

Klinisches Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
AG Avci-Adali In Vivo Tissue Engineering

**Endothelialisierung von Oxygenatormembranen zur
Verbesserung der Hämokompatibilität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

Vorgelegt von

Hansen, Caroline Cicely Gwyneth

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Koeppen

Tag der Disputation: 19.06.2023

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit beiseite standen.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Avci-Adali bedanken, die mir die Möglichkeit gab, an diesem spannenden Forschungsprojekt mitzuarbeiten.

Eine ganz wesentliche Stütze während dieser Arbeit war mein Betreuer Denis Canjuga, der mir immer für alle Fragen Beiseite stand. Vielen Dank für die Betreuung und die Korrektur meiner Arbeit.

Zusätzlich möchte ich mich beim gesamten Team des Forschungslabors der THG-Chirurgie für die Einarbeitung, Unterstützung und das nette Miteinander bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	9
1.1 Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO).....	9
1.1.1 Funktionsweise und Aufbau.....	9
1.1.2 Indikationen für die ECMO.....	12
1.1.3 Komplikationen der ECMO.....	14
1.2 Optimierung der Hämokompatibilität künstlicher Oberflächen.....	15
1.2.1 Interaktion von Blut mit künstlichen Oberflächen.....	16
1.2.2 Ansätze zur Optimierung der Hämokompatibilität.....	18
1.3 Endothelialisierung zur Verbesserung der Hämokompatibilität.....	21
1.3.1 Das Endothel.....	21
1.3.2 Endothelialisierung von Hohlfasermembranen	23
1.3.3 Verwendung der Click-Chemie im Tissue Engineering.....	24
1.4 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden.....	26
2.1 Materialien.....	26
2.1.1 Geräte	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Lösungen und Puffer.....	28
2.1.4 Zellen.....	29
2.1.5 Zellkulturmedien.....	29
2.1.6 Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.1.7 Chemikalien für die Beschichtung von Hohlfasermembranen.....	31
2.1.8 Chemikalien für die Fluoreszenzmikroskopie	31
2.1.9 Antikörper	32
2.1.10 Chemikalien zur Modifizierung der Oberfläche von HUVECS.....	32
2.1.11 Kits für Antikörperisolation, Antikörpermodifizierung und Proteinbestimmung.....	32
2.1.12 Hohlfasermembranen (HFM)	33

2.1.13	Software	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Auftauen von primären humanen Endothelzellen.....	34
2.2.2	Kultivierung und Passagieren von primären humanen Endothelzellen	34
2.2.3	Zellen Einfrieren.....	35
2.2.4	Beschichtung von PMP-Hohlmembranen	35
2.2.4.1	O ₂ -Plasmabehandlung	35
2.2.4.2	Silanisierung mit APTES	36
2.2.4.3	Nachweis von Aminogruppen mittels Methylorangefärbung	37
2.2.4.4	Einführung von Alkinen durch Behandlung mit DBCO-PEG ₄ -NHS Ester	37
2.2.4.5	Nachweis der Funktionalisierung mit DBCO mittels Azid-Cy3-Färbung	38
2.2.4.6	Generierung von Azidgruppen auf der Oberfläche von HUVECs.....	39
2.2.4.7	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Azidgruppen auf der Zelloberfläche von HUVECs	40
2.2.4.8	Durchflusszytometrischer Nachweis von Azidgruppen auf der Oberfläche von HUVECs	40
2.2.4.9	Endothelialisierung der modifizierten HFM	41
2.2.4.10	Calcein-AM Färbung der HUVECs auf den HFM	42
2.2.4.11	Nachweis der Zell-Zell Kontakte mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	43
2.2.4.12	Detektion der adhärenen Zellen mittels Fluoreszenzreader.....	44
2.2.5	Isolierung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Hybridomazellen	45
2.2.5.1	Kultivierung von P2b1 Hybridomazellen	45
2.2.5.2	Antikörperisolierung mittels Magne Protein G Beads.....	46
2.2.5.3	Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	47
2.2.5.4	Nachweis der Bindung des isolierten Maus anti-human CD31 Antikörpers an HUVECs	47
2.2.6	Azidmodifizierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers	48
2.2.6.1	Nachweis der Azidmodifizierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Durchflusszytometrie	50
3	Ergebnisse	50
3.1	Beschichtung von PMP-Hohlfasermembranen	50
3.1.1	Nachweis von Aminogruppen mittels Methylorange Färbung	50
3.1.2	Nachweis der Funktionalisierung mit DBCO mittels Azid-Cy3-Färbung.....	51
3.1.3	Nachweis der generierten Azidgruppen auf HUVECs mittels DBCO-S-Cy3-Färbung.....	53
3.1.4	Endothelialisierung der beschichteten PMP-HFM	56

3.1.5	Nachweis der Zell-Zell Kontakte mittels Immunfloreszenzfärbung	59
3.1.6	Quantifizierung der Zellbesiedlung der Membranen.....	61
3.2	Isolierung und Konzentrationsbestimmung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers.....	62
3.3	Nachweis des Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Durchflusszytometrie	64
3.4	Azidfunktionalisierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers	65
4	<i>Diskussion</i>.....	67
4.1	Etablierung eines Protokolls zur <i>in vitro</i> Endothelialisierung von Hohlfasermembranen	71
4.1.1	Oberflächenmodifizierung von PMP-Hohlfasermembranen	72
4.1.2	In vitro Endothelialisierung von PMP-Hohlfasermembranen	75
4.2	Endothelialisierung von Hohlfasermembranen mittels eines Maus anti-human CD31 Antikörpers.....	78
4.2.1	Herstellung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers.....	78
4.2.2	In vivo Selbstendothelialisierung mit EPCs	80
4.3	Fazit und Ausblick	82
5	<i>Zusammenfassung</i>.....	84
6	<i>Erklärung zum Eigenanteil</i>	86
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	87
8	<i>Liste der Veröffentlichungen</i>	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: VV-ECMO Kreislauf	11
Abbildung 2: Graphische Darstellung der Anzahl der ECMO-Fälle und der ELSO (Extracorporeal Life Support Organization) Mitgliedszentren zwischen 1990 und 2015	12
Abbildung 3: Interaktion von Blut mit der Oberfläche eines Biomaterials	17
Abbildung 4: Sauerstoffplasmabehandlung und Silanisierung mit APTES	36
Abbildung 5: NHS Ester Reaktion zwischen DBCO-PEG ₄ -NHS Ester und den Aminogruppen auf der Oberfläche der HFM	38
Abbildung 6: Generierung von Azidgruppen auf HUVECs.....	40
Abbildung 7: Reaktionsgleichung der kupferfreien Click-Chemie	41
Abbildung 8: Beschichtung der HFM.	42
Abbildung 9: Antikörperisolierung mit Magne Protein G Beads.	46
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Azidmodifizierung des anti-CD31 Antikörpers. .	49
Abbildung 11: Nachweis von NH ₂ -Gruppen nach Silanisierung mit 2 % APTES.....	51
Abbildung 12: Nachweis der Beschichtung mit DBCO-PEG ₄ -NHS Ester.....	53
Abbildung 13: Nachweis von Azidgruppen auf HUVECs nach Behandlung mit Ac ₄ ManNAz...	55
Abbildung 14: Vergleich von unterschiedlichen Ac ₄ ManNAz-Konzentrationen	56
Abbildung 15: Endothelialisierung von PMP-HFMs	57
Abbildung 16: Endothelzellbeschichtung im Verlauf der Zeit.....	58
Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung endothelialisierter HFM.	60
Abbildung 18: Bestimmung der Zelldichte auf HFMs nach Endothelialisierung	61
Abbildung 19: Methoden der Antikörperisolierung.....	63
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des aufgereinigten Maus anti human CD31 Antikörpers an HUVECs.....	65
Abbildung 21: Nachweis von Azidgruppen auf dem anti-CD31 Antikörper nach Anwendung des SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit.	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ECMO Indikationen.....	13
Tabelle 2: Oberflächenbeschichtungen von extrakorporalen Kreisläufen	20
Tabelle 3: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	27
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer	28
Tabelle 6: Verwendete Zellen	29
Tabelle 7: Verwendete Zellmedien für die Zellkultur.....	29
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medienzusätze.....	30
Tabelle 9: Eingesetzte Chemikalien für die Beschichtung von Hohlfasermembranen	31
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien für die Fluoreszenzmikroskopie	31
Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie	32
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien zur Modifizierung der Oberfläche von HUVECs.....	32
Tabelle 13: Verwendete Kits für die Antikörperisolation, Antikörpermodifizierung und Proteinbestimmung.....	32
Tabelle 14: Hohlfasermembranen (HFM)	33
Tabelle 15: Verwendete Software.....	33
Tabelle 16: Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay.....	64

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
Ac4ManNAz	Tetraacetyliertes N-Azidoacetyl-D-Mannosamin
ADP	Adenosindiphosphat
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovines Serum Albumin
BGG	Bovines Gamma Globulin
CD	Cluster of differentiation
CuAAC	Cu ^I -katalysierte-1,3-Dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen
DOAC	Direkte orale Antikoagulantien
DBCO-S-NHS Ester	Dibenzocyclooctyne-sulfo-N-hydroxysuccinimidyl Ester
DBCO-PEG ₄ -NHS Ester	Dibenzocyclooctyne-Polyethylenglycol-N-hydroxysuccinimidyl Ester
DMSO	Dimethylsulfoxid
eCPR	Extrakorporale kardiopulmonale Reanimation
EC	Endothelzellen
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung
ECLS	Extracorporeal life support
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
EZM	Extrazellulärmatrix
GeoMFI	Geometric mean fluorescence intensity
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HFM	Hohlfasermembran
HUVEC	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül-1
L-VAD	Left ventricular assist device
MO	Membranoxygenator
NO	Stickstoffmonoxid

PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostacyclin
PFA	Paraformaldehyd
PMP	Polymethylpenten
PP	Polypropylen
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
rpm	Rotationen pro Minute
tPA	Tissue plasminogen activator
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNS	Trypsin neutralization solution
vWF	Von Willebrand Faktor
VA-ECMO	Veno-arterielle ECMO
VV-ECMO	Veno-venöse ECMO
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1

1 Einleitung

1.1 Extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO)

Die ECMO ist ein extrakorporaler Kreislauf, welcher die künstliche Oxygenierung des Blutes außerhalb des menschlichen Körpers ermöglicht und heutzutage ein etabliertes Verfahren in der Intensivmedizin ist. Es wird zur Therapie von Patienten mit Herz- und oder Lungenversagen genutzt. Die ersten Versuche Blut außerhalb des menschlichen Körpers zu oxygenieren, gehen schon auf das 19. Jahrhundert zurück. Eine wesentliche Beobachtung für die Weiterentwicklung der extrakorporalen Oxygenierung gelang im Jahre 1944, als die Wissenschaftler Kolff und Berk feststellten, dass Blut oxygeniert wird, wenn es durch die Zellophankammern ihrer künstlichen Niere fließt (Makdisi and Wang, 2015). Diese Erkenntnis wurde von Gibbon genutzt, um einen Filmoxygenator zu entwickeln, womit ihm 1953 die erste offene Herzoperation gelang (Makdisi and Wang, 2015). Der erste längere Einsatz einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) bei einem Patienten mit schwerem Lungenversagen gelang dann einige Zeit später im Jahre 1972 (Makdisi and Wang, 2015).

1.1.1 Funktionsweise und Aufbau

Zunächst soll der Begriff ECMO näher erörtert und vom Begriff ECLS (engl. „extracorporeal life support“) abgegrenzt werden, denn genau genommen zählt die ECMO zu den ECLS-Systemen (engl. „extracorporeal life support“). Allerdings handelt es sich bei ECLS-Systemen um kreislaufunterstützende Maßnahmen, die auch ohne Oxygenatoren verwendet werden können (z.B. L-VAD, engl. „left ventricular assist device“). Im Gegensatz hierzu, beinhaltet die ECMO immer einen Oxygenator, der den Gasaustausch außerhalb des Körpers ermöglicht. Weiterhin besteht eine ECMO aus mindestens zwei großen Kanülen, einer Blutpumpe, einer Gasblende und einem Wärmeaustauscher, die alle über Schläuche miteinander verbunden werden (Lequier et al., 2013). Prinzipiell wird bei einer ECMO das Blut mit Hilfe einer großen Kanüle venös abgeführt, über eine Pumpe befördert, im Oxygenator mit Sauerstoff versorgt und im Anschluss über eine weitere Kanüle zum Patienten wieder rückgeführt. Je nach Art und

Weise der Kanülierung unterscheidet man die veno-venöse (VV-ECMO) und die veno-arterielle ECMO (VA-ECMO). Bei der VV-ECMO wird i.d.R. die Vena femoralis punktiert, um das Blut aus der Vena cava inferior zu drainieren. Dieses durchströmt den ECMO Kreislauf, um anschließend über eine Kanüle in der Vena jugularis interna wieder in der rechten Herzvorhof zu gelangen. Alternativ besteht auch die Möglichkeit über eine Doppellumenkanüle eine einfache Kanülierung der Vena jugularis durchzuführen. Die VV-ECMO ist somit in der Lage, unter Umgehung des Lungenkreislaufs, die Gasaustauschfunktion der Lunge zu übernehmen und ermöglicht dadurch eine effektivere lungenprotektive Beatmung. Bei der VA-ECMO kann ein peripherer oder zentraler Zugang (i.d.R. nach Herz-OP) gewählt werden. Bei der peripheren Kanülierung wird das Blut aus der Vena femoralis drainiert und dann über die Arteria femoralis wieder rückgeführt (Brodie and Bacchetta, 2011). Da es sich hier um ein veno-arterielles System handelt, wirkt die VA-ECMO im Gegensatz zur VV-ECMO pulmonal und hämodynamisch stabilisierend (Brodie and Bacchetta, 2011). Um das Blut im Kreislauf zu befördern, werden heutzutage vor allem Zentrifugalpumpen genutzt, da sie kompakter sind und weniger Hämolyse verursachen, als z.B. Rollenpumpen (Lequier et al., 2013). Neben den leistungsfähigeren Pumpen hat insbesondere die Verbesserung der Oxygenatoren zur Weiterentwicklung der ECMO beigetragen. Tatsächlich standen die ersten Oxygenatoren in direktem Kontakt mit dem Blut (direkte Oxygenatoren) und waren daher relativ traumatisch für die Blutbestandteile. Sie waren somit für den längeren Einsatz nicht geeignet (max. ca. 4 h) und fanden ihren Einsatz in der Herz-Lungen-Maschine im Herz-OP (Lim, 2006). Um die Schädigung von Blutbestandteilen zu minimieren und dadurch die Einsatzzeit der Oxygenatoren verlängern zu können, wurden mit der Zeit Oxygenatoren entwickelt, die nur indirekt mit dem Blut in Kontakt kommen (indirekte Oxygenatoren) (Lim, 2006). Heutzutage werden vor allem diese indirekten Oxygenatoren und insbesondere Membranoxygenatoren verwendet, da sie weniger Hämolyse verursachen und ein geringeres Priming-Volumen benötigen, als ältere Oxygenatoren (z.B. Blasenoxxygenatoren) (Iwahashi et al., 2004). Diese Membranoxygenatoren bestehen aus Bündeln dünner Hohlfasermembranen (HFM) und gewährleisten den Gasaustausch über

Diffusion. Das Gasgemisch für die Oxygenierung des Blutes fließt dabei durch die Hohlfasern der Membranoxygenatoren, die wiederum von Blut umspült werden. So kann der Sauerstoff, seinem Konzentrationsgradienten nach, aus dem Gasgemisch ins Blut gelangen und das CO₂ aus dem Blut wieder entfernt werden. Membranoxygenatoren bestehen in der Regel aus den Polyolefinen Polypropylen (PP), Polyethylen (PE) und Poly-4-methylpenten (PMP). Hier unterscheidet man dichte Membranen (z.B. PMP-HFM: Polymethylpenten Hohlfasermembranen) von mikroporösen Membranen (z.B. PP-HFM: Polypropylen Hohlfasermembranen). Mikroporöse Membranen haben den Nachteil des Plasmaaustritts nach längerer Anwendung und werden daher nur bei begrenzter Anwendungsdauer, beispielweise in der HLM, verwendet. Die PMP-Membranen hingegen weisen keine Plasma Leckage auf (Betit, 2018), lösen eine geringere inflammatorische Reaktion aus und führen zu einem geringeren Transfusionsbedarf bei Patienten (Peek et al., 2002). Außerdem zeigten Robak et al., dass PMP-Membranoxygenatoren im Vergleich zu PP-Membranoxygenatoren weniger häufig gewechselt werden müssen (Robak et al., 2014).

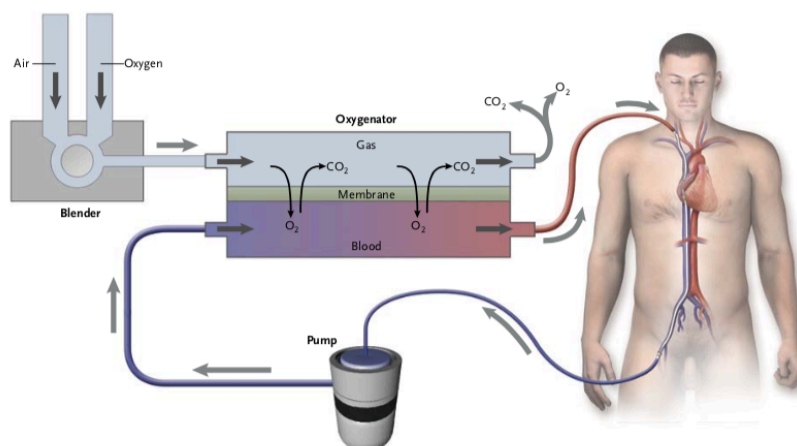


Abbildung 1: VV-ECMO Kreislauf. Beispielhafte Darstellung eines veno-venösen ECMO Kreislaufs. Das Sauerstoffarme Blut wird aus der Vena femoralis des Patienten drainiert und über eine Pumpe in den Oxygenator befördert. Hier wird das Blut über das Prinzip der Diffusion von CO₂ befreit und mit O₂ versorgt. Im Anschluss wird das oxygenierte Blut dem Patienten über die Vena jugularis interna rückgeführt (Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Brodie et al., 2011, Copyright Massachusetts Medical Society).

1.1.2 Indikationen für die ECMO

Laut Daten der ELSO (Extracorporeal life support Organization) sind die Zahlen der ECMO-Einsätze im Laufe der Jahre stetig gestiegen (Abbildung 2) (Thiagarajan et al., 2017). Hierzu trug unter anderem die CEASAR Studie bei, die zeigte, dass die 60 Tage Überlebensrate von Patienten mit ARDS (engl. Acute Respiratory Distress Syndrome) unter ECMO Therapie signifikant besser war als unter konventioneller Beatmung (Peek et al., 2006). Außerdem sind ECMOs durch den technischen Fortschritt immer handlicher, ausdauernder und verträglicher für den Patienten geworden (Kwak et al., 2020). Jedoch gilt die ECMO heute noch als „Rescue Therapy“ bzw. als „Bridge to Therapy“ oder „Bridge to Transplant“, da es sich hierbei um ein invasives Therapieverfahren handelt, welches potentiell schwerwiegende Komplikationen mit sich bringt. Laut Thiagarajan et al. gelang im Jahr 2015 bei 70 % der Patienten die Entwöhnung von der ECMO. Insgesamt überlebten 58 % der Patienten bis zur Krankenhausentlassung. Die Überlebensrate war hierbei wesentlich vom Alter der Patienten und der Indikation für die ECMO abhängig (Thiagarajan et al., 2017).

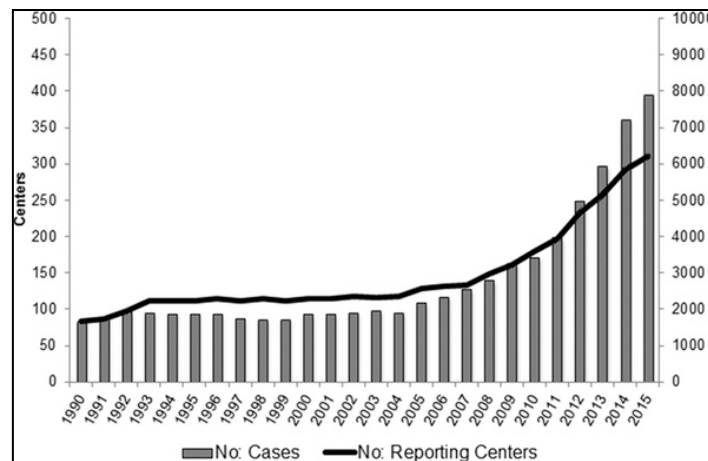


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Anzahl der ECMO-Fälle und der ELSO (Extracorporeal Life Support Organization) Mitgliedszentren zwischen 1990 und 2015. Ab 2004 ist, eine deutliche Steigerung der Anzahl von ECMO Einsätzen zu verzeichnen. Zudem wird in der Graphik gezeigt, dass die Anzahl der Zentren, die Mitglieder der ELSO sind, seit 1990 stets zugenommen hat (Thiagarajan et al, 2016, Copyright Wolters Kluwer).

Die Indikationen für die ECMO lassen sich in zwei Kategorien unterteilen, einerseits kardiale Indikationen und andererseits pulmonale Indikationen. Bei kardialer Indikation wird die VA-ECMO eingesetzt, da sie auch kreislaufunterstützend wirkt. Bei therapierefraktären hypoxischen und hyperkapnischen Zuständen wird die VV-ECMO verwendet.

Tabelle 1: ECMO Indikationen. Tabellarische Darstellung der möglichen Indikationen für den Einsatz der VA- und der VV-ECMO (Kwak et al., 2020, Makdisi and Wang, 2015, Abbasi et al., 2019).

Indikationen VA-ECMO (kardiale Indikationen)	Indikationen VV-ECMO (pulmonale Indikationen)
Kardiogener Schock (z.B. nach Lungenembolie oder Myokardinfarkt)	ARDS (engl. Acute respiratory distress syndrome)
Erfolgreiche Entwöhnung von der HLM	„Bridge to recovery“ (Lungenprotektion z.B. nach Raucherinhalation)
Chronische Kardiomyopathie	Pulmonale Hämorrhagie
Herztransplantatversagen („Rescue therapy“)	Pneumonie
„Bridge to transplant“ Verfahren	Status asthmaticus
eCPR (extrakorporale kardiopulmonale Reanimation)	Lungentransplantation („Bridge to transplant“)

1.1.3 Komplikationen der ECMO

Komplikationen können während einer ECMO Therapie häufig auftreten und führen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität der Patienten (Makdisi and Wang, 2015). Die Komplikationen der ECMO lassen sich nach ihrer Ursache in system- und patientenbezogene Komplikationen unterteilen. Zu den wichtigsten systembezogenen Komplikationen gehören: Oxygenatorversagen (8,7% in VV-ECMO und 6% in VA-ECMO), Kanülierungsprobleme (3,9% in VV-ECMO und 5,8% in VA-ECMO), Luft im Kreislauf (1,1% in VV-ECMO, 1,4% in VA-ECMO), Pumpenmalfunktion (1,5% in VV-ECMO und 0,7% in VA-ECMO) und vor allem die Thrombusbildung im ECMO-Kreislauf (13,4% in VV-ECMO und 8,2% in VA-ECMO) (Thiagarajan et al., 2017). Die Thrombusbildung im ECMO Kreislauf ist eine der häufigsten systembezogenen Komplikationen und ist gefürchtet, da sie zu Thromboembolien führen kann. Häufiger führt sie jedoch zu einem Versagen des extrakorporalen Kreislaufes, da ein Thrombus auf der Oxygenatormembran die Gasaustauschfunktion so stark beeinträchtigen kann, dass der Oxygenator ausgetauscht werden muss (Lehle et al., 2008). Zusätzlich zu den oben genannten Komplikationen, spielen patientenbezogene Komplikationen, wie Blutungen (bis zu 41% bei VA-ECMO), Infektionen (17,1% in VV-ECMO und 12,8% in VA-ECMO), Nierenversagen (ca. 10% bei VV- und VA-ECMO), Hämolyse (5,5% in VV- und VA-ECMO), Verbrauchskoagulopathie (3,2% in VV- und VA-ECMO) und Ischämien der unteren Extremität bei femoraler Kanülierung (1% bei VV-ECMO und 3,6% bei VA-ECMO) eine Rolle (Thiagarajan et al., 2017). Blutungen sind mit Abstand die häufigsten patientenbezogenen Komplikationen und lassen sich durch eine Vielzahl von Faktoren begründen. Erstmal lässt sich bei Patienten an der ECMO eine Abnahme der Thrombozytenzahl (Marasco et al., 2008), eine verminderte vWF-Aktivität (von Willebrand Faktor Aktivität) und eine gesteigerte Fibrinolyse durch erhöhte tPA (engl. tissue plasminogen activator) Konzentrationen nachweisen. Außerdem entsteht bei ECMO Patienten, durch den Verbrauch und die Verdünnung von Gerinnungsfaktoren eine Koagulopathie. Zusätzlich werden die Thrombozyten durch die Scherkräfte im ECMO Kreislauf dysfunktional, da essentielle Adhäsionsmoleküle verloren

gehen. Alle diese Faktoren tragen zu einem deutlich erhöhten Blutungsrisiko bei diesen Patienten bei. Zuzüglich zu diesem erhöhten Blutungsrisiko kommt noch eine systemische Antikoagulation, meist mit Heparin, hinzu. Durch den Einsatz von Heparin ist außerdem die seltene, aber gefürchtete Komplikation der HIT Typ 2 (Heparin Induzierte Thrombozytopenie) möglich. Bei diesem Krankheitsbild bilden sich nach Einsatz von Heparin Autoantikörper gegen den Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4. Sobald diese IgG Autoantikörper über Fc-Rezeptoren an Thrombozyten binden, kommt es zu einer Thrombozytenaggregation und -aktivierung mit Freisetzung von prokoagulatorischen Mikropartikeln. Dies äußert sich klinisch in einem starken Thrombozytenabfall und der Ausbildung von Thrombosen (Hogan and Berger, 2020). Aus diesem Grund wird die alternative Antikoagulation mit DOACs (direkte orale Antikoagulantien) während des ECMO Einsatzes, beispielweise mit Bivalirudin, getestet, um diese schwerwiegende Komplikation zu vermeiden (Pollak, 2019, Berei et al., 2018).

1.2 Optimierung der Hämokompatibilität künstlicher Oberflächen

Materialien, die für biomedizinische Zwecke verwendet werden (Biomaterialien), müssen hohe Ansprüche in Bezug auf ihre Biokompatibilität erfüllen. Insbesondere bei Biomaterialien, die in Kontakt mit Blut stehen (z.B. Oxygenatormembranen), dürfen keine Komplikationen durch die Interaktion des Blutes mit der künstlichen Oberfläche entstehen; sie müssen hämokompatibel sein. In der Medizin werden diverse Werkstoffe zur Herstellung von Biomaterialien eingesetzt, wie beispielweise Metall, Keramik, Polymere und Glas. Polymere gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie einfach und kostengünstig hergestellt werden können und vielfältige Eigenschaften aufweisen können. Zur Analyse der Hämokompatibilität eines Biomaterials werden Veränderungen von Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten untersucht und die Generierung von Aktivierungsprodukten im Blutplasma analysiert. Ebenfalls wird die Adhäsion von Proteinen und Zellen an die Materialoberfläche untersucht (Weber et al., 2018).

1.2.1 Interaktion von Blut mit künstlichen Oberflächen

Bevor die Hämokompatibilität eines Materials verbessert werden kann, muss erstmal die Interaktion zwischen Blut und dem Material verstanden werden. Diese Interaktion soll im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Sobald Blut in Kontakt mit einer künstlichen Oberfläche kommt, werden prokoagulatorische und proinflammatorische Signalkaskaden aktiviert (Abbildung 3). Zuerst kommt es durch den Kontakt von Blut mit einer künstlichen Oberfläche zur Anlagerung von im Blut enthaltenen Proteinen („Protein Fouling“). Hier kommt der sogenannte Vroman-Effekt zum Tragen, der die konsekutive Absorption von Proteinen an die Oberfläche künstlicher Materialien beschreibt. Proteine, die am Anfang an die Oberfläche gebunden haben, werden mit der Zeit durch größere und weniger mobile Proteine verdrängt, die eine stärkere Affinität für das Material aufweisen (Ferreira et al., 2015). So bindet zunächst Fibrinogen an die synthetische Oberfläche und an diese Schicht aus Fibrinogen binden dann weitere Proteine. Einerseits binden Proteine, welche die Gerinnung über den intrinsischen Weg aktivieren, wie zum Beispiel Faktor XII und Kininogen. Andererseits kann Immunglobulin G und der Komplementfaktor C3b an die Proteinschicht binden und hierdurch den alternativen Weg der Komplementaktivierung induzieren (Doyle and Hunt, 2018). Nach der Absorption von Proteinen können nun auch Thrombozyten und Leukozyten (v.a. Granulozyten) über die Integrine an ihrer Oberfläche an die künstliche Oberfläche binden (Ferreira et al., 2015). Die Thrombozyten werden durch die Bindung an die synthetische Oberfläche aktiviert und Aggregieren. Auch die Leukozyten werden aktiviert; einerseits über einen „Cross-Talk“ mit den Thrombozyten und andererseits über die Komplementaktivierung. Die Leukozyten schütten dann wiederum Zytokine und den Gewebefaktor (Faktor III) aus und fördern dadurch eine inflammatorische Reaktion und die Aktivierung der Gerinnung über den extrinsischen Weg (Courtney and Forbes, 1994).

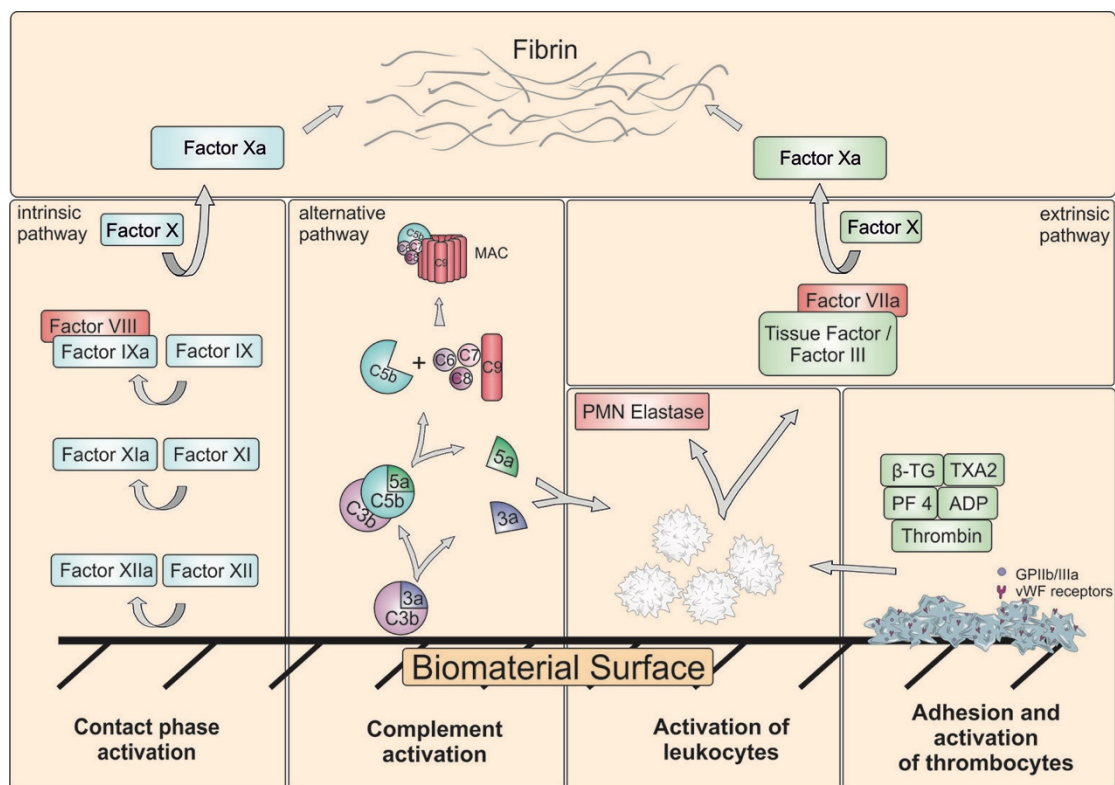


Abbildung 3: Interaktion von Blut mit der Oberfläche eines Biomaterials. Diese Abbildung zeigt schematisch, über welche Wege das Blut durch künstliche Oberflächen aktiviert wird. Einerseits wird die Gerinnung über den intrinsischen und später auch den extrinsischen Weg aktiviert. Andererseits wird das Komplementsystem aktiviert, welches zur Bildung des Membranangriffskomplexes führt und die Freisetzung der Komplementfaktoruntereinheiten C5a und C3a provoziert, die in der Lage sind Leukozyten zu aktivieren. Durch „Protein Fouling“ auf dem Biomaterial sind auch Thrombozyten in der Lage an die künstliche Oberfläche zu binden, wodurch sie aktiviert werden (Weber et al., 2018).

Die zuvor beschriebenen Prozesse spielen sich auch an den Oberflächen des extrakorporalen Kreislaufs ab und insbesondere an der Oxygenatormembran. Diese hat einen besonderen Stellenwert, da sie eine sehr große Oberfläche (ca. 2 m², (Ye et al., 2015)) besitzt, die zudem hydrophob ist (Doyle and Hunt, 2018). Diese hydrophobe Oberfläche neigt zur Absorption von Proteinen aus dem Blut und hat daher prothrombotische Eigenschaften. Da die konstante Gerinnungsaktivierung auch proinflammatorisch wirkt, kann es bei ECMO Patienten auch zu exzessiven Entzündungsreaktionen kommen (Millar et al., 2016). Neben einer verstärkten Thrombozytenaktivierung, wird die Thrombusbildung auch durch erhöhte Fibrinogen- und Faktor VIII-Konzentrationen, Heparinresistenz und Hämolyse gefördert (Thomas et al.,

2018). Ebenfalls tragen erhöhte Scherkräfte im ECMO Kreislauf zum hämostatischen Ungleichgewicht der Patienten bei. In der Tat verursachen die Scherkräfte, die v.a. von der Pumpe ausgehen, sowohl prothrombotische als auch blutungsfördernde Veränderungen. Sie führen einerseits zu Hämolyse, die vor allem bei höheren Flussraten auftritt, und fördern dadurch prothrombotische Veränderungen und andererseits führen sie zu einem Verlust essentieller Adhäsionsmoleküle von Thrombozyten und einer Abnahme der vWF Konzentration, wodurch Blutungskomplikationen gefördert werden können. Außerdem kann Hypoxie, sowie Thrombin-, Histamin- oder Vasopressinausschüttung die Ausschüttung von Plasminogenaktivatoren fördern (Doyle and Hunt, 2018) und zu einer verstärkten Fibrinolyse führen.

1.2.2 Ansätze zur Optimierung der Hämokompatibilität

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, bestimmen die Oberflächeneigenschaften eines Biomaterials wesentlich seine Interaktion mit seiner biologischen Umgebung. Da die wenigsten Materialien von Natur aus geeignet sind, um in den menschlichen Körper integriert zu werden, muss ihre Oberfläche modifiziert werden. Hierbei darf die Oberflächenmodifizierung nicht die Kerneigenschaften des Materials verändern. Die Oberflächenmodifizierung und Oberflächenbeschichtung kann mittels physikalischer und chemischer Methoden erfolgen und kann die Biokompatibilität eines Biomaterials wesentlich verbessern. Insbesondere soll die unspezifische Adsorption von Proteinen an das Biomaterial reduziert werden, da somit auch antithrombogene und antiinflammatorische Eigenschaften verbessert werden. Außerdem soll die Anlagerung und das Wachstum von Endothelzellen gefördert werden.

Allgemein lassen sich Oberflächenmodifizierungen und -beschichtungen in drei Kategorien einteilen: Passivierung, Beschichtung mit bioaktiven Substanzen und Endothelialisierung. Unter einer passiven Beschichtung versteht man die Veränderung einer Oberfläche mit Molekülen, die passiv antithrombogen wirken, d.h. sie wirken der unspezifischen Proteinadsorption entgegen („anti-Fouling“) (Tchouta and Bonde, 2015). Oft wird dies durch eine Steigerung der Hydrophilität erreicht, beispielsweise mit Hilfe einer Plasmabehandlung mit Einführung polarer Gruppen oder über die Beschichtung mit hydrophilen Polymeren. Hierbei

kommen u.a. Phosphorylcholin, Albumin und Poly-2-methoxyethylacrylat (Ontaneda and Annich, 2018) zum Einsatz. Durch die Immobilisierung von Biomolekülen (Proteine, Saccharide, Lipide, Medikamente etc.) kann ein Biomaterial spezifische gewünschte Effekte in seiner Umgebung auslösen. Für diese sogenannte bioaktive Beschichtung können adhäsive Proteine der Extrazellulärmatrix (Fibronektin, Vitronektin, Kollagen etc.) verwendet werden, um die Anlagerung von Endothelzellen zu fördern. Zusätzlich kann eine bioaktive Beschichtung mit Substanzen erfolgen, die aktiv Gerinnungsprozesse bzw. Gerinnungsfaktoren hemmen. Hierzu zählen zum Beispiel: Heparin, Stickstoffmonoxid (NO) und direkte Thrombininhibitoren. Die Biomoleküle können entweder kovalent oder physikalisch an das jeweilige Material gebunden werden. Eine kovalente Bindung bringt den Vorteil einer höheren Stabilität und daher einer längeren Wirksamkeit (Klement et al., 2002). Jedoch müssen, bevor eine kovalente Bindung entstehen kann, erstmal reaktive Gruppen auf dem zu beschichtenden Material eingeführt werden. Diese können zum Beispiel durch chemische Reaktionen, wie Silanisierung entstehen oder auch mit Hilfe einer Plasmabehandlung geschaffen werden. Zuletzt können Oberflächen auch durch Beschichtung mit Endothelzellen (Endothelialisierung) hämokompatibler gemacht werden. Die Endothelialisierung entspricht in der Theorie der idealen Oberflächenbeschichtung, da es sich um eine sich selbst regulierende und regenerierende Beschichtung handeln würde.

Die Beschichtung von Oberflächen zur Verbesserung der Hämokompatibilität findet schon heutzutage in vielen Bereichen der Medizin Anwendung. So werden auch Komponenten der ECMO beschichtet, um eine bessere Verträglichkeit mit dem Blut zu schaffen. In der Tabelle 2 werden biopassive und bioaktive Beschichtungen aufgeführt, die bereits eingesetzt werden.

Tabelle 2: Oberflächenbeschichtungen von extrakorporalen Kreisläufen. Darstellung der unterschiedlichen Beschichtungen von extrakorporalen Kreisläufen, die aktuell Anwendung in der Klinik finden (modifiziert nach Maul et al., 2015).

Hersteller	Name Beschichtung	Beschichtungstechnik und Eigenschaften
Medtronic	Carmeda	Kovalent gebundenes Heparin (gerinnungshemmend)
	Trilium	Kovalent gebundenes Heparin (gerinnungshemmend), Sulfat- und Sulfonatgruppen (negative Ladung), Polyethylenoxid (hydrophil)
Maquet	Bioline	Kovalent gebundenes humanes Albumin (Passivierung) und Heparin (gerinnungshemmend)
	Safeline	Kovalent gebundenes synthetisches Albumin (Passivierung)
	Softline	Amphiphile Polymerbeschichtung (Abnahme Oberflächenspannung)
Terumo	X-coating	Poly-2-methoxylacrylat (Reduzierung Zell- und Proteinadhäsion)
Sorin	Smart-X	Polymerbeschichtung (Polycaprolacton-Polydimethylsiloxan-Polycaprolacton) (Reduzierung Zell- und Proteinadhäsion)
	P.h.i.s.i.o	Phosphorylcholin (Reduzierung Zell- und Proteinadhäsion)

Vor allem die Beschichtung mit kovalent gebundenem Heparin ist weit verbreitet. Diese Beschichtung reduziert die Adsorption von Thrombozyten an die Oxygenatormembran und reduziert potentiell auch die inflammatorische Antwort, sowie die Aktivierung der Fibrinolyse (Niimi et al., 1999, Wendel and Ziemer, 1999). Jedoch senken diese Beschichtungen die Gerinnungsneigung nicht genug, um auf eine systemische Antikoagulation mit Heparin verzichten zu können, die selbst Nachteile aufweist. Einerseits wirkt Heparin nicht auf schon

existierende Gerinnsel. Andererseits basiert der Wirkmechanismus von Heparin auf einer Interaktion mit Antithrombin III (AT III), sodass die AT III Konzentration im Verlauf einer Heparintherapie deutlich reduziert werden kann. Zusätzlich birgt die Heparintherapie das Risiko einer HIT (Heparin induzierte Thrombozytopenie) (Silvetti et al., 2015). Dementsprechend bedarf es noch weiterer, verbesserter Beschichtungsmethoden für ECMO Kreisläufe. Idealerweise sollte die Beschichtung dem physiologischen Endothel so sehr ähneln, dass eine systemische Heparinisierung obsolet würde. So haben beispielweise Obstals et al. eine Beschichtung von PMP-Oxygenatormembranen mit Polymerbürsten entwickelt und zeigten, dass diese Beschichtung die Initiierung der Gerinnung verringert, sowie die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten verringert (Obstals et al., 2018). Auch weitere potentielle neue Beschichtungen von Oxygenatormembranen mit PEG (Abednejad et al., 2014), Plasma (Huang et al., 2016a), Phospholipidfilmen (Iwasaki et al., 2002), PEG und Heparin (Wang et al., 2017) und zwitterionischen Polymeren (Wang et al., 2016) werden aktuell in der Literatur beschrieben.

1.3 Endothelialisierung zur Verbesserung der Hämokompatibilität

Aktuell bestehen Bestrebungen, Medizinprodukte mit Endothelzellen zu beschichten, da man sich dadurch eine Optimierung der Hämokompatibilität erhofft. Endothelzellen bilden im gesamten Gefäßsystem die Gefäßauskleidung und sind die physiologische Schnittstelle zwischen Blut und Gefäßwand.

1.3.1 Das Endothel

Das Endothel ist mehr als eine einfache Gefäßauskleidung, da es sämtliche Funktionen, wie Metabolismus, Angiogenese, Hämostase, Inflammation, Synthese und Abbau von extrazellulärer Matrix und Regulation von Gefäßpermeabilität und -tonus erfüllt. Außerdem hält das Endothel das Gleichgewicht zwischen Hemmung und Förderung der Migration von glatten Muskelzellen, Thrombogenese und Fibrinolyse und zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion aufrecht (Feletou and Vanhoutte, 2007). Das gesunde, nicht aktivierte Endothel hemmt die primäre Hämostase, die Gerinnungskaskade und Inflammationsreaktionen in Gefäßen. Dabei erfolgt die Hemmung der primären

Hämostase über die Ausschüttung von NO (Stickstoffmonoxid) und PGI₂ (Prostacyclin) und durch die Aufrechterhaltung eines vasodilatativen Phänotyps. Außerdem wird über den Abbau von ADP (Adenosindiphosphat) durch Ektonukleotidasen des Endothels die Aggregation von Thrombozyten gehemmt. Die Hemmung der Gerinnungskaskade wird über die Exprimierung von Thrombomodulin, TFPI (engl. Tissue Factor Pathway Inhibitor) und Heparansulfat an der Plasmamembran der Endothelzellen bewirkt. Der Rezeptor Thrombomodulin macht z.B. aus der prokoagulatorischen Wirkung von Thrombin eine antikoagulatorische Wirkung, indem die Fähigkeit von Thrombin das Protein C zu aktivieren, vertausendfacht wird. Zudem hat das Endothel über die Freisetzung von t-PA (engl. Tissue plasminogen activator) eine fibrinolytische Wirkung. Damit Leukozyten aus dem Blut ins umliegende Gewebe gelangen können, müssen sie an das Endothel binden und es anschließend über Diapedese passieren. Die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen benötigt jedoch Adhäsionsmoleküle, wie P-Selectin, ICAM-1 (Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1) und VCAM-1/CD106 (engl. Vascular cell adhesion molecule 1), die wenig im gesunden Endothel exprimiert werden, sodass dieses antiinflammatorisch wirkt. Sobald Endothelzellen, zum Beispiel durch Verletzung, aktiviert werden, verändert sich deren Phänotyp und wird prothrombotisch und prokoagulatorisch. Es kommt zur Freisetzung vom vWF, TXA₂ (Thromboxan A₂) und PAF (Plättchen aktivierender Faktor), wodurch die Thrombusbildung gefördert wird (Feletou, 2011). Dabei fördert der vWF durch seine Interaktion mit dem Gewebefaktor die Aktivierung der Gerinnungskaskade (Rajendran et al., 2013). Der Gewebefaktor wird durch die Sekretion von TNF α (Tumornekrosefaktor α) auf Zellen vermehrt exprimiert. Außerdem führt der vWF zu einer Freisetzung von PAI 1 (engl. Plasminogen activator inhibitor). PAI 1 ist in der Lage t-PA zu hemmen, wodurch die Fibrinolyse verhindert wird. Zuletzt führen aktivierte Endothelzellen auch zu einer inflammatorischen Reaktion, da vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert werden, wodurch die Leukozyten die Endothelzellschicht vermehrt passieren können.

1.3.2 Endothelialisierung von Hohlfasermembranen

Das Endothel bildet die natürliche Barriere zwischen Blut und Gefäßwand und ist wesentlich an der Regulierung von Hämostase und Entzündung beteiligt. Daher wird generell angenommen, dass durch die Beschichtung künstlicher Oberflächen mit Endothelzellen (EC), die Hämokompatibilität verbessert wird und somit hämostatische Komplikationen reduziert werden. Außerdem könnte durch die Beschichtung mit Endothelzellen eine dauerhaft antithrombotische Oberfläche gebildet werden, die sich auch selbst regenerieren könnte (Pflaum et al., 2017). Es bestehen aktuell Bestrebungen, die Oberfläche von Membranoxygenatoren, die aus Hohlfasermembranen (HFM z.B. aus Polymethylpenten; PMP-HFM) bestehen, mit Endothelzellen zu beschichten, um ihre Hämokompatibilität zu verbessern.

Im Bereich des Tissue Engineerings bestehen zurzeit zwei Ansätze zur Endothelialisierung von Oxygenatormembranen beziehungsweise von Gewebegerüsten insgesamt. Einerseits kann eine Präendothelialisierung *in vitro* erfolgen und andererseits kann eine *in situ* Selbstendothelialisierung durch Abfangen von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen (EPCs) realisiert werden. Bei der *in vitro* Endothelialisierung werden die Endothelzellen auf eine künstliche Oberfläche ausgesät. Da die Eigenschaften künstlicher Oberflächen in der Regel wenig vorteilhaft für die Anlagerung und das Wachstum von Endothelzellen sind, müssen diese erstmal modifiziert werden. Hierbei unterscheidet man drei Modifizierungstechniken: i) physikalische Veränderung topographischer Eigenschaften (z.B. Elektropolieren) ii) chemische Behandlung mit Einführung funktioneller Gruppen, die die Hydrophilität beeinflussen (z.B. Plasmabehandlung), iii) Biofunktionalisierung z.B. mit zelladhäsiven Extrazellulärmatrixproteinen und Wachstumsfaktoren (Pang et al., 2015). Zur *in vivo* Endothelialisierung werden EPCs genutzt, die eine Population mononuklearer Zellen sind. Sie sind in erster Linie im Knochenmark vorhanden, zirkulieren jedoch in geringen Mengen auch im peripheren Blut bei Erwachsenen und können Eigenschaften von Endothelzellen erlangen. Um EPCs aus dem Blut an die künstliche Oberfläche anlocken zu können (engl. Homing), müssen EPC-selektive Moleküle an die zu besiedelnde Oberfläche gebunden werden. Dies

sind zum Beispiel Antikörper (anti-CD34, anti-CD133, anti-VEGFR-2), Peptide, magnetische Moleküle, Oligosaccharide und Aptamere (Avci-Adali et al., 2010).

1.3.3 Verwendung der Click-Chemie im Tissue Engineering

Der Begriff Click-Chemie wurde im Jahr 2001 von K.B. Sharpless etabliert (Kolb et al., 2001) und bezeichnet chemische Reaktionen, die folgende Bedingungen erfüllen (Moses and Moorhouse, 2007):

- Hohe Ausbeute
- Schneller Ablauf
- Breite und einfache Anwendung
- Stereospezifisch
- Ungefährliche Nebenprodukte, die einfach entfernt werden können
- Verwendung ungefährlicher Lösungsmittel
- Unempfindlich gegenüber H_2O und O_2

Mit diesen Reaktionen lassen sich am Beispiel der Natur, komplexe Produkte einfach generieren. Reaktionen, die als Click-Chemie Reaktionen gelten, sind Cycloadditionen wie die CuAAC (Cu^I katalysierte 1,3-Dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen), nucleophile Substitutionen (z.B. Ringöffnungsreaktionen von Epoxiden), nichtaldolartige Carbonylreaktionen (z.B. Bildung von Harnstoffen) und Additionen an C-C Mehrfachbindungen (z.B. Epoxidierungen) (Moses and Moorhouse, 2007). Seit der intensiveren Auseinandersetzung mit den sogenannten Click-Chemie Reaktionen, haben diese sich als universelles Werkzeug für die Modifizierung von DNA, Proteinen, sowie die Herstellung von Konjugaten und für die Fluoreszenzmarkierung von Proben etabliert. Aus diesem Grund wurden 2022 die Wissenschaftler:innen Carolyn Bertozzi, Barry Sharpless und Morten Meldal mit dem Nobelpreis für Chemie für ihren Beitrag zur Entwicklung der Click-Chemie geehrt.

Die Click-Chemie ist insbesondere in den Bereichen der Biokonjugation, der Materialwissenschaften und der Wirkstoffforschung von Bedeutung (Moses and Moorhouse, 2007). Unter dem Begriff Biokonjugation versteht man die kovalente Verbindung von zwei Molekülen, wobei mindestens eines davon ein Biomolekül ist. So können beispielweise Biomoleküle mit einer fluoreszierenden Probe konjugiert und dann dargestellt werden. Auch können Proteine mithilfe der Click-

Chemie kovalent an Oberflächen gebunden werden, ohne, dass sie ihre Aktivität verlieren (Shi et al., 2008). Die Click-Reaktionen sind somit eine gute Möglichkeit, um biologische Verbindungen z.B. zwischen Zellen oder zwischen bioaktiven Molekülen und Oberflächen herzustellen (Orski et al., 2010). Für die Materialwissenschaften findet die Click-Chemie beispielsweise bei der Produktion von Polymeren Anwendung. Zusätzlich können Click-Chemie Reaktionen das Screening von chemischen Datenbanken ermöglichen und so die Wirkstoffforschung vorantreiben.

Die CuAAC gilt als Goldstandard der Click-Chemie Reaktionen, da diese Reaktion sehr verlässlich und vielfältig ist. Zudem können Azide über zelleigene Stoffwechselwege in lebendige Organismen eingeführt werden, beispielweise über die Verwendung von Azidozuckern (Laughlin and Bertozzi, 2007). Da Azide und Alkine außerdem kaum physiologisch vorkommen, gibt es keine ungewollten Kreuzreaktionen mit anderen Biomolekülen (Chaturvedi et al., 2011). Außerdem sind Azide sehr klein, sodass diese die Funktion der Zielmoleküle wenig beeinflussen. Von Nachteil ist allerdings, dass zytotoxisches Kupfer als Katalysator verwendet wird. Infolgedessen etablierte Carolyn Bertozzi den Begriff „bioorthogonal“, um Reaktionen zu beschreiben, die nicht mit der biologischen Umgebung interagieren, dessen funktionelle Gruppen biologisch inaktiv sind und ausschließlich miteinander reagieren, sowie ohne die Verwendung zelltoxischer Substanzen zügig und unter physiologischen Bedingungen ablaufen können (Körpertemperatur, neutraler pH). Zusätzlich sollte möglichst eine der reaktiven Gruppen klein sein, sodass sie nicht die Funktion des zu markierenden Biomoleküls beeinträchtigt (Sletten and Bertozzi, 2011). In Anbetracht dieser Kriterien ist die CuAAC nur eine beinahe bioorthogonale Reaktion, weshalb Bertozzi et al. im Jahr 2004 die kupferfreie 1,3-Dipolare Cycloaddition von Aziden und Alkinen (SPAAC, kupferfreie Click-Chemie) etablierten (Agard et al., 2004). Dank dieser Entwicklung können nun auch Click Reaktionen in lebendigen Organismen ablaufen. So zeigten Lee et al. beispielweise, dass Wachstumsfaktoren über die kupferfreie Click-Chemie an Kollagenfasern gebunden werden konnten. Diese Verbindung war biokompatibel, nicht

zytotoxisch und förderte die Anlagerung und das Wachstum von epithelialen Zellen (Lee et al., 2017).

1.4 Zielsetzung

Die ECMO ist ein Therapieverfahren zur Behandlung von Patienten mit schwerem Herz- und/oder Lungenversagen. Dieses Verfahren ist jedoch noch mit diversen Komplikationen verbunden, vor allem mit dem Risiko von Blutungen und Thrombusbildungen. Diese Komplikationen lassen sich zum Teil durch die mangelnde Hämokompatibilität der ECMO-Bestandteile erklären. Insbesondere der Oxygenator, bestehend aus hydrophoben Hohlfasermembranen (HFM), spielt hier eine große Rolle, da er über eine große blutkontaktierende Oberfläche verfügt. Durch ihre hydrophoben Eigenschaften fördern die HFM die Absorption von Proteinen aus dem Blut. Dies führt wiederum zur Anlagerung von Thrombozyten und Leukozyten und dann zur Aktivierung prokoagulatorischer und proinflammatorischer Signalkaskaden. Um diese Prozesse zu unterbinden, sollte die Oberfläche der HFM die natürliche Trennwand zwischen Blut und Gefäßwand imitieren. Das Endothel mit seinen Endothelzellen ist wesentlich an der Regulierung von Hämostase und Inflammation beteiligt und wirkt in seinem inaktivierten Zustand dauerhaft antithrombotisch und antiinflammatorisch. In der vorliegenden Arbeit soll ein Protokoll zur Endothelialisierung von PMP-HFM zur Verbesserung ihrer Hämokompatibilität etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Artikel	Hersteller
Brutschrank (Hereus 6000)	ThermoScientific, USA
CASY Zellzähler	Roche Innovatis AG, Deutschland
ELISA Reader (Eon Synergy 2)	BioTek Instruments Inc., USA

FACScan	BD Biosciences, USA
HB-1000 Hybridizer Ofen	Ultra-violet Products Ltd., UK
Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135)	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikroplattenleser (Mithras 940)	Berthold Technologies GmbH & Co.KG, Deutschland
Parallelplattenreaktor Denta Plas®	Diener electronic, Deutschland
pH Meter (Mettler Toledo SevenCompact S220)	Cole-Parmer GmbH, Deutschland
Rollschüttler	Phoenix Instrument, Deutschland
Sonorex Ultraschallbad	Bandelin, Deutschland
Schüttler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Tischzentrifuge (MiniSpin Plus)	Eppendorf AG, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge (5415 R)	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge (Rotanta 460 R)	Hettich, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Filter, steril (0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific, USA
FACS-Rundboden Röhrchen	Corning Incorporated, USA
Eppendorfgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Deutschland
Kryoröhrchen	STARLAB GmbH, Deutschland
Kanülen (100 Sterican)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH u. Co. KA, Deutschland
Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	STARLAB GmbH, Deutschland

Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Corning Incorporated, USA
Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Österreich
Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well)	Greiner Bio-one, Österreich
Zellkulturflasche (75 cm ² und 175 cm ²)	Greiner Bio-one / Österreich

2.1.3 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer/Lösung (End.-Konz.)	Zusammensetzung
Glycin-HCl (100 mM, pH 2,7)	375 mg Glycin pH mit HCl eingestellt in dH ₂ O (Gesamtvolumen 50 ml)
Salzsäure (1 mM)	-
Methylorange-Lösung (1 mM)	16.36 mg Methylorange in 50 ml Ampuwa
Natriumhydroxid (1 mM)	4 mg NaOH 100 ml dH ₂ O
Tris-Base (1 M, pH 7,5)	2,42 g Trizma-Base pH mit HCl eingestellt in dH ₂ O (Gesamtvolumen 20 ml)
Tris-Puffer (2 M, pH 7,5)	1.889 g Trizma-Base 10.16 g Trizma-Hydrochlorid in dH ₂ O (Gesamtvolumen 40 ml)
Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS) pH 7,5	0,5 ml Tris Puffer (2 M, pH 7,5) in 10 ml dH ₂ O (Endkonz.100 mM) NaCl (150 mM)

2.1.4 Zellen

Tabelle 6: Verwendete Zellen

Zelllinie	Herkunft
HUVECs (Human umbilical cord vein endothelial cells)	American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
P2B1 Hybridomazellen (Antigen: CD31, zur Herstellung monoklonaler anti-CD31 Antikörper)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Iowa, USA)

2.1.5 Zellkulturmedien

Tabelle 7: Verwendete Zellmedien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
VascuLife Complete Medium (CellSystems), EC-Medium complete (HUVEC Zellkultur)	VascuLife Basal Medium EnGS Kit (ohne Hydrocortison) EnGS LifeFactor 0,2 %, rh EGF 5 ng/ml, Ascorbinsäure 50 µg/ml, L-Glutamin 10 mM, Heparansulfat 0,75 U/ml, fetales Kälberserum (FCS) 2 %, Gentamycin 30 mg/ml und Amphotericin B 15 µg/ml
EGM TM -2 Endothelial Cell Growth Medium-BulletKit TM (Lonza), EGM-2-Medium complete (HUVEC Inkubation mit HFM)	EBM-2 Medium 2 BulletKit (ohne Heparin und FCS) hEGF, Hydrocortison, Gentamycin, Amphotericin B, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, Ascorbinsäure, 10% humanes AB-Serum, 1% L-Glutamax
Wachstumsmedium (Hybridoma Zellkultur)	IMDM mit HEPES (ThermoFisher) 5% FCS

	L-Glutamin (200 mM) Natriumpyruvat (100 mM) Gentamycin (50 ng/ml) Penicillin-Streptomycin (10 000U/ml Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin)
Serumfreies Medium (Hybridoma Zellkultur)	Hybridoma-SFM (ThermoFisher) L-Glutamin (200mM) Natriumpyruvat (100 mM) Penicillin-Streptomycin (10 000U/mL Penicillin und 10 mg/mL Streptomycin)

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Medienzusätze

Chemikalie	Hersteller
Amphotericin B	Sigma Aldrich, USA
Ampuwa	Fresenius SE & Co. KGaA, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma Aldrich, Deutschland
BGG (Bovines Gamma Globulin)	Invitrogen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deutschland
Ethanol, 99 %	AppliChem GmbH, Deutschland
FACSClean	BD Biosciences, US
FACSRinse	BD Biosciences, USA
Gentamycin	Sigma Aldrich, USA
Gelatine	Sigma, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies, USA
Nukleasefreies Wasser	Quiagen, Deutschland
Natriumpyruvat	ThermoFisher, USA
Paraformaldehyd (4%)	Merck, Deutschland

Penicillin und Streptomycin	Life Technologies, USA
PBS mit Ca/Mg (PBS ⁺)	ThermoFisher, USA
PBS ohne Ca/Mg	ThermoFisher, USA
PrestoBlue Assay	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	Promocell, Deutschland
TNS (Trypsin neutralizing solution)	Promocell, Deutschland
Trypanblau-Färbelösung	Sigma Aldrich, USA
Triton X-100	Sigma, Deutschland
Ziegenserum (100%)	Invitrogen, USA

2.1.7 Chemikalien für die Beschichtung von Hohlfasermembranen

Tabelle 9: Eingesetzte Chemikalien für die Beschichtung von Hohlfasermembranen

Chemikalie	Hersteller
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), 100%	Sigma Aldrich, Deutschland
Dibenzylcyclooctyne-Polyethylenglycol-N-Hydroxysuccinimidyl Ester (DBCO-PEG ₄ -NHS Ester), 10 mg	Jena Bioscience, Deutschland
Methanol (100 %)	Honeywell Research Chemicals, Deutschland
Toluol (99,8%)	Sigma Aldrich, USA

2.1.8 Chemikalien für die Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien für die Fluoreszenzmikroskopie

Artikel	Hersteller
Actin Red 555 (2 Tropfen/ml PBS)	ThermoFisher, USA
Calcein-AM (50 µg in 200 µl DMSO)	ThermoFisher, USA
Cy3-Azid (4 mg/ml)	Sigma-Aldrich, USA

DBCO-Sulfo-Cy3 (10 mM)	Jena Bioscience, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, USA

2.1.9 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Antikörper	Label	Hersteller
Maus anti-human VE-Cadherin (CD144) Antikörper (0,5 mg/ml)	-	ThermoFisher, USA
Maus anti-human CD31 IgG	-	Isoliert aus P2b1 Hybridomazellen
Ratte anti-Maus IgG1 (0,2 mg/ml)	PE	eBioscience Inc., USA
Ziege anti-Maus IgG (2 mg/ml)	Alexa Fluor 488	ThermoFisher, USA

2.1.10 Chemikalien zur Modifizierung der Oberfläche von HUVECS

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien zur Modifizierung der Oberfläche von HUVECs

Artikel	Hersteller
Ac ₄ ManNAz (10 mM Stock in DMSO)	Sigma Aldrich, USA

2.1.11 Kits für Antikörperisolation, Antikörpermodifizierung und Proteinbestimmung

Tabelle 13: Verwendete Kits für die Antikörperisolation, Antikörpermodifizierung und Proteinbestimmung

Kit	Hersteller/Land
BCA Protein Assay	ThermoFisher, USA

Magne Protein G Beads	Promega, Deutschland
Site Click Antibody Azido Modification Kit	ThermoFisher, USA

2.1.12 Hohlfasermembranen (HFM)

Tabelle 14: Hohlfasermembranen (HFM)

Material	Herkunft
Polymethylpenten-Membran (PMP)	3M Membrana, Deutschland

2.1.13 Software

Tabelle 15: Verwendete Software

Programm	Funktion	Hersteller/Land
CellQuestPro	Durchflusszytometrie (Messung)	BD Biosciences, USA
FlowJo	Durchflusszytometrie (Auswertung)	Tree Star Inc., USA
Gen5	Kolorimetrische Messung/ Photometrische Messung	BioTek Instruments Inc., USA
GraphPad Prism 7	Statistische Auswertung	Statcon GmbH, Deutschland
MikroWin	Fluoreszenzmessung	Mikrotek Laborsysteme GmbH
Excel	Auswertung der Fluoreszenzmessung	Microsoft, USA
Zeiss Axio Vision	Fluoreszenzmikroskopie	Zeiss, Deutschland
ELISA Analysis	BCA Assay	Elisakit.com, Australien

2.2 Methoden

2.2.1 Auftauen von primären humanen Endothelzellen

HUVECs (engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sind primäre humane Endothelzellen, die aus Nabelschnurblut isoliert werden. Um diese aufzutauen, wurde zu Beginn ein Reaktionsgefäß mit 10 ml EC-Medium befüllt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen mit den HUVECs aus dem Stickstofftank (-196°C) bzw. der Tiefkühltruhe (-80°C) entnommen und im Wasserbad aufgetaut. Sobald die Zellen ganz aufgetaut waren, wurden diese sofort in das Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt, die Zellen in frischem EC-Medium resuspendiert und in eine beschichtete Zellkulturflasche (T 75) überführt und unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Für die Beschichtung der Zellkulturflasche wurden 6 ml einer 0,1% Gelatine Lösung (1g Gelatine in 1000 ml Ampuwa) in die Zellkulturflasche gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die überschüssige Flüssigkeit wieder entfernt.

2.2.2 Kultivierung und Passagieren von primären humanen Endothelzellen

Für die Experimente wurden die HUVECs wöchentlich passagiert. Hierfür wurde erstmal das Medium in der T 175 Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 10 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS ohne Mg/Ca) gewaschen. Nach dem Absaugen der Salzlösung wurden 5 ml Trypsin hinzugegeben. Nach gleichmäßiger Verteilung in der Zellkulturflasche wurde dieser Ansatz für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5 ml Trypsin Neutralization Solution (TNS) hinzugefügt, um die Proteaseaktivität des Trypsins zu inhibieren. Schließlich wurden die Zellen vorsichtig von der Flasche abgespült, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml EC-Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden weitere 4 ml Medium hinzugegeben und die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran erschienen hier

braun-gold, wohingegen beschädigte oder tote Zellen durch den Farbstoff Trypanblau blau gefärbt wurden. Nach der Zellzählung wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % unter Standardbedingungen (5 % CO₂, 37°C) kultiviert.

2.2.3 Zellen Einfrieren

Zum Einfrieren der Zellen wurde die Zellzahl auf $2,0 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Hierzu wurden die Zellen, wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben, abgelöst und gezählt. Im Anschluss wurden 900 µl Zellsuspension mit 100 µl DMSO in ein Kryoröhrchen überführt und gut vermischt. Die Röhrchen wurden dann 24 h bei -80°C in einem mit Isopropylalkohol befülltem Gefrierbehälter eingefroren, um eine konstante Kühlrate von -1°C/min zu gewährleisten. Nach Ablauf der 24 h wurden die Röhrchen aus dem Gefrierbehälter entnommen und bei -80°C oder in Flüssigstickstoff weiter gelagert.

2.2.4 Beschichtung von PMP-Hohlmembranen

Um eine Endothelialisierung zu ermöglichen, muss die Oberfläche der PMP-HFM modifiziert werden. Hierfür erfolgte eine O₂-Plasmabehandlung, eine Silanisierung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), eine Reaktion mit Dibenzylcyclooctyne-PEG₄-NHS Ester (DBCO-PEG₄-NHS Ester) und schlussendlich die Inkubation mit HUVECs.

2.2.4.1 O₂-Plasmabehandlung

Die Plasmabehandlung ist eine physikalische Methode zur Modifizierung von Oberflächen (Solouk et al., 2011). Bei der Niederdruck-Plasmatechnik wird Gas im Vakuum ionisiert, was wiederum zur Bildung von energiereichen und reaktiven Teilchen führt. Durch die Verwendung von Sauerstoff als Gas für die Plasmabehandlung entstehen O₂-funktionelle Gruppen, wie Carboxylgruppen (-COOH) und Hydroxylgruppen (-OH) (Solouk et al., 2011). Vor der Plasmabehandlung wurden die PMP-HFM auf eine Größe von ca. 3 x 3 cm zugeschnitten und in Petrischalen aus Glas gelegt. Die Plasmabehandlung erfolgte dann in einem Parallelplattenreaktor (Denta Plas[®], Diener electronic) mit dem „Cleaning“ Programm d.h. für 30 Minuten mit einem Druck von 0,30 mbar (±

0,20 mbar) und einer Leistung von 80 % (± 5 %). Nach der Plasmabehandlung wurden die Membranen mit einer Pinzette vorsichtig in eine 6-Well Platte gelegt und anschließend weiterbehandelt.

2.2.4.2 Silanisierung mit APTES

APTES ist ein Aminosilan d.h. ein Silan mit einer freien $-NH_2$ Gruppe. Seine Siliciumatome können mit Hydroxylgruppen reagieren und kovalente Bindungen eingehen. Aus diesem Grund kann durch die Behandlung mit APTES eine Schicht von Aminogruppen auf Membranen, die zuvor mit Sauerstoffplasma behandelt wurden, gebildet werden (Abbildung 4). Zum Ansetzen der Silanlösung wurden unter einem Abzug 19,6 ml Toluol (99,8 %) mit einer Spritze aufgezogen und in ein Becherglas gegeben. Anschließend wurden die mit O_2 -Plasma behandelten HFM in das Becherglas gelegt und 0,4 ml APTES (Endkonz. 2 % in Toluol) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Becherglas mit Parafilm bedeckt und die Proben für 30 min auf einem Schüttler bei 20 rpm und Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben gewaschen, um nicht gebundenes APTES zu entfernen. Hierzu wurden die HFM nacheinander in Bechergläser mit jeweils 10 ml Toluol (99,8 %), 10 ml Toluol/Methanol (v/v 1:1) und 10 ml Methanol (100%) gelegt und jeweils für 2 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Zuletzt wurden die Membranen für 10 Minuten bei $100^\circ C$ im Ofen getrocknet.

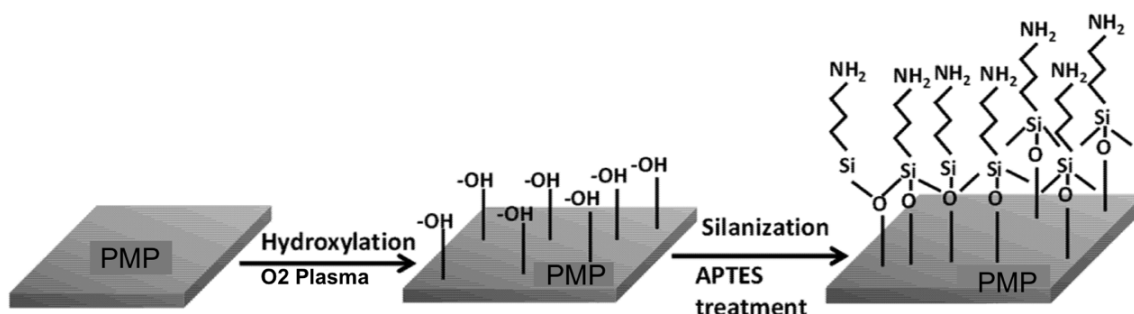


Abbildung 4: Sauerstoffplasmabehandlung und Silanisierung mit APTES. Die PMP-HFMs wurden für 30 min mit Sauerstoffplasma behandelt, um $-OH$ Gruppen zu generieren. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 2 % APTES für 30 min zur Einführung von primären Aminen auf die PMP-HFM. (Modifiziert nach (Sarkar and Daniels-Race, 2013).

2.2.4.3 Nachweis von Aminogruppen mittels Methylorangefärbung

Die Färbung der Membranen mit Methylorange dient dem Nachweis von gebundenen Aminogruppen und somit dem Nachweis der erfolgreichen Silanisierung der HFM. Methylorange ist ein Azofarbstoff, der an Substrate, die Aminogruppen enthalten, binden und danach durch Zugabe von Basen auch wieder entfernt werden kann (Hartwig et al., 1994). Zusätzlich findet bei Basenzugabe ein Farbumschlag von rot nach gelborange statt. Die Membranen wurden wie in den Abschnitten 2.2.4.1 und 2.2.4.2 behandelt. Danach wurden 50 ml einer 1 mM Methylorange-Lösung hergestellt (16.36 mg Methylorange in 50 ml Ampuwa). Diese Lösung wurde im Anschluss 1:1 in Ampuwa auf 0,5 mM verdünnt und die Membranen mit 900 µl der Lösung in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen für 5 h im Dunkeln auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die HFMs dreimal für jeweils 3 min mit 1 ml einer 1 mM HCl-Lösung und 1 ml Ampuwa gewaschen. Die Desorption von Methylorange erfolgte mit 0,5 ml einer 1 mM NaOH-Lösung über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C. Zuletzt wurden 100 µl der Lösung entnommen, in eine 96-Well Platte überführt und die Extinktion bei 465 nm im ELISA Reader in Triplikaten gemessen.

2.2.4.4 Einführung von Alkinen durch Behandlung mit DBCO-PEG₄-NHS Ester

Durch die Behandlung mit DBCO-PEG₄-NHS Ester soll die Oberfläche der HFM mit dem Alkin DBCO funktionalisiert werden. DBCO-PEG₄-NHS Ester kann mit den Aminogruppen auf der HFM unter Ausbildung stabiler Amidbindungen reagieren (Abbildung 5). Für die Einführung von Alkinen wurden 10 mg DBCO-PEG₄-NHS Ester in 7,7 ml wasserfreiem DMSO gelöst, um eine 2 mM Stocklösung herzustellen. Diese wurde im Anschluss 1:5 mit PBS verdünnt, sodass die Beschichtung der plasmabehandelten und silanisierten PMP-HFM mit 5 ml einer 400 µM DBCO-Lösung erfolgte. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler.

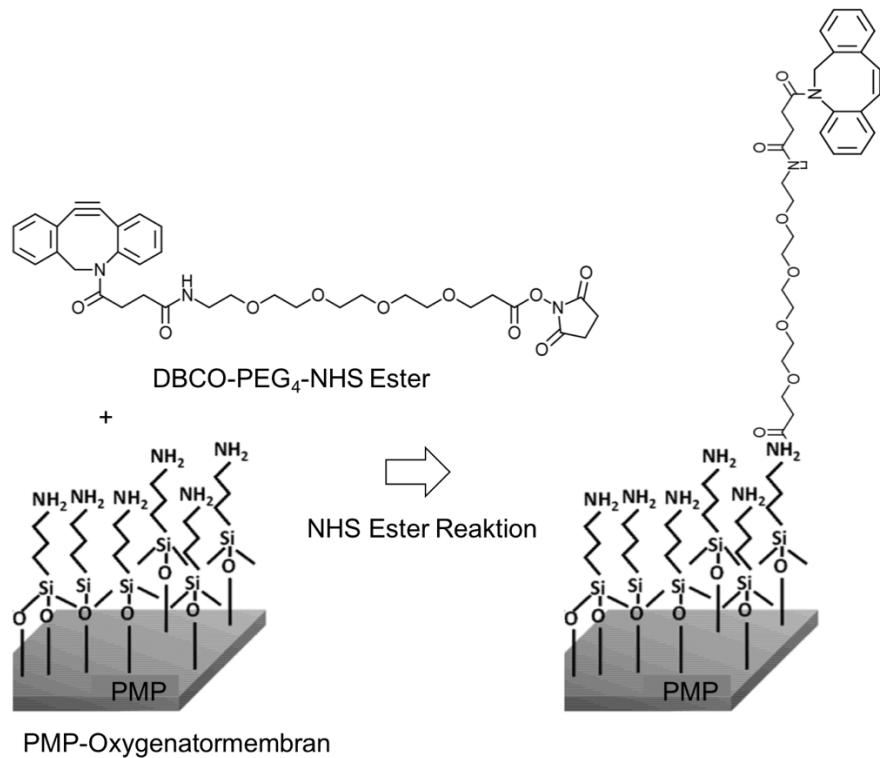


Abbildung 5: NHS Ester Reaktion zwischen DBCO-PEG₄-NHS Ester und den Aminogruppen auf der Oberfläche der HFM. DBCO-PEG₄-NHS Ester kann mit den primären Aminen der silanisierten HFM unter Ausbildung von Amidbindungen reagieren, somit wird das Alkin DBCO kovalent an die Membran gebunden (Modifiziert nach Sarkar et al., 2013).

2.2.4.5 Nachweis der Funktionalisierung mit DBCO mittels Azid-Cy3-Färbung

Der Farbstoff Azid-Cy3 kann dank seiner Azid Gruppe über die kupferfreie Click-Chemie mit DBCO reagieren. Durch den Nachweis des Farbstoffes Cy3 kann daher nachgewiesen werden, ob die HFM Oberfläche erfolgreich mit DBCO funktionalisiert wurde. Hierfür wurden die Membranen, wie zuvor beschrieben, mit Sauerstoffplasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester behandelt. Im Anschluss wurden die Membranen dreimal und jeweils für 1 min in 1 ml PBS gewaschen, dann auf einem Papiertuch leicht trocken getupft, in eine 6-Well Platte gelegt und ihre Eigenfluoreszenz im Mikroplattenleser gemessen. Zuvor wurde als „Blank“ die Fluoreszenz einer leeren 6-Well Platte gemessen, um das Hintergrundsignal der Platte zu bestimmen und von den Probenwerten subtrahieren zu können. Daraufhin wurden die Membranen in Eppendorf Gefäße

überführt und mit 80 µg/ml Azid-Cy3 in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺, bei Raumtemperatur, im Dunkeln und für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen über 10 min mit 100 % Ethanol gewaschen, kurz abgetupft und wieder ihre Fluoreszenz im Mikroplattenleser (Mithras 940, Berthold Technologies) gemessen. Hierbei wurde eine Anregungswellenlänge von 500 nm verwendet und die Emission wurde bei 600 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die „Blank Werte“ von den gemessenen Werten subtrahiert. Im Anschluss wurden die Werte der Messung vor der Cy3-Färbung von denen nach der Färbung subtrahiert. Zusätzlich zur Messung der Fluoreszenz im Mikroplattenleser wurden die Membranen auch unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.2.4.6 Generierung von Azidgruppen auf der Oberfläche von HUVECs

Durch die Behandlung der HFMs mit DBCO-PEG₄-NHS Ester wurden diese mit DBCO funktionalisiert. Damit Zellen an DBCO binden können, müssen Azidgruppen auf ihrer Oberfläche vorhanden sein. Hierfür wurden HUVECs bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Dann wurde das alte Medium entfernt und durch neues ersetzt, welches 50 µM des Azidozuckers N-azidoacetylmannosamin-tetraacyliert (Ac₄ManNAz) in DMSO gelöst enthielt. Ac₄ManNAz ist ein Zucker, welcher mit einer Azidgruppe modifiziert wurde. Während der Inkubation mit den HUVECs ist er in der Lage, passiv über die Zellmembran zu diffundieren. In der Zelle wird Ac₄ManNAz metabolisiert und dann in Glykanstrukturen auf der Zelloberfläche eingebaut. In der Abbildung 6 wird das Ergebnis dieses sogenannten metabolischen „Glycoengineerings“ mit Ac₄ManNAz dargestellt. Die Zellen wurden für diesen Versuch insgesamt für 48 h mit dem Azidozucker unter Standardbedingungen inkubiert.

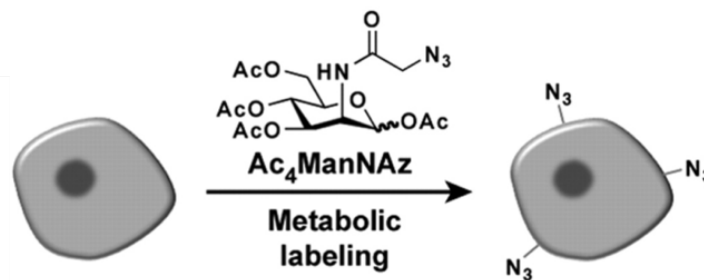


Abbildung 6: Generierung von Azidgruppen auf HUVECs. HUVECs wurden ausgesät und anschließend mit 50 μM des Azidozuckers Ac_4ManNAz behandelt und für 48 h inkubiert. Die Zellen tragen im Anschluss Azidgruppen ($-\text{N}_3$) an ihrer Oberfläche. (Baskin et al., 2007). (Copyright 2007 National Academy of Sciences).

2.2.4.7 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Azidgruppen auf der Zelloberfläche von HUVECs

In diesem Versuch wurden die Ac_4ManNAz modifizierte Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DBCO-S-Cy3 gefärbt. Dieser Farbstoff bindet mithilfe seines Alkyls DBCO an die Azidgruppen der Zelloberfläche. Hierfür wurden 2×10^5 HUVECs pro Well in eine gelatinebeschichtete 6-Well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 50 μM Ac_4ManNAz in 2 ml Medium für 48 h unter Standardbedingungen. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit 1 ml pro Well einer 5 μM DBCO-Cy3/DPBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung gefärbt und für 1 h unter Standardbedingung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung abgesaugt, die Zellen mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und dann mit dem Axiovert 135 (Carl Zeiss AG) fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.4.8 Durchflusszytometrischer Nachweis von Azidgruppen auf der Oberfläche von HUVECs

Neben der mikroskopischen Analyse wurde das Vorhandensein der Azidgruppen durchflusszytometrisch untersucht. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen wie im Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben mit Ac_4ManNAz behandelt und anschließend, wie im Abschnitt 2.2.4.7 dargestellt, mit 5 μM

DBCO-Cy3/DPBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, in FACS-Röhrchen überführt und jeweils für 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht. Um den Einfluss unterschiedlicher Ac_4ManNAz Konzentrationen zu untersuchen, wurden HUVECs entweder mit 50 μM oder 100 μM Ac_4ManNAz für 48 h inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.4.9 Endothelialisierung der modifizierten HFM

Die Endothelialisierung der Membranen mit HUVECs basiert auf dem Prinzip der von Bertozzi et al. etablierten 1,3-Dipolaren Cycloaddition von Aziden und Cyclooctinen (kupferfreie Click-Chemie) (Abbildung 7) (Agard et al., 2004).

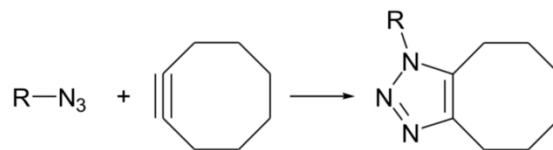


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der kupferfreien Click-Chemie. Darstellung der 1,3-Dipolaren Cycloaddition eines Azids ($-\text{N}_3$) mit einem Cyclooctin.

In unserem Versuchsaufbau reagiert die C-C-Dreifachbindung des Alkins DBCO-PEG₄-NHS Esters mit einer Azidgruppe auf der Oberfläche der HUVECs. Dadurch entsteht eine stabile kovalente Bindung zwischen der Zelle und der HFM-Oberfläche (Abbildung 8).

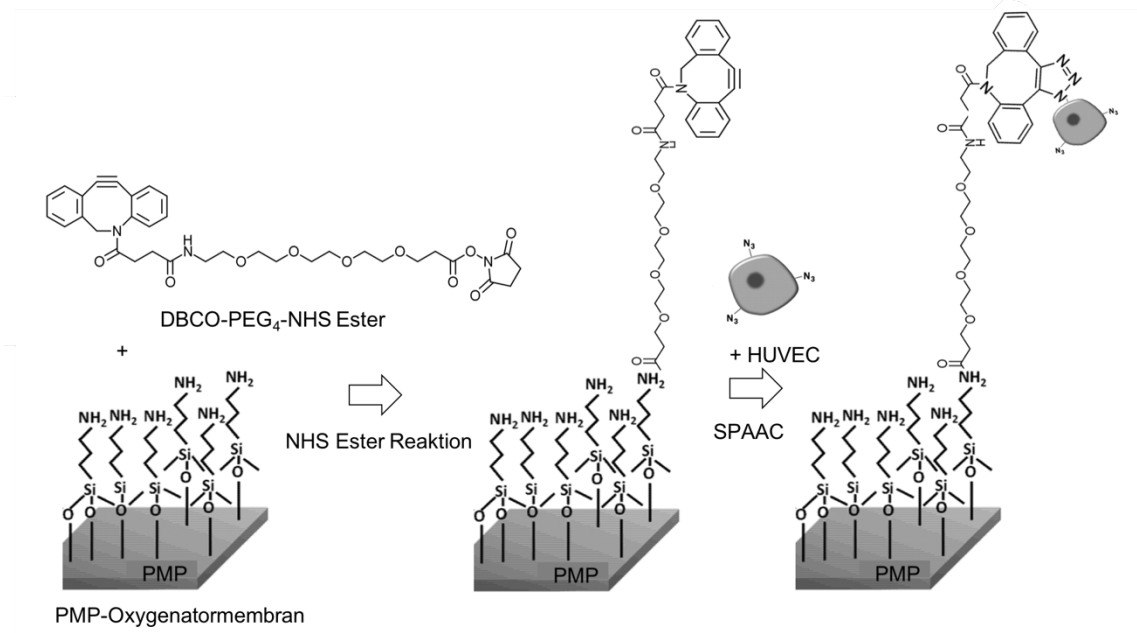


Abbildung 8: Beschichtung der HFM. Die modifizierten PMP-HFM wurden mit 400 μM DBCO-PEG₄-NHS Ester für 30 min inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Endothelialisierung mit 4×10^5 HUVECs/ml. Hierbei reagieren die Azidgruppen auf der Oberfläche der HUVECs mit der C-C Dreifachbindung von DBCO (Modifiziert nach Baskin et al., 2007 und Sarkar et al., 2013).

Vor der Beschichtung wurden die HUVECs, wie im Abschnitt 2.2.4.6 beschrieben, 48 h lang mit Ac₄ManNAz (Endkonz. 50 μM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert, in 1 ml EGM2 Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml (insgesamt $5,2 \times 10^6$ Zellen) eingestellt und in einem Gesamtvolumen von 13 ml mit der Membran in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nur leicht verschlossen und in Urinbechern fixiert wurden die Reaktionsgefäße im Anschluss auf einem Rollschüttler im Brutschrank bei 10 rpm für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen einzeln in Petri Schalen überführt, mit 13 ml EGM2 Medium bedeckt und weiter statisch inkubiert.

2.2.4.10 Calcein-AM Färbung der HUVECs auf den HFM

Zur Darstellung von vitalen Zellen, die an die HFM gebunden haben, wurde der Farbstoff Calcein-AM verwendet. Dieser Farbstoff kann die Zellmembran passieren und wird dann in der Zelle durch Esterasen in Calcein umgewandelt.

Calcein kann anschließend mit Calciumionen in der Zelle komplexieren, wodurch eine grüne Fluoreszenz entsteht. Hierbei entsteht die Fluoreszenz nur in vitalen Zellen, da nur diese genug Esteraseaktivität besitzen, um Calcein-AM in Calcein umzuwandeln. Für die Zellfärbung wurden die Membranen dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und dann mit 250 ng/ml Calcein-AM für 15 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Membranen wieder dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Nach der Färbung wurden die Membranen vorsichtig auf Objektträger gelegt, möglichst glatt ausgebreitet und mikroskopiert.

2.2.4.11 Nachweis der Zell-Zell Kontakte mittels Immunfluoreszenzfärbung

Um nachzuweisen, ob sich eine konfluente Endothelzellschicht auf der Oberfläche der Membranen gebildet hat, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen VE-Cadherin durchgeführt. VE-Cadherin ist ein Glykoprotein, welches maßgeblich an der Bildung von Zell-Zell Kontakten beteiligt ist. Somit kann der Nachweis von VE-Cadherin genutzt werden, um die Konfluenz der Endothelzellschicht auf den beschichteten HFMs nachzuweisen. Die endothelialisierten Membranen wurden hierfür mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung der Zellen mit 0,25 % Triton X-100 in Tris-Puffer (pH 7,5) und 5 % Ziegen Serum für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membranen wurden diese mit einem primären Antikörper gegen VE-Cadherin (Maus anti-human VE-Cadherin, Endkonz. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 1 % BSA/PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit dem Alexa Fluor 488 Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG, Endkonz. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 Minuten im Dunkeln. Danach wurden die Membranen dreimal gründlich mit PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Zur Darstellung des Zytoskeletts wurde der Farbstoff Actin Red 555 verwendet. Hierbei wurden 2 Tropfen Actin Red pro ml PBS zu den Membranen gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen wieder dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Schlussendlich wurde der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)

verwendet, um Zellkerne mikroskopisch darzustellen. DAPI bindet vor allem an AT-reiche Regionen der DNA und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht blau. Die Färbung mit DAPI erfolgte (1:2000 in PBS verdünnt, Endkonz. 0,5 µg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln. Die Membranen wurden dann wieder mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit dem Axiovert 135 (Carl Zeiss AG) mikroskopiert.

2.2.4.12 Detektion der adhärennten Zellen mittels Fluoreszenzreader

Zur Bestimmung der Zelldichte auf den beschichteten HFMs, wurden diese mit Calcein-AM gefärbt und anschließend die Fluoreszenz der Membranen bestimmt. Diese korreliert mit der Anzahl adhärennter Zellen auf den HFM, d.h. je größer die Anzahl von Zellen auf den Membranen, desto größer die gemessene Fluoreszenz. In diesem Versuchsaufbau wurden die Membranen mit O_2 -Plasma, 2 % APTES und 400 µM DBCO-PEG₄-NHS Ester behandelt und anschließend mit 4×10^5 Ac₄ManNAz behandelte HUVECs/ml für 24 h auf dem Rollschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und deren Fluoreszenz im Mikroplattenleser gemessen. Anschließend wurden 5 ml Calcein-AM (Endkonz. 250 ng/ml) mit den Membranen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und 30 min unter Standardbedingungen im Brutschrank (37°C, 5 % CO_2) inkubiert. Zum Schluss wurden die Membranen wieder dreimal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und erneut deren Fluoreszenz gemessen. Im Mikroplattenleser wurde eine Anregungswellenlänge von 485 nm verwendet und die Emission wurde bei 535 nm gemessen. Für die Auswertung wurde die Hintergrundfluoreszenz (Leerwert der 6-Well Platte) von den gemessenen Werten abgezogen. Danach wurden die gemessenen Werte vor der Calcein-AM Färbung von den Werten nach der Calcein-AM Färbung substrahiert.

2.2.5 Isolierung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Hybridomazellen

2.2.5.1 Kultivierung von P2b1 Hybridomazellen

Hybridomazellen sind Zellen, die zur *in vitro* Produktion monoklonaler Antikörper genutzt werden können (Kohler and Milstein, 1975). Um Hybridomazellen herzustellen, muss ein Wirtsorganismus (z.B. Maus) mit dem gewünschten Antigen immunisiert werden, woraufhin B-Zellen Antikörper gegen dieses Antigen bilden. Letztlich werden die B-Zellen mit Tumorzellen (Myelomzellen) fusioniert und dadurch immortalisiert.

Für die *in vitro* Produktion eines anti-CD31 Antikörpers wurden P2b1 Hybridomazellen kultiviert. Hierfür wurden die Zellen für 2 min im Wasserbad (37°C) aufgetaut. Im Anschluss wurden die Zellen bei 170 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Hybridoma Wachstumsmedium resuspendiert und in eine T-75 Kulturflasche mit weiteren 9 ml Hybridoma Wachstumsmedium gegeben. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Die Zellzahl wurde täglich mittels CASY Zellzähler bestimmt und sobald eine Zellkonzentration von 5 x 10⁵/ml erreicht wurde, wurde der Zellkultur 10 ml Hybridoma Wachstumsmedium zugefügt. Nach 2 Tagen wurde die Zellsuspension auf 2 T-75 Zellkulturflaschen aufgeteilt, die zusätzlich mit jeweils mit 10 ml Hybridoma Wachstumsmedium befüllt wurden. Nach weiteren 2 Tagen wurden die Zellen erneut gezählt und in T-175 Zellkulturflaschen mit 10 ml serumfreien Hybridomamedium gegeben (Endkonz. 3 x 10⁶ Zellen/ml). Über mehrere Tage wurde serumfreies Medium zu den Zellkulturen gegeben, um eine Konzentration zwischen 5 x 10⁵ Zellen/ml und 3 x 10⁶ Zellen/ml zu gewährleisten, da sich hier das beste Zellwachstum zeigt. Sobald ein Volumen von 50 ml in den Zellkulturflaschen erreicht wurde, wurden die Zellen für 14 Tage ohne Hinzugabe von Medium inkubiert. Hierdurch sterben die Hybridomazellen ab und es kann eine maximale Immunglobulinkonzentration erreicht werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand in 10 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und für 10 min bei 670 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde im Anschluss steril filtriert und mit 1 M Tris-HCl (pH 7,5) gepuffert (6 ml je 200 ml Überstand), um den pH zu stabilisieren. Der

Überstand wurde daraufhin in Zentrifugen-Filtereinheiten gegeben und für 30 min bei 8°C und 4000 x g zentrifugiert. Der aufkonzentrierte Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung in Eppendorf Gefäßen bei 4°C gelagert.

2.2.5.2 Antikörperisolierung mittels Magne Protein G Beads

Um den Antikörper aus dem gewonnenen Überstand zu isolieren, wurden Magne Protein G Beads von Promega eingesetzt. Diese Beads tragen an ihrer Oberfläche das Protein G, welches ein Protein aus der Zellwand von Streptokokken ist. Dieses Protein bindet mit hoher Affinität an die Fc-Region von IgG Antikörpern, wodurch die Beads in der Lage sind, Antikörper kovalent an ihrer Oberfläche zu binden. Durch Waschen können unspezifisch gebundene Proteine leicht entfernt werden und es bleibt am Ende nur der gewünschte Antikörper (Abbildung 9) (Nath et al., 2015).

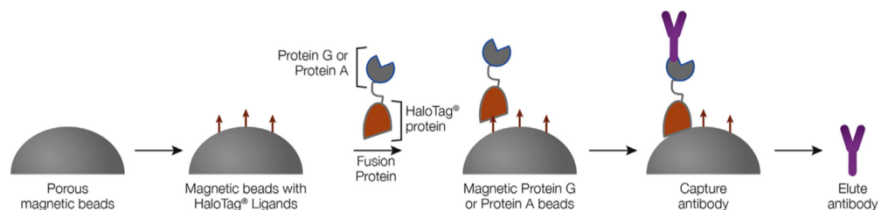


Abbildung 9: Antikörperisolierung mit Magne Protein G Beads. Die Beads tragen an ihrer Oberfläche das Protein G bzw. Protein A, welches mit hoher Affinität an Antikörper binden kann und somit die Antikörperisolierung aus Proben ermöglicht. In der Abbildung wird die Bindung von Protein G bzw. A mittels HaloTag Technologie an die magnetischen Beads dargestellt. Diese funktionalisierten Beads sind nun in der Lage, Antikörper aus einer Probe zu binden. Nach Entfernung der Beads bleibt schlussendlich nur der gewünschte Antikörper zurück (Nath et al., 2015).

Die Antikörperisolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers Promega. Zunächst wurden 50 µl Beads in ein Eppendorf Gefäß gegeben und dieses in einen Magnetständer gestellt, wodurch der Lagerungspuffer der Beads entfernt wurde. Anschließend wurden die Beads mit 500 µl TBS (pH 7,5) gewaschen. Nach der Entfernung von TBS wurden 900 µl aufkonzentrierter Hybridomazellüberstand und 100 µl TBS (pH 7,5) vermischt und zu den Beads gegeben. Die Inkubation des Zellüberstands mit den Beads erfolgte für 60 min auf einem Rotator bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Eppendorf

Gefäß mit der Probe in den Magnetständer gestellt und der Überstand entfernt. Nach insgesamt 3 Waschgängen mit TBS (pH 7,5) wurden 50 µl 100 mM Glycin-HCl (pH 2,7) zu den Beads gegeben, 5 Minuten gemischt und das Antikörpereluat entnommen, welches mit 10 µl 2 M Tris Puffer (pH 7,5) in ein neues Eppendorf Gefäß überführt wurde. Die Elution mit 100 mM Glycin-HCl (pH 2,7) erfolgte insgesamt zweimal.

2.2.5.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Um die Antikörperkonzentration im Eluat zu bestimmen, wurde mittels BCA-Assay die Proteinkonzentration der Probe bestimmt. Die BCA Reagenzien enthalten u.a. Bicinchoninsäure und Cu^{2+} . Das Cu^{2+} wird durch die Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu zu Cu^+ reduziert (Biuret Reaktion) und komplexiert dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure. Dies führt zu einem lilafarbenen Farbumschlag mit starker Extinktion bei 562 nm, der proportional zur Proteinkonzentration ist. Um von der gemessenen Extinktion auf die Proteinkonzentration der Probe schließen zu können, wird eine Standardgerade erstellt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Gamma Globulin (BGG, 2 mg/ml) mit folgenden Konzentrationen genutzt: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml und 0,0625 mg/ml.

Für die Durchführung des BCA-Assays wurde zuerst das Eluat 1:20 in nucleasefreiem Wasser verdünnt und dann die Verdünnungsreihe von BGG erstellt. Die Verdünnungsreihe und die Proben wurden dann in Triplikaten in eine 96-Well Platte pipettiert, mit 200 µl der BCA Lösung (1:50 verdünnt) vermischt und für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Extinktion der Proben bei 562 nm im ELISA Reader gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Anschluss mit der Onlinesoftware ELISA Analysis.

2.2.5.4 Nachweis der Bindung des isolierten Maus anti-human CD31 Antikörpers an HUVECs

Ziel dieses Versuchs war es nachzuweisen, dass es sich beim isolierten Antikörper tatsächlich um einen Maus anti-human CD31 Antikörper handelt. Hierfür wurden 1×10^5 HUVECs in FACS-Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Zum Waschen wurden die Zellen in 4 % BSA/PBS

resuspendiert und für 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde das Zellpellet in 50 µl 4 % BSA/PBS resuspendiert und 2 µg/ml des hergestellten Antikörpers hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut gewaschen und in einer 50 µl Lösung mit einem PE-anti-Maus-IgG Antikörper (1 µg/ml) und 4 % BSA in PBS für 30 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 4 % BSA in PBS gewaschen, in 500 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.6 Azidmodifizierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers

Mit diesem Versuch sollte der erste Schritt in Richtung einer Beschichtung der HFMs mit einem anti-CD31 Antikörper gemacht werden. Damit dieser an die mit DBCO-PEG₄-NHS Ester beschichtete Membran binden kann, muss der Antikörper Azidgruppen tragen. Hierfür wurde das Site Click Antibody Azido Modification Kit von ThermoFisher verwendet und die Anweisungen des Herstellers befolgt. Da der hergestellte Antikörper eine geringere Konzentration als 10 mg/ml hatte, wurde dieser vor der Modifizierung mit einem im Kit enthaltenen Antikörperkonzentrator aufkonzentriert. Der Konzentrator wurde durch Zugabe von 500 µl dH₂O und Zentrifugation für 6 min bei 5000 x g gewaschen. Vom Antikörper wurden 1 mg in den Antikörperkonzentrator pipettiert und insgesamt zweimal mit 500 µl des Vorbereitungspuffers vermischt und jeweils für 6 min bei 5000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Antikörperkonzentrator in ein Auffangbehältnis invertiert und für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert, um den Antikörper ins Auffangbehältnis zu eluieren. Danach wurde die Kohlenhydratdomäne des Antikörpers modifiziert, indem 20 µl β-Galaktosidase für 6 h bei 37°C mit dem Antikörper inkubiert wurden. Als nächstes wurde die Lösung zur Azidmodifizierung vorbereitet, indem 12 µl dH₂O, 18 µl 20 X Tris Puffer (pH 7,0), 40 µl Pufferzusatz und 160 µl GalT Enzym mit UDP-GalNAz vermischt wurden. Zu dieser Lösung wurde der Antikörper hinzugefügt und über Nacht bei 30°C inkubiert (Abbildung 10).

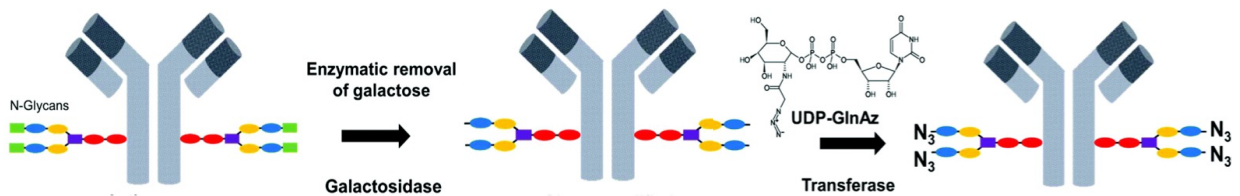


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Azidmodifizierung des anti-CD31 Antikörpers. Erstmal werden endständige Glykane enzymatisch entfernt und im Anschluss werden N₃-Gruppen mit Hilfe der UDP-GalNAz-Transferase an den Antikörper gebunden (modifiziert nach (Gai et al., 2020)).

Zuletzt wurde der Azid-gelabelte anti-CD31 Antikörper gereinigt und aufkonzentriert. Hierfür wurden zunächst 10 ml einer 1 X Tris Lösung (pH 7,0) vorbereitet, indem 500 µl 20 X Tris zu 9,5 ml dH₂O hinzugefügt wurden. Zum Waschen des großen Antikörperkonzentrators wurden 2 ml dieser Lösung hineingegeben und für 10 min bei 1200 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 1,5 ml der 1 X Tris Lösung (pH 7,0) und 350 µl des Azid-gelabelten anti-CD31 Antikörpers in den Antikörperkonzentrator gegeben und für 8 min bei 1200 x g zentrifugiert. Danach wurde das Volumen im Antikörperkonzentrator mit 1 X Tris (pH 7,0) wieder auf 2 ml aufgefüllt und erneut für 11 min bei 1200 x g zentrifugiert. Dieser Schritt zur Reinigung des Azid-gelabelten anti-CD31 Antikörpers wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Schlussendlich wurde der Antikörperkonzentrator in ein Eppendorf Gefäß invertiert und für 3 min bei 1000 x g zentrifugiert, um den Antikörper zu sammeln. Um die Konzentration des Azid-gelabelten anti-CD31 Antikörpers zu bestimmen, wurde die OD₂₈₀ (Optische Dichte) gemessen, wobei laut dem Hersteller eine OD₂₈₀ von 1,4 einer Konzentration von 1 mg/ml entspricht. Die Probe wurde bis zum weiteren Gebrauch bei 2-8°C gelagert.

2.2.6.1 Nachweis der Azidmodifizierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Durchflusszytometrie

In diesem Versuch wurde untersucht, ob die Modifizierung des Antikörpers mit einer Azidgruppe erfolgreich war. Hierfür wurden 1×10^5 HUVECs in FACS-Röhrchen gegeben und für 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Zum Waschen wurden die Zellen in 4 % BSA in PBS resuspendiert und wieder für 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 50 μ l 4 % BSA in PBS resuspendiert und es wurden 2 μ g/ml des Azid-gelabelten anti-CD31 Antikörpers hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 5 μ M DBCO-Cy3/PBS⁺-Lösung für 1 h im Brutschrank inkubiert. Schlussendlich wurden die Zellen noch zweimal mit 4 % BSA in PBS gewaschen, in 500 μ l PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Beschichtung von PMP-Hohlfasermembranen

3.1.1 Nachweis von Aminogruppen mittels Methylorange Färbung

In diesem Versuch wurde die erfolgreiche Silanisierung der HFM mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) nachgewiesen. APTES kann über die Reaktion mit Hydroxylgruppen, die zuvor durch die O₂-Plasmabehandlung generiert wurden, Aminogruppen auf die Oberfläche der PMP-Membran einführen. Der Azofarbstoff Methylorange bindet an Aminogruppen und wird daher genutzt, um diese nachzuweisen. In der Abbildung 11 ist die Extinktion der Überstände der unterschiedlichen Membranen dargestellt. Die Membran, die mit APTES behandelt wurde, weist im Vergleich zur unbehandelten und zur plasmabehandelten Membran eine signifikant höhere Extinktion auf. In der Tat ist die Extinktion der silanisierten Membran 250 Mal größer als die Extinktion der unbehandelten Membran. Zusätzlich war die gelbliche Färbung des Überstandes nach Desorption des Farbstoffs mit bloßem Auge deutlich erkennbar.

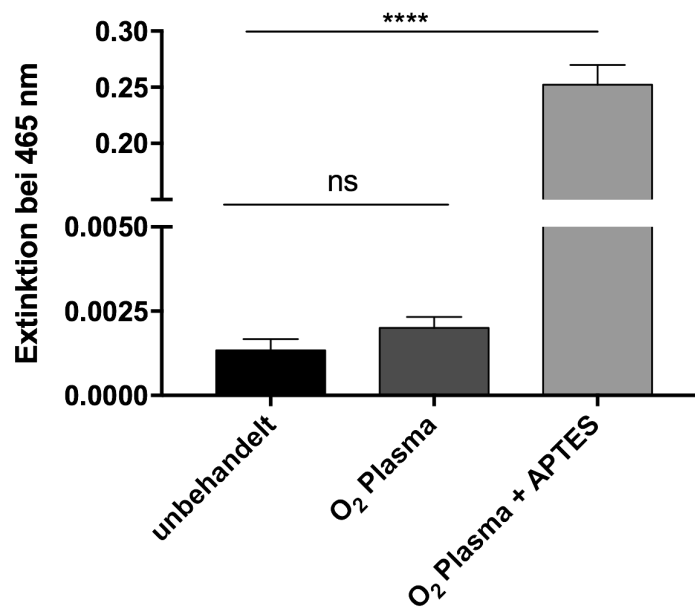


Abbildung 11: Nachweis von NH₂-Gruppen nach Silanisierung mit 2 % APTES. Dargestellt ist die Extinktion der Überstände unterschiedlicher Proben bei 465 nm nach Methylorangefärbung und Desorption mit NaOH. Als Kontrollen dienten PMP-Membranen, die ganz unbehandelt geblieben sind oder nur mit Sauerstoffplasma behandelt wurden. Die Werte sind als Mittelwert + SD (n=3) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni's multiple comparisons test (**** p<0,0001). APTES: 3-Aminopropyltriethoxysilan. (Canjuga, Hansen et al., 2022)

3.1.2 Nachweis der Funktionalisierung mit DBCO mittels Azid-Cy3-Färbung

Die erfolgreiche Bindung des DBCO-PEG₄-NHS Esters auf der Oberfläche der HFM wurde durch Markierung mit dem Azid-gekoppeltem Farbstoff Cy3 bestätigt. DBCO ist ein Alkin, welches mit Azidgruppen reagieren kann und somit durch die Reaktion mit einem Cyaninfarbstoff gekoppelten Azid farblich markiert werden kann. Als Kontrollen fungierten eine unbehandelte Membran und eine Membran, die zusätzlich mit O₂-Plasma behandelt wurde und silanisiert wurde („APTES“). Wie in der Abbildung 12 A zu erkennen ist, konnte nach Färbung mit Azid-Cy3 und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung dieser Membranen keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu, ist die rote Fluoreszenz von Azid-Cy3 auf der Membran „APTES + DBCO“ in der Fluoreszenzmikroskopie deutlich zu erkennen. Jede einzelne Faser der PMP-

HFM ist hier mit dem Farbstoff gefärbt, womit auf eine DBCO Funktionalisierung der gesamten Membran geschlossen werden kann. In der Abbildung 12 B werden die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) der jeweiligen Membranen dargestellt. Passend zu den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie hat die Membran „APTES + DBCO“ mit 22553 ± 2058 RFU eine signifikant höhere Fluoreszenz als die Kontrollmembran („unbehandelt“), zumal die RFU der Membranen „APTES“ und „unbehandelt“ sich nicht signifikant unterscheiden. Insgesamt kann man schließen, dass der Azid-Cy3 Farbstoff an die Kohlenstoff-Kohlenstoff Dreifachbindung des Alkins gebunden hat und somit die Oberfläche der HFM erfolgreich mit DBCO-PEG₄-NHS Ester modifiziert wurde.

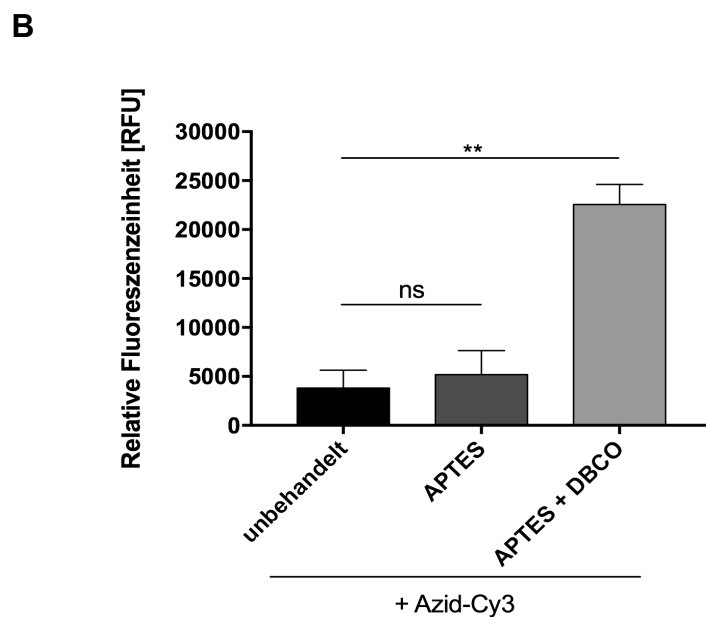
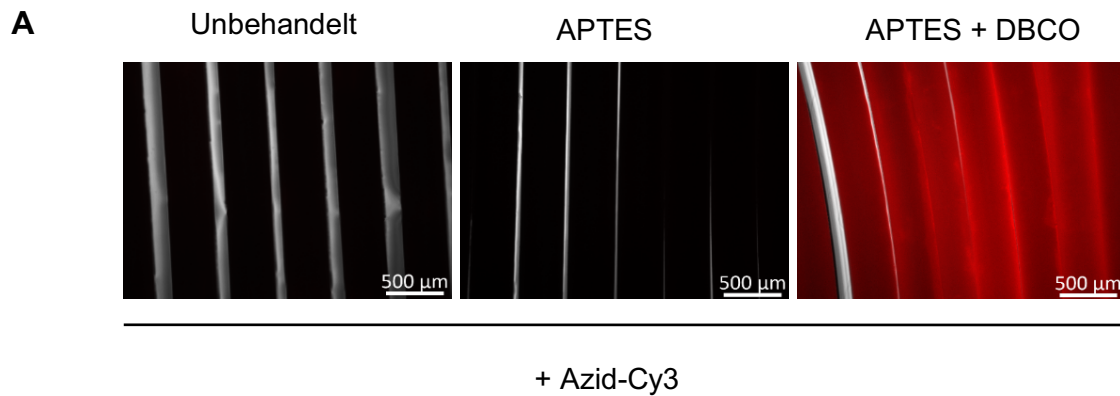


Abbildung 12: Nachweis der Beschichtung mit DBCO-PEG₄-NHS Ester. Hierfür wurde eine HFМ mit Sauerstoffplasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester behandelt (APTES + DBCO) und anschließend mit Azid-Cy3 gefärbt. Als Kontrollen dienten Membranen, die entweder ganz unbehandelt geblieben sind (unbehandelt) oder nur mit Sauerstoffplasma und APTES (APTES) behandelt wurden und danach mit Azid-Cy3 gefärbt wurden. A) Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (5-fache Vergrößerung) der Membranen nach Färbung mit Azid-Cy3. B) Detektion der Fluoreszenzintensität der Membranen nach Färbung mit Azid-Cy3. Die RFU (Relative Fluoreszenzeinheit) wurde mittels Mikroplattenleser ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM dargestellt (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des One-way ANOVA Tests mit anschließendem Bonferroni's multiple comparisons test (ns: nicht signifikant, ** p<0,01). (Canjuga, Hansen et al., 2022)

3.1.3 Nachweis der generierten Azidgruppen auf HUVECs mittels DBCO-S-Cy3-Färbung

Damit die Endothelzellen an die HFMs binden können, müssen sie mit DBCO-PEG₄-NHS Ester reagieren können. Daher wurden die Zellen für 48 h mit 50 µM des Azidozuckers Ac₄ManNAz behandelt, um Azidgruppen an der Zelloberfläche zu generieren. Um nachzuweisen, ob tatsächlich Azidgruppen auf der Oberfläche der HUVECs vorhanden sind, wurden die Zellen im Anschluss an die Inkubation mit Ac₄ManNAz mit dem Farbstoff DBCO-S-Cy3 inkubiert. In der oberen Reihe der Abbildung 13 A werden die Zellen dargestellt, die mit dem Azidozucker behandelt wurden. In der Hellfeld Aufnahme, ist ein dichter Rasen von HUVECs zu erkennen, der in der Azid-Cy3 Aufnahme eine deutliche, rote Fluoreszenz zeigt. In der zusammengefügte Darstellung wird veranschaulicht, dass alle Zellen des Zellrasens fluoreszieren und daher Azidgruppen aufweisen. Die untere Bildreihe dient als Kontrolle, da Zellen verwendet wurden, die nicht mit Ac₄ManNAz inkubiert wurden. Zur Quantifizierung der Azidfunktionalisierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 13 B). Die erste Graphik der Abbildung 13 B zeigt in Prozent die Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCBO-Cy3 gefärbt wurden. Nach der Inkubation mit dem Azidozucker weisen 98,4 ± 0,9 % der Zellen eine Fluoreszenz auf. Im Gegensatz dazu sind nur 11,73 ± 6,3 % der Zellen, die nicht mit Ac₄ManNAz behandelt wurden, positiv mit Cy3 gefärbt. Die zweite Graphik der Abbildung 13 B zeigt die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben mit bzw. ohne Färbung mit DBCO-

Cy3. Die Ac₄ManNAz behandelten HUVECs weisen eine signifikant größere, bei $2659 \pm 459,2$ liegende mittlere Fluoreszenzintensität (GeoMFI) auf, als Zellen, die nicht mit dem Azidozucker behandelt wurden. Anhand dieser Versuche wird das Vorhandensein von Azidgruppen nach Behandlung mit Ac₄ManNAz bestätigt, da DBCO-Cy3 signifikant stärker an Ac₄ManNAz behandelte HUVECs bindet.

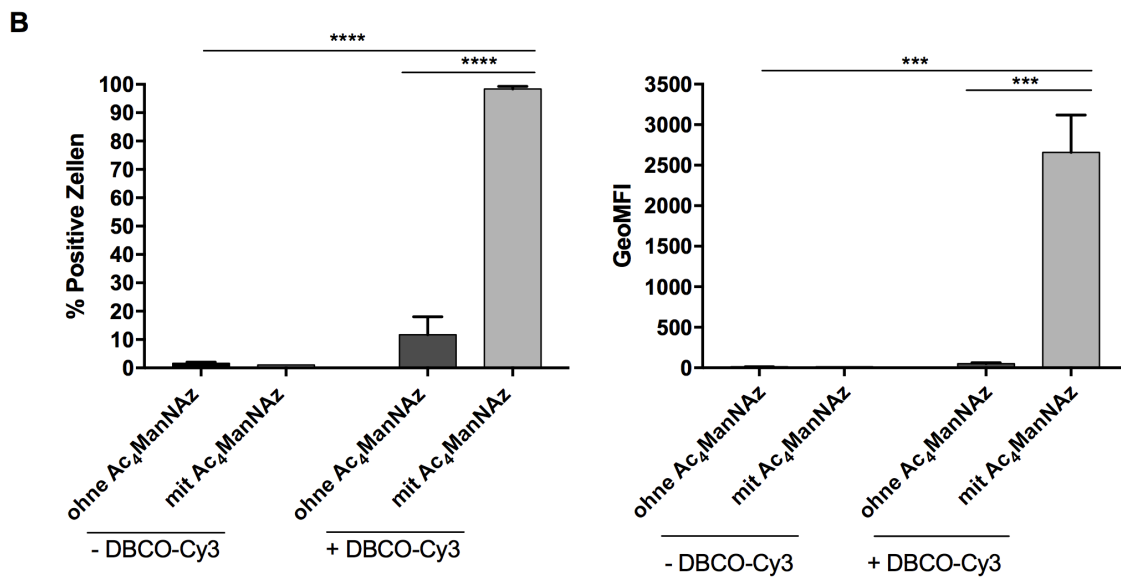
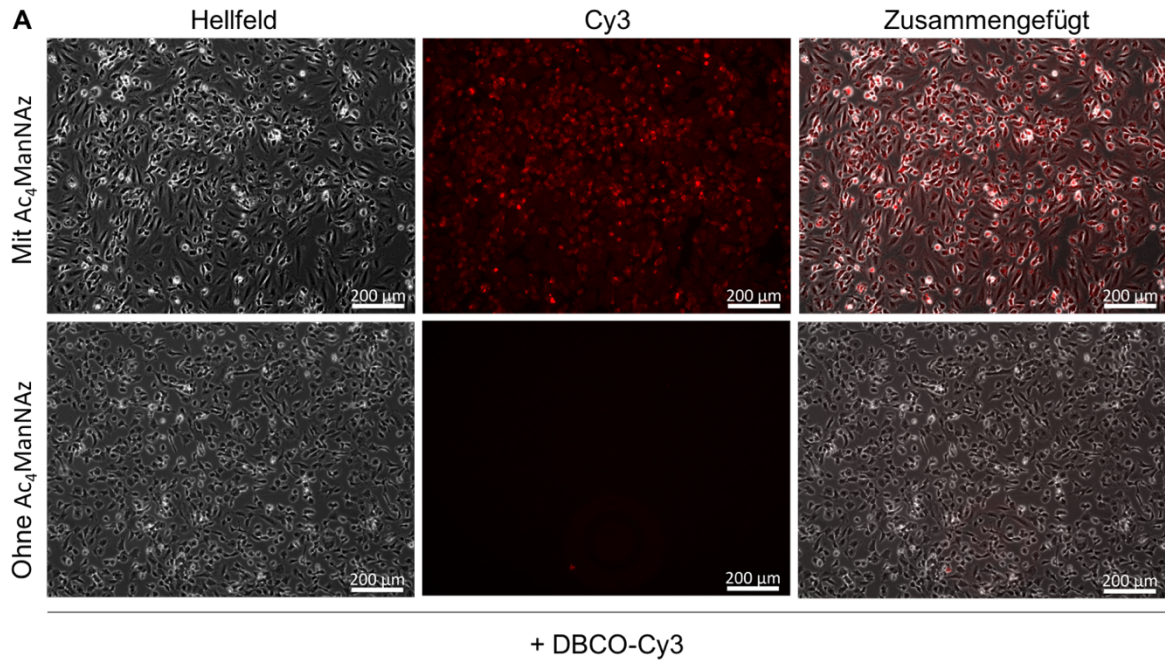


Abbildung 13: A) Nachweis von Azidgruppen auf HUVECs nach Behandlung mit Ac₄ManNAz. Hierfür wurden 2×10^5 HUVECs ausgesät und für 48 h mit 50 μM Ac₄ManNAz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 μM DBCO-Sulfo-Cy3 für 1 h gefärbt. A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Zellen (10-fache Vergrößerung). Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVECs, um eine unspezifische Bindung des Farbstoffs DBCO-Cy3 an die Zellen auszuschließen. B) Durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Es wurde die Anzahl der Zellen untersucht, die positiv für den Farbstoff waren, sowie die Fluoreszenzintensität der Zellen. Die Werte stammen aus drei Versuchen (n=3) und sind als Mittelwert + SEM dargestellt. Als statistische Tests wurden One-way ANOVA und im Anschluss Tukey's multiple comparisons test verwendet (***p*<0,001, *****p*<0,0001, GeoMFI: Geometric mean fluorescence intensity). (Canjuga, Hansen et al., 2022)

Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Effektivität der Ac₄ManNAz-Behandlung durch eine Erhöhung der Ac₄ManNAz Konzentration auf 100 μM gesteigert werden kann. Das Ergebniss der Durchflusszytometrie (Abbildung 14) deutet darauf hin, dass es kaum einen Unterschied im Prozentsatz der gefärbten Zellen gibt: 99,9 % bei der Verwendung von 100 μM ManNAz im Vergleich zu 99,6 % bei Gebrauch von 50 μM ManNAz. Auch die Fluoreszenzintensitäten bei Verwendung von 100 μM Ac₄ManNAz im Vergleich zu 50 μM Ac₄ManNAz, scheinen sich kaum zu unterscheiden. Da in diesem einzelnen Versuch kein Unterschied zwischen der Verwendung von 50 μM und 100 μM Ac₄ManNAz festgestellt werden konnte, wurde für weitere Versuche eine Konzentration von 50 μM verwendet.

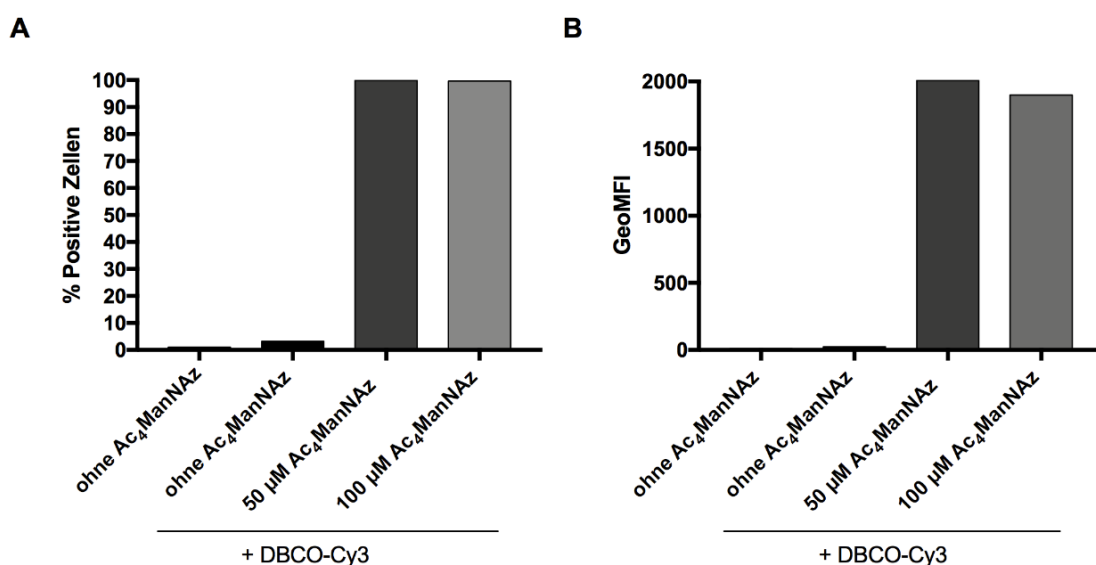


Abbildung 14: Vergleich von unterschiedlichen Ac₄ManNAz-Konzentrationen. Es wurden 2×10^5 HUVECs ausgesät und für 48 h mit 50 µM bzw. 100 µM ManNAz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 µM DBCO-Sulfo-Cy3 für 1 h gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. A) Darstellung des Prozentsatzes der Zellen, die durch die Behandlung mit DBCO-S-Cy3 gefärbt wurden und B) graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität der Zellen. Als Kontrollen dienten unbehandelte HUVECs und HUVECs, die nur mit DCBO-Cy3 inkubiert wurden. Die Werte stammen aus einem Versuch (n=1).

3.1.4 Endothelialisierung der beschichteten PMP-HFM

Zur Endothelialisierung der HFMs wurden zunächst 4×10^5 Zellen/ml in EGM2 Medium mit der beschichteten PMP-HFM in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde in einem Urinbecher fixiert, und für 24 h unter Rotation inkubiert. Eine statische Inkubation erfolgte für weitere 96 h. Nach Inkubation der Zellen mit den HFMs wurden die Zellen auf ihre Viabilität und Ausbreitung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In der Abbildung 15 ist zu erkennen, dass die HUVECs ohne Ac₄ManNAz nicht an die HFM adhären. Stattdessen sind die Zellen in Gruppen verklumpt und deformiert. In der oberen Reihe der Abbildung 15 sind HFMs dargestellt, die mit Azid-modifizierten HUVECs inkubiert wurden. Hierbei diente eine unbehandelte Membran als Kontrolle und weist kaum gebundene Zellen auf. Die HFM, die mit O₂-Plasma und APTES behandelt wurde, trägt an ihrer Oberfläche wenige unspezifisch gebundene HUVECs, die sich vor allem an den Rändern der einzelnen Hohlfasern befinden. Letztlich zeigt nur die Membran „APTES + DBCO“ die gewünschte Dichte Besiedlung der einzelnen Hohlfasern.

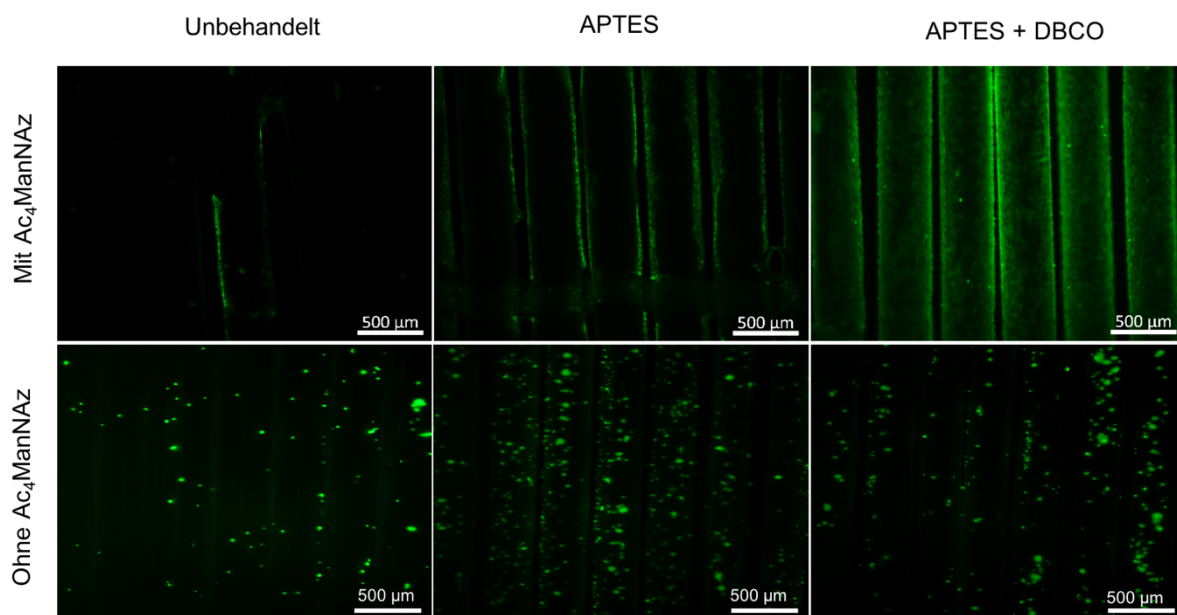
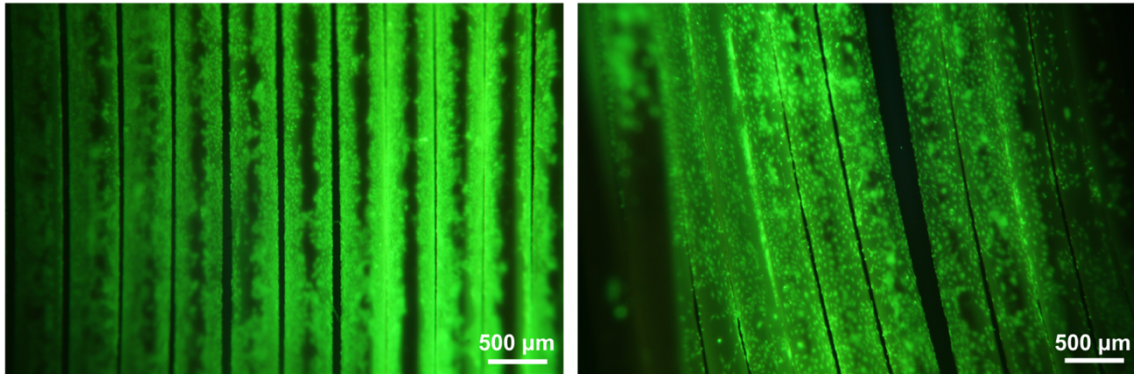


Abbildung 15: Endothelialisierung von PMP-HFMs. Hierfür wurden die Membranen mit Sauerstoffplasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester beschichtet. Im Anschluss wurden 4×10^5 HUVECs/ml zu den Membranen gegeben. Die Inkubation erfolgte erstmal 24 h rotierend und im Anschluss 96 h statisch im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden dann mit Calcein-AM gefärbt und mikroskopiert. Hier dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unterschiedlich modifizierter Membranen (5-fache Vergrößerung). (Canjuga, Hansen et al., 2022)

Die Beschichtung mit Endothelzellen wurde mehrfach durchgeführt und verschiedene Inkubationszeiten untersucht. In der Abbildung 16 A wird eine rotierende Inkubationszeit von 24 Stunden mit einer Inkubation von 7 Tagen (24 h rotierend + 6 Tage statisch) verglichen. Hier zeigt sich, dass sich innerhalb von 24 Stunden eine weitestgehend dichte Endothelzellschicht auf der HFM bildet, die jedoch noch Lücken aufweist. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen sind die Lücken in der Beschichtung deutlich rückläufig. Außerdem wurden Inkubationszeiten von 48 Stunden (24 h rotierend + 24 h statisch) und 5 Tagen (24 h rotierend + 4 Tage statisch) verglichen (Abbildung 16 B). Hier zeigt sich

nach 48 Stunden eine lückenlose Besiedlung der HFM mit Endothelzellen mit nur leichter Abnahme der Zelladhäsion nach 5 Tagen. Insgesamt scheint die Endothelzellschicht nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden am dichtesten zu sein.

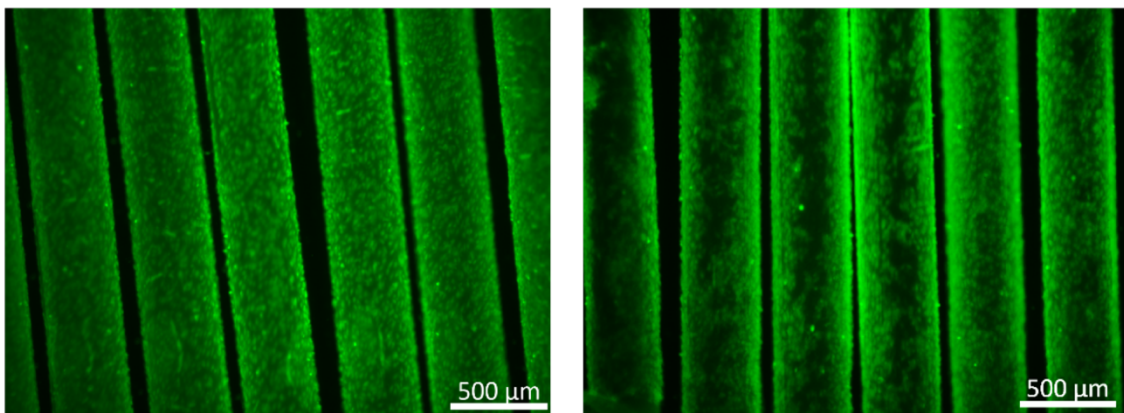
A



24 Stunden

7 Tage

B



48 Stunden

5 Tage

Abbildung 16: Endothelzellbesichtung im Verlauf der Zeit. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von endothelialisierten HFM bei A) 2,5-facher Vergrößerung bzw. B) 5-facher Vergrößerung. Für die Endothelialisierung wurden alle dargestellten HFM erstmal für 24 h unter Rotation mit den HUVECs inkubiert. Im Anschluss wurde die Inkubation für weitere 0, 1, 4 oder 6 Tage unter statischen Bedingungen fortgeführt. (Die Bildunterschrift gibt die jeweilige Inkubationsdauer an inkl. rotierender und statischer Inkubationszeit).

3.1.5 Nachweis der Zell-Zell Kontakte mittels Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Endothelialisierung einer künstlichen Oberfläche ist die Verbesserung der Hämokompatibilität wesentlich von der Integrität der gebildeten Endothelzellschicht abhängig. Daher ist es wichtig, dass sich eine konfluente Endothelzellschicht auf der HFM bildet, die die künstliche Oberfläche gänzlich bedeckt. Sobald Zellen konfluent sind, stehen sie in engem Zell-Zell Kontakt und bilden Zellverbindungen aus, die vor allem aus Zelladhäsionsmolekülen bestehen. Cadherine sind solche Zelladhäsionsmoleküle und können mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden. Hierfür wurde die endothelialisierte HFM mit einem Maus anti-human CD144 (VE-Cadherin) Antikörper inkubiert und im Anschluss mit einem zweiten fluoreszierenden Antikörper (Alexa Fluor 488 gelabelter Ziege anti-Maus IgG Antikörper). Zusätzlich wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt, sowie die Färbung des Zytoskeletts mit ActinRed. Die Abbildung 17 A zeigt bei 20-facher Vergrößerung die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von HUVECs auf einer HFM, die zuvor mit O₂-Plasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester modifiziert wurde. In der untersten Bildreihe lassen sich die Zellkerne der HUVECs deutlich in der DAPI-Färbung darstellen. In der mittleren Bildreihe zeigt sich in Grün die Expression von VE-Cadherin in den Zellmembranen. So lassen sich zwischen allen HUVECs Zell-Zell Kontakte nachweisen. Die zusammengefügte Aufnahme dient der gleichzeitigen Darstellung der Zellkerne und der ausgebildeten Zell-Zell-Kontakte. In der Abbildung 17 B wird die Endothelzellschicht auf der HFM bei 40-facher Vergrößerung dargestellt. Mit der ActinRed Färbung wird das F-Aktin des Zytoskeletts der HUVECs gefärbt und in Rot dargestellt. Insgesamt zeigen diese mikroskopischen Aufnahmen deutlich die Ausbildung eines dichten Zellrasens mit dem für Endothelzellen typischen pflastersteinartigem Phänotyp.

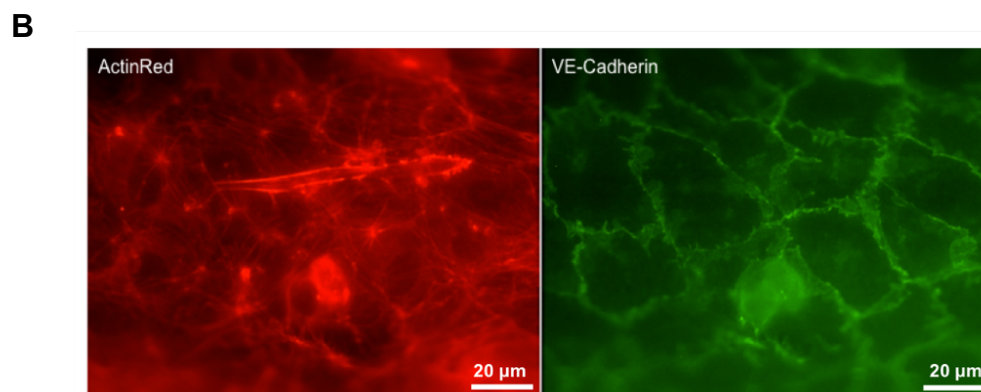
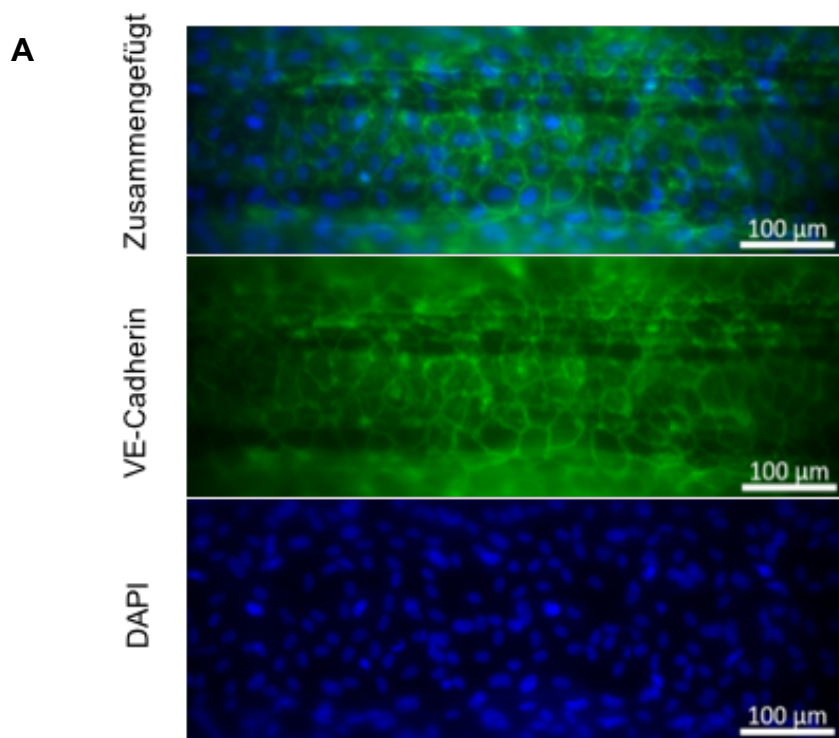


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung endothelialisierter HFM. Die PMP-HFM wurde mit Sauerstoffplasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester beschichtet. Im Anschluss wurde sie für 24 h rotierend und 24 h statisch mit 4×10^5 HUVECs/ml inkubiert. A) Zur Darstellung der Zell-Zell Kontakte auf der beschichteten HFM erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa Fluor 488 gegen VE-Cadherin. Zusätzlich erfolgte eine Zellkernfärbung mit DAPI. Die Aufnahmen wurden bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen. B) Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung mit zusätzlicher Färbung des Zytoskeletts mit Actin Red 555. (Canjuga, Hansen et al., 2022)

3.1.6 Quantifizierung der Zellbesiedlung der Membranen

Zur Quantifizierung der Zellbesiedlung der Membranen wurden die endothelialisierten Membranen mit Calcein-AM gefärbt und im Anschluss die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) im Mikroplattenleser bestimmt. Hierbei gilt, dass je mehr Zellen auf der Membran binden, desto größer ist die RFU. In der Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die DBCO-PEG₄-NHS Ester modifizierte Membranen (APTES + DBCO) mit einer RFU von 147299 ± 20757 RFU signifikant mehr Zellen aufweisen als die APTES-behandelten Membranen (APTES) mit 48232 ± 25407 RFU. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Membran, die mit HUVECs inkubiert wurde. Hier zeigte sich eine signifikant niedrigere RFU von 7391 ± 1227 RFU, sodass eine zu vernachlässigende Bindung der Zellen an die HFM angenommen werden kann. Da Calcein-AM ein Farbstoff ist, der nur vitale Zellen färbt, werden in diesem Versuch zusätzlich nur vitale Zellen auf den HFM nachgewiesen.

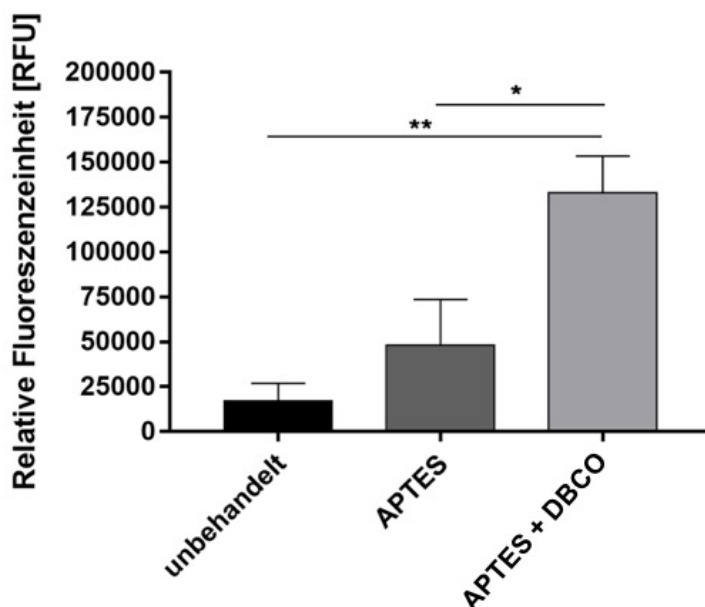


Abbildung 18: Bestimmung der Zelldichte auf HFMs nach Endothelialisierung. PMP-HFMs wurden beschichtet und mit Ac₄ManNAz behandelten HUVECs für 24 h rotierend inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen mit Calcein-AM gefärbt und die Fluoreszenz der Membranen im Mikroplattenleser gemessen. Es wurde eine Messung vor der Färbung und eine nach der

Färbung mit Calcein-AM durchgeführt. Zudem wurde die Hintergrundfluoreszenz der 6-Well Platte von den Werten abgezogen. Die Daten sind als Mittelwert + SEM (n=3) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's Test geprüft (* $p < 0,01$, ** $p < 0,001$). (Canjuga, Hansen et al., 2022)

3.2 Isolierung und Konzentrationsbestimmung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers

Für die Herstellung eines Maus anti-humanen CD31 Antikörpers wurden P2b1 Hybridomazellen kultiviert. Aus dem Zellüberstand der Hybridomazellen wurde dann der Maus anti-human CD31 Antikörper mittels Protein G Beads von Promega isoliert. Hierbei wurde untersucht, ob sich durch eine Konzentrierung des Zellüberstands oder durch eine Veränderung des Verhältnisses zwischen Protein G Beads und Zellüberstand, die Konzentration des isolierten Antikörpers erhöhen lässt. In der Abbildung 19 wird dargestellt, welche unterschiedlichen Protokolle zur Isolierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers genutzt wurden. Ein Teil des P2b1 Überstandes wurde aufkonzentriert bevor die Antikörperisolierung mit Protein G Beads erfolgte. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Mengenverhältnisse zwischen den Beads und dem Überstand verwendet (1:18 und 1:1). Aus dem restlichen Überstand wurden die Antikörper ohne vorherige Aufkonzentrierung des Überstandes isoliert und es wurde ein Beads zu Überstand Verhältnis von 1:18 gewählt.

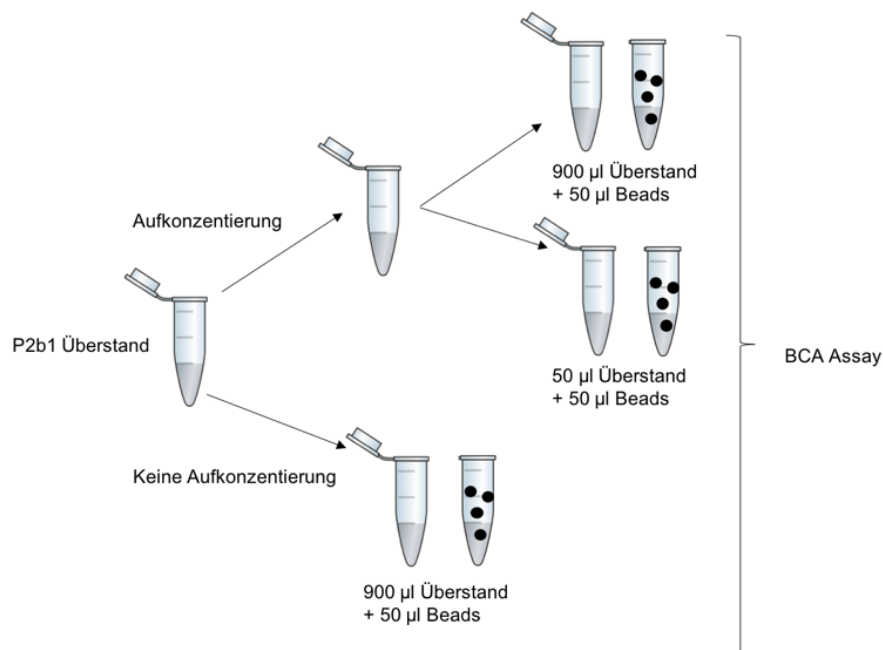


Abbildung 19: Methoden der Antikörperisolierung. In dieser Abbildung werden die unterschiedlichen Protokolle dargestellt, die zur Isolierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers verwendet wurden. Im Anschluss an die Antikörperisolierung wurde mittels BCA-Assay die Konzentration des Antikörpers bestimmt.

Die Konzentration des isolierten Antikörpers wurde im Anschluss mittels BCA-Assay bestimmt. Hierbei wurde die Extinktion der jeweiligen Proben im ELISA Reader gemessen und im Anschluss die Software ELISA Analysis verwendet, um die Antikörperkonzentration zu bestimmen. In der Tabelle 16 werden die Antikörperkonzentrationen der einzelnen Proben je nach verwendetem Protokoll dargestellt.

Tabelle 16: Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay. Darstellung der Konzentrationen unterschiedlich isolierter Antikörperproben. Die Messung der Extinktion bei 562 nm erfolgte im Eon Reader und die Auswertung anschließend mittels der ELISA Analysis Software.

Probe	Extinktion	Konzentration (mg/ml)
900 µl aufkonzentrierter Überstand	0,372	3,08
+ 50 µl Beads	0,324	3,48
	0,473	3,96
50 µl aufkonzentrierter Überstand	0,183	0,56
+ 50 µl Beads	0,108	0,4
900 µl nicht aufkonzentrierter Überstand	0,129	0,13
+ 50 µl Beads		

Anhand der Tabelle 16 lässt sich feststellen, dass die höchste Antikörperkonzentration nach vorheriger Aufkonzentrierung des Überstandes, sowie unter Verwendung von 900 µl Zellkulturüberstand mit 50 µl Beads erreicht wurde.

3.3 Nachweis des Maus anti-human CD31 Antikörpers mittels Durchflusszytometrie

Endothelzellen tragen als spezifischen Endothelzellmarker das Oberflächenmerkmal CD31. Mit der Durchflusszytometrie sollte gezeigt werden, dass der isolierte Maus anti-human CD31 Antikörper spezifisch an das CD31 der HUVECs binden kann. Hierfür wurden 1×10^5 HUVECs mit 2 µg/ml des generierten Antikörpers für 30 min in 4% BSA in PBS inkubiert. Im Anschluss erfolge die Inkubation mit einem fluoreszierenden anti-Maus IgG-PE Sekundärantikörper. Als Kontrolle dienten ungefärbte HUVECs und HUVECs, die nur mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus IgG-PE) inkubiert wurden. Letzteres diente dem Ausschluss einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers

an die Zellen. In der Abbildung 20 wird gezeigt, dass der Sekundärantikörper nur in der Lage war, an HUVECs zu binden, die zuvor mit dem isolierten Maus anti-human CD31 Antikörper inkubiert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen ergab $98,03 \pm 1,0$ % PE-positive Zellen (Abbildung 20 A) mit einem geoMFI von $2340 \pm 424,1$ (Abbildung 20 B). Im Vergleich hierzu, zeigte die IgG-PE-Kontrolle mit $2,8 \pm 1,1$ % positiven Zellen und einem GeoMFI von $9,31 \pm 3165$ ein signifikant schwächeres Signal.

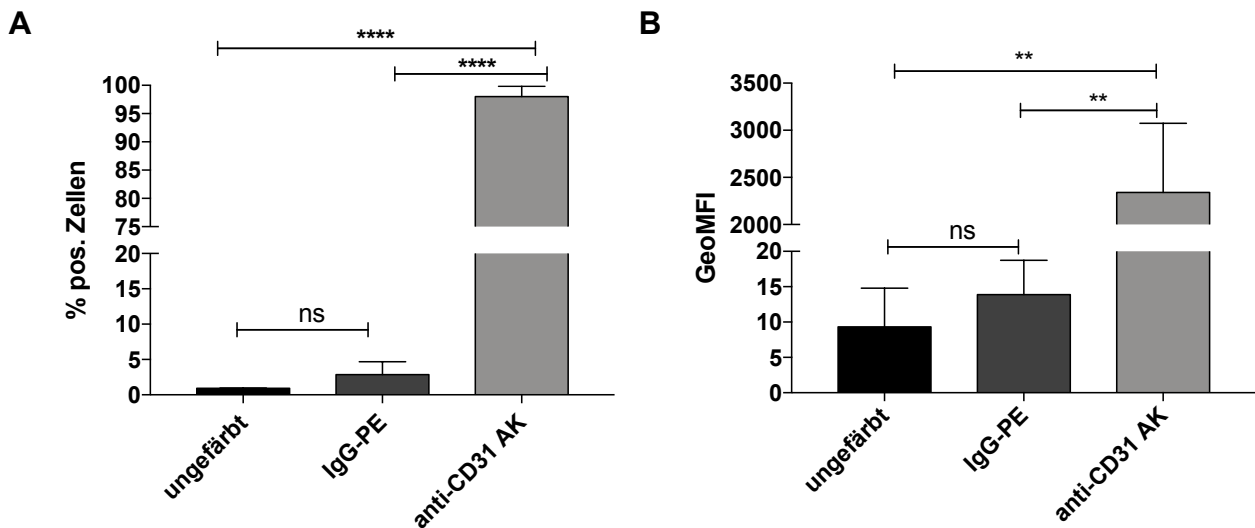


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des isolierten Maus anti-human CD31 Antikörpers an HUVECs. Hierbei wurden HUVECs mit dem isolierten Antikörper (anti-CD31 AK) und im Anschluss mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper (IgG-PE) inkubiert. A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen, der mit dem PE Farbstoff markiert wurde. B) In dieser Graphik wird die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben aufgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert + SEM (n=3) dargestellt. Die statistische Analyse wurde mittels One-way ANOVA und anschließendem Tukey's multiple comparisons Test durchgeführt.

3.4 Azidfunktionalisierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers

Um den Maus anti-human CD31 Antikörper mittels kupferfreier Click-Chemie, an die PMP-HFM binden zu können, muss dieser Azidgruppen tragen. In diesem einmalig durchgeführten Vorversuch wurde untersucht, ob mit dem SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit von ThermoFisher eine Azidfunktionalisierung des selbst isolierten Antikörpers erreicht werden kann. Zuvor wurde festgestellt, dass nach Verwendung des Kits ein Großteil des Antikörpers verloren ging. Zur Überprüfung der Azidfunktionalisierung des Maus anti-human CD31 Antikörpers

wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^5 HUVECs mit $2 \mu\text{g/ml}$ des Azid-gelabelten anti-CD31 Antikörpers für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden $5 \mu\text{M}$ DBCO-Cy3 in PBS mit $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ für 1 h im Brutschrank mit den Proben inkubiert.

Die Abbildung 21 A zeigt, dass der Farbstoff DBCO-Cy3 10,5 % der unbehandelten HUVECs färbt. Die HUVECs, die mit dem Azid-gelabelten Antikörper inkubiert wurden (HUVECs + Anti-CD31-Azid-AK), wurden zu 12,1 % gefärbt. Zudem scheint es in der Abbildung 21 B keinen Unterschied in der Fluoreszenz der Zellen zu geben: GeoMFI von 38,0 (HUVECS + Anti-CD31 Azid-AK + DBCO-Cy3) im Vergleich zu einem GeoMFI von 35,5 (HUVECs + DBCO-Cy3). Insgesamt scheinen die unbehandelten HUVECs und die HUVECs + Azid-AK sich nicht signifikant, in ihrem Färbeverhalten mit DBCO-Cy3 zu unterscheiden. Die Click-Chemie Reaktion zwischen der Azid-Gruppe des Antikörpers und dem Farbstoff DBCO-Cy3 scheint nicht stattgefunden zu haben. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Funktionalisierung des Antikörpers mit Azidgruppen nicht erfolgreich war.

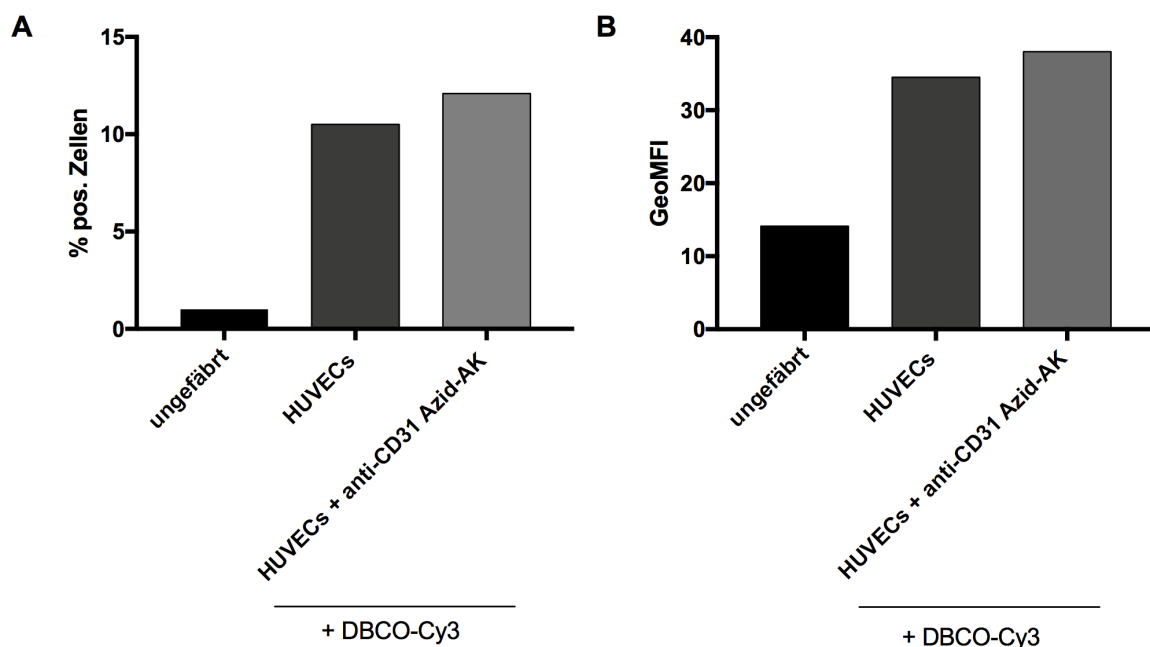


Abbildung 21: Nachweis von Azidgruppen auf dem anti-CD31 Antikörper nach Anwendung des SiteClick™ Antibody Azido Modification Kit. Hierfür wurden HUVECs mit dem Azid-gelabelten CD31 Antikörper und im Anschluss mit DBCO-S-Cy3 inkubiert (HUVECs + anti-CD31 Azid-AK).

Als Kontrolle dienten HUVECs, die ausschließlich mit dem Farbstoff DBCO-S-Cy3 inkubiert wurden (HUVECs). Ungefärbte Zellen (ungefärbt) wurden weder mit dem Primärantikörper noch mit DBCO-S-Cy3 behandelt. A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen, der sich als positiv für den Farbstoff Cy3 erwiesen hat. B) Darstellung der Fluoreszenzintensität der Zellen. Die Werte stammen aus einem Versuch (n=1).

4 Diskussion

Die Anzahl der ECMO-Einsätze ist im Verlauf der Jahre stetig gestiegen, sodass die ECMO mittlerweile zu einer gängigen Therapiemethode in der Intensivmedizin zählt (Ratnani et al., 2018). In der Tat konnte gezeigt werden, dass durch die ECMO-Therapie die Mortalität von Patienten mit einem ARDS reduziert werden kann (Combes et al., 2020). Auch für Patienten mit kardiogenem Schock ermöglicht die ECMO (VA-ECMO) eine Verbesserung der Überlebensrate (Bréchet et al., 2020, Weiner et al., 2020, Aad et al., 2013). Somit ist die ECMO eine effektive Therapie für schwer kranke Patienten mit Herz- und/oder Lungenversagen. Nichtsdestotrotz kann der Einsatz der ECMO mit erheblichen Komplikationen verbunden sein und auch die Anwendungsdauer ist aktuell noch begrenzt. Um in Zukunft eine vermehrte Anwendbarkeit dieser potentiell lebensrettenden Therapie zu ermöglichen, braucht es daher eine Reduktion der Komplikationsraten und eine Verlängerung der möglichen Anwendungsdauer.

Heutzutage wird versucht dies über die Veränderung der blutkontaktierenden Oberflächen der ECMO, insbesondere der Oxygenatormembran, zu erreichen. Membranoxygenatoren bestehen oftmals aus PMP- oder PP-Hohlfasermembranen. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden ausschließlich PMP-Hohlfasermembranen (PMP-HFM) verwendet, da diese im Vergleich zu PP-HFM leistungsfähiger sind. Zumal PMP-HFMs dicht und daher nicht anfällig für Plasma-Leakage sind (Lim, 2006). Im Vergleich zu PP-HFM müssen PMP-HFM seltener gewechselt werden und deren Verwendung führte zu einer geringeren Mortalität bei Patienten mit ARDS, die jedoch nicht statistisch signifikant war (Robak et al., 2014). Khoshbin et al. zeigten, dass Oxygenatoren aus PMP im Vergleich zu Oxygenatoren aus Silikon eine geringere inflammatorische Reaktion verursachten (Khoshbin et al., 2007). Daher werden

heute insbesondere Oxygenatoren mit Hohlfasermembranen aus PMP verwendet (Syed et al., 2021, Hayes et al., 2021). Zudem konnte gezeigt werden, dass PMP-HFM das Wachstum von Endothelzellen besser unterstützen als Hohlfasermembranen aus PP (Zwirner et al., 2018).

Die Endothelialisierung stellt eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der Hämokompatibilität von Oxygenatormembranen dar. Nach Wiegmann et al. sollte die Endothelzellschicht auf einer Oxygenatormembran folgende Eigenschaften erfüllen: 1.) Die Endothelzellen, müssen auf der künstlichen Oberfläche ihren physiologischen Phänotyp beibehalten 2.) Die Endothelialisierung soll eine Leukozyten- und Thrombozytenaggregation verhindern 3.) Die Endothelzellschicht muss unter Flussbedingungen und in Anwesenheit eines Gasflusses bestehen bleiben, um einen längerfristigen Einsatz zu gewährleisten (Wiegmann et al., 2016). Zudem dürfen die Endothelzellen nicht die Funktion der Oxygenatormembran beeinträchtigen, d.h. der Gasaustausch darf durch die Endothelzellschicht nicht eingeschränkt werden. Dies wurde in mehreren Arbeiten untersucht, da die Erhöhung der Diffusionsstrecke durch die Endothelzellen eine Reduktion des Gasaustausches vermuten ließ. Jedoch konnte durch Bestimmung der pO_2 Konzentration im Blut nach Oxygenierung durch endothelialisierte und nicht endothelialisierte Oxygenatormembranen gezeigt werden, dass das Monolayer aus Endothelzellen keinen signifikanten Einfluss auf den O_2 - und CO_2 -Transfer hatte (Polk et al., 2010). Dieses Ergebnis wird auch von Hess et al. (2010a) bestätigt, die den Gastransfer durch eine endothelialisierte und eine nicht endothelialisierte PMP-Membran gemessen haben. Andererseits deutet die Arbeit von Klein et al. (2020) darauf hin, dass die Oxygenierung des Blutes durch die endothelialisierte Membran zwar möglich ist, die Sauerstoff- und CO_2 -Transferraten mit der Zeit jedoch abnehmen. Neben der Frage des Gasaustausches, darf die potentiell toxische Wirkung von reinem Sauerstoff auf Zellen nicht außer Acht gelassen werden. Aus diesem Grund testeten Plein et al. eine Behandlung von HUVECs mit N-Acetylcystein und zeigten, dass diese deutlich resistenter gegen den Einfluss von Sauerstoffradikalen wurden (Plein et al., 2017). In Bezug auf das Beibehalten eines physiologischen Phänotyps von Endothelzellen auf

künstlichen Oberflächen ergaben qRT-PCR Untersuchungen von Pflaum et al. und Zwirner et al., dass die Zellen nach ihrer Aussaat auf Hohlfasermembranen keine erhöhte Expression von Markern der Zellaktivierung, wie beispielweise VCAM und E-Selectin aufwiesen (Pflaum et al., 2017, Zwirner et al., 2018). Im Vergleich hierzu wiesen Canjuga et al. sogar erniedrigte VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin Spiegel nach Aussaat der Endothelzellen auf die HFM und Inkubation mit humanem Blut auf (Canjuga et al., 2022). Zudem ließen sich die Zellen weiterhin durch physiologische Stimuli, wie $TNF\alpha$, aktivieren (Wiegmann et al., 2016, Zwirner et al., 2018). Auch mit dem hier dargestellten Endothelialisierungsprotokoll ließ sich diese Beobachtung bestätigen. Die Endothelzellen reagierten nach Aussaat auf die HFM und Behandlung mit $TNF\alpha$ weiterhin mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 (Canjuga et al., 2022). Da die Zellen in einem inaktivierten und daher antithrombogenen und anti-inflammatorischem Zustand verbleiben, kann auch die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten vermieden werden. Studien kamen zu dem Schluss, dass die Endothelialisierung die Adhäsion von Thrombozyten an die Oxygenatormembran reduziert (Polk et al., 2010, Hess et al., 2010b). Hess et al. inkubierten endothelialisierte PMP-Membranen mit Thrombozyten. Hierbei konnte eine signifikante Verringerung der Thrombozytenadhäsion an endothelialisierte Membranen im Vergleich zu unbeschichteten Membranen gezeigt werden. Auch nach Stimulation der Zellen mit $TNF\alpha$ war die Thrombozytenadhäsion auf endothelialisierten Membranen weiterhin geringer. Dies wird durch eine Verringerung der inflammatorischen Reaktion, die normalerweise durch Fremdmaterialien ausgelöst werden, erklärt. Auch trugen unbehandelte PMP-Folien, sowie endothelialisierte PMP-Folien vergleichbar wenige Plättchen pro Quadratmillimeter, wie eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflaum et al. darstellte (Pflaum et al., 2017). Des Weiteren zeigten Canjuga et al., dass nach Inkubation der endothelialisierten HFM mit Blut kein wesentlicher Verbrauch von Thrombozyten stattfand. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl aktivierter Thrombozyten auf der endothelialisierten HFM und einer Blutprobe (Negativkontrolle) festgestellt werden (Canjuga et al., 2022).

Abhängig von der Indikation für einen ECMO-Einsatz kann sich die benötigte Anwendungsdauer stark unterscheiden. So berichteten beispielsweise Nelson-McMillan et al. von einem 7-jährigen Kind, welches nach einem Inhalationstrauma für 20 Monate durch eine ECMO unterstützt wurde (Nelson-McMillan et al., 2020). Aus diesem Grund ist es essentiell, Beschichtungen zu entwickeln, die auch über eine längere Zeitspanne stabil bleiben. Die Beschichtung von PDMS (Polydimethylsiloxan)-Membranen durch Klein et al. mit der RGD-Sequenz (Arginin, Glycin und Asparaginsäure) und HUVECs blieb über eine Zeitspanne von 33 Tagen unter physiologischen Scherbedingung stabil und zusätzlich exprimierten die HUVECs nach dieser Zeit weiterhin einen endothelialen Phänotyp (Klein et al., 2020). Zwirner et al., Wiegmann et al. und Hess et al. modifizierten HFMs allesamt mit einer Heparin- und Albuminbeschichtung, um die Endothelialisierung zu fördern (Zwirner et al., 2018, Wiegmann et al., 2016, Hess et al., 2010a). Die Arbeitsgruppen stellten hier jedoch fest, dass diese Beschichtung sich mit der Zeit abnutzt und kamen zu dem Schluss, dass neue, stabilere Beschichtungsmethoden notwendig sind. Es konnte bereits die erfolgreiche Endothelialisierung von PMP-HFM nach Oberflächenmodifizierung mit Titaniumdioxid nachgewiesen werden. Es entstand hierbei ein vitales Zellmonolayer mit Ausbildung von Zell-Zell Kontakten (Pflaum et al., 2017). Auch gelang der Arbeitsgruppe von Cornelissen et al. die Endothelialisierung von Oxygenatormembranen nach vorheriger Oberflächenbeschichtung mit Fibronectin. Allerdings entstand eine konfluente Zellschicht ausschließlich auf der PDMS-Membran und diese blieb lediglich über vier Tage bestehen. Andere Oberflächenbeschichtungen mit Gelatine und Kollagen IV waren nicht in der Lage die Ausbildung einer konfluenten Endothelzellschicht zu unterstützen (Cornelissen et al., 2013).

Die zuvor aufgeführten Methoden der Endothelialisierung haben allesamt den Nachteil, dass sie nicht spezifisch für Endothelzellen sind. Im Gegensatz dazu ist die Endothelialisierung mittels kupferfreier Click-Chemie spezifisch für Zellen, die Azidgruppen exprimieren. Diese Gruppen sind physiologischerweise nicht vorhanden, weshalb eine ungewollte Kreuzreaktion vermieden wird. Weiterer Vorteil ist die kovalente Bindung der Zellen an die HFM. Zusätzlich werden

APTES und auch DBCO-PEG₄-NHS Ester kovalent an die künstliche Oberfläche gebunden. Insofern ist von einer stabilen Oberflächenmodifizierung und dadurch langlebigen Beschichtung auszugehen im Vergleich zu einer rein physikalischen Beschichtung mit Heparin und Albumin. In Bezug auf die Haltbarkeit der Endothelzellschicht in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Endothelzellschicht über mindestens 7 Tage unter statischen Bedingungen stabil blieb.

Neben der Haltbarkeit der Endothelzellschicht sind auch die Bestandteile der Beschichtung relevant. Es ist von Nachteil, wenn die Beschichtung, die die Adhäsion von Endothelzellen fördern soll, zusätzlich auch thrombogen ist, da bei Schädigung der Endothelzellschicht die Gerinnungsneigung der künstlichen Oberfläche gesteigert werden kann. Beispielweise ist bekannt, dass Fibronectin eine Rolle in der Aggregation von Thrombozyten und in der Thrombusbildung spielt (CHO and MOSHER, 2006). Darüber hinaus kann Heparin eine „Heparin induzierte Thrombozytopenie“ (HIT) auslösen, welche gravierende Folgen für den Patienten haben kann. Neben der Heparinisierung während der ECMO wird auch der Einfluss der Heparinbeschichtung der ECMO-Bestandteile als Auslöser einer HIT diskutiert (Pappalardo et al., 2009, Steinlechner et al., 2021). Der Fallbericht von Steinlechner et al. beschreibt den klinischen Verlauf einer Patientin, die eine HIT unter ECMO-Therapie entwickelte, obwohl die Antikoagulation mit Argatroban statt mit Heparin erfolgte. Die Arbeitsgruppe äußerte demnach den Verdacht, dass die Heparinbeschichtung der ECMO-Bestandteile Auslöser der HIT war. Zumal sich die Thrombozytenzahl nach Ausbau der ECMO wieder erholte (Steinlechner et al., 2021). In einer weiteren Arbeit wurden Dacron-Gefäßprothesen mit und ohne Heparinbeschichtung in Bezug auf ihren Einfluss auf die Bildung von Antikörpern gegen den Heparin-Plättchenfaktor-4 Komplex untersucht (Mureebe et al., 2007). Hierbei stellen die Autoren fest, dass die Heparinbeschichtung die Bildung dieser Antikörper förderte. Durch die Verwendung einer Beschichtung ohne Heparin kann das Risiko einer HIT vermieden werden.

4.1 Etablierung eines Protokolls zur *in vitro* Endothelialisierung von Hohlfasermembranen

4.1.1 Oberflächenmodifizierung von PMP-Hohlfasermembranen

Der erste Schritt der Oberflächenmodifizierung in unserem Protokoll war die Generierung von reaktiven -OH Gruppen. Hierfür wurde eine Plasmabehandlung durchgeführt, die eine einfache und effektive Methode zur Oberflächenmodifizierung ist. Sie ermöglicht die Reinigung von Oberflächen, sowie die Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit und der chemischen Eigenschaften. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass sich durch eine Plasmabehandlung die Biokompatibilität verbessern lässt, wodurch dieses Verfahren auch für medizinische Produkte von großem Interesse ist (Recek, 2019, Michaljaničová et al., 2014). Zudem wurde demonstriert, dass dieses Verfahren auch bei Oxygenatormembranen eingesetzt werden kann, die häufig aus PMP bestehen, denn obwohl es sich um ein sehr resistentes Material handelt, lassen sich ihre Oberflächeneigenschaften durch die Behandlung mit Plasma verändern (Michaljaničová et al., 2014). Durch die Verwendung von Sauerstoffplasma wird die Konzentration von Sauerstoffatomen auf der Oberfläche, sowie die Hydrophilie der PMP-HFM erhöht. In dieser Arbeit konnte auf die Einführung ausreichender Hydroxylgruppen geschlossen werden, da die anschließende Silanisierung APTES erfolgreich war. Zudem zeigte sich die erwartete Steigerung der Hydrophilie durch die vereinfachte Benetzung mit Wasser nach der Sauerstoffplasmabehandlung. Je nach Behandlungsdauer mit Sauerstoffplasma, ist es möglich, dass das behandelte Material beschädigt wird und eine Plasma Leckage gefördert wird. Daher testeten Huang et al. mehrere Behandlungszeiten mit O₂-Plasma bei 100 W und machten im Anschluss rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der PMP-HFM, zumal hier die optimale Behandlungszeit 2 min Betrag (Huang et al., 2016b). In dieser Arbeit wurde die Plasmabehandlung für 30 min durchgeführt. Um auszuschließen, dass durch die Oberflächenmodifizierung in dieser Arbeit die PMP-HFM beschädigt werden, wurden in einer Folgearbeit elektronenmikroskopische Aufnahmen der HFM (APTES, APTES + DBCO-PEG₄-NHS Ester und unbehandelt) gemacht. Hierbei konnten keine strukturellen Unterschiede zwischen den Plasma-behandelte und unbehandelten HFM-Oberflächen festgestellt werden. Außerdem konnte keine Leckage nach Inkubation der HFM mit einer

Toluidinblaulösung unter Druck detektiert werden (Canjuga et al., 2022). Alternativ könnten auch andere Methoden zur Einführung von -OH Gruppen verwendet werden. Beispielsweise zeigten Jang et al., dass NaOH verwendet werden kann, um die Hydrophilität von Titanplättchen zu erhöhen. Hierdurch konnte die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten gefördert werden (Jiang et al., 2019). Allerdings bietet die O₂-Plasmabehandlung den Vorteil, dass die Kerneigenschaften des Materials nicht beeinflusst werden. Im Gegensatz hierzu konnten Donate et al. nachweisen, dass PLA- (engl. polylactic acid) Gerüste nach Verwendung von NaOH an Masse verloren und poröser wurden. Außerdem ließ sich in ihrer Arbeit der Wasserkontaktwinkel effektiver durch Plasmabehandlung reduzieren als durch NaOH Behandlung. Zusätzlich halten die Autoren fest, dass bei der Plasmabehandlung Sauerstoffatome vornehmlich als Hydroxylgruppen eingeführt wurden und nicht wie bei NaOH als Carboxylgruppen (Donate et al., 2021).

Die Einführung von Hydroxylgruppen ermöglichte in einem nächsten Schritt die Beschichtung der PMP-HFM mit dem Aminosilan APTES, wobei Aminogruppen generiert wurden. Damit diese für weitere Reaktionsschritte verfügbar sind, muss sich ein Monolayer aus Silanmolekülen bilden und die Aminogruppen von der PMP-Membran weg gerichtet sein. Hier ist die Auswahl der richtigen Konzentration von APTES, des richtigen Lösungsmittels und der richtigen Inkubationszeit essentiell. Diese Parameter beeinflussen wesentlich die Art der APTES-Bindung an das Substrat (Vashist et al., 2014). Neben anderen Arbeitsgruppen (Solouk et al., 2011, Acres et al., 2012) definierten Zhu et al. folgende Punkte, die für die Bildung einer glatten Aminosilanoberfläche zu beachten sind (Zhu et al., 2012): 1.) Nutzung wasserfreier Lösungsmittel, 2.) geringe Silankonzentration, um die Bildung von Oligomeren und Polymeren in der Lösung zu verhindern, 3.) Waschen der Substrate nach Silanisierung, um schwach gebundene Silane zu entfernen und die Hydrolyse übriger Alkoxy-Moleküle zu fördern, 5.) Trocknen der Substrate bei hohen Temperaturen (z.B. 110°), um die Bildung von Siloxanverbindungen zu fördern und die Ammoniumionen in reaktivere Aminogruppen umzuwandeln. Vandenberg et al. zeigten, dass sich ein Silanmonolayer bildet, wenn die Reaktionszeit im

Lösungsmittel weniger als eine Stunde beträgt (Vandenberg et al., 1991). Zusätzlich konnten Wang et al. (Wang et al., 2006), wie auch Guha Thakurta und Subramanian (Guha Thakurta and Subramanian, 2012) nachweisen, dass eine APTES Konzentration von 2 % ideal ist, um weitere Funktionalisierungsschritte vorzunehmen. Daher wurden in dieser Arbeit 2 % APTES in Toluol verwendet und eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten. Unter Verwendung dieser Parameter konnten Aminogruppen nach der Silanisierung nachgewiesen und die weiteren Beschichtungsschritte erfolgreich durchgeführt werden. Zusätzlich wurden anfangs APTES-Konzentrationen von 5 % und 8 % mit Inkubationszeiten von 2 h und 24 h getestet. Hier konnten zwar auch Aminogruppen auf der Membran nachgewiesen werden, allerdings blieb die weitere Beschichtung der Membranoberfläche erfolglos. Möglicherweise entstand durch die Verwendung höherer APTES Konzentrationen ein Multilayer auf der PMP-HFM (Gunda et al., 2014). Hierbei sind die Aminogruppen nicht einzeln von der HFM weg gerichtet und daher nicht für weitere Reaktionsschritte verfügbar. In dieser Arbeit wurde zum Nachweis der eingeführten Aminogruppen eine Methylorangegefärbung durchgeführt. Der Überstand der APTES behandelten PMP-HFM nach Methylorangegefärbung und Desorption mit NaOH wies eine deutlich höhere Extinktion auf, womit auf die Bindung des Farbstoffes geschlossen werden konnte. Da Methylorange an $-NH_2$ Gruppen bindet, heißt dies im Umkehrschluss, dass die Beschichtung mit APTES erfolgreich war. Nach der Inkubation mit APTES wurden die Membranen in Toluol (100%), Methanol/Toluol (1:1) und Methanol (100%) im Ultraschallbad gewaschen (Guha Thakurta and Subramanian, 2012), um ungebundenes APTES zu entfernen. Zusätzlich wurden die HFMs nach Silanisierung getrocknet, da hierdurch die Bildung von Siloxanverbindungen weiter gefördert wird und die Reaktivität der Ammoniumione gesteigert wird (Vashist et al., 2014).

Als letzter Schritt der Oberflächenmodifizierung der PMP-HFM, wurden diese mit einem Cyclooctyn behandelt, um eine Kohlenstoff-Kohlenstoff Dreifachbindung einzuführen. Für die Bindung von DBCO an die HFM wurde eine NHS Ester-Reaktion durchgeführt. NHS Ester werden oft zur Konjugation an Aminogruppen verwendet, da die Reaktion schnell und unter milden

Bedingungen (Raumtemperatur) abläuft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ursprünglich DBCO-S-NHS Ester verwendet, welches ein Succinimidylester mit Cyclooctyn-Derivat ist. Es konnte jedoch mit DBCO-S-NHS Ester keine Endothelialisierung der Membranen erreicht werden. Am ehesten war die Seitenkette von DBCO-S-NHS zu kurz, sodass sich die Kohlenstoff-Kohlenstoff Dreifachbindung nicht adäquat von der Membran weg richten konnte. Daher wurde für weitere Versuche DBCO-PEG₄-NHS Ester verwendet, welches gut in Wasser löslich, biokompatibel und durch die lange Seitenkette besser für weitere Reaktionen verfügbar ist. Für den Nachweis von DBCO-PEG₄-NHS Ester wurde eine Färbung mit Azid-Cy3 durchgeführt und im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht, sowie die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Proben gemessen. Es zeigte sich, dass die Click-Chemie Reaktion erfolgreich zwischen der „APTES + DBCO“ Membran und der Azid-Gruppe des Farbstoffes ablaufen konnte, da diese Membran deutlich fluoreszierte. In der Arbeit von Li et al. wurde auch die Reaktion zwischen Alkinen und Aziden verwendet, um die erfolgreiche Funktionalisierung von EPCs mit einer Azid-Gruppe nachzuweisen. Hierzu wurden EPCs mit Az-PEG-CD34 inkubiert und im Anschluss eine Färbung mit dem Alkin gekoppeltem Farbstoff Alexa Fluor 647 DIBO durchgeführt (Li et al., 2018).

4.1.2 In vitro Endothelialisierung von PMP-Hohlfasermembranen

Neben der Oberflächenmodifizierung der PMP-HFM wurden auch die HUVECs modifiziert, sodass diese in der Lage sind an die HFM zu binden. Hierzu wurden Azidgruppen auf der Oberfläche der HUVECs durch metabolisches „Glycoengineering“ generiert. Gleichermäßen nutzten Mao et al. diese Methode, um N₃-positive (N₃: Azid) Makrophagen zu generieren, die an ein DBCO-modifiziertes Polymer binden können (Mao et al., 2020). Azidozucker sind Zucker, die mit Azidgruppen markiert wurden und die vor allem für *in vivo* metabolische Markierungen genutzt werden. Beispielsweise können Alkine, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wurden, über die kupferfreie Click-Chemie an Azidgruppen auf Zelloberflächen binden, sodass diese fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden können. In unserer Arbeit nutzten

wir den Azidozucker Ac₄ManNAz. Eine zusätzlich durchgeführte durchflusszytometrische Messung deutete darauf hin, dass die Azidexpression durch eine Steigerung der Ac₄ManNAz-Konzentration von 50 µM auf 100 µM nicht erhöht wird. Gleichwohl testeten Yoon et al. in ihrer Arbeit unterschiedliche ManNAz Konzentrationen und erreichten auch mit 50 µM die besten Ergebnisse (Yoon et al., 2017). Im Gegensatz hierzu empfehlen Han et al. die Verwendung von 10 µM Ac₄ManNAz (Han et al., 2017). Die Inkubationszeit der HUVECs mit Ac₄ManNAz betrug in dieser Arbeit nur 48 h im Vergleich zu einer Inkubationszeit von drei Tagen in anderen Arbeiten (Ning et al., 2008, Agard et al., 2004). In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass trotz einer verkürzten Inkubationszeit die HUVECs gleichermaßen Azidgruppen an ihrer Oberfläche tragen. Zusätzlich demonstrierten Canjuga et al., dass die Viabilität der HUVECs nicht durch die Behandlung mit Ac₄ManNAz beeinträchtigt wird (Canjuga et al., 2022). Der Nachweis der erfolgreichen Modifizierung der HUVECs erfolgte mikroskopisch und durchflusszytometrisch über die Färbung der Zellen mit DBCO-S-Cy3. Gleichermaßen zeigten Spiciarich et al. durch die Färbung mit einem Alkinderivat (DIBAC-647), dass die Behandlung mit dem Azidozucker erfolgreich war und der Farbstoff spezifisch an Azidgruppen gebunden hat (Spiciarich et al., 2017). Passend zu unseren Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigten auch Agard et al., dass Zellen, die mit dem Azidozucker behandelt wurden, eine erhöhte Fluoreszenz aufwiesen nachdem sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC-Avidin) und einem Biotin gekoppeltem Cycloocytin behandelt wurden (Agard et al., 2004). Zudem konnte keine wesentliche unspezifische Bindung des Farbstoffes an Zellen ohne Azidgruppe festgestellt werden. Die Inkubation der Azid-modifizierten HUVECs mit den DBCO-modifizierten HFMs erfolgte teilweise rotierend, da diese Inkubationsmethode mit einer höheren Besiedlungsdichte von Stents mit Endothelzellen in Verbindung gebracht worden ist (Tang et al., 2008, Avci-Adali et al., 2013, Hsu et al., 2005). In unseren Versuchen konnte diese Feststellung bestätigt werden, da unter rein statischen Inkubationsbedingungen keine zufriedenstellende Endothelialisierung realisiert werden konnte. So verwendeten auch Zwirner et al. ein Protokoll mit 24 h Rotation mit 1 rpm, um ihre HFMs zu

endothelialisieren (Zwirner et al., 2018). Die rotierende Inkubation ermöglicht eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium und daher eine homogene Endothelialisierung der HFM. Die weitere Inkubation erfolgte statisch, um das Zellwachstum und die Adhärenz der Zellen zu fördern. Mit Hilfe mikroskopischer Aufnahmen wurde die Bindung der HUVECs an die HFM dargestellt. Hierbei wurde gezeigt, dass die Ac₄ManNAz-behandelten HUVECs spezifisch an HFMs binden, die mit DBCO funktionalisiert wurden. Da die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie mit Calcein-AM gefärbt wurden, konnte zusätzlich demonstriert werden, dass die Zellen nach der Bindung an die HFM weiterhin vital bleiben. In einem zweiten Schritt wurde mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen VE-Cadherin die Bildung von Zell-Zell Kontakten nachgewiesen. Durch diese Methode kann effektiv die Bildung einer konfluenten Endothelzellschicht nachgewiesen werden, da die Beurteilung der Konfluenz beispielsweise durch eine einfache lichtmikroskopische Untersuchung nicht möglich ist (Esch et al., 2011). VE-Cadherine sind wesentliche Bestandteile von endothelialen Zell-Zell Verbindungen und spielen daher eine wichtige Rolle für die endotheliale Integrität, sowie für die interzelluläre Signaltransmission, die unter anderem das Zellwachstum und die Zellpolarität bestimmt. Dies demonstrierten beispielweise Corada et al., die mit einem Antikörper die Funktion von VE-Cadherin blockierten. Dies führte im Mausmodell zu schweren Schäden insbesondere in Herz und Lungen mit Ausbildung von interstitiellen Ödemen und Hämorrhagien (Corada et al., 1999). Das Vorhandensein von normal geformten VE-Cadherin Kontakten auf den endothelialisierten Membranen spricht somit für ein intaktes Zellmonolayer, welches einem thrombotischen und inflammatorischen Zellphänotyp entgegenwirkt.

Zur kolorimetrischen Zellquantifizierung der adhärennten Zellen an der PMP-HFM wurden die Zellen mit Calcein-AM gefärbt und dann die RFU (Relative Fluoreszenzeinheiten) gemessen. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Membranen bestätigte, dass eine höhere RFU tatsächlich mit einer höheren Zellzahl korreliert.

Bei der Verwendung von HUVECs als Zellquelle für eine Endothelialisierung müssen jedoch folgende Punkte beachtet werden. Einerseits sind HUVECs

primäre Endothelzellen, die je nach Spender unterschiedliche Eigenschaften z.B. Wachstumseigenschaften aufweisen können. Andererseits können sie nicht endlos proliferieren (Kono et al., 2016). Die Verwendung von primären Endothelzellen mit limitierter Proliferationskapazität ist insbesondere ein Problem, da die Oxygenatormembran eine sehr große Fläche von ca. 2 m² besitzt, die es zu besiedeln gilt. Eine vielversprechende alternative Zellquelle für die Endothelialisierung von Oxygenatormembranen sind iPSC (humaninduzierte pluripotente Stammzellen)-Endothelzellen. Diese Zellen haben keine Einschränkung in Bezug auf ihre Proliferation und sie können autolog oder auch immunkompatibel durch HLA Editierung generiert werden. Außerdem wurde bereits demonstriert, dass sich diese Zellen eignen, um Fibronectin beschichtete HFMs zu endothelialisieren (Pflaum et al., 2021). An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass auch der Mangel von HLA Markern eine immunologische Reaktion auslösen kann. In der Tat werden Zellen ohne HLA Marker durch NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) erkannt und eliminiert.

Die Untersuchung der Hämokompatibilität der mittels kupferfreier Click-Chemie endothelialisierten HFM erfolgte in der weiterführenden Arbeit von Canjuga et al. Durch die Endothelialisierung kommt es zu einer geringeren Aktivierung der Gerinnung. In der Tat unterscheidet sich die Expression von β -Thromboglobulin und TAT (Thrombin-Antithrombin III Komplex) auf den endothelialisierten Membranen und auf den Kontrollmembranen nicht. Auch elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die Endothelialisierung deutlich die Ausbildung eines Fibrinnetzes auf den HFM nach Kontakt mit humanem Blut reduzierte (Canjuga et al., 2022).

4.2 Endothelialisierung von Hohlfasermembranen mittels eines Maus anti-human CD31 Antikörpers

4.2.1 Herstellung eines Maus anti-human CD31 Antikörpers

In dieser Arbeit wurden erste Versuche durchgeführt, um die Entwicklung einer Beschichtung mit Antikörpern unter Verwendung der Click-Chemie voranzutreiben. Diese Beschichtung soll in Zukunft eine *in vivo*

Selbstendothelialisierung der HFM ermöglichen. Hierzu wurden Antikörper produziert, die sich gegen Endothelzellen (HUVECs) richten. Im Anschluss sollten diese mit einer Azidgruppe funktionalisiert werden, um sie mittels kupferfreier Click-Chemie an PMP-HFMs zu binden.

Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche unterschiedliche Moleküle, anhand denen Zellen spezifisch erkannt bzw. markiert werden können. Endothelzellen exprimieren endotheliale Marker wie CD31 (PECAM 1), VE-Cadherin, VEGFR2, und ACE. Der Vorteil von CD31 als Marker ist, dass dieser in hoher Dichte auf Endothelzellen vorhanden ist (DeLisser et al., 1994, Newman, 1997). Zusätzlich eignen sich CD31 Antikörper gut, um humane Endothelzellen zu binden, da sie schnell an Endothelzellen binden und hierfür im Vergleich zu anderen getesteten Antikörpern eine geringere Konzentration nötig ist (Wang et al., 2019). Aus diesem Grund wurden P2b1 Hybridoma Zellen kultiviert, die humane IgG Antikörper gegen CD31 bilden. In dieser Arbeit erfolgte die Kultur der P2b1 Hybridoma Zellen statisch in Zellkulturflaschen, wobei von Vorteil ist, dass hier keine Tiere verwendet werden müssen, im Vergleich zur Antikörperproduktion im Aszites der Maus. Da man mit einer niedrigen Antikörperkonzentration im Zellüberstand rechnete, wurde der Überstand der Zellkulturen mehrfach aufkonzentriert, womit zufriedenstellende Antikörperkonzentrationen erreicht werden konnten. Nachdem der Überstand der P2b1 Zellen gesammelt und aufkonzentriert wurde, wurde der Antikörper mittels Affinitätschromatographie isoliert. P2b1 Hybridomazellen bilden einen Antikörper vom IgG1 Isotyp, weshalb für die Antikörperisolierung Protein G Beads (20% Beads Gemisch in 20% Ethanol) verwendet wurden, die eine hohe Affinität zur Fc-Region von humanem und Maus IgG besitzen. Durch die hohe Bindungsaffinität von Protein G wird eine hohe Ausbeute und Reinheit des gewünschten Antikörpers im Eluat erreicht (Nath et al., 2016). Zudem ermöglichen die Protein G Beads eine direkte Isolierung des Antikörpers aus dem Zellmedium und machen somit weitere, aufwendige Reinigungsschritte obsolet. Nach jeder Antikörperisolierung wurde die Antikörperkonzentration im Eluat mittels BCA Assay bestimmt. So konnten die optimalen Parameter für die Antikörperisolierung mittels Protein G Beads ermittelt werden: vorherige Aufkonzentrierung des Zellüberstands, Verwendung

von 900 µl Zellüberstand und 50 µl Magne Protein G Beads (20% Beads Gemisch in 20% Ethanol). In einem zweiten Schritt sollte bestätigt werden, dass der hergestellte Antikörper tatsächlich in der Lage ist, CD31 zu binden. Hierzu wurde eine Durchflusszytometrie mit HUVECs durchgeführt, die bekanntermaßen CD31 positiv sind. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der Antikörper sich in der Tat gegen CD31 richtet, da er spezifisch HUVECs gebunden hat. Nach Bordeaux et al. ist vor allem die Auswahl der Kontrollen wichtig, wenn es um die Identifizierung von Antikörpern geht. Sie empfehlen als Negativkontrolle die Nutzung einer Zelllinie, die sicher das Antigen nicht exprimiert, statt einer Kontrolle ohne Primärantikörper. Als Positivkontrolle werden Zellen empfohlen, die mit dem nachzuweisenden Protein transfiziert wurden (Bordeaux et al., 2010). So nutzten zum Beispiel Schams et al. zum Nachweis der Produktion eines CD34 Antikörpers CD34 negative Raji Zellen als Negativkontrolle und CD34 positive TF1 Zellen (humane Embryoblastzellen) als Positivkontrolle (Shams et al., 2013). Da in unserer Arbeit der Antikörper nicht mit CD31 negativen Zellen inkubiert wurde, kann eine Kreuzreaktivität mit anderen Zellen nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.2.2 In vivo Selbstendothelialisierung mit EPCs

Die Grundlage einer *in vivo* Selbstendothelialisierung von künstlichen Oberflächen ist das Abfangen von im Blut zirkulierenden Zellen, wie den endothelialen Vorläuferzellen (sog. EPCs). Hierbei werden bestimmte Fängermoleküle genutzt, die die gewünschte Zellpopulation aus dem am Implantat vorbeiströmendem Blut binden können. Aktuell gibt es vor allem Arbeiten zur Selbstendothelialisierung von kardiovaskulären Stents. Um die EPCs an die zu besiedelnde Oberfläche zu locken (engl. Homing), gibt es unterschiedliche Strategien. Beispielsweise können Peptide, Aptamere, Antikörper und magnetische Moleküle als Fängermoleküle genutzt werden (Avci-Adali et al., 2011). In dieser Arbeit soll vor allem auf eine Endothelialisierung mittels Antikörper eingegangen werden. Hier stellt sich erstmal die Frage welcher Antikörper sich am ehestens eignet, um EPCs zu erkennen. Die hauptsächlichen EPC spezifischen Marker sind CD34, CD133 und VEGFR2 (Avci-Adali et al., 2010), allerdings ist noch unklar welcher am besten geeignet ist, um die

Endothelialisierung einer Oberfläche zu garantieren. Die meisten Arbeiten nutzen Antikörper gegen CD34 (Lee et al., 2012, Li et al., 2018, Rotmans et al., 2005, Zhuang et al., 2021). Für den ersten kommerziell erwerbbaaren CD34 Antikörper beschichteten Stent, der Genous™ Stent, konnte allerdings kein Vorteil im Vergleich zu herkömmlichen „Drug eluting Stents“ (DES) nachgewiesen werden (Klomp et al., 2011). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass CD34 nicht allein ein Marker für EPCs ist, sondern insgesamt für pluripotente Zellen, die auch anderweitig ausdifferenzieren können (z.B. in glatte Muskelzellen). Des Weiteren exprimieren EPCs CD31 auf ihrer Oberfläche. So nutzten Diaz-Rodriguez et al. (Diaz-Rodriguez et al., 2021) ein CD31-Analogon, um kardiovaskuläre Stents mit EPCs zu beschichten. In unserer Arbeit wurden die ersten Versuche zur Etablierung einer Methode zur Selbstendothelialisierung mittels kupferfreier Click-Chemie durchgeführt. Hierzu wurde der selbst produzierte Maus anti-human CD31 Antikörper verwendet. Dieser Antikörper wurde dann mit Hilfe des Antibody Azido Modifying Kit von Thermo Fisher mit einer Azidgruppe versehen. Dies gestaltete sich allerdings sehr ineffizient, da ein Großteil des Antikörpers während der Bearbeitung verloren ging. Zudem konnte in einer durchgeführten Durchflusszytometrie keine Bindung von DBCO-S-Cy3 an mit dem Azid-Antikörper behandelte HUVECs nachgewiesen werden, weshalb von einem Nichterfolg der Azidfunktionalisierung ausgegangen werden muss. Möglicherweise war der hergestellte Antikörper nicht genug glykosyliert, um die Azid-Modifizierung erfolgreich durchführen zu können. Tatsächlich wird in der Literatur ein Verlust der Glykosylierung von Antikörpern während einer *in vitro* Kultivierung von Hybridomazellen beschrieben (Council, 1999). Somit muss in Zukunft die Azid-Modifizierung des Antikörpers verbessert werden und eventuell eine alternative Methode der Antikörperisolierung erprobt werden. Neben der Click-Chemie bestehen auch weitere Möglichkeiten zur Immobilisierung von Antikörpern auf Oberflächen. Ates et al. untersuchten in ihrer Arbeit unterschiedliche Methoden zur Immobilisierung von Antikörpern, die dem Erfassen von zirkulierenden Tumorzellen dienen sollten. Unter Berücksichtigung von Effektivität, Zeit- und Kostenersparnis war die NHS/EDC Methode die machbarste Immobilisierungsmethode, die untersucht wurde (Ates et al., 2018).

Hierbei werden Carboxylgruppen (-COOH) und primäre Amine (-NH₂) unter Ausbildung einer Amidbindung konjugiert. Neben der NHS/EDC Methode wurde in weiteren Arbeiten auch die Verwendung von Glutaraldehyd getestet. Glutaraldehyd ist in der Lage Aminogruppen enthaltende Biomoleküle zu verbinden, wobei der genaue Wirkmechanismus unklar ist (Smith et al., 2020, Migneault et al., 2004). Nachteil der zuvor genannten Methoden ist allerdings, dass es sich zwar um kovalente Bindungen, aber nicht um gerichtete („site specific“) Reaktionen handelt. Aus diesem Grund kann es zu einer zufälligen Orientierung der Antikörper und zu deren Funktionsverlust kommen (Shen et al., 2017). Im Gegensatz hierzu ermöglichen Click-Chemie Reaktionen eine gerichtete Bindung von Antikörpern auf Oberflächen, sodass die Fähigkeit des Antikörpers sein Antigen zu binden, uneingeschränkt bleibt (van Moorsel et al., 2019).

4.3 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit fügt sich in eine Reihe von wenigen aber aktuellen Arbeiten, die sich mit dem Thema der Endothelialisierung von Oxygenatormembranen befassen (Zwirner et al., 2018, Hess et al., 2010b, Pflaum et al., 2017). In der Tat beschränken sich die Arbeiten zum Thema Endothelialisierung in erster Linie auf die Beschichtung von Herzklappen, Gefäßtransplantaten und Prothesen (Hess et al., 2010b). Zudem betonten insbesondere Zwirner et al., die eine Beschichtung mit Heparin und Albumin anwendeten, den Bedarf für neue, stabilere Beschichtungen mit Endothelzellen (Zwirner et al., 2018). Bevor die Endothelialisierung einer künstlichen Oberfläche möglich ist, muss diese allerdings erstmal modifiziert werden (Takagi et al., 2003), da die Zelladhäsion wesentlich durch Oberflächeneigenschaften, wie Hydrophilität, Ladung und Rauheit der Oberfläche beeinflusst wird (Hess et al., 2014, Bhattacharyya et al., 2010). In dieser Arbeit wurde eine neuartige Methode zur Endothelialisierung von Hohlfasermembranen etabliert. Durch die Verwendung der Click-Chemie entsteht zwischen den Endothelzellen und der HFM eine kovalente Bindung, wodurch man sich eine stabile und langlebige Beschichtung erhofft. Außerdem werden bei dieser Beschichtungsmethode keine

thrombogenen Proteine verwendet (z.B. Fibronectin). Die Oberfläche der HMFs wird durch die Plasmabehandlung sogar hydrophiler und die Hämokompatibilität wird verbessert (Recek, 2019). Zwar konnte erfolgreich ein Protokoll zur Endothelialisierung von PMP-HMFs etabliert werden, jedoch fehlen noch Folgestudien. In der Tat muss die Stabilität der Endothelzellschicht über die Zeit untersucht werden. Bei Versuchen, die die Stabilität der Endothelzellschicht über die Zeit untersuchen, ist eine dynamische Kultur sinnvoll, da ein laminarer Fluss mit hoher Scherbelastung das Überleben und den inaktivierten Zustand von Endothelzellen gewährleistet (Chistiakov et al., 2017). Zudem muss in einem Flussmodell überprüft werden, ob die kovalente Bindung zwischen Zellen und PMP-Membran stabil genug ist, um physiologischen Scherkräften Stand zu halten. Die Funktion des Membranoxygenators ist in erster Linie der Gasaustausch, somit sollte untersucht werden, ob die Endothelialisierung die Oxygenierung des Blutes behindert. In Hinblick auf eine eventuelle klinische Anwendung, muss auch analysiert werden, welche Zellquellen sich für eine Beschichtung eignen. In der Tat braucht es viele und gut wachsende Zellen, um möglichst schnell einen gesamten Oxygenator zu endothelialisieren. Einerseits besteht die Möglichkeit Endothelzellen aus iPSCs aus Patientenurin zu generieren (Gimbel et al., 2016, Steinle et al., 2019) und andererseits könnten allogene Zellquellen verwendet werden, die durch HLA Silencing verändert würden (Wiegmann et al., 2014), um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Zusammenfassend kann man sagen, dass die ersten Schritte für die Entwicklung einer neuen Methode zur Endothelialisierung von Oxygenatormembranen getan wurden, jedoch müssen nun weitere Versuche durchgeführt werden, die die Resistenz gegen Scherkräfte und Langlebigkeit der Beschichtung untersuchen. Weiteres Ziel wird der Übergang zu *in vivo* Versuchen sein, um fundierte Aussagen über die Funktionalität von endothelialisierten Oxygenatormembranen machen zu können. So entwickelten Schlör et al. bereits ein *in vitro* Schweinmodell, um später *in vivo* Versuche an Schweinen durchführen zu können (Schlör et al., 2022). In Hinblick auf eine *in vivo* Selbendothelialisierung wurde in einem ersten Schritt gezeigt, dass eine effektive Produktion von monoklonalen Antikörpern in Zellkulturflaschen möglich ist. Des Weiteren wurde

eine Methode zur Selbstendothelialisierung von Hohlfasermembranen mittels kupferfreier Click Chemie und Antikörpern diskutiert. Hierzu kann man sagen, dass CD31-Antikörper sich generell für eine *in vivo* Endothelialisierung eignen, jedoch muss der Herstellungsprozess optimiert werden, sodass eine Azidmodifizierung des CD31-Antikörpers realisiert werden kann.

5 Zusammenfassung

Die ECMO stellt ein extrakorporales Kreislaufverfahren dar, welches je nach Art und Weise der Kanülierung die Funktion von Herz und/oder Lungen übernehmen kann. Dies ermöglicht die Erholung dieser Organe bei Patienten mit schwerem pulmonalen und/oder kardialen Versagen. Dieses Verfahren ist jedoch noch mit erheblichen Komplikationen, wie Thrombosen und Blutungen verbunden, die unter anderem auf die eingeschränkte Hämokompatibilität dieser Systeme zurückzuführen sind. Die künstliche Oberfläche der ECMO und insbesondere die Oxygenatormembran aktivieren nämlich das Gerinnungs- und das Komplementsystem. Durch eine Beschichtung der künstlichen Oberflächen mit Endothelzellen, der natürlichen Auskleidung aller Blutgefäße und wesentliche Regulatoren von Inflammations- und Gerinnungsprozessen, erhofft man sich eine deutliche Verbesserung der Hämokompatibilität und dadurch eine Reduktion der ECMO assoziierten Komplikationen. Ziel dieser Arbeit war somit die Etablierung eines Protokolls, um die Endothelialisierung von Hohlfasermembranen unter Verwendung der Click-Chemie zu ermöglichen. Hierfür wurden erstmal die Oberflächeneigenschaften der HFM in drei Schritten modifiziert, sodass das Zellwachstum gefördert würde. Zuerst erfolgte die Behandlung mit Sauerstoffplasma, um reaktive sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen einzuführen. Im Anschluss wurde APTES verwendet, um mittels Silanisierung ein Monolayer aus Aminogruppen herzustellen. Diese Aminogruppen reagierten dann über NHS-Ester Reaktion mit DBCO-PEG₄-NHS Ester, um die HFM mit dem Alkin DBCO zu funktionalisieren. Bevor die Endothelzellen mit den HFM inkubiert wurden, wurden mittels eines Azidozuckers Azidgruppen an der Oberfläche der HUVECs generiert. Anschließend konnten die Zellen im Laufe einer unter Rotation erfolgenden

Inkubation an die HFM binden. Zusätzlich zu einer *in vitro* Endothelialisierung bestehen Bestrebungen, die Endothelialisierung *in vivo* stattfinden zu lassen. Hierzu können beispielweise an eine künstliche Oberfläche gebundene Antikörper verwendet werden, die sich gegen spezifische Oberflächenmarker von im Blut zirkulierenden Zellen richten. Daher wurde in dieser Arbeit auch die Herstellung eines anti-CD31 Antikörpers, mittels einer Hybridoma Zelllinie, die Maus anti-humane CD31 Antikörper produziert, getestet, sowie dessen Modifizierung mit einer Azidgruppe. Im Laufe dieser Arbeit konnte die Oberfläche von HFMs erfolgreich modifiziert werden und die Bildung einer konfluenten Endothelzellschicht ermöglicht werden. In der Tat trugen die Membranen, die mit Sauerstoffplasma, APTES und DBCO-PEG₄-NHS Ester behandelt wurden, signifikant mehr Zellen als die unbehandelten und rein APTES-behandelten Membranen. Diese neuartige Endothelialisierungsmethode mittels kupferfreier Click-Chemie ist unter vielfachen Gesichtspunkten vielversprechend. Einerseits gestaltet sich die Einführung von Azidgruppen in lebendige Zellen einfach und hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität. Andererseits entsteht zwischen den Zellen und der HFM durch die Reaktion von Alkinen mit Aziden eine kovalente Bindung. Dies lässt auf eine stabile Beschichtung hoffen. Des Weiteren ist die Endothelialisierung mittels kupferfreier Click-Chemie sehr spezifisch, da nur Zellen, die eine Azidgruppe tragen, welche physiologischerweise nicht vorkommt, an die Membran binden können. Auch konnte in dieser Arbeit erfolgreich ein Maus anti-human CD31 Antikörper aus einer Hybridoma Zelllinie isoliert werden. Hierfür wurden die produzierten Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus dem Zellüberstand isoliert. Zudem wurden Überlegungen zur Selbstendothelialisierung mit Hilfe von Antikörpern angestellt und erste Vorversuche durchgeführt.

Somit wurde im Laufe dieser Arbeit erstmals ein erfolgreiches Protokoll zur Endothelialisierung von PMP-HFM mittels kupferfreier Click-Chemie etabliert und auch die *in vitro* Herstellung eines anti-CD31 Antikörpers wurde realisiert. Es besteht jedoch noch Bedarf an Folgeversuchen, da noch gezeigt werden muss, dass wesentliche Funktionen des Oxygenators, wie beispielsweise der Gasaustausch, durch die Endothelialisierung nicht eingeschränkt werden.

Außerdem muss geprüft werden, ob die Zellen den Scherkräften im extrakorporalen Kreislauf standhalten können und das Endothelzellmonolayer über eine ausreichend lange Zeit stabil bleibt. Zuletzt sollte weiter an der Azidmodifizierung von Antikörpern gearbeitet werden, um später ein Protokoll für die *in vivo* Endothelialisierung von Oxygenatormembranen mittels Azid-modifizierter Antikörper zu etablieren.

6 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im klinischen Forschungslabor der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Meltem Avci-Adali durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Avci-Adali und Denis Canjuga.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Denis Canjuga und Leila Mohammadnejad) von mir eigenständig oder in Zusammenarbeit mit Denis Canjuga durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich oder in Zusammenarbeit mit Denis Canjuga.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.09.2022

Caroline Hansen

7 Literaturverzeichnis

- AAD, G., ABAJYAN, T., ABBOTT, B., ABDALLAH, J., ABDEL KHALEK, S., ABDELALIM, A. A., ABDINOV, O., ABEN, R., ABI, B., ABOLINS, M., ABOUZEID, O. S., ABRAMOWICZ, H., ABREU, H., ACHARYA, B. S., ADAMCZYK, L., ADAMS, D. L., ADDY, T. N., ADELMAN, J., ADOMEIT, S., ADRAGNA, P., ADYE, T., AEFSKY, S., AGUILAR-SAAVEDRA, J. A., AGUSTONI, M., AHLEN, S. P., AHLES, F., AHMAD, A., AHSAN, M., AIELLI, G., AKESSON, T. P., AKIMOTO, G., AKIMOV, A. V., ALAM, M. A., ALBERT, J., ALBRAND, S., ALEKSA, M., ALEKSANDROV, I. N., ALESSANDRIA, F., ALEXA, C., ALEXANDER, G., ALEXANDRE, G., ALEXOPOULOS, T., ALHROOB, M., ALIEV, M., ALIMONTI, G., ALISON, J., ALLBROOKE, B. M., ALLISON, L. J., ALLPORT, P. P., ALLWOOD-SPIERS, S. E., ALMOND, J., ALOISIO, A., ALON, R., ALONSO, A., ALONSO, F., ALTHEIMER, A., ALVAREZ GONZALEZ, B., ALVIGGI, M. G., AMAKO, K., AMELUNG, C., AMMOSOV, V. V., AMOR DOS SANTOS, S. P., AMORIM, A., AMOROSO, S., AMRAM, N., ANASTOPOULOS, C., ANCU, L. S., ANDARI, N., ANDEEN, T., ANDERS, C. F., ANDERS, G., ANDERSON, K. J., ANDREAZZA, A., ANDREI, V., ANDUAGA, X. S., ANGELIDAKIS, S., ANGER, P., ANGERAMI, A., ANGHINOLFI, F., ANISENKOV, A., ANJOS, N., ANNOVI, A., ANTONAKI, A., ANTONELLI, M., ANTONOV, A., ANTOS, J., ANULLI, F., AOKI, M., APERIO BELLA, L., APOLLE, R., ARABIDZE, G., ARACENA, I., ARAI, Y., ARCE, A. T., ARFAOUI, S., ARGUIN, J. F., ARGYROPOULOS, S., ARIK, E., ARIK, M., ARMBRUSTER, A. J., et al. 2013. Observation of associated near-side and away-side long-range correlations in $\sqrt{s(NN)}=5.02$ TeV proton-lead collisions with the ATLAS detector. *Phys Rev Lett*, 110, 182302.
- ABBASI, A., DEVERS, C., SODHA, N. R. & VENTETUOLO, C. E. 2019. Extracorporeal Life Support in Adults with Acute Respiratory Failure: Current Evidence-Based Practices. *R I Med J* (2013), 102, 39-42.
- ABEDNEJAD, A. S., AMOABEDINY, G. & GHAEI, A. 2014. Surface modification of polypropylene membrane by polyethylene glycol graft polymerization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 42, 443-50.
- ACRES, R. G., ELLIS, A. V., ALVINO, J., LENAHAN, C. E., KHODAKOV, D. A., METHA, G. F. & ANDERSSON, G. G. 2012. Molecular Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane Layers Formed on Silanol-Terminated Silicon Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116, 6289-6297.
- AGARD, N. J., PRESCHE, J. A. & BERTOZZI, C. R. 2004. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 126, 15046-15047.
- ATES, H. C., OZGUR, E. & KULAH, H. 2018. Comparative study on antibody immobilization strategies for efficient circulating tumor cell capture. *Biointerphases*, 13, 021001.
- AVCI-ADALI, M., KOBBA, J., NEUMANN, B., LESCAN, M., PERLE, N., WILHELM, N., WIEDMAIER, H., SCHLENSAK, C. & WENDEL, H. P. 2013. Application of a rotating bioreactor consisting of low-cost and ready-to-use medical disposables for in vitro evaluation of the endothelialization efficiency of small-caliber vascular

- prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 101B, 1061-1068.
- AVCI-ADALI, M., PERLE, N., ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. 2011. Current concepts and new developments for autologous in vivo endothelialisation of biomaterials for intravascular applications. *Eur Cell Mater*, 21, 157-76.
- AVCI-ADALI, M., ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. 2010. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in vivo self-endothelialization--a review of current strategies. *Biotechnol Adv*, 28, 119-29.
- BASKIN, J. M., PRESCHER, J. A., LAUGHLIN, S. T., AGARD, N. J., CHANG, P. V., MILLER, I. A., LO, A., CODELLI, J. A. & BERTOZZI, C. R. 2007. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 16793-7.
- BEREI, T. J., LILLYBLAD, M. P., WILSON, K. J., GARBERICH, R. F. & HRYNIEWICZ, K. M. 2018. Evaluation of Systemic Heparin Versus Bivalirudin in Adult Patients Supported by Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Asaio j*, 64, 623-629.
- BETIT, P. 2018. Technical Advances in the Field of ECMO. *Respiratory Care*, 63, 1162-1173.
- BHATTACHARYYA, D., XU, H., DESHMUKH, R. R., TIMMONS, R. B. & NGUYEN, K. T. 2010. Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation. *J Biomed Mater Res A*, 94, 640-8.
- BORDEAUX, J., WELSH, A., AGARWAL, S., KILLIAM, E., BAQUERO, M., HANNA, J., ANAGNOSTOU, V. & RIMM, D. 2010. Antibody validation. *BioTechniques*, 48, 197-209.
- BRÉCHOT, N., HAJAGE, D., KIMMOUN, A., DEMISELLE, J., AGERSTRAND, C., MONTERO, S., SCHMIDT, M., LUYT, C. E., LEBRETON, G., HÉKIMIAN, G., FLECHER, E., ZOGHEIB, E., LEVY, B., SLUTSKY, A. S., BRODIE, D., ASFAR, P. & COMBES, A. 2020. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation to rescue sepsis-induced cardiogenic shock: a retrospective, multicentre, international cohort study. *Lancet*, 396, 545-552.
- BRODIE, D. & BACCHETTA, M. 2011. Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults. *New England Journal of Medicine*, 365, 1905-1914.
- CANJUGA, D., HANSEN, C., HALBRÜGGE, F., HANN, L., WEIS, S., SCHLENSAK, C., WENDEL, H.-P. & AVCI-ADALI, M. 2022. Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces. *Biomaterials Advances*, 137, 212824.
- CHATURVEDI, P., CHATURVEDI, N., GUPTA, S., MISHRA, A., SINGH, M. & SIDDHARTHA, T. 2011. Click chemistry: A new approach for drug discovery. 10, 111-117.
- CHISTIYAKOV, D. A., OREKHOV, A. N. & BOBRYSHEV, Y. V. 2017. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica*, 219, 382-408.
- CHO, J. & MOSHER, D. F. 2006. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, 1461-1469.
- COMBES, A., PEEK, G. J., HAJAGE, D., HARDY, P., ABRAMS, D., SCHMIDT, M., DECHARTRES, A. & ELBOURNE, D. 2020. ECMO for severe ARDS: systematic review and individual patient data meta-analysis. *Intensive Care Med*, 46, 2048-2057.

- CORADA, M., MARIOTTI, M., THURSTON, G., SMITH, K., KUNKEL, R., BROCKHAUS, M., LAMPUGNANI, M. G., MARTIN-PADURA, I., STOPPACCIARO, A., RUCO, L., MCDONALD, D. M., WARD, P. A. & DEJANA, E. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 9815-9820.
- CORNELISSEN, C. G., DIETRICH, M., GROMANN, K., FRESE, J., KRUEGER, S., SACHWEH, J. S. & JOCKENHOEVEL, S. 2013. Fibronectin coating of oxygenator membranes enhances endothelial cell attachment. *BioMedical Engineering OnLine*, 12, 7.
- COUNCIL, N. R. 1999. *Monoclonal Antibody Production*, Washington, DC, The National Academies Press.
- COURTNEY, J. M. & FORBES, C. D. 1994. Thrombosis on foreign surfaces. *Br Med Bull*, 50, 966-81.
- DELISSER, H. M., NEWMAN, P. J. & ALBELDA, S. M. 1994. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today*, 15, 490-495.
- DIAZ-RODRIGUEZ, S., RASSER, C., MESNIER, J., CHEVALLIER, P., GALLET, R., CHOQUEUX, C., EVEN, G., SAYAH, N., CHAUBET, F., NICOLETTI, A., GHALEH, B., FELDMAN, L. J., MANTOVANI, D. & CALIGIURI, G. 2021. Coronary stent CD31-mimetic coating favours endothelialization and reduces local inflammation and neointimal development in vivo. *Eur Heart J*, 42, 1760-1769.
- DONATE, R., ALEMÁN-DOMÍNGUEZ, M. E. & MONZÓN, M. 2021. On the Effectiveness of Oxygen Plasma and Alkali Surface Treatments to Modify the Properties of Polylactic Acid Scaffolds. *Polymers*, 13, 1643.
- DOYLE, A. J. & HUNT, B. J. 2018. Current Understanding of How Extracorporeal Membrane Oxygenators Activate Haemostasis and Other Blood Components. *Frontiers in Medicine*, 5.
- ESCH, M. B., POST, D. J., SHULER, M. L. & STOKOL, T. 2011. Characterization of in vitro endothelial linings grown within microfluidic channels. *Tissue Eng Part A*, 17, 2965-71.
- FELETOU, M. 2011. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA).
- FELETOU, M. & VANHOUTTE, P. M. 2007. Endothelium-dependent hyperpolarizations: past beliefs and present facts. *Ann Med*, 39, 495-516.
- FERREIRA, P., ALVES, P., COIMBRA, P. & GIL, M. H. 2015. Improving polymeric surfaces for biomedical applications: a review. *Journal of Coatings Technology and Research*, 12, 463-475.
- GAI, M., SIMON, J., LIEBERWIRTH, I., MAILÄNDER, V., MORSBACH, S. & LANDFESTER, K. 2020. A bio-orthogonal functionalization strategy for site-specific coupling of antibodies on vesicle surfaces after self-assembly. *Polymer Chemistry*, 11, 527-540.
- GIMBEL, A. A., FLORES, E., KOO, A., GARCIA-CARDENA, G. & BORENSTEIN, J. T. 2016. Development of a biomimetic microfluidic oxygen transfer device. *Lab Chip*, 16, 3227-34.

- GUHA THAKURTA, S. & SUBRAMANIAN, A. 2012. Fabrication of dense, uniform aminosilane monolayers: A platform for protein or ligand immobilization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 414, 384-392.
- GUNDA, N. S. K., SINGH, M., NORMAN, L., KAUR, K. & MITRA, S. K. 2014. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. *Applied Surface Science*, 305, 522-530.
- HAN, S.-S., LEE, D.-E., SHIM, H.-E., LEE, S., JUNG, T., OH, J.-H., LEE, H.-A., MOON, S.-H., JEON, J., YOON, S., KIM, K. & KANG, S.-W. 2017. Physiological Effects of Ac4ManNAz and Optimization of Metabolic Labeling for Cell Tracking. *Theranostics*, 7, 1164-1176.
- HARTWIG, A., MULDER, M. & SMOLDERS, C. A. 1994. Surface amination of poly(acrylonitrile). *Advances in Colloid and Interface Science*, 52, 65-78.
- HAYES, M. M., FALLON, B. P., BARBARO, R. P., MANUSKO, N., BARTLETT, R. H. & TOOMASIAN, J. M. 2021. Membrane Lung and Blood Pump Use During Prolonged Extracorporeal Membrane Oxygenation: Trends From 2002 to 2017. *ASAIO Journal*, 67, 1062-1070.
- HESS, C., SCHWENKE, A., WAGENER, P., FRANZKA, S., LASZLO SAJTI, C., PFLAUM, M., WIEGMANN, B., HAVERICH, A. & BARCIKOWSKI, S. 2014. Dose-dependent surface endothelialization and biocompatibility of polyurethane noble metal nanocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102, 1909-1920.
- HESS, C., WIEGMANN, B., MAURER, A. N., FISCHER, P., MOLLER, L., MARTIN, U., HILFIKER, A., HAVERICH, A. & FISCHER, S. 2010a. Reduced thrombocyte adhesion to endothelialized poly 4-methyl-1-pentene gas exchange membranes—a first step toward bioartificial lung development. *Tissue Eng Part A*, 16, 3043-53.
- HESS, C., WIEGMANN, B., MAURER, A. N., FISCHER, P., MÖLLER, L., MARTIN, U., HILFIKER, A., HAVERICH, A. & FISCHER, S. 2010b. Reduced thrombocyte adhesion to endothelialized poly 4-methyl-1-pentene gas exchange membranes—a first step toward bioartificial lung development. *Tissue Engineering Part A*, 16, 3043-3053.
- HOGAN, M. & BERGER, J. S. 2020. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Review of incidence, diagnosis, and management. *Vascular Medicine*, 25, 160-173.
- HSU, S. H., TSAI, I. J., LIN, D. J. & CHEN, D. C. 2005. The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med Eng Phys*, 27, 267-72.
- HUANG, X., WANG, W., ZHENG, Z., FAN, W., MAO, C., SHI, J. & LI, L. 2016a. Surface monofunctionalized polymethyl pentene hollow fiber membranes by plasma treatment and hemocompatibility modification for membrane oxygenators. *Applied Surface Science*, 362, 355-363.
- HUANG, X., WANG, W. P., ZHENG, Z., FAN, W. L., MAO, C., SHI, J. L. & LI, L. 2016b. Surface monofunctionalized polymethyl pentene hollow fiber membranes by plasma treatment and hemocompatibility modification for membrane oxygenators. *Applied Surface Science*, 362, 355-363.

- IWAHASHI, H., YURI, K. & NOSÉ, Y. 2004. Development of the oxygenator: Past, present, and future. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs*, 7, 111-20.
- IWASAKI, Y., UCHIYAMA, S., KURITA, K., MORIMOTO, N. & NAKABAYASHI, N. 2002. A nonthrombogenic gas-permeable membrane composed of a phospholipid polymer skin film adhered to a polyethylene porous membrane. *Biomaterials*, 23, 3421-3427.
- JIANG, L., JIN, S., GENG, S., DENG, C., LIN, Z. & ZHAO, B. 2019. Maintenance and Restoration Effect of the Surface Hydrophilicity of Pure Titanium by Sodium Hydroxide Treatment and Its Effect on the Bioactivity of Osteoblasts. *Coatings*, 9.
- KHOSHBIN, E., DUX, A. E., KILLER, H., SOSNOWSKI, A. W., FIRMIN, R. K. & PEEK, G. J. 2007. A comparison of radiographic signs of pulmonary inflammation during ECMO between silicon and poly-methyl pentene oxygenators. *Perfusion*, 22, 15-21.
- KLEIN, S., HESSELMANN, F., DJELJADINI, S., BERGER, T., THIEBES, A. L., SCHMITZ-RODE, T., JOCKENHOEVEL, S. & CORNELISSEN, C. G. 2020. EndOxy: Dynamic Long-Term Evaluation of Endothelialized Gas Exchange Membranes for a Biohybrid Lung. *Annals of Biomedical Engineering*, 48, 747-756.
- KLEMENT, P., DU, Y. J., BERRY, L., ANDREW, M. & CHAN, A. K. C. 2002. Blood-compatible biomaterials by surface coating with a novel antithrombin–heparin covalent complex. *Biomaterials*, 23, 527-535.
- KLOMP, M., BEIJK, M. A., VARMA, C., KOOLEN, J. J., TEIGER, E., RICHARDT, G., BEA, F., VAN GELOVEN, N., VEROUDEN, N. J., CHAN, Y. K., WOUDESTRA, P., DAMMAN, P., TIJSSEN, J. G. & DE WINTER, R. J. 2011. 1-Year Outcome of TRIAS HR (TRI-Stent Adjudication Study–High Risk of Restenosis): A Multicenter, Randomized Trial Comparing Genous Endothelial Progenitor Cell Capturing Stents With Drug-Eluting Stents. *JACC: Cardiovascular Interventions*, 4, 896-904.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256, 495-7.
- KOLB, H. C., FINN, M. G. & SHARPLESS, K. B. 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 40, 2004-2021.
- KONO, K., HIRUMA, H., KOBAYASHI, S., SATO, Y., TANAKA, M., SAWADA, R. & NIIMI, S. 2016. In Vitro Endothelialization Test of Biomaterials Using Immortalized Endothelial Cells. *PloS one*, 11, e0158289-e0158289.
- KWAK, J., MAJEWSKI, M. B. & JELLISH, W. S. 2020. Extracorporeal Membrane Oxygenation: The New Jack-of-All-Trades? *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 34, 192-207.
- LAUGHLIN, S. T. & BERTOZZI, C. R. 2007. Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan-profiling and visualization via Staudinger ligation. *Nature Protocols*, 2, 2930-2944.
- LEE, H. J., FERNANDES-CUNHA, G. M., PUTRA, I., KOH, W. G. & MYUNG, D. 2017. Tethering Growth Factors to Collagen Surfaces Using Copper-Free Click Chemistry: Surface Characterization and in Vitro Biological Response. *ACS Appl Mater Interfaces*, 9, 23389-23399.

- LEE, J. M., CHOE, W., KIM, B. K., SEO, W. W., LIM, W. H., KANG, C. K., KYEONG, S., EOM, K. D., CHO, H. J., KIM, Y. C., HUR, J., YANG, H. M., CHO, H. J., LEE, Y. S. & KIM, H. S. 2012. Comparison of endothelialization and neointimal formation with stents coated with antibodies against CD34 and vascular endothelial-cadherin. *Biomaterials*, 33, 8917-27.
- LEHLE, K., PHILIPP, A., GLEICH, O., HOLZAMER, A., MÜLLER, T., BEIN, T. & SCHMID, C. 2008. Efficiency in extracorporeal membrane oxygenation—cellular deposits on polymethylpentene membranes increase resistance to blood flow and reduce gas exchange capacity. *Asaio Journal*, 54, 612-617.
- LEQUIER, L., HORTON, S. B., MCMULLAN, D. M. & BARTLETT, R. H. 2013. Extracorporeal membrane oxygenation circuitry. *Pediatr Crit Care Med*, 14, S7-12.
- LI, Z., SHEN, D., HU, S., SU, T., HUANG, K., LIU, F., HOU, L. & CHENG, K. 2018. Pretargeting and Bioorthogonal Click Chemistry-Mediated Endogenous Stem Cell Homing for Heart Repair. *ACS Nano*, 12, 12193-12200.
- LIM, M. W. 2006. The history of extracorporeal oxygenators. *Anaesthesia*, 61, 984-95.
- MAKDISI, G. & WANG, I. W. 2015. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis*, 7, E166-76.
- MAO, D., ZHANG, C., KENRY, LIU, J., WANG, X., LI, B., YAN, H., HU, F., KONG, D., WANG, Z. & LIU, B. 2020. Bio-orthogonal click reaction-enabled highly specific in situ cellularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 230, 119615.
- MARASCO, S. F., LUKAS, G., MCDONALD, M., MCMILLAN, J. & IHLE, B. 2008. Review of ECMO (extra corporeal membrane oxygenation) support in critically ill adult patients. *Heart Lung Circ*, 17 Suppl 4, S41-7.
- MICHALJANIČOVÁ, I., SLEPICKA, P., KASÁLKOVÁ, N., SAJDL, P. & ŠVORČÍK, V. 2014. Plasma and laser treatment of PMP for biocompatibility improvement. *Vacuum*, 107, 184–190.
- MIGNEAULT, I., DARTIGUENAVE, C., BERTRAND, M. J. & WALDRON, K. C. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37, 790-802.
- MILLAR, J. E., FANNING, J. P., MCDONALD, C. I., MCAULEY, D. F. & FRASER, J. F. 2016. The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care*, 20, 387.
- MOSES, J. E. & MOORHOUSE, A. D. 2007. The growing applications of click chemistry. *Chem Soc Rev*, 36, 1249-62.
- MUREEBE, L., GRAHAM, J. A., BUSH, R. L. & SILVER, D. 2007. Risk of Heparin-Induced Thrombocytopenia from Heparin-Bonded Vascular Prostheses. *Annals of Vascular Surgery*, 21, 719-722.
- NATH, N., GODAT, B., BENINK, H. & URH, M. 2015. On-bead antibody-small molecule conjugation using high-capacity magnetic beads. *J Immunol Methods*, 426, 95-103.
- NATH, N., GODAT, B. & URH, M. 2016. Antibody Labeling with Fluorescent Dyes Using Magnetic Protein A and Protein G Beads. *J Vis Exp*.
- NELSON-MCMILLAN, K., VRICELLA, L. A., STEWART, F. D., YOUNG, J., SHAH, A. S., HIBINO, N. & COULSON, J. D. 2020. Recovery from Total Acute Lung Failure After 20 Months of Extracorporeal Life Support. *ASAIO J*, 66, e11-e14.

- NEWMAN, P. J. 1997. The biology of PECAM-1. *The Journal of clinical investigation*, 99, 3-8.
- NIIMI, Y., ICHINOSE, F., ISHIGURO, Y., TERUI, K., UEZONO, S., MORITA, S. & YAMANE, S. 1999. The effects of heparin coating of oxygenator fibers on platelet adhesion and protein adsorption. *Anesth Analg*, 89, 573-9.
- NING, X., GUO, J., WOLFERT, M. A. & BOONS, G.-J. 2008. Visualizing Metabolically Labeled Glycoconjugates of Living Cells by Copper-Free and Fast Huisgen Cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition*, 47, 2253-2255.
- OBSTALS, F., VOROBII, M., RIEDEL, T., DE LOS SANTOS PEREIRA, A., BRUNS, M., SINGH, S. & RODRIGUEZ-EMMENEGGER, C. 2018. Improving Hemocompatibility of Membranes for Extracorporeal Membrane Oxygenators by Grafting Nonthrombogenic Polymer Brushes. *Macromol Biosci*, 18.
- ONTANEDA, A. & ANNICH, G. M. 2018. Novel Surfaces in Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuits. *Frontiers in Medicine*, 5.
- ORSKI, S. V., POLOUKHTINE, A. A., ARUMUGAM, S., MAO, L., POPIK, V. V. & LOCKLIN, J. 2010. High density orthogonal surface immobilization via photoactivated copper-free click chemistry. *J Am Chem Soc*, 132, 11024-6.
- PANG, J. H., FARHATNIA, Y., GODARZI, F., TAN, A., RAJADAS, J., COUSINS, B. G. & SEIFALIAN, A. M. 2015. In situ Endothelialization: Bioengineering Considerations to Translation. *Small*, 11, 6248-6264.
- PAPPALARDO, F., MAJ, G., SCANDROGLIO, A., SAMPIETRO, F., ZANGRILLO, A. & KOSTER, A. 2009. Bioline heparin-coated ECMO with bivalirudin anticoagulation in a patient with acute heparin-induced thrombocytopenia: the immune reaction appeared to continue unabated. *Perfusion*, 24, 135-7.
- PEEK, G. J., CLEMENS, F., ELBOURNE, D., FIRMIN, R., HARDY, P., HIBBERT, C., KILLER, H., MUGFORD, M., THALANANY, M., TIRUVOIPATI, R., TRUESDALE, A. & WILSON, A. 2006. CESAR: conventional ventilatory support vs extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure. *BMC Health Serv Res*, 6, 163.
- PEEK, G. J., KILLER, H. M., REEVES, R., SOSNOWSKI, A. W. & FIRMIN, R. K. 2002. Early experience with a polymethyl pentene oxygenator for adult extracorporeal life support. *Asaio j*, 48, 480-2.
- PFLAUM, M., DAHLMANN, J., ENGELS, L., NAGHILOUY-HIDAJI, H., ADAM, D., ZÖLLNER, J., OTTO, A., SCHMECKEBIER, S., MARTIN, U., HAVERICH, A., OLMER, R. & WIEGMANN, B. 2021. Towards Biohybrid Lung: Induced Pluripotent Stem Cell Derived Endothelial Cells as Clinically Relevant Cell Source for Biologization. *Micromachines*, 12, 981.
- PFLAUM, M., KUHN-KAUFFELDT, M., SCHMECKEBIER, S., DIPRESA, D., CHAUHAN, K., WIEGMANN, B., HAUG, R. J., SCHEIN, J., HAVERICH, A. & KOROSSIS, S. 2017. Endothelialization and characterization of titanium dioxide-coated gas-exchange membranes for application in the bioartificial lung. *Acta Biomater*, 50, 510-521.
- PLEIN, T., THIEBES, A. L., FINOCCHIARO, N., HESSELMANN, F., SCHMITZ-RODE, T., JOCKENHOEVEL, S. & CORNELISSEN, C. G. 2017. Towards a Biohybrid Lung Assist Device: N-Acetylcysteine Reduces Oxygen Toxicity and Changes Endothelial Cells' Morphology. *Cell Mol Bioeng*, 10, 153-161.

- POLK, A. A., MAUL, T. M., MCKEEL, D. T., SNYDER, T. A., LEHOCKY, C. A., PITT, B., STOLZ, D. B., FEDERSPIEL, W. J. & WAGNER, W. R. 2010. A biohybrid artificial lung prototype with active mixing of endothelialized microporous hollow fibers. *Biotechnol Bioeng*, 106, 490-500.
- POLLAK, U. 2019. Heparin-induced thrombocytopenia complicating extracorporeal membrane oxygenation support: Review of the literature and alternative anticoagulants. *J Thromb Haemost*, 17, 1608-1622.
- RAJENDRAN, P., RENGARAJAN, T., THANGAVEL, J., NISHIGAKI, Y., SAKTHISEKARAN, D., SETHI, G. & NISHIGAKI, I. 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 9, 1057-69.
- RATNANI, I., TUAZON, D., ZAINAB, A. & UDDIN, F. 2018. The Role and Impact of Extracorporeal Membrane Oxygenation in Critical Care. *Methodist DeBaakey cardiovascular journal*, 14, 110-119.
- RECEK, N. 2019. Biocompatibility of Plasma-Treated Polymeric Implants. *Materials (Basel)*, 12.
- ROBAK, O., LAKATOS, P. K., BOJIC, A., HERMANN, A., LACZIKA, K. F., CHIARI, A., HIESMAYR, J. M., STAUDINGER, T. & LOCKER, G. J. 2014. Influence of different oxygenator types on changing frequency, infection incidence, and mortality in ARDS patients on veno-venous ECMO. *Int J Artif Organs*, 37, 839-46.
- ROTMANS, J. I., HEYLIGERS, J. M., VERHAGEN, H. J., VELEMA, E., NAGTEGAAL, M. M., DE KLEIJN, D. P., DE GROOT, F. G., STROES, E. S. & PASTERKAMP, G. 2005. In vivo cell seeding with anti-CD34 antibodies successfully accelerates endothelialization but stimulates intimal hyperplasia in porcine arteriovenous expanded polytetrafluoroethylene grafts. *Circulation*, 112, 12-8.
- SARKAR, A. & DANIELS-RACE, T. 2013. Electrophoretic Deposition of Carbon Nanotubes on 3-Amino-Propyl-Triethoxysilane (APTES) Surface Functionalized Silicon Substrates. *Nanomaterials (Basel)*, 3, 272-288.
- SCHLÖR, S., PFLAUM, M., HÖFFLER, K., KÜHN, C., HAVERICH, A. & WIEGMANN, B. 2022. Towards Biohybrid Lung Development: Establishment of a Porcine In Vitro Model. *Membranes (Basel)*, 12.
- SHAMS, M., JEDDI-TEHRANI, M., NOTASH HAGHIGHAT, F., BAYAT, A. A., MAHMOUDIAN, J. & REZVANI, M. R. 2013. A Novel mAb against a Human CD34 Peptide Reacts with the Native Protein on CD34+ Cells. *Iranian Journal of Immunology*, 10, 259-266.
- SHEN, M., RUSLING, J. F. & DIXIT, C. K. 2017. Site-selective orientated immobilization of antibodies and conjugates for immunodiagnosics development. *Methods*, 116, 95-111.
- SHI, Q., CHEN, X., LU, T. & JING, X. 2008. The immobilization of proteins on biodegradable polymer fibers via click chemistry. *Biomaterials*, 29, 1118-26.
- SILVETTI, S., KOSTER, A. & PAPPALARDO, F. 2015. Do We Need Heparin Coating for Extracorporeal Membrane Oxygenation? New Concepts and Controversial Positions About Coating Surfaces of Extracorporeal Circuits. *Artificial Organs*, 39, 176-179.
- SLETTEN, E. M. & BERTOZZI, C. R. 2011. From mechanism to mouse: a tale of two bioorthogonal reactions. *Accounts of chemical research*, 44, 666-676.

- SMITH, S., GOODGE, K., DELANEY, M., STRUZYK, A., TANSEY, N. & FREY, M. 2020. A Comprehensive Review of the Covalent Immobilization of Biomolecules onto Electrospun Nanofibers. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10, 2142.
- SOLOUK, A., COUSINS, B. & SEIFALIAN, A. 2011. Application of plasma surface modification techniques to improve hemocompatibility of vascular grafts: A review. *Biotechnology and applied biochemistry*, 58, 311-27.
- SPICIARICH, D. R., NOLLEY, R., MAUND, S. L., PURCELL, S. C., HERSCHEL, J., IAVARONE, A. T., PEEHL, D. M. & BERTOZZI, C. R. 2017. Bioorthogonal Labeling of Human Prostate Cancer Tissue Slice Cultures for Glycoproteomics. *Angewandte Chemie International Edition*, 56, 8992-8997.
- STEINLE, H., WEBER, M., BEHRING, A., MAU-HOLZMANN, U., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & AVCI-ADALI, M. 2019. Generation of iPSCs by Nonintegrative RNA-Based Reprogramming Techniques: Benefits of Self-Replicating RNA versus Synthetic mRNA. *Stem Cells International*, 2019, 7641767.
- STEINLECHNER, B., KARGL, G., SCHLÖMMER, C., HOLAUBEK, C., SCHERIAU, G., EICHINGER, S., GRATZ, J. & RÖSSLER, B. 2021. Can Heparin-Coated ECMO Cannulas Induce Thrombocytopenia in COVID-19 Patients? *Case Reports in Immunology*, 2021, 6624682.
- SYED, A., KERDI, S. & QAMAR, A. 2021. Bioengineering Progress in Lung Assist Devices. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 8, 89.
- TAKAGI, M., SHIWAKU, K., INOUE, T., SHIRAKAWA, Y., SAWA, Y., MATSUDA, H. & YOSHIDA, T. 2003. Hydrodynamically stable adhesion of endothelial cells onto a polypropylene hollow fiber membrane by modification with adhesive protein. *J Artif Organs*, 6, 222-6.
- TANG, C., WANG, G., CAO, Y., WU, X., XIE, X. & XIAO, L. 2008. Adhesion and endothelialization of endothelial cells on the surface of endovascular stents by the novel rotational culture of cells. *Applied Surface Science*, 255, 315-319.
- TCHOUTA, L. N. & BONDE, P. N. 2015. The Quest for Nonthrombotic Surface Modifications to Achieve Hemocompatibility of Implantable Devices. *ASAIO J*, 61, 623-34.
- THIAGARAJAN, R. R., BARBARO, R. P., RYCUS, P. T., MCMULLAN, D. M., CONRAD, S. A., FORTENBERRY, J. D., PADEN, M. L. & CENTERS, E. M. 2017. Extracorporeal Life Support Organization Registry International Report 2016. *ASAIO J*, 63, 60-67.
- THOMAS, J., KOSTOUSOV, V. & TERUYA, J. 2018. Bleeding and Thrombotic Complications in the Use of Extracorporeal Membrane Oxygenation. *Semin Thromb Hemost*, 44, 020-029.
- VAN MOORSEL, M. V. A., URBANUS, R. T., VERHOEF, S., KOEKMAN, C. A., VINK, M., VERMONDEN, T., MAAS, C., PASTERKAMP, G. & SCHIFFELERS, R. M. 2019. A head-to-head comparison of conjugation methods for VHHs: Random maleimide-thiol coupling versus controlled click chemistry. *Int J Pharm X*, 1, 100020.
- VANDENBERG, E. T., BERTILSSON, L., LIEBERG, B., UVDAL, K., ERLANDSSON, R., ELWING, H. & LUNDSTRÖM, I. 1991. Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 147, 103-118.

- VASHIST, S. K., LAM, E., HRAPOVIC, S., MALE, K. B. & LUONG, J. H. T. 2014. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chemical Reviews*, 114, 11083-11130.
- WANG, L., FENG, X., HOU, S., CHAN, Q. & QIN, M. 2006. Microcontact printing of multiproteins on the modified mica substrate and study of immunoassays. *Surface and Interface Analysis*, 38, 44-50.
- WANG, W., ZHENG, Z., HUANG, X., FAN, W., YU, W., ZHANG, Z., LI, L. & MAO, C. 2017. Hemocompatibility and oxygenation performance of polysulfone membranes grafted with polyethylene glycol and heparin by plasma-induced surface modification. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 1737-1746.
- WANG, Y.-B., SHI, K.-H., JIANG, H.-L. & GONG, Y.-K. 2016. Significantly reduced adsorption and activation of blood components in a membrane oxygenator system coated with crosslinkable zwitterionic copolymer. *Acta biomaterialia*, 40, 153-161.
- WANG, Z., WINKLER, N., QIAN, B., GROS, W., MEHRABI, A. & RYSCHICH, E. 2019. Endothelial capture using antibodies and nanoparticles in human tissues: Antigen identification and liver segment imaging. *Acta Biomaterialia*, 97, 474-489.
- WEBER, M., STEINLE, H., GOLOMBEK, S., HANN, L., SCHLENSAK, C., WENDEL, H. P. & AVCI-ADALI, M. 2018. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 99.
- WEINER, L., MAZZEFFI, M. A., HINES, E. Q., GORDON, D., HERR, D. L. & KIM, H. K. 2020. Clinical utility of venoarterial-extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO) in patients with drug-induced cardiogenic shock: a retrospective study of the Extracorporeal Life Support Organizations' ECMO case registry. *Clin Toxicol (Phila)*, 58, 705-710.
- WENDEL, H. P. & ZIEMER, G. 1999. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 16, 342-350.
- WIEGMANN, B., FIGUEIREDO, C., GRAS, C., PFLAUM, M., SCHMECKEBIER, S., KOROSSIS, S., HAVERICH, A. & BLASCZYK, R. 2014. Prevention of rejection of allogeneic endothelial cells in a biohybrid lung by silencing HLA-class I expression. *Biomaterials*, 35, 8123-33.
- WIEGMANN, B., VON SEGGERN, H., HOFFLER, K., KOROSSIS, S., DIPRESA, D., PFLAUM, M., SCHMECKEBIER, S., SEUME, J. & HAVERICH, A. 2016. Developing a biohybrid lung - sufficient endothelialization of poly-4-methyl-1-pentene gas exchange hollow-fiber membranes. *J Mech Behav Biomed Mater*, 60, 301-311.
- YE, S.-H., ARAZAWA, D. T., ZHU, Y., SHANKARRAMAN, V., MALKIN, A. D., KIMMEL, J. D., GAMBLE, L. J., ISHIHARA, K., FEDERSPIEL, W. J. & WAGNER, W. R. 2015. Hollow Fiber Membrane Modification with Functional Zwitterionic Macromolecules for Improved Thromboresistance in Artificial Lungs. *Langmuir*, 31, 2463-2471.
- YOON, H. Y., KOO, H., KIM, K. & KWON, I. C. 2017. Molecular imaging based on metabolic glycoengineering and bioorthogonal click chemistry. *Biomaterials*, 132, 28-36.

- ZHU, M., LERUM, M. Z. & CHEN, W. 2012. How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28, 416-423.
- ZHUANG, Y., ZHANG, C., CHENG, M., HUANG, J., LIU, Q., YUAN, G., LIN, K. & YU, H. 2021. Challenges and strategies for in situ endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts. *Bioactive Materials*, 6, 1791-1809.
- ZWIRNER, U., HOFFLER, K., PFLAUM, M., KOROSSIS, S., HAVERICH, A. & WIEGMANN, B. 2018. Identifying an optimal seeding protocol and endothelial cell substrate for biohybrid lung development. *J Tissue Eng Regen Med*, 12, 2319-2330.

8 Liste der Veröffentlichungen

Canjuga, D., et al. (2022). "Improving hemocompatibility of artificial lungs by click conjugation of glycoengineered endothelial cells onto blood-contacting surfaces." *Biomaterials Advances* **137**: 212824.