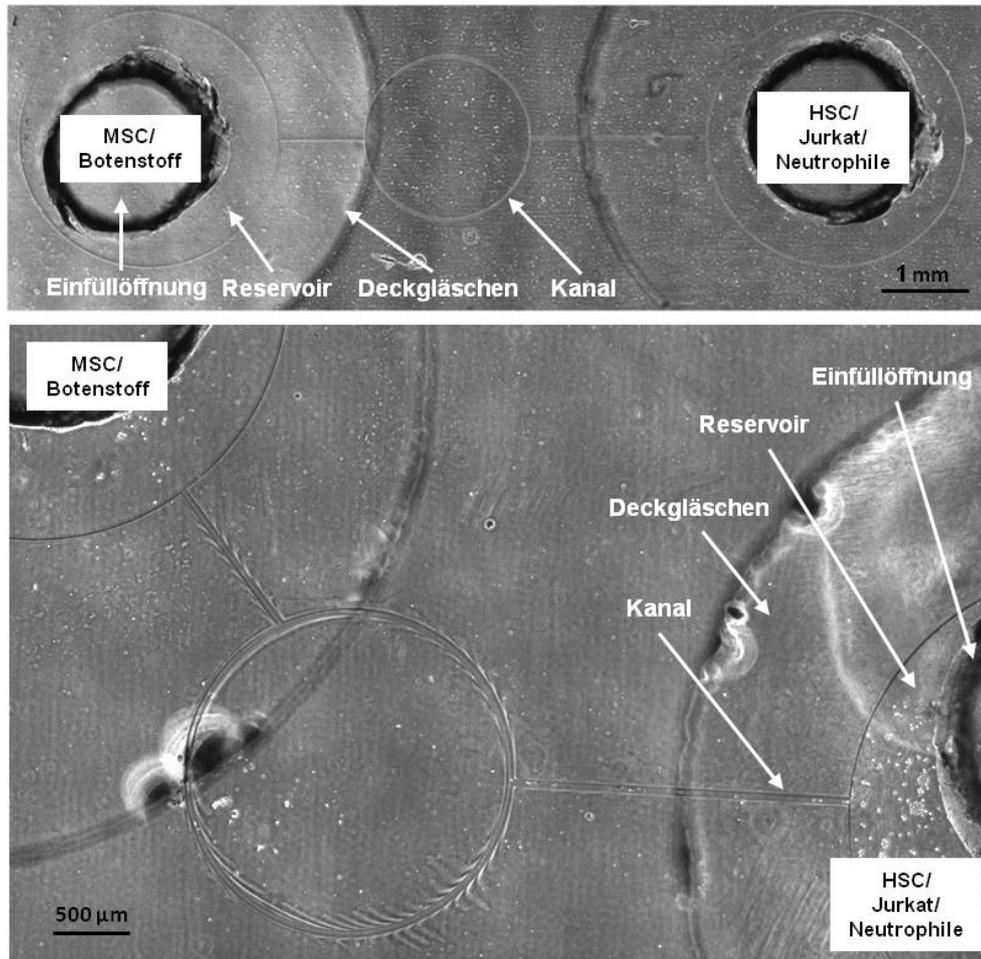


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen zweier Mikrostrukturchips mit Variation der Kanallänge und demzufolge Steilheit des Botenstoffgradienten. Oben: Struktur mit gleichlangen Kanalwegen (Kanalbreite: 30 µm, Kanallänge: 6 mm); Unten korrespondierende Struktur mit zwei verschiedenen langen Kanalwegen (kurzer Weg: 5 mm, langer Weg: 7 mm).

2.2.4 Partikel- und Farbstoffexperimente

Um die Funktionalität des entwickelten Chipsystems/der Migrationskammer zu prüfen, wurden anhand von Partikellösungen die stationären Bedingungen getestet. Zur Überprüfung der diffusiven Gradientenausbildung (vgl. Kapitel 2.2.5) wurden Farbstoffexperimente durchgeführt und diese durch eine numerische Simulation verifiziert.

Für die Kontrolle, ob und wie stark Konvektionsströmungen in den Migrationskammern vorhanden sind, wurden 4,6 µm bzw. 10 µm große Polystyrolpartikel (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) zu den Zellen in die Reservoirs zugegeben. Die Mikroartikel wurden hierfür abzentrifugiert, in Medium mit einer Konzentration von 1×10^6 /ml resuspendiert und circa 500 bis 1000 Partikel je Reservoir (entspricht 1 µl der Stammlösung) zugegeben.

Zur Überprüfung der Ausbreitung des Konzentrationsgradienten wurden zwei verschiedene Farbstoffsysteme verwendet (siehe Tabelle 3). Der zur Erhöhung des Molekulargewichtes an Dextran gebundene Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC-Dextran; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) gibt dabei die Diffusion des Chemokins SDF-1 (BioVision, Mountain View, CA, USA; oder PromoKine - PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) wieder. Der Farbstoff Brillantkresylblau (kurz: BCB; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) simuliert wiederum die Diffusion des Botenstoffes N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (kurz: fMLP; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten chemotaktischen Botenstoffe und der dazu korrespondierenden Farbstoffe.

	fMLP	BCB	SDF-1	FITC-Dextran
Hersteller/Vertrieb	Sigma	Merck	BioVision/PromoKine	Sigma
Bemerkungen	bakterielles Tripeptid	Diamino-benzooxazin-farbstoff	CXC-Chemokin Peptidkette mit 68 Aminosäuren	Polymer von Anhydroglukose mit FITC markiert, Anregung/Emission λ_{\max} : 490/520 nm
Molmasse [g/mol]	437,55	771,92 (gelöst: 386)	8000	8400
Diffusionskoeff. D [m ² /s]	$\approx 4 \times 10^{-10}$	$\approx 4 \times 10^{-10}$	$\approx 1 \times 10^{-10}$	$\approx 1 \times 10^{-10}$

Brillantkresylblau (Summenformel: $(C_{17}H_{20}N_3O)_2 \cdot ZnCl_4$) liegt dabei zunächst als Zinkchlorid-Doppelsalz vor und wurde in destilliertem Wasser gelöst ($c=5,16$ mg/ml). Das Molekulargewicht in Lösung beträgt dann 386 g/mol. Von dieser Stammlösung wurde jeweils 0,75 μ l in ein Reservoir der Mikrostruktur ($V_R \sim 10$ μ l) zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 mM im Reservoir entstand. Die Ausbreitung des Farbstoffs im Kanalsystem wurde mittels Zeitraffermikroskopie (time-lapse) beziehungsweise für die Langzeitmessung am Stereomikroskop (Stemi2000, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) mittels Kameraaufnahmen (Canon PowerShot A80) verfolgt. Mit dem Stereomikroskop konnte durch die nur geringen Vergrößerungen ein größeres Objektfeld, welches die Abbildung des gesamten Chips ermöglicht, betrachtet werden. Durch die gleichzeitige Auf- und Durchlichtbeleuchtung ist eine verbesserte Abbildung der Mikrostrukturen möglich.

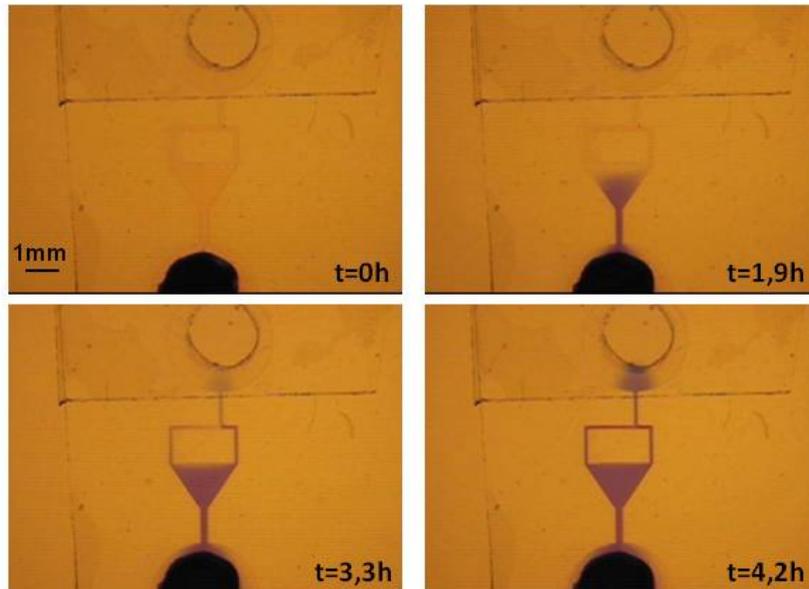


Abbildung 14: Farbstoffausbreitung von Brillantkresylblau in einer Mikrostruktur mit Sektor und zwei verschiedenen Kanalwegen.

Mit dem fluoreszenzmarkierten Dextran (FITC-Dextran) wurde eine 1%ige Lösung in MilliQ-Wasser hergestellt. Von dieser wurde jeweils $1 \mu\text{l}$ ($c \approx 0,24 \mu\text{M}$) in eines der Reservoirs zugegeben und die Ausbreitung der Diffusionsfront in der Mikrostruktur mittels Zeitraffer-Fluoreszenzmikroskopie (Filter: GFP) verfolgt. Zur Auswertung (siehe 3.2.2) wurde in der Kanalmitte für jeden Zeitpunkt ein Intensitätsprofil der Fluoreszenzintensität erstellt.

2.2.5 Simulation der Gradientenausbildung

Die diffusive Gradientenausbildung in geraden Kanälen wurde auch durch numerische Simulation mit dem Softwarepaket Femlisp von Dr. Nicolas Neuss und Dr. Maria Neuss-Radu (Universität Erlangen-Nürnberg) modelliert [136]. Hierfür wird das Kanalsystem zur Anwendung der Finite-Elemente-Methode (FEM) als 3D-Netz dargestellt (Abbildung 15), und auf Grundlage der zeitabhängigen Diffusionsgleichung (Gleichung (3)) die Farb- bzw. Botenstoffdiffusion modelliert [137].

$$\frac{\partial}{\partial t} u(x, t) = D \Delta u(x, t) \quad (3)$$

Hierbei handelt es sich um eine partielle Differentialgleichung 2. Ordnung, wobei $u(x, t)$ die Konzentration am Ort x zum Zeitpunkt t ist, D der Diffusionskoeffizient und Δ der Laplace-Operator. Nach einer Separation der Variablen x und t lässt sich die Konzentration im Kanal als Summe von Eigenfunktionen beschreiben (Gleichung (4)):

$$u(x, t) = \sum_{k=0}^{\infty} e^{-\lambda_k t} u_k(x) \quad (4)$$

λ_k mit $k = 0, 1, 2, 3, \dots$ ist dabei der Eigenwert der zugehörigen Eigenfunktion $u_k(x)$ und mit der Halbwertszeit des Konzentrationsausgleiches τ_k (Gleichung (5)) verknüpft:

$$\tau_k = \frac{\ln 2}{\lambda_k} \quad (5)$$

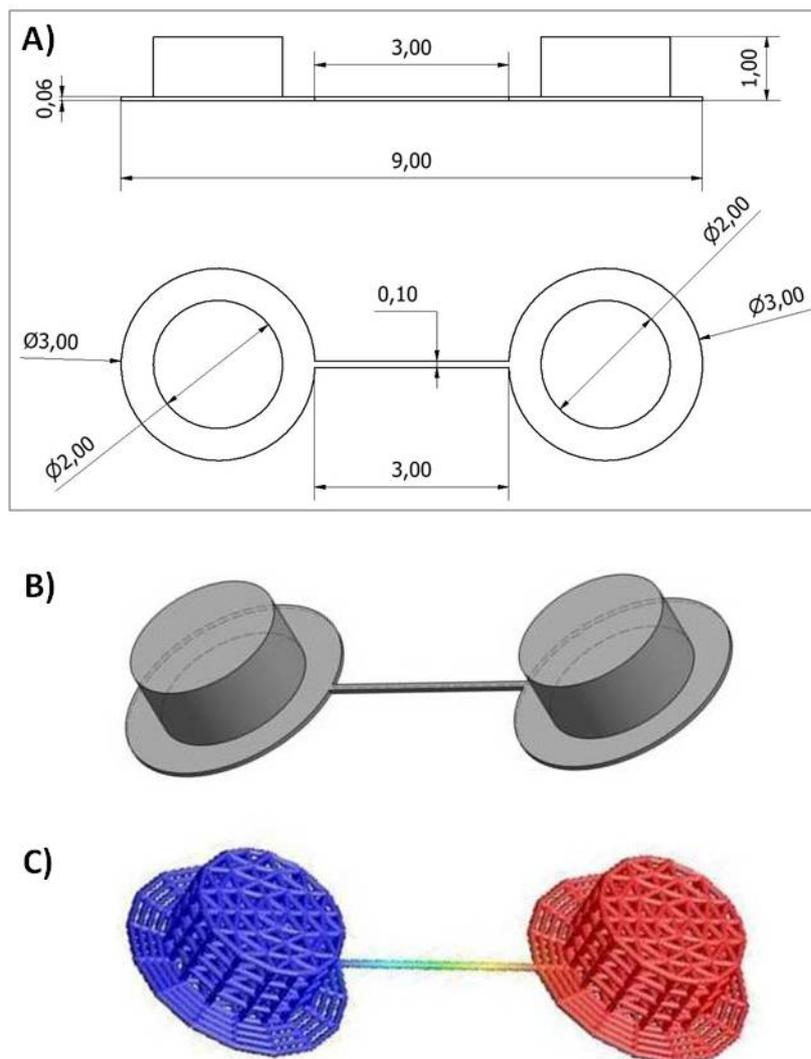


Abbildung 15: Technische Zeichnungen und die Darstellung als 3D-Netz für die numerische Simulation mit Femlisp (N. Neuss); A) Technische Zeichnung einer Migrationskammer mit geradem 3 mm-Kanal in 2D und B) in 3D (mit Dank an C. Christophis), C) trianguliertes 3D-Netz der Migrationskammer in Femlisp (FEM) mit der Eigenfunktion $u_l(x)$.

Relevant für die Modellierung des Konzentrationsprofils sind vor allem die Eigenfunktionen zu $k=0, 1, 2$ und 3 . Dabei ist die Eigenfunktion $u_0(x)$ mit $\lambda_0=0$ eine Konstante, welche dem Mittelwert über den gesamten Kanal, also der ausgeglichenen Konzentration entspricht. Die Eigenfunktion $u_1(x)$ ist in beiden Reservoiren annähernd konstant und verläuft im Kanal linear (siehe Abbildung 15C). Die Eigenfunktionen $u_2(x)$ und $u_3(x)$ spielen nur in der Anfangsphase der Gradientenausbildung eine Rolle, da die zugehörigen Eigenwerte λ_1 und λ_2 sehr groß, und somit die ihnen entsprechenden Halbwertszeiten sehr klein sind.

2.3 Chemotaxisexperimente

2.3.1 Übersicht

Der Mechanismus der Wanderung hämatopoietischer Stammzellen (HSC) zu ihrer Stammzellnische, beziehungsweise stellvertretend als Modellsystem dafür in Richtung mesenchymaler Stammzellen (MSC), ist noch immer weitestgehend ungeklärt und daher ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet. Allerdings sind HSC auch noch nicht dauerhaft kultivierbar, müssen aufwändig aus Nabelschnur- oder Peripherblut gewonnen werden, und sind nur in geringen Mengen verfügbar. Deshalb wurden zum Test der verschiedenen Chemotaxisexperimente und Auswertungsmethoden in dieser Arbeit auch alternative Blutzellen, vor allem die sehr gut migrierenden und bereits ausgiebig erforschten neutrophilen Granulozyten, mit den zugehörigen Chemoattraktanten verwendet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Zellspezies und zugehöriger Chemoattraktanten, sowie der damit durchgeführten Chemotaxisexperimente.

Wandernde Zellspezies	Chemoattraktanten	Chemotaxisexperimente
Hämatopoietische Stammzellen (HSC)	SDF-1 α (kurz: SDF-1) MSC als Botenstoffdonor	Migration im Microwell Transwell-Experimente Migration in Mikrostrukturen
Zelllinie Jurkat	SDF-1 α MSC als Botenstoffdonor	Migration im Microwell
Neutrophile Granulozyten (kurz: Neutrophile)	N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP) Interleukin 8 (IL8) Plättchenaktivierender Faktor (PAF)	Filopodienassay Transwell-Experimente Migration in Mikrostrukturen

Bei der Durchführung von Chemotaxisexperimenten mit den empfindlichen menschlichen Blutstammzellen lag der Schwerpunkt auf schnell und unkompliziert anwendbaren Systemen mit größtmöglichem Informationsgewinn. So wurde ein Konzept zunehmender Komplexität der Versuche vom einfachen Einkammer-Experiment über Transwell-Experimente bis hin zu komplexeren mikrostrukturierten Systemen befolgt (Details siehe Kapitel 3.1.2).

Einkammer-Experimente wie das Filopodienassay in Multiwellplatten für die Neutrophile oder Microwell-Experimente für die Zelllinien und HSC wurden zum Test der Reaktivität der Zellen gegenüber verschiedener Attraktanten beziehungsweise den MSC als Botenstoffdonoren angewendet. Anhand von Transwell-Experimenten können Aussagen über die Quantität der wandernden Zellen und die Dynamik der Zellwanderung getroffen werden. In den Mikrostruktur-Experimenten stehen dagegen die Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen Konzentrationsgradienten und Zellbewegungsmuster im Vordergrund.

2.3.2 Langzeitmikroskopie von Zellen

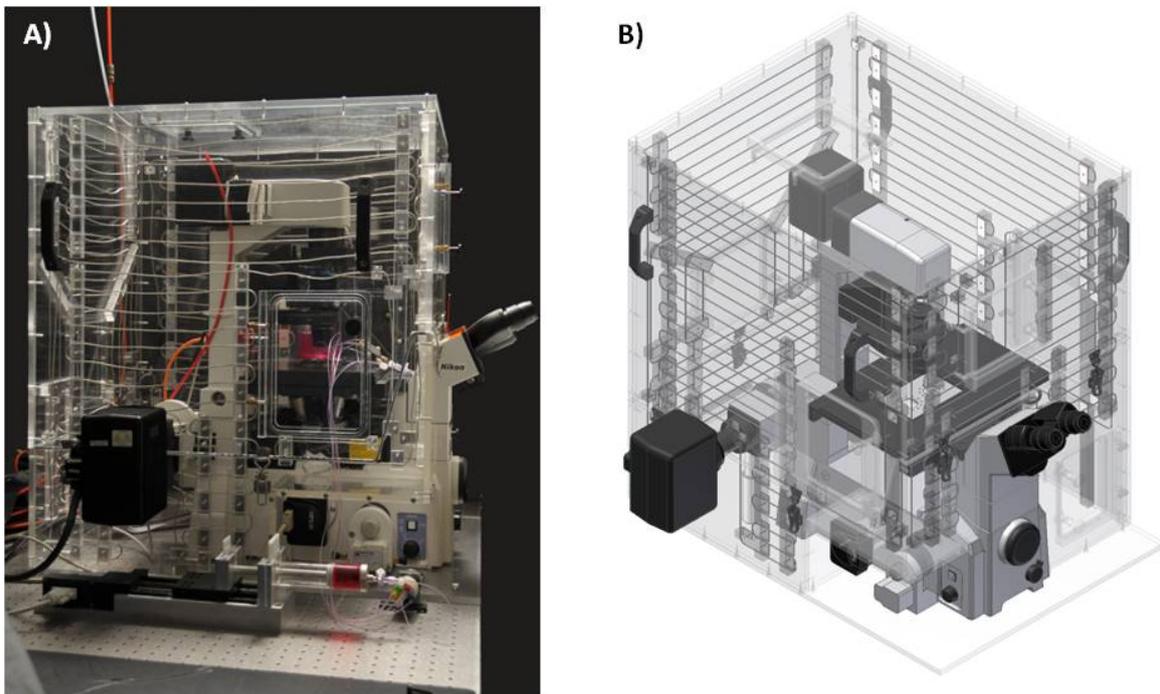


Abbildung 16: Inverses Mikroskop NIKON TE-2000 mit Inkubationskammer, A) Fotografie und B) zugehörige CAD-Zeichnung; Abbildung aus [138].

Alle Zellexperimente wurden unter inversen Mikroskopen (NIKON TE-2000 oder OLYMPUS IX70) mit speziell angefertigten Inkubationskammern (genaue Beschreibung siehe [138], Abbildung 16) durchgeführt. So wird eine befeuchtete Atmosphäre mit 5 % CO₂ und eine Temperatur von 37°C gewährleistet, was auch unter mikroskopischer

Beobachtung ein Überleben der Zellen für mindestens 3 Tage ermöglicht. Beide Mikroskope arbeiten halbautomatisch mit einem Shutter-System. Durch dieses kann die dauerhafte Belichtung der Zellen vermieden werden, und eine Austrocknung der oft sehr kleinen Volumina ($V < 25 \mu\text{l}$) in den Microwells und Mikrostrukturen wird verhindert. Bei der Durchlichtbeleuchtung wurde im Strahlengang zusätzlich zu einem Diffusor außerdem ein Grünfilter (Green Interference Filter GIF $\lambda = 546 \text{ nm}$) verwendet, um die Zellen möglichst wenig durch den UV-Lichtanteil zu irritieren. Mit dem programmierbaren Objektisch konnten mehrere Kammern parallel im Langzeitexperiment beobachtet werden.

2.3.3 Filopodienassay und Microwell-Experimente

Filopodienassay

Neutrophile Granulozyten bilden unter Einfluss von Chemoattraktanten oft sehr lange und vermehrt Filopodien aus, die sie zu erhöhter Mobilität und gleichzeitig stärkerer Adhärenz an die Oberfläche befähigen. Um zu testen, ob und auf welche Botenstoffe die Neutrophile am stärksten mit vermehrter Filopodienbildung reagieren, wurden zu den Neutrophilen in einer 24well-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) direkt die verschiedenen Botenstoffe zugegeben und die Reaktion der Zellen mikroskopisch beobachtet. Pro Kammer wurden jeweils $500 \mu\text{l}$ RPMI1640 mit circa 50 000 Zellen vorgelegt und die Attraktantlösungen ($5\text{-}15 \mu\text{l}$ je nach Konzentration) hinzupipettiert. Die folgenden Botenstoffe wurden im Filopodienassay getestet: fMLP - 100 ng/ml ($228,5 \text{ nM}$), IL8 - 89 ng/ml (10 nM) und PAF - 270 ng/ml (500 nM), Kontrolle - kein Attraktant. Nach 30 min, in denen sich die Zellen zum Teil am Boden der Platte absetzen konnten, wurden die Zellen mikroskopisch aufgenommen (Objektiv $20\times\text{Ph1}$). Diese Aufnahmen wurden anschließend unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) ausgewertet. Hierzu wurden die Bilder mittels der Threshold-Funktion in ein Binärbild umgewandelt und mittels der AnalyzeParticles analysiert. Dabei wurden zunächst alle Zellen (Zirkularität 0-1) und danach nur die runden Zellen mit einer Zirkularität von 0,7-1 automatisch gezählt (Abbildung 17). So kann durch Differenzbildung der Anteil der nicht-runden, migrationsfähigen Zellen mit Filopodien und Lamellipodien ermittelt werden.

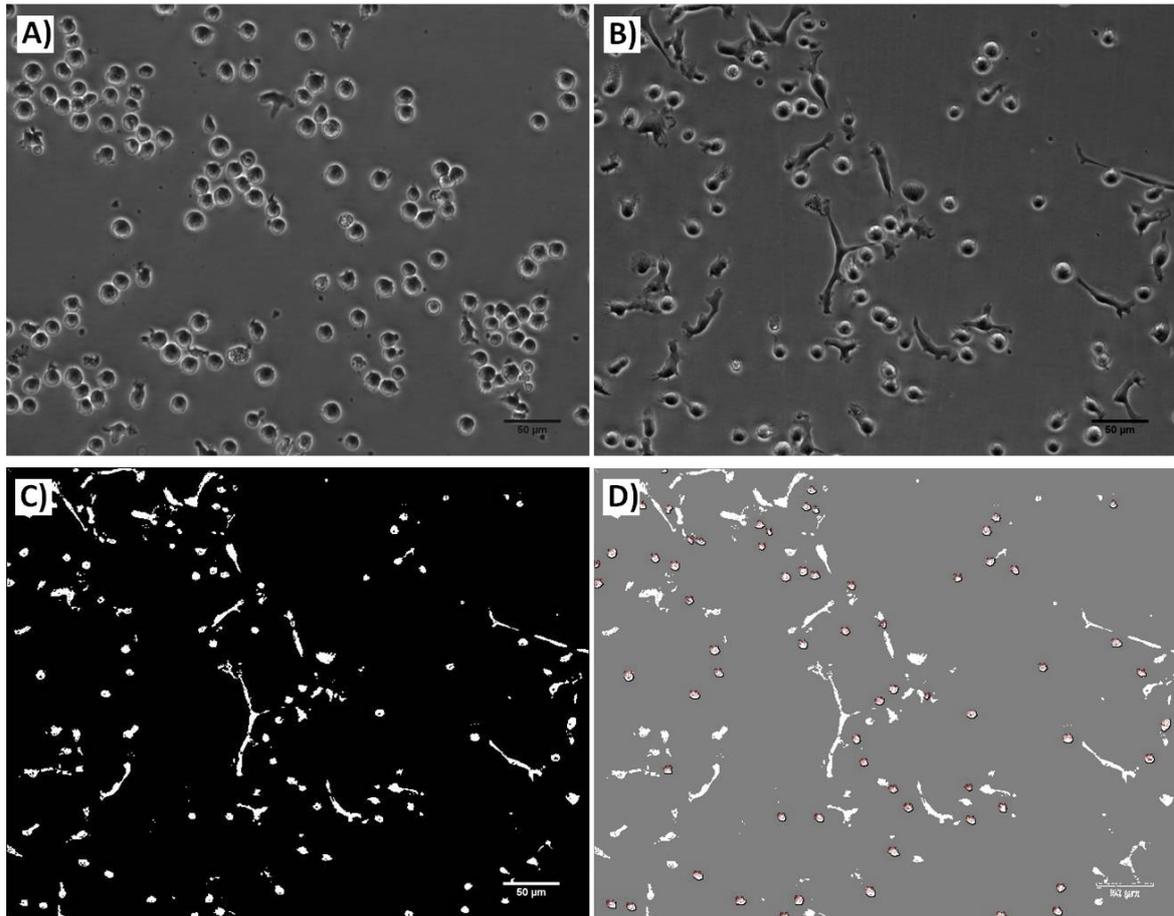


Abbildung 17: Auswertung des Filopodienassays mit ImageJ. A) Mikroskopische Aufnahme der Neutrophile der Kontrolle ohne Attraktant und B) mit 500 nM PAF (Maßstabsbalken = 50 µm), C) Binärbild von B, D) Zählmaske der runden Zellen mit einer Zirkularität von 0,7 bis 1 nach Anwendung der AnalyzeParticles-Funktion.

Microwell-Experimente

Für die Microwell-Experimente wurden MSC beziehungsweise AFT024-Zellen in einer 60well-Terasaki-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Diese Microwells haben einen Bodendurchmesser von 1,3 mm und ein Fassungsvermögen von 20 µl Medium. Die konische Form der Kammern verhindert beim Mikroskopieren durch die Krümmung der Flüssigkeitsoberfläche hervorgerufene Reflexe und Verzerrungen. Um die Zellen nur auf einer Seite der Kammer anzusiedeln, wird die Terasakiplatte während des Pipettierens und dem Anwachsen der Zellen stets schräg in einem circa 45°-Winkel gelagert. Zunächst wurden circa 500 MSC beziehungsweise AFT024-Zellen in einem 5 µl-Tropfen, dieser bedeckt dann etwa ein Drittel des Kammerbodens, vorsichtig an den unteren Rand des Microwells pipettiert. Nach dem Absinken und Adhieren der Zellen (circa 2-4 h) wird dann das gesamte Microwell mit Medium aufgefüllt. Aufgrund es sehr geringen Tropfenvolumens ist immer auf eine gut befeuchtete Umgebungsatmosphäre zu achten, dafür können auch nicht genutzte Kammern der Platte mit Wasser gefüllt werden oder mit Wasser getränkte Zellstoffröllchen an den

Rand der Terasakiplatte gelegt werden. Zum Einbringen der wandernden Zellen (HSC oder Zelllinien Jurkat, HL-60, KG-1a, Kasumi) wurde die Platte dann entgegengesetzt um 45° gekippt und ein 1 µl-Tropfen mit circa 200 Zellen an den gegenüberliegenden Kammerrand pipettiert. Bis zum vollständigen Absinken der Zellen wurde die Platte weiterhin schräg gelagert. Anschließend wurde die Terasakiplatte unter einem 5°-Steigungswinkel (bzw. Neigung des Mikroskopes um 5°) in Richtung der adhärenen MSC/AFT024-Zellen unter dem Mikroskop platziert, und die Zellwanderung der HSC/Zelllinien mittels Zeitrafferaufnahmen beobachtet (vgl. [101]). Für die Auswertung der genauen Zellpositionen und -bewegungen wurde das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ verwendet.

2.3.4 Transwell-Experimente

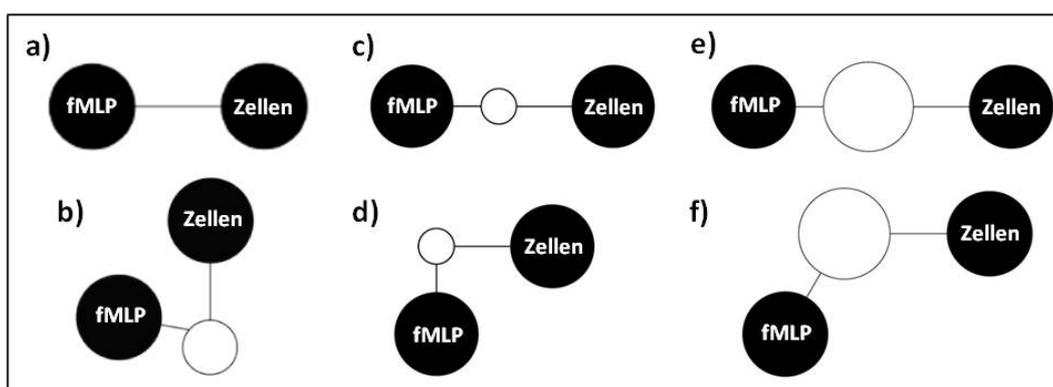
Alle Transwell-Experimente wurden in 24well-Platten (Corning Costar #3524, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) mit Zellkultureinsätzen mit 3 µm Porendurchmesser (Corning Transwell® #3415, Corning Incorporated, Corning, NY, USA und BD Falcon Cell culture inserts #353096, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. In der unteren Kammer wurde das Kulturmedium (HSC: LTBMCM, Neutrophile: RPMI1640) mit dem Botenstoff versetzt und in die obere Kammer die Zelllösung gegeben (genaue Angaben siehe Tabelle 5). Nach den in den Diagrammen angegebenen Zeiten wurden die Einsätze entfernt, die Zellen für 10 min absetzen gelassen, und anschließend mikroskopische Aufnahmen des unteren Kammerbodens angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurde die Anzahl der durch die Membran gewanderten Zellen durch Auszählung (Software: ImageJ, Point Picker) ermittelt.

Tabelle 5: Füllmengen und verwendete Konzentrationen der Transwell-Experimente

	untere Kammer	obere Kammer
Corning Transwell® #3415	Volumen: 500 µl	Volumen: 100 µl
BD Falcon™ #353096	Volumen: 700 µl	Volumen: 200 µl
Zellzahl Neutrophile		100 000
Zellzahl HSC		50 000
Botenstoffkonzentrationen		
Kontrolle	nur Medium	
SDF-1(PromoKine)	10 nM (80 ng/ml) 62,5 nM (500 ng/ml)	
fMLP (Sigma)	228,5 nM (100 ng/ml)	
PAF (Sigma)	500 nM (270 ng/ml)	
IL-8 (Sigma)	10 nM (89 ng/ml)	

2.3.5 Zellmigration in Mikrostrukturen

Die Migrationskammern wurden wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben angefertigt. Für die *Experimente mit neutrophilen Granulozyten* (verwendete Mikrostrukturen siehe Abbildung 18) wurde das MilliQ-Wasser in den Kammern nach zweimaligen Spülen mit PBS gegen RPMI1640 Medium (zweimal Spülen) ersetzt. Der Flüssigkeitstropfen sollte dabei nur leicht über den Rand des Einfüllloches hinausragen. Danach wurden in eines der beiden Reservoirs 1000-5000 Neutrophile (entspricht $\approx 1-5 \mu\text{l}$ Zelllösung) pipettiert und das Zellreservoir mit einem 5 mm-Deckgläschen gedeckelt (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland). In das andere Reservoir wurde 1-2 μl fMLP-Lösung hinzu pipettiert, so dass sich Endkonzentrationen von 250 ng/ml, 500 ng/ml beziehungsweise 1 $\mu\text{g/ml}$ für das Reservoirvolumen von 10 μl ergaben. Schließlich wurde auch das Attraktantreservoir mit einem 5 mm-Deckgläschen abgedeckt. Pro Objektträger, auf dem die PDMS-Strukturen durch Plasmaoxidation angebunden sind, können so gleichzeitig bis zu acht Migrationskammern befüllt werden. Generell ist darauf zu achten, dass die in die Reservoirs zupipettierten Volumina möglichst klein sind, am besten maximal 2 μl bei 10 μl Reservoirvolumen, um nur geringe Konvektionsströmungen durch das Einfüllen zu verursachen. Deshalb sollte auch vor dem Abdecken die endgültige Füllhöhe beider Reservoirs in etwa identisch sein. Die Deckgläschen werden schräg mit einer Pinzette aufgelegt, um den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden, daher ist es auch erforderlich, dass das Medium leicht über den Reservoirrand hinausragt. Die sich so unter dem Deckgläschen ausbildende Wasserlamelle sorgt während des Experimentes für eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Kohlenstoffdioxid aus der Umgebungsatmosphäre.



	Kanalbreite	Kurzer Kanalweg	Langer Kanalweg
a	30 μm	3 mm	-
b	30 μm	4,1 mm	7,9 mm
c	40 μm	5 mm	-
d	40 μm	4 mm	6 mm
e	20 μm	8 mm	-
f	20 μm	6,4 mm	9,6 mm

Abbildung 18: Für die Migrationsexperimente mit neutrophilen Granulozyten verwendete Mikrostrukturen; Kanalmaße siehe Tabelle.

Für die *Experimente mit hämatopoietischen Stammzellen* wurde das MilliQ-Wasser in den Migrationskammern zunächst gegen PBS (zweimal Spülen) und anschließend gegen Medium M1 (siehe Tabelle 6, ebenfalls zweimal Spülen) ersetzt. In einem der beiden Reservoirs wurden danach mesenchymale Stammzellen (ca. 5000 Zellen aus M1) für ein bis 5 Tage vorinkubiert. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass die Migrationskammern aufgrund der noch offenen Reservoirs und dem geringen Füllvolumen nicht austrocknen. Das Medium wurde täglich gewechselt, um eine ausreichende Versorgung der Zellen zu gewährleisten. Direkt vor der Zugabe der HSC wurde das Medium erneut gewechselt, was gleichzeitig den Start des Migrationsexperimentes und den Beginn der Ausbildung des Botenstoffgradienten markiert (Abbildung 19). Nach dem Medienwechsel wurde zuerst das MSC-Reservoir gedeckelt, danach etwa 1000 HSC (entspricht 1 μl Lösung mit 1000 Zellen/ μl) in das andere Reservoir pipettiert und dieses ebenfalls abgedeckt.

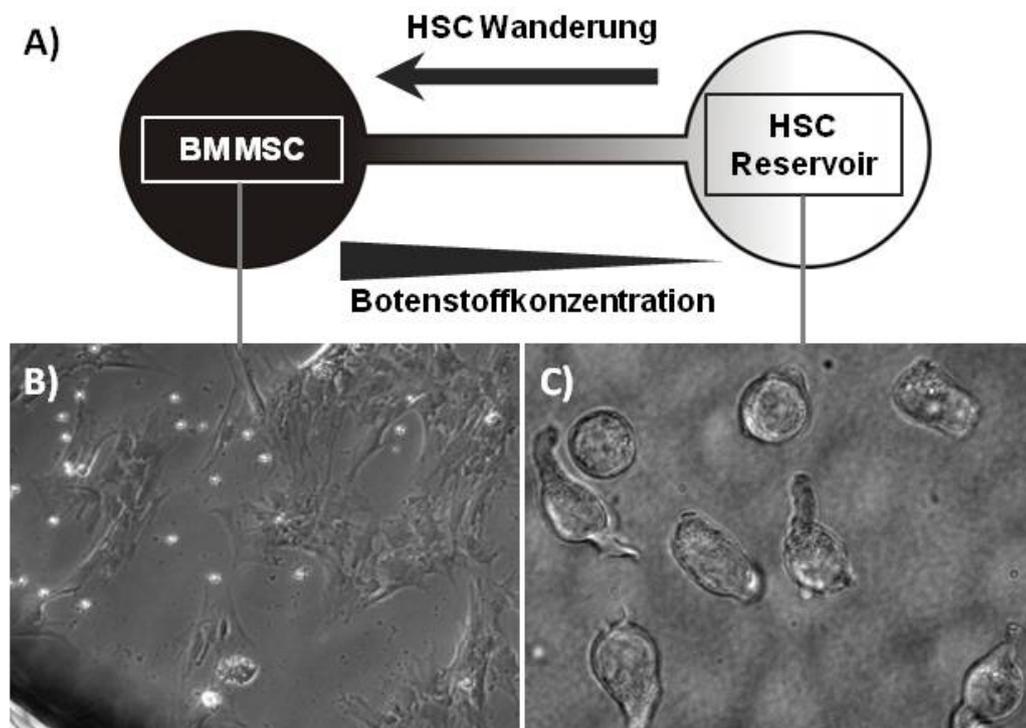


Abbildung 19: A) Schematische Zeichnung einer Mikrostruktur, typische Originalmaße: 9 mm Länge, 3 mm Breite, 2-5 mm Kanallänge, 20-100 μm Kanalbreite. B) Die Knochenmarkszellen (BM MSC) werden vor dem Experiment in einem Reservoir angesiedelt. Ein Medienwechsel markiert den Startzeitpunkt des Experimentes, damit beginnt die erneute Ausbildung eines Botenstoffgradienten in der Mikrostruktur, und die Stammzellen (HSC) werden in das zweite Reservoir zugegeben. C) Auf dem Glasboden wandernde HSC mit deutlich erkennbaren Filopodien (Aufnahme R. Saffrich).

Beobachtung und Aufnahme der Zellwanderung

Für die Beobachtung der Zellwanderung unter dem Mikroskop wurden die Objektträger in 4well-Multiwellplatten mit Deckel (quadriPerm, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gelegt, wobei eine der vier Kammern mit Wasser gefüllt wurde, um eine feuchtere Umgebungsatmosphäre zu schaffen. Die 15 bis 24 Stunden dauernden Migrationsexperimente wurden mittels Zeitrafferaufnahmen (time-lapse, 6 bis 20 Bilder/Stunde) verfolgt. Pro Experiment konnten dabei über die automatische Objektischsteuerung des Mikroskops (Software: NIKON Advanced) bis zu 60 verschiedene Positionen aufgenommen werden. In jeder Migrationskammer wurden die jeweils interessanten Kanalabschnitte, das Zellreservoir, der Kanaleingang, die Verzweigungspunkte des Kanals und der Kanalausgang, beobachtet. Die HSC mit einer Zellgröße von etwa 5 μm wurden mit dem 6 \times PhL bzw. 10 \times Ph1 Objektiv beobachtet, die Neutrophile mit 10-20 μm Zellgröße mit dem 4 \times PhL bzw. 6 \times PhL Objektiven. Durch das automatische Shutterssystem wurden die Belichtungszeiten kurz gehalten, und damit die Austrocknung der Mikrostrukturen durch zu viel Hitzeentwicklung vermieden.

Auswertung der Zellmigration

Die Bewegung der Zellen in den Mikrostrukturen wurde anhand der Zeitrafferaufnahmen mit der speziell auf Mikroskopie zugeschnittenen frei verfügbaren Bildbearbeitungssoftware ImageJ (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet. Hierfür wurden über die ManualTracking-Funktion des Programmes die exakte Position und Bewegungspfade (Abbildung 20) einzelner Zellen ermittelt. Aus diesen Positionsdaten konnten dann weitere Parameter, wie die Wanderungsgeschwindigkeit oder der Abstand der Zelle zum Kanaleingang berechnet werden (Software: Microsoft Office EXCEL).

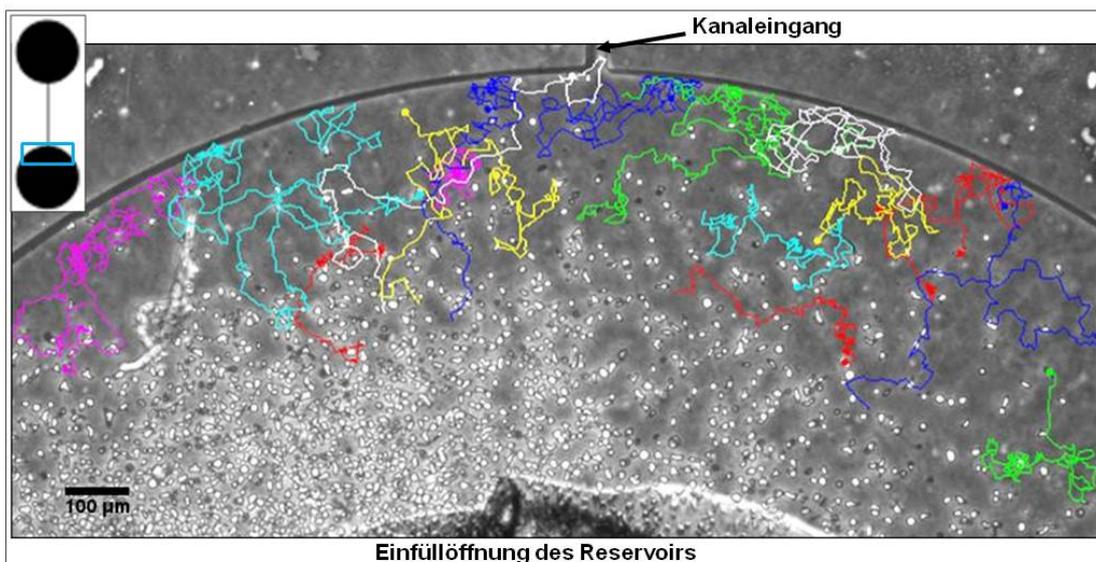


Abbildung 20: Trackingpfade einzelner Neutrophilzellen erstellt mit der ManualTracking-Funktion des Programmes ImageJ. Gezeigt ist ein Kontrollexperiment ohne Botenstoff in der oben links gezeigten Mikrostruktur mit einer Kanalbreite von 30 μm . Die Neutrophile bewegen sich ungerichtet im Reservoir.

2.4 ELISA und Immunofluoreszenzfärbungen

Anhand der durchgeführten ELISA-Experimente (enzyme-linked immunosorbant assay) wurde die SDF-1-Ausschüttung durch mesenchymale Stromazellen (MSC) untersucht. Um möglichst umfangreiche und genaue Daten zur Berechnung der SDF-1-Diffusionsfront in den Mikrostrukturen zu erhalten, wurden Messungen in Abhängigkeit vom Kulturmedium, von der Zahl inkubierter Zellen und von der Inkubationsdauer durchgeführt. Desweiteren wurde der Einfluss des CXCR4 Antagonisten AMD3100 auf die SDF-1-Produktion untersucht. Hierfür wurden auch intrazelluläre SDF-1-Immunofluoreszenzfärbungen in MSC angewendet.

2.4.1 Zellkultur der MSC

Die primären mesenchymalen Stromazellen (human) wurden durch Isolation aus Knochenmark [63, 139] in der Arbeitsgruppe von Professor Ho (Innere Medizin V, Universitätsklinikum Heidelberg) gewonnen und für die ELISA-Experimente bereitgestellt. Als Hauptkulturmedium wurde dabei das kommerziell erhältliche Medium M1 genutzt (siehe Tabelle 6). Die MSC wurden in nicht weiter behandelten Zellkulturflaschen mit einer Dichte von etwa 1×10^5 Zellen/cm² ausgesät, die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen zwei- bis dreimal mit PBS gespült, mit 0,25 % Trypsin/1mM EDTA abgelöst (etwa 10 min) und abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min). Für die ELISA-Experimente wurden MSC der Passagen 2 bis 5 verwendet.

Für die *Medientest-Experimente* wurden jeweils 50 000 MSC pro Kammer in einer 24well-Platte ausgesät und in den verschiedenen Kulturmedien (siehe Tabelle 6) für 24 h beziehungsweise 72 h inkubiert (400 µl Medium), anschließend das Medium abgenommen und 100 µl für den ELISA-Test verwendet. Das MSC-Lysat wurde mittels eines Lysepuffers (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 5mM EDTA, 1 % Triton-X100, Protease Inhibitor (komplett, Roche 25×) gewonnen. Dafür wurden die nach Abnahme des Medienüberstandes in der Multiwellplatte verblieben MSC zweimal mit PBS gewaschen, pro Kammer 200 µl des Lysepuffers zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden noch anhaftende Zellen mit einem Zellschaber gelöst und das gesamte Lysat für 10 min bei 13 000 rpm (10 000 × g) zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder sofort für das ELISA-Experiment genutzt oder bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

Tabelle 6: Übersicht der in ELISA-Experimenten verwendeten MSC-Medien

Kurzbezeichnung	Medium	Anmerkungen zur Zusammensetzung
M1	MSC GM (PT-3001, Lonza, Walkersville, MD, USA)	Basis: MSC BM enthält 10 % FCS
M2	selbst angemischtes Medium nach Reyes [140]	Basis: DMEM + MCDB201 (#6770, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) + 2 % FCS + 2 % L-Glutamin + 1 % Pen/Strep + Zusätze
hPL	selbst angemischtes Medium nach Kocaoemer [141], entspricht GMP-Bedingungen, serumfrei	Basis: DMEM + 2 % humanes Plättchenlysat (START-MSC) + 2 % L-Glutamin + 1 % Pen/Strep
LT BMC	Long-Term Bone Marrow Culture selbst angemischt, nach Dexter [142] geeignet zur MSC/HSC Cokultur	Basis: IMDM + 12,5 % FCS + 12,5 % Pferdeserum + 1 % L-Glutamin (2 mM) + 1% Pen/Strep + 0,05% Hydrokortison 100

Für die *Zellkonzentrationsreihe* wurden jeweils 1000, 5000, 10 000, 20 000, 50 000 oder 100 000 Zellen pro Kammer in einer 24well-Platte ausgesät und in 400 µl von Medium M1 kultiviert. Nach einem Tag zum Anwachsen der Zellen wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 72 h für das ELISA-Experiment abgenommen (100 µl). Die Messwerte für 12 500 Zellen und 25 000 Zellen ergaben sich aus einer 1:4 Verdünnung des Überstandes der 50 000 beziehungsweise 100 000 Zellen.

Für die *Bestimmung der Zeitabhängigkeit* der SDF-1-Konzentration wurden jeweils 50 000 MSC pro Kammer in einer 24well-Platte ausgesät und in 400 µl von Medium M1 für einen Tag zum Anwachsen vorinkubiert. Danach wurde das Medium in allen Kammern gewechselt und invers zur beabsichtigten Zeitspanne in der jeweiligen Kammer erneut gewechselt (siehe Abbildung 21). Diese Vorgehensweise ist notwendig, um die Zellzahl in allen Kammern in etwa konstant zu halten. So kommt es während der Kulturdauer zwar zu Zellteilungen, mit dem gemeinsamen Ernten des Mediums tragen am Ende aber zum 2 h-Wert genauso 50 000+X Zellen bei, wie zum 72 h-Wert. Alle Zellen werden über die gleiche Gesamtkulturdauer von 4 Tagen in der 24well-Platte inkubiert, lediglich der Zeitpunkt des Mediumwechsels variiert ja nach Messpunkt. So wird das Medium für den

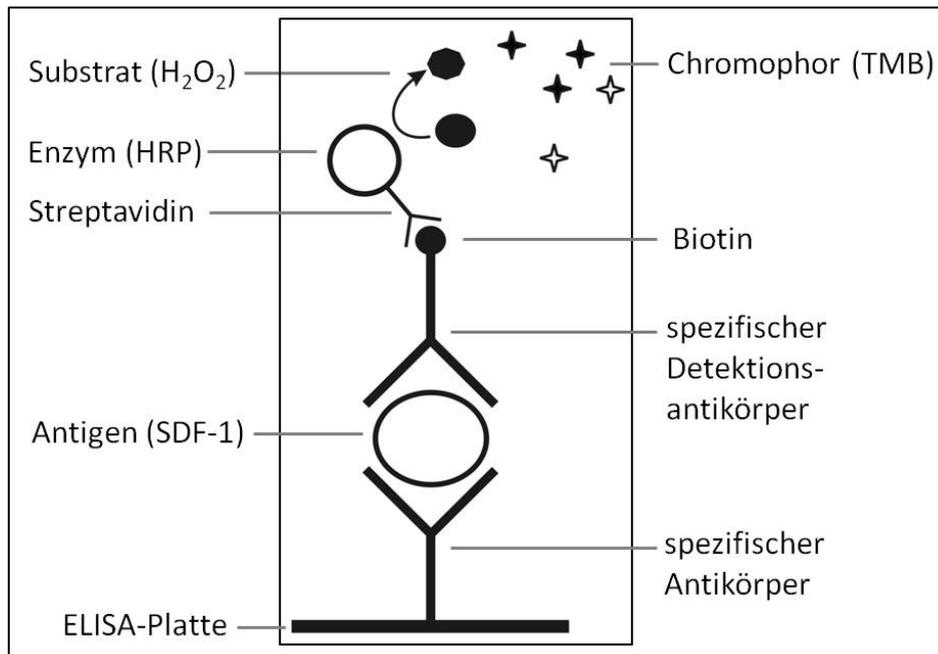


Abbildung 22: Schematische Zeichnung des Sandwich-ELISA-Experimentes. Das zu detektierende Antigen SDF-1 ist wie in einem Sandwich zwischen den spezifischen Antikörpern (*Coating*- und *Detection*-Antikörper) gepackt und wird über eine Farbreaktion quantifiziert.

In Kürze wurde folgender Ablauf des ELISA-Tests durchgeführt (vgl. Abbildung 22): Die Inkubation der Standard- und Probelösungen ($100\ \mu\text{l}/\text{well}$) auf der ELISA-Platte erfolgte für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur ($\approx 22^\circ\text{C}$) unter leichtem Schütteln. Während dieser Inkubationsphase bindet das SDF-1 an den zugehörigen auf der Platte fixierten Antikörper, so dass im Anschluss durch gründliches Waschen ($4\times$) mit einer Pufferlösung alle ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt werden können. Danach wurde der biotinylierte Detektionsantikörper ($100\ \mu\text{l}/\text{well}$) zugegeben und erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneutem gründlichen Waschen mit Pufferlösung ($4\times$) wurde eine Streptavidinlösung ($100\ \mu\text{l}/\text{well}$), welche bereits das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) enthielt, in die ELISA-Platte pipettiert, 45 min inkubiert, die Lösung verworfen und nochmals mit Pufferlösung gewaschen ($4\times$). Letztlich wurden pro well $100\ \mu\text{l}$ einer Farblösung mit Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid in die Platte pipettiert. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit der Meerrettichperoxidase, wodurch das TMB oxidiert wird und sich zunächst von farblos zu blau, nach Zugabe des Stopp-Reagenzes ($50\ \mu\text{l}/\text{well}$, enthält Schwefelsäure) gelb verfärbt. Wichtig sind die sorgfältigen Waschschrte vor der Zugabe des jeweils nächsten Reagenz um Nebenreaktionen, und damit einen zu hohen Hintergrundwert zu vermeiden. Die Intensität der letztlich gelben Färbung wurde mit einem Plattenlesegerät (Milenia Analyzer, Milenia Biotec GmbH, Gießen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von $450\ \text{nm}$ ausgelesen (Kalibrierung mit leerer 96well-Platte). Die so ermittelte optische Dichte, welche der Extinktion $E_{450\text{nm}}$ der Farbstofflösung entspricht, lässt sich über die Standardkurve mit den SDF-1-Konzentrationswerten korrelieren.

2.4.3 Auswertung der ELISA-Experimente

Für die Auswertung der ELISA-Daten ist die Erstellung der Standardkurve für jedes einzelne ELISA-Kit von zentraler Bedeutung. In dieser Arbeit wurde zum Erstellen der Standardkurve eine Methode nach Findlay [143, 144] angewendet. Es handelt sich hierbei um eine 4-Parameter-Logistik-Funktion (4PL, Gleichung (6)) welche an die Messdaten der Standardkurve, d.h. die Optische Dichte in Abhängigkeit von den vorgegebenen Standardkonzentrationen, gefittet (Programme Origin und SigmaPlot) wird.

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B\right]} \quad (6)$$

Wobei die Parameter folgender Bedeutung entsprechen: Y ist die gemessene optische Dichte (OD), X der zugehörige Konzentrationswert, A optische Dichte bei der Konzentration null, D optische Dichte bei unendlicher Konzentration, C Konzentration c bei halber optischer Dichte zwischen A und D (dieser Wert C entspricht etwa dem Wendepunkt der Kurve), und B ist ein Anstiegsparameter, der die Steilheit der Kurve beeinflusst.

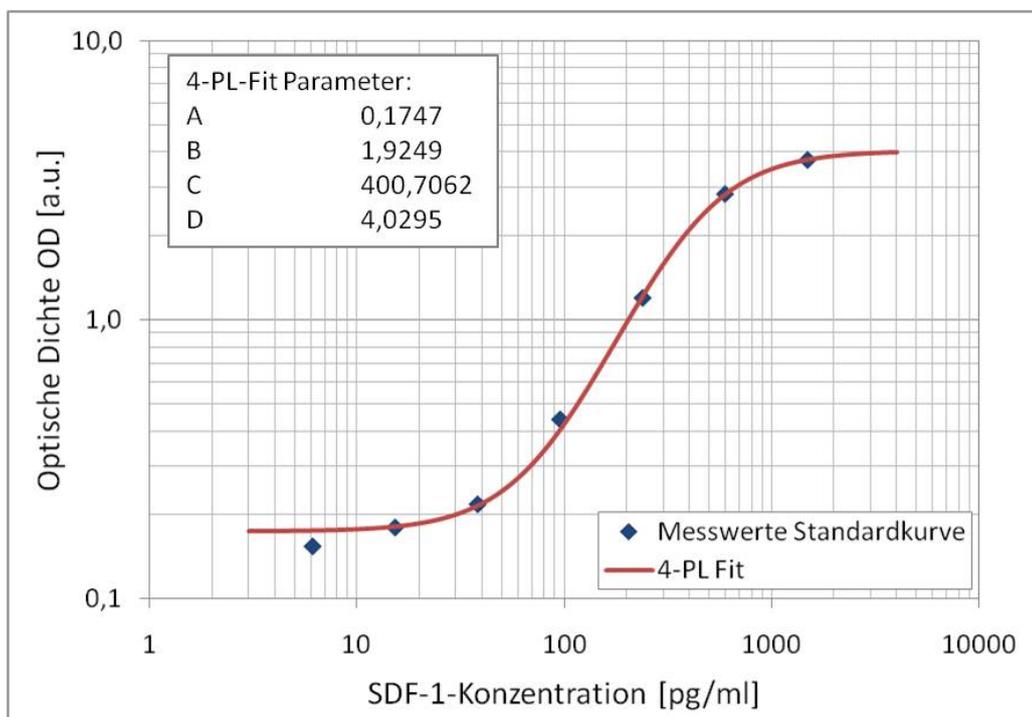


Abbildung 23: Typische ELISA-Standardkurve mit 4-Parameter-Logistik-Fit, gemessen mit SDF-1-ELISA-Kit Nr. 5. Hier kann also jeder gemessenen optischen Dichte/Extinktion zwischen 0,175 und 4,029 eine SDF-1 Konzentration zugeordnet werden.

Durch Umstellen der Gleichung (6) nach X kann nach Ermittlung der Parameter A, B, C und D jedem Messwert optischer Dichte innerhalb des Kalibrationsbereiches ein Konzentrationswert zugeordnet werden. Der mögliche Messbereich entspricht dabei den Werten zwischen dem Minimum A und Maximum D der Standardkurve, optimaler Weise liegen die Messwerte aber im linearen Bereich der Standardkurve. Abbildung 23 zeigt eine typische SDF-1-ELISA-Standardkurve mit 4PL-Fit, die im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde.

2.4.4 Immunofluoreszenzfärbungen

Für die intrazellulären SDF-1-Immunofluoreszenzfärbungen wurden die MSC in einer 24well-Multiwellplatte auf runden 1 cm-Deckgläschen kultiviert (Medium M1 oder hPL). Bei einer Zelldichte von circa 60 % Bodenbedeckung wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, für 10-15 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden die MSC für die Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100 für 5 min bei Raumtemperatur und anschließend zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen noch mit 2 % BSA in PBS für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Färbung der Zellen auf den Deckgläschen durch erstens Inkubation mit einem Anti-SDF-1 α Antikörper (Verdünnung 1:100, #MAB350, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) für 60 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer, danach dreimal für 5 min Waschen mit PBS, und zweitens Inkubation mit einem Alexa-Fluor 488 gekoppelten Anti-Maus IgG Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:200, #A21200, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) für 60 min in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur, und nochmals dreimal für 5 min Waschen mit PBS. Die Färbung der Zellkerne erfolgte im Anschluss an die SDF-1-Färbung mit 100 nM DAPI (Hoechst #33342) für 5 min bei Raumtemperatur und wiederum dreimal für 5 min Waschen mit PBS. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit den gefärbten MSC auf einem sauberen Objektträger mit einem Tropfen Fluoromount-G (Southern Biotech Association, Birmingham, AL, USA) fixiert und vor dem Mikroskopieren für 12-24 Stunden antrocknen gelassen.

Für die Untersuchung des *Einflusses von AMD3100* auf den intrazellulären SDF-1-Gehalt wurde das Zellkulturmedium einmalig mit 500 ng/ml AMD3100 versetzt und die MSC nach 1,2,4,6 und 12 h nach obigem Protokoll fixiert und anschließend angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem inversen Olympus IX70 Mikroskop (Filter: GFP und DAPI) mit jeweils gleichen Belichtungseinstellungen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten wurde anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Mean Gray Value der gefärbten MSC abzüglich des Hintergrundes) durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Ziele und Konzept dieser Arbeit

3.1.1 Ziel dieser Arbeit

In vitro Experimente zur Untersuchung der Chemotaxis humaner hämatopoietischer Stammzellen (HSC, definiert durch CD34+) in Bezug auf einen durch mesenchymale Stromazellen (MSC) vorgegebenen SDF-1 Gradienten [8, 37] wurden bisher als standardisierte Chemotaxisexperimente durchgeführt. Eine HSC-MSC-Kokultur ermöglicht beispielsweise die Untersuchung der Anhaftung an die Stammzellnische, jedoch kann keine quantitative Auswertung über die HSC-Wanderung getroffen werden. Außerdem wird bei Experimenten in nur einer Kammer die Ausbildung des chemischen Gradienten stark durch Konvektion beeinflusst. Transwell-Experimente [145] mit zwei getrennten Kammern ermöglichen wiederum nicht die Auswertung von dynamischen Parametern, wie Wanderungsgeschwindigkeit und den zeitlichen Ablauf der HSC-Antwort auf den Gradienten. Durch Anwendung von Videomikroskopie konnte bereits gezeigt werden, dass HSC im Microwell-Experiment eine direkte Migration zu Stromazellen zeigen und sich an diese mittels ihres Uropods, einem Pseudopodium am hinteren Zellende, anhaften [59, 101, 146]. Für die Untersuchung der dynamischen Parameter der Zellmigration können neue mikrofluidische Systeme in Kombination mit Videomikroskopie angewendet werden. Solche mikrofluidischen Ansätze wurden vor allem bereits für Chemotaxisexperimente mit Neutrophilen [120] oder T-Zellen [82] verwendet, doch auch in der medizinischen Stammzellforschung beginnt sich die Anwendung der Mikrofluidik durchzusetzen [114, 115].

In dieser Arbeit werden die Mechanismen der chemotaktischen Wanderung von hämatopoietischen humanen Stamm- bzw. Progenitorzellen (HSC) zu mesenchymalen Stromazellen (MSC) als Nischenmodell (Kapitel 1.2.1) anhand von verschiedenen, zunehmend komplexen Migrationsmessungen (Kapitel 3.1.2) untersucht. Dabei werden einzelne Faktoren der Stammzellantwort, d.h. die Beweglichkeit und die Sensitivität der HSC im chemischen Gradienten (SDF-1), isoliert betrachtet und quantifiziert. Für ein grundlegendes Verständnis der Stammzellchemotaxis ist die Beantwortung der folgenden Fragestellungen von zentraler Bedeutung (Abbildung 24):

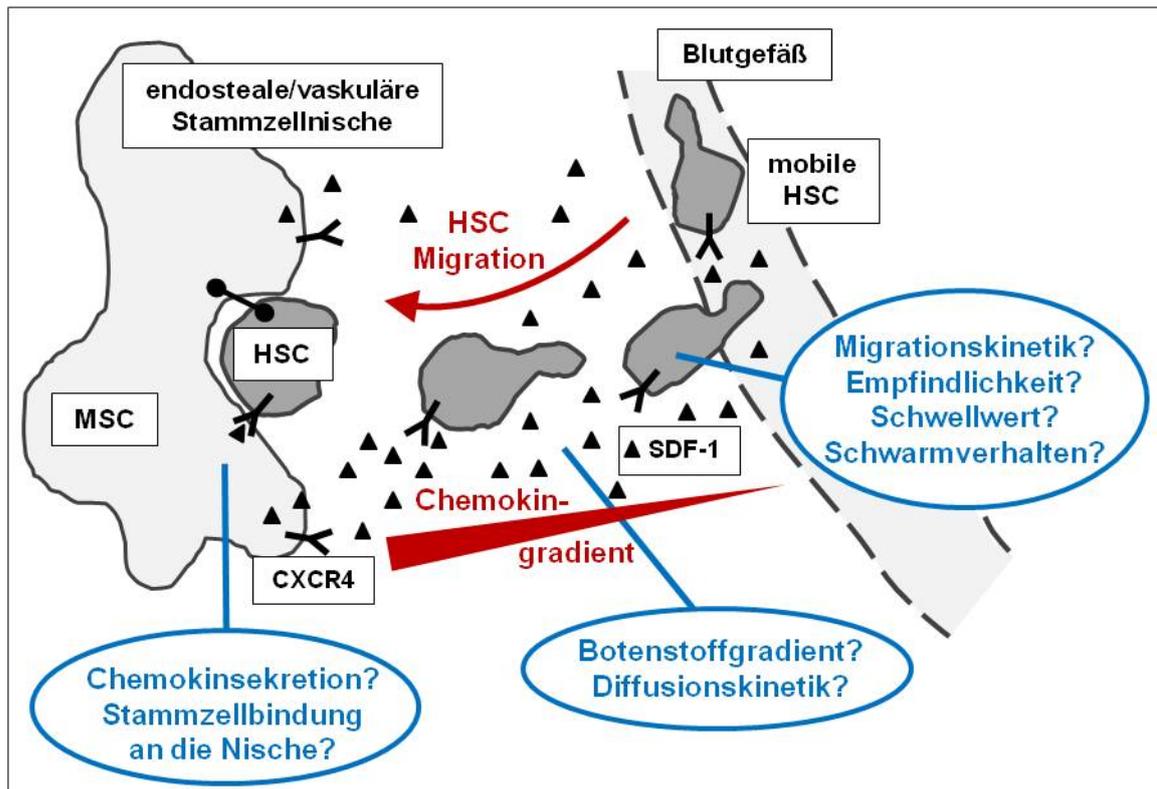


Abbildung 24: Zusammenfassung der Fragestellungen bezüglich der HSC-Chemotaxis am Beispiel des SDF-1/CXCR4-Botenstoffsystems, das die Migration der HSC aus dem Peripherblut hin zur Stammzellnische steuert.

Welche Botenstoffkonzentration und welcher Konzentrationsgradient an SDF-1 müssen vorliegen, um eine Stammzellmigration auszulösen? Wie wird die Migrationskinetik durch den Konzentrationsgradienten beeinflusst? Kommunizieren die HSC während der Migration miteinander und gibt es eine kollektive Stammzellmigration? Wie hoch ist die von den MSC exprimierte SDF-1-Konzentration? Wie beeinflusst der CXCR4 Antagonist AMD3100 die Expression von Chemokinen (SDF-1) durch MSC, und hat AMD3100 inhibierende Effekte auf die chemotaktische beziehungsweise die migratorische Aktivität der HSC?

Zur Beantwortung dieser Fragen bietet sich die Verwendung von Mikrofluidikexperimenten an. Hierzu wurde in dieser Arbeit eigens ein neues auf Mikrostrukturen basierendes Migrationsexperiment entwickelt und anhand der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten etabliert. Besonders die Bestimmung von experimentellen Bedingungen zur Erzeugung reproduzierbarer Ergebnisse stand hierbei im Mittelpunkt. Die diffusive Ausbildung der Chemokingradienten wurde daher mit verschiedenen Farb- und Partikelexperimenten überprüft und zusätzlich durch numerische Simulationsrechnungen verifiziert. Schließlich wurde die Chemotaxis der HSC in Mikrostrukturen auf Basis des SDF-1/CXCR4-Botenstoffsystems untersucht. Anhand von ELISA-Experimenten wurde die SDF-1-Ausschüttung durch die MSC quantifiziert, um die chemischen Gradienten

innerhalb der Mikrostrukturen und die absoluten Werte für die Mindestkonzentrationen berechnen zu können. Durch die Korrelation des Verhaltens der HSC in den verzweigten Mikrostrukturen mit Bioanalytikdaten sollen letztlich neue Erkenntnisse über das HSC Migrationsverhalten gewonnen werden.

3.1.2 Konzept zunehmender Komplexität

Für diese Arbeit wurde bei den Migrationsexperimenten ein Konzept zunehmender Komplexität verfolgt (Abbildung 25), um die rare Ressource der HSC aus Nabelschnurblut optimal nutzen zu können. Für die Neuentwicklung und Optimierung der Chemotaxisexperimente wurden zunächst auch Zelllinien mit ähnlichem Migrationsverhalten, aber artifiziellen Botenstoffen als Chemoattraktanten eingesetzt.

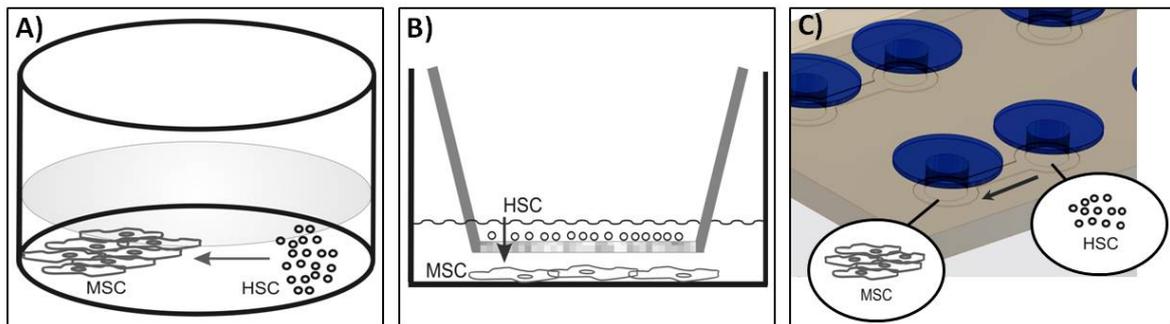


Abbildung 25: Angewendete Chemotaxisassays mit zunehmender Komplexität. A) Einkammer-Experimente in Multiwell- und Microwellplatten, B) Boyden-Kammer bzw. Transwell-Experimente mit zwei getrennten, vertikal angeordneten Kammern, C) Migrationskammern basierend auf Mikrostrukturen mit horizontaler Zellwanderung.

Zur Charakterisierung des Zellmaterials wurden Einkammer-Experimente (Abbildung 25A), die Microwell-Versuche für die HSC beziehungsweise Filopodienbildungsassays für die Neutrophile, genutzt. Das Microwell-Experiment wurde in der Arbeitsgruppe um Professor Ho etabliert [58, 101] und ist sehr gut geeignet, um das Verhalten der verschiedenen Chargen an Zellmaterial zu testen und zu analysieren. Neben der Überprüfung und Auswahl der MSC-Linien könnte in Zukunft anhand des Microwell-Assays auch die Qualität der HSC in Hinblick auf ihre Motilität und Migrationsfähigkeit schnell und effizient kontrolliert werden.

Als nächster Schritt wurde mit der Durchführung von Transwell-Experimenten die räumliche Trennung von MSC und HSC beziehungsweise von Neutrophilen und Botenstoff, eingeführt (Abbildung 25B). Anhand der kommerziell erhältlichen Transwell-Experimente können Aussagen über die Quantität und Qualität der wandernden Zellen, aber auch über den Einfluss blockierender Antikörper oder spezifischer Inhibitoren (z.B.

AMD3100 als ein Inhibitor für CXCR4/SDF1) getroffen werden. Auch dieses Setup wurde bereits erfolgreich auf das HSC/MSC-System in angewandt [145].

Als höchste Komplexitätsstufe wurde eine selbst entwickelte mikrofluidische Migrationskammer eingesetzt (Abbildung 25C). Der Vorteil liegt unter anderem in der räumlichen Trennung der beweglichen HSC und adhären MSC. Im Gegensatz zum Transwell-Experiment befinden sich diese hier jedoch auf der gleichen horizontalen Ebene, was auch eine gleichzeitige mikroskopische Beobachtung des gesamten Systems ermöglicht. Die MSC erzeugen Chemokine, die durch die definierten Mikrokanäle diffundieren und somit einen zeitabhängigen Konzentrationsgradienten bilden. Sobald der Gradient die Stammzellen erreicht und die Chemokinkonzentration eine Schwellkonzentration überschreitet, wird die chemotaktische Antwort der HSC ausgelöst. Durch eine systematische Veränderung der Kanalgeometrien und –anordnung kann diese Schwellkonzentration durch Korrelation mit bioanalytischen Chemokinexpressionsdaten ermittelt werden. Mit einer Einbindung von Kanalverzweigungen werden den Stammzellen konkurrierende Migrationswege angeboten, wodurch die Sensitivität der HSC gegenüber dem Gradienten gemessen werden kann. Anhand der Mikrostrukturen wurden also vor allem die dynamischen Parameter der Zellbewegung sowie die spezifischen Zellbewegungsmuster (Fortbewegungsart, Kollektivität) untersucht.

Durch die verschiedenen Komplexitätsstufen konnte der experimentelle Durchsatz erhöht und die Versuchsbedingungen für die aufwendigeren Experimente optimal angepasst werden. Während die weniger komplexen Versuche dazu dienten die Zellen zu testen und deren Qualität zu sichern, erlaubten die komplexeren Versuche in Mikrostrukturen anschließend die Messung der Zeitabhängigkeit der Zellstimulierung, deren Antwort mit dem Diffusionsgradienten der Chemokine korreliert wurde.

3.2 Diffusive Ausbildung der Konzentrationsgradienten

Um die diffusive Gradientenausbildung in dem neu entwickelten mikrofluidischen System zu überprüfen und für die spätere Quantifizierung der Migrationsergebnisse nutzbar machen zu können, wurden die fluidischen Eigenschaften der mikrostrukturierten Migrationskammern mit Hilfe von Partikel- und Farbstoffexperimenten getestet. Die Ergebnisse dazu werden in diesem Kapitel dargestellt und diskutiert.

3.2.1 Konvektionsströmungen

Zur Überprüfung, ob und in welchem Ausmaß Konvektionsströmungen im neu entwickelten mikrostrukturbasierten Chemotaxisexperiment eine Rolle spielen, wurden in mehreren Experimenten mit Jurkat-Zellen Partikellösungen mit in das Zellreservoir zugegeben (siehe Absatz 2.2.4.). Es wurden dabei sowohl Polystyrol-Partikel mit einem Durchmesser von 10 μm als auch mit 4,6 μm verwendet. In allen Experimenten mit intakter Bindung zwischen PDMS und Glas konnten keine Partikelbewegungen festgestellt werden (Abbildung 26). Während sich die Jurkat-Zellen statistisch im Reservoir oder in Richtung des SDF-1-Gradienten bewegten, blieben die Partikel stationär am Boden liegen. Starke Konvektionsströmungen durch die nicht komplett verschließende Deckelung der Reservoirs können also ausgeschlossen werden.

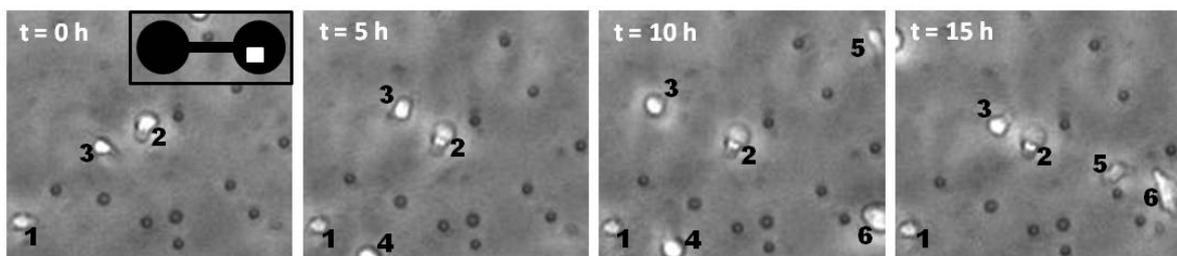


Abbildung 26: Partikel und Jurkat-Zellen im Zellreservoir einer Migrationskammer, der Bildausschnitt entspricht der weiß markierten Fläche im Schema der Mikrostruktur; dunkelgraue Punkte = Polystyrolpartikel mit $d = 4,6 \mu\text{m}$, keine Partikelbewegung über einen Zeitraum von 15 h; markierte Zellen: 1 = stationäre Zelle, 2 = stationäre Zelle (ab $t = 5 \text{ h}$ tot), 3/4/5/6 = wandernde Zellen.

Allerdings haben Polystyrol-Partikel auch die Eigenschaft in geringem Maße an Glasoberflächen anzuhafte. Daher wird für ein HSC-MS- Chemotaxisexperiment, in dem die Stammzellenzellen durch einen offensichtlichen Konvektionsfluss durch den Kanal gespült wurden, nachfolgend eine Peclet-Analyse durchgeführt (siehe 1.4.1), d.h. der Konvektionsstrom gegen die Diffusion abgewogen:

Die HSC bewegten sich in diesem Experiment durch die im Kanal herrschende Strömung mit einer Geschwindigkeit von 25 $\mu\text{m}/\text{min}$ durch den 100 μm breiten Kanal. Aus dem Zellstrom der HSC lässt sich ableiten, dass gleichzeitig auch das Medium in

diesem Experiment eine Fließgeschwindigkeit von $v=4,16 \times 10^{-7}$ m/s hatte. Der Diffusionskoeffizient von SDF-1, dessen Chemokingradient durch Diffusion ausgebildet werden sollte, beträgt circa $D=1 \times 10^{-10}$ m²/s. Die anhand dieser Werte berechnete Peclet-Zahl $Pe = vd/D$ beträgt 0,4. Dieser Wert ist immer noch kleiner als 1 und bedeutet, dass selbst in einer Mikrostruktur mit geringem Mediumfluss die diffusive Ausbildung des Chemokingradienten kaum behindert wird. Strömungen können bei diesem Experiment aufgrund der Verdunstung an der Flüssigkeitslamelle zwischen Reservoir und Deckelung oder der Wärmeentwicklung bei der Belichtung zur Bildaufnahme auftreten. Die Vorteile für die Zellkultur und in der Handhabbarkeit dieses nicht komplett geschlossenen Mikrofluidiksystems überwiegen aber die Beeinträchtigungen durch geringe Konvektionsströmungen. Außerdem gibt es bereits erste Studien, die den Einfluss von Konvektion in Chemotaxisexperimenten für eine optimale Zellantwort für notwendig erachten [147].

3.2.2 Farbstoffausbreitung

Die Ausbildung der Attraktantgradienten kann aufgrund der sehr geringen Konzentrationen schlecht überprüft werden. Eine Fluoreszenzmarkierung beispielsweise würde die diffusiven Eigenschaften der Botenstoffe stark verändern, und bei den niedrigen Konzentrationen im Nano- und Pikogrammbereich sind die Fluoreszenzintensitäten zu gering für eine quantitative Detektion. Anhand von höher konzentrierten Farbstofflösungen wurde daher die Gradientenausbildung in den Mikrostrukturen nachgestellt. Stellvertretend für den Attraktanten fMLP wurde Brillantkresylblau und anstelle von SDF-1 ein fluoreszenzmarkiertes Dextran verwendet (siehe 2.2.4).

Bei einem Langzeitexperiment mit Brillantkresylblau zeigte sich der chemische Gradient in Mikrostrukturen mit einem geraden Verbindungskanal über mehr als drei Wochen hinweg stabil. Obwohl in unbefeuchteter Umgebungsatmosphäre gearbeitet wurde und durch die Deckelung teilweise Luftblasen im Reservoir eingeschlossen waren, trockneten die Kanäle nicht merklich aus. Der diffusive Konzentrationsausgleich zwischen den Reservoiren wurde durch zwei Methoden der Differenzbildung anhand der mikroskopischen Aufnahmen nachvollzogen. Einerseits wurde nur die Differenz der Grauwerte der Reservoire gebildet (Abbildung 28 oben), andererseits wurden die Grauwerte in eine Extinktion E des Farbstoffes nach Lambert-Beer umgerechnet, mit $E = -\log(I/I_0)$ (I =Intensität/Grauwert im Reservoir, I_0 =Intensität/Grauwert des Hintergrundes), und anschließend die Differenz gebildet (Abbildung 28 unten).

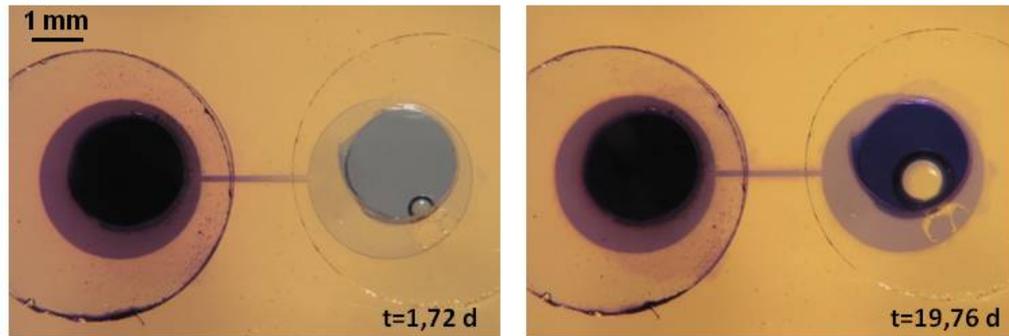


Abbildung 27: Konzentrationsausgleich des Farbstoffes Brillantkresylblau. Dieser Versuch zeigt die Langzeitstabilität des Farbstoffgradienten in der befüllten Migrationskammer. Bereits nach einem Tag ist der Farbstoffgradient im Kanal gut erkennbar, trotz eingeschlossener Luftblase trocknet das Kanalsystem über 3 Wochen hinweg bei Raumtemperatur und ohne befeuchtete Umgebungsatmosphäre nicht aus; Kanal Nr. 3: Breite $d=100\ \mu\text{m}$, Länge $l=2\ \text{mm}$, Ausgangskonzentration BCB $c=1\ \text{mM}$; weiße Markierung = ausgewertete Bereiche für Abbildung 28.

Erwartungsgemäß zeigt sich der steilste Kurvenverlauf jeweils für den $100\ \mu\text{m}$ breiten Kanal, da dieser bei gleicher Konzentrationsdifferenz von $\Delta c=1\ \text{mM}$ gegenüber dem $50\ \mu\text{m}$ breiten Kanal die größere Querschnittsfläche aufweist. Kanal Nr. 1 mit der geringeren Konzentrationsdifferenz $\Delta c=0,1\ \text{mM}$ weist dagegen den langsamsten Konzentrationsausgleich auf. Eine ausgeglichene Konzentration in beiden Reservoiren, dies würde einen Differenzwert von 0 bedeuten, wurde aber selbst nach 3 Wochen Laufzeit des Experimentes in keinem Fall erreicht. Die jeweils aus den Extinktionskurven ermittelte Halbwertszeit für den Konzentrationsausgleich von Brillantkresylblau liegt bei 17 Tagen für Kanal 1, 13,7 Tagen für Kanal 2 und 8,8 Tagen für Kanal 3. Die Abnahme der Gradientensteilheit durch den fortschreitenden Konzentrationsausgleich wurde für Kanal Nr. 3 über einen Zeitraum von 24 Tagen genauer betrachtet (Abbildung 29). Demnach stellt sich der chemische Gradient innerhalb der ersten Stunden nach der Farbstoffzugabe ein und fällt dann sehr langsam ab. Nach drei Wochen hatte sich in diesem Versuch die Steilheit des chemischen Gradienten noch nicht ganz halbiert. Jedoch für den Zeitraum der Dauer eines Migrationsexperimentes, dies sind maximal zwei Tage, kann der chemische Gradient demnach als stationär betrachtet werden.

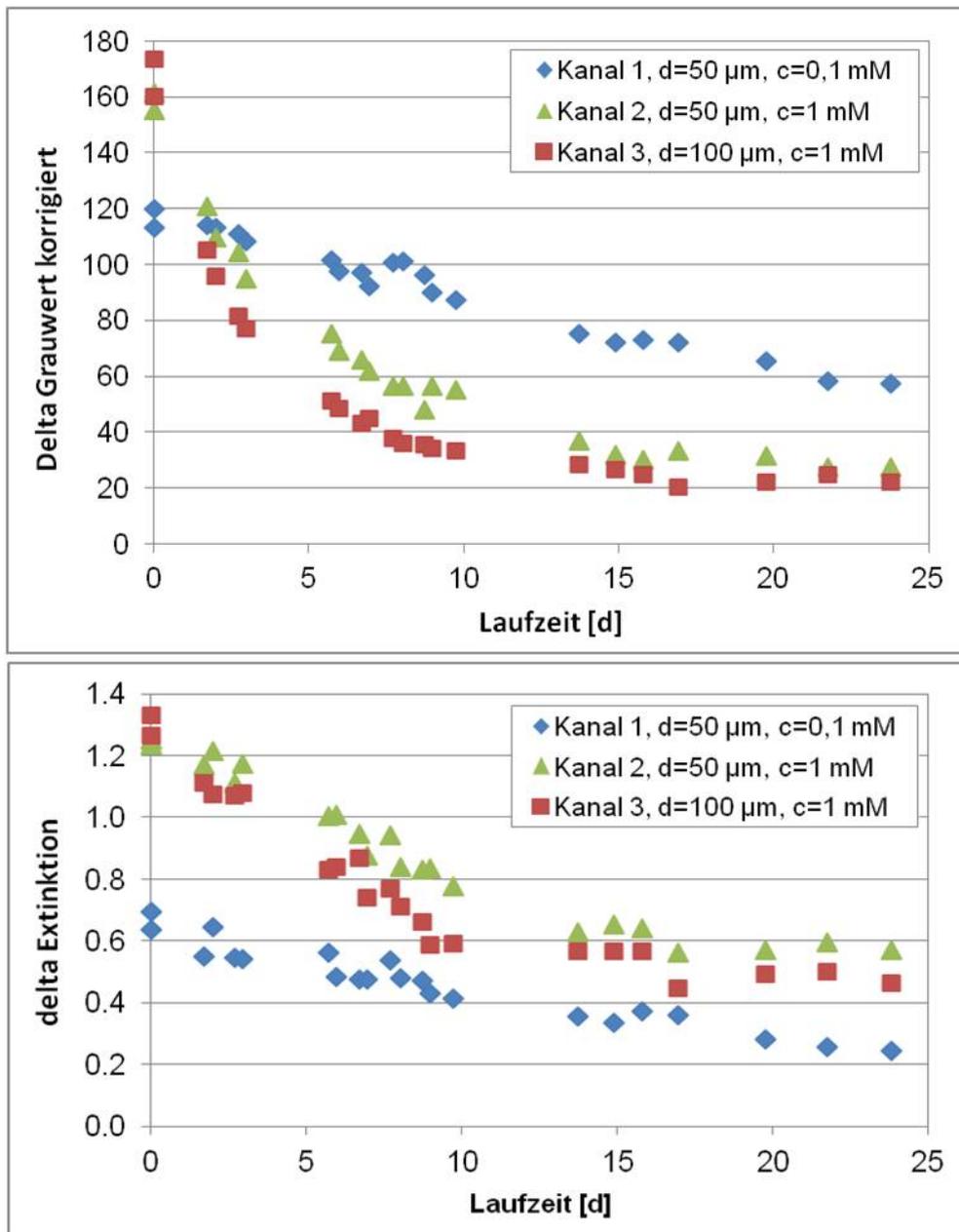


Abbildung 28: Konzentrationsausgleich des Farbstoffes Brillantkresylblau. Oben: Grauwertdifferenz zwischen Farbstoffreservoir links und Reservoir rechts (siehe Bereiche in Abb. 14) mit Belichtungskorrektur (Hintergrundabgleich); unten: Differenz in der Extinktion nach Lambert-Beer für die gleichen Reservoirbereiche, ein Erreichen des Wertes 0 würde in beiden Darstellungen den kompletten Konzentrationsausgleich bedeuten.

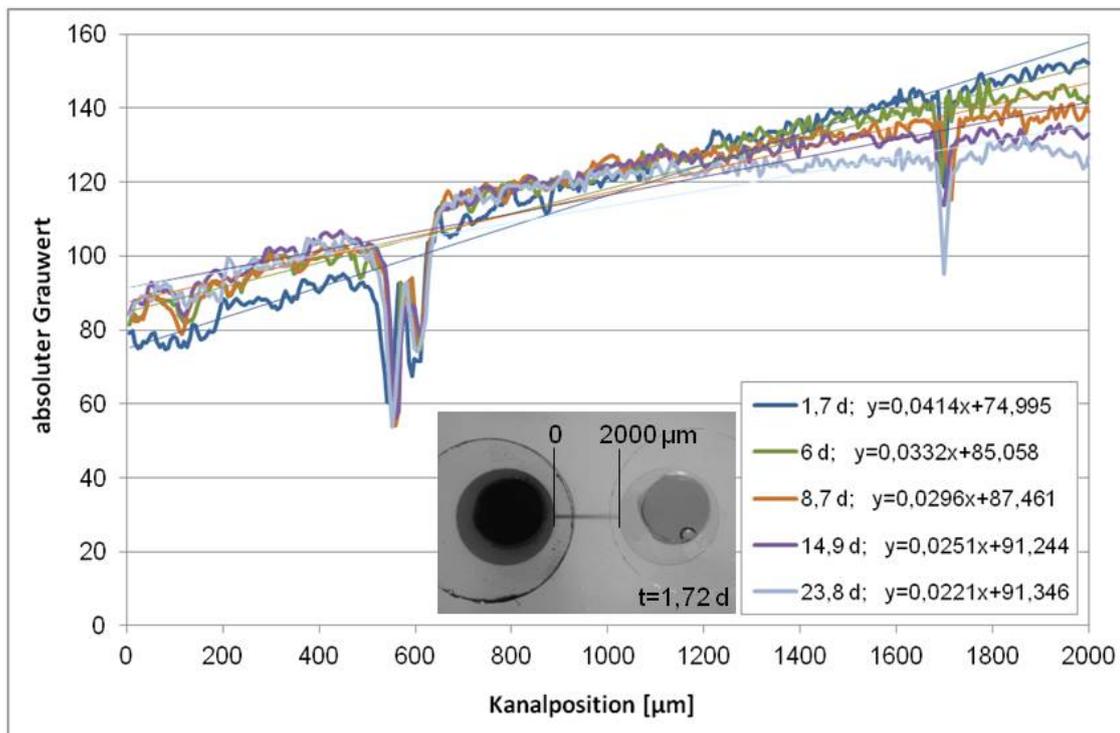


Abbildung 29: Konzentrationsgradient von Brillantkresylblau innerhalb eines Kanals mit 2 mm Länge, Ausgangskonzentration $c(\text{BCB})=1 \text{ mM}$; Die Peaks bei ca. 600 und 1700 μm sind auf den Rand der Deckgläschen, welche die Reservoirs verschließen, zurückzuführen. Die abnehmende Geradensteigung verdeutlicht die Abnahme der Gradientensteilheit über den Zeitraum von 24 Tagen.

Die Ausbildung des chemischen Gradienten ist vor allem für das größere und damit langsamer diffundierende SDF-1 interessant. Die Entstehungsphase des chemischen Konzentrationsgradienten in den Mikrostrukturen wurde deshalb anhand des fluoreszenzmarkierten Dextrans (FITC-Dextran), welches in seinen diffusiven Eigenschaften etwa dem SDF-1 gleicht, untersucht. Hierfür wurde in der Kanalmitte eines 3 mm langen und 20 μm breiten Kanals die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (Abbildung 30 oben). Wichtig ist, dass der Messpunkt außerhalb des Bereiches der Reservoirabdeckungen liegt, in diesen würde der Gradientenverlauf durch die dünne Flüssigkeitlamelle zwischen Deckel und PDMS verfälscht werden. Die Intensitäten wurden zur Verbesserung der Darstellung auf den Bereich zwischen niedrigsten und höchsten Messwert normiert. Eine Zuordnung von Absolutkonzentrationen konnte aufgrund der hohen Intensität im tiefen Reservoirbereich, welche die Detektorsättigung erreichte, nicht erfolgen. Hierfür wären Experimente mit wesentlich geringeren Farbstoffkonzentrationen nötig gewesen, die aber wiederum im Kanal zu geringe Fluoreszenzintensitäten liefern.

Der Intensitätsverlauf (Abbildung 30 unten) zeigt zunächst einige Unregelmäßigkeiten innerhalb der ersten zehn Minuten nach Einfüllen der Farbstofflösung. Diese sind auf die durch das Einfüllen und Deckeln der Reservoire hervorgerufene Konvektion zurückzuführen. Danach erfolgt über einen Zeitraum von etwa einer Stunde, in dem sich der lineare Konzentrationsgradient im Kanal ausbildet, ein fast linearer Anstieg der Intensität. Nach etwa zwei Stunden erreicht die Intensitätskurve einen Plateauwert, d.h. nach dieser Zeit ist der lineare Konzentrationsgradient vollständig ausgebildet.

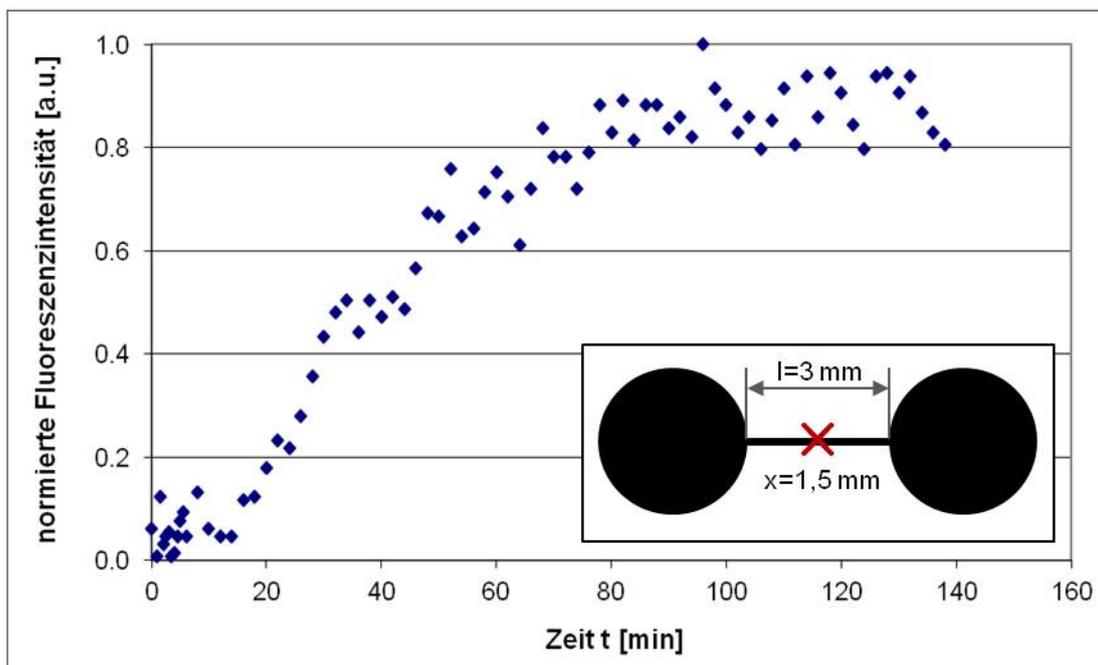
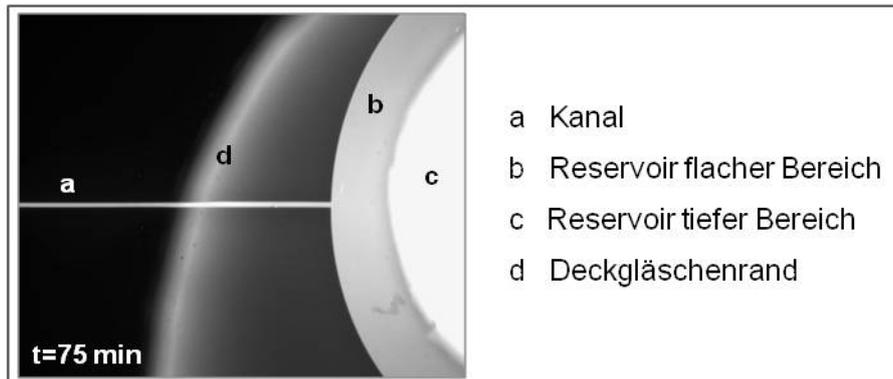


Abbildung 30: Ausbildung eines Konzentrationsgradienten von FITC-Dextran im einfachen Kanal bei Raumtemperatur, Kanallänge $l=3$ mm, Kanalbreite $b=20$ μm , Messpunkt bei $x=1,5$ mm, Ausgangskonzentration FITC-Dextran $c \approx 0,24$ μM (1%ige Lösung); oben: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Kanals mit Gegenreservoir bei $t=75$ min, unten: Verlauf der Fluoreszenzintensität am Kanalmittelpunkt $x=1,5$ mm.

3.2.1 Simulation der Farbstoffdiffusion

Um die Ausbildung des Farbstoffgradienten im geraden Kanal zu verifizieren, wurden im Rahmen einer Kooperation mit den Mathematikern Maria Neuss-Radu und Nicolas Neuss numerische Simulationen der Gradientenausbildung durchgeführt (siehe 2.2.5) und mit den erhaltenen Fluoreszenzdaten verglichen. Abbildung 31 zeigt den Konzentrationsverlauf in einem geraden Kanal mit einer Länge von 2 mm und einer Breite von 100 μm innerhalb der ersten 10 Stunden nach Einfüllen des Farbstoffes. Es wurde dabei ein Diffusionskoeffizient von $D=1\times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ in der Rechnung verwendet, was den Molekülen SDF-1 oder FITC-Dextran entspricht. Aus den Kurvenverläufen wird zum einen deutlich, dass sich im Kanal nach etwa 4 Stunden ein linearer Konzentrationsgradient ausgebildet hat, zum anderen fällt die stark abfallende Konzentration in den flachen Reservoirbereichen auf. Diese entsteht durch den Übergang von einer fast eindimensionalen Geometrie des Kanals zur zweidimensionalen Geometrie und Ausbreitung der Moleküle im flachen Reservoir. In den tiefen Reservoirbereichen, welche das Hauptvolumen der gesamten Mikrostruktur beinhalten, bleiben über die 10 h die Konzentrationen nahezu unverändert, also die Ausgangskonzentration (entspricht dem Wert 1) im Farbstoffreservoir und unendlich kleine Konzentration (entspricht dem Wert 0) im Gegenreservoir.

3.2.2 Diskussion des Versuchsaufbaus

Das Auftreten von Konvektionsströmungen ist für viele miniaturisierte Systeme ein größeres Problem, da sie sich nur äußerst schwierig komplett vermeiden lassen. Hierfür sind die geringen Flüssigkeitsvolumina und die sehr schnelle Erwärmung dieser, beispielsweise durch die bloße Belichtung während einer mikroskopischen Aufnahme, verantwortlich. Auch Undichtigkeiten oder Verdunstung bei nicht komplett geschlossenen Systemen können Ursachen für auftretende Strömungen sein. Sowohl die Partikelexperimente als auch die Überprüfung der Gradientenausbildung mit den Farbstofflösungen haben allerdings gezeigt, dass für dieses mikrofluidische Experiment geringe Konvektionsströmungen zu keiner Beeinträchtigung des Experimentes führen. Der Vergleich zwischen experimenteller Gradientenausbildung, mit einer Dauer von zwei Stunden bis zur Ausbildung des stationären Gradienten (Kanal: $l=3 \text{ mm}$, $b=100 \mu\text{m}$), und der Simulation, mit vier Stunden bis zur Ausbildung des stationären Gradienten (Kanal: $l=2 \text{ mm}$, $b=100 \mu\text{m}$), zeigt, dass die Konvektionsströmungen beim Befüllen und Deckeln die Ausbildung des chemischen Gradienten nicht wesentlich verändern. Es wurden in der Literatur bereits andere Ansätze beschrieben [120, 122, 123], bei denen Chemotaxisexperimente mit halboffenen Mikrofluidikexperimenten durchgeführt wurden. Alle haben jedoch gezeigt, dass die Ausbildung des Botenstoffgradienten durch die offene Anordnung kaum beeinflusst wird.

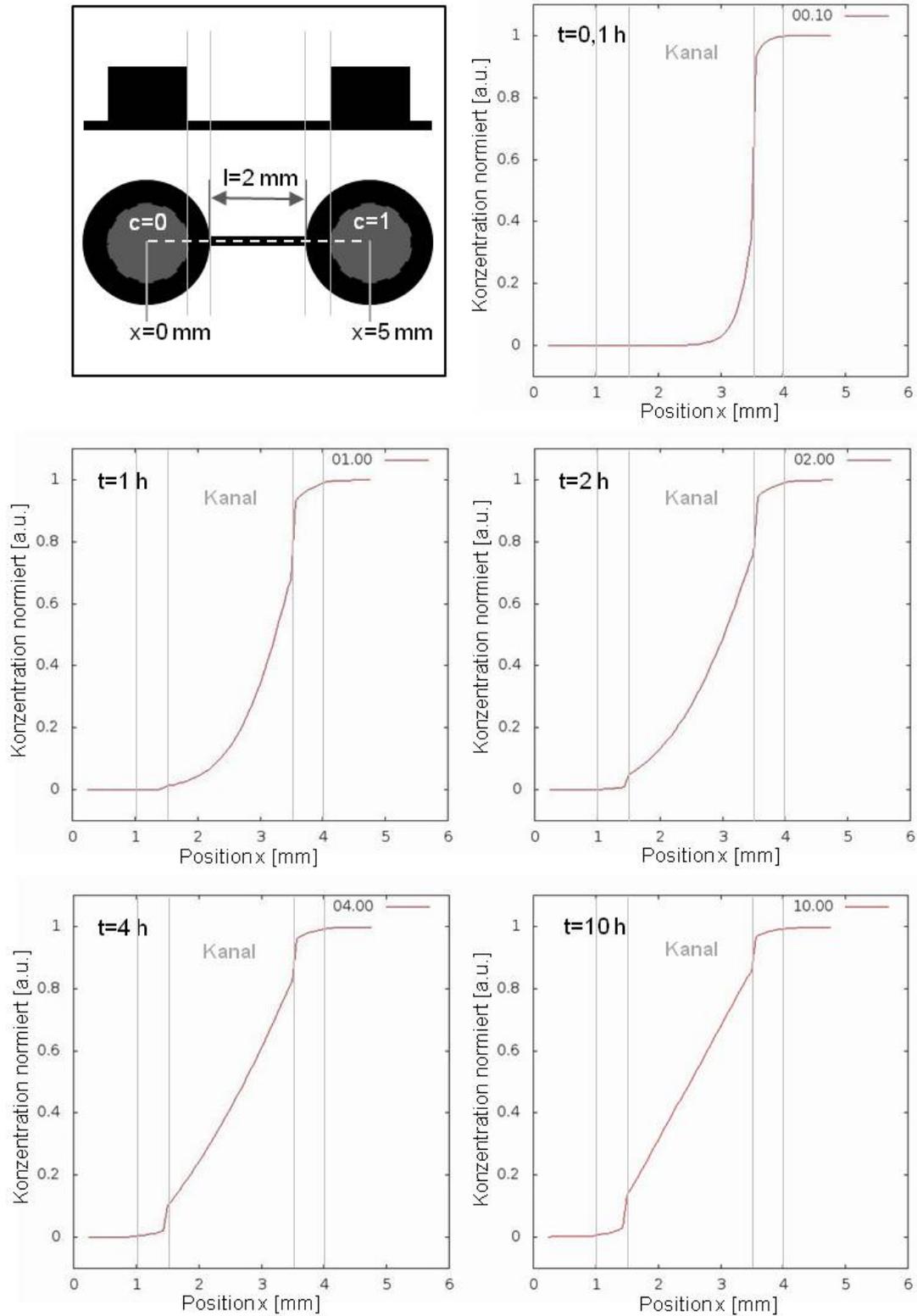


Abbildung 31: Vorläufige numerische Simulation der Gradientenausbildung im geraden Kanal für ein Molekül mit $D=1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (entspricht FITC-Dextran oder SDF-1); Gezeigt ist das Konzentrationsprofil entlang der gestrichelten Linie (siehe Skizze oben links) für die Zeitpunkte 0,1, 1, 2, 4 und 10 h nach Befüllen des rechten Reservoirs mit Farb- bzw. Botenstoff. Simulation: Software Femlisp, Nicolas Neuss.

Die Ausbildung des Chemokingradienten folgt im Chemotaxisexperiment mit den HSC einer Konvolution aus der Produktion der Botenstoffe und deren anschließender Diffusion durch den Kanal. Das Erreichen des stationären Gradienten wurde hier aber nur für eine einmalige Chemokinzugabe untersucht. Deshalb sind auch genaue Kenntnisse der Chemokinbildungsrate durch die MSC notwendig (siehe Kapitel 3.3), um den zwei bis vier Stunden Zeitraum der Gradientenausbildung einordnen zu können. Der Zeitrahmen des Konzentrationsausgleichs zwischen beiden Reservoirien spielt für das Chemotaxisexperiment keine Rolle, die Halbwertszeiten liegen im Bereich von wenigen Wochen. Das Migrationsexperiment dauert jedoch maximal zwei Tage, so dass während der Laufzeit des Experimentes der Attraktantgradient als quasistationär betrachtet werden kann. Werden zudem anstatt künstlichen Attraktanten MSC als Botenstoffdonoren eingesetzt, wird durch diese fortlaufend der Attraktant (SDF-1) nachproduziert, so dass die Ausgleichskinetik für das Chemotaxisexperiment noch mehr an Relevanz verliert.

Zusammengefasst haben diese Messungen zur Gradientenausbildung und –stabilität sowie die zugehörige Simulation gezeigt, dass es nicht zwingend notwendig ist, mit aufwendiger Mikrofluidik Attraktantgradienten in Mikrostrukturen zu erzeugen (vgl. Kapitel 1.3.4). Betrachtet man die zumeist kurze Experimentierdauer mit lebendem Zellmaterial, diese liegt meist sogar nur im Bereich von wenigen Stunden, so ist die einmalige Zugabe von Chemoattraktant in ein ausreichend großes Vorratsreservoir, und natürlich das Vorhandensein einer entsprechenden Senke, oft vollkommen genügend. Für den Aufbau chemischer Gradienten mittels kontinuierlich fließender Attraktantlösungen werden dagegen wesentlich größere Substanzmengen der oft teuren Botenstoffe benötigt. Die für diese Arbeit entwickelten mikrostrukturierten Systeme kombinieren also eine unkomplizierte Anwendbarkeit mit dem Vorteil einer geometrisch definierten Mikroumgebung und einem quasistationären Attraktantgradienten.

3.3 SDF-1-Ausschüttung durch mesenchymale Stromazellen

In diesem Kapitel soll der Einfluss der Kulturbedingungen und –dauer auf die SDF-1-Ausschüttung durch die mesenchymalen Stromazellen analysiert und diskutiert werden. Ist beim Einsatz der MSC als Attraktantquelle wird die Ausbildung des Botenstoffgradienten in den Mikrostrukturen durch das Zusammenspiel der SDF-1-Sekretion mit der anschließenden diffusiven Chemokinausbreitung gesteuert. Die Kenntnis der SDF-1-Konzentration ist damit von essentieller Bedeutung für die Ermittlung der Konzentrationsgradienten in den Mikrostrukturen und für die Bestimmung der chemotaktisch wirksamen SDF-1-Dosis. Auch die Auswirkungen des CXCR4-Antagonisten AMD3100 auf die vorhandene SDF-1-Konzentration werden im nachfolgenden Kapitel näher untersucht.

3.3.1 Einfluss des Kulturmediums

Da die Auswahl des richtigen Zellkulturmediums entscheidend für die Durchführung der in-vitro Chemotaxisexperimente ist, wurde ein umfangreicher Medientest mit ELISA durchgeführt (Abbildung 32). Das Kulturmedium beeinflusst neben dem Phänotyp in starkem Maße auch das Sekretionsverhalten der MSC [60-62]. Die MSC wurden daher in drei verschiedenen, häufig verwendeten Kulturmedien inkubiert, nämlich M1, M2 und hPL, zusätzlich wurde ein HSC-unterstützendes Medium, LTBMCM, verwendet (siehe Kapitel 2.4.1).

Die höchsten SDF-1-Ausschüttungsraten und Konzentrationen wurden im kommerziell erhältlichen MSC-Kulturmedium M1 mit 10 % FCS gemessen. 24 Stunden nach dem Medienwechsel betrug die SDF-1-Konzentration in der überstehenden Lösung circa 180 pg/ml (Abbildung 32 oben). Aufgrund dessen wurde das Medium M1 für alle weiteren Experimente zur Abhängigkeit von der Zellkonzentration und der Messung des zeitlichen Verlaufs der SDF-1-Ausschüttung benutzt. 72 Stunden nach dem Medienwechsel wurden auch im humanen Plättchenlysat-Medium und im LTBMCM-Medium höhere Konzentrationen von SDF-1 gemessen (Abbildung 32 unten). Im Medium M2 mit nur 2 % FCS, welches gewöhnlich für MSC-Expansions- und Alterungsstudien verwendet wird [148, 149], erhöhte sich die SDF-1-Konzentration jedoch nicht. In diesem Medium überstieg die SDF-1-Konzentration im Überstand der Zellen nicht einmal die Konzentration im Zelllysat. Offensichtlich können MSC, die im Kulturmedium M2 kultiviert werden, kein SDF-1 in die überstehende Lösung ausschütten. Generell zeigten die Konzentrationen von SDF-1 im Zelllysat, mit etwa 40 pg/ml SDF-1, keine großen Unterschiede abhängig vom Zellkulturmedium und von der Inkubationsdauer, außer für Medium M2, für das leicht erhöhte SDF-1-Konzentrationen im Zelllysat gemessen wurden.

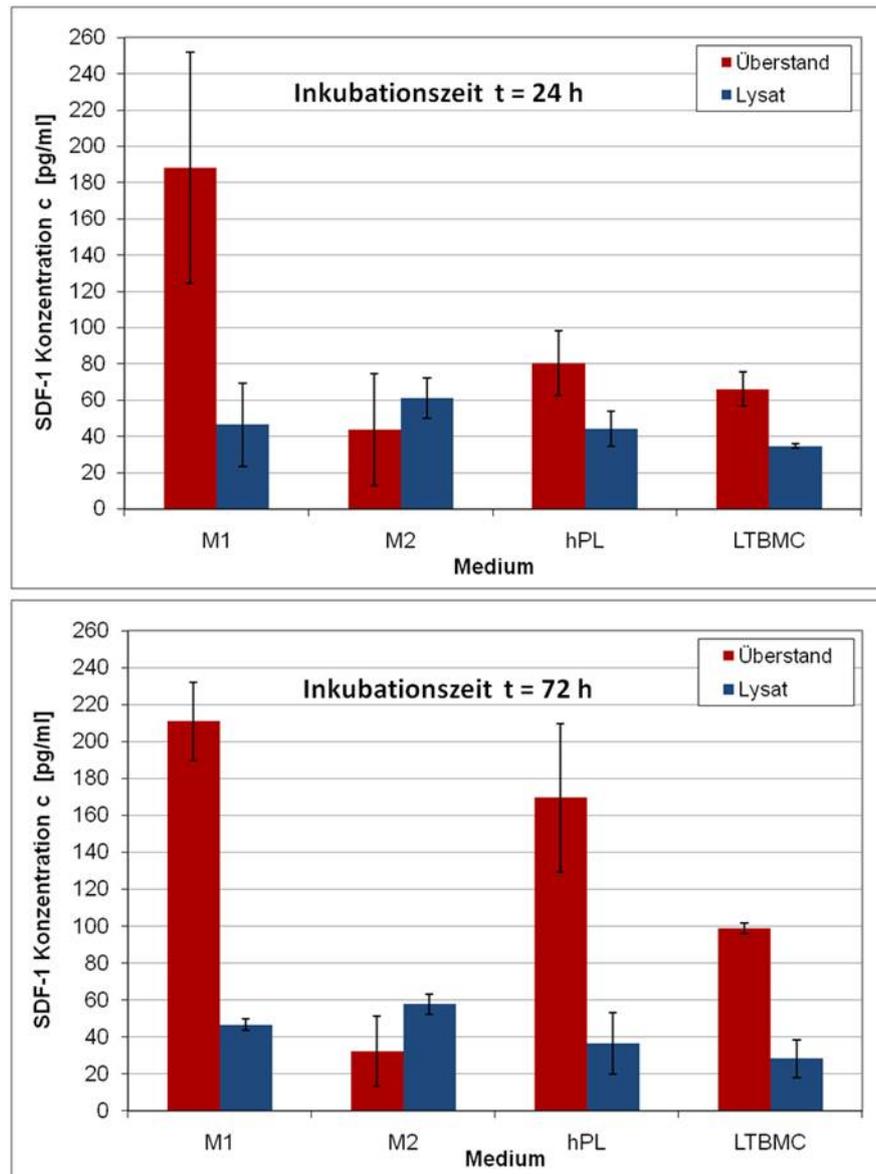


Abbildung 32: Einfluss des Kulturmediums auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand und im Zellysat; oben: Konzentrationen nach 24 h Inkubationsdauer, unten: Konzentrationen nach 72 h Inkubationsdauer; Zellzahl = 50 000 MSC, Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (M1: n=3, M2 und hPL: n=4, LTBMC: n=2).

3.3.2 Einfluss der Zellkonzentration und Inkubationsdauer

Um eine geeignete SDF-1-Ausschüttungskurve für die Auswertung der Chemotaxisexperimente in den Mikrostrukturen zu erhalten, wurde auch die SDF-1-Konzentration im MSC-Medienüberstand (M1) in Abhängigkeit von der Zelldichte, also der ausgesäten Zellzahl, und der Inkubationsdauer untersucht. Die Erstellung von möglichst genauen Sekretionskurven ist auch für die mathematische Simulation der Gradientenausbildung unabdingbar, in der eine Sekretionskurve eingesetzt werden muss, die das Verhalten der MSC als Attraktantenquelle widerspiegelt.

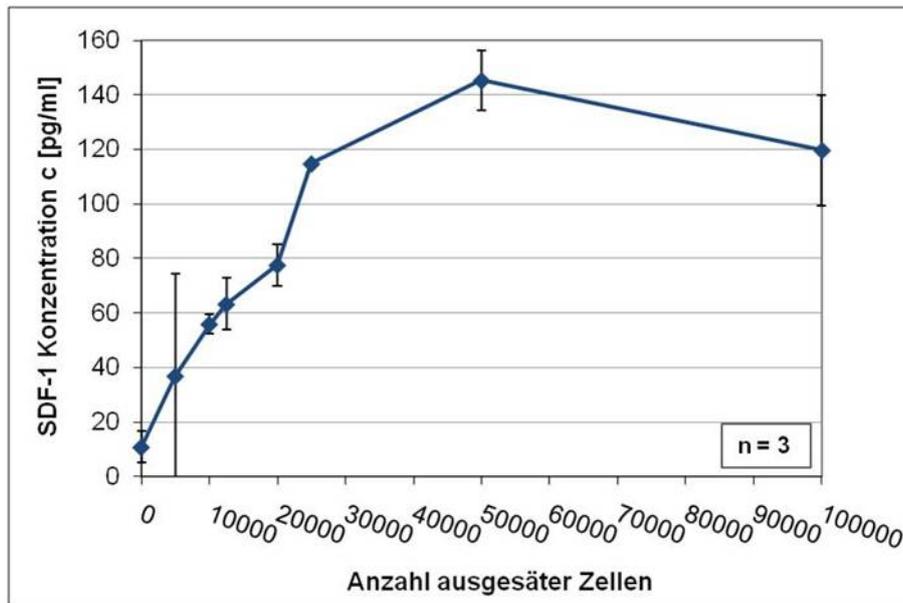


Abbildung 33: Einfluss der Anzahl ausgesäter MSC (M1) auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (n=3).

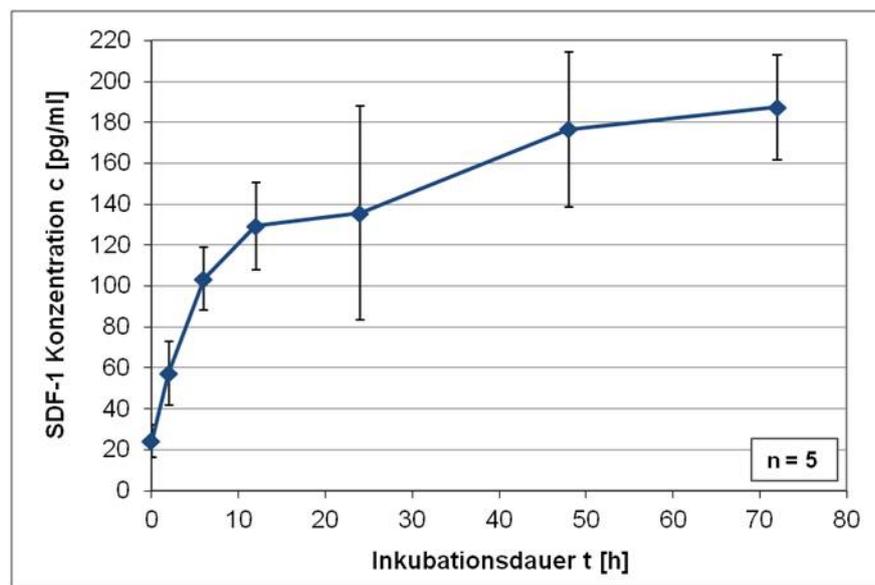


Abbildung 34: SDF-1-Konzentraion im Medienüberstand in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer t, Zellzahl = 50 000 MSC (M1); Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (n=5).

Wie erwartet, führt eine größere ausgesäte MSC-Anzahl auch zu höheren SDF-1-Konzentrationen im überstehenden Medium (Abbildung 33). Dieser Effekt ist allerdings durch die räumliche Begrenzung des Zellwachstums in den Multiwellkammern limitiert. Mit einer Zelldichte von etwa 25 000 Zellen/cm² ist eine Überkonfluenz der MSC erreicht, die zur Stagnation der SDF-1-Konzentration bei circa 130 pg/ml führt. Um die Frage zu beantworten, wie schnell sich die SDF-1-Konzentration nach einem Mediumwechsel erholt, wurde die SDF-1-Ausschüttung von 50 000 MSC (M1) über drei Tage hinweg

verfolgt (Abbildung 34). Es ist wiederum zu sehen, dass nach frühestens 24 Stunden eine Plateaukonzentration bei etwa 180 pg/ml SDF-1 erreicht wird. Dabei ist die Ausschüttungsrate in den ersten zwölf Stunden nach dem Mediumwechsel wesentlich höher als in den nachfolgenden Tagen. Die Zellkultur zur Analyse der SDF-1-Sekretion wurde jeweils in 24well-Multiwellplatten mit 400 μ l Medium pro Kammer durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.1).

3.3.3 Einfluss von AMD3100

Ein anderer wichtiger Punkt ist der Einfluss des CXCR4 Antagonisten AMD3100 auf die SDF-1-Sekretion. Es ist bekannt, dass AMD3100 mit dem CXCR4-Rezeptor wechselwirkt [40, 150], dieser liegt sowohl auf den MSC als auch auf den HSC vor. Der genaue Einfluss von AMD3100 auf die SDF-1 α -Ausschüttung konnte jedoch noch nicht berichtet werden.

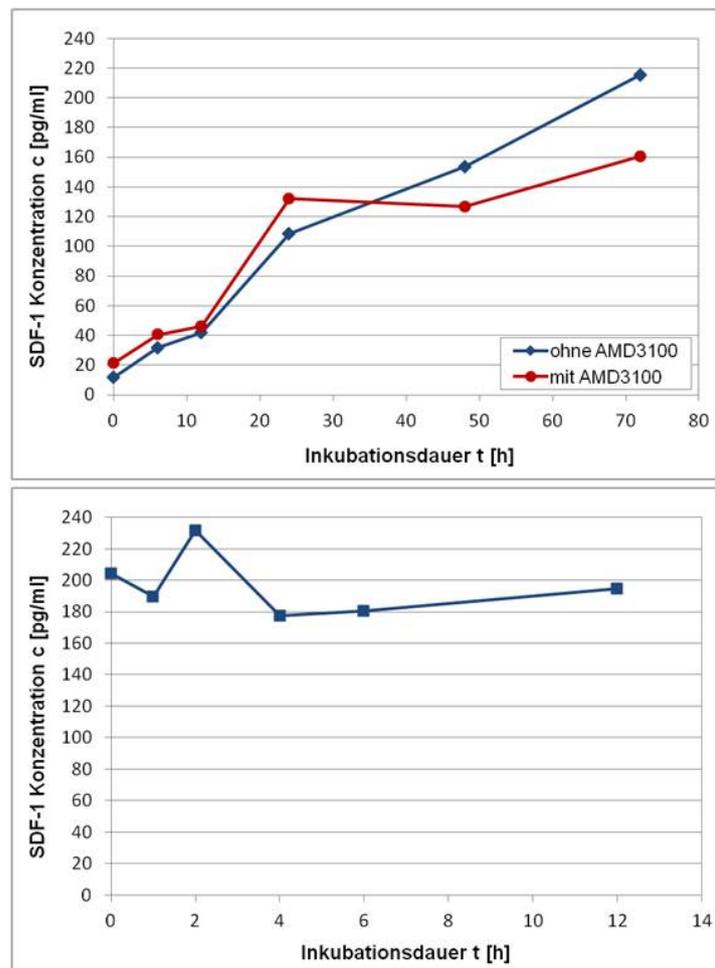


Abbildung 35: Auswirkungen von AMD3100 auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand, Zellzahl = 50 000 MSC (M1); oben: Langzeitwirkung, 3 Tage Kultur mit 500 ng/ml AMD3100 im Medium (Kreise) und ohne AMD3100 (Rauten), unten: Kurzzeitwirkung, einmalige AMD3100-Zugabe (500 ng/ml, bei t = 0 h) zum Kulturmedium nach 3 Tagen Vorinkubation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zusätzlich ELISA-Experimente zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der SDF-1-Ausschüttung unter AMD3100 durchgeführt. Hierfür wurden dem MSC-Kulturmedium M1 500 ng/ml AMD3100 zugegeben und wieder die SDF-Sekretion über drei Tage hinweg untersucht (Abbildung 35 oben). Dieser Langzeiteinfluss von AMD3100 in der MSC-Zellkultur führte nicht zur Erhöhung der SDF-1-Konzentration im Medienüberstand. Die Sekretionskurven mit und ohne AMD3100-Zusatz sind in etwa vergleichbar.

Allerdings konnte ein Kurzeffekt von AMD3100 auf die SDF-1-Ausschüttung im Anfangszeitraum von zwölf Stunden beobachtet werden. In diesem Zeitraum wurde ein Maximum der SDF-1-Konzentration beobachtet, welches circa zwei bis sieben Stunden nach Zugabe von 500 ng/ml AMD3100 zum MSC-Medium auftritt (Abbildung 35 unten). Dieses Experiment wurde ebenfalls mit 50 000 MSC (M1) durchgeführt, die zuvor für drei Tage vorinkubiert wurden. In dieser Zeit sollte dann die maximale Plateaukonzentration von SDF-1 im Überstand bereits erreicht sein. Das Maximum entspricht einer Zunahme der SDF-1-Konzentration im Überstand von etwa 40 pg/ml, was dem Wert des MSC Zelllysats sehr nahe kommt (vgl. Abbildung 32, M1).

Um diesen plötzlichen Konzentrationsanstieg aufzuklären, wurden zusätzlich *Immunofluoreszenzmessungen* zum intrazellulären SDF-1 α -Vorkommen durchgeführt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine gleichmäßige Verteilung von SDF-1 im Zellplasma der drei Tage in Medium M1 inkubierten MSC (Abbildung 36A, t=0 h). Zwei Stunden nach Zugabe von 500 ng/ml AMD3100 konnte dagegen kaum noch SDF-1 in den Zellen gemessen werden (Abbildung 36B). Schon nach vier Stunden (Abbildung 36C) wurde allerdings wieder eine Fluoreszenzintensität entsprechend der SDF-1-Anfangskonzentration im MSC-Plasma erreicht. Die Immunofluoreszenzfärbung von SDF-1 und deren Auswertung wurde ebenfalls für in hPL-Medium kultivierte MSC durchgeführt und ergab für diese dasselbe Ergebnis (Abbildung 37).

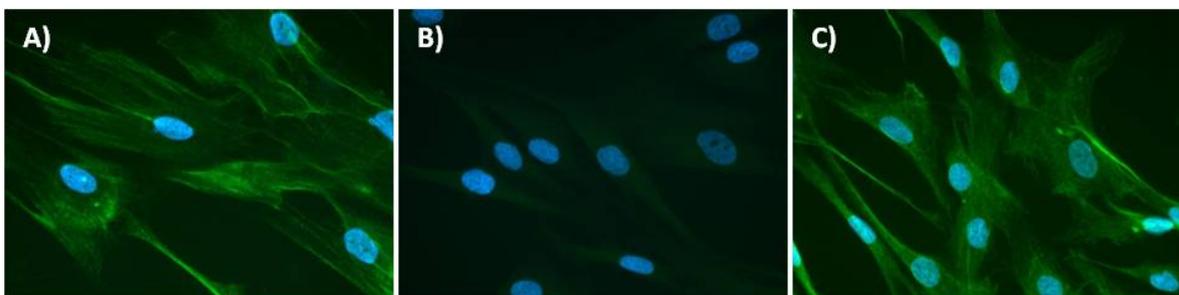


Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären SDF-1-Immunofluoreszenz (grün) in MSC (M1) nach einmaliger AMD3100-Zugabe (500 ng/ml); A) t = 0 h, B) t = 2 h, C) t = 4 h nach der AMD3100-Zugabe; (blau = Färbung der Zellkerne); Aufnahmen: R. Saffrich.

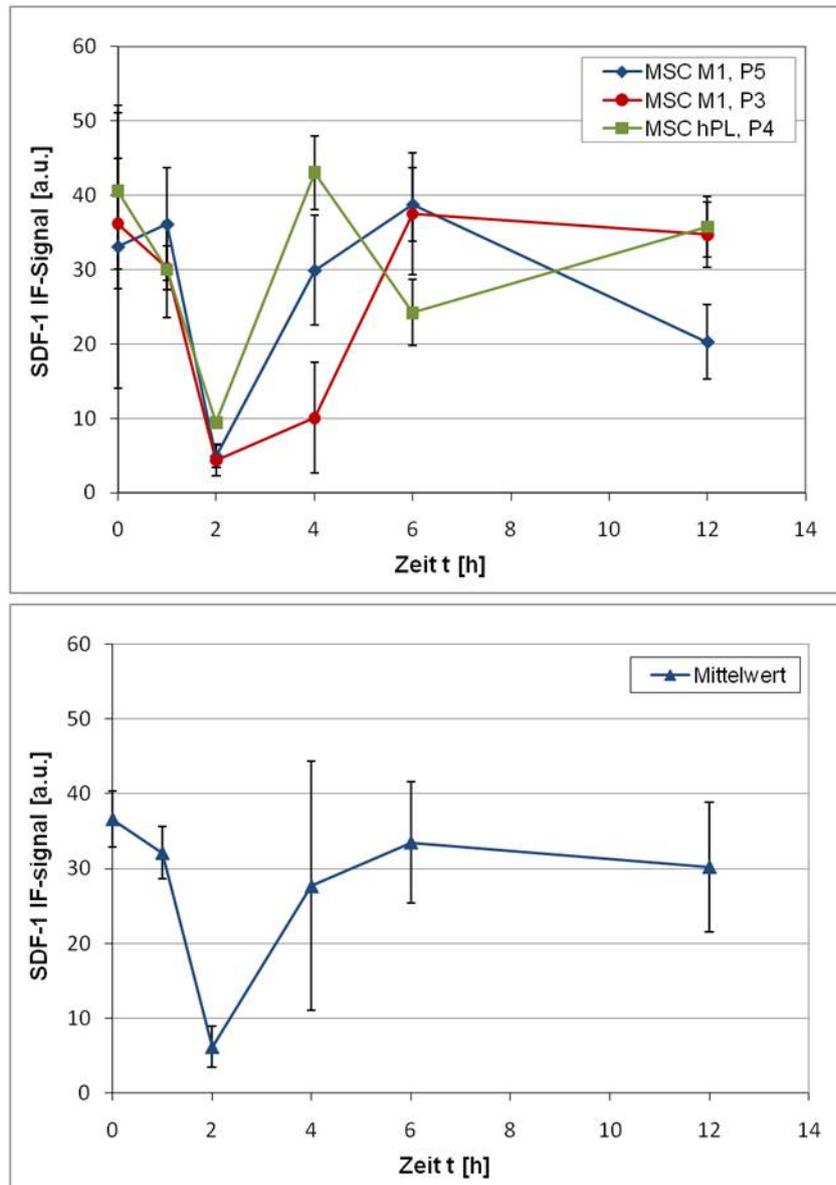


Abbildung 37: Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung von intrazellulärem SDF-1 in MSC; oben: Einzelkurven der verschiedenen Zellchargen (M1 – verschiedene Spender, und hPL), unten: Mittelwertkurve aus den Einzelkurven von oben; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (jeweils n=3).

3.3.4 Diskussion der SDF-1-Sekretion

MSC als Modell für die hämatopoietische Stammzellnische produzieren Chemokine, wie z.B. SDF-1 α , und repräsentieren daher die Quelle des chemischen Attraktantgradienten. Um nun die Chemokinkonzentration in den Mikrostrukturen an der Position der HSC berechnen zu können, sind Informationen über die Menge und Bildungsrate der von den MSC ausgeschütteten Chemokine notwendig. Die SDF-1-Sekretion der MSC wurde anhand von ausführlichen ELISA-Studien zur SDF-1-Konzentration im MSC-Medienüberstand untersucht.

Optimale SDF-1-Ausschüttung

In dem neu entwickelten, horizontalen Migrationsversuch in Mikrostrukturen werden MSC direkt als Chemokindonoren zur Untersuchung der Chemotaxis der HSC eingesetzt (Abbildung 19). Für eine zeitnahe Ausbildung des Botenstoffgradienten in der Mikrostruktur ist eine hohe Produktionsrate des Botenstoffes, z.B. SDF-1 als bekanntester Faktor, nötig. Die SDF-1-Ausschüttung der MSC wurde in dieser Arbeit anhand der Wahl des Zellkulturmediums und der angepassten Zelldichte optimiert. In den meisten bisherigen Chemotaxisstudien wurden rekombinante Chemokine verwendet, um die Zellmigration zu induzieren. Da somit nur die migrierende Zelllinie in diesen Studien verwendet wurde, konnte das Zellmedium einfach auf diesen Zelltyp hin optimiert werden. Bei den Mikrostrukturexperimenten werden aber gleichzeitig zwei verschiedene Zelllinien für den in vitro-Versuch verwendet, nämlich die MSC zur Chemokinausschüttung und die HSC als wandernde Zellspezies. Bei der Wahl des richtigen Mediums für die Durchführung der Chemotaxisexperimente muss neben der optimalen Chemokinexpression der MSC also gleichzeitig auch die Vitalität und Beweglichkeit der HSC beachtet werden.

Eine zusätzliche mikroskopische Beobachtung der HSC-Motilität und Vitalität in den verschiedenen Kulturmedien ergab erwartungsgemäß die längste Lebensdauer von bis zu einer Woche im LTBMCMedium. Allerdings konnten auch in den Medien M1 und M2 während der ersten zwei Tage, die für das Chemotaxisexperiment relevant sind, keine offensichtlichen Motilitätsänderungen/Änderungen in der Filopodienbildung beobachtet werden. Das hPL-Medium wurde in dieser Studie nicht untersucht, in reinem PBS überlebten die HSC maximal 24 Stunden. Die Durchführung der Chemotaxisexperimente in Pufferlösung ist also nicht möglich. Darüber, ob und in wie weit die HSC in den zwei Tagen durch Inkubation in den verschiedenen Medien ausdifferenzieren, kann ohne eingehende molekularbiologische Untersuchungen keine Aussage getroffen werden.

Auch die ELISA-Messungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass die SDF-1-Ausschüttung durch die MSC stark von den Kulturbedingungen abhängt (Abbildung 32). Die höchsten SDF-1-Ausschüttungsraten und Konzentrationen konnten im MSC-Medienüberstand der Kultur mit dem kommerziell erhältlichen Poietics MSC Medium (M1), welches 10 % FCS enthält, ermittelt werden. Das Medium M1 ist deshalb für die HSC-Migrationsexperimente in den Mikrostrukturen am meisten geeignet, da eine schnelle Ausbildung des Botenstoffgradienten nach dem anfänglichen Mediumwechsel von Vorteil ist. Die HSC zeigten in diesem Medium ihre normale Beweglichkeit und überlebten mindestens drei Tage, dabei vollzogen sie allerdings keine Zellteilungen. Die Beobachtung der HSC-Migration in den Mikrostrukturen dauert normalerweise 24 Stunden. Innerhalb dieses Zeitraums stellt sich in Medium M1 auch die Plateaukonzentration von circa 180 pg/ml SDF-1 für 25 000 MSC/cm² ein (Abbildung 34). Dieses Konzentrationsniveau deckt sich mit den Literaturwerten der ELISA-Studie von Mishima et al. [151].

Falls klinische Transplantationsstandards eingehalten werden müssen, könnte auch das humane Plättchenlysatsmedium hPL zur Untersuchung des HSC homing-Prozesses verwendet werden. Im hPL-Medium wurden nach drei Tagen ähnlich hohe SDF-1-Konzentrationen gemessen wie im Medium M1, allerdings ist die Ausschüttungsrate wesentlich niedriger. Das LTBMC-Medium unterstützt auch die Vitalität der HSC und sogar Expansion, aber aufgrund der höheren ausgeschütteten SDF-1-Konzentration wurde das Medium M1 für die Verwendung in den HSC-Chemotaxisexperimenten vorgezogen. Überraschenderweise erwies sich das weitverbreitete MSC Kulturmedium M2 [140] als nicht geeignet für die Untersuchung der HSC-Chemotaxis. Im Medium M2 findet keine SDF-1-Ausschüttung durch die MSC statt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass die MSC unter diesen Kulturbedingungen untereinander keine Connexin-Verbindungen ausbilden können und dadurch auch die Kalziumtransmission blockiert ist. Dies würde nach Schajnovitz et al. [152] auch dazu führen, dass die MSC kein SDF-1 ausschütten können.

Einfluss von AMD3100

Zusätzlich zur normalen SDF-1-Produktion wurde der Einfluss des nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Plerixafor) auf die SDF-1-Produktion der MSC und auf die Stammzellmigration untersucht. Die Messungen zeigten, dass AMD3100 keinen Langzeiteffekt auf die SDF-1-Produktion hat, und daher höchstwahrscheinlich den Prozess des HSC-homings nicht beeinflusst. Jedoch konnte ein interessanter Kurzzeiteffekt der SDF-1-Ausschüttung beobachtet werden - die gesamte Menge an intrazellulärem SDF-1 wird innerhalb weniger Stunden nach der AMD3100-Zugabe von den MSC ins Medium freigesetzt. Die schnelle Erholung der intrazellulären SDF-1-Konzentration und die Abnahme der SDF-1-Konzentration nach dem Maximum in der entsprechenden ELISA-Kurve (Abbildung 35 unten) führen zu der Annahme, dass das SDF-1 von den MSC wieder aus dem umgebenden Medium aufgenommen wurde. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen von Dar et al. bestätigt [153], wonach das SDF-1 über den CXCR4-Rezeptor auch von den MSC internalisiert werden kann. Folglich blockiert AMD3100 den CXCR4-Rezeptor nur für kurze Zeit, da der Rezeptor schon zwei bis vier Stunden nach der AMD3100-Zugabe wieder für SDF-1-Moleküle zugänglich ist. Neuere intrazelluläre SDF-1-Immunofluoreszenzfärbungen in Endothelzelllinien (Quelle: interne Kommunikation) ergaben, dass auch diese nach AMD3100-Zugabe ein ähnliches Sekretionsverhalten wie die MSC zeigen. In Anbetracht der Vielzahl SDF-1 exprimierender Zellspezies im Körper, was insbesondere auch die meisten Endothelzellen mit einschließt, kann geschlussfolgert werden, dass die plötzliche komplette SDF-1-Ausschüttung unter AMD3100 zu einer kurzzeitigen Destabilisierung des natürlichen SDF-1-Gradienten führen muss. Dies könnte unter anderen ein Grund für die erhöhte HSC-Mobilisierung unter der Anwendung von AMD3100 sein [150, 154].

3.4 Chemotaxis der Zelllinien gegenüber MSC

3.4.1 Zellinientest im Microwell

Die leukämische Zelllinie Jurkat (vgl. Absatz 2.3.3) wurde neben drei weiteren Zelllinien, HL-60, KG-1a und Kasumi, als Ersatzsystem für die seltener erhältlichen HSC auf ihre chemotaktische Aktivität gegenüber MSC überprüft. Hierfür wurden Microwell-Experimente mit den Zelllinien und MSC durchgeführt (Abbildung 38).

Über den Beobachtungszeitraum von 19 Stunden zeigten die Zellen der Linien HL-60 (Abbildung 38 A und B), KG-1a (Abbildung 38 C und D) und Kasumi (Ergebnis nicht gezeigt) keine Wanderungsaktivitäten in Richtung der MSC. Zwar fand während des Experimentes eine Verteilung der Zellhaufen im Microwell statt, diese ist aber auf die starke Vermehrung der Zellen und ihre rein statistische Bewegung zurückzuführen. Die Kasumi-Zellen bildeten bei ihrer Vermehrung zudem vorrangig Zellhaufen um die Mutterzelle und sind schon aufgrund dessen nicht für ein Einzelzelltracking geeignet. Die Migration der Zelllinien KG-1a und Kasumi wurde somit nicht weiter untersucht und ausgewertet. Auch die Zelllinie HL-60 selbst wurde nicht weiter für Migrationsversuche verwendet, aus dieser wurden aber für ausführlichere Chemotaxisexperimente die neutrophilen Granulozyten ausdifferenziert (siehe Kapitel 2.1.4).

Die Jurkat-Zellen erreichten im Microwell-Experiment als einzige die MSC in der Mitte des Microwells (Abbildung 38 E und F) und hafteten sich dann an diese. Es ist dabei zu beobachten gewesen, dass zumeist ganze Zellhaufen aus 3-5 Zellen entgegen der Neigung der Kammer in Richtung der MSC wanderten. Erst bei Erreichen dieser verteilten sich die Jurkatzellen über die Zelloberfläche der MSC und adhärirten daran (siehe Markierung in Abbildung 38 F). Weiterhin wurde das Migrationsverhalten der Zelllinie Jurkat unter einmaliger Zugabe von 500 ng/ml AMD3100 zum Kulturmedium untersucht. Auch in diesem Experiment erreichten die Jurkat-Zellen die MSC durch Migration entgegen der Microwellneigung. Die Jurkat-Zellen blieben allerdings nicht mehr an den MSC haften, sondern rutschten oftmals wieder zurück in Richtung des unteren Microwellrand.

3.4.2 Analyse der Jurkat-Migration

Um die Migration der Jurkat-Zellen im Microwell quantitativ auszuwerten, wurde das aufgenommene Microwell durch ein Abstandsraaster unterteilt (Abbildung 38 H) und anhand dessen ermittelt, wie weit und wie viele Zellen in Richtung der MSC migriert waren. Diese Auswertung ergab, dass ein Anteil von nur rund 10 % aller Jurkat-Zellen eindeutig in Richtung der MSC wanderte, also eine chemotaktische Aktivität aufwies (Abbildung 39, mittlere, rote Balken).

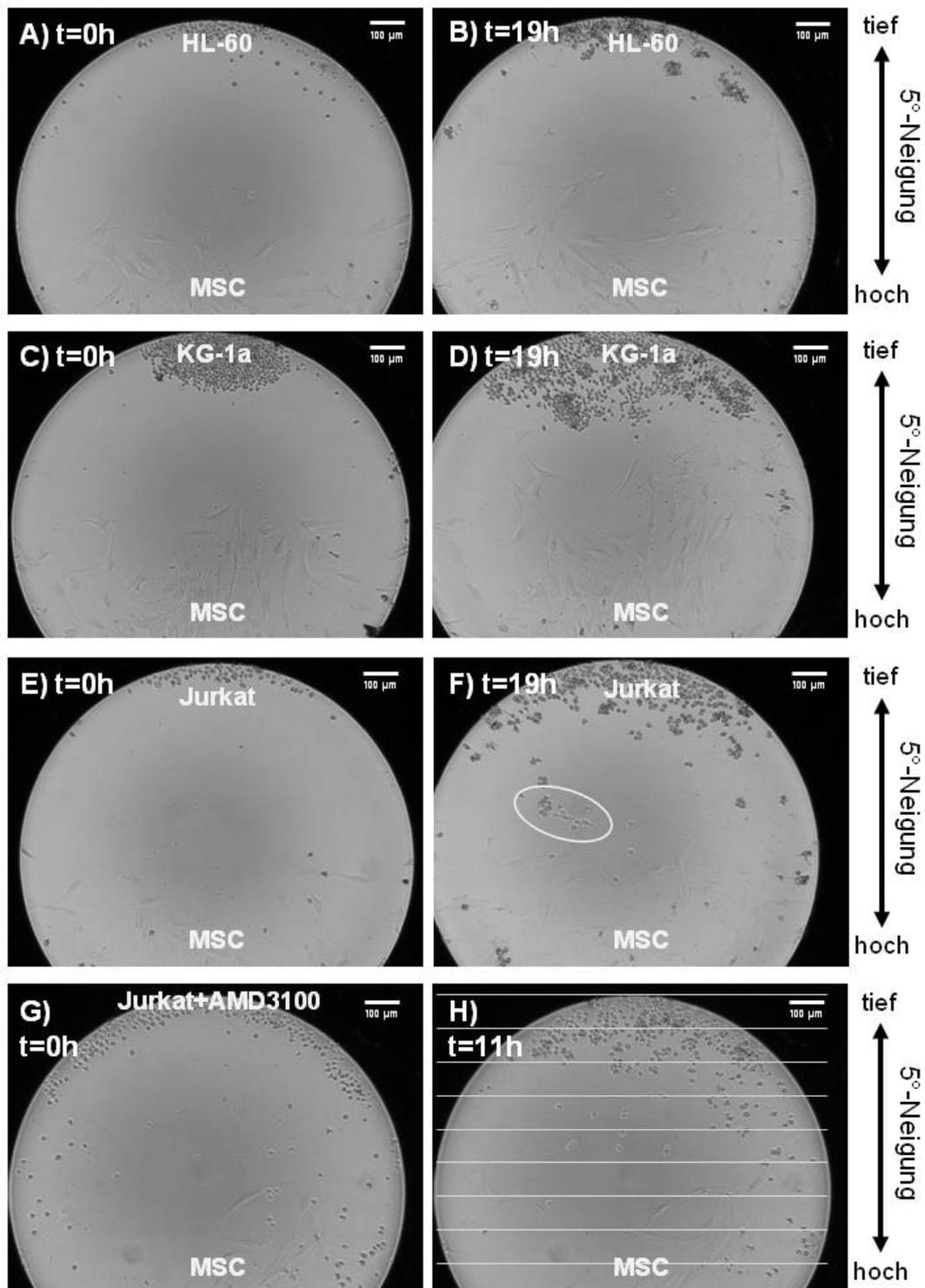


Abbildung 38: Migrationstest in Microwells einer um 5° gekippten Terasaki-Platte. A)+B): HL-60-Zellen zeigen keine Migration in Richtung MSC; C)+D): KG-1a-Zellen zeigen ebenfalls keine Migration in Richtung MSC; E)+F): Jurkat-Zellen migrieren zu den MSC und adhäreren dort, siehe markierter Bereich; G)+H): Jurkat-Zellen mit 500 ng/ml AMD3100 im umgebenden Kulturmedium zeigen geringere Migration zu den MSC und adhäreren nicht mehr an diesen. Viele der sich bei t=0h in Nähe der MSC befindenden Jurkat-Zellen können nicht adhären und rutschen zurück an den tieferen Rand. Das Gitter in H) verdeutlicht die zur Auswertung (Abbildung 39) genutzten Abstandsbereiche; alle Maßstabsbalken=100 µm.

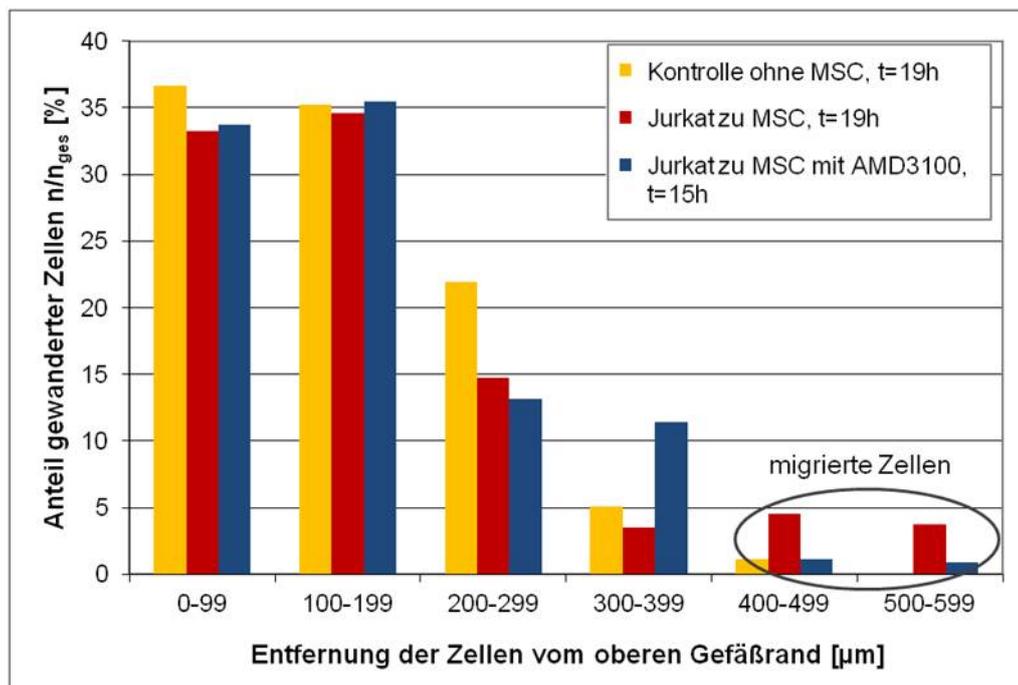


Abbildung 39: Wanderung von Jurkat-Zellen im Microwell einer Terasaki-Platte. Der Anteil migrierender Zellen (>400 µm) ist mit weniger als 10 % aller Zellen sehr gering.

Die Kontrolle dagegen zeigt eine statistische, in etwa gaußförmige Verteilung der Zellen aufgrund ihrer ungerichteten Zellbewegung (Abbildung 39, erste, gelbe Balken). Bei der Auswertung der Migration unter AMD3100 (Abbildung 39, letzte, blaue Balken) ist auffällig, dass der Anteil der bis zu den MSC migrierten und daran anhaftenden Zellen sehr gering ist (>400 µm, 2 %). Dafür ist der Anteil der Zellen im mittleren Abstandsbereich (300-399 µm) im Vergleich zur Kontrolle wesentlich erhöht. Dieses Ergebnis spiegelt ebenfalls wider, dass die Jurkat-Zellen unter AMD3100 zwar in Richtung der MSC migrieren, aber nicht daran haften bleiben können. Insgesamt zeigten die Zellen unter AMD3100 eine geringere Tendenz in Richtung der MSC zu wandern.

3.4.3 Diskussion der Migration der Zelllinien

Eine Verwendung der Zelllinien Jurkat, HL-60, KG-1a und Kasumi in horizontalen Migrationsversuchen wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Zepeda-Moreno et al. [83] haben kürzlich die Adhäsion von Jurkat-Zellen unter Einwirkung des Chemokins SDF-1 untersucht, welches auch von den MSC ausgeschüttet wird und auch für die Jurkat-Migration eine Rolle spielt [155-157]. Daneben wurde die Migration und Chemotaxis von T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen, sowie die zugehörigen Signalwege, nur anhand von Transwell-Migrationsexperimenten untersucht [158, 159].

Wie die Chemotaxisexperimente in dieser Arbeit zeigen, weisen die leukämischen Zelllinien kein beziehungsweise ein nur sehr geringes Migrationsvermögen gegenüber MSC auf. Lediglich für die Jurkat-Zellen konnte die Chemotaxis in Bezug auf die MSC quantitativ ausgewertet werden. Hierzu muss allerdings auch angemerkt werden, dass erstens das räumlich getrennte Einpipettieren von zwei Zellspezies in das nur 1 mm Durchmesser große Microwell äußerst schwierig ist, und zweitens auch die quantitative Auswertung der Zellmigration aufgrund der runden Kammerform kaum zu vereinfachen und kritisch zu überdenken ist.

Durch eine Zugabe von AMD3100 verringerte sich insgesamt die Migration der Jurkat-Zellen in Richtung der MSC. Die Jurkat-Zellen adhärten auch nicht mehr an den MSC, wenn sie diese erreichten. Für HSC tritt dieser Effekt gleichermaßen auf. Von Faber et al. wurde für die HSC gezeigt, dass AMD3100 eine Verringerung der Zelladhäsion an MSC zur Folge hat und dass AMD3100 eine verringerte CXCR4-Expression auf der HSC-Zelle hervorruft [145]. Auf die Zelllinie Jurkat, welche ebenso in hohem Maße CXCR4 exprimiert wie die HSC [155], hat AMD3100 offensichtlich einen gleichen Einfluss, was zur Verringerung der chemotaktischen Migration in Richtung MSC und zum Verlust der Adhäsion an diesen führt.

Zusätzlich zu den gezeigten Ergebnissen wurden für diese Arbeit noch einige Migrationsexperimente mit Jurkat-Zellen und rekombinantem SDF-1 in Mikrostrukturen durchgeführt. Die Jurkat-Zellen zeigten jedoch in diesen Versuchen überhaupt nur selten eine Reaktion auf das SDF-1, oder es migrierte nur ein sehr geringer Anteil der Zellen. Gründe hierfür könnten ein unangepasster chemischer Attraktantgradient (zu steil/zu flach), eine eingeschränkte biologische Aktivität des rekombinanten SDF-1 oder ein unzureichendes Migrationsvermögen der Jurkat-Zellen selber gewesen sein. Letzteres könnte beispielsweise durch eine verstärkte Aktivierung der Zelladhäsion durch das SDF-1 im Zusammenspiel mit CD44 hervorgerufen werden [35], die das Migrationsbestreben der Zellen überlagert. Es wurden deshalb keine weiteren Chemotaxisexperimente mit den Jurkat-Zellen durchgeführt, obwohl sie als Modell für die chemotaktische Wanderung der Stammzellen durch ihre Größe, Form und Migrationsverhalten am ähnlichsten sind.

3.5 Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind eine der mobilsten Blutzellspezies und werden daher oft in Migrations- und Podienbildungsversuchen eingesetzt. Da ihr chemotaktisches Verhalten vergleichsweise gut untersucht ist, stellen sie ein optimales Modellsystem zum Test neuer experimenteller Aufbauten dar. Auch mehrere Attraktantsubstanzen für die Neutrophile, beispielsweise das Formyl-Tripeptid fMLP und das Chemokin IL8 [89], sind bereits bekannt und konnten für die Chemotaxisexperimente angewandt werden.

3.5.1 Filopodienbildung

Die Filopodienbildung der neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) nach Zugabe verschiedener Attraktantsubstanzen wurde anhand mikroskopischer Aufnahmen mit anschließender automatisierter Bildauswertung (Programm ImageJ) untersucht (siehe Absatz 2.3.3). Dabei konnte für alle Attraktanten, fMLP, IL8 und PAF, eine signifikante Zunahme der Filopodienbildung gegenüber der Kontrolle ohne Attraktant als Indiz für eine gesteigerte Motilität [99] der Neutrophile festgestellt werden (Abbildung 40). Für den Aufnahmezeitpunkt 30 min nach Attraktanzugabe zeigten die Neutrophile auf die höhere Konzentration (500 nM) an Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) die stärkste Filopodienbildungsreaktion. Für die geringere PAF-Konzentration (100 nM) war dagegen der Unterschied zur Kontrolle nicht statistisch signifikant. Im Transwell-Experiment wurden daher 500 nM PAF eingesetzt.

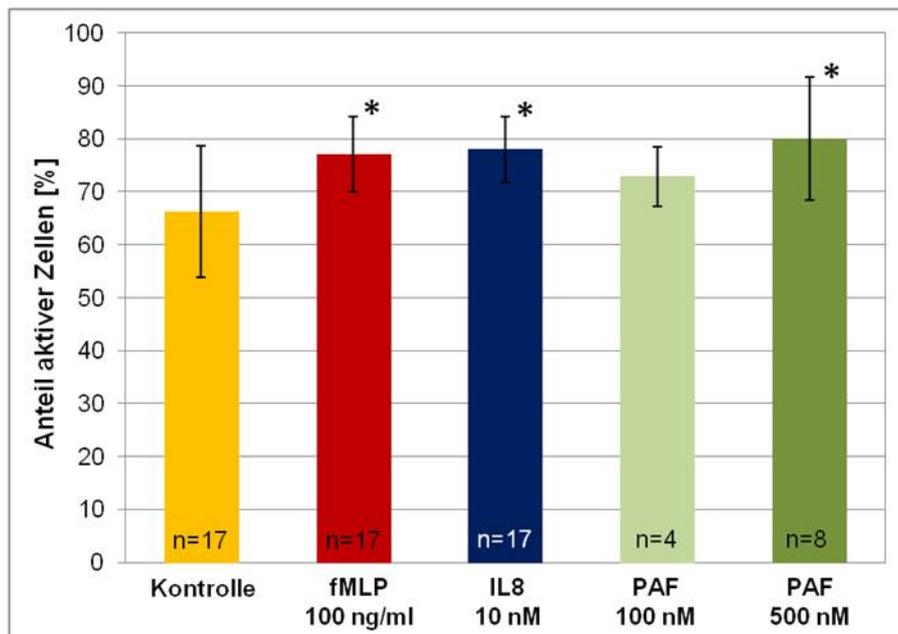


Abbildung 40: Filopodienbildung der neutrophilen Granulozyten in Gegenwart verschiedener Chemoattraktanten. Dargestellt ist der Anteil aktiver, nicht-runder Neutrophilzellen mit Filopodien und Lamillipodien bezogen auf die Gesamtanzahl aller Zellen; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert, * t-Test mit $P < 0,01$ [160].

Die Unterschiede in der Filopodienbildung zwischen den einzelnen Attraktanten sind aber sehr gering, jeweils 75-80 % der Zellen weisen unter Attraktanteinfluss eine deutliche Podienbildung auf. Rein anhand dieser Studie wären also alle getesteten Chemoattraktanten gleich gut für die Verwendung in weiteren Chemotaxisexperimenten mit den Neutrophilen geeignet.

3.5.2 Neutrophile im Transwell-Assay

Im standardisierten Transwell-Experiment wurde getestet, welcher der Chemoattraktanten, fMLP, IL8 und PAF, tatsächlich zu einer aktiven Transmigration der Neutrophile führt. Wie auch bei der Filopodienbildung reagierten die Neutrophile eindeutig auf jeden der Botenstoffe (Abbildung 40). Die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ohne Chemokin waren aber auch hier mit einer 2,5fachen (IL8) bis maximal 6fachen (PAF) Migrationsrate nach einer Stunde Inkubationszeit eher gering. Die Neutrophile reagierten nach einer Stunde ebenfalls auf PAF am stärksten. Diese Beobachtung deckt sich auch mit der am stärksten ausgeprägten Filopodienbildung durch PAF nach einem Zeitraum von 30 min (vgl. Abbildung 40).

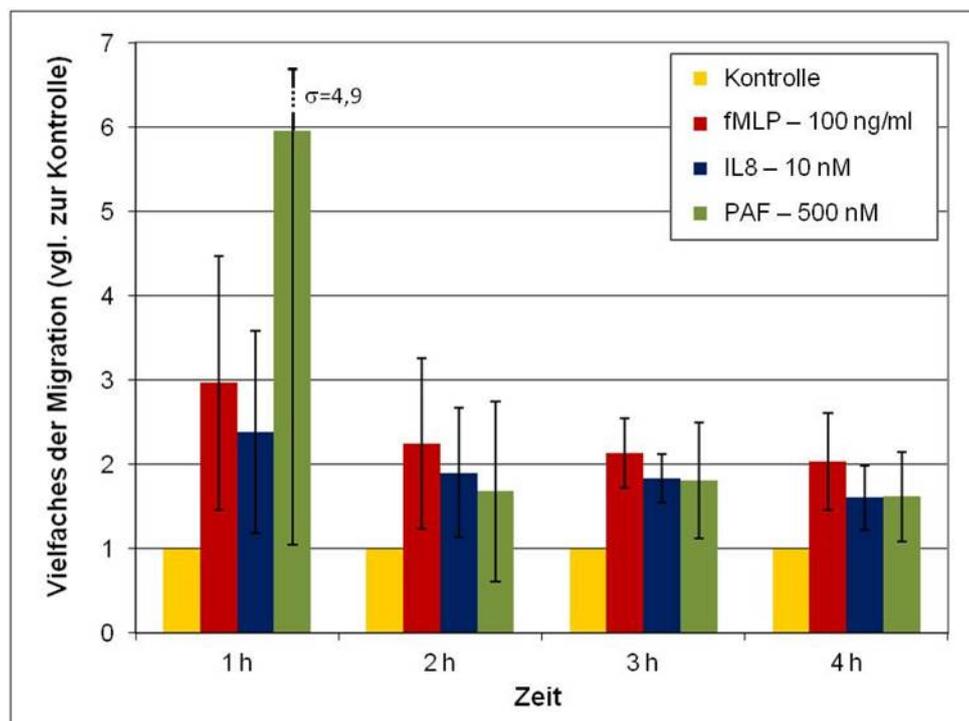


Abbildung 40: Chemotaxis der Neutrophile gegenüber verschiedenen Chemoattraktanten im Transwell-Experiment. Aufgetragen ist das Verhältnis der Anzahl migrierter Zellen mit Attraktant zur Anzahl migrierter Zellen der Kontrolle ohne Attraktant. Die Auszählung der gewanderten Zellen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, um die Dynamik der Botenstoffwirksamkeit aufzuzeigen; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (n=4).

Die Durchführung einer Zeitserie ermöglicht auch im Transwell-Experiment die Untersuchung der Dynamik der Neutrophilchemotaxis in Bezug auf die verschiedenen Attraktanten. Durch die zusätzliche Auszählung der in die untere Kammer gewanderten Zellen nach 2, 3 und 4 Stunden Inkubationszeit wird deutlich, dass die chemotaktische Antwort auf den PAF zwar am schnellsten geschaltet wird (Abbildung 40, 1h), aber ebenso schnell wieder nachlässt. Bereits nach zwei Stunden im Transwell übersteigt die fMLP- und IL8-aktivierte Migration der Zellen sogar die PAF-aktivierte Migration. FMLP und IL8 führen also zu einer länger anhaltenden chemotaktischen Reaktion der Neutrophile als PAF. So konnte für fMLP auch noch nach vier Stunden eine doppelt so hohe Anzahl migrierter Zellen ermittelt werden wie in der Kontrolle. Durch die längere chemotaktische Wirksamkeit von fMLP wurde dieser Botenstoff als Attraktant für die Migrationsexperimente in den Mikrostrukturen ausgewählt.

3.5.3 Migration in Mikrostrukturen

Chemotaxisexperimente in Microwells und im Transwell ermöglichen keinen ausreichenden Zugang zu dynamischen Wanderungsparametern der Zellbewegung und deren Quantifizierung. Besonders im Transwell-Assay fehlt die Möglichkeit einer mikroskopischen Beobachtung und Kontrolle der Zellmigration. Mikrofluidische Systeme bieten aufgrund der durchsichtigen Materialien diese Möglichkeit der Observierung des Verhaltens sowohl von Einzelzellen als auch von einer Zellgesamtheit. Botenstoffquelle und wandernde Zellen können in Mikrostrukturen räumlich getrennt und Attraktantgradienten gezielt eingestellt werden. Zum Test des in dieser Arbeit entwickelten mikrofluidischen Systems wurde anstelle der raren und sensiblen hämatopoietischen Stammzellen ein auf Zelllinien basiertes Modellsystem gesucht. Leukämische Blutzelllinien zeigten dabei eine zu schwache chemotaktische Migration gegenüber MSC. Deshalb wurden die ausdifferenzierten neutrophilen Granulozyten mit einer künstlichen Botenstoffquelle, für die auch der Attraktantgradient in den Mikrostrukturen einfacher definiert werden kann, als Modellsystem verwendet. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse zur Migration von neutrophilen Granulozyten wurden anhand von 15 unabhängigen Chemotaxisexperimenten in Mikrostrukturen gewonnen. Die Auswertungen zur Neutrophilmigration in den mikrostrukturierten Systemen zeigen, welche Informationen zur Chemotaxis von humanen Blutzellen anhand dieses mikrofluidischen Experimentes gewonnen werden können.

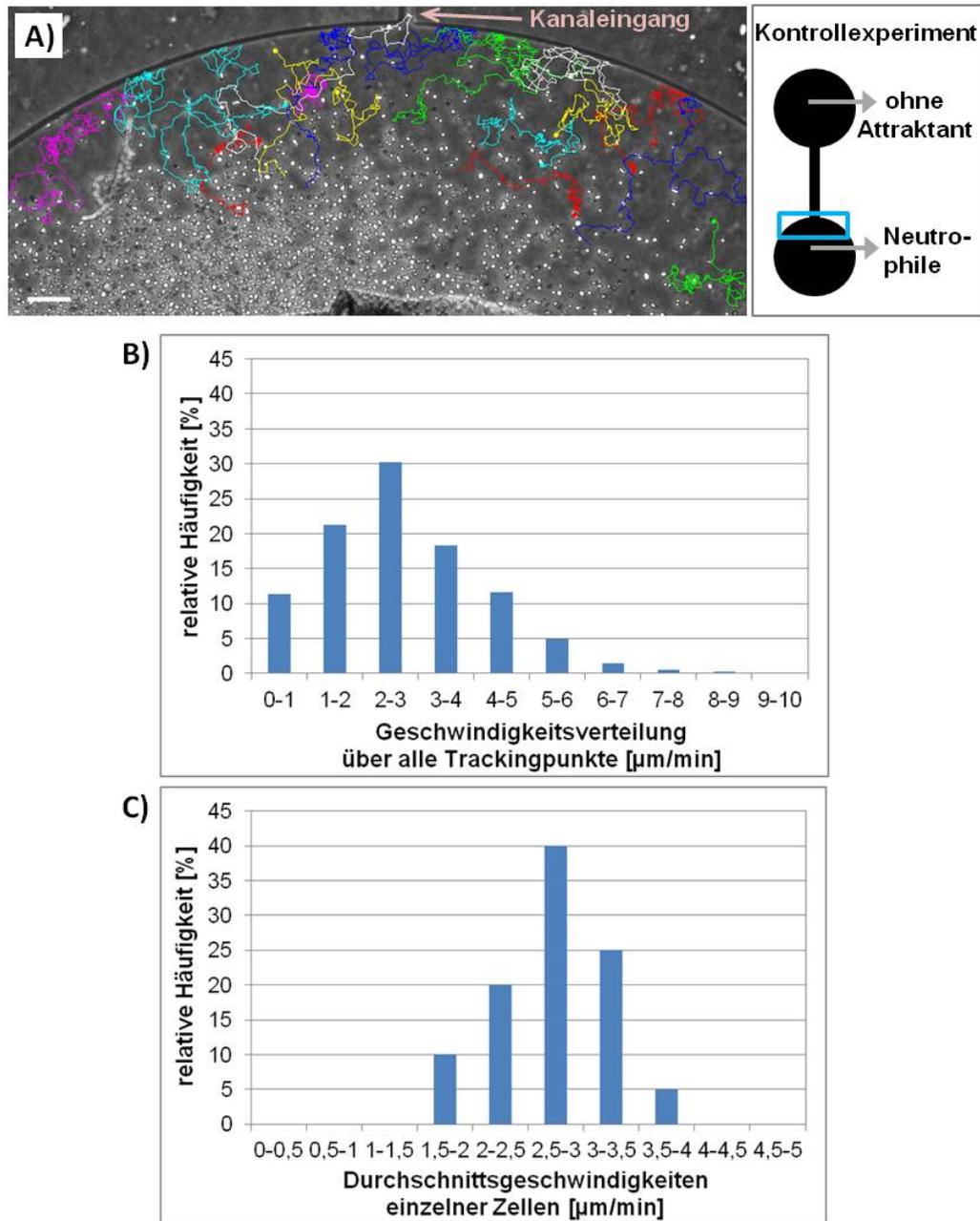
Kontrollexperiment ohne Attraktant

Abbildung 41: Bewegung der Neutrophile ohne Attraktanteinfluss (Kontrolle): A) Trackingpfade der Neutrophilbewegung im Zellreservoir der rechts gezeigten Mikrostruktur (Maßstabsbalken=100 µm), B) Geschwindigkeitsverteilung über alle Trackingpunkte ($n=3757$, $v_d=2,75$ µm/min, $\sigma=1,45$ µm/min) und C) Geschwindigkeitsverteilung der mittleren Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellen ($n=20$, $v_d=2,79$ µm/min, $\sigma=0,18$ µm/min).

Zunächst wurde die Bewegung der Neutrophile im Zellreservoir ohne Attraktanteinfluss ausgewertet (Abbildung 42). Die Bewegungspfade der Zellen zeigen, dass die Neutrophile sich größtenteils ungerichtet und keinem bestimmten Muster folgend im Reservoir bewegten (Abbildung 42 A). Charakteristisch sind die vielen Richtungswechsel und teilweise auftretende kreisförmige Bewegungen auf kleinem Gebiet, dies zeigt beispielsweise der grüne Trackingpfad in der rechten unteren Bildecke. Aus der Gesamtheit aller einzelnen Bewegungsschritte der Zellen, also den Geschwindigkeiten aller Trackingpunkte, lässt sich eine Geschwindigkeitsverteilung mit einem Maximum bei 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ erstellen (Abbildung 42B). Demnach bewegten sich die Zellen nur sehr selten schneller als 6 $\mu\text{m}/\text{min}$. Diese Verteilung spiegelt zwar mit einem Geschwindigkeitsmittelwert von 2,75 $\mu\text{m}/\text{min}$ gut die allgemeine Bewegung der Neutrophile wider, es können daraus aber keine Aussagen über die Bewegung der einzelnen Zellen getroffen werden, und ob diese sich sehr unterschiedlich verhalten. Daher wurden in einer zweiten Geschwindigkeitsverteilung die Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen Neutrophilzellen, also die mittlere Geschwindigkeit resultierend aus jeweils einem Trackingpfad, aufgetragen (Abbildung 42C). Auch in dieser Auftragung liegt der Geschwindigkeitsmittelwert ähnlich dem ersteren bei 2,79 $\mu\text{m}/\text{min}$. Die Verteilung fällt gleichförmig um das Maximum bei 2,5-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ ab, es gibt also bei der Neutrophilbewegung ohne Attraktant im Reservoir keine besonders schnellen oder langsamen Zellen. Der Hauptanteil mit 65 % aller Zellen bewegt sich durchschnittlich mit Geschwindigkeiten von 2,5-3,5 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Analyse der Migrationsgeschwindigkeit unter Attraktanteinfluss

Für Neutrophile im Zellreservoir unter Attraktanteinfluss (hier: fMLP) ergibt sich bei der Auftragung der Geschwindigkeiten resultierend aus allen Trackingpunkten keine Normalverteilung mehr (Abbildung 43A). Neben dem Hauptmaximum bei 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$ wurde ein zweites Maximum bei 9-10 $\mu\text{m}/\text{min}$ gefunden. Dieser signifikante Anteil schnellerer Zellbewegungen führt zu einer Erhöhung des Gesamtmittelwertes auf 3,93 $\mu\text{m}/\text{min}$. In diesem Fall können aus der Auftragung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellen zwei verschiedene Zellfraktionen abgeleitet werden (Abbildung 43B). Es treten unter Attraktanteinfluss weiterhin sich langsam bewegende Zellen wie in der Kontrolle ohne Attraktant auf (siehe Abbildung 43B, 1. Maximum bei 2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$), aber auch eine Fraktion schnellerer Zellen mit Durchschnittsgeschwindigkeiten von 6-12 $\mu\text{m}/\text{min}$. Diese zwei Bewegungsmodi spiegeln sich auch deutlich in den Migrationspfaden der Zellen wieder. Die langsamen Zellen (Abbildung 43C) bewegten sich zwar unter dem fMLP-Einfluss gerichtet in Richtung Kanaleingang, jedoch mit vielen stärkeren Richtungswechseln und teilweise ebenfalls noch mit zwischenzeitlichen kreisförmigen Bewegungen. Die schnellen Zellen dagegen weisen eher über längere Strecken geradlinige Migrationspfade mit nur wenigen schwächeren Richtungswechseln auf (Abbildung 43D).

Diese schnellen Neutrophile migrierten insgesamt ungerichteter als die langsamen, es war keine vorrangige Bewegung in Richtung Kanaleingang erkennbar. Außerdem bildeten diese sich schneller bewegenden Zellen oftmals auch extrem lange Filopodien mit über 30 μm Länge aus.

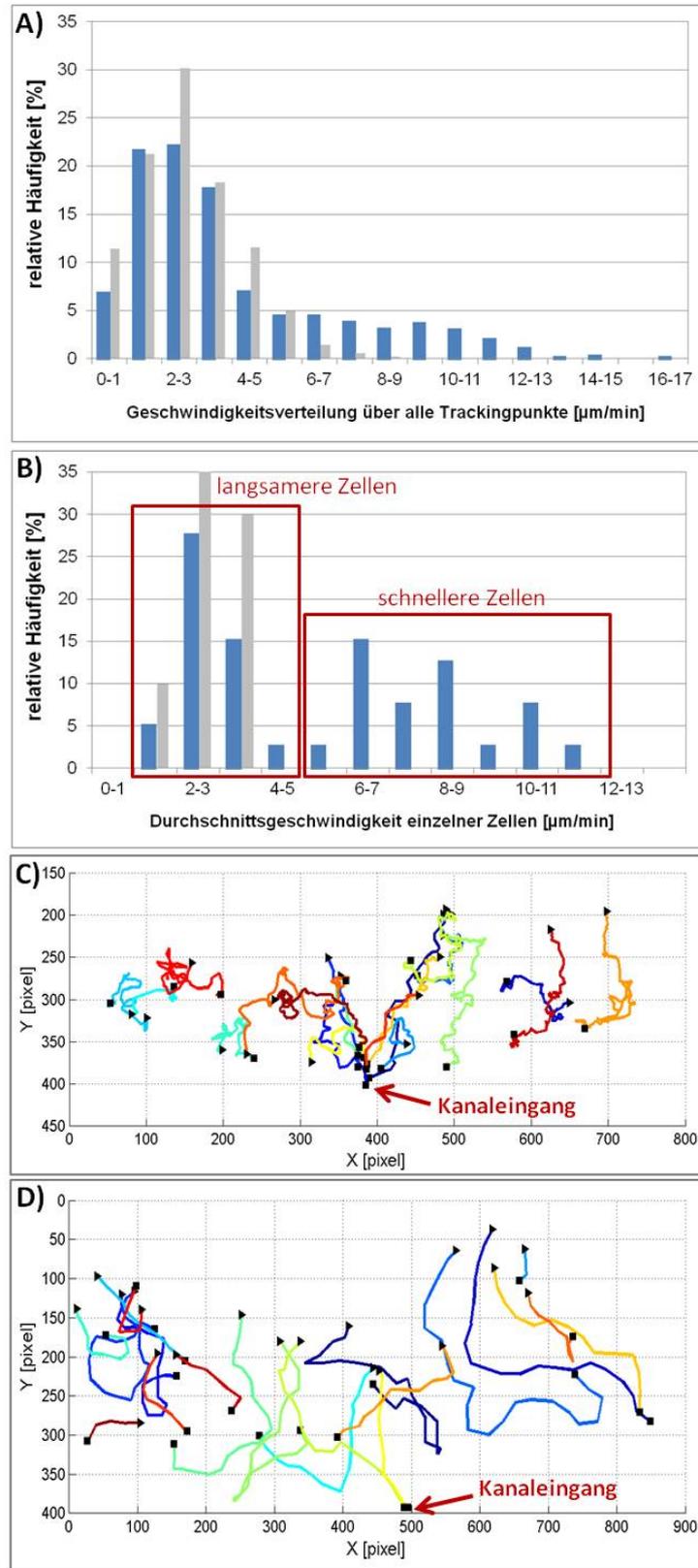


Abbildung 42: Geschwindigkeitsmodi der Neutrophile im Zellreservoir unter Attraktant-einfluss (hier: 500 ng/ml fMLP im Attraktantreservoir): A) Die Geschwindigkeitsverteilung über alle Trackingpunkte der Neutrophilbewegung im Zellreservoir unter Attraktanteinfluss zeigt keinen normalverteilten Verlauf sondern ein verdecktes zweites Maximum bei etwa 9-10 $\mu\text{m}/\text{min}$ ($n=1099$, $v_d=3,93 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=2,93 \mu\text{m}/\text{min}$). Die Geschwindigkeitsverteilung der Kontrolle ohne Attraktant ist zum Vergleich hellgrau eingezeichnet. B) In der Auftragung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen Neutrophilzellen erhält man zwei klar getrennte Fraktionen mit langsameren und schnelleren Zellen (Kontrolle zum Vergleich in hellgrau). Auch die Trackingpfade C) der langsamen und D) der schnellen Zellen unterscheiden sich deutlich voneinander (Anfangsposition = Dreieck, Endposition = Quadrat, Maßstab: 1 Pixel = 0,63 μm).

Auffallend ist jedoch, dass die schnelle Zellfraktion vor allem zu Beginn des Experimentes während der ersten vier Stunden Aufnahmezeit dominierte. Die Auftragung aller Einzelgeschwindigkeiten über die experimentelle Laufzeit zeigt eine deutliche Abnahme der Durchschnittsgeschwindigkeit von circa 8 $\mu\text{m}/\text{min}$ auf unter 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ nach sechs Stunden (Abbildung 43). Dieses Verhalten könnte einerseits als Ermüdung der Zellen aufgrund der in der Mikrostruktur aufgebrauchten Nährstoffe interpretiert werden, wobei diese Tendenz ohne Chemoattraktant nicht auftrat. Andererseits könnte es sich bei der schnelleren Zellbewegung auch um eine Aktivierung der Zellen durch bereits nur wenige Attraktantmoleküle handeln, die vergleichbar zu den Ergebnissen des Transwell-Experimentes nach einigen Stunden nachlässt (vgl. Abbildung 40). Die verstärkte Filopodienbildung der schnellen Neutrophile in dieser Anfangsphase deutet eher auf eine Aktivierung der Zellbewegungen durch den Attraktanteinfluss hin.

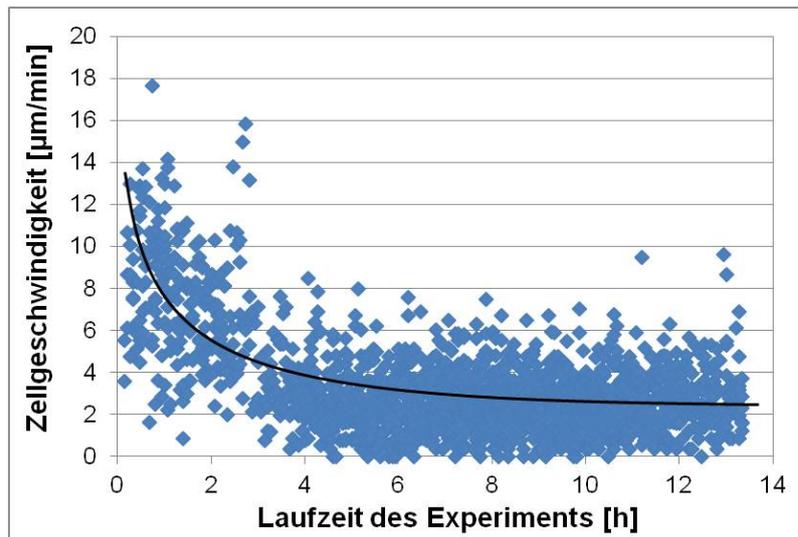


Abbildung 43: Zellgeschwindigkeiten der Neutrophile im Zellreservoir (alle Trackingpunkte) im Verlauf der experimentellen Messzeit: Die Neutrophile im Zellreservoir zeigen während der 13 Stunden des Experimentes eine deutliche Abnahme ihrer Aktivität, die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit sinkt dabei von etwa 8 $\mu\text{m}/\text{min}$ auf unter 3 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Korrelation der Migrationsgeschwindigkeit mit der Absolutkonzentration

Die Chemotaxisexperimente in den Mikrostrukturen bieten den großen Vorteil, dass der Konzentrationsgradient und die Absolutkonzentrationen im Kanalsystem und den Reservoiren aufgrund der vorgegebenen Geometrie berechenbar sind. So können die Ergebnisse aus der reinen Geschwindigkeitsanalyse auch diskreten Konzentrations- und Gradientenwerten zugeordnet werden, womit eine Quantifizierung der Neutrophilchemotaxis möglich wird. Abbildung 44 zeigt die gemessenen Durchschnittsgeschwindigkeiten der Neutrophile in Bezug zu der jeweils zugehörigen Absolutkonzentration an Attraktant (Abbildung 44A).

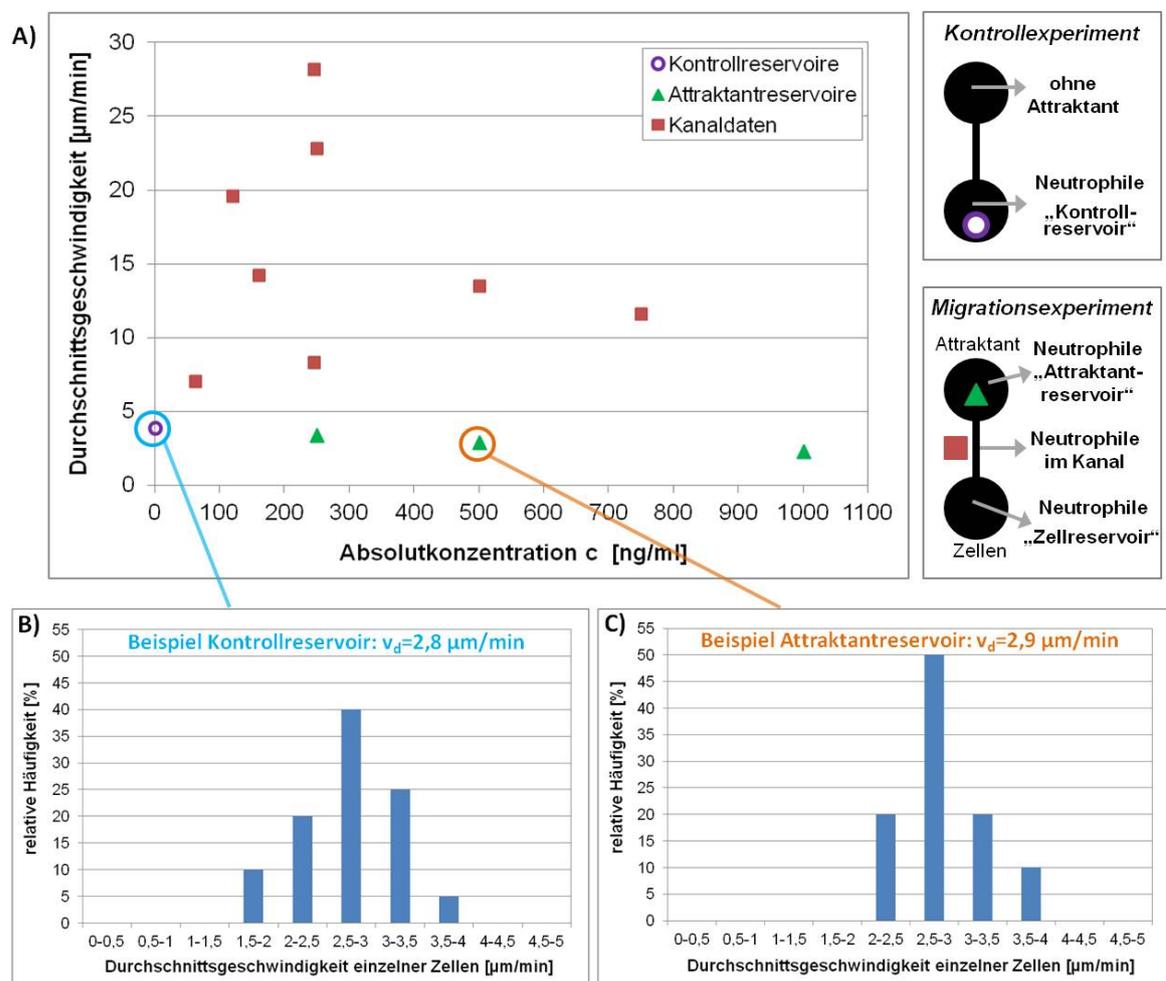


Abbildung 44: A) Abhängigkeit der Neutrophilmigration von der Absolutkonzentration des Attraktanten fMLP in den Mikrostrukturen. Hierfür wurde die Migrationsgeschwindigkeit v der Neutrophile in verschiedenen Bereichen der Mikrostrukturen ausgewertet (Erläuterung der Symbole siehe auch Abbildung 45): B) Beispiel für eine Geschwindigkeitsverteilung in einem der vier Kontrollexperimente ohne Chemokin und C) Beispiel für eine im Attraktantreservoir gemessene Geschwindigkeitsverteilung bei einer fMLP-Absolutkonzentration von $c=500 \text{ ng/ml}$.

Die Absolutkonzentration des Chemoattraktanten hat demnach keinen direkten Einfluss auf die Neutrophilgeschwindigkeit. Besonders deutlich wird dies anhand der Reservoirdaten: In den Kontrollreservoirien ohne Attraktant (Abbildung 44B) wurden ähnliche Zellgeschwindigkeiten und Geschwindigkeitsverteilungen erhalten wie für die Bewegung der Zellen in den Attraktantreservoirien, wo eine hohe Absolutkonzentration an Botenstoff vorhanden ist (Abbildung 44C). Die in den Attraktantreservoirien ausgewerteten Zellen haben den Kanal bereits passiert. Nur innerhalb der Kanäle fand eine schnellere Bewegung der Neutrophile statt (Abbildung 44A, rote Quadrate). Der Mittelwert der Durchschnittsgeschwindigkeiten aus allen ausgewerteten Kanalabschnitten beträgt $23,2 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=20$, $\sigma=19,6 \mu\text{m}/\text{min}$), wobei die jeweiligen Geschwindigkeiten eine sehr starke Streuung aufweisen. Zwischen der Neutrophilgeschwindigkeit und der Absolutkonzentration in den entsprechenden Kanalabschnitten ist deshalb keine sinnvolle Korrelation möglich.

Korrelation der Migrationsgeschwindigkeit mit dem Konzentrationsgradienten

Dagegen kann bei der Auftragung der Zellgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom vorherrschenden Konzentrationsgradienten (Abbildung 45A) für die Kanaldaten ein linearer Zusammenhang gefunden werden. In allen Reservoirien (vgl. Abbildung 45B-D) und in den langen Kanalwegen (vgl. Abbildung 45D) bewegen sich die Neutrophile mit durchschnittlichen Geschwindigkeiten von $3-4 \mu\text{m}/\text{min}$. In diesen Bereichen der Mikrostruktur gibt es keinen (Kontrollreservoirie) oder einen nur sehr flachen (langer Kanalweg) Botenstoffgradienten. Auch in den Zellreservoirien und Attraktantreservoirien herrscht größtenteils, bis auf den Bereich direkt vor den Kanaleingängen, ein sehr flacher Gradient. Mit dem steileren Botenstoffgradient in den Kanälen nimmt tendenziell auch die Geschwindigkeit der Neutrophile bis zu $20 \mu\text{m}/\text{min}$ zu (Abbildung 45A). Ab etwa einem Gradienten von $50 \text{ ng}/(\text{ml mm})$ erhöht sich die Migrationsgeschwindigkeit der Neutrophile signifikant. Vereinzelt treten allerdings außerhalb dieser Korrelation auch höhere Migrationsgeschwindigkeiten der Neutrophile auf. Diese höheren Ausreißerwerte (Abbildung 45A) können aber jeweils mobileren Zellchargen zugeordnet werden, sind also auf die Qualität der Neutrophile zurückzuführen.

Generell konnten die Neutrophile bei ihrer Migration durch verzweigte Kanalsysteme dem steileren Konzentrationsgradienten nachfolgen. Über 90 % der Zellen wählten den kürzeren Kanalweg und folgten damit dem steileren Konzentrationsgradienten. Der fMLP-Gradient in den kürzeren Kanalwegen betrug dabei zwischen 120 und $160 \text{ ng}/(\text{ml mm})$, der in den langen Kanalwegen 20 bis $30 \text{ ng}/(\text{ml mm})$ (Mikrostruktur siehe Abbildung 45D). Dabei wurde die Steilheit des Gradienten im kurzen, direkten Kanalweg anhand der Konzentrationsdifferenz zwischen den Reservoirien unter der Annahme eines stationären linearen Gradienten berechnet. Die Steilheit des Gradienten im langen Kanalweg wurde

anhand der Konzentrationsdifferenz zwischen den Verzweigungspunkten unter der Annahme eines stationären linearen Gradienten berechnet. Der Unterschied in der Gradientensteilheit, den die Neutrophile noch wahrnehmen können, sollte dabei in etwa dem Mindestkonzentrationsgradienten zur Auslösung der Chemotaxis entsprechen. Für beide Parameter ist der Unterschied zwischen der Rezeptorbelegung mit Attraktant am führenden und am hinteren Zellende entscheidend, wonach die Zelle mit der Migration beginnt oder den Migrationsweg mit steilerem Gradienten wählt.

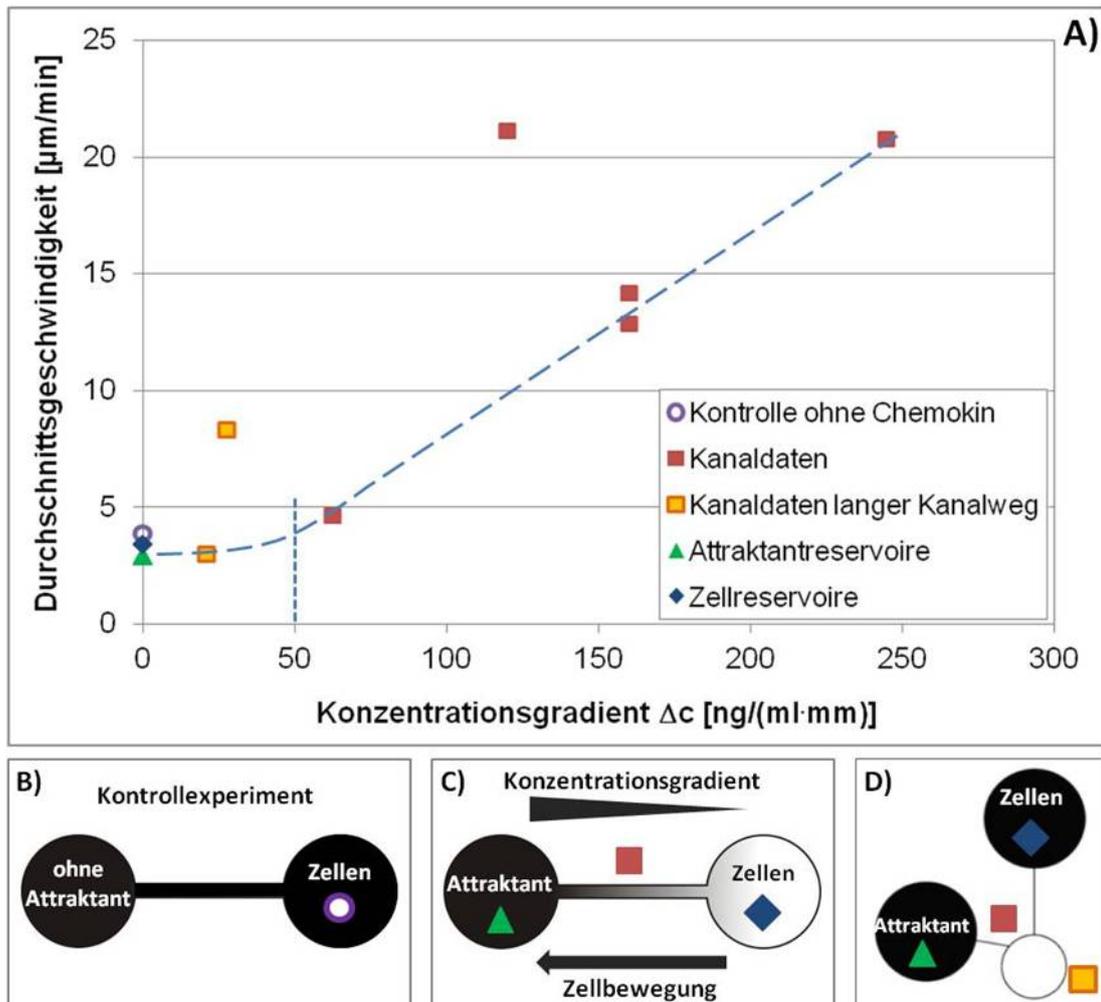


Abbildung 45: A) Abhängigkeit der Neutrophilmigration von der Steilheit des in den Mikrostrukturen ausgebildeten Konzentrationsgradienten. Hierfür wurde die Zellmigrationsgeschwindigkeit v in den Reservoiren und in verschiedenen Bereichen der Kanäle ausgewertet: B) Im Kontrollexperiment (vgl. Abbildung 20) wurde die Zellbewegung ohne fMLP ausgewertet, violetter Kreis ($v_d=3,86 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,89 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=4$); C) für die Versuche mit Attraktant erfolgte die Auswertung der Zellbewegung im Zellreservoir (steiler Abfall des Gradienten bis auf quasi unendliche Verdünnung), blaue Raute ($v_d=3,41 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,77 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=5$), und im Attraktantreservoir (quasistationäre Ausgangskonzentration an fMLP), grünes Dreieck ($v_d=2,93 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,45 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=5$); sowie D) bei verzweigten Strukturen für die verschiedenen langen Kanalabschnitte (der längere Kanalweg führt zu einem flacheren Gradienten).

Sensitivität der Zellen – Schwellwertermittlung

Beim Übergang vom Kanal in das Zellreservoir fällt die Botenstoffkonzentration aufgrund der plötzlichen zweidimensionalen Geometrie stark ab (vgl. Simulationsrechnung Kapitel 3.2.1 und Abbildung 47). Daher wurden die Migrationsgeschwindigkeiten in diesem Bereich der Mikrostruktur genauer analysiert, um einen Konzentrationsschwellwert der Neutrophilchemotaxis zu ermitteln.

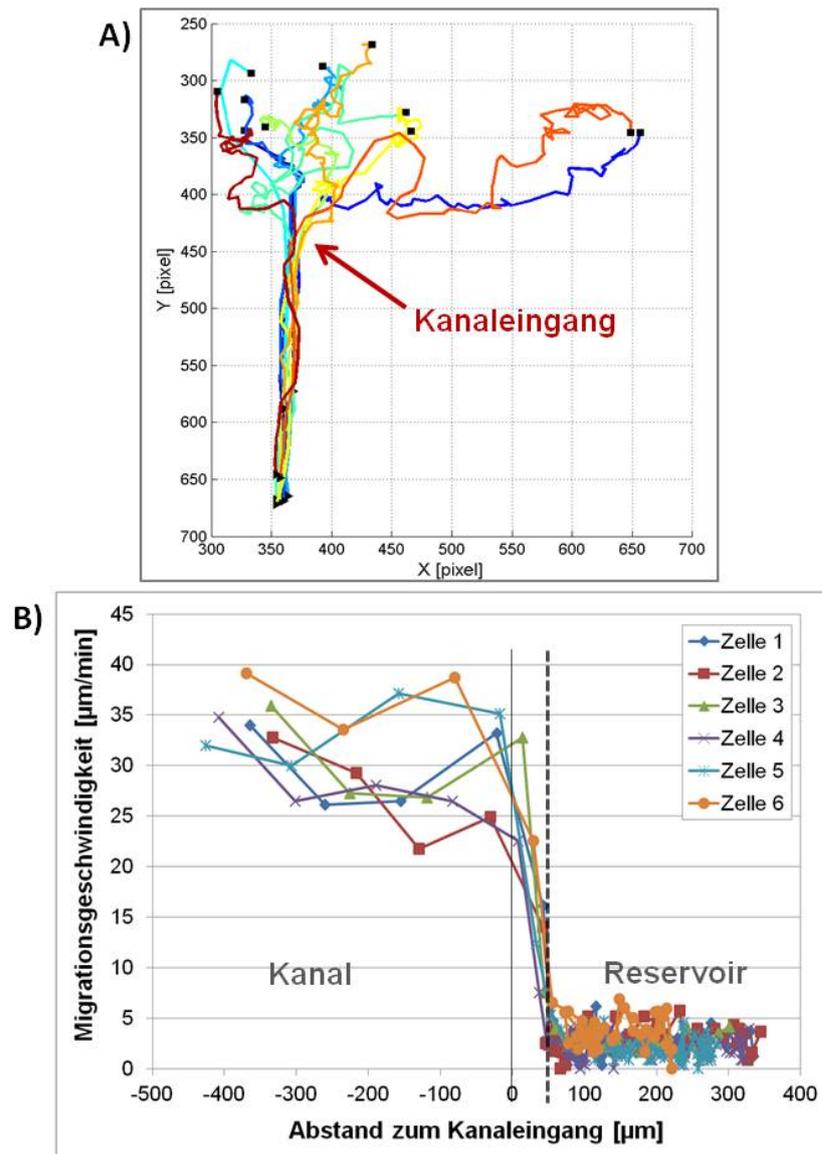


Abbildung 46: Migrationsgeschwindigkeiten der Neutrophile beim Übergang vom Zellreservoir in den Kanal (Attraktant: fMLP 500 ng/ml): A) Die Wanderungspfade einzelner Zellen wurden vom Reservoir bis in den Kanal hinein durch manuelles Zelltracking verfolgt und anhand dessen der jeweilige Abstand der Zelle zum Kanaleingang sowie die Migrationsgeschwindigkeit zwischen den Trackingpunkten bestimmt (Maßstab: 1 Pixel = 0,63 μm); B) Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit vom Abstand zum Kanaleingang ($x=0 \mu\text{m}$) aufgetragen, für Werte größer null befand sich die Zelle also im Reservoir, für Werte kleiner null im Kanal. Ab einer Entfernung von ca. 40-50 μm zum Kanaleingang fand eine Beschleunigung der gerichteten Zellbewegung statt.

Anhand der Migrationspfade der Neutrophile in der Nähe des Kanaleinganges (Abbildung 46A) wurden der exakte Abstand der einzelnen Zellen zum Kanaleingang und die zugehörigen Wanderungsgeschwindigkeiten ermittelt. Die Auftragung der Migrationsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit vom Abstand der Zelle zum Kanaleingang (Abbildung 46B) zeigt, dass sich die Zellbewegung bereits 40 bis 50 μm , dies entspricht etwa 3 bis 5 Zelllängen, vor Kanalbeginn beschleunigt. Es kann also angenommen werden, dass die Neutrophile den Übergang zum steileren Konzentrationsgradienten im Kanal wahrnehmen und dadurch schneller in Richtung der Attraktantquelle wandern. Der Entfernung von 50 μm zum Kanaleingang kann anhand der Simulationsdaten (siehe Abbildung 47) etwa eine Absolutkonzentration von einem Zwanzigstel der Attraktantkonzentration (Abbildung 47, $t=4\text{ h}$, $x=1,5\text{ mm}$, $y=0,05$) zugeordnet werden. Dies entspricht bei der ausgewerteten Messung an dieser Stelle einer fMLP-Konzentration von 25 ng/ml. Der Konzentrationsgradient geht dabei von einer Steigung mit etwa 50 ng/(ml mm) im Reservoir in den 125 ng/(ml mm) Gradienten im Kanal über.

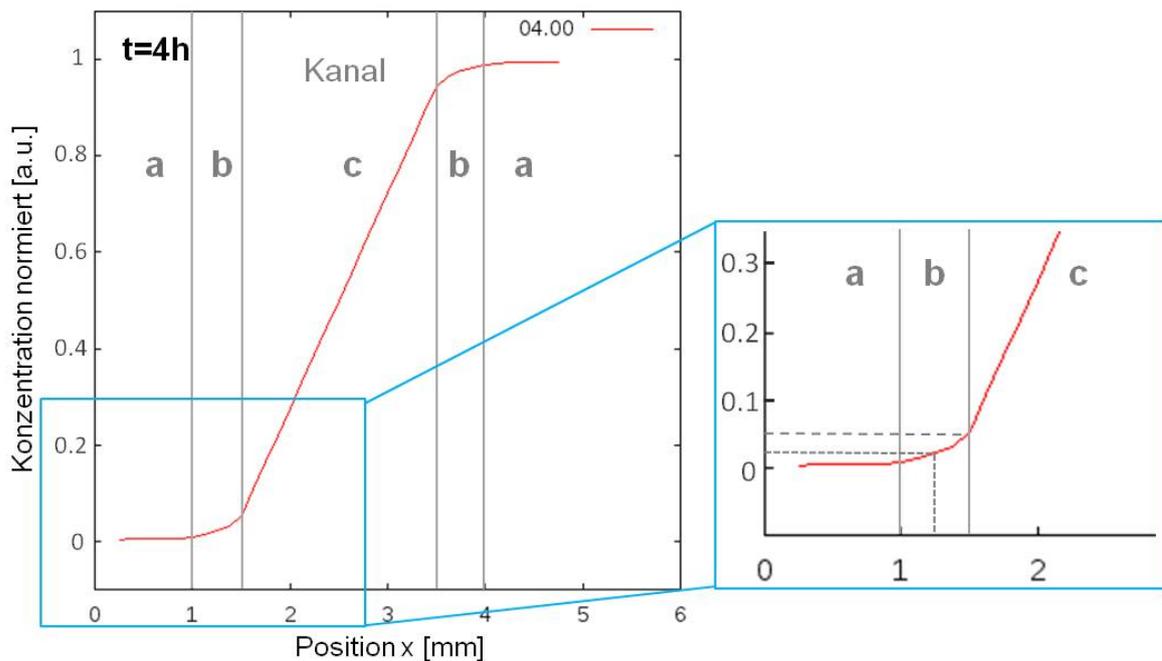


Abbildung 47: Numerische Simulation des Konzentrationsverlaufs in einer Mikrostruktur mit einem 3 mm langem linearen Verbindungskanal für einen Botenstoff mit $D=4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (entspricht fMLP) und $t=4\text{ h}$ nach Einfüllen des Botenstoffs; Mikrostrukturbereiche: a = tiefer Reservoirbereich, b = flacher Reservoirbereich, c = Kanal (vgl. Abbildung 31, mit Dank an N. Neuss).

Die gerichtete Migration der Neutrophile beginnt allerdings schon viel weiter im Reservoirinneren, nämlich bereits 200 bis 250 μm vom Kanaleingang entfernt. Diese Entfernung ist für die eigentliche *Schwellwertbestimmung* heranzuziehen. Für einen Abstand von 250 μm zum Kanaleingang kann aus der Simulation (Abbildung 31, $t=10\text{ h}$, $x=1,25\text{ mm}$) eine Absolutkonzentration von etwa 10 ng/ml fMLP und ein Konzentrationsgradient von 25 ng/(ml mm) bestimmt werden. Dieser Gradientenschwellwert der

Neutrophilchemotaxis bezüglich fMLP ist noch um die Hälfte geringer als der durch die Korrelation von Migrationsgeschwindigkeit und Attraktantgradient gefundene Wert (50 ng/(ml·mm), Abbildung 45A). Da die Simulation jedoch für einen 3 mm langen Kanal und nicht speziell für den verzweigten Kanal (kurzer Kanalweg 4,1 mm) dieser Messung angefertigt wurde, ist generell von noch ein wenig niedrigeren Konzentrations- und Gradientenschwellwerten der Neutrophilmigration auszugehen.

Kollektive Zellbewegung

Als ein weiteres interessantes Phänomen konnte bei den Chemotaxisexperimenten in den Mikrostrukturen eine kollektive Zellbewegung der Neutrophile, welche zur Formation von Zellfronten im Zellreservoir und dem Kanal führte, beobachtet werden. Diese kollektive Zellmigration trat vor allem dann auf, wenn sich im Zellreservoir außergewöhnlich viele Neutrophile befanden. Die Zellfronten bewegten sich dann mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 13 $\mu\text{m}/\text{min}$ in Richtung des Attraktantreservoirs. Neutrophile können als Teil des Immunsystems selbst Lockstoffe sekretieren [161], z.B. ebenfalls IL8 [162], um andere Immunzellen oder weitere Neutrophile zu rekrutieren. Ob allerdings in diesem Fall eine interzelluläre Botenstoffkommunikation vorlag, oder die Neutrophile simultan auf den äußeren fMLP-Botenstoffgradienten reagierten, konnte nicht überprüft werden.

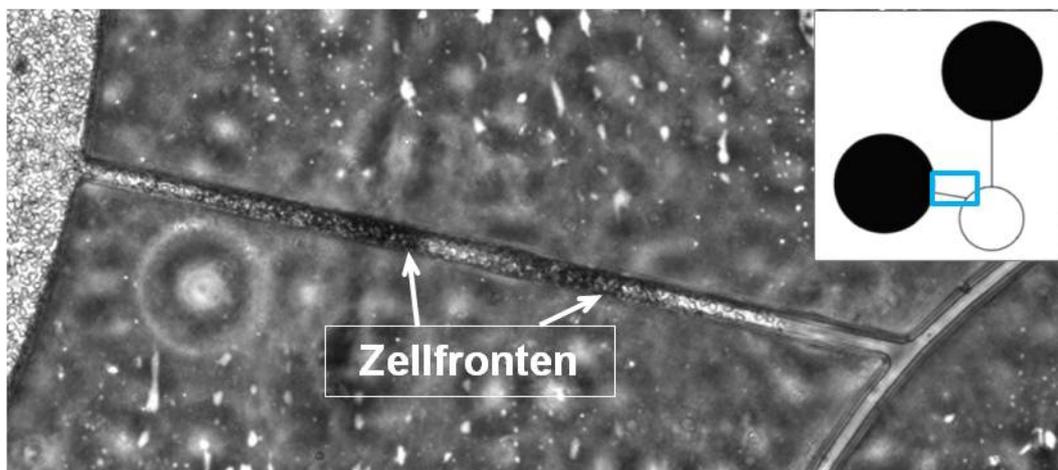


Abbildung 48: Bewegung von Neutrophilen als Zellfront in einem 160 ng/(ml·mm) fMLP-Gradienten, die Durchschnittsgeschwindigkeit solcher Fronten betrug $v_d=12,8 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$, $\sigma=1,2 \mu\text{m}/\text{min}$).

3.5.4 Diskussion der Neutrophil-Chemotaxis

Viele der Untersuchungen zur Chemotaxis von Neutrophilen haben die Aufdeckung von neuen Attraktanten, den zugehörigen Signalwegen oder von inhibierenden Faktoren zum Ziel. In der großen Mehrheit dieser Experimente werden immer noch Transwell-Assays oder ähnlich verwandte Ansätze verwendet [163]. In einigen neueren Studien wird jedoch auch der Vorteil der Anwendung von mikrofluidischen Systemen für die Quantifizierung von Chemotaxisvorgängen allgemein, und der Neutrophilchemotaxis im Besonderen genutzt [120, 123, 164]. Keenan et al. [164] definieren dabei anhand ihres Mikrofluidikexperimentes drei verschiedene Motilitätsklassen der Neutrophile, wobei die migrierenden Zellen in einem fMLP-Gradient eine Geschwindigkeit von etwa $4 \mu\text{m}/\text{min}$ aufwiesen. Jeon et al. [120] haben ebenfalls eine unterschiedliche Beschleunigung der Neutrophilmigration abhängig vom chemischen Gradienten gefunden, wobei die Neutrophile in Gradienten flacher als $100 \text{ ng}/(\text{ml}\cdot\text{mm})$ eine stärkere Beschleunigung zeigten als in Gradienten steiler als $100 \text{ ng}/(\text{ml}\cdot\text{mm})$, generell beschleunigten die Zellen ihre Bewegung mit zunehmender Attraktantkonzentration in ihrer Umgebung. Diese dokumentierten Ergebnisse stellen die ersten Ansätze von vitro-Analysen zur Quantifizierung der Neutrophilmigration dar, darin wurden jedoch keine Mindestkonzentrationen an Botenstoff oder Grenzkonzentrationsgradienten betrachtet.

Die Ergebnisse zur Neutrophilmigration in dieser Arbeit zeigen, dass sich die Neutrophile ohne Attraktanteinfluss mit einer Geschwindigkeit von circa $3 \mu\text{m}/\text{min}$ ungerichtet bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen nimmt unter Attraktanteinfluss auf bis zu $30 \mu\text{m}/\text{min}$ zu, wobei kein direkter Zusammenhang mit der Absolutkonzentration an Botenstoff gefunden werden konnte. Allerdings besteht eine Korrelation zwischen Neutrophilgeschwindigkeit und Gradientensteilheit der Attraktantkonzentration, bei steileren Botenstoffgradienten erhöht sich die Geschwindigkeit der Neutrophile. Durch die detaillierte Auswertung der Neutrophilbewegung im Zellreservoir konnte eine Art Aktivierungsphase der Neutrophile, bei der sie sich zunächst schneller ($8\text{-}10 \mu\text{m}/\text{min}$), aber noch ungerichtet bewegen, gefunden werden. Also sind offensichtlich bereits wenige Attraktantmoleküle in der Lage bei den neutrophilen Granulozyten eine Chemokinese, aber noch keine Chemotaxis hervorzurufen.

Im Anschluss an diese Aktivierung beginnt die langsame Migration der Zellen ($3\text{-}4 \mu\text{m}/\text{min}$) entlang des im Reservoir noch flachen Konzentrationsgradienten in Richtung Kanaleingang. Etwa $50 \mu\text{m}$ vor Eintritt in den Kanal detektieren die Neutrophile den Übergang zum steileren Gradienten im Kanal und die Bewegung der Zellen beschleunigt sich. Damit konnten die Ergebnisse von Jeon et al. [120], wonach die Geschwindigkeit der Neutrophilmigration abhängig von der Steilheit des Attraktantgradienten ist, durch diese Arbeit bestätigt werden. Die Beschleunigung der gerichteten Neutrophilbewegung konnte sogar genauer quantifiziert werden, der Gradientenschwellwert für eine schnellere

Migration liegt bei circa 50 ng/(ml·mm). Im Kanalsystem selbst konnten die Neutrophile zwischen verschiedenen steilen Gradienten unterscheiden und folgten dem steileren Gradienten im kurzen direkten Kanalweg nach.

Der Unterschied des in dieser Arbeit neu entwickelten mikrofluidischen Aufbaus zu den oben genannten von Jeon und Keenan [120, 164] kommt besonders in der Analyse der Neutrophilreaktion bei Wechseln in der Gradientensteilheit zum Tragen. In allen anderen erwähnten Mikrofluidikexperimenten wird jeweils nur ein chemischer Gradient durch Regulierung der Flussbedingungen voreingestellt und die Wanderung darin untersucht. Im experimentellen Aufbau dieser Arbeit ändert sich die Gradientensteilheit dagegen beim Übergang von Reservoir in den Kanal oder bei den Kanalverzweigungen, wodurch Aussagen zur Sensitivität der Zellen getroffen werden können. Im Zellreservoir ergibt sich durch den Wechsel zur zweidimensionalen Geometrie ein flacherer Botenstoffgradient, von etwa einem Zwanzigstel der eingesetzten Attraktantkonzentration am Kanaleingang zu quasi unendlicher Verdünnung im tiefen Reservoirteil. Aufgrund der beginnenden Wanderung der Neutrophile im flachen Konzentrationsgradienten im Zellreservoir konnte eine nötige Mindestkonzentration von 10 ng/ml mit einem Gradientenschwellwert von 25 ng/(ml·mm) für die gerichtete Neutrophilbewegung bezüglich fMLP ermittelt werden. Dabei sind die realen Schwellwerte eher noch niedriger einzuordnen, wenn auch in der gleichen Größenordnung. Im Körper folgen die Neutrophile außerdem nicht nur einem speziellen Botenstoffgradienten nach, sondern integrativ einer Summe aus allen Attraktantsignalen [165].

3.6 Chemotaxis hämatopoietischer Stammzellen

3.6.1 HSC-Migration im Microwell-Assay

Einen Ausgangspunkt dieser Arbeit stellten die von Wagner et al. [101] durchgeführten Microwell-Experimente dar. In diesen konnte die gerichtete Migration von HSC hin zu AFT-Zellen und MSC in vitro gezeigt werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde die Migration der HSC im Microwell weitergehend ausgewertet und quantifiziert. Das Microwell-Experiment eröffnet zwar die Möglichkeit einer quantitativen Untersuchung der Migrationsgeschwindigkeit, aber aufgrund der vergleichsweise schlecht definierten Bedingungen können damit keine Absolutwerte an Attraktant verknüpft werden. Für eine weiterführende Analyse der HSC-Migration und Quantifizierung wurden deshalb im Anschluss die neu entwickelten Migrationskammern mit den definierten Attraktantgradienten herangezogen.

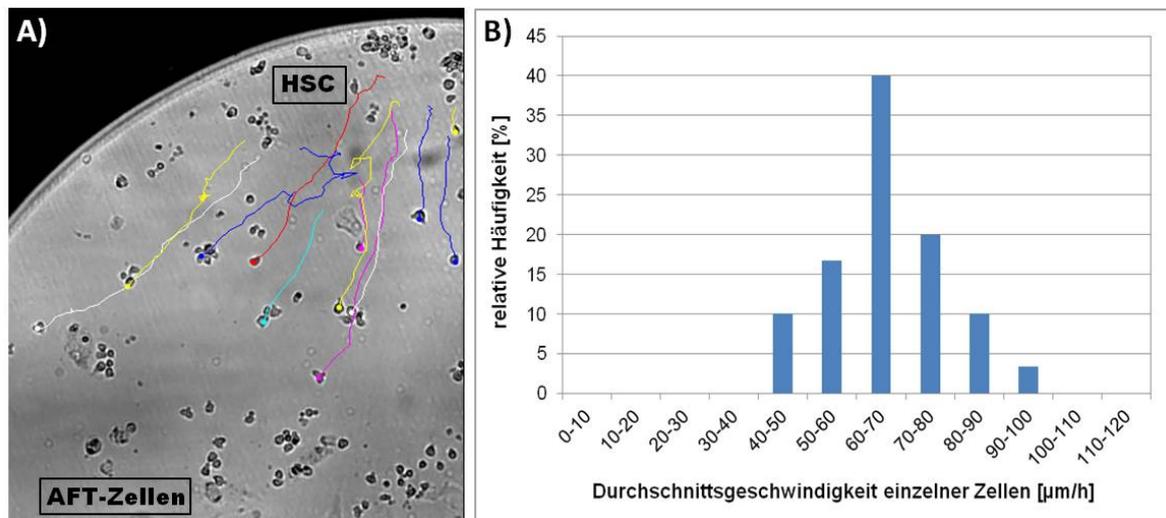


Abbildung 49: Durchschnittsgeschwindigkeiten der in Richtung AFT024-Zellen wandernden HSC im Microwell: A) Exemplarische Trackingpfade der Wanderung von HSC am oberen Rand des Microwells zu den AFT024-Zellen am unteren Rand des Microwells, B) Verteilung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen HSC ($n=30$, $v_d=66 \mu\text{m/h}$, $\sigma=11 \mu\text{m/min}$).

Die Zeitspanne zwischen Mediumwechsel/Einbringen der HSC ins Microwell und dem Beginn der Migration betrug 2 bis 5 Stunden. In dieser Zeit sekretieren die adhärennten AFT024-Zellen beziehungsweise die MSC Chemokine und ein Konzentrationsgradient bildet sich aus. Dieser ist allerdings im Microwell aufgrund der Konvektion und der nicht vorhandenen räumlichen Trennung der HSC und AFT/MSK-Zellen nicht weiter spezifizierbar. Der Abstand der AFT/MSK-Zellen von den HSC beträgt im Microwell nur 200 bis 300 μm . Die Migrationsgeschwindigkeit der HSC konnte anhand von Einzelzelltracking genauer bestimmt werden (Abbildung 49A). In diesem Microwell-Experiment betrug die Durchschnittsgeschwindigkeit der HSC 66 $\mu\text{m/h}$ (Abbildung 49B),

über alle ausgewerteten Versuche gesehen etwa 65 $\mu\text{m}/\text{h}$ bis maximal 130 $\mu\text{m}/\text{h}$. Die HSC bewegen sich also in der Regel nicht einmal halb so schnell wie die im vorigen Kapitel analysierten neutrophilen Granulozyten, deren langsame Zellbewegung bereits 180 $\mu\text{m}/\text{h}$ betrug. Desweiteren konnte keine Beschleunigung der Zellbewegung mit sich verringern den AFT-HSC-Abstand festgestellt werden. Auffallend ist die häufige Überlagerung von Trackingpfaden, weil die HSC oft in kleinen Gruppen von wenigen Zellen wandern und einen ähnlichen Migrationsweg wie vorangegangene Zellen einschlagen.

3.6.2 HSC-Migration im Transwell-Experiment

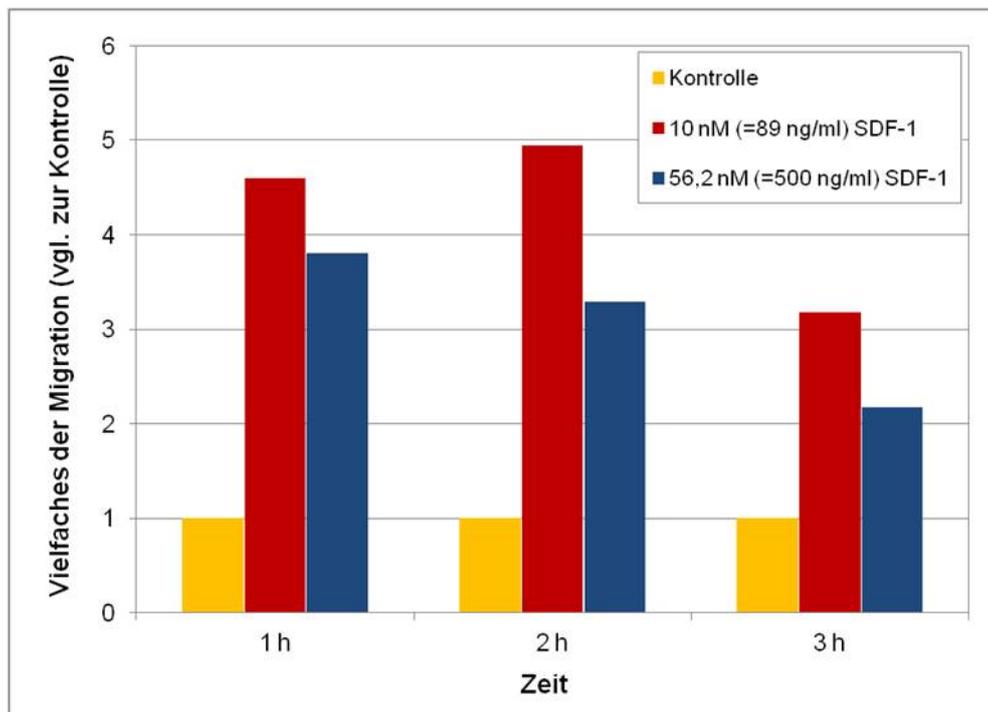


Abbildung 50: Migration von HSC zu SDF-1-Lösungen im Transwell-Experiment. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, wobei die Anzahl N migrierter Zellen gegenüber der Kontrolle normiert wurde ($\text{Vielfaches} = \frac{N(\text{SDF-1})}{N(\text{Kontrolle})}$).

Anhand des Transwell-Experimentes kann die Sensitivität der HSC-Chemotaxis gegenüber verschieden hohen SDF-1-Konzentrationen und damit einhergehend verschieden steilen Attraktantgradienten untersucht werden. Allerdings ist im Gegensatz zu den Mikrostrukturen im Transwell-Experiment für jede Konzentration und jeden Analysezeitpunkt eine separate Messung erforderlich. Aufgrund der hohen benötigten Zellzahl konnten nur wenige Transwell-Experimente mit HSC durchgeführt werden, pro Einzelexperiment sind im 24er-Plattenformat mindestens 50 000 Zellen im oberen Einsatz notwendig. Die mikroskopische Auszählung der HSC ergab einen Anteil transmigrierter HSC-Zellen von unter 10 %, wobei der Anteil der an und in der Membran haftenden Zellen

nicht berücksichtigt wurde. Bei allen Transwell-Experimenten konnte eine höhere Migrationsrate für die niedrigere Konzentration von 10 nM (89 ng/ml) SDF-1, etwa das 5fache der Kontrolle, als bei der höheren SDF-1-Konzentration von 56 nM (500 ng/ml) beobachtet werden (Abbildung 50). Am deutlichsten wurde die Reaktion auf den Chemoattraktanten dabei in der Auszählung nach zwei Stunden ersichtlich, während sich schon nach drei Stunden der Unterschied zur Kontrolle wesentlich verringert hatte.

3.6.3 HSC-Migration in den Mikrostrukturen

Die Chemotaxisexperimente mit HSC in den Mikrostrukturen (vgl. Abbildung 19) bieten den Vorteil, dass pro Experiment nur sehr wenige, nämlich 1000-5000 Zellen, benötigt werden. Aufgrund der offenen Mikrostrukturen, welche nur für die Zeit des Experimentes gedeckelt werden, konnten die MSC für einen Zeitraum von bis zu einer Woche in einem der Reservoirs separat vorinkubiert werden. Als Startzeitpunkt der Migrationsversuche wurde der Mediumwechsel vor dem Zupipettieren der HSC in das Zellreservoir festgelegt. Nach wenigstens drei Stunden Inkubationszeit in der Mikrostruktur begannen die HSC schließlich in Richtung des Kanaleingangs, der zum MSC-Reservoir führt, zu wandern (Abbildung 51). Während dieser Versatzzeit wird durch die MSC neues SDF-1 ausgeschüttet und der Attraktantgradient bildet sich im Kanalsystem aus. Die Wanderungsgeschwindigkeit der HSC betrug vergleichbar zum Microwell-Experiment etwa 110 $\mu\text{m/h}$. Die HSC kriechen dabei durch eine amöboide Zellbewegung unter Ausbildung eines großen Lamellipodiums auf der Glasoberfläche des Chips (Abbildung 51B) in Richtung der Attraktantquelle, den MSC im gegenüberliegenden Reservoir. Auffallend war auch bei diesem Experiment, dass die HSC häufig in reihenartigen Formationen von drei bis sechs Zellen in Richtung des Kanaleingangs wanderten und oft der vorangegangenen Zelle nachfolgten. Dies ist in der Abbildung 51A durch die weißen Pfeile angedeutet. Die Wanderungsrouten der HSC werden auch in der Aufsummierung aller Einzelbilder der Zeitrafferaufnahme besonders deutlich (Abbildung 51B). Aufgrund ihrer langsamen Wanderungsgeschwindigkeit erreichten die HSC während des Beobachtungszeitraums von maximal 36 Stunden Zellen nicht die MSC auf der anderen Seite des Kanalsystems. Über den Beobachtungszeitraum hinweg werden die Nährstoffe im Medium in der Mikrostruktur allmählich aufgebraucht. Da bei diesem Versuchsaufbau kein neues Medium nachgeführt werden konnte, nahm sowohl die Vitalität der MSC als auch der HSC allmählich ab, was eine Anhaftung der HSC an die Kanalwände oder den Glasboden zur Folge hat.

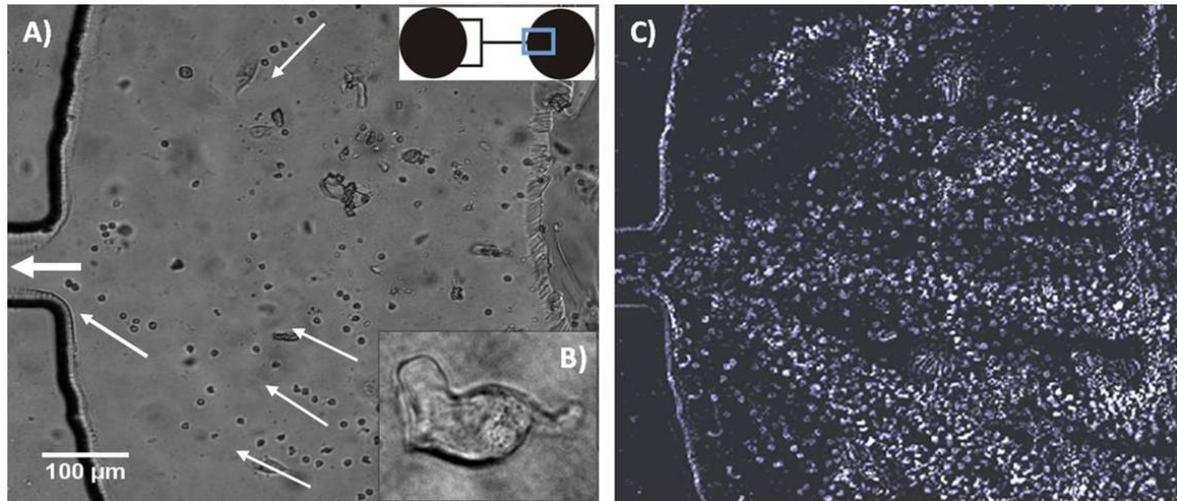


Abbildung 51: Wanderung von HSC in einer Mikrostruktur (abgebildeter Ausschnitt siehe Skizze, Kanalbreite $100\ \mu\text{m}$). A) Nach Bildung der Botenstoffe durch die MSC und Ausbildung des chemischen Gradienten beginnen die Stammzellen zum Kanaleingang in Richtung des MSC-Reservoirs zu wandern. Sie bilden dabei linienförmige Aneinanderreihungen. C) Aufsummierung an Differenzbildern der gesamten Zeitrafferaufnahme (erstellt mit MATLAB), hier spiegeln sich die Wanderungsrouten der hintereinander wandernden HSC besonders deutlich wider. B) Detailaufnahme einer migrierenden Stammzelle mit deutlich ausgebildetem Lamellipodium.

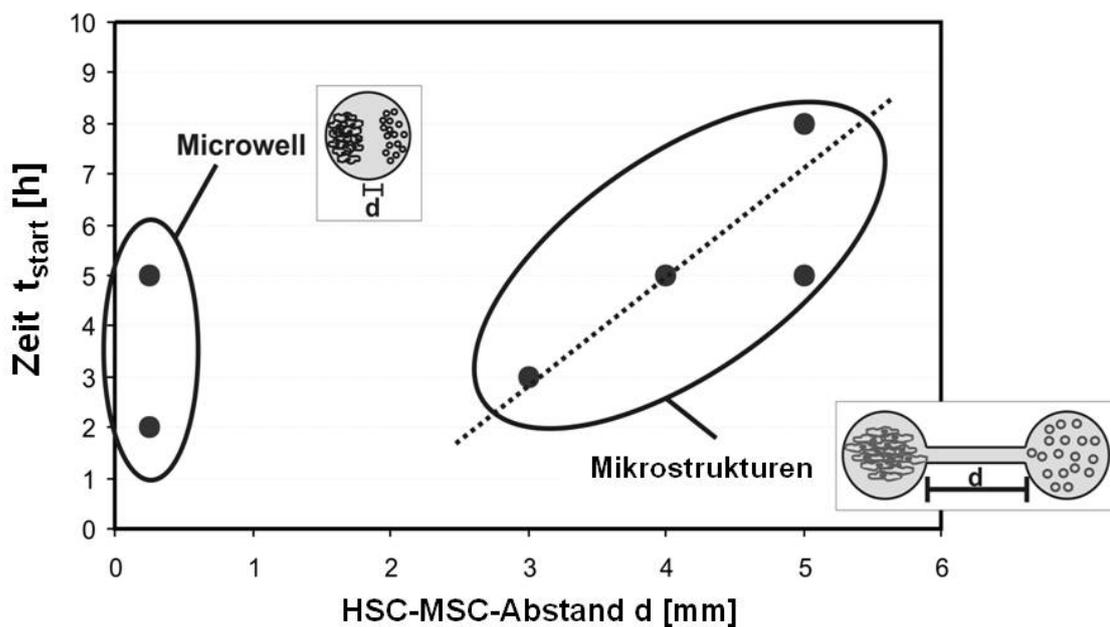


Abbildung 52: Abhängigkeit des Startzeitpunktes t_{start} der HSC-Wanderung zu den MSC vom HSC-MSC-Abstand d in Microwellexperimenten (Zellabstand ca. $250\ \mu\text{m}$) und in den Mikrostrukturen (Zellabstand 2 bis 5 mm). Mit einer Vergrößerung des Abstandes d verlängert sich auch der Diffusionsweg der Botenstoffmoleküle, und die HSC reagieren erst später auf die Stimulierung.

Aus dem Migrationsverhalten der HSC im Zellreservoir können aufgrund der definiert ausgebildeten Chemokingradienten in den Mikrostrukturen quantitative Aussagen über die HSC-Chemotaxis getroffen werden. Bei zunehmender Kanallänge ergab sich ein längerer zeitlicher Versatz des Beginns der HSC-Migration in Richtung des Kanaleingangs (Abbildung 52). Der Vergleich dieser Verzögerung des Startzeitpunkts der Migration mit den Microwell-Experimenten zeigt, dass der Migrationsstart nach zwei bis drei Stunden zunächst unabhängig von der MSC-HSC-Entfernung auftritt. Erst bei Kanallängen von über 4 mm wird deutlich, dass auch die Gradientenausbildung und damit Gradientensteilheit einen Einfluss auf den Migrationsstart hat. Um die Ausbildung des SDF-1-Gradienten innerhalb der Mikrostrukturen genauer bestimmen zu können und einen Schwellenwert der Attraktantkonzentration zu ermitteln, wurde die SDF-1-Sekretion der MSC anhand von ELISA-Experimenten untersucht (siehe Kapitel 3.3).

3.6.4 Diskussion der HSC-Chemotaxis

Humane hämatopoietische Stammzellen wurden für diese Migrationsexperimente aus Nabelschnurblut isoliert und stehen damit nicht unbegrenzt als Ressource in immer gleichbleibender Qualität zur Verfügung. Es wurden daher für die HSC-Migrationsexperimente auch Standards in der Qualitätskontrolle zur Sicherung der Zellqualität und der HSC-Motilität gesucht. So wurde beispielsweise parallel zu jedem komplexen Mikrofluidikexperiment die Vitalität und Motilität der HSC über die Laufzeit des Experimentes mittels Mikroskopie dokumentiert. Trotz dieser Kontrollexperimente zeigten die HSC zwischen den einzelnen Microwell- und Mikrostrukturexperimenten einen relativ großen Unterschied in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Diese betrug 65 $\mu\text{m}/\text{h}$ bis 130 $\mu\text{m}/\text{h}$ und kommt wahrscheinlich durch die qualitativ doch sehr verschiedenen Primärzellproben an HSC zustande. In wieweit dabei auch die MSC eine Rolle spielen, welche die Attraktantmoleküle ausschütten und ja ebenfalls Primärzellen von verschiedenen Spendern sind, kann anhand der optischen Kontrollen und Migrationsexperimente allein nicht nachvollzogen werden. Auch für die Microwell-Experimente mit MSC und HSC gilt wie bei denen mit den Jurkat-Zellen, dass sie durch die Vorinkubation der MSC auf nur einer Kammerseite (Bodendurchmesser 1 mm!) relativ schwierig vorzubereiten sind und keine quantitative Auswertung der Zellwanderung möglich ist. Dagegen ist die qualitative Aussage, ob die verwendete spezifische Kombination an primären HSC und MSC zu einer Zellmigration führt im Microwell eindeutig möglich, da bei einem Auslösen der chemotaktischen Wanderung immer über 90 % der HSC zu den MSC migrierten (vgl. [101]).

Im Gegensatz zum Ergebnis von Faber et al. [145] zeigten die HSC in den Transwell-Experimenten eine höhere Migrationsrate bei der geringeren SDF-1-Konzentration von 10 nM (89 ng/ml). Allerdings unterschied sich die Migrationsrate und Podienbildung bei

Faber et al. zwischen 100 ng/ml und 500 ng/ml SDF-1 auch nur gering bei großem Fehler. Die Reaktivität der HSC im Transwell-Assay war ebenfalls sehr stark von der Zellcharge abhängig, so traten neben der gezeigten 5fachen Migrationsrate gegenüber SDF-1 auch bis zu 30fache Migrationsraten auf. Für die Qualitätssicherung wäre eine parallele Durchführung von Transwell-Experimenten zu jedem Mikrofluidikexperiment aufgrund der großen benötigten Zellzahl nur in einem miniaturisierten Maßstab, maximal 96er-Plattenformat, möglich.

Die Anwendung von Mikrofluidik und Mikrostrukturen in der experimentellen medizinischen Forschung nimmt zwar stetig zu, jedoch werden in kaum einer Studie mehrere Zelllinien und/oder langsam wandernde Zellen wie die HSC verwendet [114, 115]. Dies mag an der begrenzten Verfügbarkeit solcher Zellen liegen, weshalb man die Zellen nicht einfach wie gewöhnlich durch den mikrofluidischen Chip spülen oder kontinuierlich durchpumpen kann. Dasselbe gilt für die meist teuren Chemokine und andere Botenstoffe. Durch das minimalisierte Design des in dieser Arbeit verwendeten Chipsystems, ohne Konnektoren und Zuleitungen für einen kontinuierlichen Mediumfluss wie in der klassischen Mikrofluidik [127], wurden Probleme mit der Zell- und Botenstoffmenge vermieden. Außerdem wurde durch die rein diffusive Gradientenausbildung die Beeinflussung der HSC-Migration durch Scherkräfte, wie sie in allen Chipsystemen mit hydrodynamischem Fluss auftreten, vermieden. Zudem konnte im Gegensatz zu den üblicherweise verwendeten Chemotaxis-Assays [106, 109] die Steilheit des Botenstoffgradienten in dem entwickelten Mikrofluidikaufbau sehr einfach über die Variation der Kanallängen eingestellt werden. Da außerdem anstatt von rekombinantem SDF-1 [145, 166] die MSC direkt als Botenstoffdonoren eingesetzt wurden, konnte sich in der horizontalen Ebene der Mikrostruktur ein komplett natürlicher, komplexer chemischer Attraktantgradient ausbilden. Als Startzeitpunkt des Migrationsexperimentes kann ohne weiteres der Medienwechsel vor Beginn des Experimentes angenommen werden, da die SDF-1-Produktion durch die MSC und die parallel erfolgende Gradientenausbildung (Kapitel 3.2) wesentlich länger dauern als die Zugabe der HSC in das Zellreservoir und die Einrichtung der Aufnahme am Mikroskop.

Anhand der Quantifizierung der SDF-1-Ausschüttung durch die MSC (Kapitel 3.3) und unter Annahme eines vollständig ausgebildeten Chemokingradienten kann ein Konzentrationsschwellwert der Attraktantkonzentration aus nur einem Experiment abgeschätzt werden: Pro Mikrostruktur wurden 5000 MSC für ein Migrationsexperiment ausgesät. Damit entsprach die Zelldichte im Reservoir in etwa der konfluenten Zelldichte von 50 000 MSC Zellen in einer Kammer der 24well-Platten, wie sie für die ELISA-Experimente verwendet wurden. Auch das Verhältnis von Zellanzahl zu Mediumvolumen ist bei beiden Experimenten ähnlich, so dass die durch ELISA ermittelte SDF-1-Sekretionskurve der MSC (Abbildung 34) auch für die Mikrostrukturexperimente gültig

ist. Der minimalen Startzeitverzögerung der HSC-Migration von zwei Stunden (Abbildung 52) kann aus der SDF-1-Sekretionskurve der MSC (Abbildung 34) eine bis dahin sekretierte Attraktantkonzentration von 60 pg/ml, beziehungsweise $7,5 \times 10^{-12}$ mol/l (für $M=8$ kDa), zugeordnet werden. Bezogen auf den 3 mm langen Kanal bedeutet dies einen Schwellwert des Konzentrationsgradienten von 20 pg/ml pro mm, auf den die HSC bereits mit einer gerichteten Zellbewegung reagieren können. Dieser abgeschätzte Konzentrationsgradient verdeutlicht die hohe Sensibilität der HSC gegenüber einem Chemokingradienten. Über die Zelllänge einer Stammzelle von 10 μ m gesehen bedeutet dieser Gradient einen SDF-1-Konzentrationsunterschied von nur 0,2 pg/ml, den die Stammzellen anhand ihrer CXCR4-Rezeptoren detektieren und in Richtung der Attraktantquelle nachfolgen können.

Aus nur wenigen Chemotaxisexperimenten in Mikrostrukturen konnten viele Informationen über die Stammzellmigration gewonnen werden. Trotzdem bleibt die Frage noch offen, warum die Stammzellen in vergleichsweise wenigen Experimenten, also HSC/MSC-Kombinationen, überhaupt migrieren und oft auch keine Reaktion auf die MSC zeigen. Sicherlich bietet beispielsweise die unnatürliche Glasoberfläche der Mikrochips keinen optimalen Untergrund für die Migration der Zellen. So wurde schon durch Avigdor et al. gezeigt [35], dass auch typische adhäsive Rezeptor/Botenstoff-Systeme, wie z.B. CD44/Hyaluronsäure, für die Zellmigration wichtig sind. Außerdem ist unklar, in wieweit ein geringer Mediumfluss, wie er auch im Gewebe vorkommt, die Zellwanderung beeinflussen würde. Beispielsweise ist für eine Anhaftung der HSC auf Hyaluronsäure-beschichteten Oberflächen ein minimaler Fluss notwendig [135, 138], der zu einer rollenden Zellbewegung der HSC auf den Oberflächen, dem sogenannten Zellrolling, führt. Vielleicht können diese Faktoren in zukünftigen Chemotaxisexperimenten in Mikrostrukturen berücksichtigt werden und damit zu neuen Erkenntnissen über die chemotaktische Zellmigration der hämatopoietischen Stammzellen führen.

4 Zusammenfassung

Thema dieser Arbeit war die Erforschung der gerichteten Bewegung hämatopoietischer Stammzellen (HSC) entlang eines von mesenchymalen Stromazellen (MSC) erzeugten Chemokingradienten durch in vitro Experimente. Die chemotaktische Bewegung von HSC zu ihrer Stammzellnische, das Stammzellhoming, sowie Faktoren die zum umgekehrten Prozess des Herauslösens von HSC aus der Nische führen, einer Stammzellmobilisierung, sind aufgrund ihrer therapeutischen Relevanz in der Leukämiebehandlung äußerst bedeutsame Forschungsgegenstände. Der genaue Ablauf der chemotaktischen Stammzellmigration ist in vivo sehr schwierig nachzuvollziehen, da die Population der im Blutkreislauf zirkulierenden HSC verschwindend gering ist. Deshalb ist für das Verständnis von grundlegenden Wanderungseigenschaften der HSC die Durchführung von Laborexperimenten notwendig. Anhand der Untersuchungen in dieser Arbeit wurden Art und Geschwindigkeit der HSC-Migration, der Einfluss der absoluten Attraktantkonzentration und der Gradientensteilheit, sowie eine Mindestkonzentration an Attraktant quantifiziert. Dafür wurden die durchgeführten Experimente vor allem auf das bereits identifizierte Botenstoffsystem SDF-1/CXCR4 bezogen.

Um eine Quantifizierung der Stammzellmigration zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Ausschüttung des Chemokins SDF-1 durch mesenchymale Stromazellen anhand von ELISA-Tests quantitativ untersucht. Die MSC, welche auch primär an der Bildung der realen Stammzellnische beteiligt sind, wurden als Modell der Stammzellnische und als direkte Chemokindonoren in den Migrationsversuchen eingesetzt. Die ELISA-Experimente ergaben eine optimale SDF-1-Sekretion in einem kommerziellen MSC-Kulturmedium mit Kälberserum, welches daher in den Migrationsversuchen verwendet wurde. In diesem MSC GM Kulturmedium von Lonza wurde für eine konfluente MSC-Kultur innerhalb von drei Tagen im Mediumüberstand eine SDF-1-Konzentration von 180 pg/ml gemessen. Eine nur leicht geringere Sekretionsrate wurde in rein humanem Plättchenlysat-Medium gefunden. Dagegen wurde von den MSC gar kein SDF-1 ausgeschüttet, wenn sie in einem entsprechend der Gruppe um Verfaillie angemischten und ebenfalls häufig verwendeten MSC-Kulturmedium inkubiert wurden.

Im Zusammenhang mit der Erstellung einer SDF-1-Sekretionskurve für die Migrationsexperimente wurde auch der Einfluss des CXCR4-Antagonisten AMD3100 auf die SDF-Ausschüttung durch MSC untersucht. Dabei konnte anhand der ELISA-Experimente ein Langzeiteinfluss von AMD3100 ausgeschlossen werden. Allerdings wurde durch zusätzliche Immunofluoreszenzfärbungen ein interessanter Kurzeffekt von AMD3100 auf die SDF-1-Sekretion aufgedeckt. Demnach exprimieren die MSC nach einmaliger AMD3100-Zugabe das gesamte intrazelluläre SDF-1 innerhalb von nur zwei Stunden und internalisieren das SDF-1 danach ebenso schnell wieder. Dieser neu entdeckte

und ausführlich nachgewiesene Effekt könnte zur Aufklärung der erhöhten Stammzellmobilisierung unter AMD3100 beitragen.

Zur Untersuchung der HSC-Migration wurden zunehmend komplexere Chemotaxisversuche angewendet. Neben der Durchführung von Einkammerexperimenten in Microwells und dem etablierten Transwell-Assay wurde ein neuartiger mikrostrukturierter Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zellmigration in dieser Arbeit entwickelt. Durch die Nutzung der Mikrostrukturen können die migrierenden Zellen und der Botenstoff initial voneinander getrennt werden, und durch die definierten Kanalstrukturen wird eine kontrollierbare Ausbildung des Attraktantgradienten erreicht. Die rein diffusionskontrollierte Ausbildung der chemischen Gradienten in den Kanälen wurde mittels Farbstoffdiffusion und Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Die Farbstoffausbreitung in den Mikrostrukturen wurde durch Simulationsrechnungen modelliert, was eine exakte Quantifizierung der Chemokinkonzentrationen in den verschiedenen Kanalabschnitten zu unterschiedlichen Zeitpunkten auch für komplexe mikrofluidische Strukturen erlaubt. Ferner ergaben die Berechnungen, dass die durch das offene Design hervorgerufene Konvektion gegenüber der Diffusion vernachlässigbar ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Konzentrationsgradient in den Mikrostrukturen im Zeitraum von zwei Stunden bis zu mehreren Tagen sehr stabil ist, und damit über die Dauer des Migrationsexperimentes als quasistationär angesehen werden kann.

Die speziellen Kanalgeometrien der Mikrostrukturen ermöglichen es, den Einfluss einzelner Parameter, wie Absolutkonzentration, Botenstoffgradient oder Konzentrations-schwellwerte, auf die Wanderungsgeschwindigkeiten und das Verhalten von migrierenden Zellen quantitativ zu bestimmen. Eine ausführliche Analyse und Auswertung des chemotaktischen Verhaltens wurde exemplarisch für die sehr reproduzierbar migrierenden und einfacher verfügbaren neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Für die Neutrophile konnte anhand der Verwendung der Mikrostrukturen gezeigt werden, dass weniger die Absolutkonzentration als der Attraktantgradient eine Auswirkung auf die Migrationsgeschwindigkeit der Neutrophile hat. Diese erhöhte sich unter zunehmend steilen Gradienten. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Neutrophile betrug übereinstimmend mit der Literatur ohne Attraktant etwa $3 \mu\text{m}/\text{min}$ und unter Attraktanteinfluss bis zu $30 \mu\text{m}/\text{min}$. Für den Botenstoff fMLP konnte ein Konzentrationsschwellwert von $8 \text{ ng}/\text{ml}$ und ein Mindestgradient von $20 \text{ ng}/(\text{ml}\cdot\text{mm})$ für die Chemotaxis der Neutrophile ermittelt werden. Allerdings zeigten die Neutrophile auch schon bei viel geringeren Botenstoffkonzentrationen eine beschleunigte, aber noch ungerichtete Zellbewegung, also eine Chemokinese.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals ein mikrofluidischer Versuchsansatz zur Untersuchung der Chemotaxis von humanen hämatopoietischen Stammzellen angewendet. Die Mikrostrukturen ermöglichen eine räumliche Trennung der HSC von den MSC, und über

die Kanäle können definierte Chemokingradienten auf die Zellen geleitet sowie unter mikroskopischer Beobachtung das Migrationsverhalten der HSC beobachtet werden. Die MSC als Chemokinquelle konnten aufgrund des offenen Designs bis zu einer Woche in den mikrofluidischen Chips vorinkubiert werden. Für die Wanderung der HSC zu den MSC wurde eine Migrationsgeschwindigkeit von circa 100 $\mu\text{m}/\text{h}$ ermittelt. Dabei wurde auch für die HSC-Migration keine Abhängigkeit von der Absolutkonzentration an Chemokin festgestellt. Über die Korrelation des Startzeitpunktes der HSC-Wanderung in Mikrostrukturen mit verschiedenen langen Verbindungskanälen mit den bioanalytischen ELISA-Daten zur Chemokinproduktionsrate wurde ein Gradientenschwellwert von 20 $\text{pg}/(\text{ml}\cdot\text{mm})$ für die *in vitro* HSC-Chemotaxis bezüglich von MSC exprimierten SDF-1 gefunden. Die HSC zeigten die Tendenz, sich in Gruppenverbänden beziehungsweise auf gleichen Wanderungspfaden zu bewegen, was ein Indiz für eine kollektive Zellbewegung sein könnte.

Durch diese interdisziplinäre Arbeit wurde mit der Anwendung eines mikrofluidischen Systems der Zugang zu neuen Analysemethoden und Verfahren für die experimentelle Untersuchung der Stammzellchemotaxis eröffnet und der Nutzen durch neue Erkenntnisse bezüglich der HSC- und Neutrophilmigration demonstriert.

5 Anhang

5.1 Entwürfe hergestellter Belichtungsmasken

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zahlreiche Mikrostrukturen entworfen und als Belichtungsmasken in Form von Foliendruckern oder einer Chrommaske zur Herstellung der Mikrostrukturmaster verwendet (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Die entwickelten Strukturen werden nachfolgend dargestellt und ihre angedachte Funktion erläutert. Die Kanalhöhe aller gefertigten Strukturen wird durch das Belackungsverfahren mit dem abhängig vom jeweiligen Fotolack bestimmt. In dieser Arbeit betrug die Höhe der AZ-Lackschicht, und damit auch die finale Kanalhöhe im PDMS, zwischen 60 und 65 μm .

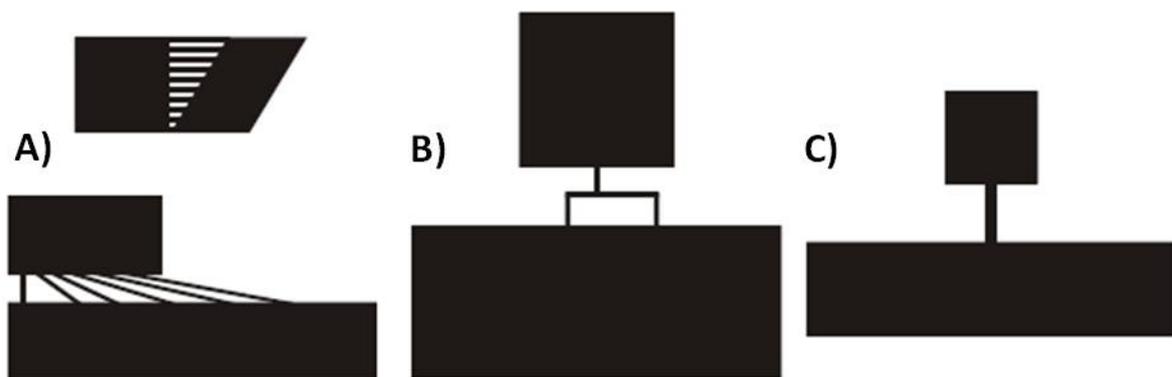


Abbildung 53: Vergrößerungen und Funktionen der Entwürfe 1, alle Strukturen in 4-facher Vergrößerung: A) Mikrostrukturen mit unterschiedlich langen Kanälen (vgl. Abbildung 9): Durch die verschiedenen langen Diffusionswege erreicht der Attraktant die Zellen im Reservoir zu versetzten Zeiten, wodurch eine zeitlich versetzte Zellantwort erwartet werden kann, gleichzeitig entwickeln sich in den verschiedenen langen Kanälen verschieden steile Attraktantgradienten; B) Mikrostruktur mit einer Kanalverzweigung: In den verschiedenen langen Kanalwegen bilden sich auch verschieden steile Konzentrationsgradienten aus, somit kann anhand des Zellverhaltens am Verzweigungspunkt die Sensitivität der Zellen im Bezug auf die Gradientensteilheit getestet werden; C) Mikrostruktur mit einem breiteren Verbindungskanal: Durch die Breite des Verbindungskanals kann die Breite der Diffusionsfront bestimmt werden und somit auch, ob der Botenstoff zunächst nur einzelne Zellen vor dem Kanaleingang erreicht (sehr dünner Kanal) oder viele Zellen auf einmal (breiterer Kanal). Je nach Antwort der Zellen können sich dadurch Hinweise auf ein kollektives Zellverhalten ergeben.

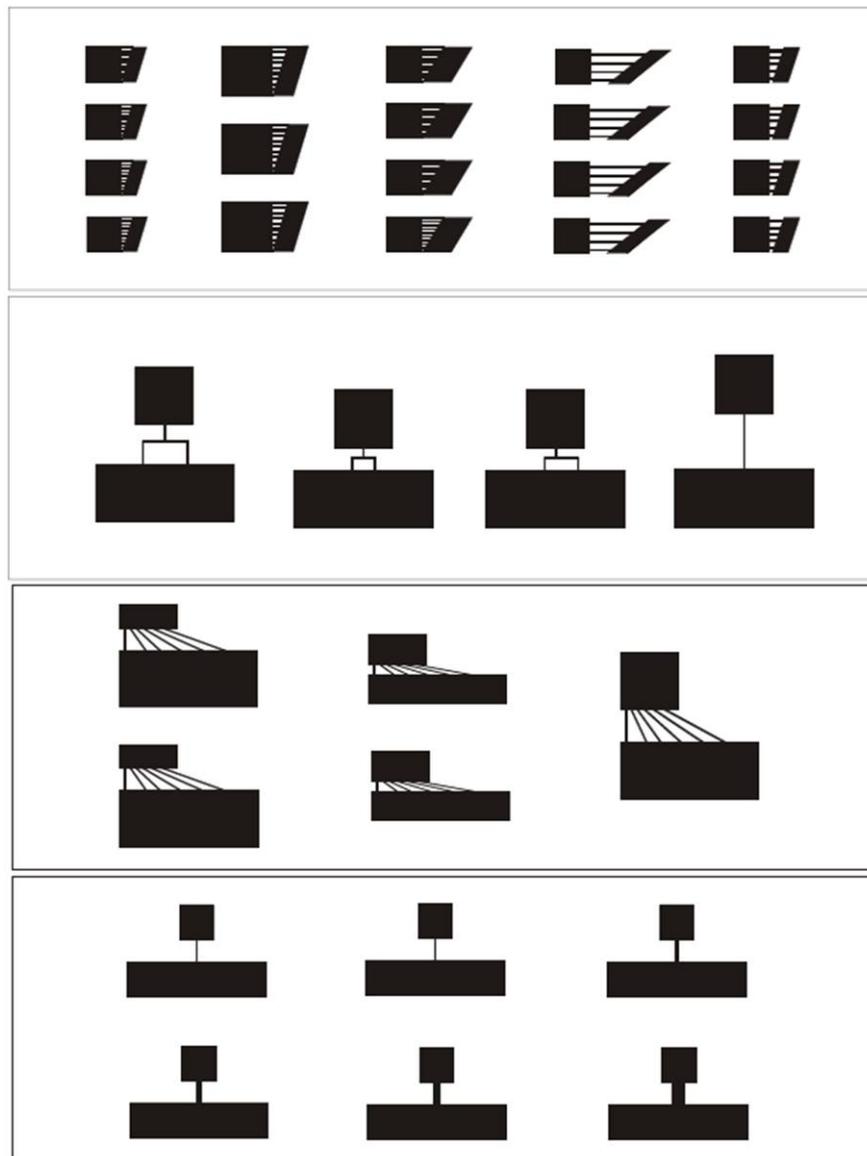


Abbildung 54: Entwürfe 1: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von $100\ \mu\text{m}$ und wurden als Folienmasken realisiert. Merkmale dieser allerersten Entwürfe waren die viereckigen Reservoirs und noch sehr breite, teils auch sehr lange Kanäle; 1,5fache Vergrößerung, Format: Objektträger – jeweils zwei der Objektträgerausschnitte konnten zur Belichtung eines 4-Zoll-Wafers verwendet werden.

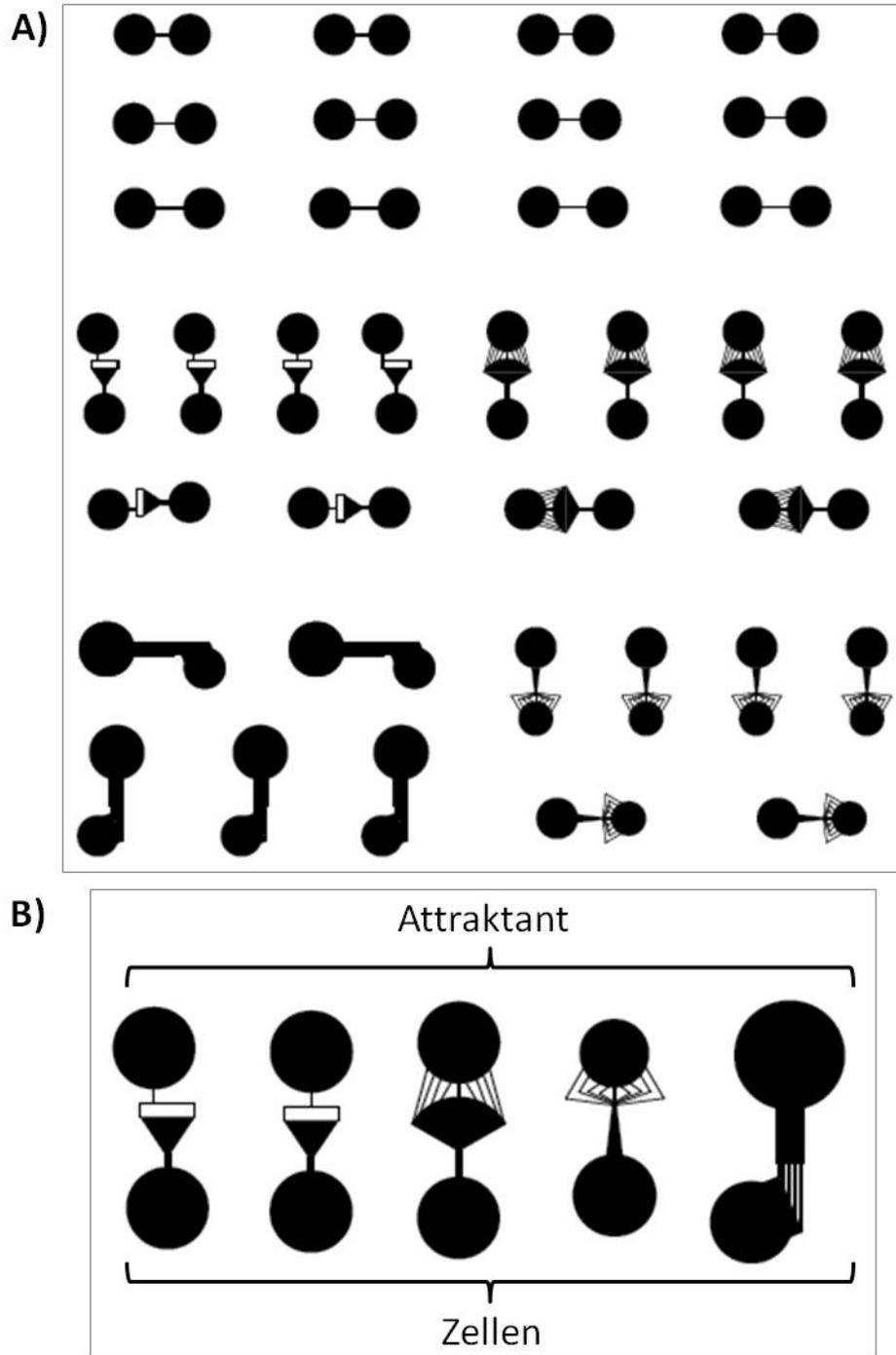


Abbildung 55: Entwürfe 2: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von $40\ \mu\text{m}$ und wurden als Folienmaske realisiert. Merkmale dieser weiterentwickelten Entwürfe waren die runden Reservoirs, deren Durchmesser (meist $3\ \text{mm}$) an das Pipettieren der Zellen und Ausstanzen der Einfülllöcher mit $2,5\ \text{mm}^2$ -Aderendhülsen angepasst wurde. A) 2fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 4-Zoll-Wafer; B) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen mit unterschiedlich langen Kanalwegen, wodurch die Sensitivität der Zellen im Bezug auf die Gradientensteilheit getestet werden kann. Die breiten Kanalabschnitte, die sich erst im weiteren Verlauf aufsplittenden, können dazu genutzt werden, den Kanal vor dem Experiment durch mechanischen Druck von oben auf das PDMS zu verschließen, damit kann ein Startzeitpunkt des Experimentes definiert werden.

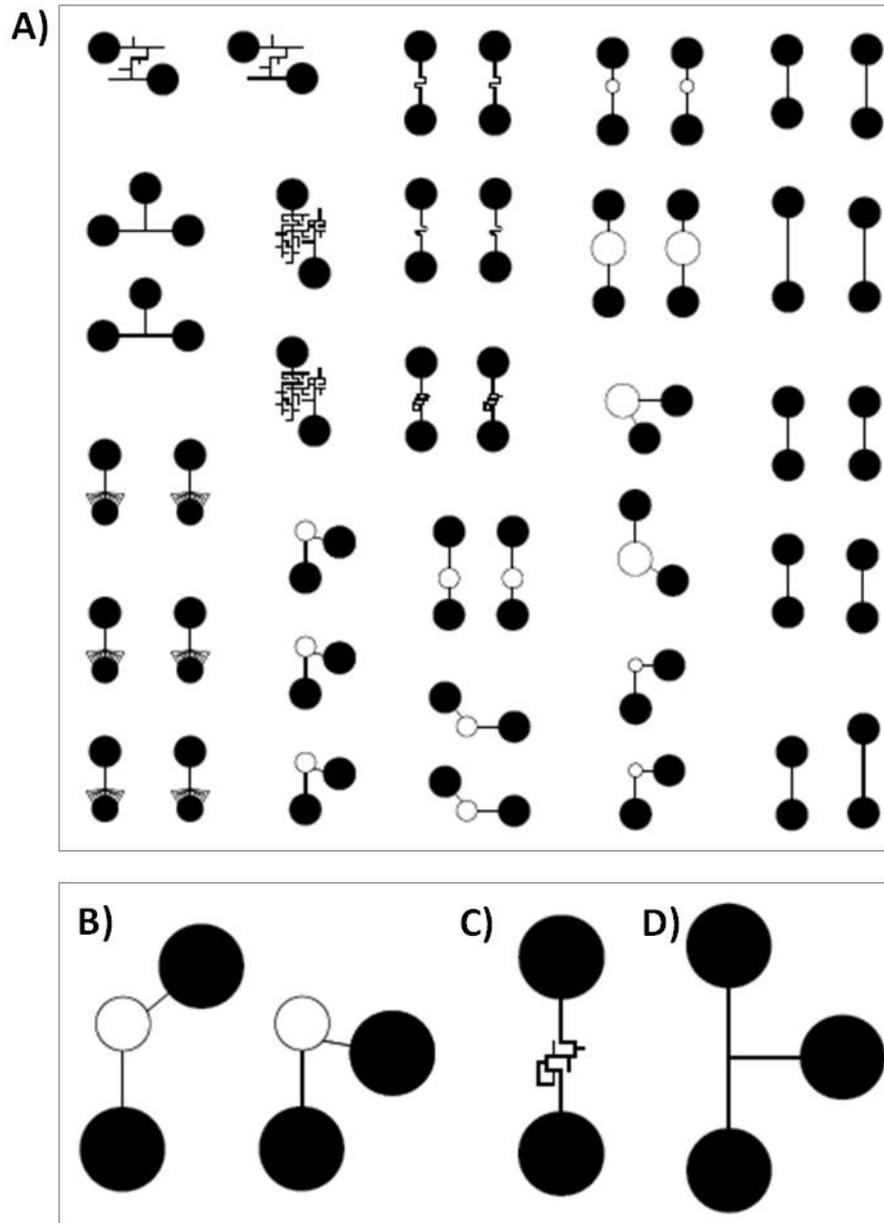


Abbildung 56: Entwürfe 3: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von $10\ \mu\text{m}$ und wurden als Chrommaske realisiert. Generell konnten durch das Chrommasken-Verfahren viel kleinere Strukturen hergestellt werden, welche für die Untersuchung der nur $5\ \mu\text{m}$ großen Stammzellen vorteilhafter waren. A) 1,5fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 5-Zoll-Maske zur Belichtung von 4-Zoll-Wafern; B)-D) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen: B) Verbesserung der Strukturen mit zwei verschiedenen langen Kanalwegen zur Untersuchung der Sensitivität der Zellen gegenüber dem chemischen Gradienten, C) kleiner Irrgarten, durch den relativ langen Kanalweg lassen sich solche Strukturen aber nur für schnell migrierende Zellen anwenden, D) Struktur mit drei Reservoiren, anhand der z.B. die Chemotaxis im Falle von zwei konkurrierenden Botenstoffen untersucht werden könnte.

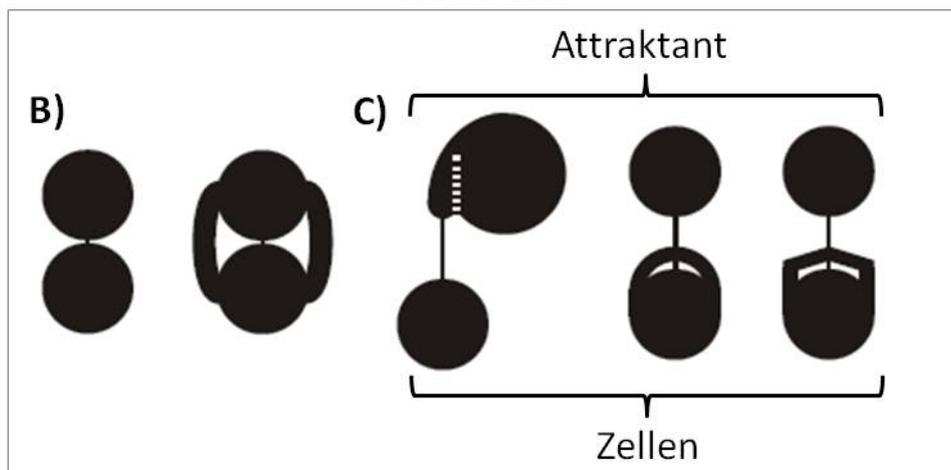
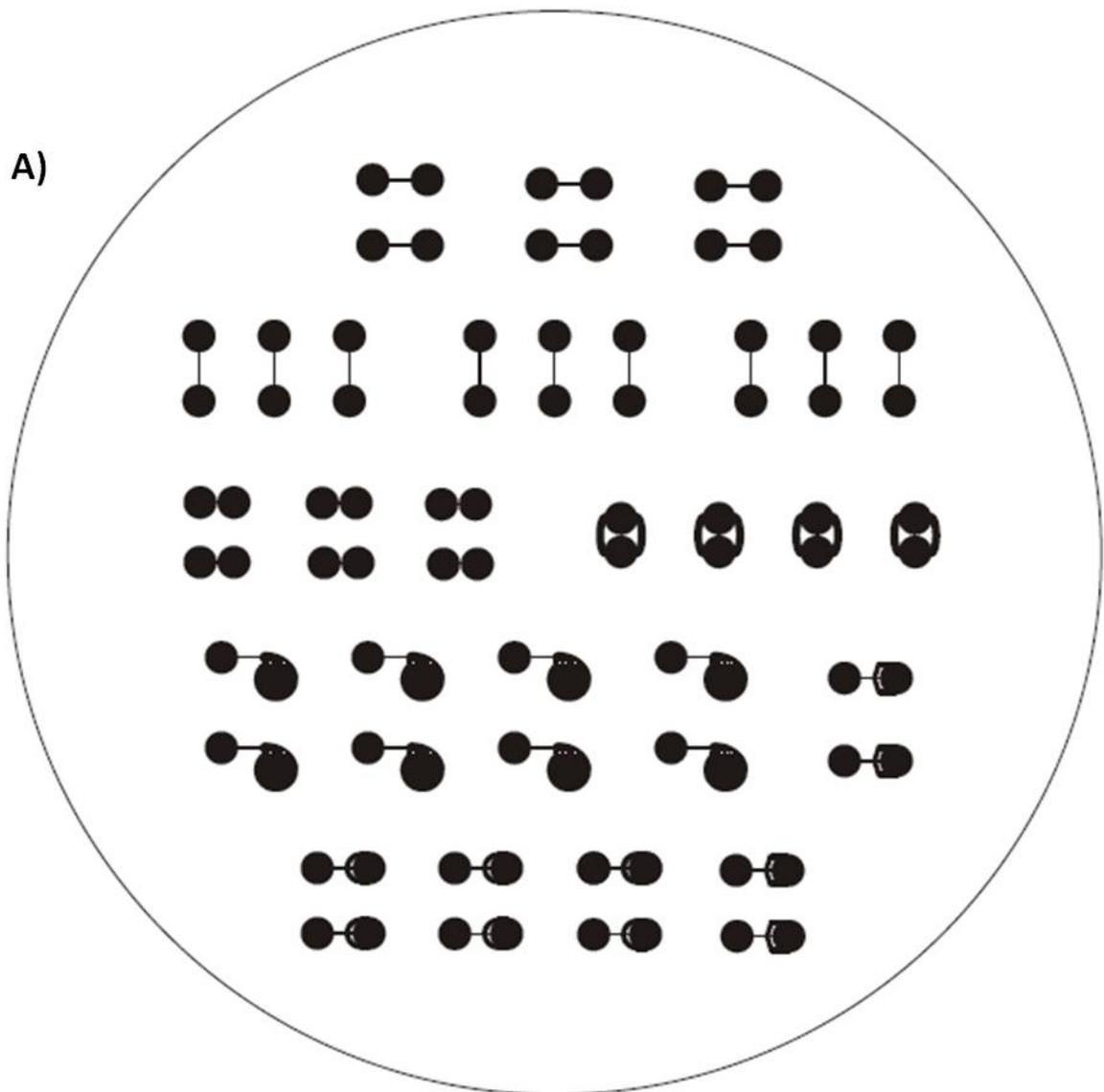


Abbildung 57: Entwürfe 4: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von 50 μm und wurden als Folienmaske realisiert. A) 1,5fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 4-Zoll-Wafer; B) und C) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen: B) Strukturen mit einem sehr kurzen Verbindungskanal, der ermöglicht, dass auch langsam migrierende Zellen wie die HSC die MSC erreichen, C) Strukturen mit breiten äußeren Kanälen, durch diese kann aufgrund der Geometrie ein eventueller Konvektionsfluss abgeleitet werden, während im schmalen mittleren Kanal, dem kürzesten Verbindungsweg zwischen den Reservoirien, die Diffusion dominiert und ein steilerer Konzentrationsgradient vorliegt.

5.2 Eigene Publikationen

Veröffentlicht:

Leinweber, C., R. Saffrich, A.D. Ho, M. Grunze, and A. Rosenhahn: Analysis of SDF-1alpha expression in hMSC for the experimental investigation of hematopoietic stem cell chemotaxis. *Onkologie* **33** (2010), 259.

In Vorbereitung:

Leinweber, C., R. Saffrich, V. Eckstein, A.D. Ho, M. Grunze, A. Rosenhahn, and P. Wuchter: Impact of plerixafor on the secretion of stromal cell-derived factor-1 alpha by mesenchymal stromal cells and implications for mobilization and homing of human hematopoietic progenitor cells. *in Vorbereitung*.

Neuss N., C. Leinweber, M. Neuss-Radu, M. Grunze and A. Rosenhahn: Numeric simulation of diffusional chemoattractant gradients in a microstructured cell migration chamber. *in Vorbereitung*.

Leinweber, C., M. Braun, K. Schmitz, N. Neuss, M. Neuss-Radu, M. Grunze, and A. Rosenhahn: Analysis of chemotactic Neutrophil migration in microstructures with diffusion based attractant gradients. *in Vorbereitung*.

5.3 Abkürzungs- und Größenverzeichnis

ALDH	Aldehyddehydrogenase
AMD3100	Synonym für Plerixafor: 1,1'-[1,4-Phenylenebis(methylene)]bis-[1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan]
ATCC	American Type Culture Collection
AZ9260	ein Fotolack für Positivfotolackverfahren
BCB	Brillantkresylblau
BM MSC	bone marrow mesenchymal stromal cells (medium)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	computer-aided design
CD	cluster of differentiation
CV	Variationskoeffizient $CV(x) = \text{Standardabweichung } \sigma(x)/\text{Mittelwert } (x)$
CXCL12	andere Bezeichnung für SDF-1
CXCR4	CXC Chemokinrezeptor 4
D	Diffusionskoeffizient
d	Breite/Kanalbreite, Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, ein Fluoreszenzfarbstoff
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
dxf	drawing interchange format, ein Dateiformat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum, fötales bovines Serum
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum

FEM	Finite Elemente Methode
FGF	fibroblast growth factor, ein Wachstumsfaktor
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fMLP	N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanin, ein Formyl-Tripeptid
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HL-60	leukämische myeloblastische Zelllinie
hPL	humanes Plättchenlysat (Medium)
HSC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase, ein Enzym
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G
IL8	Interleukin 8
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik am KIT
Jurkat	leukämische lymphoblastoide Zelllinie
kDa	kilo Dalton, 1 kDa=1 g/mol
KG1a	leukämische myeloblastische Zelllinie
KIT	Karlsruhe Institut für Technologie
l	Länge
LSC	Leukämische Stammzellen
LTBMC	Finite-Elemente-Methode
M1	Medium 1 = MSC GM (Lonza)
M2	Medium 2 (selbst angesehen)
MACS	magnetic activated cell sorting
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MSC GM	mesenchymal stromal cell growth medium (Lonza)
n oder N	Anzahl

Neutrophile	kurz für: neutrophile Granulozyten
NP40	Nonoxinol 40, ein nichtionisches Tensid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
pdf-Format	portable document format, ein Dateiformat
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
Pe	Peclet-Zahl
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Re	Reynolds-Zahl
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCF	Stammzellfaktor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1, ein Chemokin, in dieser Arbeit wurde ausschließlich die α -Konfiguration verwendet und untersucht
t	Zeitkoordinate
TMB	Tetramethylbenzidin, ein Chromogen
Tris-HCl	Tris-hydrochlorid, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
V	Volumen
v	Geschwindigkeit
VCAM	vascular cell adhesion molecule 1
v_d	Geschwindigkeitsmittelwert
Wnt	Zelligand benannt nach Wg für Wingless und Int-1
x	Orts- oder Abstandskoordinate
σ	Standardabweichung

5.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zellspezies und Kulturbedingungen.....	21
Tabelle 2: Prozessparameter für die Plasmaoxidation von PDMS zur Versiegelung bei der Chipherstellung.....	29
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten chemotaktischen Botenstoffe und der dazu korrespondierenden Farbstoffe.	32
Tabelle 4: Übersicht verwendeter Zellspezies und zugehöriger Chemoattraktanten, sowie der damit durchgeführten Chemotaxisexperimente.....	35
Tabelle 5: Füllmengen und verwendete Konzentrationen der Transwell-Experimente	39
Tabelle 6: Übersicht der in ELISA-Experimenten verwendeten MSC-Medien.....	44

5.5 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aktuelles Schema zur endostealen (links) und vaskulären hämatopoietischen Stammzellnische (rechts) mit den wichtigsten bislang identifizierten Einflussfaktoren. Essentiell ist jeweils die Bindung an mesenchymale Stromazellen (MSC); Abbildung entnommen aus Ehninger et al., JEM, 2001 [14]. 6
- Abbildung 2: Übersicht der SDF-1/CXCR4-Signaltransduktionswege, vor allem über den PI3K-Weg führt die Anlagerung von SDF-1 zu gerichteter Zellmigration; Abbildung entnommen aus [43]. 8
- Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des hämatopoietischen Stammbaums ausgehend von der hämatopoietischen Progenitorzelle (HSC) mit einer Eingruppierung der als Modellsystem gewählten Zelllinien Jurkat und HL-60, letztere wird zu den neutrophilen Granulozyten (kurz: Neutrophile) ausdifferenziert; (Abbildung modifiziert aus http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Illu_blood_cell_lineage.jpg, den 19.11.2011)..... 9
- Abbildung 4: Microwell-Experiment (Terasaki-Platte) zur in vitro Migration von humanen hämatopoietischen Stamm-/Progenitorzellen (HSC, durch die weißen Pfeile gekennzeichnet) zu adhärenen Maus-AFT024-Zellen (durch die schwarzen Pfeile gekennzeichnet), welche vermutlich einen SDF-1-Gradienten durch Sekretion generieren; Maßstab entspricht 100 μm (Abbildung entnommen aus [101]). 13
- Abbildung 5: Etablierte Versuche zur Untersuchung der Zellchemotaxis: A) Agarose-Assay mit Neutrophilen (schwarze Punkte), die sich in Richtung eines IL-8/LeukotrienB4-Reservoirs (runde Ausstanzung oben) bewegen, B) schematische Darstellung des Boyden-Kammer/Transwell-Experimentes und C) der Dunn-Chemotaxiskammer (Seitenansicht); (Abbildungen entnommen aus [96], teilweise modifiziert). 14
- Abbildung 6: Ausgewählte Mikrofluidikexperimente zur Untersuchung der Chemotaxis: A) Das Leiter-Assay [117] beruht auf der diffusiven Ausbildung eines Botenstoffgradienten in kleinen Kapillaren, welche einen Quellkanal mit Botenstoff und einen Zellen enthaltenden Kanal ohne Botenstoff verbinden. Durch die Variation der Kapillarlänge, d.h. die fluidischen Kanäle laufen nicht mehr parallel, kann die Gradientensteilheit innerhalb eines Versuches variiert werden; B) Ein mikrofluidischer Gradientengenerator [120] an dessen Ende sich ein Analysefeld mit dem generierten chemischen Gradienten befindet, in das von der Seite die migrierenden Zellen eingespült werden. Je nach Konzentration der zu mischenden

- Botenstofflösungen ändert sich die Steilheit des Gradienten im Analysefeld; (Abbildungen entnommen aus [114]). 16
- Abbildung 7: Herstellprozess von Mikrostrukturen in PDMS mittels *soft lithography*. Gezeigt ist der Ablauf eines Positiv-Fotolackverfahrens, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde (Kapitel 2.2.2). 20
- Abbildung 8: Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast) von MSC (M1) der Passage 6, A) Zellen mit etwa 80 % Konfluenz, B) zwei miteinander in Kontakt stehende Zellen; Aufnahmen: R. Saffrich. 23
- Abbildung 9: Entwürfe einer Mikrostruktur mit zwei getrennten Kammern, welche durch verschieden lange Kanäle verbunden sind, in 6facher Vergrößerung. A) Schematische Darstellung des ursprünglichen Entwurfes für das Mikrofluidiksetup. Die verschiedenen Kanallängen bilden definierte Diffusionswege für die Chemoattraktanden und die Grundlage einer zeitversetzten HSC Migrationsreaktion, B) hier wurde die Ursprungsidee direkt in ein CAD-Layout umgesetzt, Kanalbreite 100 μm , C) Da die Zellen den Kanalbereich nicht als solchen wahrnahmen, wurde er deutlicher von den Reservoiren abgegrenzt und die Kanäle verlängert, D) Runde Reservoire erleichtern das Befüllen, die Kanalbreite wurde deutlich verringert und eine mikrofluidische Pufferzone (breiter Kanalbereich) eingebaut. 26
- Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahmen von Folienmasken bei gleicher Vergrößerung. A) eine mit herkömmlichen Laserdrucker (1200 dpi) auf Laserfolie gedruckte Struktur, B) eine über das Filmbelichtungsverfahren hergestellte Folienmaske, schwarze Flächen sind hier komplett undurchsichtig und es ist keine Pixelung erkennbar (>3600 dpi). 27
- Abbildung 11: Fotografien von Fotolackmastern und PDMS-Abgüssen. A) Titanbeschichteter Siliziumwafer mit Strukturen aus AZ-Fotolack als Master zur PDMS-Chipherstellung, B) Kanalstruktur aus Fotolack, Strukturhöhe 60 μm , C) PDMS-Abguss von Kanalstrukturen, D) Fotolackstruktur und korrespondierender Abguss in PDMS, Gesamtgröße der Struktur: 1cm x 1cm. 28
- Abbildung 12: Ablauf der Chipherstellung. A) durch *soft lithography* strukturiertes PDMS, B) Ausstanzen der Reservoirelöcher, C) Plasmaversiegelung des PDMS mit einem Objektträger, D) Deckeln der Reservoire mit Deckgläschen nach dem Befüllen der Kammern; (mit Dank an C. Christophis)..... 30
- Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen zweier Mikrostrukturchips mit Variation der Kanallänge und demzufolge Steilheit des Botenstoffgradienten. Oben: Struktur mit

- gleichlangen Kanalwegen (Kanalbreite: 30 μm , Kanallänge: 6 mm); Unten korrespondierende Struktur mit zwei verschiedenen langen Kanalwegen (kurzer Weg: 5 mm, langer Weg: 7 mm)..... 31
- Abbildung 14: Farbstoffausbreitung von Brillantkresylblau in einer Mikrostruktur mit Sektor und zwei verschiedenen langen Kanalwegen..... 33
- Abbildung 15: Technische Zeichnungen und die Darstellung als 3D-Netz für die numerische Simulation mit Femlisp (N. Neuss); A) Technische Zeichnung einer Migrationskammer mit geradem 3 mm-Kanal in 2D und B) in 3D (mit Dank an C. Christophis), C) trianguliertes 3D-Netz der Migrationskammer in Femlisp (FEM) mit der Eigenfunktion $u_7(x)$ 34
- Abbildung 16: Inverses Mikroskop NIKON TE-2000 mit Inkubationskammer, A) Fotografie und B) zugehörige CAD-Zeichnung; Abbildung aus [138]..... 36
- Abbildung 17: Auswertung des Filopodienassays mit ImageJ. A) Mikroskopische Aufnahme der Neutrophile der Kontrolle ohne Attraktant und B) mit 500 nM PAF (Maßstabsbalken = 50 μm), C) Binärbild von B, D) Zählmaske der runden Zellen mit einer Zirkularität von 0,7 bis 1 nach Anwendung der AnalyzeParticles-Funktion..... 38
- Abbildung 18: Für die Migrationsexperimente mit neutrophilen Granulozyten verwendete Mikrostrukturen; Kanalmaße siehe Tabelle..... 40
- Abbildung 19: A) Schematische Zeichnung einer Mikrostruktur, typische Originalmaße: 9 mm Länge, 3 mm Breite, 2-5 mm Kanallänge, 20-100 μm Kanalbreite. B) Die Knochenmarkszellen (BM MSC) werden vor dem Experiment in einem Reservoir angesiedelt. Ein Mediumwechsel markiert den Startzeitpunkt des Experimentes, damit beginnt die erneute Ausbildung eines Botenstoffgradienten in der Mikrostruktur, und die Stammzellen (HSC) werden in das zweite Reservoir zugegeben. C) Auf dem Glasboden wandernde HSC mit deutlich erkennbaren Filopodien (Aufnahme R. Saffrich). 41
- Abbildung 20: Trackingpfade einzelner Neutrophilzellen erstellt mit der ManualTracking-Funktion des Programmes ImageJ. Gezeigt ist ein Kontrollexperiment ohne Botenstoff in der oben links gezeigten Mikrostruktur mit einer Kanalbreite von 30 μm . Die Neutrophile bewegen sich ungerichtet im Reservoir..... 42
- Abbildung 21: Schema zur Durchführung der Zellkultur für die Bestimmung der zeitabhängigen SDF-1-Konzentration. Am Tag -1 werden in einer 24well-Platte 50 000 MSC je Kammer ausplattiert, nach 24 h das Medium gewechselt (=Startzeitpunkt) und nach weiteren 72 h alle Medienüberstände abgenommen und

- analysiert. Dabei erfolgen zwischenzeitliche Medienwechsel invers zur beabsichtigten Zeitspanne, z.B. erfolgt der Medienwechsel für den 48 h-Wert nach 12 h und der Medienwechsel für den 6 h-Wert nach 66 h Inkubationsdauer. 45
- Abbildung 22: Schematische Zeichnung des Sandwich-ELISA-Experimentes. Das zu detektierende Antigen SDF-1 ist wie in einem Sandwich zwischen den spezifischen Antikörpern (*Coating*- und *Detection*-Antikörper) gepackt und wird über eine Farbreaktion quantifiziert. 46
- Abbildung 23: Typische ELISA-Standardkurve mit 4-Parameter-Logistik-Fit, gemessen mit SDF-1-ELISA-Kit Nr. 5. Hier kann also jeder gemessenen optischen Dichte/Extinktion zwischen 0,175 und 4,029 eine SDF-1 Konzentration zugeordnet werden. 47
- Abbildung 24: Zusammenfassung der Fragestellungen bezüglich der HSC-Chemotaxis am Beispiel des SDF-1/CXCR4-Botenstoffsystems, das die Migration der HSC aus dem Peripherblut hin zur Stammzellnische steuert. 50
- Abbildung 25: Angewendete Chemotaxisassays mit zunehmender Komplexität. A) Einkammer-Experimente in Multiwell- und Microwellplatten, B) Boyden-Kammer bzw. Transwell-Experimente mit zwei getrennten, vertikal angeordneten Kammern, C) Migrationskammern basierend auf Mikrostrukturen mit horizontaler Zellwanderung. 51
- Abbildung 26: Partikel und Jurkat-Zellen im Zellreservoir einer Migrationskammer, der Bildausschnitt entspricht der weiß markierten Fläche im Schema der Mikrostruktur; dunkelgraue Punkte = Polystyrolpartikel mit $d = 4,6 \mu\text{m}$, keine Partikelbewegung über einen Zeitraum von 15 h; markierte Zellen: 1 = stationäre Zelle, 2 = stationäre Zelle (ab $t = 5 \text{ h}$ tot), 3/4/5/6 = wandernde Zellen. 53
- Abbildung 27: Konzentrationsausgleich des Farbstoffes Brillantkresylblau. Dieser Versuch zeigt die Langzeitstabilität des Farbstoffgradienten in der befüllten Migrationskammer. Bereits nach einem Tag ist der Farbstoffgradient im Kanal gut erkennbar, trotz eingeschlossener Luftblase trocknet das Kanalsystem über 3 Wochen hinweg bei Raumtemperatur und ohne befeuchtete Umgebungsatmosphäre nicht aus; Kanal Nr. 3: Breite $d=100 \mu\text{m}$, Länge $l=2 \text{ mm}$, Ausgangskonzentration BCB $c=1 \text{ mM}$; weiße Markierung = ausgewertete Bereiche für Abbildung 28. 55
- Abbildung 28: Konzentrationsausgleich des Farbstoffes Brillantkresylblau. Oben: Grauwertdifferenz zwischen Farbstoffreservoir links und Reservoir rechts (siehe Bereiche in Abb. 14) mit Belichtungskorrektur (Hintergrundabgleich); unten: Differenz in der Extinktion nach Lambert-Beer für die gleichen Reservoirbereiche,

- ein Erreichen des Wertes 0 würde in beiden Darstellungen den kompletten Konzentrationsausgleich bedeuten. 56
- Abbildung 29: Konzentrationsgradient von Brillantkresylblau innerhalb eines Kanals mit 2 mm Länge, Ausgangskonzentration $c(\text{BCB})=1 \text{ mM}$; Die Peaks bei ca. 600 und 1700 μm sind auf den Rand der Deckgläschen, welche die Reservoirs verschließen, zurückzuführen. Die abnehmende Geradensteigung verdeutlicht die Abnahme der Gradientensteilheit über den Zeitraum von 24 Tagen. 57
- Abbildung 30: Ausbildung eines Konzentrationsgradienten von FITC-Dextran im einfachen Kanal bei Raumtemperatur, Kanallänge $l=3 \text{ mm}$, Kanalbreite $b=20 \mu\text{m}$, Messpunkt bei $x=1,5 \text{ mm}$, Ausgangskonzentration FITC-Dextran $c \approx 0,24 \mu\text{M}$ (1%ige Lösung); oben: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Kanals mit Gegenreservoir bei $t=75 \text{ min}$, unten: Verlauf der Fluoreszenzintensität am Kanalmittelpunkt $x=1,5 \text{ mm}$ 58
- Abbildung 31: Vorläufige numerische Simulation der Gradientenausbildung im geraden Kanal für ein Molekül mit $D=1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (entspricht FITC-Dextran oder SDF-1); Gezeigt ist das Konzentrationsprofil entlang der gestrichelten Linie (siehe Skizze oben links) für die Zeitpunkte 0,1, 1, 2, 4 und 10 h nach Befüllen des rechten Reservoirs mit Farb- bzw. Botenstoff. Simulation: Software Femlisp, Nicolas Neuss. 60
- Abbildung 32: Einfluss des Kulturmediums auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand und im Zellysate; oben: Konzentrationen nach 24 h Inkubationsdauer, unten: Konzentrationen nach 72 h Inkubationsdauer; Zellzahl = 50 000 MSC, Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (M1: $n=3$, M2 und hPL: $n=4$, LTBM: $n=2$). 63
- Abbildung 33: Einfluss der Anzahl ausgesäter MSC (M1) auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert ($n=3$). 64
- Abbildung 34: SDF-1-Konzentration im Medienüberstand in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer t , Zellzahl = 50 000 MSC (M1); Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert ($n=5$). 64
- Abbildung 35: Auswirkungen von AMD3100 auf die SDF-1-Konzentration im Medienüberstand, Zellzahl = 50 000 MSC (M1); oben: Langzeitwirkung, 3 Tage Kultur mit 500 ng/ml AMD3100 im Medium (Kreise) und ohne AMD3100 (Rauten), unten: Kurzzeitwirkung, einmalige AMD3100-Zugabe (500 ng/ml, bei $t = 0 \text{ h}$) zum Kulturmedium nach 3 Tagen Vorinkubation. 65

- Abbildung 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der intrazellulären SDF-1-Immunofluoreszenz (grün) in MSC (M1) nach einmaliger AMD3100-Zugabe (500 ng/ml); A) t = 0 h, B) t = 2 h, C) t = 4 h nach der AMD3100-Zugabe; (blau = Färbung der Zellkerne); Aufnahmen: R. Saffrich..... 66
- Abbildung 37: Quantitative Auswertung der Immunofluoreszenzfärbung von intrazellulärem SDF-1 in MSC; oben: Einzelkurven der verschiedenen Zellchargen (M1 – verschiedene Spender, und hPL), unten: Mittelwertkurve aus den Einzelkurven von oben; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (jeweils n=3)..... 67
- Abbildung 38: Migrationstest in Microwells einer um 5° gekippten Terasaki-Platte. A)+B): HL-60-Zellen zeigen keine Migration in Richtung MSC; C)+D): KG-1a-Zellen zeigen ebenfalls keine Migration in Richtung MSC; E)+F): Jurkat-Zellen migrieren zu den MSC und adhären dort, siehe markierter Bereich; G)+H): Jurkat-Zellen mit 500 ng/ml AMD3100 im umgebenden Kulturmedium zeigen geringere Migration zu den MSC und adhären nicht mehr an diesen. Viele der sich bei t=0h in Nähe der MSC befindenden Jurkat-Zellen können nicht adherieren und rutschen zurück an den tieferen Rand. Das Gitter in H) verdeutlicht die zur Auswertung (Abbildung 39) genutzten Abstandsbereiche; alle Maßstabsbalken=100 µm. 71
- Abbildung 39: Wanderung von Jurkat-Zellen im Microwell einer Terasaki-Platte. Der Anteil migrierender Zellen (>400 µm) ist mit weniger als 10 % aller Zellen sehr gering..... 72
- Abbildung 40: Chemotaxis der Neutrophile gegenüber verschiedenen Chemoattraktanten im Transwell-Experiment. Aufgetragen ist das Verhältnis der Anzahl migrierter Zellen mit Attraktant zur Anzahl migrierter Zellen der Kontrolle ohne Attraktant. Die Auszählung der gewanderten Zellen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten, um die Dynamik der Botenstoffwirksamkeit aufzuzeigen; Fehler = Standardabweichung vom Mittelwert (n=4)..... 75
- Abbildung 41: Bewegung der Neutrophile ohne Attraktanteinfluss (Kontrolle): A) Trackingpfade der Neutrophilbewegung im Zellreservoir der rechts gezeigten Mikrostruktur (Maßstabsbalken=100 µm), B) Geschwindigkeitsverteilung über alle Trackingpunkte (n=3757, $vd=2,75 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=1,45 \mu\text{m}/\text{min}$) und C) Geschwindigkeitsverteilung der mittleren Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellen (n=20, $vd=2,79 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,18 \mu\text{m}/\text{min}$). 77

Abbildung 42: Geschwindigkeitsmodi der Neutrophile im Zellreservoir unter Attraktanteinfluss (hier: 500 ng/ml fMLP im Attraktantreservoir): A) Die Geschwindigkeitsverteilung über alle Trackingpunkte der Neutrophilbewegung im Zellreservoir unter Attraktanteinfluss zeigt keinen normalverteilten Verlauf sondern ein verdecktes zweites Maximum bei etwa 9-10 $\mu\text{m}/\text{min}$ ($n=1099$, $v_d=3,93 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=2,93 \mu\text{m}/\text{min}$). Die Geschwindigkeitsverteilung der Kontrolle ohne Attraktant ist zum Vergleich hellgrau eingezeichnet. B) In der Auftragung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen Neutrophilzellen erhält man zwei klar getrennte Fraktionen mit langsameren und schnelleren Zellen (Kontrolle zum Vergleich in hellgrau). Auch die Trackingpfade C) der langsamen und D) der schnellen Zellen unterscheiden sich deutlich voneinander (Anfangsposition = Dreieck, Endposition = Quadrat, Maßstab: 1 Pixel = 0,63 μm). 80

Abbildung 43: Zellgeschwindigkeiten der Neutrophile im Zellreservoir (alle Trackingpunkte) im Verlauf der experimentellen Messzeit: Die Neutrophile im Zellreservoir zeigen während der 13 Stunden des Experimentes eine deutliche Abnahme ihrer Aktivität, die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit sinkt dabei von etwa 8 $\mu\text{m}/\text{min}$ auf unter 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ 80

Abbildung 44: A) Abhängigkeit der Neutrophilmigration von der Absolutkonzentration des Attraktanten fMLP in den Mikrostrukturen. Hierfür wurde die Migrationsgeschwindigkeit v der Neutrophile in verschiedenen Bereichen der Mikrostrukturen ausgewertet (Erläuterung der Symbole siehe auch Abbildung 45): B) Beispiel für eine Geschwindigkeitsverteilung in einem der vier Kontrollexperimente ohne Chemokin und C) Beispiel für eine im Attraktantreservoir gemessene Geschwindigkeitsverteilung bei einer fMLP-Absolutkonzentration von $c=500 \text{ ng/ml}$ 81

Abbildung 45: A) Abhängigkeit der Neutrophilmigration von der Steilheit des in den Mikrostrukturen ausgebildeten Konzentrationsgradienten. Hierfür wurde die Zellmigrationsgeschwindigkeit v in den Reservoiren und in verschiedenen Bereichen der Kanäle ausgewertet: B) Im Kontrollexperiment (vgl. Abbildung 20) wurde die Zellbewegung ohne fMLP ausgewertet, violetter Kreis ($v_d=3,86 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,89 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=4$); C) für die Versuche mit Attraktant erfolgte die Auswertung der Zellbewegung im Zellreservoir (steiler Abfall des Gradienten bis auf quasi unendliche Verdünnung), blaue Raute ($v_d=3,41 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,77 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=5$), und im Attraktantreservoir (quasistationäre Ausgangskonzentration an fMLP), grünes Dreieck ($v_d=2,93 \mu\text{m}/\text{min}$, $\sigma=0,45 \mu\text{m}/\text{min}$, $n=5$); sowie D) bei verzweigten Strukturen für die verschieden langen Kanalabschnitte (der längere Kanalweg führt zu einem flacheren Gradienten). 83

- Abbildung 46: Migrationsgeschwindigkeiten der Neutrophile beim Übergang vom Zellreservoir in den Kanal (Attraktant: fMLP 500 ng/ml): A) Die Wanderungspfade einzelner Zellen wurden vom Reservoir bis in den Kanal hinein durch manuelles Zelltracking verfolgt und anhand dessen der jeweilige Abstand der Zelle zum Kanaleingang sowie die Migrationsgeschwindigkeit zwischen den Trackingpunkten bestimmt (Maßstab: 1 Pixel = 0,63 μm); B) Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde in Abhängigkeit vom Abstand zum Kanaleingang ($x=0 \mu\text{m}$) aufgetragen, für Werte größer null befand sich die Zelle also im Reservoir, für Werte kleiner null im Kanal. Ab einer Entfernung von ca. 40-50 μm zum Kanaleingang fand eine Beschleunigung der gerichteten Zellbewegung statt. 84
- Abbildung 47: Numerische Simulation des Konzentrationsverlaufs in einer Mikrostruktur mit einem 3 mm langem linearen Verbindungskanal für einen Botenstoff mit $D=4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (entspricht fMLP) und $t=4\text{h}$ nach Einfüllen des Botenstoffs; Mikrostrukturbereiche: a = tiefer Reservoirbereich, b = flacher Reservoirbereich, c = Kanal (vgl. Abbildung 31, mit Dank an N. Neuss). 85
- Abbildung 48: Bewegung von Neutrophilen als Zellfront in einem 160 ng/(ml·mm) fMLP-Gradienten, die Durchschnittsgeschwindigkeit solcher Fronten betrug $v_d=12,8 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=4$, $\sigma=1,2 \mu\text{m}/\text{min}$). 86
- Abbildung 49: Durchschnittsgeschwindigkeiten der in Richtung AFT024-Zellen wandernden HSC im Microwell: A) Exemplarische Trackingpfade der Wanderung von HSC am oberen Rand des Microwells zu den AFT024-Zellen am unteren Rand des Microwells, B) Verteilung der Durchschnittsgeschwindigkeiten der einzelnen HSC ($n=30$, $v_d=66 \mu\text{m}/\text{h}$, $\sigma=11 \mu\text{m}/\text{min}$). 89
- Abbildung 50: Migration von HSC zu SDF-1-Lösungen im Transwell-Experiment. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung, wobei die Anzahl N migrierter Zellen gegenüber der Kontrolle normiert wurde (Vielfaches= $N(\text{SDF-1})/N(\text{Kontrolle})$). 90
- Abbildung 51: Wanderung von HSC in einer Mikrostruktur (abgebildeter Ausschnitt siehe Skizze, Kanalbreite 100 μm). A) Nach Bildung der Botenstoffe durch die MSC und Ausbildung des chemischen Gradienten beginnen die Stammzellen zum Kanaleingang in Richtung des MSC-Reservoirs zu wandern. Sie bilden dabei linienförmige Aneinanderreihungen. C) Aufsummierung an Differenzbildern der gesamten Zeitrafferaufnahme (erstellt mit MATLAB), hier spiegeln sich die Wanderungsrouten der hintereinander wandernden HSC besonders deutlich wider.

B) Detailaufnahme einer migrierenden Stammzelle mit deutlich ausgebildetem Lamellipodium..... 92

Abbildung 52: Abhängigkeit des Startzeitpunktes t_{start} der HSC-Wanderung zu den MSC vom HSC-MSC-Abstand d in Microwellexperimenten (Zellabstand ca. 250 μm) und in den Mikrostrukturen (Zellabstand 2 bis 5 mm). Mit einer Vergrößerung des Abstandes d verlängert sich auch der Diffusionsweg der Botenstoffmoleküle, und die HSC reagieren erst später auf die Stimulierung..... 92

Abbildung 53: Vergrößerungen und Funktionen der Entwürfe 1, alle Strukturen in 4facher Vergrößerung: A) Mikrostrukturen mit unterschiedlich langen Kanälen (vgl. Abbildung 9): Durch die verschieden langen Diffusionswege erreicht der Attraktant die Zellen im Reservoir zu versetzten Zeiten, wodurch eine zeitlich versetzte Zellantwort erwartet werden kann, gleichzeitig entwickeln sich in den verschieden langen Kanälen verschieden steile Attraktantgradienten; B) Mikrostruktur mit einer Kanalverzweigung: In den verschieden langen Kanalwegen bilden sich auch verschieden steile Konzentrationsgradienten aus, somit kann anhand des Zellverhaltens am Verzweigungspunkt die Sensitivität der Zellen im Bezug auf die Gradientensteilheit getestet werden; C) Mikrostruktur mit einem breiteren Verbindungskanal: Durch die Breite des Verbindungskanals kann die Breite der Diffusionsfront bestimmt werden und somit auch, ob der Botenstoff zunächst nur einzelne Zellen vor dem Kanaleingang erreicht (sehr dünner Kanal) oder viele Zellen auf einmal (breiterer Kanal). Je nach Antwort der Zellen können sich dadurch Hinweise auf ein kollektives Zellverhalten ergeben..... 101

Abbildung 54: Entwürfe 1: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von 100 μm und wurden als Folienmasken realisiert. Merkmale dieser allerersten Entwürfe waren die viereckigen Reservoirs und noch sehr breite, teils auch sehr lange Kanäle; 1,5fache Vergrößerung, Format: Objektträger – jeweils zwei der Objektträgerausschnitte konnten zur Belichtung eines 4-Zoll-Wafers verwendet werden..... 102

Abbildung 55: Entwürfe 2: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von 40 μm und wurden als Folienmaske realisiert. Merkmale dieser weiterentwickelten Entwürfe waren die runden Reservoirs, deren Durchmesser (meist 3 mm) an das Pipettieren der Zellen und Ausstanzen der Einfülllöcher mit 2,5 mm²-Aderendhülsen angepasst wurde. A) 2fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 4-Zoll-Wafer; B) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen mit unterschiedlich langen Kanalwegen, wodurch die Sensitivität der Zellen im Bezug auf die Gradientensteilheit getestet werden kann. Die breiten Kanalabschnitte, die sich erst im weiteren Verlauf aufsplittenden, können dazu genutzt werden, den Kanal vor dem Experiment durch mechanischen Druck von

oben auf das PDMS zu verschließen, damit kann ein Startzeitpunkt des Experimentes definiert werden. 103

Abbildung 56: Entwürfe 3: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von 10 μm und wurden als Chrommaske realisiert. Generell konnten durch das Chrommasken-Verfahren viel kleinere Strukturen hergestellt werden, welche für die Untersuchung der nur 5 μm großen Stammzellen vorteilhafter waren. A) 1,5fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 5-Zoll-Maske zur Belichtung von 4-Zoll-Wafern; B)-D) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen: B) Verbesserung der Strukturen mit zwei verschiedenen langen Kanalwegen zur Untersuchung der Sensitivität der Zellen gegenüber dem chemischen Gradienten, C) kleiner Irrgarten, durch den relativ langen Kanalweg lassen sich solche Strukturen aber nur für schnell migrierende Zellen anwenden, D) Struktur mit drei Reservoiren, anhand der z.B. die Chemotaxis im Falle von zwei konkurrierenden Botenstoffen untersucht werden könnte. 104

Abbildung 57: Entwürfe 4: Die gezeigten Mikrostrukturen haben eine minimale Kanalbreite von 50 μm und wurden als Folienmaske realisiert. A) 1,5fache Vergrößerung des gesamten Layouts, Format: 4-Zoll-Wafer; B) und C) 4fache Vergrößerung ausgewählter Strukturen: B) Strukturen mit einem sehr kurzen Verbindungskanal, der ermöglicht, dass auch langsam migrierende Zellen wie die HSC die MSC erreichen, C) Strukturen mit breiten äußeren Kanälen, durch diese kann aufgrund der Geometrie ein eventueller Konvektionsfluss abgeleitet werden, während im schmalen mittleren Kanal, dem kürzesten Verbindungsweg zwischen den Reservoiren, die Diffusion dominiert und ein steilerer Konzentrationsgradient vorliegt. 106

5.6 Literaturverzeichnis

- [1] Ho AD, Beyreuther K. Faszinierende Multitalente - "Rohstoff" Stammzellen? Ruperto Carola. 2001.
- [2] Ho AD, Punzel M. Hematopoietic stem cells: Can old cells learn new tricks? *J Leukoc Biol.* 2003;73:547-555.
- [3] Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research.* 2011;175:145-149.
- [4] Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466:829-834.
- [5] Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116:769-778.
- [6] Ferraro F, Lo Celso C, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Cell Biology of Stem Cells.* Berlin: Springer-Verlag Berlin; 2010. p. 155-168.
- [7] Nilsson SK, Simmons PJ, Bertoncello I. Hemopoietic stem cell engraftment. *Exp Hematol.* 2006;34:123-129.
- [8] Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005;106:1901-1910.
- [9] Schulz C, von Andrian UH, Massberg S. Hematopoietic stem and progenitor cells: their mobilization and homing to bone marrow and peripheral tissue. *Immunol Res.* 2009;44:160-168.
- [10] Ross J, Li LH. HSC mobilization: new incites and insights. *Blood.* 2009;114:1283-1284.
- [11] Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol.* 2002;30:973-981.
- [12] Gazitt Y. Homing and mobilization of hematopoietic stem cells and hematopoietic cancer cells are mirror image processes, utilizing similar signaling pathways and occurring concurrently: circulating cancer cells constitute an ideal target for concurrent treatment with chemotherapy and antineage-specific antibodies. *Leukemia.* 2004;18:1-10.
- [13] Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4:7-25.
- [14] Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med.* 2011;208:421-428.
- [15] Zhang JW, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425:836-841.

- [16] Nakamura Y, Arai F, Iwasaki H, et al. Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells. *Blood*. 2010;116:1422-1432.
- [17] Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia*. 2010;24:1979-1992.
- [18] Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: Home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology*. 2005;20:349-356.
- [19] Doan PL, Chute JP. The vascular niche: home for normal and malignant hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2011.
- [20] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425:841-846.
- [21] Arai F, Suda T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Hematopoietic Stem Cells Vi*; 2007. p. 41-53.
- [22] Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki HA. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7:569-589.
- [23] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:568-584.
- [24] Jing DH, Fonseca AV, Alakel N, et al. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells - modeling the niche compartments in vitro. *Haematol-Hematol J*. 2010;95:542-550.
- [25] Walenda T, Bork S, Horn P, et al. Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;14:337-350.
- [26] Lutolf MP, Blau HM. Artificial Stem Cell Niches. *Adv Mater*. 2009;21:3255-3268.
- [27] Marthiens V, Kazanis I, Moss L, Long K, French-Constant C. Adhesion molecules in the stem cell niche - more than just staying in shape? *Journal of Cell Science*. 2010;123:1613-1622.
- [28] Ellis SJ, Tanentzapf G. Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interactions. *Cell Tissue Res*. 2010;339:121-130.
- [29] Jiang YH, Prosper F, Verfaillie CM. Opposing effects of engagement of integrins and stimulation of cytokine receptors on cell cycle progression of normal human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2000;95:846-854.
- [30] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311:1880-1885.
- [31] Eisenbach M. Chemotaxis. London: Imperial College Press; 2004.

- [32] Jin T, Xu XH, Hereld D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*. 2008;44:1-8.
- [33] Christopherson KW, II, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of Hematopoietic Stem Cell Homing and Engraftment by CD26. *Science*. 2004;305:1000-1003.
- [34] Paganessi LA, Walker AL, Tan LL, et al. Effective mobilization of hematopoietic progenitor cells in G-CSF mobilization defective CD26^{-/-} mice through AMD3100-induced disruption of the CXCL12-CXCR4 axis. *Exp Hematol*. 2011;39:384-390.
- [35] Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, et al. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34⁺ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*. 2004;103:2981-2989.
- [36] Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration. *J Leukoc Biol*. 2008;84:1521-1529.
- [37] Aiuti A, Webbl IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34⁺ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34⁺ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185:111-120.
- [38] Jo D-Y, Rafii S, Hamada T, Moore MAS. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105:101-111.
- [39] Vagima Y, Lapid K, Kollet O, Goichberg P, Alon R, Lapidot T. Pathways Implicated in Stem Cell Migration: The SDF-1/CXCR4 Axis. *Stem Cell Migration: Methods and Protocols*; 2011. p. 277-289.
- [40] Pusic I, DiPersio JF. Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr Opin Hematol*. 2010;17:319-326.
- [41] Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002;3:687-694.
- [42] Tavor S, Petit I. Can inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis eradicate acute leukemia? *Semin Cancer Biol*. 2010;20:178-185.
- [43] Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16:2927-2931.
- [44] Voermans C, Anthony EC, Mul E, van der Schoot E, Hordijk P. SDF-1-induced actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2001;29:1456-1464.
- [45] Eaves CJ. SDF-1 tells stem cells to mind their P's and Z's. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115:27-29.

- [46] Fu JX, Zhang XH, Zhang Y, et al. SDF1/CXCR4 signalling promotes mobility of myeloma cells by activation and redistribution of cell surface adhesion molecules. *Archives of Medical Science*. 2009;5:141-148.
- [47] Jimenez C, Portela RA, Mellado M, et al. Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol*. 2000;151:249-261.
- [48] Wang JF, Park IW, Grooman JE. Stromal cell-derived factor-1 stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*. 2000;95:2505-2513.
- [49] Fruehauf S, Seeger T, Maier P, et al. The CXCR4 antagonist AMD3100 releases a subset of G-CSF-primed peripheral blood progenitor cells with specific gene expression characteristics. *Exp Hematol*. 2006;34:1052-1059.
- [50] Frimberger AE, McAuliffe CI, Werme KA, et al. The fleet feet of haematopoietic stem cells: rapid motility, interaction and proteopodia. *British journal of haematology*. 2001;112:644-654. FIELD Reference Number: FIELD Journal Code:0372544 FIELD Call Number:.
- [51] Fricker SP, Anastassov V, Cox J, et al. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical Pharmacology*. 2006;72:588-596.
- [52] Wong RSY, Bodart V, Metz M, Labrecque J, Bridger G, Fricker SP. Comparison of the Potential Multiple Binding Modes of Bicyclam, Monocyclam, and Noncyclam Small-Molecule CXC Chemokine Receptor 4 Inhibitors. *Molecular Pharmacology*. 2008;74:1485-1495.
- [53] Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood*. 2003;102:2728-2730.
- [54] DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2009;113:5720-5726.
- [55] Runnels JM, Azab AK, Pitsillides C, et al. The Effect of the CXCR4 Inhibitors, AMD3100 and AMD3465, in Multiple Myeloma Cell Homing and Its Interaction with the Bone Marrow Microenvironment. *Blood*. 2009;114:725-725.
- [56] Teixeira AI, Hermanson O, Werner C. Designing and Engineering Stem Cell Niches. *MRS Bull*. 2010;35:591-596.
- [57] Lutolf MP, Doyonnas R, Blau HM. Engineering niches for the in vitro manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Exp Hematol*. 2005;33:221.
- [58] Wagner W, Wein F, Roderburg C, et al. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stromal cells as a model for interaction between stem cells and their niche. *Blood*. 2006;108:1399.

- [59] Wagner W, Wein F, Roderburg C, et al. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp Hematol.* 2007;35:314-325.
- [60] Wagner W, Feldmann RE, Seckinger A, et al. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations - Evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol.* 2006;34:536-548.
- [61] Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations - Comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 2007;3:239-248.
- [62] Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy.* 2008;10:320-330.
- [63] Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33:1402-1416.
- [64] Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984;133:157-165.
- [65] Katz FE, Tindle R, Sutherland DR, Greaves MF. Identification of a membrane glycoprotein associated with haemopoietic progenitor cells. *Leuk Res.* 1985;9:191-198.
- [66] Voermans C, Gerritsen WR, von dem Borne AEGK, van der Schoot CE. Increased migration of cord blood-derived CD34+ cells, as compared to bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells across uncoated or fibronectin-coated filters. *Exp Hematol.* 1999;27:1806-1814.
- [67] Freund D, Oswald J, Feldmann S, Ehninger G, Corbeil D, Bornhauser M. Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34(+) and CD133(+) blood stem cells derived from a single donor. *Cell Proliferation.* 2006;39:325-332.
- [68] Terstappen L, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood.* 1991;77:1218-1227.
- [69] Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9118-9123.
- [70] Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2006;107:2162-2169.
- [71] Christ O, Lucke K, Imren S, et al. Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. *Haematol-Hematol J.* 2007;92:1165-1172.

-
- [72] Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 2005;23:752-760.
- [73] Schneider U, Bornkamm H-USG. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 1977;19:621-626.
- [74] Gillis S, Watson J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med*. 1980;152:1709-1719.
- [75] Weiss A, R.L. W, Stobo JD. The Role of T3 Surface Molecules in the Activation of Human T Cells: A Two-Stimulus Requirement for IL 2 Production Reflects Events Occurring at a Pre-Translational Level. *J Immunol* 1984;133:123-128.
- [76] Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *ProcRSocLondBBiolSci*. 1964;159:257-282.
- [77] Zinkernagel RM, Doherty PC. Restriction of in vitro T-cell mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*. 1974;248:701-702.
- [78] Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cells migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol*. 2005:127-159.
- [79] Ward SG. T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol*. 2006;27:80-87.
- [80] Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol*. 2010;88:463-473.
- [81] Munk R, Ghosh P, Ghosh MC, et al. Involvement of mTOR in CXCL12 Mediated T Cell Signaling and Migration. *PLoS One*. 2011;6:5.
- [82] Lin F, Butcher EC. T cell chemotaxis in a simple microfluidic device. *Lab Chip*. 2006;6:1462-1469.
- [83] Zepeda-Moreno A, Taubert I, Hellwig I, et al. Innovative method for quantification of cell-cell-adhesion in 96-well plates. *Cell Adh Migr*. 2011;5:215-219.
- [84] Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. Characterization of the Continuous, Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) from a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*. 1979;54:713-733.
- [85] Matzner Y, Gavison R, Rachmilewitz EA, Fibach E. Expression of granulocytic functions by leukemic promyelocytic HL-60 cells - differential induction by dimethylsulfoxide and retinoic acid. *Cell Differentiation*. 1987;21:261-269.
- [86] Wolach B, van der Laan LJW, Maianski NA, et al. Growth factors G-CSF and GM-CSF differentially preserve chemotaxis of neutrophils aging in vitro. *Exp Hematol*. 2007;35:541-550.
-

- [87] Sachs CWJ, Thompson B, Pratt P, Lynn WSJ. Ethanol induces functional differentiation of the promyelocytic cell line HL-60. *Federation Proceedings*. 1985;44:534.
- [88] Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. *Fundamentals of Inflammation*. New York: Cambridge University Press; 2010.
- [89] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: Molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*. 2000;80:617-653.
- [90] Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008;112:935-945.
- [91] Sham RL, Phatak PD, Belanger KA, Packman CH. Functional properties of HL-60 cells matured with all-trans retinoic acid and DMSO - differences in response to interleukin-8 and fMLP. *Leuk Res*. 1995;19:1-6.
- [92] Hauert AB, Martinelli S, Marone C, Niggli V. Differentiated HL-60 cells are a valid model system for the analysis of human neutrophil migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:838-854.
- [93] Carrigan SO, Pink DBS, Stadnyk AW. Neutrophil transepithelial migration in response to the chemoattractant fMLP but not C5a is phospholipase D-dependent and related to the use of CD11b/CD18. *J Leukoc Biol*. 2007;82:1575-1584.
- [94] Di Cioccio V, Strippoli R, Bizzarri C, et al. Key role of proline-rich tyrosine kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis. *Immunology*. 2004;111:407-415.
- [95] Toetsch S, Olwell P, Prina-Mello A, Volkov Y. The evolution of chemotaxis assays from static models to physiologically relevant platforms. *Integr Biol*. 2009;1:170-181.
- [96] Keenan TM, Folch A. Biomolecular gradients in cell culture systems. *Lab Chip*. 2008;8:34-57.
- [97] Decaestecker C, Debeir O, Van Ham P, Kiss R. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. *Med Res Rev*. 2007;27:149-176.
- [98] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302:1704-1709.
- [99] Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:446-454.
- [100] Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends in Cell Biology*. 2002;12:112-120.
- [101] Wagner W, Saffrich R, Wirkner U, et al. Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction. *Stem Cells*. 2005;23:1180-1191.

-
- [102] Gundersen W, J.N. B. Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science*. 1979;206:1079-1080.
- [103] Nelson RD, Herron MJ. Agarose method for human neutrophil chemotaxis. *Method Enzymol*. 1988;162:50-59.
- [104] Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol*. 1997;139:1349-1360.
- [105] Zigmond SH. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *J Cell Biol*. 1977;75:606-616.
- [106] Zicha D, Dunn GA, Brown AF. A new direct-viewing chemotaxis chamber. *Journal of Cell Science*. 1991;99:769-775.
- [107] Marasco WA, Becker EL, Oliver JM. The ionic basis of chemotaxis. Separate cation requirements for neutrophil orientation and locomotion in a gradient of chemotactic peptide. *American Journal of Pathology*. 1980;98:749-768.
- [108] Alstergren P, Zhu BQ, Glougauer M, Mak TW, Ellen RP, Sodek J. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. *Cellular Immunology*. 2004;231:146-157.
- [109] Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*. 1962;115:453-466.
- [110] Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:746-761.
- [111] Xia Y, Whitesides GM. Soft lithography. *Angewandte Chemie, International Edition*. 1998;37:550-575.
- [112] Sia SK, Whitesides GM. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*. 2003;24:3563-3576.
- [113] Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2002;4:261-286.
- [114] Huang Y, Agrawal B, Sun DD, Kuo JS, Williams JC. Microfluidics-based devices: New tools for studying cancer and cancer stem cell migration. *Biomicrofluidics*. 2011;5:013412.
- [115] Wu HW, Lin CC, Lee GB. Stem cells in microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2011;5:013401.
- [116] Saadi W, Rhee SW, Lin F, Vahidi B, Chung BG, Jeon NL. Generation of stable concentration gradients in 2D and 3D environments using a microfluidic ladder chamber. *Biomed Microdevices*. 2007;9:627-635.
- [117] Irimia D, Charras G, Agrawal N, Mitchison T, Toner M. Polar stimulation and constrained cell migration in microfluidic channels. *Lab Chip*. 2007;7:1783-1790.
-

- [118] Fossier KA, Nuzzo RG. Fabrication of patterned multicomponent protein gradients and gradient arrays using microfluidic depletion. *Analytical Chemistry*. 2003;75:5775-5782.
- [119] Jeon NL, Dertinger SKW, Chiu DT, Choi IS, Stroock AD, Whitesides GM. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*. 2000;16:8311-8316.
- [120] Jeon NL, Baskaran H, Dertinger SKW, Whitesides GM, Van de Water L, Toner M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotechnol*. 2002;20:826-830.
- [121] Irimia D, Geba DA, Toner M. Universal microfluidic gradient generator. *Analytical Chemistry*. 2006;78:3472-3477.
- [122] Smith RL, Demers CJ, Collins SD. Microfluidic device for the combinatorial application and maintenance of dynamically imposed diffusional gradients. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2010;9:613-622.
- [123] Abhyankar VV, Lokuta MA, Huttenlocher A, Beebe DJ. Characterization of a membrane-based gradient generator for use in cell-signaling studies. *Lab Chip*. 2006;6:389-393.
- [124] Madou MJ. *Fundamentals of Microfabrication*, 2nd ed. Boca Raton, London: CRC Press LLC; 2002.
- [125] Probstein RF. *Physicochemical hydrodynamics*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1995.
- [126] Squires TM, Quake SR. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*. 2005;77:977-1026.
- [127] Pennathur S. Flow control in microfluidics: are the workhorse flows adequate? *Lab Chip*. 2008;8:383-387.
- [128] McDonald JC, Duffy DC, Anderson JR, et al. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*. 2000;21:27-40.
- [129] Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*. 1998;70:4974-4984.
- [130] Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*, 5th ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- [131] Koefler HP, Billing R, Lusic AJ, Sparkes R, Golde DW. An Undifferentiated Variant Derived from the Human Acute Myelogenous Leukemia Cell Line (K_g-1). *Blood*. 1980;56:256-273.
- [132] Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. Establishment of a Human Acute Myeloid Leukemia Cell Line (Kasumi-1) with 8;21 Chromosome Translocation. *Blood*. 1991;77:2031-2036.

- [133] Nolta JA, Thiemann FT, Arakawa-Hoyt J, et al. The AFT024 stromal cell line supports long-term ex vivo maintenance of engrafting multipotent human hematopoietic progenitors. *Leukemia*. 2002;16:352-361.
- [134] Thiemann FT, Moore KA, Smogorzewska EM, Lemischka IR, Crooks GM. The murine stromal cell line AFT024 acts specifically on human CD34(+)CD38(-) progenitors to maintain primitive function and immunophenotype in vitro. *Exp Hematol*. 1998;26:612-619.
- [135] Christophis C, Taubert I, Meseck GR, et al. Shear Stress Regulates Adhesion and Rolling of CD44+ Leukemic and Hematopoietic Progenitor Cells on Hyaluronan. *Biophysical Journal*. 2011;101:585-593.
- [136] Kettemann A, Neuss-Radu M. Derivation and analysis of a system modeling the chemotactic movement of hematopoietic stem cells. *J Math Biol*. 2008;56:579-610.
- [137] Crank J. *The mathematics of diffusion*, 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc. ; 1975.
- [138] Christophis C. Quantification of cell adhesion strength on artificial surfaces with a microfluidic shear force device. *Applied Physical Chemistry*. Heidelberg: University of Heidelberg; 2011.
- [139] Wagner W, Feldmann RE, Wein F, et al. The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations. *Cytotherapy*. 2006;8:244.
- [140] Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells (Retracted article. See vol. 113, pg. 2370, 2009). *Blood*. 2001;98:2615-2625.
- [141] Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007;25:1270-1278.
- [142] Dexter TM, Moore MA, Sheridan AP. Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras in vitro. *J Exp Med*. 1977;145:1612-1616.
- [143] Findlay JWA, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *Aaps Journal*. 2007;9:E260-E267.
- [144] Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*. 2000;21:1249-1273.
- [145] Faber A, Roderburg C, Wein F, et al. The many facets of SDF-1 alpha, CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Biotechnol*. 2007:26065.

- [146] Fruehauf S, Srbic K, Seggewiss R, Topaly J, Ho AD. Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *J Leukoc Biol.* 2002;71:425-432.
- [147] Beta C, Frohlich T, Bodeker HU, Bodenschatz E. Chemotaxis in microfluidic devices - a study of flow effects. *Lab Chip.* 2008;8:1087-1096.
- [148] Wagner W, Bork S, Horn P, et al. Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells. *PLoS One.* 2009;4:e5846.
- [149] Wagner W, Horn P, Castoldi M, et al. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS One.* 2008;3:e2213.
- [150] Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J Exp Med.* 2005;201:1307-1318.
- [151] Mishima S, Nagai A, Abdullah S, et al. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. *Eur J Haematol.* 2010;84:538-546.
- [152] Schajnovitz A, Itkin T, D'Uva G, et al. CXCL12 secretion by bone marrow stromal cells is dependent on cell contact and mediated by connexin-43 and connexin-45 gap junctions. *Nat Immunol.* 2011;12:391-398.
- [153] Dar A, Goichberg P, Shinder V, et al. Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol.* 2005;6:1038-1046.
- [154] Mohty M, Ho AD. In and out of the niche: perspectives in mobilization of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2011;39:723-729.
- [155] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med.* 1996;184:1101-1109.
- [156] Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a G(i)-Coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *Journal of Immunology.* 1999;163:5954-5963.
- [157] Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MAS, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34(+) hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood.* 1998;91:4523-4530.
- [158] Nishita M, Aizawa H, Mizuno K. Stromal cell-derived factor 1 alpha activates LIM kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T-cell chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology.* 2002;22:774-783.
- [159] Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K, Broxmeyer HE. Stromal-cell-derived factor-1/CXCL12-induced chemotaxis of a T cell line involves intracellular signaling through Cbl

and Cbl-b and their regulation by Src kinases and CD45. *Blood Cells Molecules and Diseases*. 2006;36:308-314.

[160] Otto M. *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*. Weinheim: VCH; 1997.

[161] Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: Selling cytokines by the pound. *AdvImmunol*. 1999;73:369-509.

[162] Gainet J, Chollet-Martin S, Brion M, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: An amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. *Laboratory Investigation*. 1998;78:755-762.

[163] Harvath L, Falk W, Leonard EJ. Rapid quantification of Neutrophil chemotaxis: Use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly. *J Immunol Methods*. 1980;37:39-45.

[164] Keenan TM, Frevert CW, Wu A, Wong V, Folch A. A new method for studying gradient-induced neutrophil desensitization based on an open microfluidic chamber. *Lab Chip*. 2010;10:116-122.

[165] Foxman EF, Kunkel EJ, Butcher EC. Integrating conflicting chemotactic signals: The role of memory in leukocyte navigation. *J Cell Biol*. 1999;147:577-587.

[166] Lee JY, Buzney CD, Poznansky MC, Sackstein R. Dynamic alterations in chemokine gradients induce transendothelial shuttling of human T cells under physiologic shear conditions. *J Leukoc Biol*. 2009;86:1285-1294.

Danksagung

Zunächst möchte ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Michael Grunze für die Möglichkeit danken, dass ich diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner Anleitung durchführen konnte. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Anthony D. Ho für die Unterstützung und die Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Für die freundliche Betreuung, die Korrektur der Arbeit und so manchen Anschubser möchte ich mich bei PD Dr. Axel Rosenhahn bedanken, der trotz wenig Zeit immer versucht hat, in meinen Ergebnissen noch durchzusehen, konstruktive Kritik zu üben und hilfreiche Ideen einzubringen.

Bei Patrick Wuchter und Wolfgang Wagner möchte ich mich für die wissenschaftliche Diskussion des Themas und ihre Ratschläge dazu bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Rainer Saffrich bedanken, von dem ich über die letzten Jahre am allermeisten gelernt habe. Lieber Rainer, ein extra Danke an Dich für alle gemeinsamen Experimente, all deine Hilfsbereitschaft und alle netten Gespräche!

Der Arbeitsgruppe Stammzellforschung möchte ich für die Bereitstellung der Zellen und die Beantwortung all meiner Fragen danken, dabei insbesondere Larissa Pietsch, Isabel Taubert, Abraham Zepeda-Moreno, Annette Ludwig, Isabelle Hellwig, Angela Lenze, Anke Diehlmann, Birgit Michels und Volker Eckstein.

Die Hilfe und Kooperation folgender Arbeitsgruppen hat mir die Arbeit wesentlich erleichtert und zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen: Vielen Dank an den Arbeitskreis Prof. Spatz, für die Möglichkeit der Nutzung der Zellkultur und vieler Geräte, insbesondere an Sigrid Riese für die wertvollen Tipps in der Zellkultur. Vielen Dank an Prof. Dr. Saile und seinen Arbeitskreis am IMT für die Anfertigung der Mikrostrukturmaster, besonders an Sandra Wilson. Vielen Dank auch an Prof. Dr. Katja Schmitz, Maria Braun und Nicole Niemeier für die Einführung in die Neutrophile und deren Bereitstellung.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Rosenhahn bedanke ich mich für die nette Gesellschaft, für alle wertvollen und weniger wertvollen Gespräche und die moralische Unterstützung. Besonders Fanny möchte ich für ihre Freundschaft danken, Christof und Sebastian für das „Mitleiden“ und alle wissenschaftlichen Diskussionen, sowie allen anderen, mit denen ich eine schöne Zeit im Büro und im Labor verbringen durfte!

Ein großes Dankeschön auch an das nicht-wissenschaftliche Personal des AK Grunze für die technische und administrative Unterstützung in allen Belangen.

Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern dafür danken, dass sie mich finanziell unterstützt und mir diesen Bildungsweg ermöglicht haben, und auch dafür, dass sie immer versucht haben auf die Entfernung so gut es eben ging zu helfen und mir alle Wünsche zu erfüllen.

Den größten Rückhalt hat mir jedoch immer meine Familie gegeben. Vielen Dank lieber Felix, ohne dich hätte ich sicher nicht durchgehalten, und danke Markus und Thomas, ich hoffe ihr könnt irgendwann Verständnis dafür zeigen, dass ihr Mama mit einer Doktorarbeit teilen musstet, als ihr klein wart.

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, den
