

Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Tobias Göckler

aus

Karlsruhe, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referent: Prof. Dr. Pavel Levkin

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers vom 17. Oktober 2017 bis zum 28. Oktober 2020 am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Pavel Levkin möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Eidesstattliche Erklärung

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

FÜR MEINE FAMILIE

IF YOU WANT TO GO QUICKLY,

GO ALONE.

IF YOU WANT TO GO FAR,

GO TOGETHER.

(Afrikanisches Sprichwort)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die Geschichte des 3D-Drucks	1
1.2 Biofabrikationsprozesse	4
1.2.1 <i>3D-Bioprinting</i>	4
1.2.2 <i>Direct Laser Writing</i>	6
1.3 Druckbare Materialien.....	8
1.3.1 Biomaterialien.....	8
1.3.2 Biotinten.....	9
2 Zielsetzung	15
3 Ergebnisse	17
3.1 Biomaterialien und Biotinten für additive Fertigungsverfahren.....	17
3.1.1 Photolacke für das <i>Direct Laser Writing</i>	17
3.1.1.1 Degradierbare Photolacke.....	19
3.1.1.2 Polycaprolactontriacrylat.....	20
3.1.1.2.1 Abbaubarkeit	23
3.1.1.2.2 <i>Direct Laser Writing</i>	25
3.1.1.2.3 Biokompatibilität.....	28
3.1.1.2.4 Kapitelzusammenfassung.....	35
3.1.2 Biotinten für das <i>3D-Bioprinting</i>	36
3.1.2.1 Gelatine-Methacryloyl.....	36
3.1.2.1.1 Synthese und chemische Charakterisierung	38
3.1.2.1.2 Biokompatibilität.....	42
3.1.2.1.3 Diffusionsstudie	44
3.1.2.1.3.1 Ritger-Peppas-Modell.....	44
3.1.2.1.3.2 Abhängigkeit der Diffusion von den Hydrogeleigenschaften .	48
3.1.2.1.3.3 Abhängigkeit der Diffusion von der Molekülgröße	52
3.1.2.1.4 Kapitelzusammenfassung.....	54

3.1.2.2	Norbornen-funktionalisierte Gelatine	55
3.1.2.2.1	Synthese und chemische Charakterisierung.....	57
3.1.2.2.2	Bildung des Thiol-En-Photoclick-Hydrogels GelNB/GelS	62
3.1.2.2.3	Biokompatibilität	68
3.1.2.2.4	3D-Bioprinting.....	74
3.1.2.2.5	Kapitelzusammenfassung	78
3.1.3	Interpenetrating-Polymer-Network-Hydrogele	79
3.1.3.1	Polyelektrolyt-Komplex-Hydrogele	81
3.1.3.2	PEC/C-Hybrid-Hydrogele.....	85
3.1.3.2.1	Synthese von funktionalisierten PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈ - Triblockcopolyelektrolyten	86
3.1.3.2.2	Herstellung und Charakterisierung von PEC/C-Hybrid- Hydrogelen.....	87
3.1.3.2.3	Charakterisierung mittels SAXS.....	90
3.1.3.2.3.1	Modulation des nicht-kovalenten Polymernetzwerks	90
3.1.3.2.3.2	Modulation des kovalenten Polymernetzwerks	92
3.1.3.2.4	Rheologische Charakterisierung	93
3.1.3.2.4.1	Kovalente und nicht-kovalente Einzelnetzwerke	93
3.1.3.2.4.2	g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele	96
3.1.3.2.5	Adaptive Eigenschaften bei NaCl-Exposition.....	101
3.1.3.2.6	Physikalisch-mechanische Charakterisierung.....	104
3.1.3.2.6.1	Zugversuche.....	104
3.1.3.2.6.2	Quelleigenschaften.....	107
3.1.3.2.7	Kapitelzusammenfassung	109
3.2	Biotinten für subtraktive Fertigungsverfahren	111
3.2.1	Photodegradierbare Hydrogele.....	111
3.2.1.1	Synthese und Screening einer kombinatorischen Hybrid- Hydrogel-Bibliothek.....	114
3.2.1.2	Biokompatibilität	118
3.2.1.3	Photodegradation	123
3.2.1.4	Subtraktives <i>Photopatterning</i>	127
3.2.1.5	Kapitelzusammenfassung	130

4	Abschlussdiskussion	131
5	Material und Methoden	143
5.1	Material.....	143
5.1.1	Zellen und Organismen.....	143
5.1.2	Zellkulturmedien	143
5.1.3	Zusammengesetzte Medien und Chemikalien	143
5.1.4	Chemikalien und Reagenzien.....	144
5.1.5	Verbrauchsmaterialien	148
5.1.6	Geräte.....	151
5.1.7	Software.....	154
5.2	Methoden	155
5.2.1	Synthesevorschriften.....	155
5.2.1.1	Synthese von Polycaprolactontriacrylat (PCLTA).....	155
5.2.1.2	Synthese von Gelatine-Methacryloyl (GelMA).....	156
5.2.1.3	Synthese von Norbornen-funktionalisierter Gelatine (GelNB)	157
5.2.1.4	Synthese von Thiol-funktionalisierter Gelatine (GelS)	159
5.2.1.5	Synthese von PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈ -Triblockcopolymeren	160
5.2.1.6	Funktionalisierung von PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈ - Triblockcopolymeren mit Ammonium- und Sulfonat-Gruppen.....	160
5.2.1.7	Funktionalisierung von PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈ - Triblockcopolymeren mit Guanidinium-Gruppen.....	161
5.2.2	Chemische Analytik.....	161
5.2.2.1	NMR-Spektroskopie	161
5.2.2.2	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA)-Assay	162
5.2.2.2.1	Bestimmung des Gehalts an freien Aminogruppen in Gelatine Typ A.....	162
5.2.2.2.2	Bestimmung des Funktionalisierungsgrads der Hydrogelvorläufer	162
5.2.3	Herstellung der Biomaterial- bzw. Biotinten-Formulierungen	163
5.2.3.1	PETA-Photolack	163
5.2.3.2	Acrylat-basierter PCL-Photolack	163
5.2.3.3	Thiol-Acrylat-basierter PCL-Photolack.....	163

5.2.3.4	GelMA-Hydrogele.....	164
5.2.3.5	GelNB/DTT-Hydrogele.....	164
5.2.3.6	GelNB/GelS-Hydrogele	165
5.2.3.7	Polyelektrolyt-Komplex (PEC)-Hydrogele	166
5.2.3.8	<i>Interpenetrating-Polymer-Network</i> (IPN)-Hydrogele	166
5.2.3.9	Synthese einer kombinatorischen GelPEG-Bibliothek	167
5.2.4	Materialcharakterisierung.....	168
5.2.4.1	Quellverhältnis von GelNB/GelS-Hydrogelen.....	168
5.2.4.2	Ellman's Assay	168
5.2.4.3	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS).....	169
5.2.4.4	Rheologische Messungen	169
5.2.4.5	Zugversuche von IPN-Hydrogelen	170
5.2.4.6	Quellverhältnis von IPN-Hydrogelen	170
5.2.5	Diffusionsstudie.....	171
5.2.5.1	Photometrischer Nachweis von Methylenblau	171
5.2.5.2	Kolorimetrischer Nachweis von Glucose und Dextran	172
5.2.6	Degradationsstudien.....	173
5.2.6.1	Hydrolytischer Abbau von PCL-Würfeln.....	173
5.2.6.2	Hydrolytischer Abbau von DLW-Boxringen unter zellfreien Bedingungen	173
5.2.6.3	Hydrolytischer Abbau von DLW-Boxringen unter Zellkulturbedingungen.....	173
5.2.6.4	Biodegradation von GelNB/GelS-Hydrogelen.....	174
5.2.6.5	Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit von variierenden PEGMA/PEGDMA/GelMA-Anteilen	174
5.2.6.6	Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit von der Geldicke.....	175
5.2.6.7	Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums	175
5.2.7	<i>In-vitro</i> -Experimente in 2D-/3D-Zellkultur	176
5.2.7.1	Steriles Arbeiten und Sterilisation	176
5.2.7.2	Verwendete Zelllinien.....	176
5.2.7.3	Auftauen der Zellen	176

5.2.7.4	Kultivierung der Zellen.....	177
5.2.7.5	Einfrieren der Zellen.....	177
5.2.7.6	MTT-Proliferationsassay	178
5.2.7.7	PrestoBlue-Proliferationsassay.....	180
5.2.7.8	Färbung mit CellTracker Green CMFDA	181
5.2.7.9	Färbung mit Phalloidin-FITC und Hoechst 33342.....	181
5.2.7.10	Zelleinbettung in Gelatine-basierten Hydrogelen.....	182
5.2.7.11	Zelleinbettung im PEG- bzw. GelPEG-Hybrid-Hydrogel.....	182
5.2.7.12	Lebend-/Tot-Färbung.....	183
5.2.8	Fabrikationsprozesse	184
5.2.8.1	<i>Direct Laser Writing</i>	184
5.2.8.2	Extrusionsbasiertes <i>3D-Bioprinting</i>	184
5.2.8.3	Subtraktives <i>Photopatterning</i>	185
6	Abkürzungsverzeichnis	187
7	Literaturverzeichnis	197
	Danksagung	223

Zusammenfassung

Der Einzug von additiven Fertigungsmethoden, insbesondere 3D-Druckverfahren, in die Bio- und Medizinwissenschaften bietet großes Potenzial für zukünftige Anwendungen in der Forschung und Industrie durch Schaffung von maßgeschneiderten Gerüststrukturen sowie 3D-Zellkultursystemen für die gezielte Gewebe- und Organrekonstruktion. Da das Verhalten von Zellen maßgeblich durch unterschiedliche Stimuli der 3D-Mikroumgebung beeinflusst wird, sind herkömmliche planare Zellkulturmaterialien, wie z. B. Petrischalen oder Zellkulturflaschen, nur begrenzt in der Lage die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an der Entwicklung geeigneter druckbarer Materialien, um künstliche Mikroumgebungen für Zellen zu schaffen, welche die natürliche extrazelluläre Matrix imitieren und das Zellwachstum in 3D fördern.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem chemisch-biologischen Design von zellfreien Biomaterialien sowie zellenthaltenden Biotinten auf Hydrogel-Basis für verschiedene lichtbasierte Biofabrikationsprozesse. Die zentrale Herausforderung bestand darin, eine Balance zwischen exzellenten Druckeigenschaften und biologischen Anforderungen des Materials zu finden, da diese Eigenschaften häufig nicht miteinander einhergehen. Die Grundlage für die im Rahmen der Arbeit entwickelten 3D-Druckmaterialien bildeten verschiedene Biopolymere, wie Gelatine, Polyethylenglykol und Polycaprolacton, aufgrund ihrer hervorragenden Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit. Da die genannten Biopolymere über keine intrinsische Lichtresponsivität verfügten, wurden sie chemisch mit photoreaktiven Gruppen (Acrylat, Methacrylat, Norbornen, Thiol) modifiziert, um eine räumliche und zeitliche Kontrolle über die Vernetzung der Polymerketten im Zuge des Strukturierungsprozesses zu erzielen. Insgesamt wurden fünf verschiedene Materialkompositionen für additive und subtraktive Fertigungsverfahren entwickelt, darunter *Direct Laser Writing*, *3D-Bioprinting* und *Photopatterning*. Ziel war es, typische Probleme gängiger 3D-Druckmaterialien zu adressieren und durch innovative Ansätze zu lösen. Der jeweilige Fokus beim Materialdesign wurde dabei auf eine verbesserte Biokompatibilität, Bio- und Photoabbaubarkeit, kontrollierte Viskoelastizität sowie Adaptivität gegenüber externen Umwelteinflüssen gelegt.

Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse zu jedem der fünf entwickelten Materialsysteme gegeben:

1. Es wurde ein Photolack auf Basis von bioabbaubarem Polycaprolacton synthetisiert, der in einem laserbasierten 3D-Druckverfahren (*Direct Laser Writing*) zu hochaufgelösten Boxringstrukturen verdruckt wurde. Die auf den Gerüststrukturen kultivierten Fibroblasten wiesen im Vergleich zu einem DLW-Standardlack eine verbesserte Biokompatibilität und Zell-Matrix-Interaktion auf.
2. Das GelMA-Hydrogel ist bis heute eine der meistverwendeten Biotinten im *Tissue Engineering* aufgrund seiner exzellenten biologischen Eigenschaften und Thermo-sensitivität, die im *3D-Bioprinting* ausgenutzt wird. In einer 3D-Biokompatibilitäts- und Diffusionsstudie wurde der Einfluss variierender Polymernetzwerkeigenschaften des GelMA-Hydrogels auf das Zellverhalten und Diffusionsvermögen evaluiert.
3. Die in der Arbeit entwickelte GelNB/GelS-Biotinte, deren Photopolymerisation auf der Thiol-En-Click-Chemie beruht, stellt eine vielversprechende Weiterentwicklung des GelMA-Hydrogels dar. Für das Photoclick-Hydrogel wurden eine verbesserte Biokompatibilität, schnellere Aushärtungszeit und höhere Überlebensrate der verdruckten Fibroblasten im *3D-Bioprinting* nachgewiesen.
4. Ein Hybrid-Hydrogel mit interpenetrierenden kovalenten und elektrostatisch assemblierten Polymernetzwerken bildete die Grundlage für eine umfangreiche strukturelle, rheologische und physiko-mechanische Analyse. Die Verflechtung der Polymernetzwerke führte dazu, dass die vorteilhaften Eigenschaften der Einzelnetzwerke aufsummiert und ihre jeweiligen individuellen Schwachstellen kompensiert wurden.
5. Eine Hydrogelmischung aus PEGMA, PEGDMA und GelMA bildete die Basis für eine photodegradierbare Biotinte, die in einem subtraktiven Fertigungsverfahren unter Verwendung einer Photomaske strukturiert wurde. Der wesentliche Vorteil gegenüber der additiven Fertigung lag in der Vermeidung von quellungs-induzierten Verzerrungen des gedruckten Konstrukts, da der Strukturierungsprozess am bereits gequollenen Hydrogel erfolgte.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten Materialsysteme lieferten damit einen wichtigen Beitrag, um die Bandbreite und Komplexität der zur Verfügung stehenden, druckbaren Materialien für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse zu erweitern.

1 Einleitung

1.1 Die Geschichte des 3D-Drucks

Bereits in seiner Rede zur Lage der Nation im Jahr 2013 hob der amerikanische Präsident Barack Obama die besondere Bedeutung des 3D-Drucks hervor und attestierte der Fertigungsmethode *“the potential to revolutionize”*.¹ Mit kaum einer anderen Schlüsseltechnologie sind derart große Hoffnungen für zukünftige Applikationen verbunden. Für den 3D-Druck-Bereich wird ein jährliches Wirtschaftswachstum von ca. 24 % und ein Anstieg des Markts bis 2024 auf 35 Milliarden US-Dollar prognostiziert.² Dieser Trend spiegelt sich ebenso in der akademischen Forschung wider, die in den letzten Jahren einen exponentiellen Anstieg an Publikationen rund um den 3D-Druck verzeichnete.³⁻⁵ Insbesondere der zunehmende Einzug der additiven Fertigungsverfahren in die Bio- und Medizinwissenschaften eröffnet eine Vielzahl an potenziellen Anwendungsfeldern. Diese umfassen 3D-Zellkulturen anstelle der konventionellen Petrischale, miniaturisierte Organsysteme für eine zielgerichtete Wirkstofftestung, die maßgeschneiderte Rekonstruktion von Geweben und Organen für medizinische Transplantationen bis hin zum Steak aus dem 3D-Drucker.⁶⁻⁹ Gegenwärtige Probleme, wie eine mangelnde Organspendebereitschaft, der hohe Anteil an Tierversuchen in der medizinischen Forschung sowie der weltweit ansteigende Fleischkonsum, scheinen mit der 3D-Drucktechnologie in Zukunft lösbar zu sein.¹⁰⁻¹²

Nicht ohne Grund wird der 3D-Druck daher als Triebkraft der nächsten industriellen Revolution angesehen. Ein Blick zurück in die Geschichte lohnt sich, um Parallelen zu erkennen, bei denen die Entwicklung neuer Technologien revolutionäre Veränderungen in der industriellen Fertigung einläutete. Der Auslöser für die erste industrielle Revolution (*Industrie 1.0*) war die Erfindung der Dampfmaschine im 18. Jahrhundert, welche die Antriebskraft für Eisenbahnen und Dampfschiffe lieferte und breite Anwendung im Kohlebergbau, der Textilindustrie und der Schwerindustrie fand. Den Startschuss für die zweite industrielle Revolution (*Industrie 2.0*) Ende des 19. Jahrhunderts bildete die Einführung der Elektrizität als Antriebskraft sowie die Perfektion der Fließbandfertigung durch Henry Ford im Jahr 1913, die eine Massenproduktion von Gütern ermöglichte. Die dritte industrielle Revolution (*Industrie 3.0*) ab den 1970er Jahren war geprägt vom Einsatz computergestützter

Maschinen, Industrierobotern sowie einer zunehmenden Automatisierung von Prozessen. Aktuell befinden wir uns inmitten der vierten industriellen Revolution (*Industrie 4.0*), deren Ziel eine umfassende Digitalisierung der industriellen Produktion ist.¹³

In diesem Zusammenhang wird häufig die additive Fertigung, insbesondere der 3D-Druck, als eine eigenständige industrielle Revolution angesehen, die auf eine zunehmende Produktindividualisierung anstelle von Massenproduktion abzielt.^{14,15} Einen Überblick über die wichtigsten Meilensteine der additiven Fertigung wird in *Abbildung 1* gegeben.¹⁶ Die Geburtsstunde des 3D-Drucks geht jedoch deutlich weiter zurück in die 1980er Jahre, als die drei grundlegenden Fertigungsverfahren, nämlich die Stereolithographie (SLA), das Selektive Lasersintern (SLS) und das Schmelzschicht-Verfahren (engl. *Fused Deposition Modeling*, FDM) entwickelt wurden.¹⁷ Der Begriff des 3D-Drucks anstelle von *Rapid Prototyping* wurde dagegen erst etwa ein Jahrzehnt später eingeführt. Mit der Bereitstellung von CAD-Programmen (CAD = *Computer Aided Design*) wurde es schließlich möglich, maßgeschneiderte Produkte am Computer zu designen und anschließend via 3D-Druck herzustellen.¹⁸ Der Einzug des 3D-Drucks in die Medizinwissenschaften markierte einen wichtigen Meilenstein, wodurch die Technologie seitdem eine hohe mediale Aufmerksamkeit erfahren hat.¹⁹⁻²¹ Während die Fertigungsmethode zu Beginn lediglich für die Herstellung von Prothesen, Gelenkschrauben oder Ähnliches eingesetzt wurde^{22,23}, ist der 3D-Druck stetig weiter in die Lebenswissenschaften (engl. *Life Science*) vorgedrungen, wodurch es heutzutage möglich ist, Gewebe- und Organ-ähnliche Konstrukte aus Zellen zu erzeugen.⁸ Maßgeblich zu dieser Entwicklung beigetragen hat ein Experiment von Wilson und Boland im Jahr 2003, als Zellen mit einem modifizierten Tintenstrahldrucker der Firma *Hewlett-Packard* (HP) erstmals verdruckt wurden.^{24,25} Auch wenn nur wenige Zellen diesen Vorgang überlebten, gilt dieses Ereignis als die Geburtsstunde des biologischen 3D-Drucks (engl. *3D-Bioprinting*). Ab diesem Zeitpunkt hat der biologische 3D-Druck einen rasanten Aufstieg sowohl in der Forschung als auch in der Industrie erfahren.^{26,27} So entwickelte beispielsweise die kalifornische Firma *Organovo* in Zusammenarbeit mit *Invetech* im Jahr 2009 den ersten kommerziellen 3D-Bioprinter (*NovoGen MMX Bioprinter™*).^{28,29} Darüber hinaus erzielte das Unternehmen entscheidende Erfolge in der Geweberekonstruktion und schuf die ersten künstlichen Blutgefäße mittels *3D-Bioprinting*. Im Jahr 2019 gelang es schließlich einer israelischen Forschungsgruppe der Universität Tel-Aviv das erste künstliche, miniaturisierte Herz aus dem 3D-Drucker

zu erzeugen.³⁰ Dieser Durchbruch gilt als wichtiger Schritt auf dem Weg zu voll funktionsfähigen menschlichen Organen. Eine weiterentwickelte Form des 3D-Drucks stellt der 4D-Druck dar, bei dem neben den drei Raumrichtungen die Zeit als vierte Dimension berücksichtigt wird.^{31,32} So besitzen 4D-Objekte die Fähigkeit, sich über die Zeit zu verändern, wobei die Transformation durch einen bestimmten Stimulus, wie z. B. Licht, Temperatur, Schall oder ein Lösungsmittel, ausgelöst wird.³³⁻³⁵ Bekannteste Vertreter hierbei sind Polymere mit einem Formgedächtnis, bei denen eine induzierte Konformationsänderung eine Biegung, Faltung oder ein Zusammenklappen der 3D-Struktur bewirkt.³⁶⁻³⁸

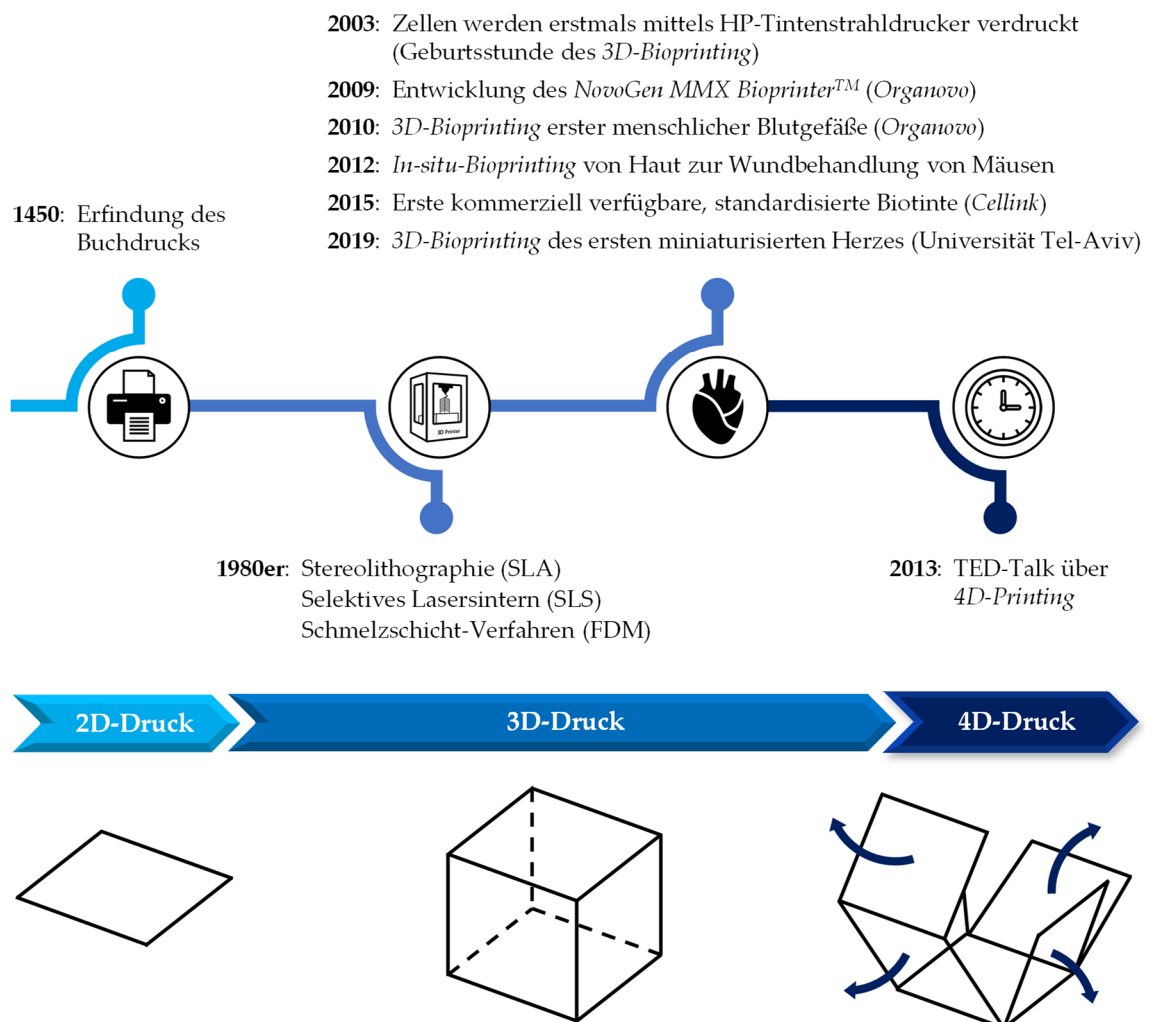


Abbildung 1: Historischer Überblick über die wichtigsten Meilensteine in der Entwicklung von 2D-, 3D- und 4D-Druckverfahren.

1.2 Biofabrikationsprozesse

Mit dem Einzug des 3D-Drucks in die Lebenswissenschaften steht der regenerativen Medizin eine vielversprechende Technologie zur Verfügung, die weit über die Möglichkeiten der konventionellen Gewebeersatzforschung (engl. *Tissue Engineering*) hinausreicht.^{8,39} Im Hinblick auf die Bandbreite an verschiedenen 3D-Drucktechnologien haben in den Lebenswissenschaften insbesondere lichtbasierte Biofabrikationsprozesse eine große Bedeutung erlangt, da Licht eine sehr zellschonende Methode zur Strukturierung darstellt.⁴⁰ Darüber hinaus weisen Photopolymerisationen eine schnelle Reaktionskinetik auf und erlauben bei gezielter Einstrahlung des Lichts eine hohe räumliche und zeitliche Kontrolle des Strukturierungsprozesses.⁴¹ Im Folgenden werden zwei unterschiedliche Ansätze von Biofabrikationsprozessen im *Tissue Engineering* vorgestellt. Bei der klassischen Herangehensweise, hier am Beispiel des 3D-Laserdrucks (engl. *Direct Laser Writing*), erfolgen die Erzeugung der Gerüststruktur und die anschließende Besiedlung mit Zellen zeitlich voneinander getrennt. Im weiterentwickelten Ansatz, dem *3D-Bioprinting*, wird dagegen nur ein einziger Fertigungsschritt benötigt, um die Zellen zusammen mit dem Druckmaterial zur gewünschten Stützstruktur zu verarbeiten. Das Ziel beider Verfahren liegt in der Bereitstellung biokompatibler Stützstrukturen, welche die biologische Selbstassemblierung zu komplexen 3D-Zellverbänden fördern sollen.⁴²⁻⁴⁴

1.2.1 3D-Bioprinting

Trotz des enormen Fortschritts in den vergangenen Jahren steckt der digitale Druck von künstlichem Gewebe für den Einsatz in der Medizin noch in den Kinderschuhen.⁴⁵ Im Gegensatz zu herkömmlichen, kommerziell verfügbaren 3D-Drucktechnologien, die sich als industrielle Fertigungsmethoden etabliert haben, ist das *3D-Bioprinting* deutlich komplexer, da lebende Zellen involviert sind.³⁹ Die größten Herausforderungen liegen in der Anpassung gängiger 3D-Druckverfahren für den biologischen Einsatz, in der Bereitstellung geeigneter druckbarer Materialien sowie in der Erfüllung regulatorischer Anforderungen für die klinische Anwendung.²⁶ Beim *3D-Bioprinting* werden die Zellen mit einem Biomaterial vermischt und die resultierende Biotinte mittels 3D-Druck schichtweise zur gewünschten 3D-Struktur aufgebaut. Dabei wird eine homogene

Verteilung der Zellen in der erzeugten Stützstruktur erreicht. Allgemein wird beim *3D-Bioprinting* zwischen drei verschiedenen Techniken unterschieden (*Abbildung 2*).⁴⁶

Das Laser-induzierte *Bioprinting* (Laser-induzierter Vorwärtstransfer, LIFT) beruht auf einem dreiteiligen System bestehend aus einer Laserquelle, einem Donor- und einem Akzeptorsubstrat.⁴⁶ Ein zellbeladenes Hydrogel wird zunächst unterhalb einer Laserlicht-absorbierenden Schicht des Donorsubstrats positioniert, welches parallel zum Akzeptorsubstrat angeordnet ist. Anschließend werden durch Laserpulse sukzessiv Hydrogeltropfen vom Donorfilm auf das Akzeptorsubstrat transferiert.^{47,48} Vorteile des LIFT-Verfahrens liegen in der hohen Druckauflösung und der Kompatibilität mit sowohl festen als auch flüssigen Phasen.⁴⁹ Allerdings findet die Technik vergleichsweise selten Anwendung aufgrund der hohen Kosten, Einschränkungen hinsichtlich der vertikalen Druckmöglichkeiten und der einhergehenden Zellschädigung durch Laser und entstehende Hitze.²⁸

Beim tintenstrahlbasierten *3D-Bioprinting* erfolgt der Strukturaufbau mittels kleiner Tröpfchen bestehend aus einem Biomaterial und Zellen. Die Tropfen werden dabei entweder thermisch oder mittels eines piezoelektrischen Aktors erzeugt.^{46,49} Das Druckverfahren erlaubt zwar hohe Auflösungen, ist jedoch beschränkt auf den Einsatz niedrigviskoser Biotinten, wodurch das Drucken von Hydrogelen erschwert wird. Weitere Herausforderungen liegen in der Reproduzierbarkeit der Tröpfchen, dem Drucken vertikaler Strukturen und der raschen Zellsedimentation in der Druckkartusche, die zu einem Verstopfen der Düsenöffnung führt.²⁸ Aus diesem Grund können beim Tintenstrahl Druck nur geringe Zelldichten von $< 10^6$ Zellen·mL⁻¹ verdruckt werden.^{8,50}

Der Extrusionsdruck stellt die am weitesten verbreitete *3D-Bioprinting*-Methode dar. Bei dieser Technik wird ein kontinuierlicher Strang der Biotinte mittels pneumatischer oder mechanischer Kräfte (Kolben- oder Schraubmechanismus) durch eine Düse extrudiert.^{46,49} Im Vergleich zum Tintenstrahl Druck weisen die extrudierten Filamente eine höhere Strukturintegrität auf. Allerdings ist der Extrusionsdruck ausschließlich für viskose Lösungen geeignet, wodurch die Materialauswahl limitiert ist.²⁸ Aus diesem Grund existieren diverse Strategien, um die Viskosität der Biotinte entsprechend zu erhöhen. Diese basieren in der Regel auf einer physikalischen Vorvernetzung des Materials in der Druckkartusche, wie z. B. auf einer thermischen Gelierung im Falle von Gelatine⁵¹ oder auf ionischen Wechselwirkungen im Falle von Alginat.⁵² Die Biotinte

wird nach erfolgter Extrusion chemisch, photochemisch oder thermisch vernetzt, wodurch die Zellen in den zylindrischen Filamenten der gedruckten 3D-Struktur eingeschlossen werden. Der wesentliche Vorteil des extrusionsbasierten *3D-Bioprinting* besteht darin, dass hohe Zelldichten verdruckt werden können.⁵⁰ Auch wenn der Extrusionsdruck von den vorgestellten Methoden die geringste Auflösung von ca. 200 μm besitzt, erlaubt die Technik ein einfaches Scale-Up zur Herstellung von Geweben und Organen.⁸

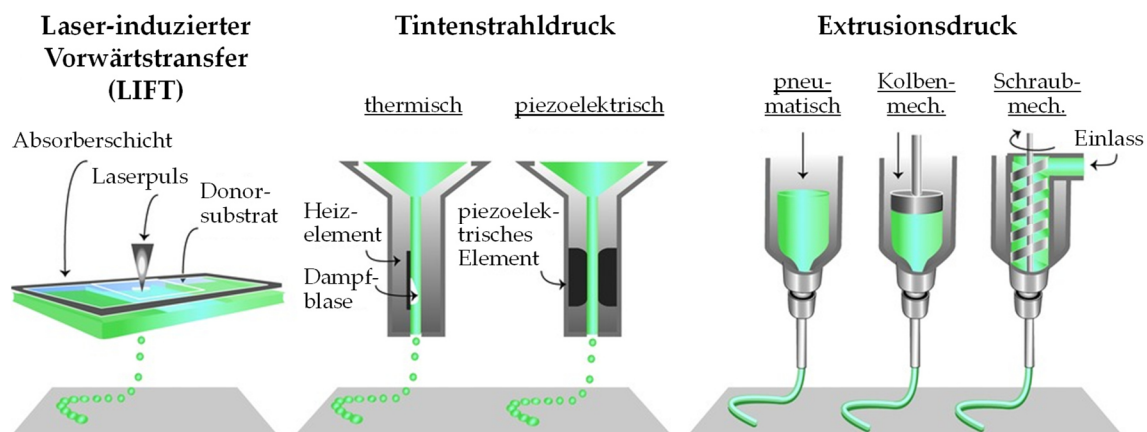


Abbildung 2: Übersicht über verschiedene *3D-Bioprinting*-Techniken: (A) Laser-induzierter Vorwärtstransfer (LIFT), (B) Tintenstrahl-Druck und (C) Extrusionsdruck (modifiziert mit Genehmigung von Malda et al., Copyright© 2013, John Wiley & Sons).⁴⁶

1.2.2 Direct Laser Writing

Der 3D-Laserdruck (*Direct Laser Writing*, DLW) ist im Vergleich zum *3D-Bioprinting* das historisch ältere Verfahren, das bereits 1997 entwickelt wurde⁵³, jedoch erst in den letzten Jahren vermehrt Anwendung in den Lebenswissenschaften gefunden hat.^{54,55} Es handelt sich um ein Laser-Lithographie-Verfahren, das die höchste Auflösung aller 3D-Drucktechnologien besitzt. Mit der Methode lassen sich auf diese Weise hochaufgelöste Mikrostrukturen nahezu beliebiger Geometrie erzeugen, die anschließend mit Zellen besiedelt werden können. Darüber hinaus lassen sich überhängende sowie freistehende Strukturelemente im Gegensatz zu extrusionsbasierten Druckverfahren ohne die Notwendigkeit eines Opfermaterials herstellen.^{56,57} Der Materialbedarf beim DLW ist sehr gering und beträgt nur einige Mikroliter. Für das Strukturierungsverfahren wird ein kleiner Flüssigkeitstropfen des Photolacks bestehend aus einem photosensitiven Material sowie einem Photoinitiator auf ein Glassubstrat aufgebracht. Durch die

selektive Einstrahlung eines Femtosekundenlasers wird eine hochgradig gezielte Photopolymerisation der Monomere innerhalb des Tropfens induziert. Aus der relativen Veränderung der Position des Glassubstrats zum Laserfokus resultiert der Aufbau des 3D-Gerüsts mit Strukturmerkmalen bis in den Submikrometerbereich (ca. 100 nm).⁵⁸ Im anschließenden Entwicklungsprozess wird die Probe in ein geeignetes Lösungsmittel getaucht, durch welches nicht polymerisierte Photomomere entfernt werden. Infolgedessen bleibt lediglich die photochemisch vernetzte 3D-Mikrostruktur auf dem Glassubstrat zurück (Abbildung 3).⁵⁹

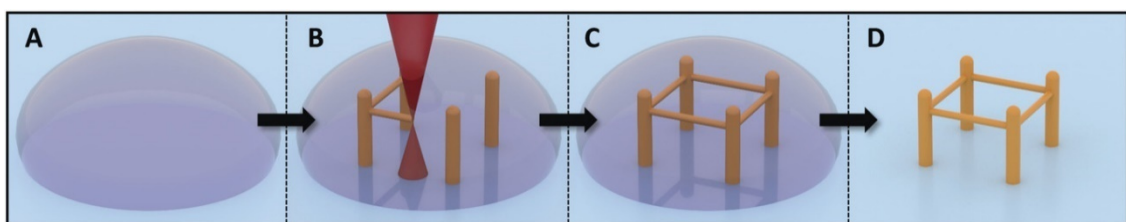


Abbildung 3: Schematische Übersicht über den Herstellungsprozess von 3D-Mikrostrukturen mittels *Direct Laser Writing*. (A) Ein Tropfen des photosensitiven Materials wird auf einem Glassubstrat positioniert. (B) - (C) Generierung einer exemplarischen Boxringstruktur durch gezielte Einstrahlung eines Femtosekundenlasers. (D) Erhalt der fertigen 3D-Mikrostruktur auf dem Glassubstrat nach Entfernung von nicht polymerisierten Photomonomeren durch einen Waschschrift (Gräfe et al., 2019, John Wiley & Sons, Creative Common License).⁵⁹

Die hohe Auflösung beim DLW ist auf die Zwei-Photonen-Absorption (2PA) zurückzuführen, bei der simultan zwei Photonen durch den Photoinitiator absorbiert werden müssen, um die notwendige Energie für den Übergang in den angeregten Zustand bereitzustellen.⁶⁰ Während bei der Einzelphoton-Absorption die Wahrscheinlichkeit für den Übergang vom elektronischen Grundzustand in den angeregten Zustand linear von der Intensität des Lichts abhängt, beruht sie bei der Zwei-Photonen-Absorption auf einem quadratischen Zusammenhang. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit bei niedrigen Intensitäten sehr gering, dass eine Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) induziert wird; sie steigt aber mit zunehmender Intensität quadratisch an. Diese Eigenschaft wird im DLW ausgenutzt, da nur im Laserfokus ein ausreichend hoher Photonenfluss für die 2PP gegeben ist. Durch den Einsatz einer Laserintensität, die knapp über dem Schwellenwert der Intensität liegt, bei der eine Photopolymerisation stattfindet, werden Auflösungen im Submikrometerbereich erreicht. Neuere Ansätze, wie der STED-inspirierte 3D-Laserdruck (STED = Abregung durch stimulierte Emission, engl. *stimulated emission depletion*) erlauben zudem, die

natürliche Beugungsgrenze von Licht (Abbé-Limit) zu unterschreiten und Auflösungen im Bereich weniger Nanometer zu erzielen.^{61,62} In Analogie zum Pixel in einem 2D-Bild wird die höchstmögliche räumliche Auflösung durch die Größe des Voxels, des kleinsten polymerisierbaren Volumenelements, bestimmt.^{56,59}

1.3 Druckbare Materialien

Für die beiden vorgestellten Biofabrikationsprozesse (*3D-Bioprinting* und DLW) ergeben sich aufgrund des stark variierenden Auflösungsvermögens unterschiedliche Anwendungen in den Lebenswissenschaften. Im DLW besteht das Ziel in der Bereitstellung kleinster Struktureinheiten, um das Verhalten einzelner Zellen oder kleiner Zellverbände zu untersuchen.^{54,55} Das *3D-Bioprinting* strebt dagegen eine gezielte Geweberekonstruktion auf makroskopischer Ebene an, indem Zellen gemeinsam mit einem geeigneten Material zu den gewünschten Strukturen verdruckt werden.⁶³ Der größte Unterschied der beiden Techniken liegt in der Herangehensweise, wie die Besiedlung der gedruckten Stützstruktur mit Zellen erfolgt. Daher sind die an das Druckmaterial gestellten Anforderungen höchst verschieden und vor allem davon abhängig, ob zellenthaltende oder zellfreie Biomaterialien zum Einsatz kommen.^{64,65}

1.3.1 Biomaterialien

Als Biomaterialien werden zellverträgliche Materialien bezeichnet, die in direktem Kontakt mit Zellen oder biologischem Gewebe stehen.^{66,67} In der Medizin haben sie breite Anwendung als Medizinprodukte in Form von Implantaten oder Prothesen gefunden; in den Biowissenschaften vor allem als Stützstrukturen in der 3D-Zellkultur.^{68,69} Die Besiedlung einer zuvor hergestellten Gerüststruktur mit Zellen stellt eine weit verbreitete Technik im klassischen *Tissue Engineering* dar.⁷⁰ Die Stützstruktur bildet eine definierte Mikroumgebung für Zellen und definiert die äußere Form des Zellagglomerats. Im Laufe der Kultivierung wachsen die ausgesäten Zellen in die vorgegebene Struktur hinein, interagieren mit der künstlichen Matrix und bilden schließlich einen 3D-Zellverband aus.⁷¹ Die an das Biomaterial gestellten Anforderungen sind vergleichsweise gering, da der 3D-Druckprozess von der Zellaussaat zeitlich entkoppelt ist. Dies erhöht die Auswahl der zur Verfügung stehenden Materialien und

Drucktechnologien immens.⁷²⁻⁷⁴ So müssen das Vorläuferpolymer und der Verarbeitungsschritt weder zellverträglich sein noch unter sterilen Bedingungen erfolgen. Entscheidend ist lediglich die Biokompatibilität des prozessierten Biomaterials. Der wesentliche Vorteil des zweistufigen Biofabrikationsprozesses liegt darin, dass durch die fehlende zelluläre Komponente keine Kompromisse hinsichtlich der eingesetzten Drucktechnologie und des Biomaterials eingegangen werden müssen. Eine hohe Monomer-Toxizität sowie harsche Temperatur- oder Strahlungsbedingungen während des Druckvorgangs stellen daher kein Problem dar. Des Weiteren können wasserunlösliche Biopolymere oder Photomomere für den 3D-Druck herangezogen werden. So können beispielsweise Thermoplaste auf Basis von Polyglykolid, Polylactid oder Polycaprolacton im Mikroextrusionsverfahren durch Erhitzung auf oberhalb der Glasübergangstemperatur zu den gewünschten Stützstrukturen verarbeitet werden.^{75,76} In Laser-Lithographie-Verfahren wie das vorgestellte DLW können dagegen toxische Acrylat-basierte Photolacke eingesetzt werden, wie z. B. Pentaerythritoltriacrylat, das durch einen Femtosekundenlaser zu hochaufgelösten Mikrostrukturen hoher Formstabilität polymerisiert wird.^{77,78} Nach erfolgter Prozessierung werden biokompatible Gerüststrukturen aus den jeweiligen Thermoplasten bzw. Photopolymeren erhalten, welche die Grundlage für eine anschließende Zellbesiedlung bilden.

1.3.2 Biotinten

Im *3D-Bioprinting* werden die zeitlich entkoppelten Biofabrikationsschritte (3D-Druck und Zellbesiedlung) zu einem einzigen Fertigungsschritt zusammengefasst. Die Zellen werden im zu verdruckenden Material direkt suspendiert (*Abbildung 4*). Die entstehende Materialmischung, die sich aus einer zellulären Komponente und einem wasserlöslichen Biomaterial zusammensetzt, wird als Biotinte bezeichnet.⁶⁴ Als Biomaterial fungieren in der Regel Hydrogele, deren hydrophile Polymernetzwerke Wassermengen bis zum Tausendfachen ihres Trockengewichts aufnehmen können, ohne sich dabei aufzulösen.⁷⁹ Der hohe Wassergehalt sowie die hohe Porosität sind ideale Voraussetzungen für die Zellverkapselung und stellen den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und anderen wasserlöslichen Stoffen im Hydrogelnetzwerk sicher.⁸⁰ Aufgrund ihrer exzellenten Zellkompatibilität und gewebeähnlichen mechanischen Eigenschaften haben Hydrogele zahlreiche biomedizinische Anwendungen gefunden und bilden die Grundlage für

zellbasierte Biotinten im *3D-Bioprinting*.^{81,82} Die Bandbreite an verfügbaren Hydrogelen ist in den letzten Jahren stetig gestiegen, um den wachsenden Anforderungen im *Tissue Engineering* gerecht zu werden. Allgemein wird zwischen natürlichen, synthetischen und semi-synthetischen Hydrogelen unterschieden.^{83,84}

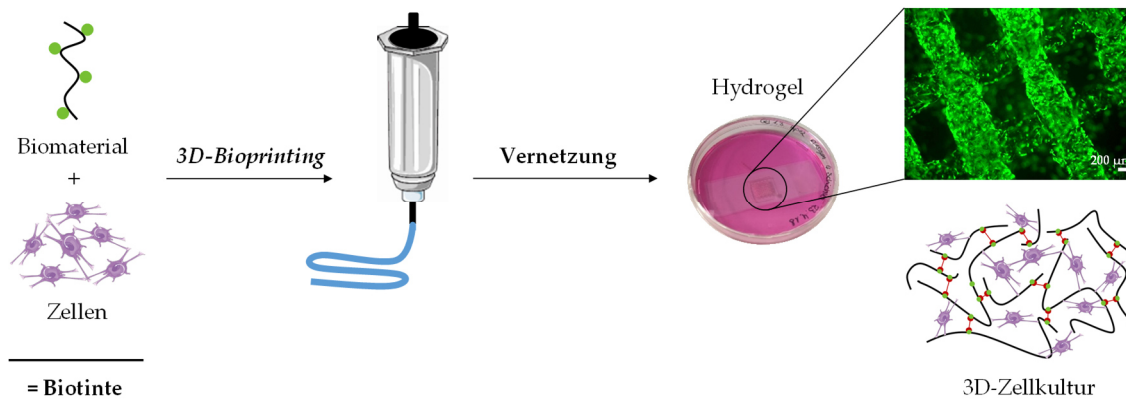


Abbildung 4: Schematische Darstellung des *3D-Bioprinting*-Prozesses. Eine zellhaltige Biotinte wird durch Suspension der Zellen in der flüssigen Hydrogelvorläuferlösung hergestellt. Nach dem extrusionsbasierten Druckvorgang wird die Biotinte chemisch zum Hydrogel vernetzt, wodurch die Zellen in der 3D-Stützstruktur eingeschlossen werden. (Erstellt in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempter).

Natürliche Polymere, wie z. B. Hyaluronsäure, Chitosan, Alginat, Kollagen, Gelatine, Fibrin oder Matrigel™, zeichnen sich durch eine hervorragende Biokompatibilität aus. Aufgrund ihrer Extrazellulärmatrix (EZM)-ähnlichen Eigenschaften sind die auf ihnen basierenden Hydrogele bestens für die Zellverkapselung geeignet. Allerdings besitzen natürliche Hydrogele nur eine schwache mechanische Stabilität und lösen teilweise immunologische Reaktionen aus. Ihre mangelnde Strukturintegrität erschwert die Anwendung im *3D-Bioprinting*, da der Gelierungsprozess ausschließlich auf physikalischen Prinzipien beruht, wodurch die Aushärtung zum Hydrogel vergleichsweise langsam erfolgt und nur begrenzt steuerbar ist.⁸³⁻⁸⁵

Der Vorteil von Hydrogelen auf Basis synthetischer Polymere, wie Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol oder Pluronic®, liegt in einer hohen Kontrolle und Reproduzierbarkeit der Polymernetzwerkeigenschaften, da die Polymersequenz, die Kettenlänge und der Vernetzungsgrad im Rahmen der Synthese exakt festgelegt werden können. Die genannten Polymere sind zwar biokompatibel, allerdings mangelt es ihnen an bioaktiven Erkennungssequenzen, denen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Migration und Biodegradation zukommt.⁸³⁻⁸⁵

Aus diesem Grund haben insbesondere semi-synthetische Hydrogele einen hohen Stellenwert im *Tissue Engineering* erlangt, da sie die Vorteile der natürlichen und synthetischen Polymere vereinen. Die Grundlage bilden natürliche Biopolymere, die mit geeigneten funktionellen Gruppen modifiziert werden, um kontrollierte Polymerisationseigenschaften zu erzielen.⁸³⁻⁸⁵ Für den Einsatz im *3D-Bioprinting* sind semi-synthetische Hydrogele mit einer schnellen Polymerisationskinetik und einer hohen Zellkompatibilität von großem Interesse. Am besten geeignet sind hierfür photopolymerisierbare Hydrogele, deren funktionalisierte Polymervorläufer mit Hilfe von Licht schnell und unter milden Bedingungen vernetzt werden können.⁴⁰ Zu den wichtigsten photoreaktiven Gruppen zählen Methacrylate^{86,87}, Norbornene^{88,89} oder Thiole^{90,91}, deren Vernetzung nach einem radikalischen Mechanismus verläuft. Ihre Photopolymerisation erfordert keine zusätzlichen toxischen Chemikalien bis auf einen Photoinitiator, der in niedrigen Konzentrationen (< 0,5 % (w/v)) zugegeben und bei einer geeigneten Wellenlänge angeregt wird.⁴⁰

Für den Einsatz der semi-synthetischen Hydrogele als Biotinte im *3D-Bioprinting* müssen eine Reihe verschiedener Einflussfaktoren berücksichtigt werden, welche die Druckqualität und Überlebensfähigkeit der Zellen determinieren (*Abbildung 5*).⁴⁶ Über den gesamten Biofabrikationsprozess werden die Zellen in der Biotinte diversen schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, beginnend bei der Präparation der Biotinte über den Druckprozess selbst bis hin zur anschließenden photochemischen Vernetzung zum Hydrogel. Nach Suspension der Zellen in der flüssigen Biotinte wirkt sich insbesondere die Toxizität der unvernetzten Photomomere stark auf die Überlebensrate der Zellen aus.⁹² Daher muss eine hohe Biokompatibilität der flüssigen Hydrogelvorläuferlösung über einen Zeitraum von Minuten bis einigen Stunden gegeben sein. Um während des Druckprozesses sowohl den auf die Zellen wirkenden Scherstress zu minimieren als auch eine gute Verdruckbarkeit der Biotinte zu gewährleisten, sind scherverdünnende Eigenschaften der Hydrogelvorläuferlösung essenziell.⁹³⁻⁹⁵ Die erreichbare Druckauflösung im extrusionsbasierten *3D-Bioprinting* wird vor allem von der Viskosität und der benötigten Gelierungszeit der Biotinte sowie von der verwendeten Dosiernadel bestimmt.⁹⁶ Ist die Zeitspanne zwischen Deposition der Biotinte und Aushärtung zum Hydrogel zu groß, führt dies zum Verlaufen der Hydrogellösung und zum Verlust der Strukturintegrität. Da bei der additiven Fertigung ein schichtweiser Strukturaufbau erfolgt, besitzt die benötigte Bestrahlungsdauer für jede gedruckte Schicht einen erheblichen Einfluss auf die Herstellungszeit und die

UV-Exposition der Zellen.⁹⁷ Nach Abschluss des Biofabrikationsprozesses spielen für die weitere Zellkultivierung und Geweberekonstruktion die Polymernetzwerkeigenschaften der resultierenden Hydrogele eine wichtige Rolle. Diese bestimmen die strukturellen und physiko-mechanischen Eigenschaften der Hydrogele, welche Formstabilität, Viskoelastizität, Quellbarkeit, Porengröße, Diffusionsvermögen, Bioaktivität und Adaptivität umfassen.^{98,99}

Die ideale Biotinte, die alle geforderten Eigenschaften erfüllt und universal für jeden Zelltyp einsetzbar ist, existiert bis dato noch nicht und wird es auch in absehbarer Zukunft mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht geben. Trotz der stetig steigenden Komplexität und Anzahl der entwickelten Biotinten müssen die spezifischen Präferenzen verschiedener Zelltypen durch die jeweilige Materialkomposition gezielt adressiert werden. Dennoch können allgemeine Strategien entwickelt werden, die sich leicht auf andere Materialklassen übertragen lassen, wie beispielsweise die Funktionalisierung von Biopolymeren mit bestimmten photoreaktiven oder bioaktiven Gruppen, die Inkorporation zusätzlicher Additive in die Biotinte zur Verbesserung der Druckeigenschaften oder der Einsatz von Mehrkomponenten-Hydrogelen zur Erhöhung der Materialkomplexität. Dem ungebremsten Fortschritt in der Entwicklung innovativer Biomaterialien und Biotinten über die vergangenen beiden Jahrzehnte ist es zu verdanken, dass der 3D-Druck mittlerweile nicht nur einen hohen medialen, sondern auch realen Stellenwert in den Medizin- und Biowissenschaften erlangt hat.

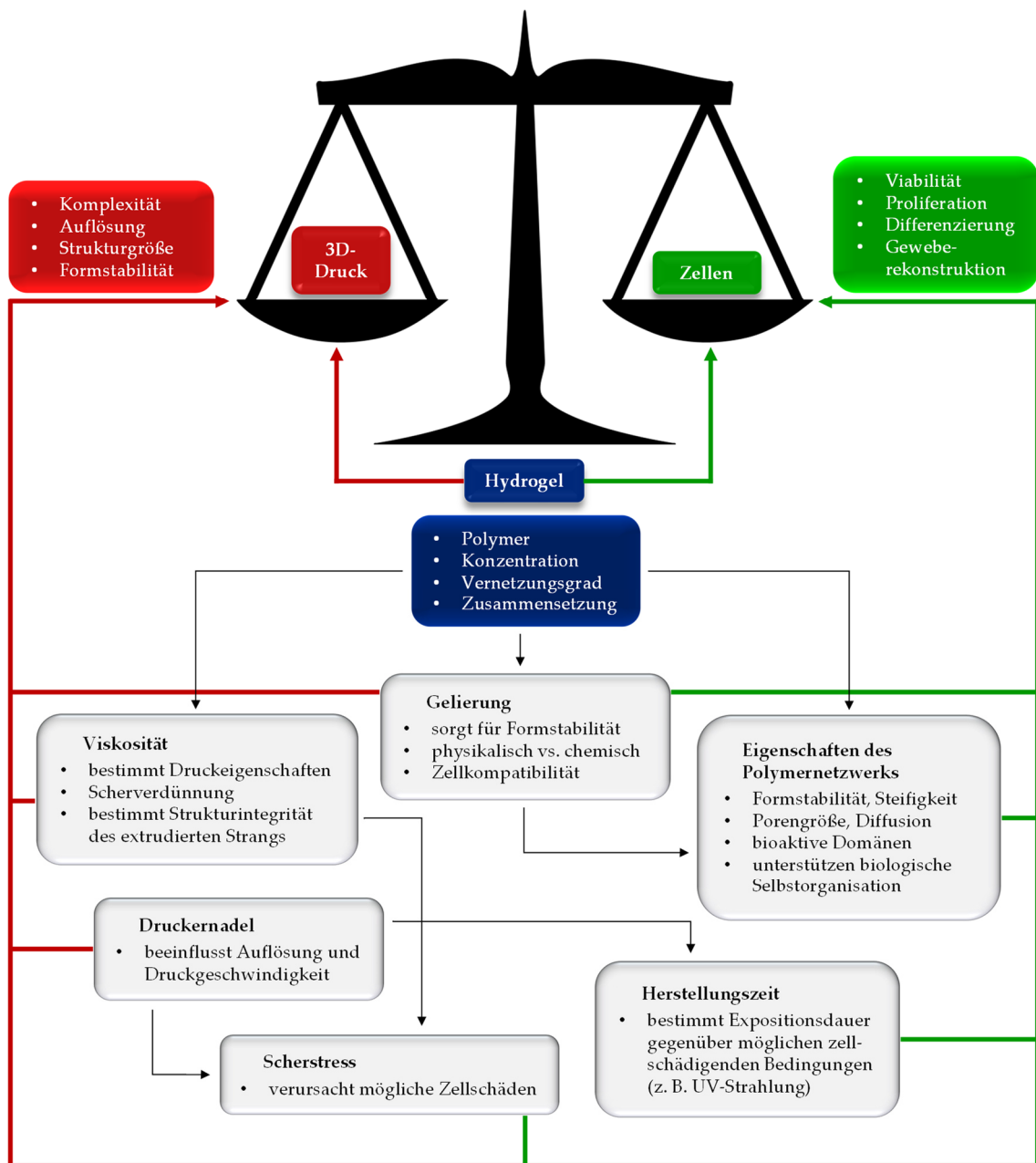


Abbildung 5: Übersicht über die verschiedenen Einflussfaktoren und ihre Beziehungen, die beim chemisch-biologischen Design geeigneter Biotinten für das extrusionsbasierte 3D-Bioprinting berücksichtigt werden müssen. Die Herausforderung besteht darin, eine Balance zwischen exzellenten biologischen und druckspezifischen Eigenschaften zu finden (modifiziert nach Malda *et al.*).⁴⁶

2 Zielsetzung

Durch die steigenden Anforderungen im *Tissue Engineering* hinsichtlich des Materialdesigns und der 3D-Drucktechnologie gibt es einen zunehmenden Bedarf an der Entwicklung innovativer druckbarer Biomaterialien und Biotinten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher im chemisch-biologischen Design geeigneter Materialkompositionen für verschiedene lichtbasierte Biofabrikationsprozesse (*Abbildung 6*). Die Grundlage hierfür sollten Gelatine, Polyethylenglykol und Polycaprolacton bilden, die chemisch mit diversen funktionellen Gruppen so modifiziert wurden, dass eine ausgewogene Balance zwischen 3D-Verdruckbarkeit und Biokompatibilität erzielt wurde. Die synthetisierten Materialien sollten umfassend charakterisiert, biologisch evaluiert und in additiven sowie subtraktiven Fertigungsmethoden erprobt werden. Im Vergleich zu herkömmlichen Druckformulierungen sollten die im Rahmen der Arbeit entwickelten Materialsysteme vorteilhafte Eigenschaften besitzen, wie eine verbesserte Biokompatibilität, Bio- bzw. Photoabbaubarkeit, kontrollierte viskoelastische Eigenschaften, Adaptivität gegenüber externen Umwelteinflüssen sowie eine höhere Zellüberlebensrate im 3D-Druck. Die Materialsysteme sollten damit einen wichtigen Beitrag leisten, um die Bandbreite und Komplexität der zur Verfügung stehenden Materialien für 3D-Druckverfahren im *Tissue Engineering* zu erweitern und auf die jeweiligen Bedürfnisse zuzuschneiden.

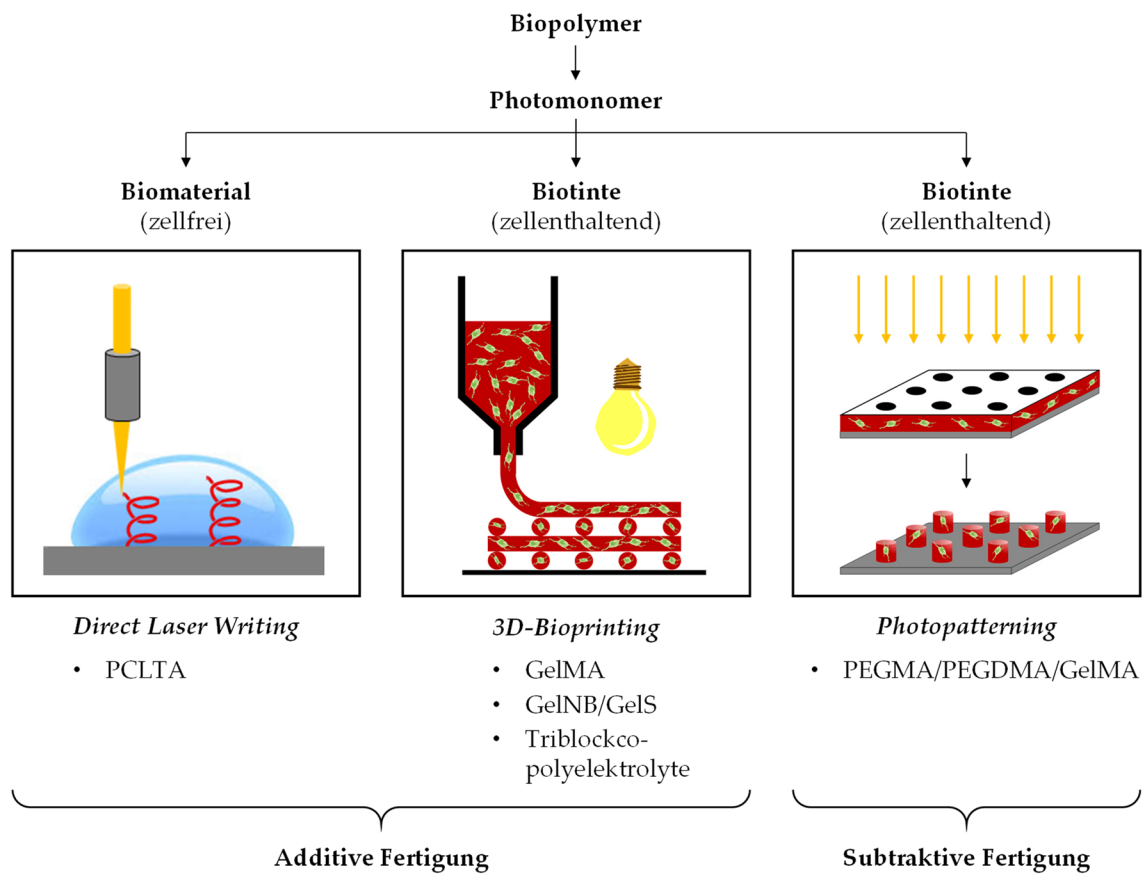


Abbildung 6: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Materialien und eingesetzten Biofabrikationsmethoden.

3 Ergebnisse

3.1 Biomaterialien und Biotinten für additive Fertigungsverfahren

Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich der Materialentwicklung für additive Fertigungsverfahren mit biologischer sowie biomedizinischer Anwendung. Der zunehmende Einzug additiver Fertigungsverfahren in den Bereich der Gewebersatzforschung ermöglicht es, maßgeschneiderte 3D-Stützstrukturen für die Zellkultivierung bereitzustellen.^{54,55,62} Diese fungieren als vielversprechende Alternativen zu konventionellen 2D-Zellkulturmaterialien und als Unterstützung für die gezielte Geweberekonstruktion. Für die biologische Anwendung haben sich insbesondere lichtbasierte Fabrikationsprozesse, wie das *3D-Bioprinting* (3BP) und das *Direct Laser Writing* (DLW) durchgesetzt, da sie eine kontaktlose Strukturierung des Materials erlauben und in der Regel unter biologisch sehr milden Bedingungen ablaufen.¹⁰⁰ Durch die selektive Einstrahlung von Licht geeigneter Wellenlänge wird eine räumlich und zeitlich begrenzte Photopolymerisation des Biomaterials bzw. der Biotinte induziert.⁶⁰ Da biologisch relevante Polymere jedoch keine intrinsische Photosensitivität besitzen, muss eine chemische Modifizierung mit geeigneten photoreaktiven Gruppen vorgenommen werden, um die Biopolymere den genannten Fertigungsverfahren zugänglich zu machen.^{101,102}

3.1.1 Photolacke für das *Direct Laser Writing*

Geeignete photopolymerisierbare Materialien für das DLW (sog. Photolacke) müssen für ihre Verschreibbarkeit mittels Zwei-Photonen-Absorption (2PA) eine Reihe von Voraussetzungen erfüllen. Hierzu zählen insbesondere eine hohe Dichte an photoreaktiven Gruppen für eine schnelle Vernetzung sowie eine gute Löslichkeit des Monomers im Falle eines Feststofflacks in einem geeigneten Lösungsmittel. Ein typischer Photolack setzt sich aus einem oder mehreren photopolymerisierbaren Monomeren sowie einem 2PA-Photoinitiator, wie z. B. Irgacure 369, Irgacure 819, ITX oder DETC zusammen.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Die Vernetzung der Monomere hängt dabei von den funktionellen Gruppen ab und kann über verschiedene Reaktionsmechanismen erfolgen

wie freie radikalische Polymerisation, Thiol-En oder Thiol-In Chemie, Cycloaddition (z. B. photoinduzierte Diels-Alder-Reaktion) oder Photodimerisierung.¹⁰⁶ Die größte Bedeutung haben vor allem multifunktionale Acrylate, wie z. B. Pentaerythritoltriacrylat (PETA) oder Pentaerythritoltetraacrylat (PETTA), erlangt aufgrund ihrer kommerziellen Verfügbarkeit, einfachen Handhabung, hohen Polymerisationsgeschwindigkeit sowie exzellenten Druckauflösung.¹⁰⁴ Ihre Photopolymerisation führt zu mechanisch stabilen Strukturen mit geringer Schrumpfung sowie einer hohen Temperatur- und Lösungsmittelresistenz.

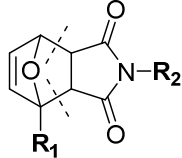
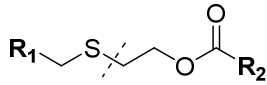
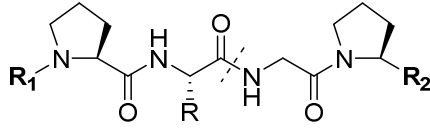
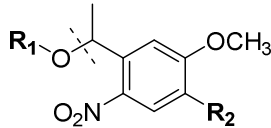
Neben zahlreichen Anwendungen in den Bereichen von *Rapid Prototyping*, Mikrofluidik, Mikromechanik, Optik und Photonik stellt das DLW eine vielversprechende und leistungsfähige Fertigungsmethode in den Biowissenschaften dar, um künstliche Mikroumgebungen zu schaffen, welche die Extrazellulärmatrix (EZM) imitieren.^{62,107} Die Wahl der Größenabmessungen und Geometrie der Gerüststruktur bietet die Möglichkeit, Wachstum und Ausrichtung der Zellen in einer definierten 3D-Umgebung zu steuern bzw. verschiedene Zelltypen entsprechend ihrer Anordnung im zu simulierenden Gewebe zu positionieren. Die hohe Auflösung von DLW bis in den Submikrometerbereich erlaubt es, das Verhalten einzelner Zellen oder kleiner Zellverbände in einer maßgeschneiderten Mikroumgebung zu studieren.⁵⁵ Die wachsende Bedeutung von DLW in der Biologie hat in den letzten Jahren die Entwicklung biokompatibler Photolacke stark vorangetrieben. Typischerweise wird dabei eine Oberflächenbeschichtung des hydrophoben Polymergerüsts mit Biomolekülen, wie beispielsweise RGD-Peptidsequenzen, Proteinen der EZM (z. B. Kollagen) oder Wachstumsfaktoren, vorgenommen.⁶² Im einfachsten Fall erfolgt die Biofunktionalisierung durch Eintauchen der Stützstruktur in eine Proteinlösung, was zu einer Physisorption der Biomoleküle an der hydrophoben Polymeroberfläche führt.⁵⁵ Neuere Ansätze zielen verstärkt auf eine kontrollierte Modifizierung der Gerüststruktur ab, um die Zellausrichtung aktiv zu steuern.¹⁰⁸ Klein *et al.* haben beispielsweise eine DLW-Struktur bestehend aus zwei Komponenten entwickelt, bei der ein proteinabweisendes Grundgerüst (Polyethylenglykoldiacrylat) gezielt mit einem proteinbindenden Polymer (Ormocomp®) funktionalisiert wurde, welches als Ankerpunkt für die anschließende Proteinadsorption fungierte.⁷⁷

3.1.1.1 Degradierbare Photolacke

Ein wesentliches Ziel der DLW-Forschung liegt darin, die Technologie und die zugehörigen Photolacke dahingehend zu optimieren, dass verbesserte Auflösungen, höhere Druckgeschwindigkeiten sowie größere 3D-Mikrostrukturen erreicht werden. Aufgrund der irreversiblen Vernetzung der Monomere während des Schreibprozesses werden in der Regel starre Gerüststrukturen erhalten, die kein Reaktionsvermögen gegenüber externen Stimuli aufweisen. Für die Anwendung in den Biowissenschaften besteht jedoch ein zunehmendes Interesse an adaptiven Eigenschaften der Photolacke gegenüber diversen Einflüssen mechanischer, chemischer, elektrischer, optischer oder thermischer Natur. Hierzu zählt im Besonderen auch die Abbaubarkeit des Photolacks, die je nach Wahl des Materials und der Degradationsbedingungen entweder unspezifisch oder gezielt lokal abläuft.⁵⁹ Abbaubare Photolacke für das DLW basieren auf der Inkorporation labiler Bindungen im Photomonomer, deren Spaltung durch unterschiedliche Umwelteinflüsse induziert werden kann, wie z. B. durch Temperatur¹⁰⁹, Chemikalien^{110,111}, Enzyme¹¹² oder Licht¹¹³ (*Tabelle 1*). Kürzlich haben Batchelor *et al.* einen „Zwei-in-Eins“ Photolack entwickelt, bei dem Licht nicht nur einen Stimulus für die Zwei-Photonen-Polymerisation (900 nm) darstellt, sondern auch eine anschließende selektive Photodegradation der DLW-Struktur über 2PA (700 nm) ermöglicht.¹¹³ Eine solche Kombination additiver und subtraktiver Verfahren fördert die mögliche Komplexität der resultierenden 3D-Strukturen.

Im biologischen Kontext besteht die besondere Herausforderung für degradierbare Photolacke darin, dass deren Auflösungsprozess sowohl unter biokompatiblen Bedingungen abläuft als auch zu Abbauprodukten führt, die keine toxische Wirkung auf Zellen besitzen. Idealerweise sollte die gedruckte 3D-Stützstruktur lediglich als transiente, künstliche Matrix fungieren, an der Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung gefördert werden. Im Laufe der Kultivierung bilden Zellen zunehmend eigene EZM, wodurch die DLW-Gerüststruktur schließlich obsolet wird. Der Abbauprozess der DLW-Struktur muss jedoch auf die EZM-Produktion zeitlich so abgestimmt sein, dass der Zellverband dabei nicht in seiner strukturellen Anordnung aufgelöst wird. Das erste Kapitel befasst sich mit dem chemisch-biologischen Design eines bioabbaubaren Photolacks und umfasst dessen Synthese, Biokompatibilitäts- und Abbaustudien sowie eine kritische Evaluation der Eignung des Photolacks als bioabbaubare DLW-Gerüststruktur.

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene Arten labiler Linker zur Generierung abbaubarer Mikrostrukturen im DLW (modifiziert nach Grafe *et al.*⁵⁹).

Stimulus	Spaltbare Gruppe	Spaltung	Lit.
Temperatur		105 °C (in Furfurylalkohol)	[109]
Chemikalie			
• Reduktion	$R_1-S-S-R_2$	DTT	[110]
• Addition		Ethanolamin	[111]
Enzym		Kollagenase Typ II	[112]
Licht		365 nm (1PA) 700 nm (2PA)	[113]

3.1.1.2 Polycaprolactontriacrylat

Bioabbaubare Polymere wie Polyglykolid (PGA), Polylactid (PLA) und Polycaprolacton (PCL) haben aufgrund ihrer ausgezeichneten Biokompatibilität in der Medizin schon heute breiten Einsatz als künstliche Implantate gefunden, wie z. B. Interferenzschrauben aus PLA.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Mit steigender Hydrophobizität der Polymere von PGA < PLA < PCL verlangsamt sich die jeweilige Abbaugeschwindigkeit von wenigen Wochen über Monate bis hin zu mehreren Jahren.^{117,118} Der Grund hierfür liegt in der abnehmenden Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffes, wodurch die hydrolytische Spaltung verzögert wird. Verläuft der Abbau des Biopolymers relativ schnell wie im Falle von PGA oder PLA, wurde in zahlreichen Studien von einer Azidifikation des umliegenden Gewebes berichtet, wodurch inflammatorische Reaktionen hervorgerufen wurden.¹¹⁹⁻¹²¹ Daher bildete PCL, dessen Abbauprozess zwar langsamer abläuft, jedoch mit einer höheren Biokompatibilität verbunden ist, das zugrundeliegende Polymer für die Entwicklung eines bioabbaubaren Photolacks für das DLW.

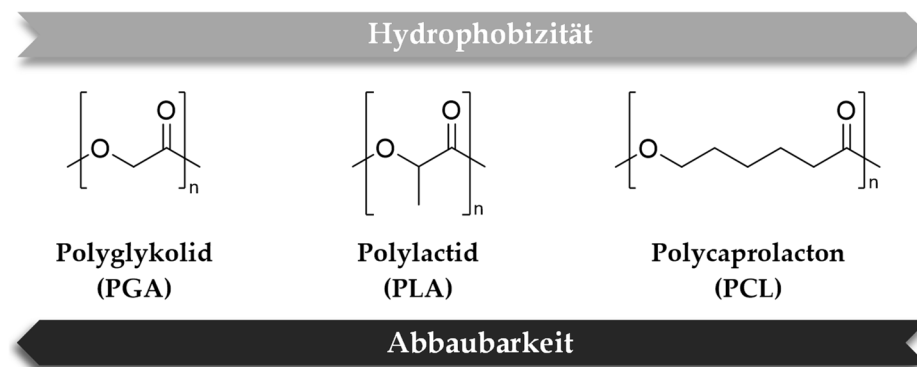


Abbildung 7: Chemische Strukturen hydrolytisch degradierbarer Polymere, deren Abbaurate mit steigender Hydrophobizität abnimmt.

Bei den drei genannten Polymeren handelt es sich um Thermoplaste, weswegen der FDM-basierte (engl. *Fused Deposition Modeling*, Schmelzschichtung) 3D-Druck die gängigste Methode zur Strukturierung der Materialien darstellt.¹²²⁻¹²⁴ Allerdings konnte in der Literatur PLA durch Modifikation mit Methacrylat-Gruppen bereits lichtbasierten 3D-Druckverfahren wie der Stereolithographie (SLA) sowie Multiphotonen-Lithographie (MPL) zugänglich gemacht werden, um verbesserte Auflösungen zu erreichen.^{125,126}

Da DLW das höchste Auflösungsvermögen aller additiven Fertigungsverfahren besitzt, bestand im Folgenden das Ziel, einen geeigneten PCL-basierten Photolack zu entwickeln. Um eine ausreichend hohe Dichte an polymerisierbaren Gruppen für das DLW zu gewährleisten, wurde niedermolekulares PCL ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) als Edukt verwendet, das mit maximal drei Acrylat-Gruppen pro Photomonomer modifiziert wurde. Die Synthese von Polycaprolactontriacrylat (PCLTA) erfolgte aus Polycaprolactontriol durch Endfunktionalisierung der freien Hydroxylgruppen mittels Acryloylchlorid (*Abbildung 8 A*). Durch Verwendung eines Überschusses an Acryloylchlorid (3,75 Äq. pro OH-Gruppe) wurde eine vollständige Konversion der Hydroxylgruppen sichergestellt, wie dem NMR-Spektrum in *Abbildung 8 B* zu entnehmen ist. Das niedrige Molekulargewicht führte dazu, dass das Produkt flüssig war, sodass die Präparation des Photolacks kein zusätzliches Lösungsmittel erforderte. Das synthetisierte Photomonomer bildete die Grundlage für zwei Photolacke, die sich in ihrem jeweiligen Vernetzungsmechanismus unterschieden (*Abbildung 9*). Photolack 1 (Acrylat-basiert) bestand lediglich aus PCLTA, dessen Vernetzung durch eine radikalische Kettenpolymerisation erfolgte. Photolack 2 (Thiol-Acrylat-basiert) setzte

sich aus einer äquimolaren Mischung aus PCLTA und dem Trithiol-Crosslinker Trimethylolpropantri(3-mercaptopropionat) zusammen und wurde durch einen gemischten Vernetzungsmechanismus aus Kettenpolymerisation und Stufenpolymerisation photopolymerisiert. Ein Anteil von 2 % (w/v) Irgacure 369 in beiden Photolacken stellte dabei die Initiierung der radikalischen Photopolymerisation sicher.

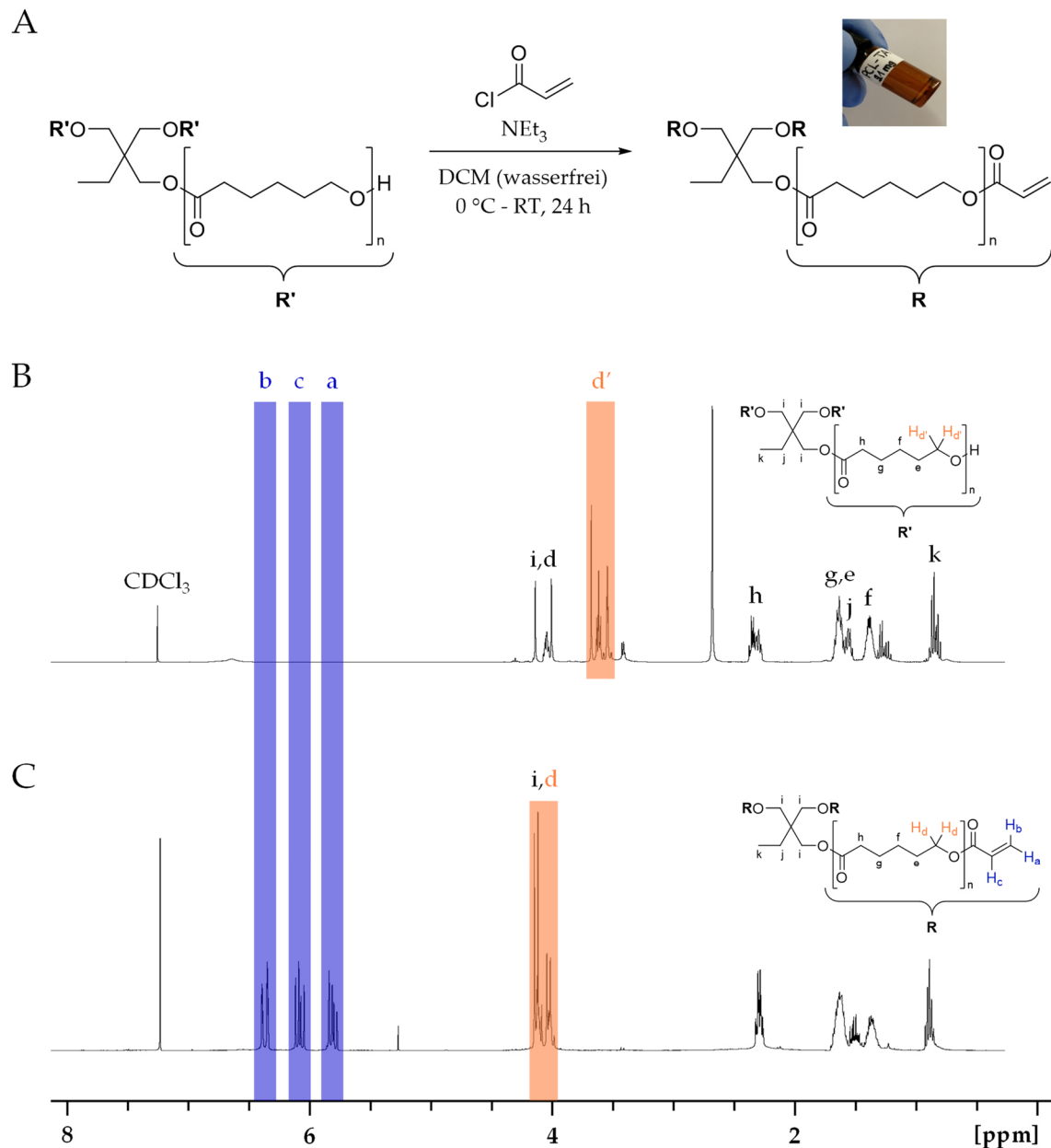


Abbildung 8: Entwicklung eines PCL-basierten Photopolymers für das DLW. (A) Synthese von PCLTA aus PCL-triol. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) von (B) PCL-triol und (C) PCLTA.

3.1.1.2.1 Abbaubarkeit

In einem ersten Schritt wurde die hydrolytische Abbaubarkeit der beiden Photolacke studiert. Hierzu wurde eine Degradationsstudie durchgeführt und der Abbauprozess über einen Zeitraum von 24 bzw. 56 Tagen durch Gewichtsmessungen verfolgt (Abbildung 10). Da PCL für seine langsame Abbaurrate bekannt ist, wurden neben physiologischen Bedingungen (PBS, 37 °C) ebenfalls basische Bedingungen (0,1 M, 1 M, 10 M NaOH, 37 °C) getestet, um die Esterhydrolyse zu beschleunigen und eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Acrylat- und Thiol-Acrylat-basierten Photolacksystemen zu gewährleisten. Grundlage für die makroskopische Abbaustudie bildeten kleine Würfel mit einer Kantenlänge von vier Millimeter der beiden Photopolymere. Diese wurden mit Hilfe einer PDMS-Form hergestellt, indem der flüssige Photolack jeweils in eine würfelförmige Vertiefung der Silikonform pipettiert und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht photopolymerisiert wurde.

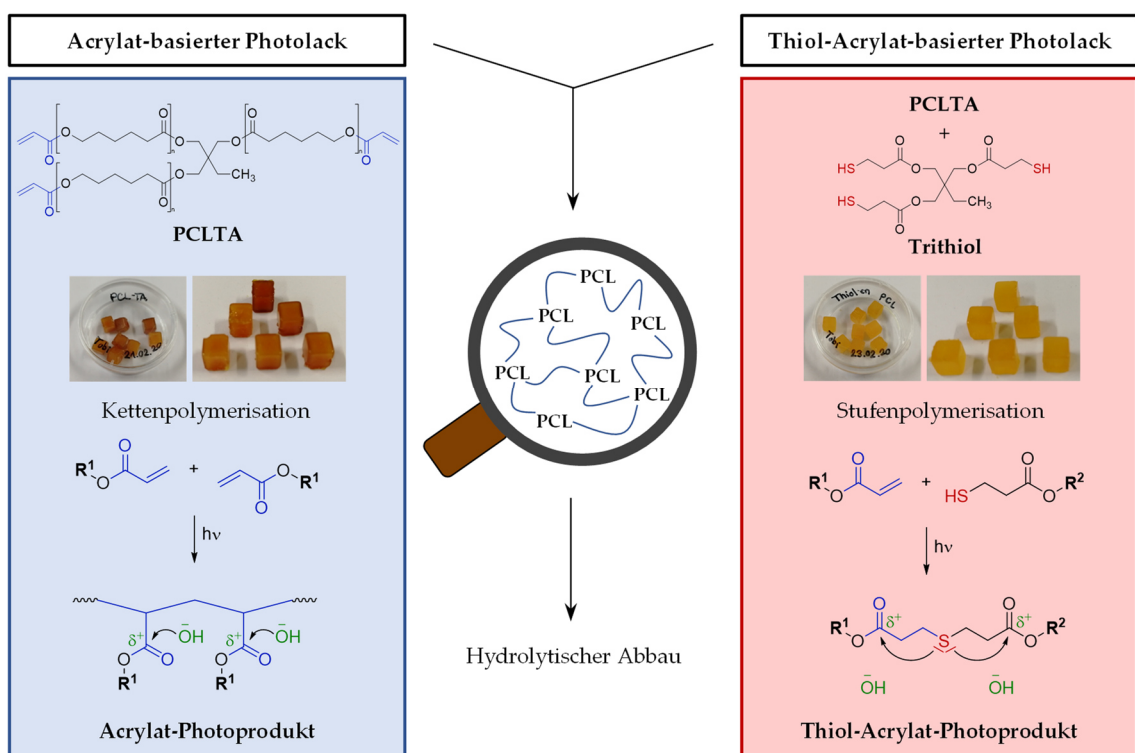


Abbildung 9: Schematische Übersicht über die Photopolymerisation der Monomere sowie die hydrolytische Spaltung der vernetzten Acrylat- und Thiol-Acrylat-basierten Photopolymere.

Aus den gemessenen Daten ließ sich ein deutlicher Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit zwischen Acrylat- und Thiol-Acrylat-basiertem Photolack erkennen. Während der Thiol-Acrylat-Lack bereits an Tag 1 in 10 M und 1 M NaOH-Lösung bzw. an Tag 20 in 0,1 M NaOH-Lösung vollständig aufgelöst war, verlief der Abbau des Acrylat-Lacks dagegen sehr langsam. Selbst nach 24-tägiger Inkubation in 10 M NaOH-Lösung wies der Würfel noch 83 % seines ursprünglichen Gewichts auf (*Abbildung 10 A,B*). In der Salzlösung (pH 7,2 - 7,4) verlief die Degradation aufgrund der niedrigen OH⁻-Konzentration für beide Photoprodukte deutlich langsamer. Allerdings wurde auch hier ein schnellerer Abbau für das Thiol-Acrylat-Photopolymer über einen Zeitraum von 56 Tagen festgestellt, wohingegen der Gewichtsverlust des Acrylat-Photopolymers lediglich 0,5 % betrug (*Abbildung 10 C*).

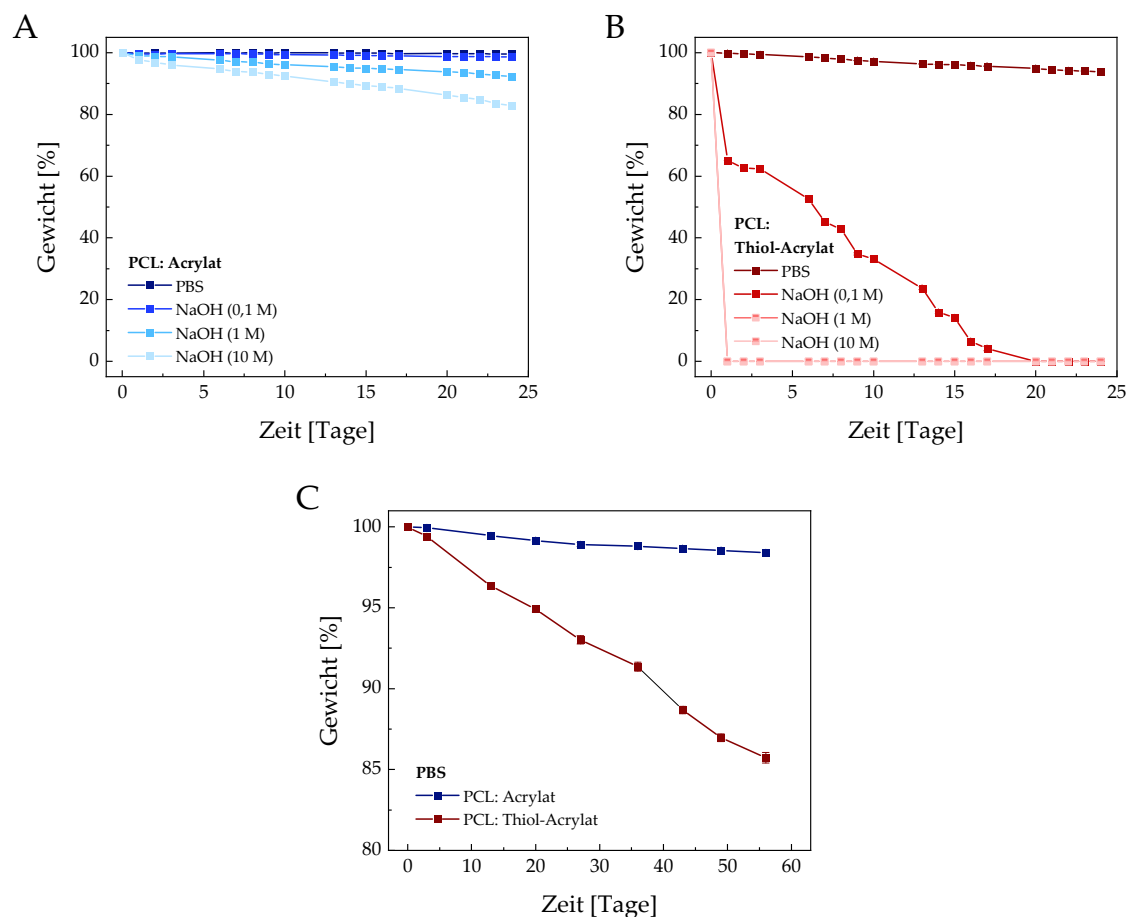


Abbildung 10: Abhängigkeit der Abbaubarkeit der Photolacke von ihrem Vernetzungsmechanismus sowie vom pH-Wert der Lösung. Degradationsverlauf in wässriger Salzlösung (PBS) sowie basischer Umgebung (0,1 M, 1 M, 10 M NaOH) bei 37 °C für den (A) Acrylat-basierten und (B) Thiol-Acrylat-basierten Photolack über einen Zeitraum von 24 Tagen. (C) Vergleich der Abbaugeschwindigkeit der beiden Photopolymere in PBS bei 37 °C über einen Zeitraum von 56 Tagen.

Die variierende Abbaugeschwindigkeit der beiden Photolacksysteme war auf den unterschiedlichen Vernetzungsmechanismus sowie insbesondere auf die involvierten funktionellen Gruppen zurückzuführen, die im Falle des Thiol-Acrylat-Photopolymers eine beschleunigte Hydrolyse förderten. Während die Photopolymerisation der Acrylat-Monomere zu einem Kettenpolymerisationsprodukt führte, bei dem die Monomere über C-C-Bindungen miteinander verknüpft waren, erfolgte die Verknüpfung der Acrylat- und Thiol-Monomere im Stufenpolymerisationsprodukt über Thioether-Bindungen.¹¹¹ Die räumliche Nähe zwischen Schwefel und Carbonylkohlenstoff bewirkte dabei einen Nachbargruppeneffekt. Durch intramolekularen Angriff der freien Elektronenpaare des Schwefels am elektrophilen Carbonylkohlenstoff wurde eine nukleophile Substitution erleichtert, wodurch die Esterhydrolyse im Vergleich zum Kettenpolymerisationsprodukt beschleunigt wurde.¹²⁷

Für die durchgeführte Degradationsstudie gilt es generell zu berücksichtigen, dass es sich bei den polymerisierten Würfeln um makroskopische Strukturen mit geringem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis handelte. Die Ergebnisse erlauben zwar qualitative Trends sehr gut abzuschätzen; allerdings besitzen sie nur eine begrenzte quantitative Aussagekraft bzw. Übertragbarkeit auf DLW-Strukturen. Bei Letzteren handelt es sich um mikroskopische Objekte mit großem Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis, die sich zusätzlich in ihrem Vernetzungsgrad unterscheiden können.

3.1.1.2.2 *Direct Laser Writing*

In Kollaboration mit Tobias Messer (Institut für Angewandte Physik, KIT, AG Prof. Dr. Martin Wegener) wurden die beiden Photolacksysteme auf ihre jeweilige Strukturierbarkeit mittels DLW getestet. Hierzu wurde ein kleines Probevolumen von je ca. 50 μL in Form eines Tropfens auf ein Glassubstrat aufgebracht, dessen Oberfläche mit Methacrylat-Gruppen modifiziert war. Auf diese Weise wurde während der Photopolymerisation eine kovalente Verknüpfung mit der Glasoberfläche erreicht. Die 3D-Mikrostrukturierung der PCL-Photolacke erfolgte durch selektive Einstrahlung eines Femtosekundenlasers bei 780 nm (Photonic Professional GT, Nanoscribe).

Zunächst wurde für beide Photolacke ein 2D-Dosistest durchgeführt, um einen geeigneten Satz an Druckparametern zu identifizieren, welcher anschließend für die Fabrikation von 3D-Strukturen verwendet wurde (*Abbildung 11 A*). Im Rahmen des Dosistests wurde bei konstanter Schreibgeschwindigkeit ($100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) und variierender

z-Höhe (von $-2\ \mu\text{m}$ bis $2\ \mu\text{m}$) die Laserintensität von $0\ \text{mW}$ bis $50\ \text{mW}$ variiert. Bei der Wahl der optimalen Laserintensität galt dabei Folgendes zu berücksichtigen: Die Intensität musste einerseits einen minimalen Schwellenwert überschreiten, um die Photopolymerisation zu induzieren und eine ausreichend hohe Vernetzung des Photolacks zu erzielen. Andererseits führten zu hohe Laserintensitäten aufgrund der starken Hitzeentwicklung zu lokalen „Explosionen“ des Photolacks, wodurch dessen gezielte Strukturierung verhindert wurde. Neben der Laserintensität spielte auch die z-Höhe eine zentrale Rolle, damit die gedruckten Strukturen kovalent mit der Glasoberfläche verknüpft und im anschließenden Entwicklungsprozess nicht weg-gewaschen wurden. Während bei kommerziellen Photolacken eine automatische Grenzflächensuche durch eine Software durchgeführt werden kann, war für die synthetisierten Lacke dagegen eine Optimierung mit Hilfe der Ergebnisse aus dem Dosistest erforderlich.

Der Dosistest lieferte geeignete Druckparameter für den Acrylat-basierten Photolack. Im Gegensatz dazu konnte für den Thiol-Acrylat-basierten Lack keine Bedingung gefunden werden, mit der sich der Photolack explosionsfrei verschreiben ließ. Für die weitere 3D-Strukturierung wurde daher lediglich der PCLTA-Photolack herangezogen. Als 3D-Objekte fungierten sowohl einfache Strukturen wie Quader ($20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$) als auch kompliziertere Gerüststrukturen in Form von Boxringen ($30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$). Letztere sind aufgrund ihrer freihängenden Verbindungsstücke durch konventionelle 3D-Druckverfahren, wie z. B. dem Extrusionsdruck, nicht ohne Stützstrukturen zugänglich. Anhand der Boxringe wurden die Druckbedingungen weiter optimiert und der Bereich geeigneter Parameter eingeschränkt. Von den getesteten Bedingungen (Laserintensität: $20\ \text{mW}$, $30\ \text{mW}$; Schreibgeschwindigkeit: 1000 , 1250 , 1500 , 1750 , $2000\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ergab eine Laserintensität von $30\ \text{mW}$ und eine Schreibgeschwindigkeit von $2000\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ die besten Druckergebnisse. Die Auflösung der Boxringe wurde mit PETA, einem kommerziell erhältlichen Standard im DLW, verglichen. Sowohl das neu entwickelte PCLTA als auch PETA lieferten vergleichbare Druckergebnisse, was auf den ähnlichen molekularen Aufbau der beiden Photomomere zurückzuführen war (*Abbildung 11 B*). Die gedruckten Boxringstrukturen fanden im Folgenden Anwendung in biologischen Zellexperimenten.

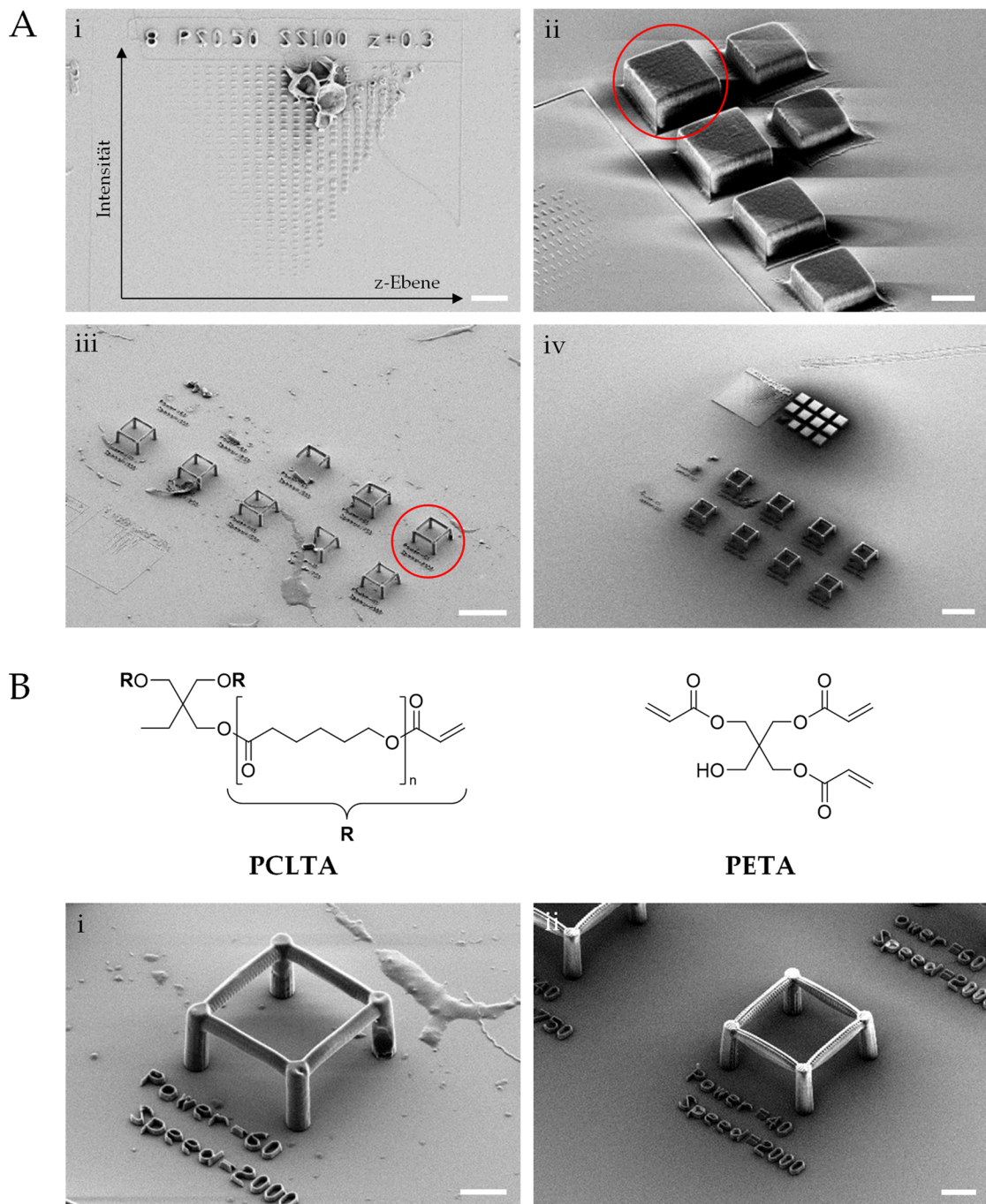


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der DLW-Strukturen (Zeiss Supra 55VP). (A) Optimierung der DLW-Bedingungen für den PCLTA-Photolack: (i) 2D-Dosistest mit variierender Laserintensität (0-50 mW) und z-Höhe ($\pm 2 \mu\text{m}$); Erzeugung verschiedener 3D-Strukturen in Form von (ii) Quadern (5-30 mW und $2000 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) und (iii) Boxringen bei variierender Laserintensität (untere Reihe: 20 mW, obere Reihe: 30 mW) und Schreibgeschwindigkeit (1000, 1250, 1500, 1750, $2000 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Die Ergebnisse mit den besten Druckparametern sind rot umrandet. (iv) Analoges Screening für den PETA Photolack. (B) Vergleich von (i) PCLTA- und (ii) PETA-Photolack nach Optimierung der Druckparameter anhand von DLW-Boxringstrukturen. Maßstab: $10 \mu\text{m}$ (A i-ii, B i-ii) und $50 \mu\text{m}$ (A iii-iv) (in Kollaboration mit Tobias Messer).

3.1.1.2.3 Biokompatibilität

In einem ersten Schritt wurden der synthetisierte PCLTA-Photolack und der PETA-Standardlack auf ihre jeweilige Bioverträglichkeit untersucht. Grundlage hierfür bildeten Beschichtungen, die aus den PCLTA- bzw. PETA-Monomeren und anschließender Photopolymerisation hergestellt wurden. Die Evaluation der Biokompatibilität erfolgte durch einen MTT-Proliferationsassay (*Abbildung 12*). Hierzu wurden HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 72 Stunden auf den Beschichtungen kultiviert und hinsichtlich ihres Proliferationsvermögens analysiert. Als Referenz fungierten dabei unbeschichtete Wells. Beim Vergleich der beiden Photolackbeschichtungen wurde für das PCLTA eine etwa zehnmal höhere Zellviabilität nachgewiesen, weswegen der neu entwickelte Photolack als eine wesentliche Verbesserung zum Standardlack PETA angesehen werden konnte. Das allgemein niedrige Proliferationsniveau für beide Beschichtungen konnte durch die Hydrophobizität der Polymeroberfläche erklärt werden. HepG2-Zellen in den unbeschichteten Wells der Referenz (100 %) besaßen ein deutlich höheres Proliferationsvermögen, da kommerziell erhältliche Zellkulturmaterialien in der Regel eine Oberflächenaktivierung erfahren, um das Zellwachstum zu fördern.

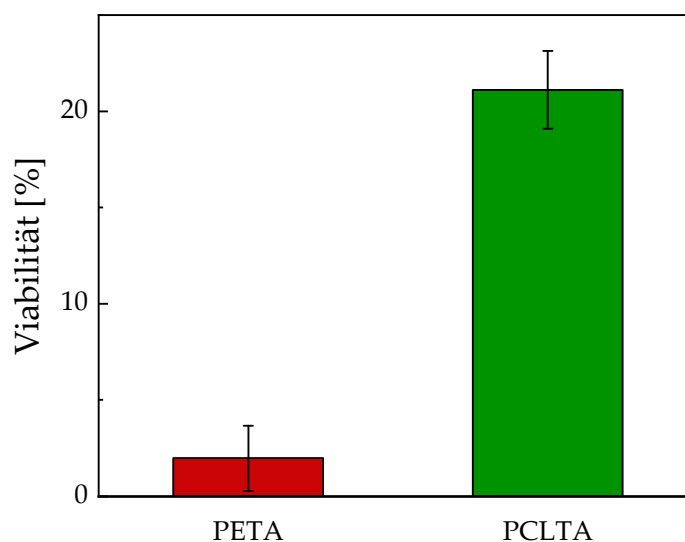


Abbildung 12: Evaluation der Biokompatibilität von PCLTA-Photolack und PETA-Standardlack durch einen MTT-Test. HepG2-Zellen wurden auf PETA- bzw. PCLTA-Beschichtungen ausgesät und der Einfluss auf die Zellproliferation nach 72-stündiger Inkubation bestimmt. Als Referenz dienten unbeschichtete Wells einer 96-Well-Platte.

Für die weitere biologische Evaluierung wurde die Zellinteraktion an DLW-Mikrostrukturen untersucht. Als Zelltyp wurden humane Fibroblasten (*normal human dermal fibroblasts*, NHDF) gewählt aufgrund ihrer Größe sowie ihrer typischen spindelförmigen Ausrichtung, wodurch eine mikroskopische Visualisierung der Zellinteraktion erleichtert wurde. Im Unterschied zu Oberflächenbeschichtungen sind im Falle von mikroskopischen Gerüststrukturen die Kontaktflächen zwischen polymerisiertem Photolack und Zellen in der Regel sehr klein. Mittels DLW wurde ein Array bestehend aus 5×5 Boxringstrukturen aus dem PCLTA-Photolack erzeugt. Der Boxring stellt in der Literatur eine gängige Gerüststruktur dar, um Zell-Matrix-Interaktionen zu studieren.^{55,128-130} Da PCL keine bioaktiven Domänen wie RGD-Sequenzen besitzt, wurden die hydrophoben Stützstrukturen vor dem Aussäen der Zellen mit Kollagen ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) beschichtet, um die Zelladhäsion zu verbessern. Anschließend wurden 1×10^4 NHDF, suspendiert in ca. $50 \mu\text{L}$ DMEM, auf dem Glassubstrat so platziert, dass der gesamte Boxring-Array durch das Kulturmedium bedeckt war. Nach dem Anwachsen der NHDF wurde das Deckglas für die weitere Zellkultivierung in eine Petrischale mit Zellkulturmedium gelegt.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert und ihre Interaktion mit den Boxringstrukturen mikroskopisch verfolgt. Da die Zellen bei der Aussaat zunächst eine kugelförmige Morphologie besaßen und die offenen Strukturen nur eine begrenzte Oberfläche für eine instantane Zelladhäsion boten, fiel ein Großteil der Fibroblasten zunächst durch die Boxringstrukturen hindurch und wuchs auf dem Boden des Glassubstrats an (*Abbildung 15 A(i)*). Allerdings zeigte sich bereits nach wenigen Tagen eine deutliche Interaktion der Zellen mit den Boxringstrukturen, die durch Färbung der NHDF mit CellTracker Green CMFDA bzw. Phalloidin-FITC sowie Hoechst 33342 und anschließende Konfokalmikroskopie visualisiert wurden. Einerseits wuchsen die NHDF entlang der Pfosten der Boxringe nach oben. Andererseits demonstrierten sie eine ausgeprägte langgestreckte Morphologie, indem sie sich sowohl innerhalb eines Boxrings als auch zwischen einzelnen Boxringen über eine Distanz von bis zu $100 \mu\text{m}$ aufspannten und dabei keinen Kontakt mehr zum Boden des Glassubstrats aufwiesen (*Abbildung 13*). Dies zeigte die hohe Bioverträglichkeit des PCLTA-Photolacks sowie die Möglichkeit einer kontrollierten Zellorientierung durch die Geometrie und Abstände der Boxringstrukturen. Zudem wurde bei der Färbung des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin-FITC eine deutliche Ausrichtung der zellulären Aktinfilamente beobachtet, welche die spindelförmige Morphologie der NHDF bewirkten (*Abbildung 14 A,B*).

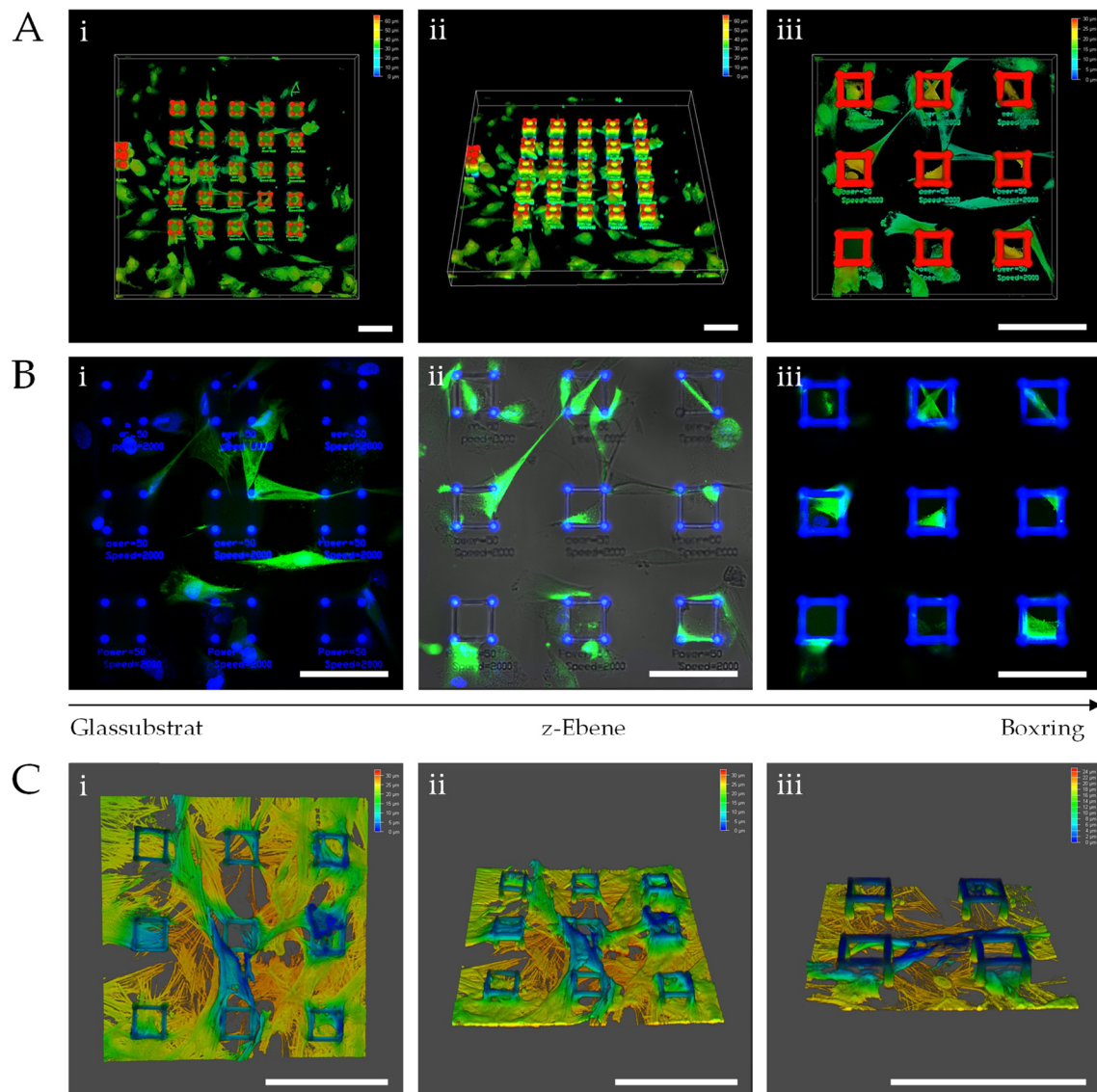


Abbildung 13: Visualisierung der Zellinteraktion zwischen NHDF und PCLTA-Boxringen. (A) Tiefencodierung (i-ii: 60 µm, iii: 30 µm) nach Färbung der NHDF an Tag 1 mit CellTracker Green CMFDA ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}540 \text{ nm}$) und anschließende Konfokalmikroskopie. (B) Ausgewählte Aufnahmen des gemessenen z-Stacks aus (A iii): (i) Boden des Glassubstrats (0 µm), (ii) in 2 µm Höhe und (iii) am oberen Ende des Boxrings (10 µm). (C) Tiefencodierung (i-ii: 30 µm, iii: 24 µm) nach Färbung des Aktinzytoskeletts der NHDF an Tag 4 mit Phalloidin-FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 545\text{-}625 \text{ nm}$) und der Zellkerne mit Hoechst 33342 ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{-}480 \text{ nm}$) sowie anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: 100 µm.

Im Laufe der Kultivierung wurde nicht nur eine morphologische Veränderung der Fibroblasten beobachtet, sondern eine ebenso starke Verformung der Boxringe. Während die Gerüststrukturen an Tag 4 eine hohe Strukturintegrität aufwiesen, ließ sich nach Tag 14 eine zunehmende Verformung beobachten, die schließlich dazu führte, dass die Boxringe vom Boden des Glassubstrats abgelöst wurden, sich um bis zu 180° um ihre Achse drehten und sich von ihrer ursprünglichen Position entfernten (*Abbildung 14 A,B*). Trotz des Verlusts der kovalenten Verknüpfung mit dem Glas wurden die Boxringe durch die regelmäßigen Medienwechsel nicht gewaschen, da sie von den adhären Zellen festgehalten wurden. Die Ablösung der Boxringe schien dabei weniger auf die Bioabbaubarkeit des Materials zurückzuführen sein als auf die starken mechanischen Zugkräfte der NHDF, wodurch die Pfosten der Boxringe aufgrund ihres geringen Durchmessers zu stark beansprucht wurden und schließlich der mechanischen Belastung nachgaben. Die Boxringe blieben jedoch in ihrer jeweiligen Gesamtstruktur über einen Zeitraum von 14 Tagen erhalten, d. h. weder einzelne Pfosten noch Verbindungselemente wurden der Stützstruktur entzogen. Interessanterweise wurden nicht nur die Boxringe selbst, sondern auch die jeweiligen Ziffern der Druckparameter vom Boden des Glassubstrats abgelöst. Für einen Boxring-Array hergestellt aus dem PETA-Photolack wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten, auch wenn die Zellinteraktion mit den Boxringen insgesamt niedriger ausgeprägt zu sein schien, da die Zellen fast ausschließlich auf dem Boden des Glassubstrats wuchsen. (*Abbildung 14 C*).

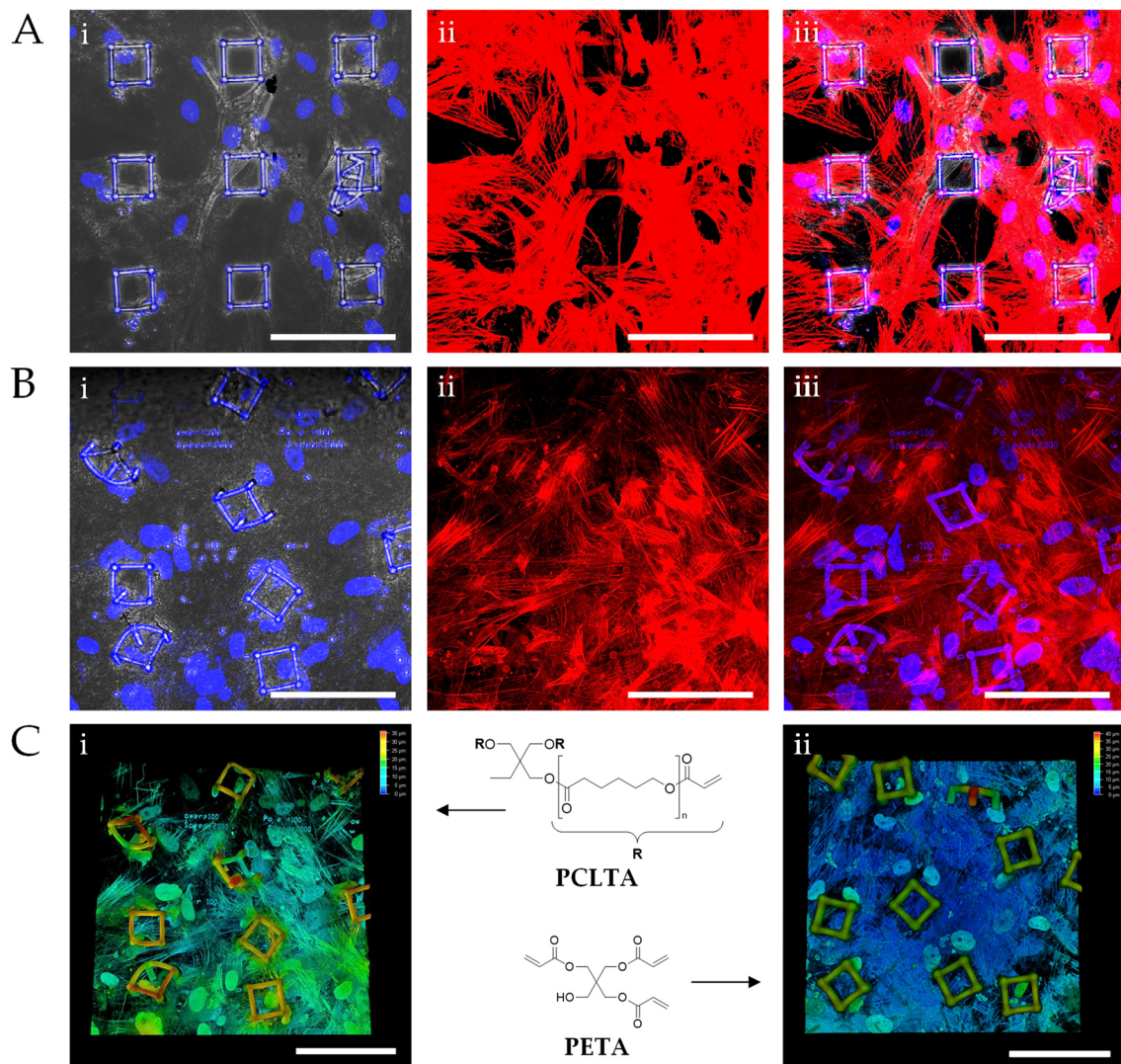


Abbildung 14: Veränderung des Boxring-Arrays über einen Zeitraum von 14 Tagen durch eine zunehmende Zellinteraktion. Färbung des Aktinzytoskeletts der NHDF durch Phalloidin-FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 545\text{-}625 \text{ nm}$) und der Zellkerne durch Hoechst 33342 ($\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 415\text{-}480 \text{ nm}$) an (A) Tag 4 und (B) Tag 14 sowie anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B). (C) Tiefencodierung (i: $35 \mu\text{m}$, ii: $40 \mu\text{m}$) und Visualisierung des Verlusts der Strukturintegrität des Boxring-Arrays für den (i) PCLTA und (ii) PETA-Photolack nach 14 Tagen. Maßstab: $100 \mu\text{m}$.

Um herauszufinden, ob die Ursache für das Ablösen der Boxringe auf die Wechselwirkung mit den Fibroblasten oder den hydrolytischen Abbau von PCLTA zurückzuführen war, wurde die Degradierbarkeit der DLW-Boxringe zusätzlich unter zellfreien Bedingungen untersucht (*Abbildung 15 B*). Hierzu wurden Glassubstrate mit bedruckten Boxring-Arrays sowohl in einer wässrigen Pufferlösung (PBS, 37 °C) als auch in einer 1 M NaOH-Lösung inkubiert und der jeweilige Abbauprozess mikroskopisch verfolgt. In der Salzlösung ließ sich selbst über einen Zeitraum von einem Monat keine sichtbare Degradation der Boxringe feststellen. Unter basischen Bedingungen dagegen wurde eine rasche Ablösung der Boxringstrukturen beobachtet. Während die vom Substrat getrennten Boxringe unter Zellkulturbedingungen von den Fibroblasten zurückgehalten wurden, erfolgte dagegen unter zellfreien Bedingungen eine direkte Freisetzung in die umgebende Lösung. Aufgrund der geringen Kontaktfläche zwischen Boxring und Glassubstrat war bereits ein geringer Degradationsgrad ausreichend, um den Boxring vom Boden des Substrats abzulösen. Die damit deutlich schnellere Abbaubarkeit der DLW-Strukturen im Vergleich zum makroskopischen Würfel in 1 M NaOH-Lösung war daher hauptsächlich auf die besondere Geometrie der Boxringstruktur zurückzuführen. Von einem vollständigen Abbau des PCLTA-Photolacks ist jedoch auch unter basischen Bedingungen für den gemessenen Zeitraum nicht auszugehen, da selbst nach einer Woche für die einzelnen Ziffern der Druckparameter kein Verlust der Strukturintegrität zu beobachten war.

Insgesamt konnte dem PCLTA-Photolack damit nur eine begrenzte biologische Abbaubarkeit attestiert werden. Unter zellfreien Bedingungen konnten die Gerüststrukturen lediglich unter basischen Bedingungen, die nicht biokompatibel sind, abgelöst werden. In wässrig-neutraler Umgebung erwies sich der rein Acrylat-basierte Photolack dagegen über längere Zeiträume als stabil. Das größere Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis der DLW-Strukturen schien damit keinen signifikanten Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit zu besitzen. Sowohl für den makroskopischen Würfel als auch den DLW-Boxring ließ sich über einen Zeitraum von einem Monat keine wesentliche Veränderung beobachten. Trotz der offensichtlich sehr langsamen Abbaubarkeit ist dem PCLTA-Photolack eine außerordentlich hohe Biokompatibilität und Zellwechselwirkung zuzuschreiben, weswegen er eine vielversprechende Alternative zum etablierten PETA-Photolack darstellt.

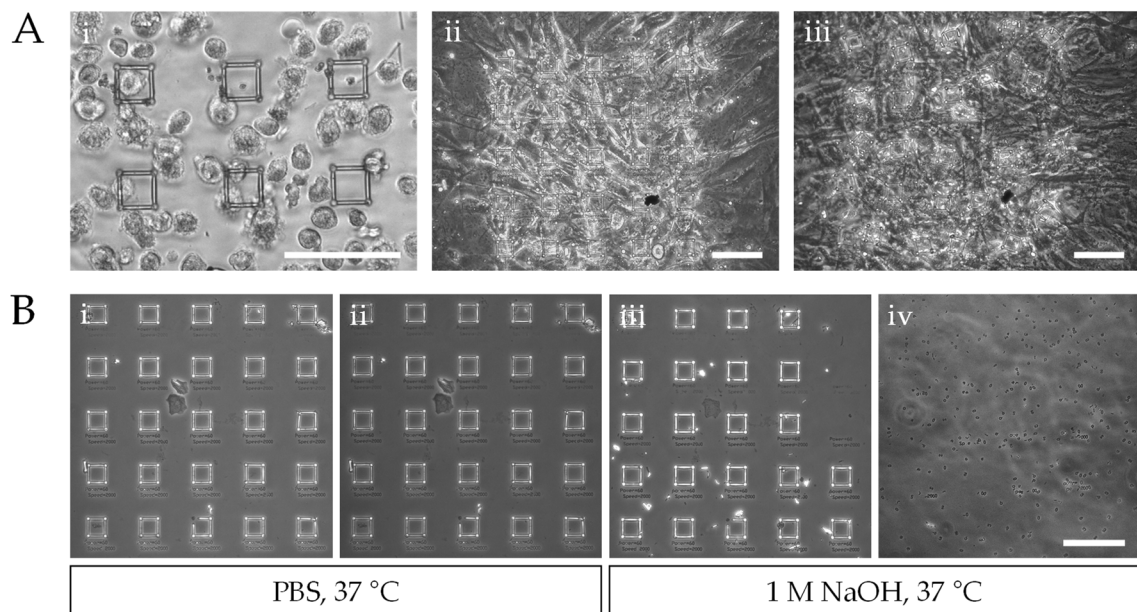


Abbildung 15: Vergleich des Degradationsverlaufs von Boxring-Arrays aus PCLTA unter (A) Zellkultur (NHDF, DMEM, 37 °C) und (B) zellfreien Bedingungen (PBS, 1 M NaOH, 37 °C) (A) Mikroskopische Aufnahmen (i) unmittelbar nach der Zellaussaat, an (ii) Tag 1 und (iii) Tag 14. (B) Visualisierung des hydrolytischen Abbauprozesses in PBS (37 °C) nach (i) Tag 1 und (ii) Tag 31 sowie in 1 M NaOH-Lösung nach (iii) Tag 1 und (iv) Tag 7 (Leica DM IL LED). Maßstab: 100 µm.

3.1.1.2.4 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel ein photopolymerisierbares Biomaterial basierend auf einem biologisch abbaubaren Polymer für das DLW entwickelt. 3-arm PCL wurde durch chemische Modifikation in das Photomonomer PCLTA umgewandelt, welches die Grundlage für zwei verschiedene Photolacksysteme bildete. Der Acrylat-basierte Photolack wurde lediglich durch das Photomonomer selbst sowie einen Photoinitiator gebildet und über eine Kettenpolymerisation vernetzt. Die Vernetzung des Thiol-Acrylat-basierten Photolacks, der einen Thiol-Crosslinker enthielt, erfolgte zusätzlich durch eine Stufenpolymerisation. Neben der Basizität der Degradationslösung hatte insbesondere der Vernetzungsmechanismus einen großen Einfluss auf die Abbaubarkeit der jeweiligen Photoprodukte. Die schnellere Degradation des Thiol-Acrylat-Photoprodukts war auf den Nachbargruppeneffekt des Schwefels zurückzuführen, der eine Esterhydrolyse erheblich beschleunigte. Allerdings konnte nur der Acrylat-basierte Photolack erfolgreich mittels DLW strukturiert werden. Verschiedene 3D-Mikrostrukturen, darunter Boxringe, wurden hergestellt und wiesen eine vergleichbare Druckqualität wie der kommerziell erhältliche Referenzlack PETA auf. In Zellexperimenten mit NHDF wurde eine exzellente Biokompatibilität für den PCLTA-Photolack sowie eine starke Interaktion der Fibroblasten mit den DLW-Gerüststrukturen nachgewiesen. Da die Biodegradation der Acrylat-basierten DLW-Strukturen unter physiologischen Bedingungen nur sehr langsam zu erfolgen schien, ist dessen Anwendung als transiente Matrix nur begrenzt sinnvoll. Eine verbesserte Biodegradation des Photolacks könnte beispielsweise durch die Inkorporation hydrolytisch leichter spaltbarer Gruppen oder enzymatischer Schnittstellen erreicht werden. Trotz der eingeschränkten Bioabbaubarkeit stellt der hier vorgestellte PCLTA-Photolack aufgrund seiner verbesserten Biokompatibilität eine ausgezeichnete Alternative zum DLW-Standard PETA dar.

3.1.2 Biotinten für das *3D-Bioprinting*

Im vorherigen Kapitel wurde ein photopolymerisierbares Biomaterial für das DLW vorgestellt, bei dem der Strukturierungsprozess und die Zellbesiedlung zeitlich voneinander entkoppelt waren. Die Zellen wurden erst nach erfolgter Photopolymerisation auf den erzeugten 3D-Gerüststrukturen ausgesät. In den folgenden zwei Kapiteln liegt dagegen der Fokus auf Biomaterialien, in deren Vorläuferlösungen Zellen direkt suspendiert werden können, wodurch sie nach anschließender Vernetzung in der 3D-Stützstruktur eingeschlossen werden. Zellhaltige Biomaterialien, die sich aus einer zellulären Komponente und einem Biomaterial zusammensetzen, werden als Biotinten bezeichnet.⁶⁴ Die Anwesenheit von Zellen in der flüssigen Biotinte erhöht die biologischen Materialanforderungen, da nicht nur das ausgehärtete Biomaterial, sondern auch die entsprechenden Monomere eine hohe Biokompatibilität aufweisen müssen.^{131,132} Daher eignen sich lediglich wasserbasierte Polymerlösungen als Biotinten, wobei insbesondere Hydrogele eine breite Anwendung erfahren haben. Die in Wasser quellbaren Polymernetzwerke zeichnen sich durch einen hohen Wassergehalt, kontrollierte Quelleigenschaften, eine ausgezeichnete Biokompatibilität und scherverdünnende Eigenschaften aus.¹³³ Diese Kombination an vorteilhaften Eigenschaften macht sie zu geeigneten Biotinten für das *3D-Bioprinting*, dessen Bedeutung als Biofabrikationsprozess im *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin über die letzten Jahre rasant gestiegen ist.^{46,83,134}

3.1.2.1 Gelatine-Methacryloyl

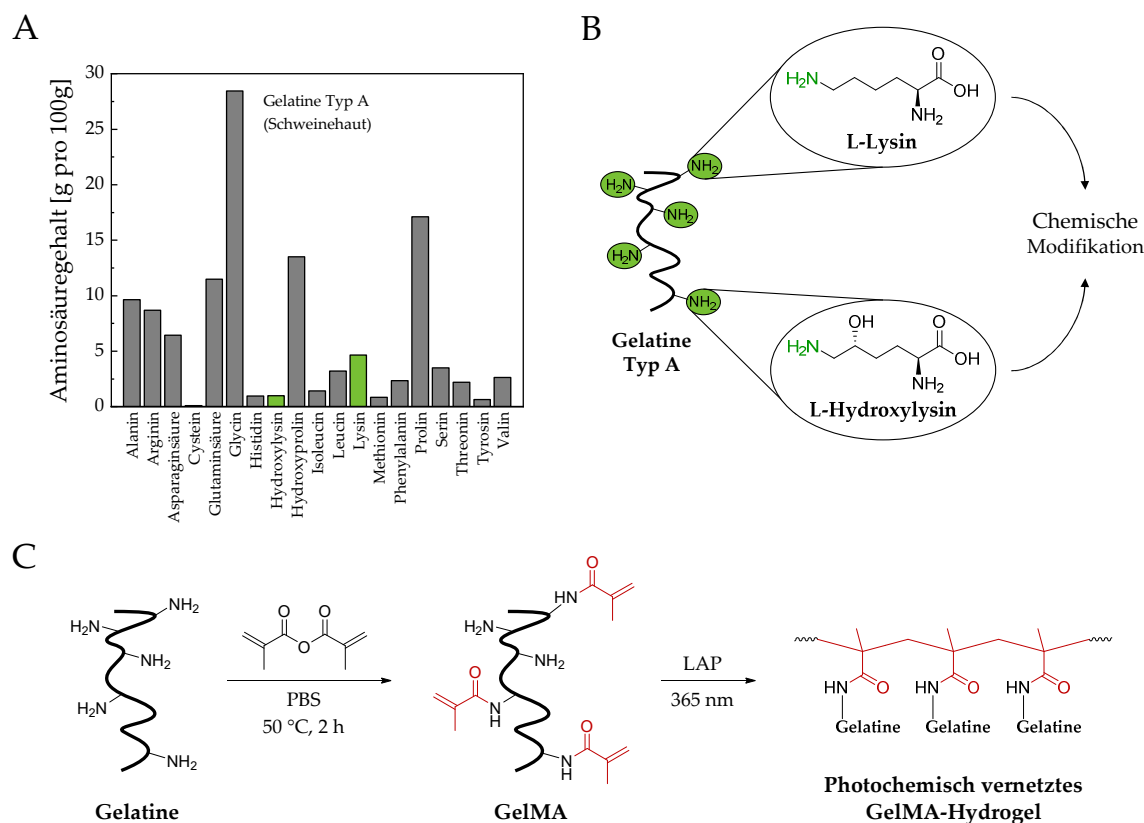
Um den wachsenden Anforderungen in den Bio- und Medizinwissenschaften gerecht zu werden, wurde die Entwicklung neuer Biomaterialien und Biotinten stetig vorangetrieben.^{39,135} Im Hinblick auf die Bandbreite der zur Verfügung stehenden Biotinten haben vor allem semi-synthetische Hydrogele die größte Bedeutung erlangt, da sie die Vorteile natürlicher Hydrogele, wie eine exzellente Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit, mit den Vorteilen synthetischer Hydrogele, insbesondere eine hohe Kontrolle der Polymerzusammensetzung und Vernetzung, miteinander vereinen.^{84,85} Für die Erzeugung semi-synthetischer Hydrogelvorläufer werden typischerweise Biopolymere, wie z. B. Gelatine, Hyaluronsäure, Kollagen, Chitosan oder Alginat, mit funktionellen Gruppen modifiziert, um eine gezielte Vernetzung zu erreichen.^{102,131,136} Licht stellt dabei einen besonders milden und kontaktlosen Stimulus für eine chemische

Vernetzung dar, wodurch der Einsatz von toxischen Reagenzien vermieden wird.^{40,137} Zudem erlaubt die Verwendung von photopolymerisierbaren Hydrogelvorläufern eine hohe räumliche und zeitliche Kontrolle der Vernetzung, die in lichtbasierten Biofabrikationsprozessen unerlässlich ist.¹³⁸ Beispiele für semi-synthetische, lichtaushärtbare Hydrogele sind Methacrylat-funktionalisierte Biopolymere, wie Gelatine-Methacryloyl (GelMA)^{86,139,140}, Kollagen-Methacryloyl (ColMA)¹⁴¹⁻¹⁴³ oder Hyaluronsäure-Methacrylat (HAMA)^{87,144,145}, die breiten Einsatz im *Tissue Engineering* gefunden haben. Im Bereich des *3D-Bioprinting* besitzt von den genannten Vertretern GelMA die größte Relevanz aufgrund der einfachen chemischen Modifizierbarkeit sowie der inhärenten Präsenz von bioaktiven Domänen in der Gelatine, wie Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Zelladhäsionsmotiven und Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-Spaltsequenzen.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Ferner ermöglicht es die kostengünstige und kommerzielle Verfügbarkeit der Gelatine, chemische Modifikationen in größerem Gramm-Maßstab durchzuführen, um die benötigten Substanzmengen für die Anwendung in 3D-Druckverfahren zu erzeugen. Diese Gründe haben schließlich dazu geführt, dass sich GelMA als Goldstandard in der 3D-Zellkultur und im *3D-Bioprinting* etabliert hat.^{46,149-151}

Dieses Kapitel befasst sich mit einer umfangreichen Charakterisierung des semi-synthetischen Hydrogels GelMA. In Kollaboration mit Sonja Haase¹⁵² und Xenia Kempter¹⁵³ (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) wurden drei Varianten von GelMA-Hydrogelen mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad der Gelatineketten synthetisiert und die Auswirkungen einer steigenden Vernetzungsdichte auf das Verhalten der im Hydrogel eingeschlossenen Zellen bewertet. Darüber hinaus fungierten GelMA-Hydrogele als Modellsystem, um die Diffusion in Hydrogelen in Abhängigkeit von Temperatur, Polymerkonzentration, Vernetzungsgrad, Vernetzungsmechanismus und Molekulargewicht der diffundierenden Stoffe zu studieren.

3.1.2.1.1 Synthese und chemische Charakterisierung

Die Synthese von GelMA erfolgte ausgehend von Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelerkraft: ~ 300 g Bloom), die aus saurer Hydrolyse von Kollagen gewonnen wurde (Abbildung 16). Charakteristisch für Kollagen und Gelatine ist das Vorkommen der nicht-kanonischen Aminosäure Hydroxylysin (Hyl) neben Lysin (Lys). Beide Aminosäuren besitzen primäre Aminogruppen in ihren Seitenketten, die als Ansatzpunkt für die chemische Funktionalisierung fungierten. Die freien Aminogruppen von Lys und Hyl wurden mittels Methacrylsäureanhydrid (MAA) modifiziert. Zusätzlich wurden zu einem geringen Anteil auch die Hydroxylgruppen von Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin funktionalisiert. Aus der Synthese resultierten daher sowohl Methacrylamid- als auch Methacrylat-Gruppen, wobei die Funktionalisierung der freien Aminogruppen aufgrund der höheren Nukleophilie des Stickstoffs begünstigt wurde.¹⁵⁴



Die zugegebene Menge an MAA erlaubte eine Kontrolle über den Funktionalisierungsgrad (engl. *degree of functionalization*, DoF) der Aminogruppen in der Gelatine. Ein Äquivalent bezog sich dabei auf die Anzahl der freien Aminogruppen in unmodifizierter Gelatine, die kolorimetrisch über eine Glycin-Standardkurve mittels TNBSA-Assay bestimmt wurde (*Abbildung 17 B,C*). Es wurde ein Wert von $0,266 \pm 0,046$ mmol Aminogruppen pro Gramm Gelatine ermittelt, der vergleichbar mit den angegebenen Werten für Gelatine Typ A aus der Literatur war.¹⁵⁶ Im Zuge der GelMA-Synthese führte eine Erhöhung der MAA-Äquivalente zu einer Zunahme des Funktionalisierungsgrads. Der jeweilige Reaktionsumsatz der freien Aminogruppen wurde mittels TNBSA-Assay bestimmt. Die erhaltenen Werte zeigten dabei ein beschränktes Wachstum. (*Abbildung 17 D*). Ab ca. 16 Äquivalenten führte eine weitere Steigerung des molaren MAA-Überschusses zu keiner signifikanten Erhöhung des Funktionalisierungsgrads. Stattdessen resultierte aus der zunehmenden MAA-Konzentration eine vermehrte Hydrolyse des überschüssigen Anhydrids im wässrigen Puffer und ein Anstieg des Nebenprodukts Methacrylsäure. Die damit verbundene Reduktion des pH-Werts, die nur begrenzt durch den PBS-Puffer aufgefangen werden konnte, führte zur Protonierung und dadurch zum Verlust der Nukleophilie der verbleibenden freien Aminogruppen. Ein vollständiger Umsatz der freien Aminogruppen (~97 %) konnte in der Literatur nur durch Modifikation des Syntheseprotokolls erreicht werden.¹⁵⁷ Hierbei wurde MAA schrittweise zur Reaktion gegeben und der pH-Wert vor jeder Zugabe neu eingestellt. Das auf diese Weise hergestellte Gelatinederivat weist eine maximale Dichte an photoreaktiven Gruppen auf. Für die biologische Anwendung, insbesondere für den Einschluss von Zellen im GelMA-Hydrogel, sind derart hohe Vernetzungsdichten jedoch meist ungeeignet, da die resultierenden Hydrogele eine zu hohe Steifigkeit besitzen.

Nach dem Vorbild des konventionellen Syntheseverfahrens nach Van Den Bulcke *et al.*¹³⁹ wurde GelMA mit niedrigem (DoF: $32 \% \pm 4 \%$), moderatem (DoF: $68 \% \pm 2 \%$) und hohem (DoF: $77 \% \pm 4 \%$) Funktionalisierungsgrad erhalten. Die synthetisierten Hydrogelvorläufer werden im Folgenden als GelMA *Low*, GelMA *Medium* und GelMA *High* bezeichnet (*Abbildung 17 E*).

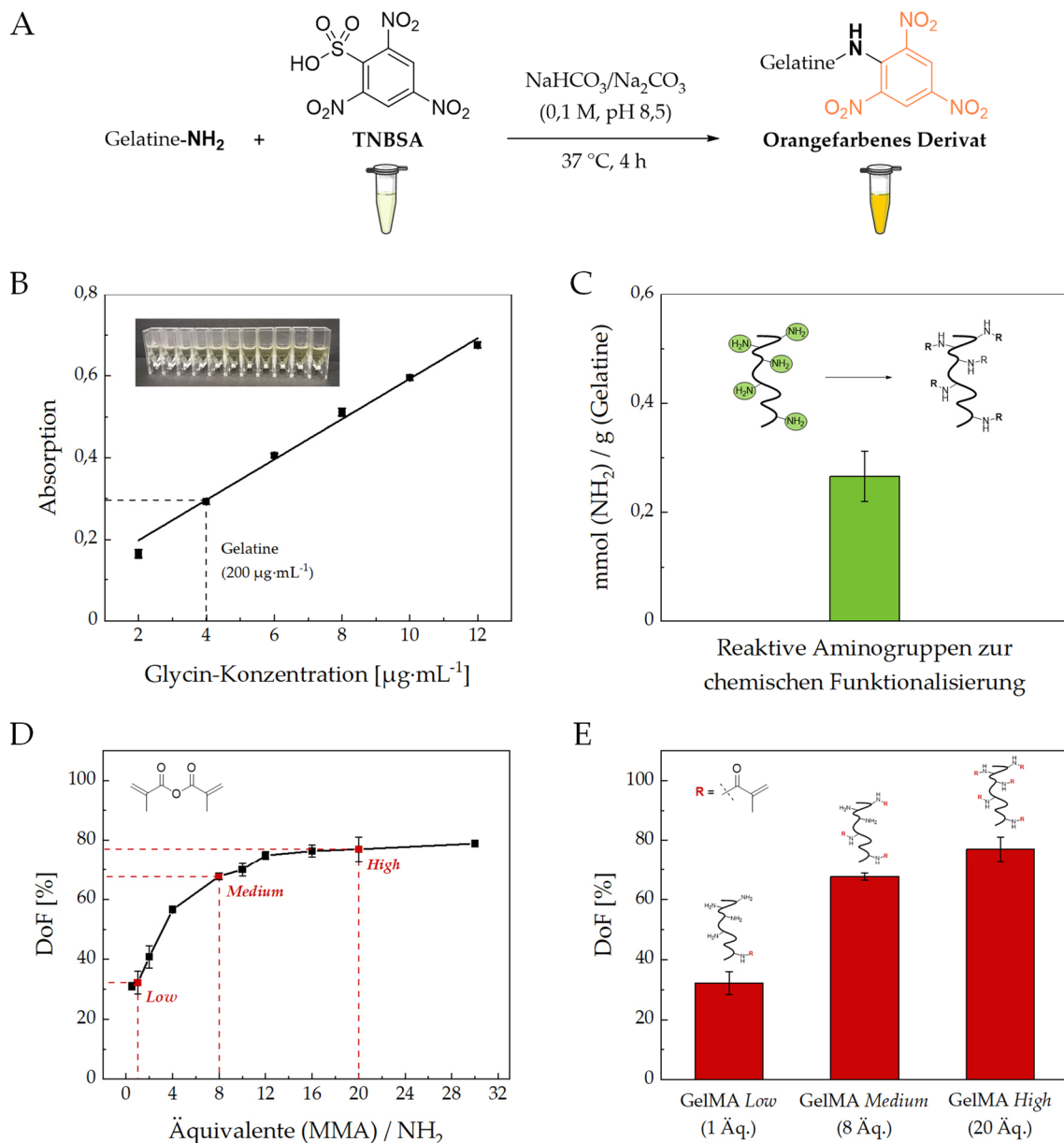


Abbildung 17: Chemische Charakterisierung von Gelatine und GelMA. (A) Reaktionsschema für den kolorimetrischen Nachweis freier Aminogruppen mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA). (B) Glycin-Standardkurve (2-12 µg·mL⁻¹) zur Ermittlung der freien Aminogruppen in Gelatine. (C) Errechneter Gehalt an freien Aminogruppen (Lys und Hyl) in Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierstärke: ~ 300 g Bloom). (D) Zunahme des Funktionalisierungsgrads (DoF) für die synthetisierten GelMA-Hydrogelvorläufer mit steigender MAA-Menge. (E) Ausgewählte GelMA-Hydrogelvorläufer (*Low*, *Medium*, *High*), welche die Grundlage für die weiteren Untersuchungen bildeten (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempfer).

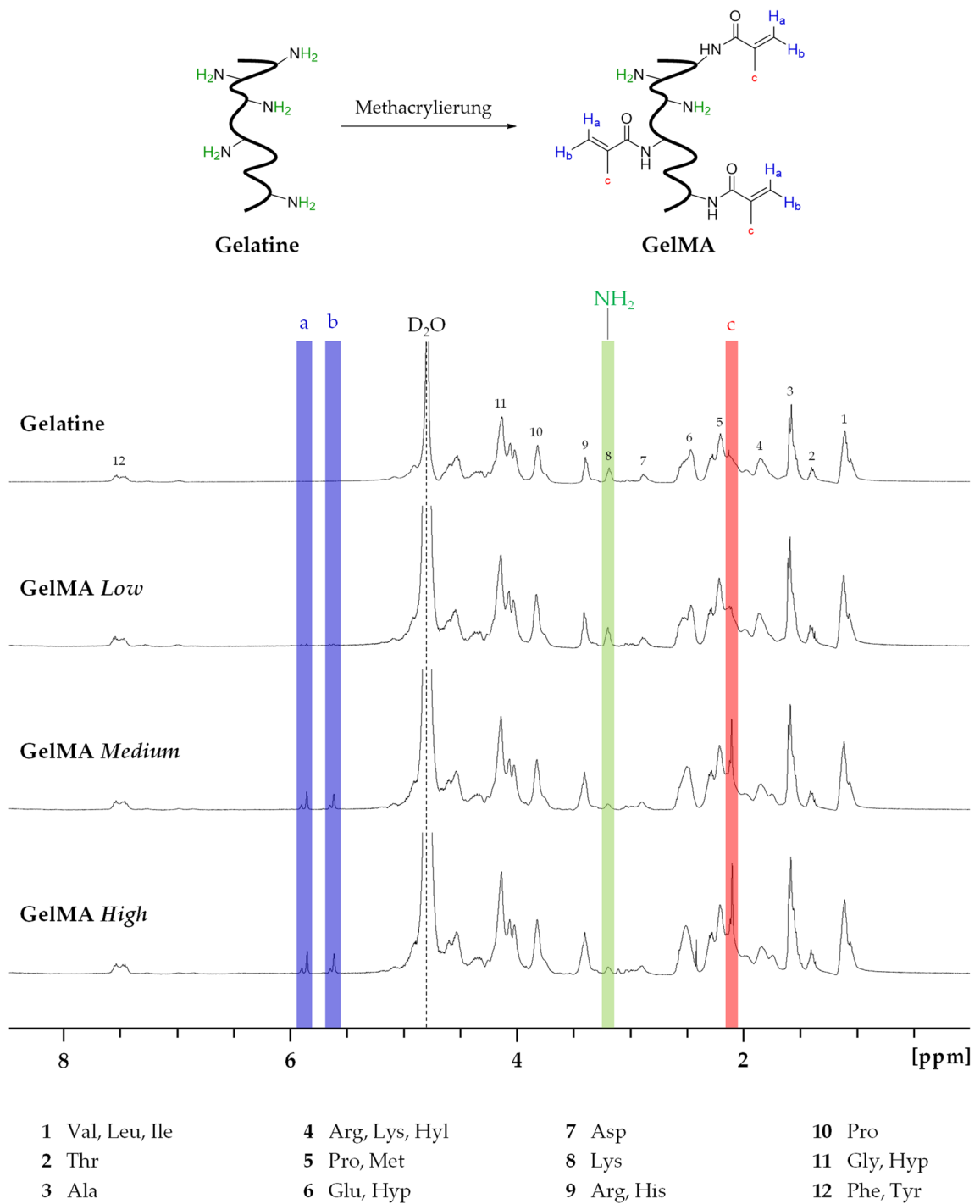


Abbildung 18: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, D_2O , 315 K) von unfunktionalisierter Gelatine und GelMA-Hydrogelvorläufern mit steigendem Funktionalisierungsgrad (*Low*, *Medium*, *High*) (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kemper).

Darüber hinaus wurden ^1H -NMR-Spektren der Hydrogelvorläufer aufgenommen und mit dem Spektrum der unfunktionalisierten Gelatine verglichen (*Abbildung 18*). Die erfolgreiche Methacrylierung der Gelatine ließ sich dabei an drei Regionen im Spektrum nachweisen. Besonders charakteristisch waren die Peaks bei 5,88 ppm und 5,64 ppm, die auf die beiden Vinylprotonen der Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppe zurückzuführen waren. Das Peakintegral korrelierte dabei mit dem Funktionalisierungsgrad, weswegen eine wachsende Signalintensität in der Reihenfolge *Low < Medium < High* zu beobachten war. Da die Gelatine selbst keine C=C-Bindungen besaß und das überschüssige MAA durch die Dialyse entfernt wurde, konnten die beiden Signale daher als Nachweis für eine erfolgreiche Funktionalisierung angesehen werden. Mit steigendem Methacrylierungsgrad sank zugleich die Anzahl der freien Aminogruppen von Lys und Hyl, sodass eine Abnahme der Signalintensität bei 3,20 ppm gemessen wurde. Ferner führte ein höherer Funktionalisierungsgrad zu einer Vergrößerung des Peaks bei 2,11 ppm, welcher der Methylgruppe der photoreaktiven Gruppe zugeordnet werden konnte.

3.1.2.1.2 Biokompatibilität

Der Einfluss des Funktionalisierungsgrads der GelMA-Hydrogelvorläufer auf die Ausrichtung und Proliferation von Zellen wurde in Kollaboration mit Sonja Haase¹⁵² und Xenia Kempter¹⁵³ (Institut für funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) in einer Biokompatibilitätsstudie mit humanen Fibroblasten (NHDF) untersucht. Grundlage hierfür bildeten 5%ige (w/v) GelMA-Hydrogelvorläuferlösungen, die einen Anteil von 0,3 % (w/v) des Photoinitiators Lithiumphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinat (LAP) sowie $2,5 \times 10^6$ NHDF·mL⁻¹ enthielten. Nach Suspension der Zellen in der Vorläuferlösung wurde die flüssige Biotinte durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻², 1 min) zum Hydrogel ausgehärtet. Im Zuge der photochemischen Vernetzung reagierten die Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen nach einem radikalischen Kettenpolymerisationsmechanismus, wodurch die Gelatineketten miteinander verknüpft wurden. Um die Toxizität der photoreaktiven Gruppen vor ihrer chemischen Vernetzung für die Zellen möglichst gering zu halten, erfolgten Suspension der Zellen und Photopolymerisation unmittelbar aufeinander. Die Hydrogele wurden anschließend mit Zellkulturmedium

überschichtet, wodurch mögliche Reste des Photoinitiators verdünnt und herausgewaschen wurden. Die in den jeweiligen GelMA-Hydrogelen (*Low, Medium, High*) eingeschlossenen NHDF wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert und Viabilität, Ausrichtung sowie Proliferation der Zellen durch Lebend-/Tot-Färbungen an den Tagen 1, 7 und 14 mit anschließender Konfokalmikroskopie visualisiert (Abbildung 19).

Es waren deutliche Unterschiede im Zellverhalten für die verschiedenen GelMA-Varianten (*Low, Medium, High*) sichtbar. Obwohl in allen Hydrogelen eine exzellente Viabilität sowie homogene Verteilung der NHDF durch die RGD-vermittelte Zelladhäsion nachgewiesen werden konnte, hatte die Vernetzungsdichte einen erheblichen Einfluss auf die Geschwindigkeit von Zellausrichtung und Proliferation. Beide zellulären Prozesse wurden mit steigendem Funktionalisierungsgrad von GelMA stark verlangsamt. Während für GelMA *High* innerhalb des 14-tägigen Kultivierungszeitraums keine signifikante Erhöhung der Zellzahl festgestellt werden konnte, wurde dagegen in GelMA *Medium* und insbesondere in GelMA *Low* eine starke Proliferation sowie Ausbildung eines dichten Netzwerks der Fibroblasten beobachtet. Darüber hinaus war in den niedrig bis moderat vernetzten Hydrogelen die charakteristische spindelförmige Morphologie der NHDF bereits nach sieben Tagen für alle Zellen vollständig ausgeprägt. Die beobachteten Unterschiede für die drei GelMA-Varianten waren auf folgende Gründe zurückführbar: Einerseits führte der größere Vernetzungsgrad zu einer erhöhten Steifigkeit der Hydrogele, die sich nachteilig auf die Kultivierbarkeit der Fibroblasten, welche typischerweise das Bindegewebe im Körper bilden, auswirkten. Andererseits wurde mit zunehmender Vernetzungsdichte der für die Ausrichtung der NHDF zur Verfügung stehende Platz im Gelatinenetzwerk reduziert. Die NHDF mussten daher die 3D-Stützstruktur zunächst über die MMP-Domänen teilweise abbauen und die extrazelluläre Mikroumgebung umformen.^{158,159} Allgemein sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die nachgewiesene Präferenz der NHDF für GelMA *Low* nicht für alle Zelltypen verallgemeinert werden kann. Je nach Zelllinie werden unterschiedliche Anforderungen hinsichtlich der mechanischen Festigkeit und Komposition der Extrazellulärmatrix an das Hydrogel gestellt.

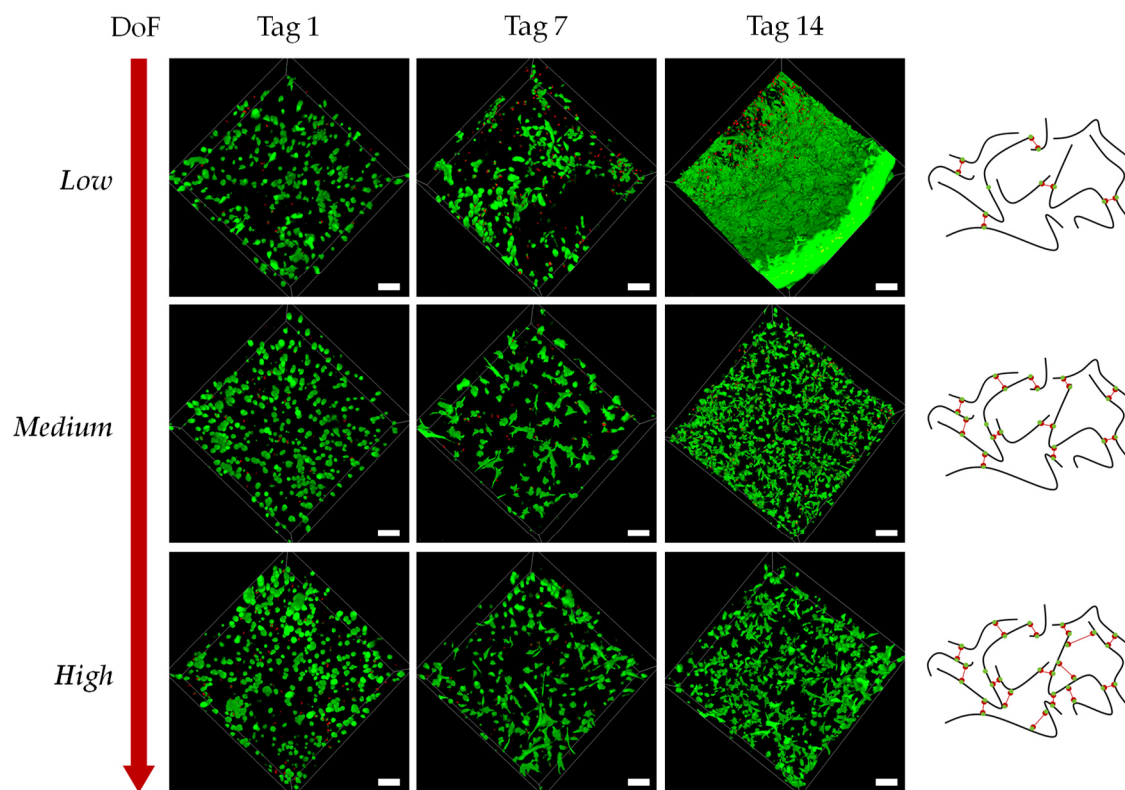


Abbildung 19: Lebend-/Tot-Färbung von NHDF mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584 \text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700 \text{ nm}$) in GelMA-Hydrogelen mit unterschiedlicher Vernetzungsdichte (*Low*, *Medium*, *High*) an den Tagen 1, 7 und 14 sowie anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: $100 \mu\text{m}$ (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempter).

3.1.2.1.3 Diffusionsstudie

3.1.2.1.3.1 Ritger-Peppas-Modell

GelMA-Hydrogele wurden in der Literatur bereits umfassend biologisch charakterisiert und haben eine Vielzahl von Anwendungen im *Tissue Engineering* und im *3D-Bioprinting* gefunden.^{140,147,149,151} Neben den biologischen und physiko-mechanischen Materialeigenschaften spielt darüber hinaus die Versorgung der in der 3D-Stützstruktur eingeschlossenen Zellen eine entscheidende Rolle. So muss sowohl der Transport von Sauerstoff und Nährstoffen in das Hydrogel hinein als auch die Freisetzung von schädlichen Zellmetaboliten aus dem Hydrogel gewährleistet sein.^{160,161} Beide Vorgänge beruhen auf Diffusionsprozessen.¹⁶² Bisher gibt es in der Literatur nur wenige Studien, die sich mit der Diffusion in Gelatine-basierten Hydrogelen befassen.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Gerade für größere Hydrogelkonstrukte, wie sie typischerweise im *3D-Bioprinting* erzeugt werden, reichen Diffusionsprozesse allein häufig nicht aus, um die Versorgung der Zellen im

Inneren des Hydrogels sicherzustellen, weswegen vielfältige Ansätze zur Vaskularisierung von Hydrogelen entwickelt wurden.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Ziel der nachfolgenden Diffusionsstudie war es, ein grundlegendes Verständnis über die Zusammenhänge zwischen Hydrogeleigenschaften und Diffusionsvermögen zu erlangen. In Kollaboration mit Eleftheria Papamanoglou¹⁶⁹ und Benjamin Konetschny¹⁷⁰ (Bachelorstudenten 2020 und 2019, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) wurden unterschiedliche Einflussfaktoren, wie Temperatur, Polymerkonzentration, Vernetzungsgrad, Vernetzungsmechanismus und Molekülgröße, auf die Diffusion in GelMA-Hydrogelen evaluiert, indem die jeweiligen Diffusionskoeffizienten bestimmt wurden.

Grundlage für die Diffusionsexperimente bildeten dünne Hydrogelfilme definierter Größenabmessungen (3 cm × 3 cm × 1 mm), die mit Hilfe einer 3D-gedruckten Gussform hergestellt wurden. Der zu untersuchende Stoff wurde in der flüssigen Hydrogelvorläuferlösung gelöst und nach anschließender photochemischer Vernetzung homogen im Gelatinegerüst eingeschlossen. Die erzeugten Hydrogelfilme wurden in ein definiertes Volumen an dH₂O gegeben und die Freisetzung des diffundierenden Stoffes über die Zeit verfolgt. Aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen Hydrogel und Umgebung diffundierte der gelöste Stoff gemäß der Fick'schen Diffusion in die umliegende Lösung, wo seine Konzentration mit der Zeit zunahm. Innerhalb des Hydrogels erfolgte der Transport des gelösten Stoffes in den wassergefüllten Zwischenräumen des Polymergerüsts. Dabei hatten insbesondere die Größe des gelösten Stoffes, die Mobilität der Polymerketten sowie die Wechselwirkung zwischen gelöstem Stoff und Polymerketten einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit des Transportprozesses.¹⁷¹

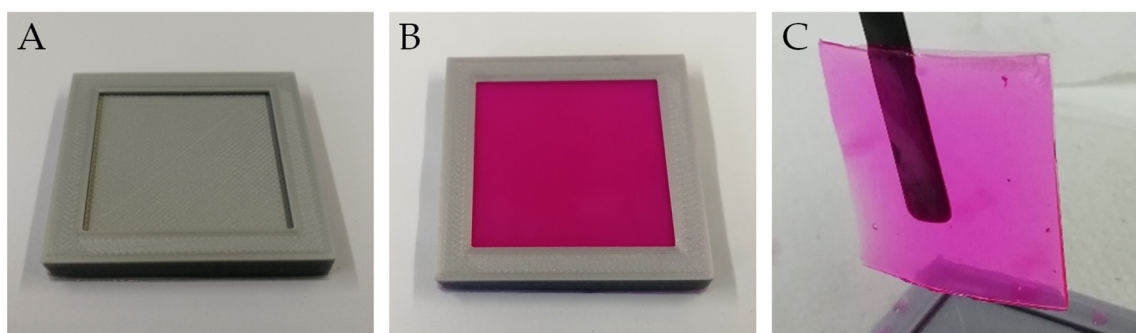


Abbildung 20: Herstellung eines exemplarischen GelMA-Hydrogelfilms, in dem der Farbstoff Rhodamin B eingeschlossen wurde.

Die Diffusion erfolgte näherungsweise gemäß des 2. Fick'schen Gesetzes, wobei $\partial c / \partial t$ die Änderung der Konzentration c mit der Zeit t , D der Diffusionskoeffizient und x die Position im Hydrogel angeben.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1)$$

Ritger und Peppas haben ein einfaches Modell entwickelt, mit dem die Freisetzung des gelösten Stoffes gemäß des 2. Fick'schen Gesetzes durch einen polynomialen Zusammenhang beschrieben werden kann, bei dem M_t/M_∞ die partielle Freisetzung, k eine kinetische Konstante, t die Zeit und n den Diffusionsexponenten darstellen.¹⁷²

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (2)$$

Ritger und Peppas zeigten, dass mit dieser Gleichung die Freisetzung aus bestimmten Geometrien (Filme, Zylinder, Kugeln) approximiert werden kann. Basierend auf dem Ritger-Peppas-Modell wurden die Diffusionskoeffizienten D_K für kurze Zeiten und D_L für lange Zeiten aus den folgenden Gleichungen für die jeweiligen Hydrogelfilme berechnet.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{D_K \cdot t}{\pi \cdot l^2}} \quad (3)$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 \cdot D_L \cdot t}{l^2}\right) \quad (4)$$

Die Validität des Ritger-Peppas-Modells war für D_K auf die ersten 60 % und für D_L auf 90 % Freisetzung des gelösten Stoffes aus dem Hydrogelfilm beschränkt. Die Gleichungen (3) und (4) stellen Näherungen dar, die bei der Lösung der Fick'schen Differentialgleichung (1) unter Annahme folgender Anfangs- und Randbedingungen erhalten wurden. Dabei stellen l die Dicke des Films, c_1 die Konzentration des diffundierenden Moleküls zu Beginn im Hydrogelfilm, c_0 die Konzentration an der Grenzfläche zwischen Hydrogel und Umgebung und x die Position im Hydrogel dar.

$t = 0$	$-l/2 < x < l/2$	$c = c_1$
$t > 0$	$x = \pm l/2$	$c = c_0$

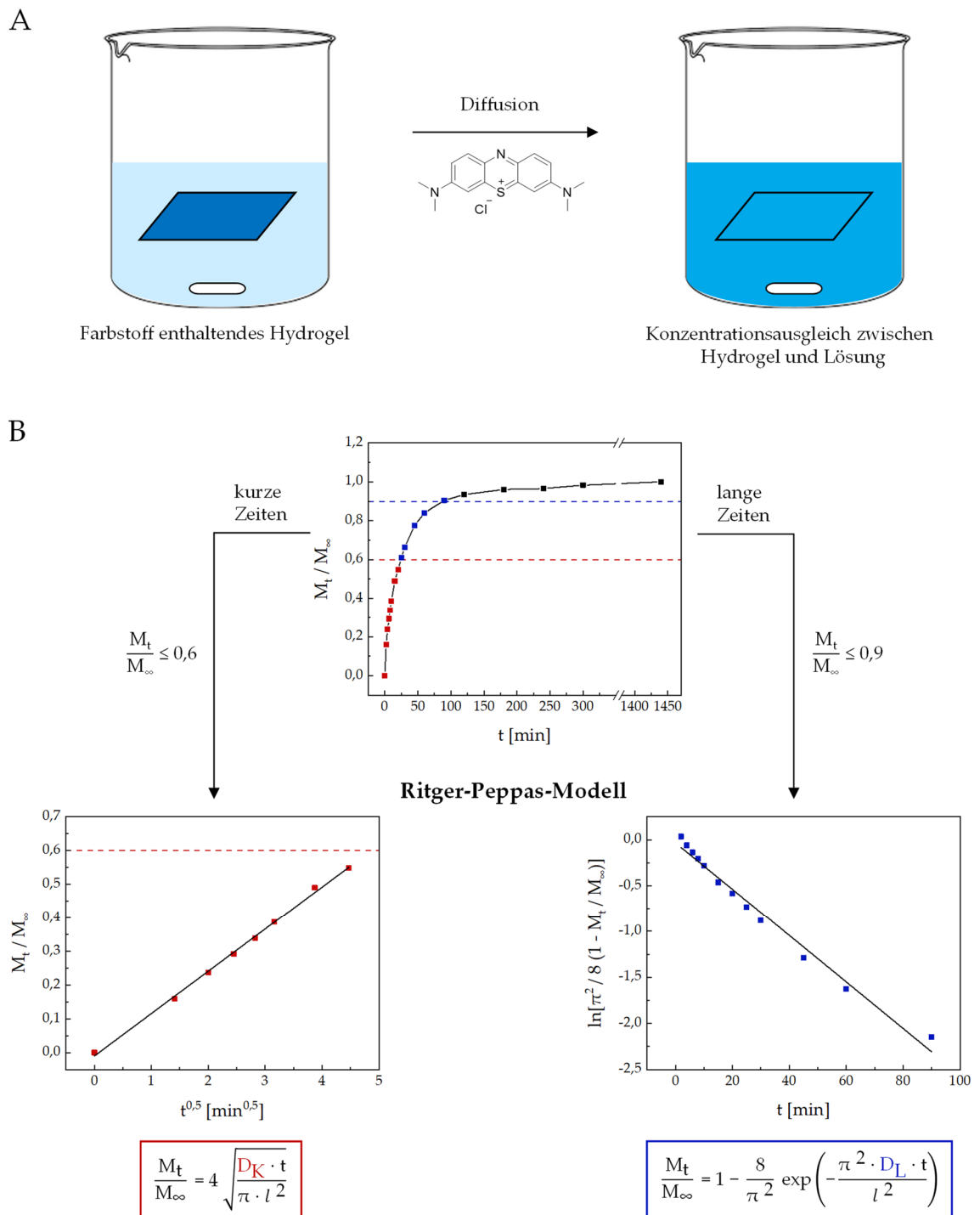


Abbildung 21: Bestimmung der Diffusionskoeffizienten D_K und D_L nach dem Ritger-Peppas-Modell. (A) Schematische Übersicht über das Diffusionsexperiment am Beispiel eines Methyleneblau enthaltenden Hydrogelfilms. (B) Auftragung der zeitlichen Zunahme des freigesetzten Farbstoffmoleküls in der umgebenden Lösung. In Rot markiert sind die ersten 60 % der Freisetzung, in Blau bis 90 % Freisetzung. Gemäß den von Ritger und Peppas entwickelten Approximationen wurden die Messwerte der farblich markierten Bereiche aufgetragen, eine lineare Trendlinie erstellt und der jeweilige Diffusionskoeffizient für kurze bzw. lange Zeiten aus der Steigung berechnet.

Zunächst wurde überprüft, ob für die gemessene Freisetzung des gelösten Stoffes aus dem Hydrogelfilm eine reine Fick'sche Diffusion angenommen werden konnte. Dazu wurden die experimentellen Daten exemplarisch für ein 5%iges (w/v) GelMA-Hydrogel (*Low*) mit eingeschlossenem Dextran 10 nach Gleichung (2) gefittet. Der ermittelte Diffusionsexponent $n = 0,44$ lag nahe bei 0,5, dem Wert für einen idealen Film, weswegen die Freisetzung gemäß der Fick'schen Diffusion modelliert und die von Ritger und Peppas entwickelten Approximationen angewendet werden konnten.

Unter Verwendung des Ritger-Peppas-Modells wurden für alle Hydrogelproben die Diffusionskoeffizienten D_K und D_L ermittelt. Bei Hydrogelen handelt es sich jedoch um keine idealen Systeme, da sie in Wasser quellen und somit ihre Dicke und ihr Volumen im Laufe der Zeit verändern. Die Gültigkeit des Ritger-Peppas-Modells ist beschränkt auf nicht quellbare Systeme bzw. Materialien, die über den Messzeitraum nicht mehr als 25 % ihres ursprünglichen Volumens quellen.¹⁷³ Daher wurden lediglich kurze Zeiten für die Auswertung herangezogen, da die Hydrogele in der ersten Stunde nur einer geringen Quellung unterlagen.

Im Folgenden wurden unterschiedliche Einflussfaktoren in einer Diffusionsstudie mit Gelatine-basierten Hydrogelen evaluiert. Einerseits wurde untersucht, wie sich Veränderungen der Hydrogeleigenschaften auf den Diffusionskoeffizienten von Dextran 10 ($M_n = 10$ kDa) auswirkten. Andererseits wurden die Diffusionskoeffizienten von verschiedenen Verbindungen mit zunehmender Molekülgröße in einem Hydrogel definierter Zusammensetzung verglichen.

3.1.2.1.3.2 Abhängigkeit der Diffusion von den Hydrogeleigenschaften

Zunächst wurde die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Dextran 10 in 5%igen (w/v) GelMA-Hydrogelen (*Low*) studiert (*Abbildung 22 A*). Die Besonderheit der Gelatine liegt in ihrer temperaturabhängigen, reversiblen Gelierbarkeit. Bei Abkühlung einer Gelatinelösung auf unter 30 °C werden durch Ausbildung partieller Tripelhelices, die der Kollagenstruktur ähneln, physikalisch vernetzte Hydrogele gebildet. Dieser Prozess kann jedoch durch Temperaturerhöhung wieder rückgängig gemacht werden.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Die Thermosensitivität der Gelatine bleibt auch nach deren chemischer Modifikation im GelMA-Hydrogel erhalten.¹⁷⁷ Die gewählte Temperatur im Diffusionsexperiment hatte damit einen entscheidenden Einfluss auf die Anordnung der Polymerketten und Tertiärstruktur der Gelatine. Es wurden die

Diffusionskoeffizienten von ausschließlich physikalisch gelierten GelMA-Hydrogelen bei 23 °C, von physikalisch und chemisch vernetzten Hydrogelen bei 23 °C sowie von ausschließlich chemisch vernetzten Hydrogelen bei 37 °C bestimmt. Beim Vergleich der beiden Hydrogelproben, die bei 23 °C gemessen wurden, ließ sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der ermittelten Diffusionskoeffizienten feststellen, weswegen davon auszugehen ist, dass die zusätzliche chemische Vernetzung nur einen geringen Einfluss auf das Diffusionsvermögen besaß. Eine Erhöhung der Temperatur führte dagegen zu einer Steigerung des Diffusionskoeffizienten. Die beschleunigte Freisetzung von Dextran 10 war dabei auf die Summe aus dem Verlust der Tripelhelices und der erhöhten Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund der höheren Temperatur zurückzuführen. Welcher der beiden Faktoren den größeren Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten besaß, ließ sich anhand der durchgeführten Experimente jedoch nicht ableiten.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss einer steigenden Polymerkonzentration auf das Diffusionsvermögen von Dextran 10 bewertet (*Abbildung 22 B*). Bei Erhöhung der GelMA-Konzentration von 5 % auf 20 % (w/v) wurde eine kontinuierliche Abnahme der Diffusionskoeffizienten gemessen. Der Grund hierfür lag in einer zunehmenden Dichte des Polymernetzwerks, wodurch Porengröße und Diffusionsgeschwindigkeit von Dextran 10 herabgesetzt wurden. Dieser Zusammenhang konnte bereits in der Literatur an anderen Hydrogelsystemen wie z. B. Polyethylenglykoldiacrylat (PEGDA) gezeigt werden.¹⁷⁸

Bei der Vernetzungsdichte wäre ein analoger Trend zu erwarten gewesen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl aus einer Erhöhung der Polymerkonzentration als auch der Anzahl von Vernetzungen mechanisch stabilere Hydrogele hervorgehen.^{140,179} Dennoch wurde wider Erwarten mit zunehmendem Vernetzungsgrad eine Erhöhung der Diffusionskoeffizienten gemessen (*Abbildung 22 C*). Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass eine Zunahme der kovalenten Verknüpfungen zwischen den Gelatineketten zwar die mechanische Stabilität erhöhte, die Netzwerkdicke davon jedoch nur unwesentlich beeinflusst wurde. Die Polymerkonzentration blieb für alle drei Vernetzungsgrade (*Low, Medium, High*) dieselbe. Allerdings besaß der Vernetzungsgrad einen erheblichen Einfluss auf die Quelleigenschaften der Hydrogele. Wie in der Literatur bereits gezeigt wurde, sinkt mit zunehmendem Vernetzungsgrad die Quellbarkeit von Hydrogelen.^{140,179} Infolgedessen trat für GelMA *High* die geringste

Volumenänderung während des Messzeitraums auf, wodurch die Dicke des Hydrogelfilms am wenigsten beeinflusst wurde. Die Freisetzung erfolgte schneller, da der zurückzulegende Weg aus dem Hydrogelfilm kürzer war im Vergleich zum stärker quellenden GelMA *Medium* und GelMA *Low*. Aufgrund der guten Quelleigenschaften von GelMA *Low* wurde für das gering vernetzte Hydrogel der niedrigste Diffusionskoeffizient für Dextran 10 gemessen.

Darüber hinaus spielte auch der Vernetzungsmechanismus eine entscheidende Rolle für die Homogenität der resultierenden Polymernetzwerkstruktur. Im Rahmen der Diffusionsstudie wurden Ketten- und Stufenpolymerisationsprodukte miteinander verglichen (*Abbildung 22 D*). Grundlage hierfür bildeten unterschiedlich funktionalisierte Hydrogelvorläufer bzw. Crosslinker, die mit Methacrylat-/Methacrylamid-, Norbornen- oder Thiol-Gruppen modifiziert waren. Die Vernetzung von GelMA erfolgte durch einen Kettenpolymerisationsmechanismus, während GelNB/DTT und GelNB/GelS durch einen Stufenpolymerisationsmechanismus vernetzt wurden. Kettenpolymerisationsprodukte wiesen eine hochgradig heterogene Netzwerkstruktur auf, da sowohl Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen von unterschiedlichen Gelatinesträngen als auch vom gleichen Gelatinestrang miteinander reagieren konnten. Letzterer Fall führte dabei zur Ausbildung von Loops anstelle einer intermolekularen Vernetzung. Bei der Stufenpolymerisation basierend auf der Thiol-En-Chemie wurden hingegen Homopolymerisationen vermieden, da die Norbornen-Gruppe nicht mit sich selbst reagieren konnte, sondern auf ein Thiol als Reaktionspartner angewiesen war.^{40,180} Dennoch konnten bei Verwendung eines Thiol-Crosslinkers wie DTT ebenso Loops entstehen, wenn Norbornen-Gruppen, die auf demselben Gelatinestrang lokalisiert waren, durch DTT miteinander verknüpft wurden. Daher resultierten für die beiden Hydrogelsysteme auf Basis von GelMA und GelNB/DTT ähnliche Diffusionskoeffizienten. Lediglich beim GelNB/GelS-Hydrogel, das auf Norbornen- und Thiol-modifizierten Hydrogelvorläufern beruhte, führte jede Thiol-En-Reaktion zu einer Verknüpfung unterschiedlicher Gelatinestränge. Dementsprechend besaß das Hydrogel die höchste Homogenität und geringsten Netzwerkdefekte, wodurch die Freisetzung von Dextran 10 beschleunigt wurde. Bei gleicher Polymerkonzentration und Vernetzungsgrad wie GelNB/DTT und GelMA wies das GelNB/GelS-Hydrogel einen signifikant höheren Diffusionskoeffizienten auf.

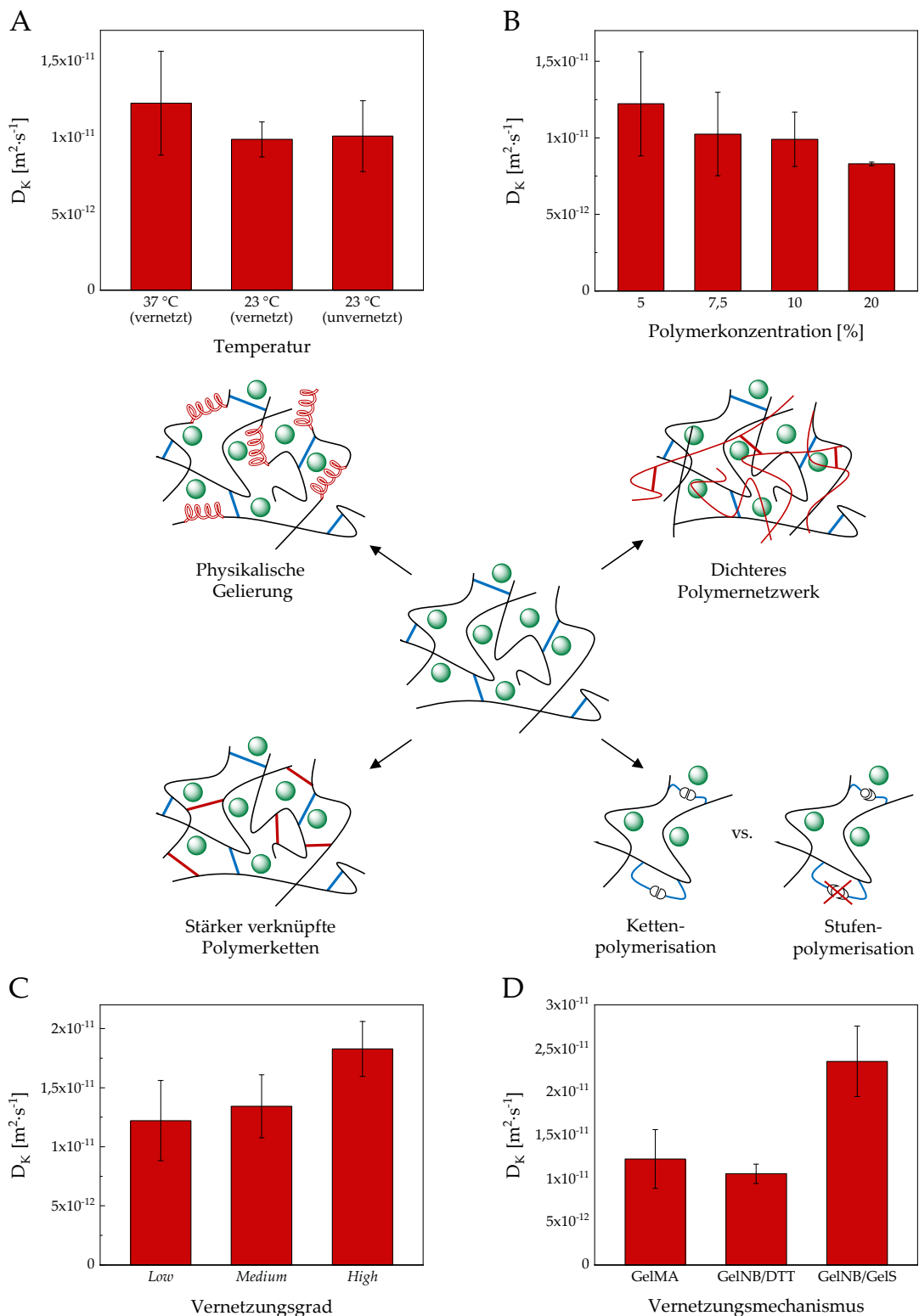


Abbildung 22: Evaluierung unterschiedlicher Einflussfaktoren auf die Diffusion von Dextran 10 ($M_n = 10$ kDa) in GelMA-Hydrogelen. Die nach dem Ritger-Peppas-Modell bestimmten Diffusionskoeffizienten D_K für (A) unterschiedliche Temperaturen, (B) eine steigende Polymerkonzentration, (C) ein steigender Vernetzungsgrad und (D) verschiedene Vernetzungsmechanismen (in Kollaboration mit Eleftheria Papamanoglou).

3.1.2.1.3.3 Abhängigkeit der Diffusion von der Molekülgröße

Neben den bisher diskutierten Einflussfaktoren, die sich auf die Netzwerkeigenschaften des Hydrogels auswirkten, lag im letzten Schritt der Fokus auf dem diffundierenden Molekül (*Abbildung 23 A*). Während in den vorherigen Experimenten Dextran 10 ($M_n = 10\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) eingesetzt wurde, welches der Größe eines kleinen Proteins entsprach, reichte die Bandbreite im Folgenden von sehr kleinen Molekülen wie Glucose ($M = 180\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) über verschiedene Dextrane zunehmender Molekülgröße bis hin zu einem Farbstoff-beladenen Dextran mit einem sehr hohen Molekulargewicht ($M_n = 2\,000\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). In den durchgeführten Diffusionsexperimenten wurden dabei die Polymerkonzentration sowie der Vernetzungsgrad des GelMA-Hydrogels konstant gehalten und lediglich die Molekülgröße bzw. das Molekulargewicht des diffundierenden Stoffes erhöht.

Es wurde eine deutliche Abnahme der Diffusionskoeffizienten mit steigendem Molekulargewicht festgestellt (*Abbildung 23 B*). So unterschieden sich die Diffusionskoeffizienten von Glucose und Dextran 500 um Faktor 118. Für Blue Dextran, welches das höchste Molekulargewicht der getesteten Verbindungen aufwies, konnte dagegen keine Freisetzung mehr nachgewiesen werden. Das Molekül verblieb über den gesamten Messzeitraum im Hydrogel eingeschlossen. Daher ist davon auszugehen, dass die Porengröße des Hydrogels kleiner war als der hydrodynamische Durchmesser von Blue Dextran. Folglich konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Ausschlussgrenze des 5%igen (w/v) GelMA-Hydrogels zwischen 500 und 2000 kDa lag. Neben den Diffusionskoeffizienten wurden zusätzlich die Zeitpunkte aufgetragen, bei denen 60 % des untersuchten Stoffes aus dem Hydrogel freigesetzt waren (*Abbildung 23 C*). Glucose diffundierte aufgrund ihrer geringen Molekülgröße nahezu ungehindert durch das Gelatinegerüst, weswegen bereits nach zehn Minuten eine 60%ige Freisetzung erzielt wurde. Der Zeitpunkt verschob sich mit steigendem Molekulargewicht kontinuierlich nach hinten und wurde für Dextran 500 erst nach 160 min erreicht. Insgesamt ließ sich aus den durchgeführten Diffusionsexperimenten ableiten, dass die Molekülgröße einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Geschwindigkeit der Freisetzung besaß als die Modulation der Netzwerkeigenschaften des GelMA-Hydrogels.

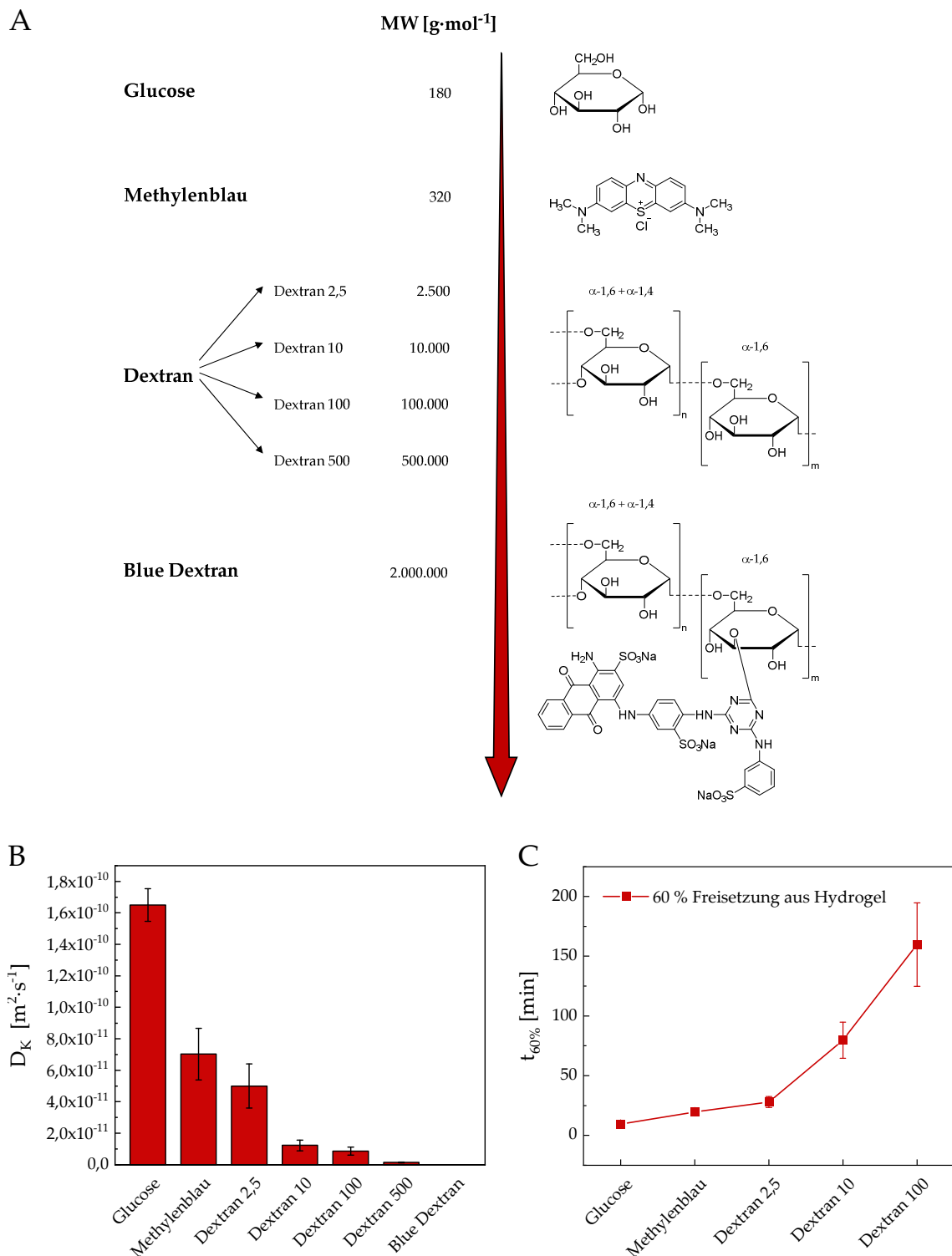


Abbildung 23: Einfluss eines steigenden Molekulargewichts auf die Diffusion in 5%igen (w/v) GelMA-Hydrogelen. (A) Übersicht über die getesteten Verbindungen und (B) die jeweils nach dem Ritger-Peppas-Modell bestimmten Diffusionskoeffizienten D_K . (C) Benötigte Zeit, bis 60 % des im Hydrogelfilm eingeschlossenen Moleküls freigesetzt wurden (in Kollaboration mit Benjamin Konetschny).

3.1.2.1.4 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel das semi-synthetische GelMA-Hydrogel, das sich in der 3D-Zellkultur und im *3D-Bioprinting* als Goldstandard etabliert hat, biologisch und physikalisch charakterisiert. Es wurden drei verschiedene GelMA-Varianten (*Low, Medium, High*), die einen steigenden Anteil von photoreaktiven Gruppen aufwiesen, aus Gelatine Typ A durch Reaktion mit MAA synthetisiert und der jeweilige Funktionalisierungsgrad bestimmt. Die Hydrogelvorläufer bildeten nach photochemischer Vernetzung GelMA-Hydrogele mit unterschiedlicher Vernetzungsdichte. Der Einfluss des Vernetzungsgrads wurde in der 3D-Zellkultur in Bezug auf die Adhäsion, Ausrichtung und Proliferation von NHDF bewertet, wobei insbesondere ein niedriger Vernetzungsgrad das Wachstum der Fibroblasten im Hydrogel am stärksten begünstigte. Darüber hinaus fungierten die GelMA-Hydrogele als Modellsystem für eine umfangreiche Diffusionsstudie. Hierfür wurden die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Stoffe unter variierenden Bedingungen nach dem Ritger-Peppas-Modell bestimmt, um verschiedene Einflussfaktoren zu quantifizieren und miteinander zu vergleichen. Dabei wurde einerseits der Einfluss von Hydrogelparametern, wie physikalische oder chemische Vernetzung, Polymerkonzentration, Vernetzungsgrad sowie Vernetzungsmechanismus, und andererseits der Einfluss der Molekülgröße des diffundierenden Stoffes auf die Diffusionsgeschwindigkeit evaluiert. Das dadurch entwickelte Grundverständnis soll im Folgenden für das chemisch-biologische Design verbesserter Gelatine-basierter Hydrogelsysteme genutzt werden.

3.1.2.2 Norbornen-funktionalisierte Gelatine

Semi-synthetische Hydrogele, wie das im vorherigen Kapitel vorgestellte GelMA, haben im *Tissue Engineering* und im *3D-Bioprinting* als EZM-ähnliche 3D-Stützstrukturen eine große Bedeutung erlangt, da sie die Vorteile von natürlichen und synthetischen Hydrogelen vereinen.^{86,140,146,149,151} Insbesondere die Inkorporation von photoreaktiven Gruppen in natürliche Biopolymere, wie Gelatine, Kollagen oder Hyaluronsäure, erlaubt eine hohe räumliche und zeitliche Kontrolle über die chemische Vernetzung zum Hydrogel.^{102,136} GelMA stellte dabei eines der ersten photopolymerisierbaren Hydrogele dar und gilt bis heute als Goldstandard im *Tissue Engineering*.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Dies ist vor allem auf die Kombination an vorteilhaften Eigenschaften der Gelatine zurückzuführen, wie eine exzellente Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit, das natürliche Vorkommen von RGD- und MMP-Domänen, Thermosensitivität, eine kostengünstige kommerzielle Verfügbarkeit sowie die einfache chemische Modifizierbarkeit.^{131,140,149} Dennoch wurde in zahlreichen Studien gezeigt, dass sich die photochemische Vernetzung von GelMA nachteilig auf die in der Hydrogellösung suspendierten Zellen auswirkt. Der radikalische Vernetzungsmechanismus, der auf einer Kettenpolymerisation beruht, wird durch Sauerstoff inhibiert, weswegen hohe Photoinitiator- und Radikalmengen sowie eine lange UV-Bestrahlungszeit für die Aushärtung zum Hydrogel benötigt werden. Da zudem sowohl die photoreaktiven Gruppen auf demselben als auch auf benachbarten Gelatinesträngen miteinander vernetzt werden können, führt die Photopolymerisation zur Ausbildung heterogener 3D-Netzwerkstrukturen. Darüber hinaus gehen die Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen leicht unerwünschte und zellschädigende Nebenreaktionen, insbesondere Michael-Additionen, mit Nukleophilen auf der Zelloberfläche ein.¹⁸⁰⁻¹⁸²

Aufgrund der genannten Nachteile wurde in den letzten Jahren die Entwicklung von Gelatine-basierten Hydrogelen mit alternativen Strategien zur Photovernetzung, die unter mildereren Bedingungen stattfinden, vorangetrieben. Ein vielversprechender Ansatz stellt dabei die Thiol-En-Chemie dar, die auf der Reaktion zwischen einem Thiol und einem Alken beruht.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Eine besondere Bedeutung kommt hierbei zyklischen Alkenen, insbesondere Norbornenen, zu. Im Gegensatz zu Methacrylaten weist die Norbornen-Gruppe eine geringere Toxizität für Zellen auf und reagiert selektiv mit Thiolen nach einem Stufenpolymerisationsmechanismus.^{180,181,186} Da Thiole erheblich

seltener auf der Zelloberfläche vorhanden sind, werden zellschädigende Nebenreaktionen auf ein Minimum reduziert. Homopolymerisationen der Norbornen-Gruppen werden zudem vermieden, wodurch homogene Netzwerkstrukturen im Zuge der photochemischen Vernetzung entstehen.^{184,187} Ferner wird die Thiol-En-Reaktion nicht durch Sauerstoff inhibiert und erfordert im Vergleich zur Kettenpolymerisation eine geringere Photoinitiator- und Radikal-Konzentration.^{40,180,181} In der Literatur wurden verschiedene Hydrogelsysteme entwickelt und biologisch evaluiert, die auf einem Norbornen-funktionalisierten Biopolymer und einem multifunktionalen Thiol-Crosslinker basieren.^{88,89,181,188,189} Beispielsweise konnten Muñoz *et al.* eine erhöhte Zellviabilität und Ausrichtung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) in GelNB/DTT-Hydrogelen im Vergleich zum Goldstandard GelMA nachweisen.¹⁸¹ Kürzlich hat die Forschungsgruppe von Sandra Van Vlierberghe ein Crosslinker-freies Hydrogelsystem entwickelt, das auf Norbornen- (GelNB) und Thiol-funktionalisierten Gelatinederivaten (GelS) beruht. Dabei konnte eine erhöhte Differenzierung von aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (ASC) gezeigt werden, die auf – durch 3D-Extrusionsdruck erzeugten – Stützstrukturen ausgesät wurden.¹⁹⁰ Trotz der vielversprechenden Ergebnisse gibt es bisher noch keine Untersuchungen über das Verhalten von eingeschlossenen Zellen im GelNB/GelS-Hydrogel und dessen Vorläuferlösung, die das Potenzial für den Einsatz als Biotinte in Biofabrikationsprozessen bestimmen.

Ziel in diesem Kapitel war es daher, die Eignung des GelNB/GelS-Hydrogels als Biotinte für das *3D-Bioprinting* zu evaluieren und seine biologische Performance mit etablierten Hydrogelsystemen wie GelMA und GelNB/DTT zu vergleichen. In Kollaboration mit Sonja Haase¹⁵² und Xenia Kempter¹⁵³ (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) wurde eine neue Synthese für GelNB entwickelt, drei Varianten des GelNB/GelS-Hydrogels mit variierender Vernetzungsdichte etabliert und eine umfangreiche Materialstudie durchgeführt, um GelNB/GelS hinsichtlich der Biokompatibilität von Hydrogel und Vorläuferlösung, Bioabbaubarkeit, Quelleigenschaften, postsynthetischen Funktionalisierbarkeit, Aushärtungszeit und 3D-Verdruckbarkeit zu charakterisieren.¹⁹¹

3.1.2.2.1 Synthese und chemische Charakterisierung

Die Hydrogelvorläufer auf Basis von Norbornen- und Thiol-funktionalisierten Gelatinederivaten wurden jeweils ausgehend von Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom) durch chemische Modifikation der freien Aminogruppen (Lys, Hyl) synthetisiert (*Abbildung 24 A*). In der Literatur lieferten die frühesten Syntheseansätze von GelNB unter Verwendung von 5-Norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid in Analogie zur GelMA-Synthese nur einen geringen Funktionalisierungsgrad von $44 \pm 2 \%$.¹⁸¹ In einer kürzlich von Van Hoorick *et al.* entwickelten Route wurden 5-Norbornen-2-carbonsäure (NBCA) und die Aktivierungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) sowie *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) für die chemische Modifikation verwendet. Dabei konnte ein maximaler Funktionalisierungsgrad der Gelatine von 90 % erzielt werden.⁸⁸ Allerdings wurde die Reaktion in DMSO durchgeführt, das zytotoxisch ist, und daher im Zuge der Aufreinigung vollständig aus dem Produkt entfernt werden muss.¹⁹²⁻¹⁹⁴

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine weiterentwickelte Methode für die Herstellung von GelNB etabliert, welche die Vorteile der wasserbasierten Synthese und eines hohen Modifikationsgrads der beiden vorherigen Routen vereinte. Hierzu wurde NBCA in MES-Puffer (pH 5 - 6) gelöst und nach Aktivierung durch EDC/NHS in den entsprechenden Succinimidylester umgewandelt. Das molare Verhältnis zwischen NBCA, EDC·HCl und NHS betrug 1:2:1 gemäß eines Standardprotokolls für Peptidkupplungschemie.¹⁹⁵ Nach Zugabe der Gelatine wurde der pH-Wert auf 7,5 - 7,8 erhöht, um eine nukleophile Acylsubstitution zu initiieren. Die Kontrolle des Funktionalisierungsgrads erfolgte über die Menge von NBCA und Aktivierungsreagenzien, ohne dass dabei das molare Verhältnis von 1:2:1 verändert wurde. Ziel war es, einen möglichst breiten Bereich unterschiedlicher Funktionalisierungsgrade durch Modulation der Synthese abzudecken. Mittels TNBSA-Assay wurde der jeweilige Funktionalisierungsgrad der GelNB-Hydrogelvorläufer bestimmt (*Abbildung 24 B,D*). Die Synthese mit 0,3 Äq. NBCA lieferte GelNB mit niedrigem (DoF: $20 \pm 2 \%$), 2 Äq. NBCA mit moderatem (DoF: $53 \pm 1 \%$) und 10 Äq. NBCA mit hohem Funktionalisierungsgrad (DoF: $97 \pm 1 \%$). Im Folgenden werden die Hydrogelvorläufer als GelNB *Low*, *Medium* und *High* bezeichnet. Eine Konversion von 97 % der freien Aminogruppen stellte dabei den bisher höchsten Funktionalisierungsgrad für Norbornen-funktionalisierte Gelatine dar. Zusätzlich wurden ¹H-NMR-Spektren der

GelNB-Hydrogelvorläufer aufgenommen und mit dem Spektrum der unfunktionalisierten Gelatine verglichen (*Abbildung 25 A*). Die erfolgreiche Norbornen-Funktionalisierung ließ sich dabei einerseits an der Zunahme der Peakintegrale der Vinylprotonen von *Low* < *Medium* < *High* bei 6,44 ppm, 6,39 ppm und 6,37 ppm nachweisen und andererseits an einer abnehmenden Signalintensität der freien Aminogruppen bei 3,20 ppm. Darüber hinaus konnten mit steigendem Funktionalisierungsgrad weitere Protonen dem Norbornengerüst zugeordnet werden.

Die Synthese von GelS wurde nach einer Methode von Van Vlierberghe *et al.* unter Verwendung von *N*-Acetyl-DL-homocysteinethiolacton (AHCT) durchgeführt.¹⁹⁶ Die Reaktion, Aufreinigung und Lagerung von GelS erfolgte unter Schutzgasatmosphäre, um eine Oxidation der Thiolgruppen und Bildung von Disulfidbrücken zu vermeiden. Die Höhe des Funktionalisierungsgrads wurde durch die Menge des Thiolierungsreagenzes kontrolliert, wobei im Vergleich zu GelNB eine deutlich niedrigere Konversion erzielt wurde (*Abbildung 24 C,E*). Alternative Thiolierungsreagenzien wie z. B. 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz) erlauben zwar höhere Reaktionsumsätze, sind jedoch aus Kostengründen für die Herstellung von Hydrogelvorläufern im Grammmaßstab eher ungeeignet.^{197,198} Die Synthese mit 1 Äq. AHCT lieferte GelS mit niedrigem (DoF: 20 ± 3 %) und 5 Äq. AHCT mit moderatem (DoF: 50 ± 3 %) Funktionalisierungsgrad. Die GelS-Hydrogelvorläufer werden im Folgenden als GelS *Low* und GelS *Medium* bezeichnet. Eine weitere Erhöhung der Äquivalente von AHCT führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung des Modifikationsgrads. In den gemessenen ¹H-NMR-Spektren korrelierte ein zunehmender Thiolierungsgrad mit einem wachsenden Peakintegral der Acetylgruppe bei 2,23 ppm und einer Abnahme der Signalintensität der freien Aminogruppen bei 3,20 ppm (*Abbildung 25 B*).

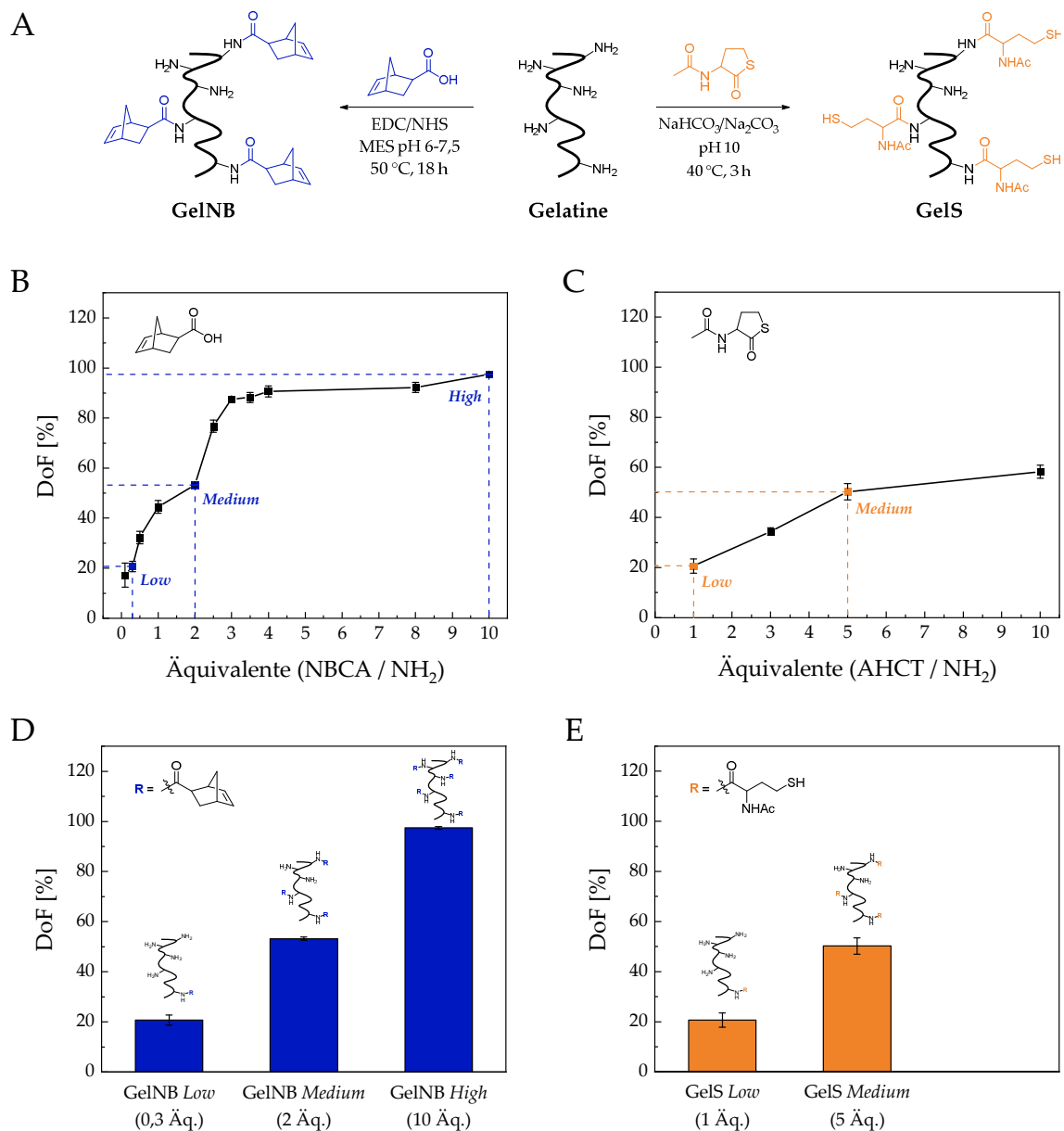
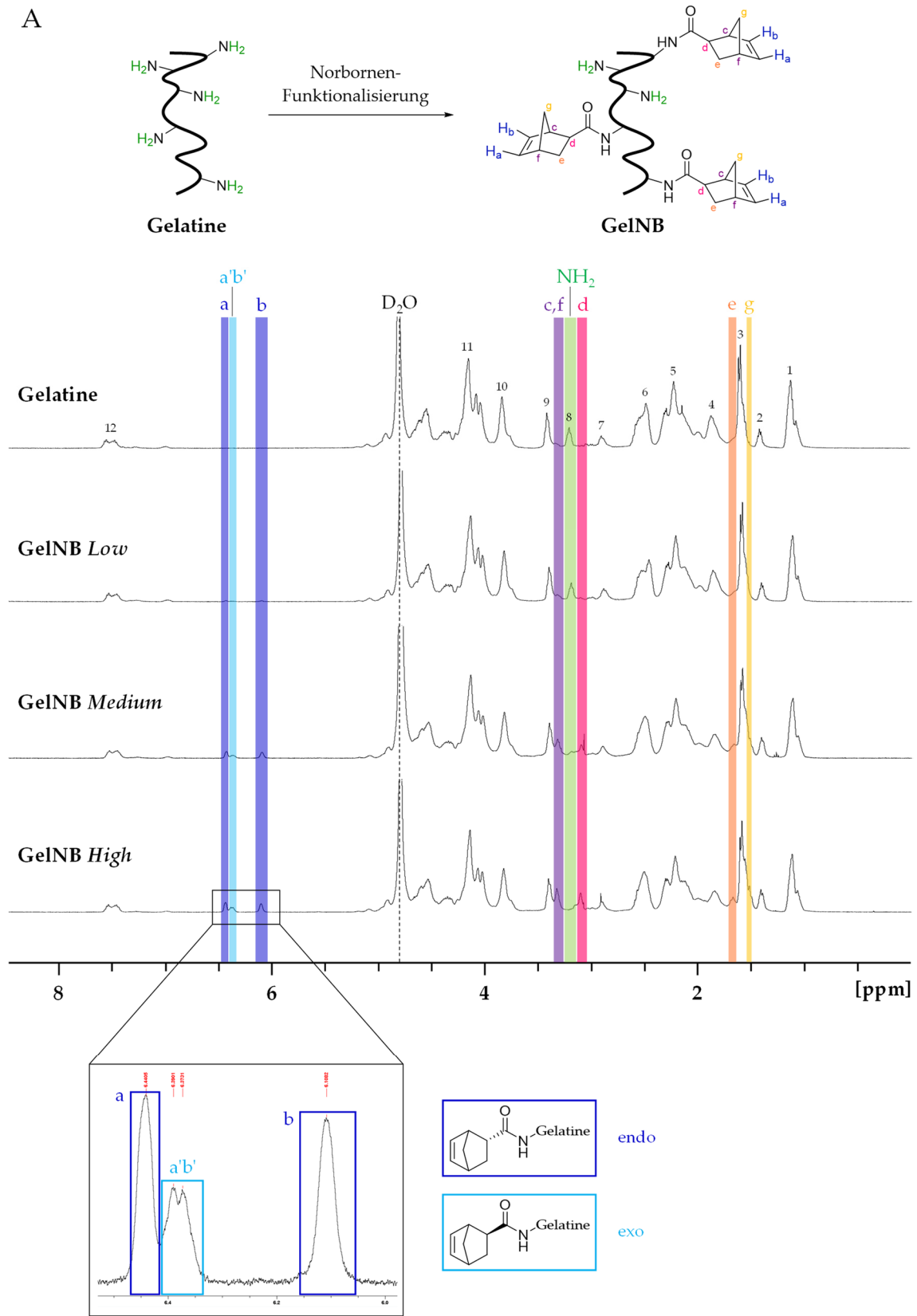


Abbildung 24: (A) Synthese von GelNB- und Gels-Hydrogelvorläufern aus Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierstärke: ~ 300 g Bloom) und anschließende chemische Charakterisierung mittels TNBSA-Assay. Zunahme des Funktionalisierungsgrads (DoF) der synthetisierten (B) GelNB-Hydrogelvorläufer mit steigender NBCA-Menge und der (C) Gels-Hydrogelvorläufer mit steigender AHCT-Menge. Ausgewählte (D) GelNB- (*Low*, *Medium*, *High*) und (E) Gels-Hydrogelvorläufer (*Low*, *Medium*), welche die Grundlage für Thiol-En-Photoclick-Hydrogele mit unterschiedlicher Vernetzungsdichte bildeten (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempfer).



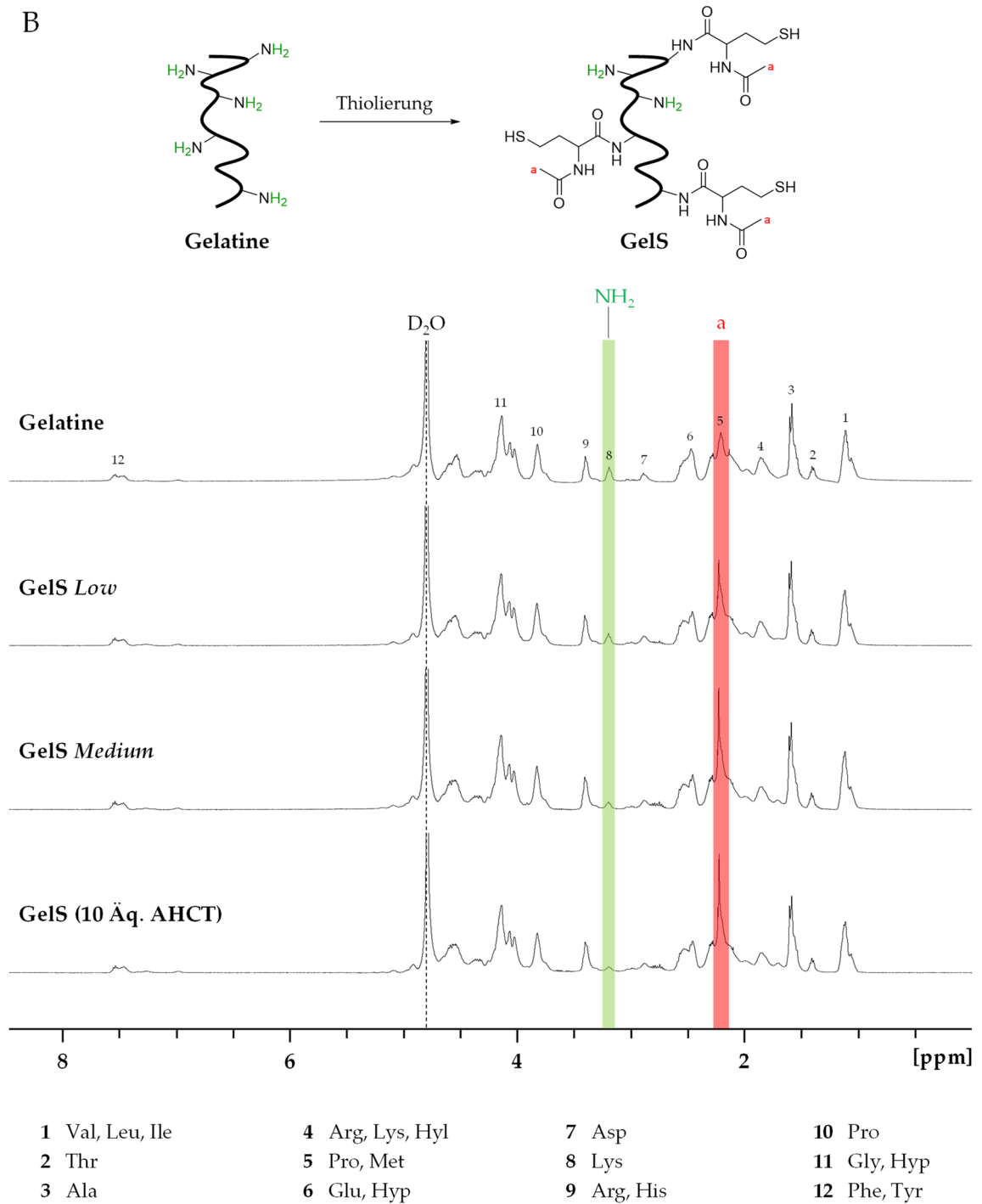


Abbildung 25: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz, D_2O , 315 K) von unmodifizierter Gelatine und den Thiol-En-Click-Hydrogelvorläufern mit steigendem Funktionalisierungsgrad: (A) GelNB (*Low, Medium, High*) und (B) Gels (*Low, Medium, 10 Äq. AHCT*) (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempter).

3.1.2.2.2 Bildung des Thiol-En-Photoclick-Hydrogels GelNB/GelS

Thiol-En-Click-Reaktionen zeichnen sich durch eine schnelle Reaktionskinetik, einen vollständigen Reaktionsumsatz, die Kompatibilität mit dem Lösungsmittel Wasser und einer hohen Biokompatibilität aus, weswegen sie eine hohe Bedeutung in der bioorganischen Chemie besitzen.^{183,199,200} Durch den Einsatz von Thiol-En-Click-Chemie wurden die funktionalisierten Gelatinderivate ohne zusätzliches Crosslinker-Molekül, wie z. B. DTT, photochemisch miteinander vernetzt (Abbildung 26). Für die Herstellung von GelNB/GelS-Hydrogelen wurden die Vorläufer GelNB und GelS separat gelöst und in äquimolarem Verhältnis hinsichtlich der photoreaktiven Gruppen (NB:S = 1:1) miteinander gemischt. Nach Zugabe des Photoinitiators LAP wurde die Photopolymerisation zum Hydrogel durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) induziert.

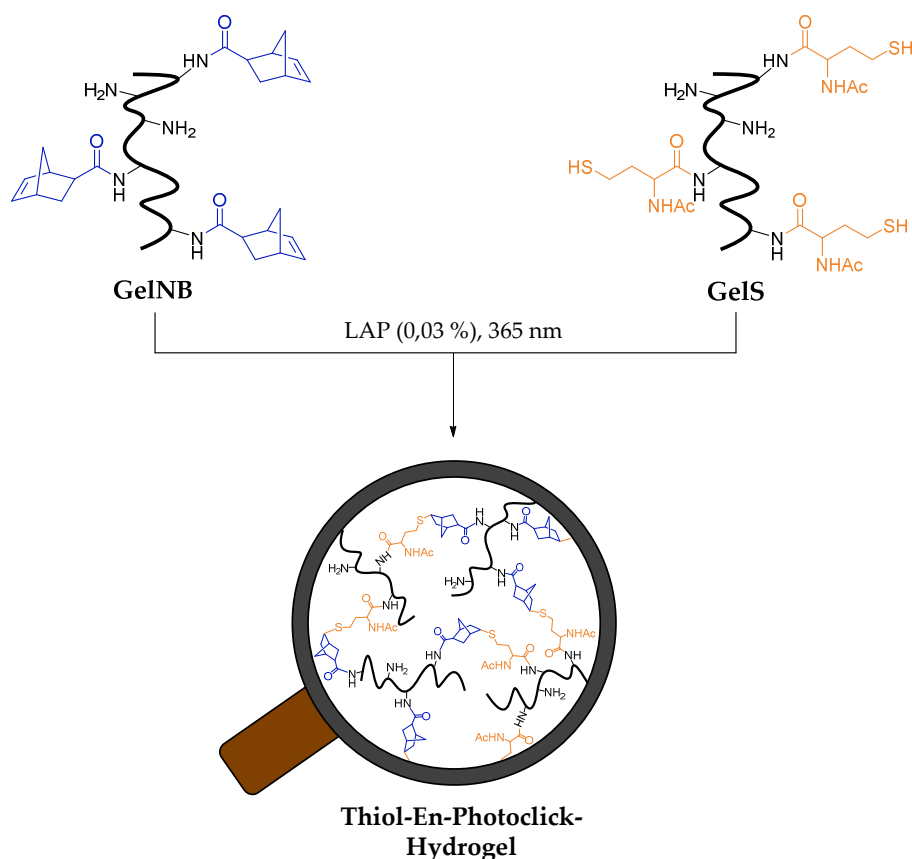


Abbildung 26: Bildung des Thiol-En-Photoclick-Hydrogels durch photochemische Vernetzung der GelNB- und GelS-Hydrogelvorläufer.

Wie oben gezeigt, resultierten aus den jeweiligen Synthesen von GelNB und GelS Funktionalisierungsgrade von 20 % bis 97 %, welche Auswirkung auf die viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele besaßen. Allgemein gilt: Je höher der Funktionalisierungsgrad, desto höher der Vernetzungsgrad und die Steifigkeit des resultierenden Hydrogels. In Analogie zu GelMA wurden drei Varianten des GelNB/GelS-Hydrogels mit geringer, moderater und hoher Vernetzungsdichte (*Low*, *Medium*, *High*) etabliert.^{141,152,204}

Thiol-En-Photoclick-Mischungen von

1. GelNB *Low* + GelS *Low*
2. GelNB *Medium* + GelS *Medium*
3. GelNB *High* + GelNB *Medium*

werden nach photochemischer Vernetzung zum Hydrogel im Folgenden bezeichnet als

1. GelNB/GelS *Low*,
2. GelNB/GelS *Medium*
3. GelNB/GelS *High*.

Der Einfluss der Vernetzungsdichte auf die Quellbarkeit und Bioabbaubarkeit wurde in Kollaboration mit Alisa Grimm²⁰¹ (Masterstudentin 2020, Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) an 5%igen (w/v) GelNB/GelS-Hydrogelen (*Low*, *Medium*, *High*) untersucht. Mit zunehmendem Vernetzungsgrad nahm aufgrund der dichteren Netzwerkstruktur und der abnehmenden Flexibilität der Polymerketten die Quellbarkeit der Hydrogele ab (*Abbildung 27 A*). Es wurde eine Reduktion des Massenquellverhältnisses von 17,4 für GelNB/GelS *Low* auf 8,7 für GelNB/GelS *High* gemessen. Der beobachtete Zusammenhang zwischen steigendem Vernetzungsgrad und abnehmender Quellbarkeit wurde in der Literatur bereits für GelMA-Hydrogele aufgezeigt.^{140,179} Die Bioabbaubarkeit der Hydrogele wurde in PBS mit 10 % (v/v) FCS durch Gewichtsmessungen über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt (*Abbildung 27 B*). Die Anwesenheit von proteolytisch spaltbaren Sequenzen (MMP-Spaltsequenzen) entlang des Gelatinemoleküls gewährleistete dabei die enzymatische Bioabbaubarkeit der Hydrogele. Für GelNB/GelS *Low* wurde ein vollständiger Abbau des Hydrogels innerhalb von sieben Tagen gemessen. Mit steigender Vernetzungsdichte verlangsamte sich die Abbaugeschwindigkeit, da durch die stärkere Verknüpfung der Gelatineketten in der Summe mehr Spaltungsreaktionen stattfinden mussten, um das Hydrogel zu fragmentieren.

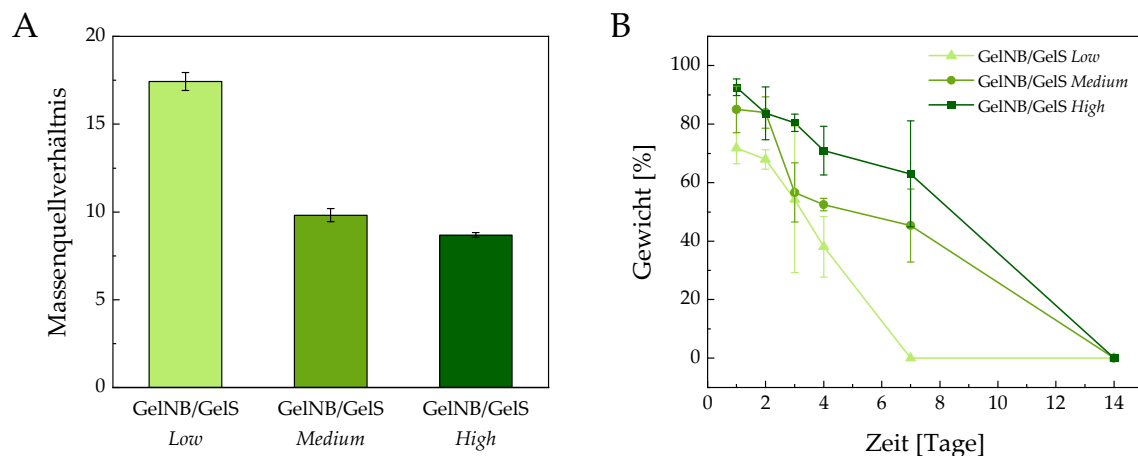


Abbildung 27: (A) Massenquellverhältnis von GelNB/GelS-Hydrogelen mit unterschiedlicher Vernetzungsdichte. (B) Bioabbaubarkeit von GelNB/GelS-Hydrogelen (*Low*, *Medium*, *High*) in PBS mit 10 % (v/v) FCS über einen Zeitraum von 14 Tagen (in Kollaboration mit Alisa Grimm und Sonja Haase).

Im nächsten Schritt wurde die erforderliche Dauer der UV-Strahlung bis zur Aushärtung zum Hydrogel untersucht. Die benötigte Bestrahlungszeit stellt im *3D-Bioprinting* einen wichtigen Faktor dar, da sie einerseits die Herstellungszeit pro Schicht und andererseits die Expositionsdauer gegenüber der zellschädigenden UV-Strahlung bestimmt. Wie oben bereits beschrieben, erfolgte die photochemische Vernetzung von Thiol-En-basierten Hydrogelsystemen nach einem Stufenpolymerisationsmechanismus, während die Photopolymerisation von GelMA nach einem Kettenpolymerisationsmechanismus verlief. Da in der Literatur die beiden unterschiedlichen Mechanismen bereits umfassend charakterisiert und verglichen wurden, lag der Fokus im Folgenden insbesondere auf den beiden Thiol-En-basierten Hydrogelsystemen GelNB/DTT (*High*) und GelNB/GelS (*High*) hinsichtlich der jeweils benötigten Aushärtungszeit und Photoinitiator-Konzentration. Im Vergleich zu GelMA erfolgte die Photopolymerisation der Thiol-En-Hydrogele bei gleichen Bedingungen (0,3 % (w/v) LAP, 320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) deutlich schneller (*Abbildung 28 B*). Mit Erhöhung der Bestrahlungsintensität konnte die Aushärtungszeit für GelMA zwar reduziert werden (*Abbildung 28 A*); da jedoch durch dieses Vorgehen die Strahlungsbelastung für die in der Hydrogellösung eingeschlossenen Zellen steigt, sollte aus biologischen Gesichtspunkten die Bestrahlungsintensität minimal gehalten werden. Ausgehend von der für GelMA-Hydrogele typischerweise eingesetzten LAP-Konzentration von 0,3 % (w/v) wurde die Photoinitiator-Menge kontinuierlich auf

0,01 % (w/v) verringert und dabei die Auswirkung auf die Aushärtungszeit für die beiden Thiol-En-Hydrogele evaluiert (*Abbildung 28 C*). Die Reduktion der LAP-Konzentration führte zu keiner Veränderung in der erforderlichen Bestrahlungszeit von GelNB/GelS-Hydrogelen. Erst ab einer Konzentration von 0,01 % (w/v) erhöhte sich die Dauer von einer Sekunde auf zwei Sekunden, weswegen 0,03 % (w/v) als die bestgeeignete Photoinitiator-Konzentration für die Photopolymerisation angesehen wurde. Für das Crosslinker-freie GelNB/GelS-Hydrogel benötigte es lediglich eine Thiol-En-Reaktion zwischen einer Thiol-Gruppe von GelS und einer Norbornen-Gruppe von GelNB, um zwei Gelatineketten miteinander zu verknüpfen. Im Gegensatz dazu erhöhte sich im GelNB/DTT-Hydrogelsystem die Anzahl der erforderlichen Thiol-En-Reaktionen auf zwei bei Verwendung des biofunktionalen Thiol-Crosslinkers DTT (*Abbildung 28 D*). Die Vernetzung erforderte die Reaktion beider Thiol-Gruppen von DTT mit je einer Norbornen-Gruppe von GelNB. Da die Norbornen-Gruppen sich sowohl auf demselben Gelatinestrang als auch auf benachbarten Gelatinemolekülen befinden konnten, führte nur eine begrenzte Anzahl der Thiol-En-Reaktionen zur Vernetzung der Polymerketten. Aufgrund der Möglichkeit von auftretenden Loops anstelle von intermolekularen Vernetzungen wurden weniger homogene Netzwerke im Vergleich zum Crosslinker-freien Hydrogelsystem gebildet. Darüber hinaus resultierten aus der Reduktion der LAP-Konzentration längere Aushärtungszeiten für das GelNB/DTT-Hydrogel.

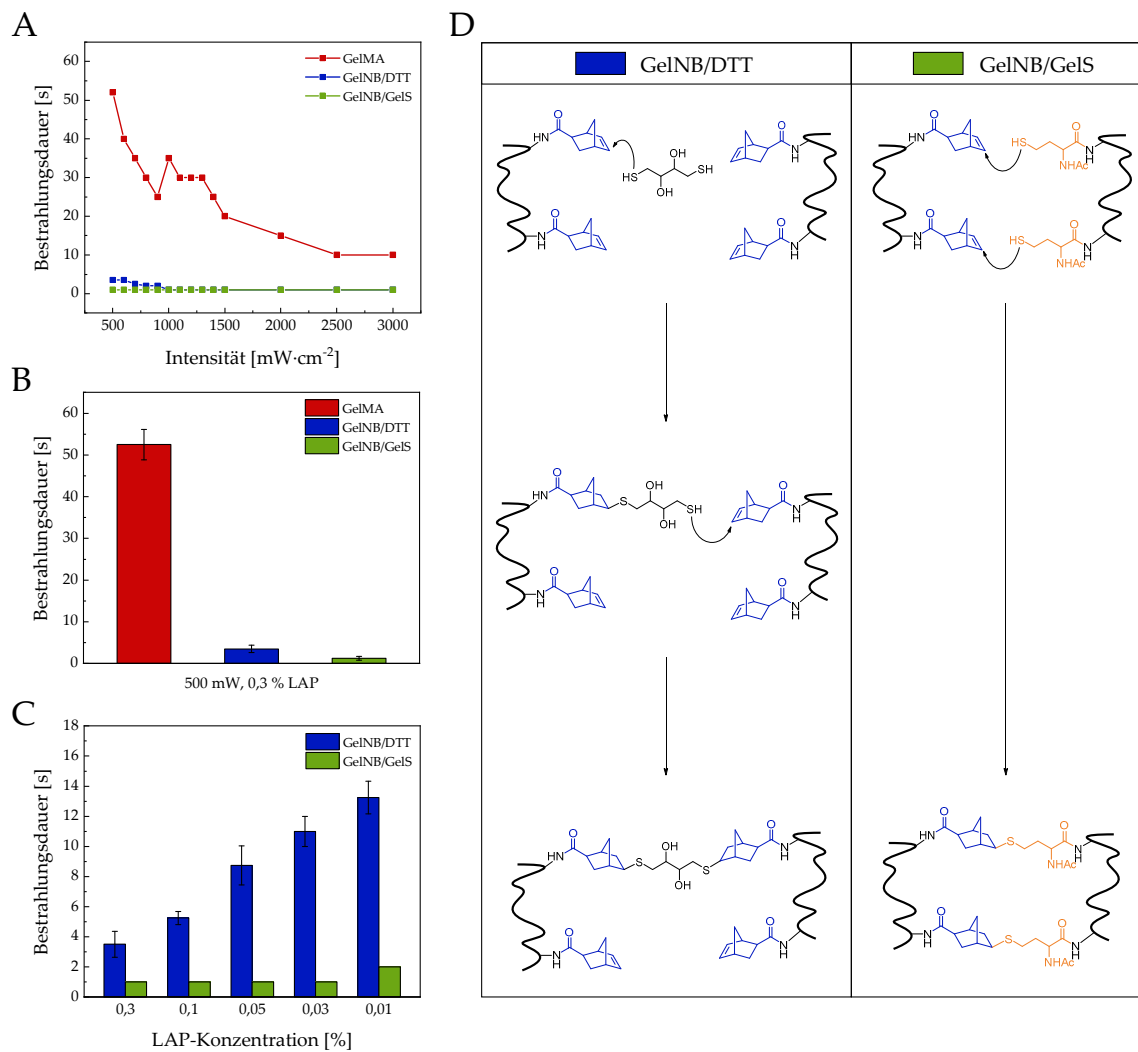


Abbildung 28: (A) Vergleich der benötigten Aushärtungszeiten für die drei Hydrogelsysteme GelMA, GelNB/DTT und GelNB/GelS bei einer LAP-Konzentration von 0,3 % (w/v) und (A) unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten sowie (B) einer Bestrahlungsintensität von 500 mW. (C) Vergleich der Aushärtungszeiten für die Thiol-En-Hydrogelsysteme GelNB/DTT und GelNB/GelS bei Reduktion der LAP-Konzentration von 0,3 % auf 0,01 % (w/v). (D) Mechanismus der Vernetzungsreaktion der Thiol-En-Hydrogelsysteme (in Kollaboration mit Sonja Haase).

Ein weiterer Vorteil des GelNB/GelS-Hydrogels bestand darin, dass selbst im Anschluss an die Photopolymerisation zum Hydrogel weiterhin die Möglichkeit gegeben war, postsynthetische Funktionalisierungen vorzunehmen. Während bei GelMA der Reaktionsumsatz der Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen nahezu vollständig bzw. kaum steuerbar war, erlaubte dagegen die Verwendung unterschiedlich modifizierter Gelatinederivate eine hohe Kontrolle. Durch Veränderung des Thiol-zu-Norbornen-Verhältnisses konnten nach erfolgter Photopolymerisation überschüssige Funktionalitäten zur Inkorporation weiterer Moleküle genutzt werden. Grundlage für ein *Proof-of-Concept-Experiment* bildeten Formulierungen von GelNB/GelS (*Medium*) mit steigendem Thiol-Anteil von 1:1 bis 1:10 (NB:S). Überschüssige Thiol-Gruppen, die nicht zur Vernetzung der Hydrogele beitrugen, wurden durch Reaktion mit dem Ellman's Reagenz nachgewiesen (*Abbildung 29*). Für die äquimolare Mischung von GelNB und GelS (NB:S = 1:1) wurde dabei ein Reaktionsumsatz von 99 % ermittelt, was die hohe Effizienz der Thiol-En-Reaktion widerspiegelte. Mit steigendem Thiol-Anteil wurde ein kontinuierlicher Anstieg freier Thiol-Gruppen beobachtet, der für eine Post-Funktionalisierung zur Verfügung stand.

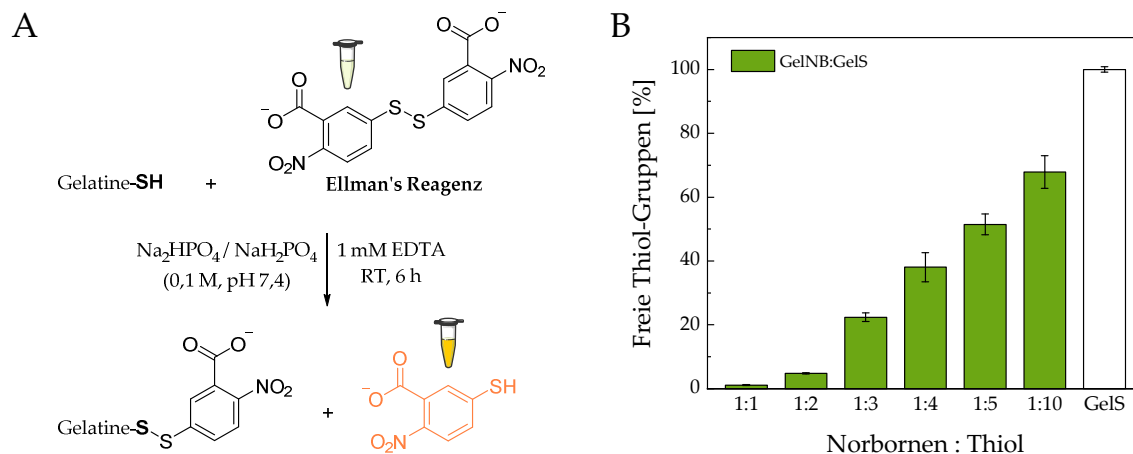


Abbildung 29: (A) Kolorimetrischer Nachweis von Thiol-Gruppen mittels Ellman's Reagenz. (B) Chemisch modifizierbare Thiol-Gruppen in GelNB/GelS-Hydrogelen mit steigendem GelS-Anteil.

3.1.2.2.3 Biokompatibilität

Das GelNB/GelS-Hydrogelsystem wurde im Folgenden biologisch charakterisiert und seine Eignung als EZM-ähnliche Stützstruktur in der 3D-Zellkultur sowie als Biotinte im *3D-Bioprinting* evaluiert. Dazu wurde in Kollaboration mit Sonja Haase¹⁵² und Xenia Kempter¹⁵³ (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) eine vergleichende Analyse mit den in der Literatur etablierten Hydrogelen GelMA und GelNB/DTT durchgeführt. Im Rahmen einer Biokompatibilitätsstudie wurden humane Fibroblasten (NHDF) im jeweiligen 5%igen (w/v) Hydrogel eingeschlossen und über einen Zeitraum von einer Woche kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Lebend-/Tot-Färbung mittels Calcein-AM und Propidiumiodid visualisiert (*Abbildung 30*). Aufgrund des natürlichen Vorkommens von RGD- und MMP-Sequenzen in der Gelatine war für alle drei Hydrogelsysteme eine homogene Verteilung und charakteristische Ausrichtung der NHDF innerhalb des Polymernetzwerks zu beobachten. Nach siebentägiger Kultivierungsdauer waren in GelMA- (*Medium*), GelNB/DTT- (*Medium*) und GelNB/GelS- (*Medium*) Hydrogelen deutliche Ansätze eines sich ausbildenden Zellnetzwerks sichtbar. Darüber hinaus ließ sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Viabilität der eingebetteten Fibroblasten feststellen. In allen drei Hydrogelen wurde nur ein sehr geringer Anteil toter Zellen nachgewiesen.

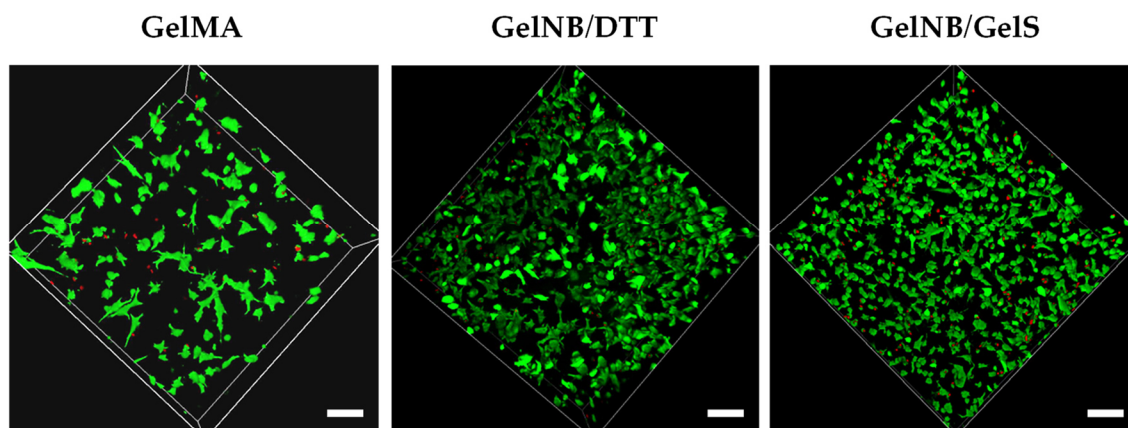


Abbildung 30: Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584 \text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700 \text{ nm}$) von NHDF, die in GelMA- (*Medium*), GelNB/DTT- (*Medium*) und GelNB/GelS- (*Medium*) Hydrogelen eingebettet und über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert wurden. Konfokalmikroskopische Aufnahmen (Leica TCS SPE DMI4000B) von z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße: $5 \mu\text{m}$) und anschließende Konvertierung in 3D-Bilder (Leica LAS X Software). Maßstab: $100 \mu\text{m}$ (in Kollaboration mit Sonja Haase und Xenia Kempter).

Trotz der hervorragenden biologischen Performance aller drei Hydrogelsysteme sollte berücksichtigt werden, dass bei den durchgeführten Experimenten die Photopolymerisation zum Hydrogel unmittelbar erfolgte, nachdem die Zellen in der flüssigen Vorläuferlösung suspendiert wurden. Dadurch wurden alle zellschädigenden Einflüsse vernachlässigt, die von Bestandteilen der unvernetzten Biotinte verursacht wurden, wie beispielsweise die Toxizität der Photomonomere oder Nebenreaktionen der funktionellen Gruppen mit Zellkomponenten. Daher wurden neben dem Vergleich der drei photopolymerisierten Hydrogelsysteme zusätzlich die jeweiligen Einzelkomponenten (Hydrogelpolymere, Crosslinker, Photoinitiator, Abbauprodukte) in einer Toxizitätsstudie untersucht.

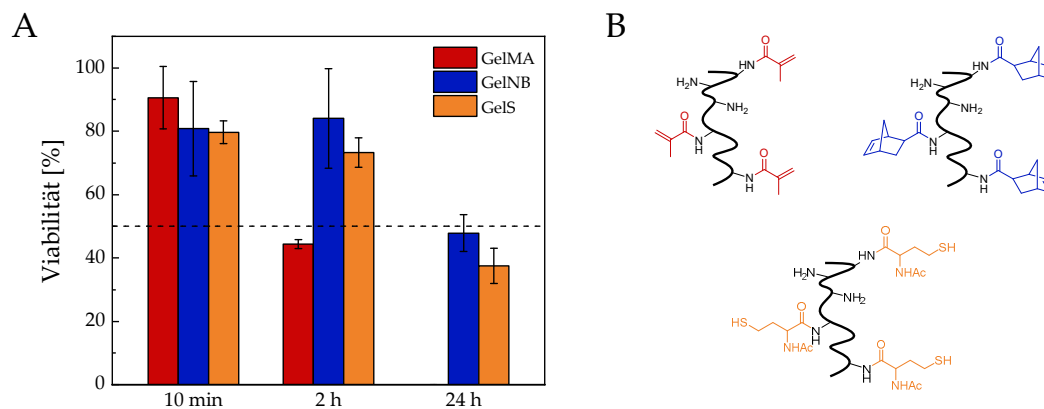


Abbildung 31: (A) Bestimmung der Zytotoxizität der unvernetzten Photomonomere GelMA, GelNB und GelS in 5%iger (w/v) Polymerkonzentration durch einen MTT-Proliferationsassay mit HepG2-Zellen für verschiedene Expositionszeiten (10 min, 2 h, 24 h). (B) Chemische Strukturformeln der Hydrogelvorläufer mit gleichem Funktionalisierungsgrad.

In einem ersten Schritt wurde die Bioverträglichkeit der unvernetzten Photomonomere GelNB, GelS und GelMA in einem MTT-Proliferationsassay mit HepG2-Zellen bestimmt (Abbildung 31). Grundlage hierfür bildeten Hydrogelvorläufer, die aus demselben Gelatine-Edukt synthetisiert wurden, die gleiche Polymerkonzentration (5 % (w/v)) sowie einen ähnlichen Funktionalisierungsgrad (DoF: ca. 50 %) aufwiesen, um die Toxizität der photoreaktiven Gruppen (Norbornen, Thiol, Methacrylat/Methacrylamid) miteinander zu vergleichen. Bei Exposition gegenüber den GelNB- und GelS-Vorläufern besaßen die HepG2-Zellen selbst über mehrere Stunden ein hohes Proliferationsvermögen von ca. 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, während für GelMA bereits nach zwei Stunden eine deutliche Abnahme der Viabilität auf unter 50 % nachgewiesen wurde. Eine 24-stündige Exposition von GelMA führte aufgrund der starken Toxizität der Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen einschließlich ihren Nebenreaktionen mit Zellkomponenten zum vollständigen Absterben der Krebszellen. Eine hohe Zellviabilität in der unvernetzten Hydrogelvorläuferlösung über mehrere Minuten bis Stunden ist jedoch für die Anwendung im *3D-Bioprinting* essenziell, weswegen die beiden Thiol-En-basierten Hydrogelsysteme für den Einsatz als Biotinten deutlich besser geeignet waren.

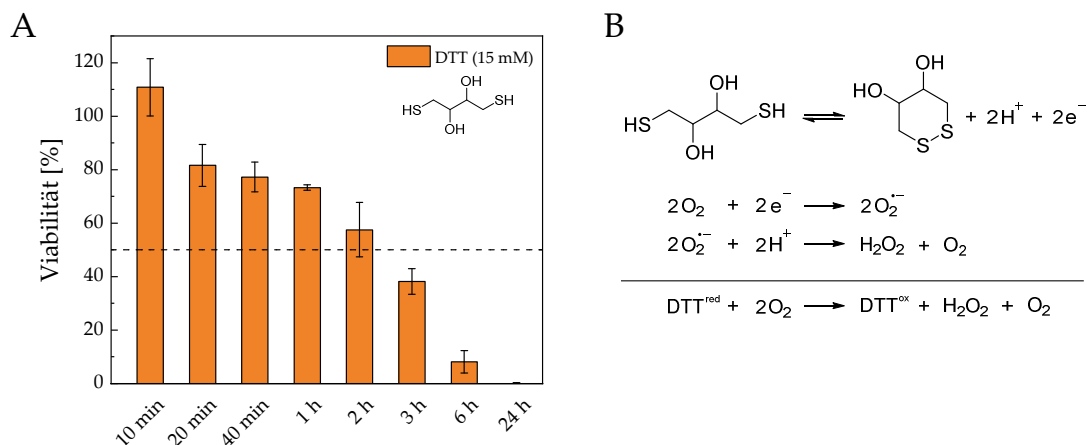


Abbildung 32: (A) Bestimmung der Zytotoxizität des Thiol-Crosslinkers DTT in einer Konzentration von 15 mM durch einen MTT-Proliferationsassay mit HepG2-Zellen für verschiedene Expositionszeiten (10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h). (B) Instabilität von DTT in Lösung und bei ausbleibender Lagerung unter Schutzgasatmosphäre, da es leicht durch Luftsauerstoff oxidiert wird. Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid) führen zu oxidativem Stress für Zellen.

Im nächsten Schritt lag der Fokus auf dem Vergleich der Biokompatibilität der beiden Thiol-Komponenten im jeweiligen GelNB-basierten Hydrogelsystem. Für den Thiol-Crosslinker DTT, der in der Literatur typischerweise in einer Konzentration von 15 mM zur Vernetzung von GelNB-funktionalisierten Gelatineketten eingesetzt wird¹⁸¹, wurde eine hohe Zytotoxizität nachgewiesen (*Abbildung 32*). Die Toxizität von DTT war dabei stark abhängig von der Expositionsdauer. Bereits nach wenigen Stunden sank die Viabilität auf unter 50 %. Eine 24-stündige Exposition führte dagegen zum vollständigen Zelltod der HepG2-Zellen. Darüber hinaus gilt DTT in Lösung als instabil, da es leicht durch Luftsauerstoff oxidiert wird.²⁰² Die im Zuge der Oxidationsreaktion gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies, freien Radikale und H₂O₂ bewirkten daher oxidativen Stress für Zellen.^{203,204} Trotz der erfolgreichen Verwendung von DTT als Crosslinker für GelNB in der 3D-Zellkultur ist die Eignung des GelNB/DTT-Hydrogels für das *3D-Bioprinting* stark begrenzt, da die Präparation der Biotinte und die Photopolymerisation nicht unmittelbar aufeinander folgen. Die in der flüssigen Biotinte suspendierten Zellen sind daher dem zellschädigenden Einfluss von DTT über die gesamte Zeit des Druckprozesses ausgesetzt. Im Gegensatz dazu war Gels für mindestens zwei Wochen stabil in Lösung und zeigte auch bei längerer Exposition eine geringere Toxizität als DTT (*Abbildung 31*).

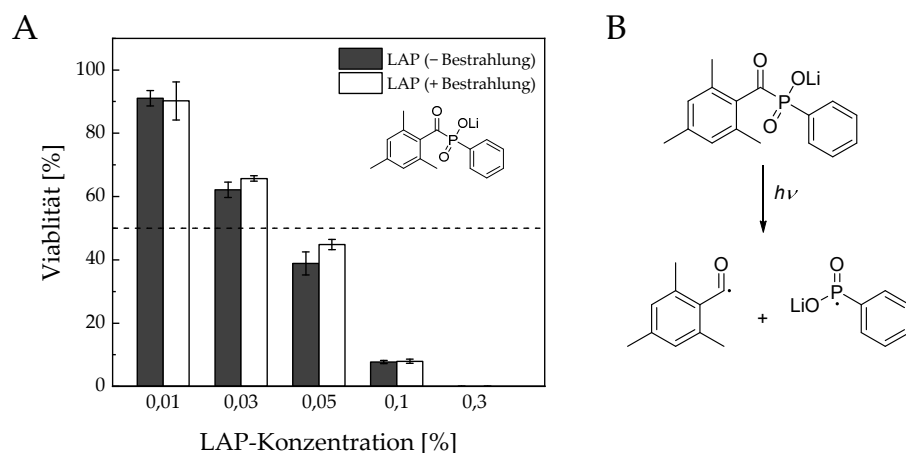


Abbildung 33: (A) Bestimmung der Zytotoxizität des Photoinitiators LAP durch einen MTT-Proliferationsassay mit HUVEC für verschiedene Konzentrationen (0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 % (w/v)). (B) Photolyse des Photoinitiators unter Bildung der initiierenden Radikale für die Photopolymerisation.

Als nächstes wurde eine toxikologische Bewertung des Photoinitiators LAP vorgenommen. Dabei wurde die dosisabhängige Toxizität von LAP an primären humanen Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) untersucht (Abbildung 33). Wie oben bereits gezeigt, liegt ein wesentlicher Vorteil des GelNB/GelS-Hydrogelsystems in der Reduktion der benötigten LAP-Konzentration von 0,3 % auf 0,03 % (w/v). Auch wenn der Photoinitiator mengenmäßig nur den geringsten Anteil der Biotinte ausmachte, verblieben nach erfolgter Photopolymerisation dessen Überreste im Hydrogel, die nur langsam durch Diffusion entfernt wurden. Es wurde ein LD₅₀ von 0,04 % (w/v) bei 24-stündiger Exposition ermittelt. Große Unterschiede in der Viabilität zeigten sich insbesondere bei der jeweils benötigten Photoinitiator-Konzentration für das GelMA-Hydrogel (0,3 % (w/v), 0 % Viabilität) und GelNB/GelS-Hydrogelsystem (0,03 % (w/v), 62 % Viabilität). Eine zusätzliche Bestrahlung von Photoinitiator und Zellen für 30 Sekunden mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) führte dagegen zu keiner weiteren Reduktion des Proliferationsvermögens der HUVEC.

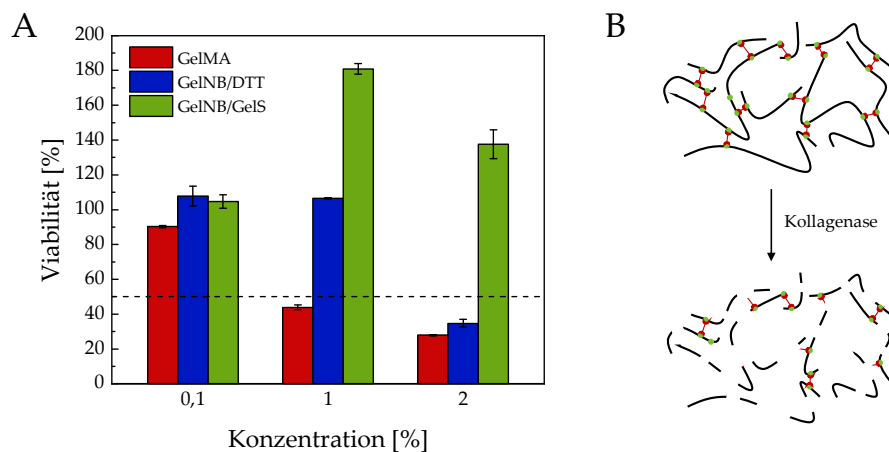


Abbildung 34: (A) Bestimmung der Zytotoxizität der Hydrogelabbauprodukte von GelMA, GelNB/DTT und GelNB/GelS durch einen MTT-Proliferationsassay mit HepG2-Zellen für verschiedene Konzentrationen (0,1 %, 1 %, 2 % (w/v)). (B) Schematische Darstellung des Hydrogelverbaus durch Kollagenase (10 U·mL⁻¹, Typ 1, aus *Clostridium histolyticum*).

Im letzten Schritt wurden die enzymatischen Abbauprodukte von GelMA-, GelNB/DTT- und GelNB/GelS-Hydrogelen untersucht. Hierzu wurden die photopolymerisierten Hydrogele durch Kollagenase-Verdau fragmentiert und die flüssigen Degradationsprodukte auf ihre Toxizität an HepG2-Zellen überprüft (Abbildung 34). Obwohl alle drei Hydrogelsysteme Gelatine-basiert waren, wurde ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der resultierenden Zellviabilitäten gemessen. Während die Abbauprodukte der GelMA- und GelNB/DTT-Hydrogele bei steigender Konzentration zu einer Abnahme des Proliferationsvermögens führten, wirkten die GelNB/GelS-Degradationsprodukte dagegen wachstumsfördernd. Mögliche Gründe für die erhöhte Toxizität der Abbaulösungen von GelMA und GelNB/DTT könnten an einem nicht vollständigen Reaktionsumsatz der photoreaktiven Gruppen, an einem Überschuss des Crosslinkers DTT im Thiol-En-Hydrogel sowie insbesondere an Rückständen des Photoinitiators liegen. Im Vergleich zu GelNB/GelS wurde für die Vernetzung der beiden Hydrogele die zehnfache Menge an LAP (0,3 % (w/v)) benötigt.

Zusammenfassend zeigte die toxikologische Analyse der Einzelkomponenten der jeweiligen Biotinten einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der Biokompatibilität der drei vorgestellten Hydrogelsysteme. Für den Einsatz im *3D-Bioprinting* muss sowohl für das photopolymerisierte Hydrogel als auch für die flüssige Biotinte eine hohe Zellviabilität gegeben sein. Während die erste Anforderung von allen drei Hydrogelsystemen gleichermaßen exzellent erfüllt wurde, wies lediglich die Vorläuferlösung von GelNB/GelS eine hohe Bioverträglichkeit auf. Dies war insbesondere auf eine geringere Toxizität der zugrundeliegenden photoreaktiven Gruppen der Hydrogelvorläufer sowie eine 90%ige Reduktion der Photoinitiator-Menge zurückzuführen. Beide Faktoren spielten eine entscheidende Rolle für die verbesserte Überlebensfähigkeit der Zellen in der flüssigen Biotinte.

3.1.2.2.4 *3D-Bioprinting*

Im Anschluss an die toxikologische Evaluierung der Biotinten wurde das Potenzial des GelNB/GelS-Hydrogels im 3D-Extrusionsdruck erprobt und die Druckergebnisse mit dem Goldstandard GelMA verglichen. Die *3D-Bioprinting*-Experimente wurden dabei von Sonja Haase¹⁵² (Institut für Funktionelle Grenzflächen, KIT, AG Prof. Dr. Ute Schepers) durchgeführt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Tytgat *et al.*, bei der aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen (ASC) auf den photopolymerisierten Hydrogeloberflächen von 3D-gedruckten Stützstrukturen ausgesät wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Zellviabilität zwischen GelMA und GelNB/GelS.¹⁹⁰ Da die Zellen jedoch nicht mit der flüssigen Biotinte vermischt und gemeinsam verdruckt wurden, handelte es sich bei dieser Vorgehensweise nicht um eine *3D-Bioprinting*-Methode. Die Einsatzmöglichkeit als Biotinte in Biofabrikationsprozessen wurde daher im Folgenden evaluiert. Hierzu wurden NHDF in den Hydrogelvorläuferlösungen von GelNB/GelS (*Low, Medium, High*) und GelMA (*Low, Medium, High*) suspendiert und die Biotinte in die Kartusche des *3D-Bioprinters* überführt. Anschließend wurde die Biotinte für etwa eine halbe Stunde auf eine Temperatur von 22 °C gekühlt, um einen temperaturinduzierten Viskositätsanstieg der Hydrogellösung durch physikalische Gelierung der Gelatine zu erzielen. Dieses Vorgehen stellte optimale Ergebnisse und Auflösungen für den Extrusionsdruck der Gelatine-basierten Hydrogele sicher.

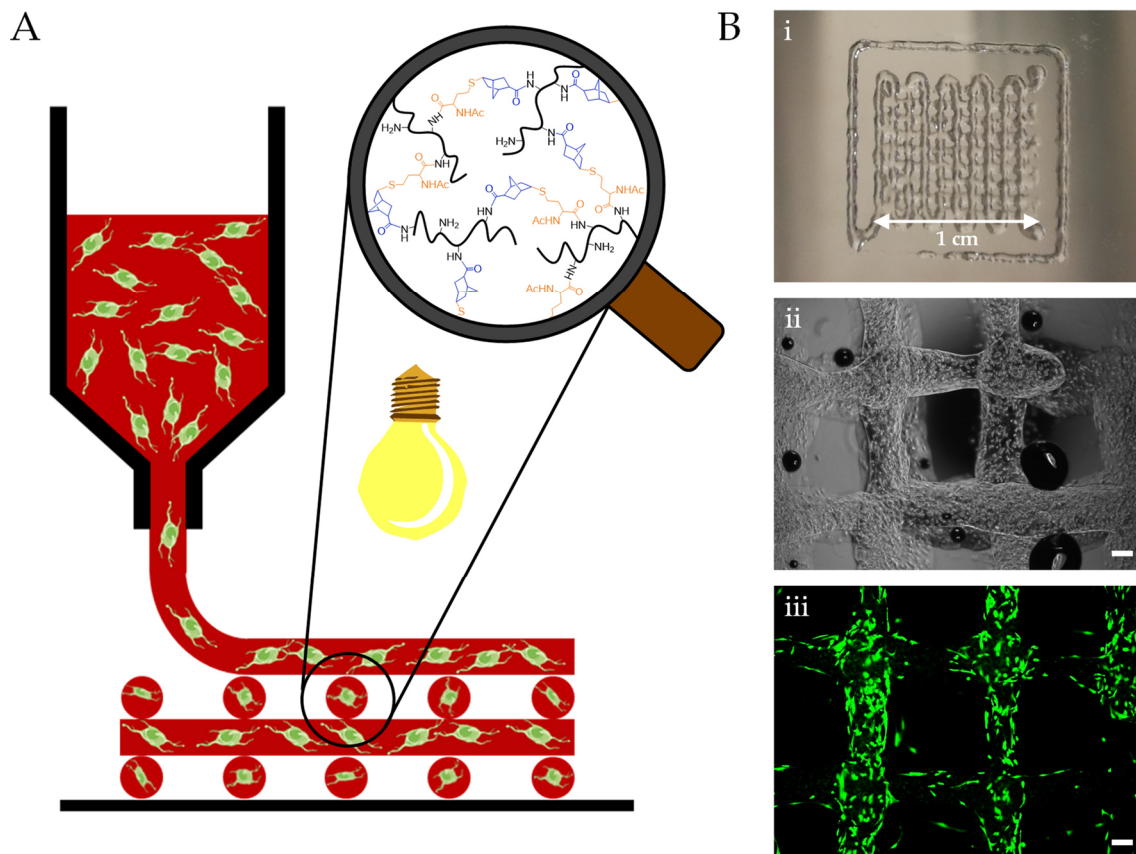


Abbildung 35: (A) Schematische Übersicht über den extrusionsbasierten 3D-Bioprinting-Prozess der GelNB/GelS-Biotinte. (B) (i) Gedruckte Hydrogelstruktur in Form eines Gitters (1 cm × 1 cm, vier Schichten) und (ii-iii) mikroskopische Visualisierung der im Hydrogel eingeschlossenen NHDF. Maßstab 200 µm (in Kollaboration mit Sonja Haase).

Als 3D-Modellstruktur wurde ein aus vier Schichten bestehendes Hydrogelgitter gewählt, um eine gleichmäßige Versorgung der Zellen mit Nährstoffen sicherzustellen (Abbildung 35). Ab dem Zeitpunkt der Herstellung der Biotinte bis zum Abschluss des Druckprozesses waren die Zellen einer Reihe an schädlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche durch die in der Hydrogellösung enthaltenen Komponenten, durch den Druckprozess selbst und durch die photochemische Vernetzung verursacht wurden. Im Anschluss an den Druckprozess wurde daher die Überlebensfähigkeit der Zellen in der GelNB/GelS- und GelMA-Biotinte durch eine Viabilitätsanalyse quantifiziert. Während die Zellviabilität in der GelMA-Biotinte mit steigendem Vernetzungsgrad von *Low* > *Medium* > *High* deutlich abnahm, wurde für die GelNB/GelS-Biotinte dagegen eine konstante Viabilität von über 80 % unabhängig vom Funktionalisierungsgrad der Hydrogelvorläufer ermittelt (Abbildung 36 A,B). Die niedrigere Überlebensrate in der GelMA-Biotinte war dabei auf die Toxizität und

Nebenreaktionen der Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen zurückzuführen, die mit steigendem Funktionalisierungsgrad der Gelatine zunahmen. Darüber hinaus erforderte der Kettenpolymerisationsmechanismus von GelMA eine höhere Dosis an Photoinitiator, Radikalen und UV-Strahlung im Vergleich zum Thiol-En-System, wodurch die Viabilität zusätzlich herabgesetzt wurde. Für die verdruckten Fibroblasten im GelNB/GelS-Hydrogel wurde eine hohe Viabilität über einen 14-tägigen Kultivierungszeitraum nachgewiesen. Nach sieben Tagen war eine typische spindelförmige Ausrichtung der NHDF sowie eine zunehmende Zellvernetzung vor allem an den Rändern des Hydrogels sichtbar (*Abbildung 36 C*). Die Tiefencodierung der mikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass die Ausrichtung der NHDF insbesondere entlang der longitudinalen Achse des extrudierten Hydrogelstrangs erfolgte. Das von den Fibroblasten gebildete Netzwerk stabilisierte das Hydrogel, sodass die Strukturintegrität der gedruckten Gitterstruktur über 14 Tage aufrechterhalten wurde. Innerhalb des Hydrogels war aufgrund der Anwesenheit von Zelladhäsionsdomänen eine homogene Verteilung der Zellen beobachtbar, sodass nur wenige Zellen auf dem Boden des Glassubstrats wuchsen. Insgesamt demonstrierte das GelNB/GelS-Hydrogel damit seine hervorragende Eignung als Biotinte im *3D-Bioprinting*. Im Vergleich zum Goldstandard GelMA sorgte die Zusammensetzung der GelNB/GelS-Hydrogelvorläuferlösung für eine wesentliche Verbesserung der Überlebensfähigkeit der Zellen während des 3D-Druckprozesses.

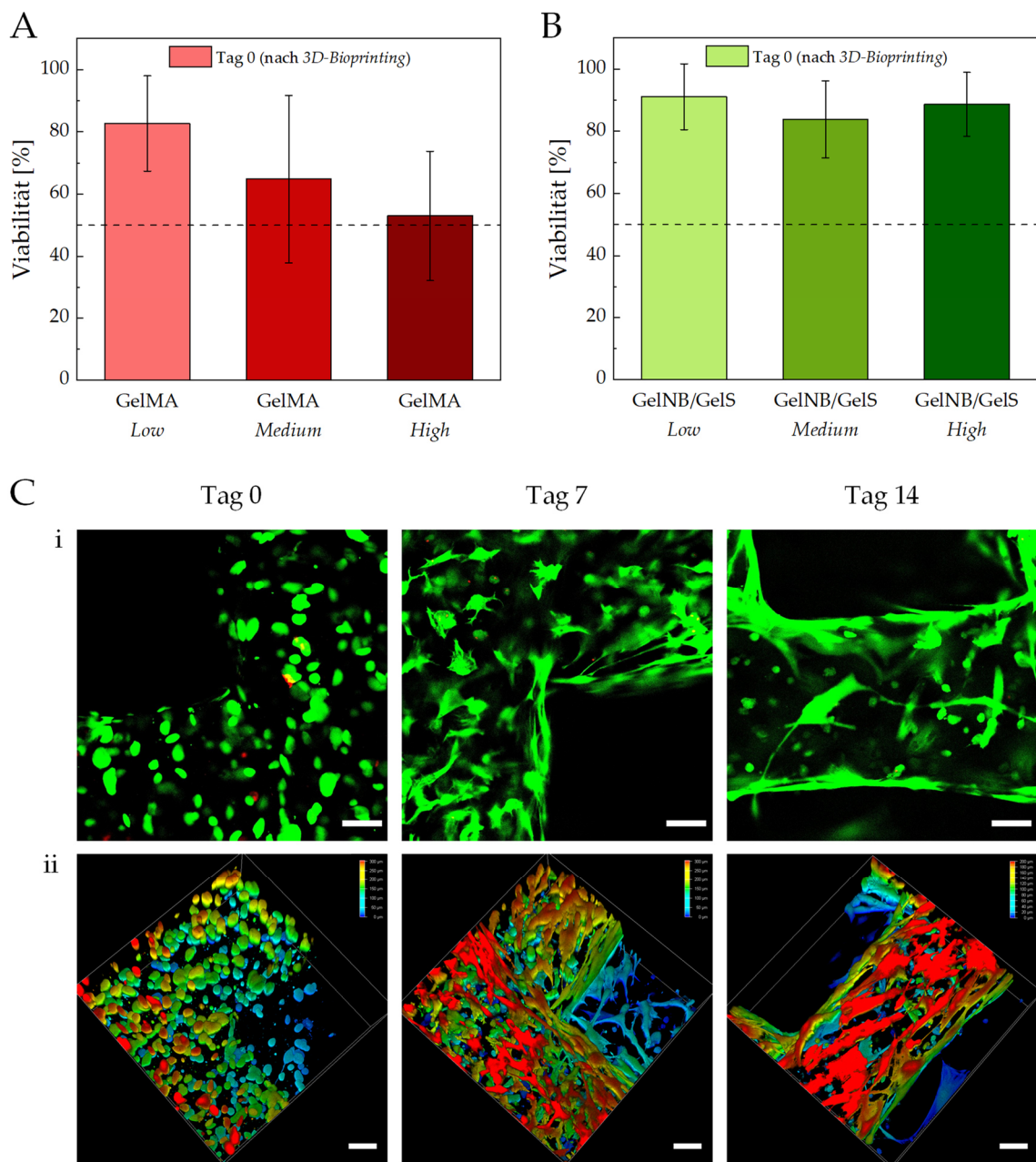


Abbildung 36: Zellviabilitätsanalyse (Python-Software) der NHDF unmittelbar nach dem 3D-Bioprinting (Tag 0) für die (A) GelMA-Biotinte (*Low*, *Medium*, *High*) und die (B) GelNB/GelS-Biotinte (*Low*, *Medium*, *High*). (C) (i) Lebend-/Tot-Färbung der verdrukten NHDF mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584 \text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700 \text{ nm}$) an den Tagen 0, 7 und 14 und anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B). (ii) Tiefencodierung (300 μm) und Visualisierung der Verteilung der NHDF im Hydrogel entlang der z-Achse. Maßstab: 100 μm (in Kollaboration mit Sonja Haase).

3.1.2.2.5 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel das Photoclick-Hydrogel GelNB/GelS entwickelt, welches die hohe Reaktionsgeschwindigkeit der Thiol-En-Reaktion ausnutzte. Während GelMA für lange Zeit als Goldstandard im *Tissue Engineering* galt, haben in den letzten Jahren Thiol-En-Hydrogele auf Basis von Norbornen- und Thiol-funktionalisierten Biopolymeren eine zunehmende Bedeutung erlangt. Die Synthese der Hydrogelvorläufer GelNB und GelS erfolgte ausgehend von Gelatine Typ A durch Modifikation der freien Aminogruppen mit 5-Norbornen-2-carbonsäure bzw. *N*-Acetyl-DL-homocysteinethiolacton. Dabei wurde eine neue, wasserbasierte Syntheseroute von GelNB etabliert, die auf eine Verwendung des Lösungsmittels DMSO verzichtete und Zugang zu einer großen Bandbreite an unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden (20 % bis 97 %) gewährleistete. Durch Mischung mit thiolierter Gelatine entstand das schnell vernetzbare Photoclick-Hydrogel GelNB/GelS, dessen Photopolymerisation nach einem Stufenpolymerisationsmechanismus erfolgte. In Analogie zu GelMA wurden drei Varianten des GelNB/GelS-Hydrogels mit steigender Vernetzungsdichte (*Low, Medium, High*) etabliert. In einer vergleichenden Biokompatibilitätsstudie wurden die photopolymerisierten Hydrogele und Vorläuferlösungen von GelMA, GelNB/DTT und GelNB/GelS toxikologisch untersucht, um ihre Eignung als Biotinte im *3D-Bioprinting* zu evaluieren. Die wesentlichen Vorteile des GelNB/GelS-Hydrogel-systems lagen dabei in der Verringerung der benötigten Photoinitiator-Konzentration, schnelleren Photopolymerisation, höheren Netzwerkhomogenität, Verringerung der Toxizität der photoreaktiven Gruppen, Reduktion von möglichen Nebenreaktionen mit Zellkomponenten und dadurch einer erheblich höheren Biokompatibilität der Vorläuferlösung. Insbesondere der zuletzt genannte Aspekt ist ein wichtiges, jedoch häufig vernachlässigtes Kriterium bei der biologischen Evaluierung von Biotinten, da die in der Vorläuferlösung suspendierten Zellen den unvernetzten Photomonomeren und weiteren Reagenzien für einen beträchtlichen Zeitraum während des *3D-Bioprinting* ausgesetzt sind. Im Vergleich zur GelMA-Biotinte, bei der die Viabilität mit steigendem Anteil der photoreaktiven Gruppen deutlich abnahm, blieb die Überlebensrate für die in der GelNB/GelS-Biotinte eingeschlossenen Zellen trotz steigendem Funktionalisierungsgrad konstant hoch. Das Thiol-En-Photoclick-Hydrogel GelNB/GelS demonstrierte damit seine hervorragende Eignung als Biotinte im *3D-Bioprinting* und stellt darüber hinaus ein vielversprechendes Biomaterial für weitere Biofabrikationsprozesse und zukünftige Anwendungen im *Tissue Engineering* dar.

3.1.3 *Interpenetrating-Polymer-Network-Hydrogele*

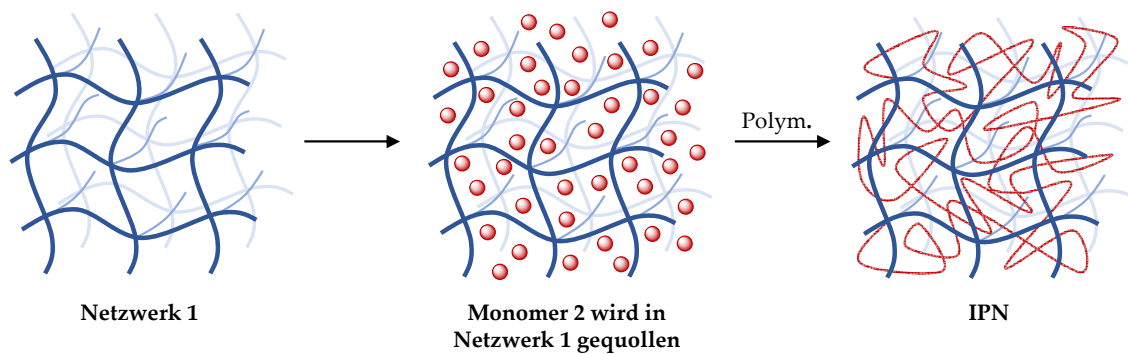
Im vorherigen Kapitel wurden verschiedene *Single-Network* (SN)-Hydrogele auf Gelatinebasis vorgestellt, deren zugrundeliegendes Polymernetzwerk aus einem einzigen Monomertyp gebildet wurde. Als Monomere fungierten dabei unterschiedlich chemisch modifizierte Gelatinebausteine, die in einer Polymerisationsreaktion über kovalente Bindungen zu einem Hydrogel vernetzt wurden. Allgemein wird bei SN-Hydrogelen zwischen chemischer und physikalischer Vernetzung unterschieden.²⁰⁵

Chemisch vernetzte Hydrogele können durch eine Vielzahl an Reaktionen erhalten werden. Hierzu zählen insbesondere Kondensationen von Carbonylverbindungen (Imin, Hydrazon, Oxim)²⁰⁶⁻²⁰⁹, photoinduzierte freie radikalische Polymerisationen^{40,140,210,211} Click-Reaktionen (z. B. Diels-Alder²¹²⁻²¹⁴, Azid-Alkin-Cycloaddition²¹⁵⁻²¹⁷, Thiol-Michael-Addition²¹⁸⁻²²¹) oder Enzym-katalysierte Reaktionen²²²⁻²²⁶. Vorteile chemisch vernetzbarer Hydrogele liegen in den hervorragenden mechanischen Eigenschaften sowie einer exzellenten Strukturintegrität.^{205,227} Aufgrund der kovalenten Verknüpfung weisen die Hydrogele jedoch limitierte selbstheilende Eigenschaften auf und zeigen lediglich eine geringe Adaptivität gegenüber externen Umwelteinflüssen.²²⁸ Ferner sind chemisch vernetzbare Hydrogele nur begrenzt einsetzbar für medizinische Injektionen, da ihre Vorläuferlösungen in der Regel eine sehr niedrige Viskosität besitzen, wodurch der Wirkstoff rasch von der Injektionsstelle wegdiffundiert, bevor das Hydrogel gebildet wird.²²⁹⁻²³¹

Physikalisch vernetzte Hydrogele werden dagegen durch elektrostatische²³²⁻²³⁴ bzw. hydrophobe²³⁵⁻²³⁹ Interaktionen, π - π -Stapelwechselwirkung^{240,241}, Wasserstoffbrückenbindungen²⁴²⁻²⁴⁵, *Guest-Host*-Wechselwirkungen²⁴⁶⁻²⁵⁰ oder Metallkoordination²⁵¹⁻²⁵³ gebildet. In der Regel weisen sie im Vergleich zu chemisch vernetzbaren Hydrogelen komplementäre Eigenschaften auf. Die nicht-kovalenten Verknüpfungen bedingen schwächere Wechselwirkungen, aus denen meist schlechte mechanische Eigenschaften resultieren.²⁵⁴ Ein wesentlicher Vorteil physikalisch vernetzbarer Hydrogele liegt in der reversiblen Vernetzung, die eine wichtige Voraussetzung für selbstheilende Eigenschaften von Hydrogelen darstellt.^{255,256} Auch finden sie vermehrt Anwendung bei medizinischen Injektionen, da ihre Vernetzung instant an der Injektionsstelle erfolgt.²⁵⁷⁻²⁵⁹

Die Anforderungen, die im *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin an ein Biomaterial gestellt werden, sind in den letzten Jahren stetig gestiegen und befeuert die Entwicklung immer ausgereifterer Hydrogelsysteme.²⁶⁰⁻²⁶² Dabei haben vor allem Mehrkomponenten- bzw. *Double-Network* (DN)-Hydrogele eine zunehmende Bedeutung erlangt, da sie die Vorteile verschiedener Materialien in einem Hydrogel vereinen.²⁶³⁻²⁶⁶

A) Sequentielle IPN-Synthese



B) Simultane IPN-Synthese

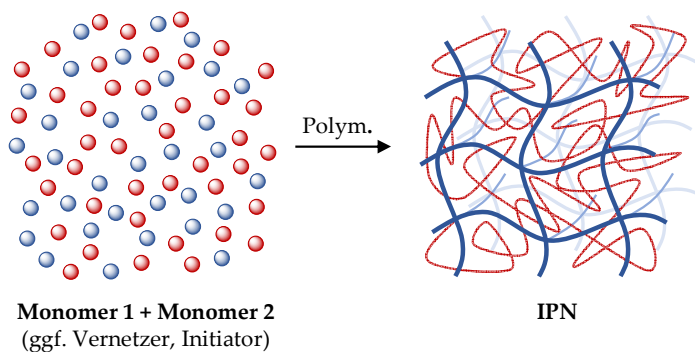


Abbildung 37: Schematische Darstellung der beiden Verfahren zur Herstellung von IPNs. (A) Bei der sequentiellen Synthese erfolgt die Herstellung der Polymernetzwerke nacheinander. Nach Bildung des ersten Polymernetzwerks werden die Vorläufer des zweiten Polymernetzwerks darin gequollen und anschließend polymerisiert. (B) Bei der simultanen Synthese werden die Vorläufer beider Polymernetzwerke gemischt und gleichzeitig polymerisiert.

Besteht das Polymernetzwerk aus zwei oder mehr Einzelnetzwerken, die miteinander verflochten, jedoch nicht kovalent miteinander verknüpft sind, handelt es sich um ein *Interpenetrating Polymer Network* (IPN).^{267,268} Die Bildung von IPNs kann dabei auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen.²⁶⁹ Bei der sequentiellen Synthese werden die Polymernetzwerke nacheinander gebildet. Zunächst wird das Polymernetzwerk 1 synthetisiert. Anschließend wird die Vorläuferlösung von Polymernetzwerk 2 (bestehend aus Monomer, Vernetzer und Initiator) im Polymernetzwerk 1 gequollen. Das dadurch gebildete semi-IPN wird nach erfolgter Vernetzung in ein IPN umgewandelt. Bei der simultanen Synthese werden dagegen die Vorläufer beider Polymernetzwerke gemischt und gleichzeitig polymerisiert, wobei sich die jeweiligen Reaktionen einander nicht behindern dürfen. Auch wenn die Einzelnetzwerke eines IPN nicht kovalent miteinander verknüpft sind, können sie nach erfolgter Synthese nicht mehr voneinander getrennt werden, ohne dass dabei chemische Bindungen gebrochen werden.²⁷⁰ Aus der Verflechtung der Polymernetzwerke resultieren vorteilhafte Eigenschaften wie beispielsweise kontrollierte Quelleigenschaften, eine hohe mechanische Belastbarkeit sowie Zugfestigkeit, Reaktivität gegenüber externen Stimuli oder eine verbesserte biologische Performance.²⁷¹⁻²⁷⁴

3.1.3.1 Polyelektrolyt-Komplex-Hydrogele

Grundlage für die Bildung von IPNs bilden in der Regel neutrale und geladene Polymergerüste. Beispiele für neutrale Polymere sind Polyethylenglykol (PEG), Polyacrylamid (PAM) oder Polyvinylalkohol (PVA).^{275,276} Als geladene Polymere fungieren meist Polyelektrolyte, bei denen zwischen synthetischer und biologischer Herkunft unterschieden wird (*Abbildung 38*).^{271,277} Polyelektrolyte sind wasserlösliche Polymere, die eine große Anzahl anionischer oder kationischer dissozierbarer Gruppen tragen. Sie entstehen in Lösung durch Abgabe (Polyanionen) bzw. Aufnahme (Polykationen) von Protonen.²⁷⁸ Starke Polyelektrolyte (z. B. Sulfonat-basiert) tragen in Lösung eine permanente Ladung, die unabhängig vom pH-Wert der Lösung ist. Bei schwachen Polyelektrolyten (z. B. Carboxylat-basiert) hängt der Dissoziationsgrad und damit ihre Ladung vom pH-Wert der Lösung ab.²⁷⁹ Neben synthetischen Polyelektrolyten wie beispielsweise Polystyrolsulfonsäure (PSS), Polyacrylsäure (PAA), Polyethylenimin (PEI), Polydiallyldimethylammoniumchlorid (polyDADMAC) umfasst die Klasse der Polyelektrolyte ebenso Biopolymere wie Alginat, Hyaluronsäure,

Gellangummi, Pektine, Nukleinsäuren, Proteine sowie semi-synthetische Biopolymere wie Carboxymethylcellulose.^{271,277,280} Viele der genannten Polyelektrolyte finden bereits Anwendung als elektrostatisch vernetzbare Hydrogele.²⁸¹⁻²⁸³

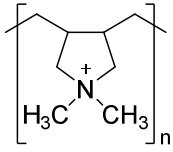
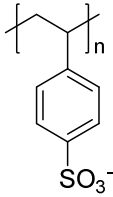
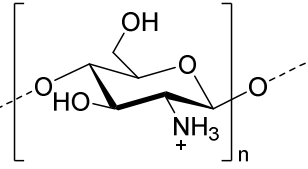
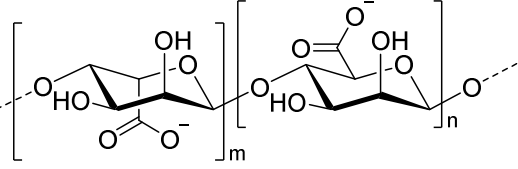
	kationisch	anionisch
synthetisch	 <p>polyDADMAC</p>	 <p>PSS</p>
biologisch	 <p>Chitosan</p>	 <p>Alginate</p>

Abbildung 38: Übersicht über ausgewählte Polyelektrolyt-Vertreter entsprechend ihrer Herkunft und ihrer Ladung.

Eine zunehmende Bedeutung haben Polyelektrolyt-Komplex (PEC)-Hydrogele auf Basis von synthetischen ABA-Triblockcopolymeren erlangt.²⁷⁹ Dieser Polymertyp besteht aus einem neutralen Mittelblock (B) wie z. B. PEG, der von positiv oder negativ geladenen Endblöcken (A) flankiert wird. Werden Triblockcopolyelektrolyte unterschiedlicher Ladung miteinander gemischt, führt dies zur spontanen Selbstassemblierung in Wasser durch Mikrophasenseparation der geladenen Endblöcke (*Abbildung 39*). Der Prozess der Assemblierung ist entropiegetrieben, da bei der PEC-Bildung die jeweiligen Gegenionen freigesetzt werden.^{284,285} Innerhalb einer PEC-Domäne interagieren positiv und negativ geladene A-Blöcke über elektrostatische Wechselwirkungen.²⁷⁹ Der neutrale Mittelblock fungiert als Crosslinker zwischen verschiedenen PEC-Domänen, aus deren Vernetzung ein definiertes 3D-Polymernetzwerk entsteht.²⁸⁶ Die Wahl der Triblockcopolyelektrolyte, insbesondere die Kettenlänge von A- und B-Blöcken, die Wahl der ionischen Gruppe sowie die Ladungsdichte erlauben eine präzise Kontrolle über die strukturellen und physikalischen Eigenschaften des Polymernetzwerks.^{279,285,287} Diese Faktoren beeinflussen die mikroskopische Netzwerkstruktur, indem sie die Größe der PEC-Domänen sowie den Abstand zueinander determinieren. Die mikroskopische Netzwerkstruktur

bedingt die makroskopischen Eigenschaften der Hydrogele wie z. B. deren Viskoelastizität, mechanische Eigenschaften sowie Adaptivität gegenüber externen Umwelteinflüssen.²⁸⁷

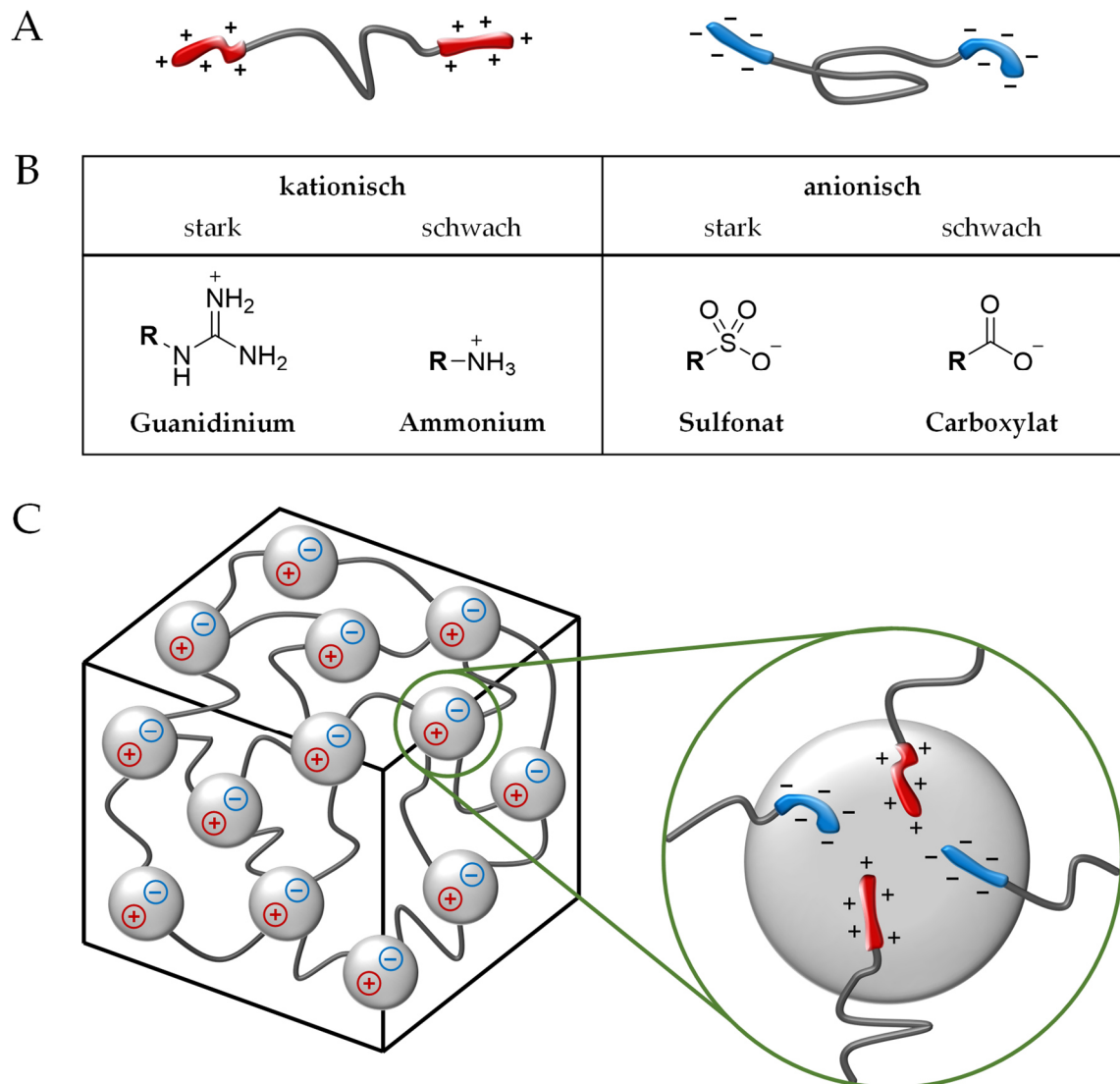


Abbildung 39: (A) Schematische Darstellung des funktionalisierten Triblockcopolyelektrolyts PAGE_m-PEG_n-PAGE_m bestehend aus einem neutralen Mittelblock und anionisch bzw. kationischen Endblöcken. (B) Übersicht über gängige funktionelle Gruppen der Endblöcke. (C) Spontane Assemblierung zum PEC-Hydrogel in Wasser durch Mikrophasenseparation. Die PEC-Domänen sind über die neutralen Mittelblöcke der Triblockcopolyelektrolyte miteinander vernetzt.

Prominenteste und zugleich am besten studierte Vertreter synthetischer PEC-Hydrogele werden aus funktionalisierten Poly(allylglycidylether)_m-poly(ethylenglykol)_n-poly(allylglycidylether)_m (PAGE_m-PEG_n-PAGE_m)-Triblockcopolyelektrolyten hergestellt. Die Forschungsgruppen von Prof. Dr. Matthew Tirrell und Asst. Prof. Dr. Samanvaya Srivastava haben intensive Studien durchgeführt, die sich mit der Aufklärung der hierarchischen Netzwerkstruktur der Triblockcopolyelektrolyte, der Kinetik der Selbstassemblierung und den viskoelastischen sowie adaptiven Eigenschaften der Hydrogele gegenüber Änderungen von pH-Wert und Salzkonzentration beschäftigen.²⁸⁵⁻²⁸⁸ Darüber hinaus haben die PEC-Hydrogele breite biologische Anwendung erfahren als Bioadhäsive, Gewebeklebstoffe oder Wirkstofftransporter sowie bei biomedizinischen Injektionen.^{282,289-292} Da PEC-Hydrogele zu den physikalisch vernetzbaren Hydrogelen zählen, weisen sie jedoch die oben bereits erwähnten Nachteile auf.

3.1.3.2 PEC/C-Hybrid-Hydrogele

Im Folgenden bestand daher das Ziel, die Vorteile von elektrostatisch vernetzbaren PEC-Hydrogelen mit den Vorteilen von photochemisch vernetzbaren Hydrogelen zu verbinden und die Nachteile der jeweiligen Einzelnetzwerke zu minimieren. Während eines dreieinhalbmonatigen Forschungsaufenthalts an der *University of California, Los Angeles* (UCLA) wurde in Kollaboration mit Defu Li (*Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Samueli School of Engineering, UCLA, AG Asst. Prof. Dr. Samanvaya Srivastava*) ein IPN-Hydrogel entwickelt, das kovalente und nicht-kovalente Vernetzungsstrategien vereinte.²⁹³ Das vorgestellte Modellsystem setzte sich aus einem PEG-basierten Photopolymer sowie unterschiedlich geladenen PEG-basierten Triblockcopolyelektrolyten zusammen. Das kovalente Netzwerk entstand durch Photopolymerisation von 4-arm Polyethylenglykolacrylat (4-arm PEGA), während das nicht-kovalente Netzwerk durch elektrostatische Assemblierung von funktionalisierten PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolyelektrolyten gebildet wurde. Im Rahmen einer umfangreichen Materialstudie wurde das DN-Hydrogel umfassend charakterisiert und der Einfluss der Einzelnetzwerke auf die Eigenschaften des Gesamthydrogels untersucht. Das IPN-Hydrogel wies eine Kombination an vorteilhaften Eigenschaften auf, die durch keines der beiden Einzelnetzwerke zugänglich waren. Hierzu zählten insbesondere größere Schubmodule, eine höhere Viskosität, Dehnbarkeit, kontrollierte Quelleigenschaften sowie adaptive Eigenschaften des Hydrogels bei Salzexposition. Der Einsatz von PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolyelektrolyten als Bestandteil von IPN-Hydrogelen stellte einen neuartigen Ansatz dar, der eine hohe Kontrolle über die Struktur des gebildeten 3D-Polymernetzwerks erlaubte und vielversprechende Ergebnisse für zukünftige biomedizinische Anwendungen lieferte.

3.1.3.2.1 Synthese von funktionalisierten PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolylektrolyten

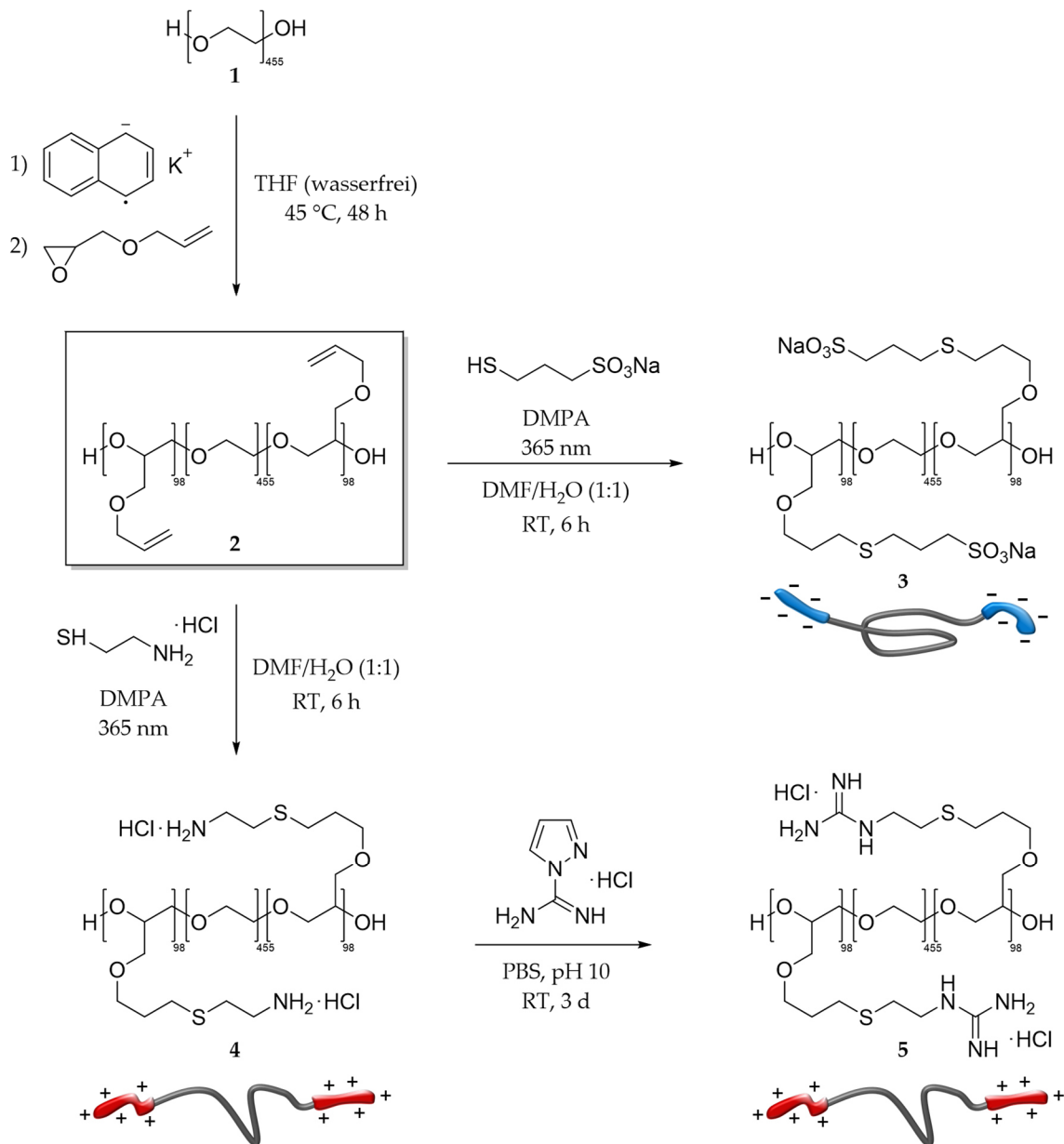


Abbildung 40: Synthese eines PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolymer **2** ausgehend von PEG ($M_n = 20\,000$) und anschließende Funktionalisierung mit positiv bzw. negativ geladenen Gruppen mittels Thiol-En-Click-Chemie zu ABA-Triblockcopolylektrolyten **3** (Sulfonat), **4** (Ammonium) und **5** (Guanidinium). Die Reaktionen zur Bildung des Triblockcopolymer und alle Modifikationen verliefen quantitativ. (DMPA = 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon, Photoinitiator).

Die verwendeten Triblockcopolyelektrolyte wurden durch Defu Li bereitgestellt und durch eine zweistufige Synthese nach Hunt *et al.* ausgehend von PEG ($M_n = 20\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) erhalten (Abbildung 40).²⁷⁹ In einem ersten Schritt wurde lineares PEG durch anionische Polymerisation mit Allylglycidylether modifiziert und in ein ABA-Triblockcopolymer umgewandelt. Im zweiten Schritt wurden die A-Blöcke mittels Thiol-En-Click-Chemie mit anionischen **3** (Sulfonat) bzw. kationischen **4, 5** (Ammonium, Guanidinium) Gruppen funktionalisiert. Grundlage hierfür bildete in allen drei Fällen dasselbe in Schritt 1 synthetisierte Triblockcopolymer **2**, um identische Kettenlängen von PEG und PAGE zu gewährleisten. Da der Reaktionsumsatz der Thiol-En-Click-Reaktionen jeweils vollständig war, wiesen alle synthetisierten Triblockcopolyelektrolyte zudem dieselbe Ladungsdichte (Modifikationen pro A-Block) auf. Für die Herstellung von PEC-Hydrogelen wurden jeweils Triblockcopolyelektrolyte mit positiver und negativer Ladung in äquimolarem Verhältnis in Bezug auf die geladenen Gruppen gemischt. Die kationischen Triblockcopolyelektrolyte unterschieden sich dabei nur in der Stärke ihrer Polyelektrolyte, woraus unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der Sulfonat-Gruppe resultierten.

3.1.3.2.2 Herstellung und Charakterisierung von PEC/C-Hybrid-Hydrogelen

Die Herstellung von DN-Hydrogelen mit interpenetrierenden kovalenten und elektrostatisch wechselwirkenden Polymernetzwerken (PEC/C-Hybrid-Hydrogele) erfolgte durch eine sequentielle IPN-Synthese. Kovalentes und nicht-kovalentes Polymernetzwerk wurden unabhängig voneinander gebildet. Für eine homogene Verflechtung der beiden Netzwerke spielte die Reihenfolge der Monomer-Zugabe eine entscheidende Rolle.

1. dH₂O
2. 4-arm Polyethylenglykolacrylat (4-arm PEGA)
3. Photoinitiator Irgacure 2959
4. Ammonium- oder Guanidinium-funktionalisiertes Triblockcopolyelektrolyt (a-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ bzw. g-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈)
5. Sulfonat-funktionalisiertes Triblockcopolyelektrolyt (s-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈)

Sobald positiv und negativ geladene Triblockcopolyelektrolyte miteinander in Kontakt kamen, führten die elektrostatischen Wechselwirkungen zu einer instantanen Selbstassemblierung. Aus diesem Grund war es wichtig, dass die Zugabe des Gegenions als letztes erfolgte, um eine homogene Durchmischung des 4-arm PEGA-Monomers in der Vorläuferlösung zu erreichen, bevor das nicht-kovalente Netzwerk ausgebildet wurde. Das interpenetrierende kovalente Netzwerk wurde im Anschluss durch Photopolymerisation des 4-arm PEGA-Monomers erhalten.

Im gebildeten IPN-Hydrogel traten Unterschiede in der Elektronendichte zwischen den PEC-Domänen und den umliegenden Bereichen auf. Einerseits wiesen die PEC-Domänen eine höhere Polymerkonzentration auf als die umgebende Lösung, die von PEG-Ketten der neutralen Mittelblöcke der Triblockcopolyelektrolyte sowie des kovalenten 4-arm PEGA-Netzwerks gebildet wurde. Andererseits kam es innerhalb der PEC-Domänen zu einer Akkumulation von Elementen mit höherer Atommasse wie Stickstoff oder Schwefel. Dies führte zu einem ausreichend hohen Elektronenkontrast, um die physikalischen Eigenschaften des IPN-Hydrogels mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. *small-angle X-ray scattering*, SAXS) zu untersuchen. Ziel war es, sowohl die Größe der PEC-Domänen als auch den Abstand zwischen einzelnen PEC-Domänen zu bestimmen und den Einfluss des interpenetrierenden kovalenten Polymernetzwerks zu evaluieren. Die SAXS-Messungen sowie die Auswertung und Interpretation der Daten wurden von Defu Li durchgeführt. Neben der Strukturanalyse wurden ebenso die physiko-mechanischen Eigenschaften der IPN-Hydrogele durch rheologische Messungen sowie Experimente zur Quellbarkeit und Zugfestigkeit bestimmt.

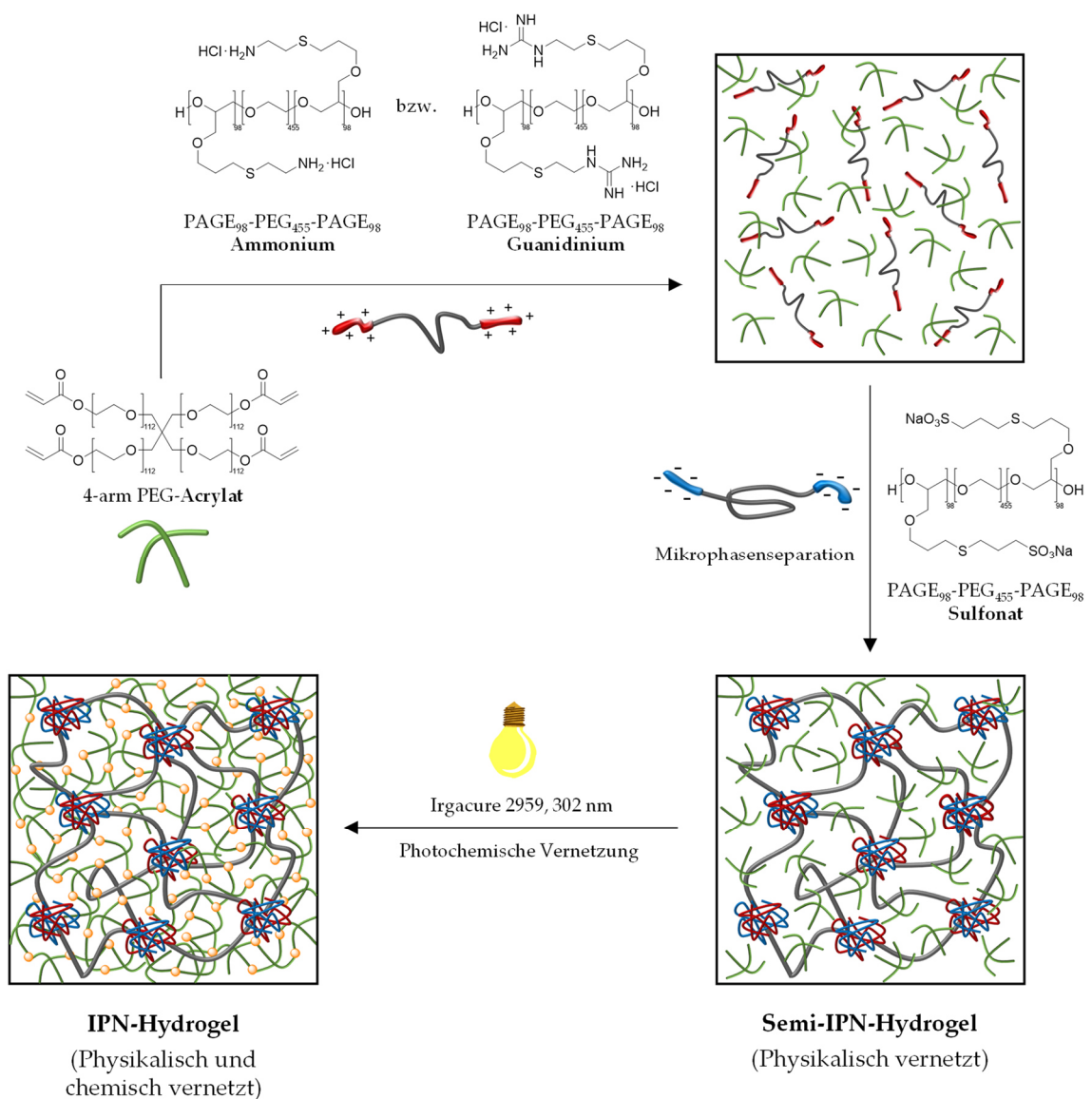


Abbildung 41: Schematische Übersicht über die sequentielle IPN-Synthese des PEC/C-Hybrid-Hydrogels mit interpenetrierenden kovalenten und nicht-kovalenten Polymernetzwerken. (1) Das kationische Triblockcopolyelektrolyt wurde zu einer Lösung bestehend aus 4-arm PEGA-Photomonomer und Photoinitiator Irgacure 2959 gegeben und gut gemischt, um eine homogene Verflechtung der Polymerketten zu erreichen. (2) Nach Zugabe des anionischen Triblockcopolyelektrolyts erfolgte die elektrostatische Assemblierung zum PEC-Hydrogel durch Mikrophasenseparation. (3) Durch photochemische Vernetzung wurde das kovalente Polymernetzwerk gebildet. Das resultierende IPN-Hydrogel vereinte physikalische und chemische Vernetzungsstrategien.

3.1.3.2.3 Charakterisierung mittels SAXS

3.1.3.2.3.1 Modulation des nicht-kovalenten Polymernetzwerks

Die mikroskopischen und makroskopischen Eigenschaften der Hydrogele wurden für variierende Anteile der jeweiligen Einzelnetzwerke untersucht. Zunächst lag der Fokus auf PEC-Hydrogelen sowie PEC/C-Hybrid-Hydrogelen mit zunehmendem Anteil des elektrostatisch assemblierten Polymernetzwerks auf Basis von Guanidinium- und Sulfonat-funktionalisiertem PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ (g/s-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈). Die Konzentration des kovalenten 4-arm PEGA-Netzwerks wurde dabei konstant bei 5 % (w/v) gehalten. Allgemein führte eine steigende Konzentration der Triblockcopolyelektrolyte zu dichteren Polymernetzwerken, wodurch die strukturellen und mechanischen Eigenschaften der Hydrogele beeinflusst wurden.

Aus den gemessenen SAXS-Daten wurden die Radien der PEC-Domänen errechnet (*Abbildung 42 B*). Bei einer Zunahme der Polyelektrolyt-Konzentration von 10 % auf 40 % (w/v) wurden sowohl für das PEC-Hydrogel als auch das PEC/C-Hybrid-Hydrogel ähnliche Radien um 125 Å gemessen. Die Radien verhielten sich dabei unabhängig zur Polyelektrolyt-Konzentration. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Radius einer PEC-Domäne nicht von der Konzentration, sondern im Wesentlichen von der Länge sowie vom Endblock-zu-Mittelblock-Verhältnis der Triblockcopolyelektrolyte abhängig ist. Dabei gilt: Je größer die Länge bzw. je höher der Endblock-Anteil, desto höher der Radius der PEC-Domäne.²⁹⁴

Neben der Größe wurden die Abstände der PEC-Domänen zueinander ermittelt (*Abbildung 42 B*). Für PEC-Hydrogele ergab sich dabei eine abnehmende Distanz zwischen den PEC-Domänen von 363, 327, 327 auf 309 Å bei einer zunehmenden g/s-PEC-Konzentration von 10, 20, 30, 40 % (w/v). Für die PEC/C-Hybrid-Hydrogele wurden vergleichbare Abstände erhalten, nämlich 363, 327, 316 und 309 Å. Insgesamt wurde sowohl für das Einzelnetzwerk als auch das Hybridnetzwerk eine jeweilige Abnahme der Distanz von 14,9 % ermittelt. Da die Größe der PEC-Domänen konstant blieb, führte die Zunahme der Polyelektrolyt-Konzentration zu einer Erhöhung der Anzahl der PEC-Domänen. Dadurch wurde das Gesamtsystem verdichtet und der Platz zwischen den einzelnen PEC-Domänen verringert.

Die vernachlässigbaren Unterschiede beim Vergleich der SN- und DN-Hydrogele hinsichtlich der Abstände und Radien der PEC-Domänen zeigten, dass die Inkorporation des kovalenten 4-arm PEGA-Hydrogels in niedriger Konzentration (5 % (w/v)) keinen Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften von elektrostatisch assemblierten PEC-Hydrogelen (10 - 40 % (w/v)) hatte. Trotz des zusätzlichen interpenetrierenden Polymergerüsts wurde die Struktur des nicht-kovalenten Netzwerks nicht gestört.

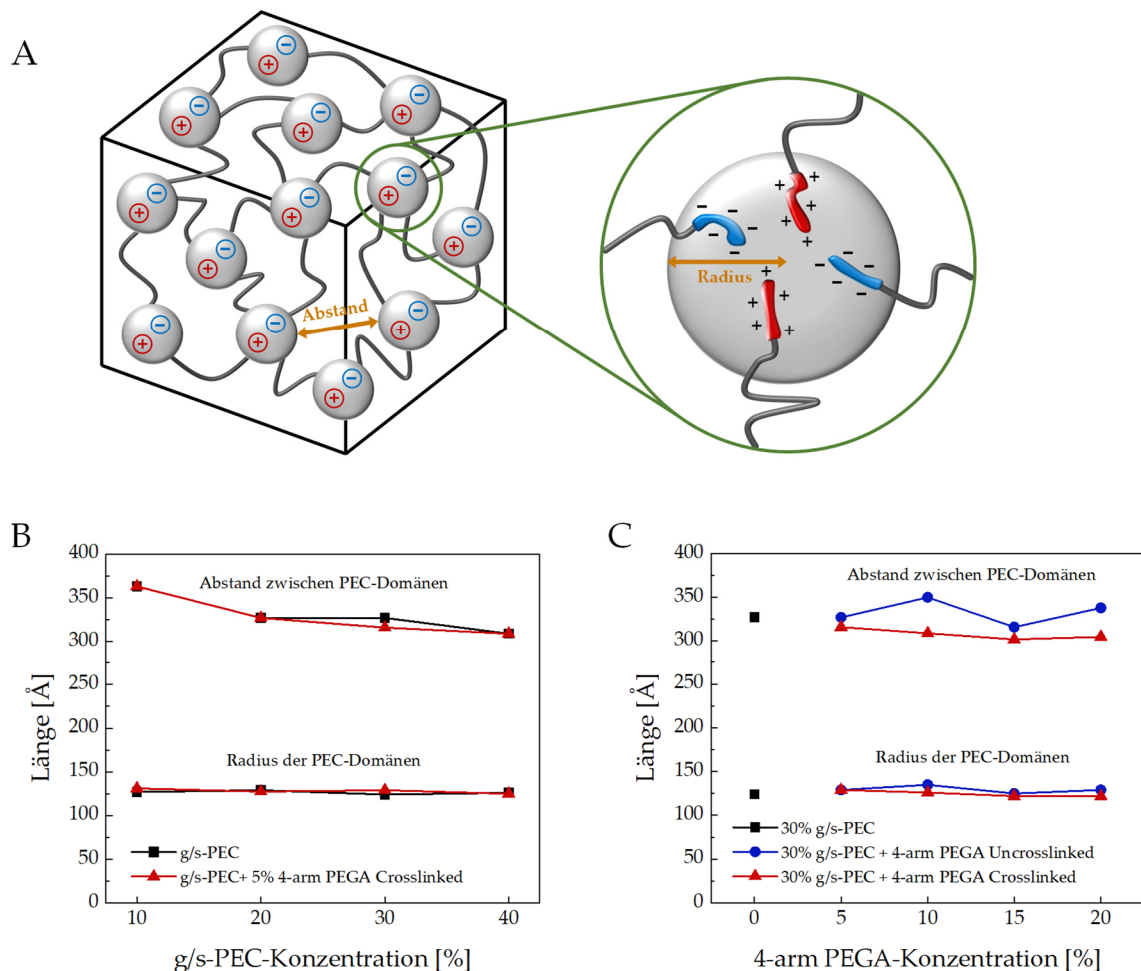


Abbildung 42: (A) Schematische Darstellung des elektrostatisch assemblierten Polymernetzwerks (ohne interpenetrierendem kovalenten Polymernetzwerk), dessen Strukturparameter mittels SAXS analysiert wurden. Aus den SAXS-Daten ermittelte Radien und Abstände der PEC-Domänen in elektrostatisch assemblierten PEC-Hydrogelen (schwarz), chemisch unvernetzten PEC/C-Hybrid-Hydrogelen (blau) und chemisch vernetzten PEC/C-Hybrid-Hydrogelen (rot) in Abhängigkeit zur (B) g/s-PEC-Konzentration und (C) 4-arm PEGA-Konzentration (in Kollaboration mit Defu Li).

3.1.3.2.3.2 Modulation des kovalenten Polymernetzwerks

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss eines steigenden Anteils des kovalenten Netzwerks auf die physikalischen Eigenschaften von PEC/C-Hybrid-Hydrogelen studiert. Dazu wurde der Anteil des photochemisch vernetzten Polymergerüsts von 0 % auf 20 % (w/v) erhöht, während die g/s-PEC-Konzentration bei 30 % (w/v) konstant gehalten wurde. Zusätzlich wurden die Strukturparameter der PEC/C-Hybrid-Hydrogele vor und nach der photochemischen Vernetzung analysiert. Bevor das kovalente Polymernetzwerk gebildet wurde, waren die 4-arm PEGA-Monomere homogen in den Bereichen zwischen den PEC-Domänen verteilt und frei beweglich. Im Zuge der Photopolymerisation wurden die Monomere schließlich kovalent miteinander verknüpft, wodurch sie in ihrer Position fixiert wurden.

Die Analyse der Abstände zwischen den PEC-Domänen ergab geringere Distanzen für die photovernetzten Hydrogele im Vergleich zu ihren chemisch unvernetzten Vorläuferlösungen (*Abbildung 42 C*). Die ermittelten Abstände für die unvernetzten Hydrogele variierten dabei zwischen 316 Å und 350 Å aufgrund der hohen Flexibilität der 4-arm PEGA-Ketten. Auch in höheren Konzentrationen trug 4-arm PEGA in den photochemisch unvernetzten Hybrid-Hydrogelen nicht zu einer Kompression des Gesamtsystems bei. Im Gegensatz dazu wurde für die vernetzten PEC/C-Hybrid-Hydrogele eine siebenprozentige Abnahme der Abstände zwischen den PEC-Domänen von 327 Å auf 305 Å gemessen. Aus der photoinduzierten Vernetzung der Acrylat-Gruppen wurden die Polymerketten in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt, wodurch das Gesamtsystem verdichtet und die Abstände zwischen den PEC-Domänen reduziert wurden.

Der Einfluss von Konzentration und Vernetzung von 4-arm PEGA auf die Radien der PEC-Domänen war dagegen vernachlässigbar, da diese ausschließlich von den geladenen Endblöcken der Triblockcopolyelektrolyte bestimmt wurden (*Abbildung 42 C*).

3.1.3.2.4 Rheologische Charakterisierung

Neben den SAXS-Experimenten wurden rheologische Messungen durchgeführt, um die viskoelastischen Eigenschaften von PEC-Hydrogelen und PEC/C-Hybrid-Hydrogelen miteinander zu vergleichen. Analog zum Vorgehen oben wurden einerseits der Einfluss eines zunehmenden Anteils von elektrostatischem bzw. kovalentem Netzwerk sowie andererseits der Einfluss der chemischen Vernetzung auf die rheologischen Eigenschaften der Hydrogele evaluiert.

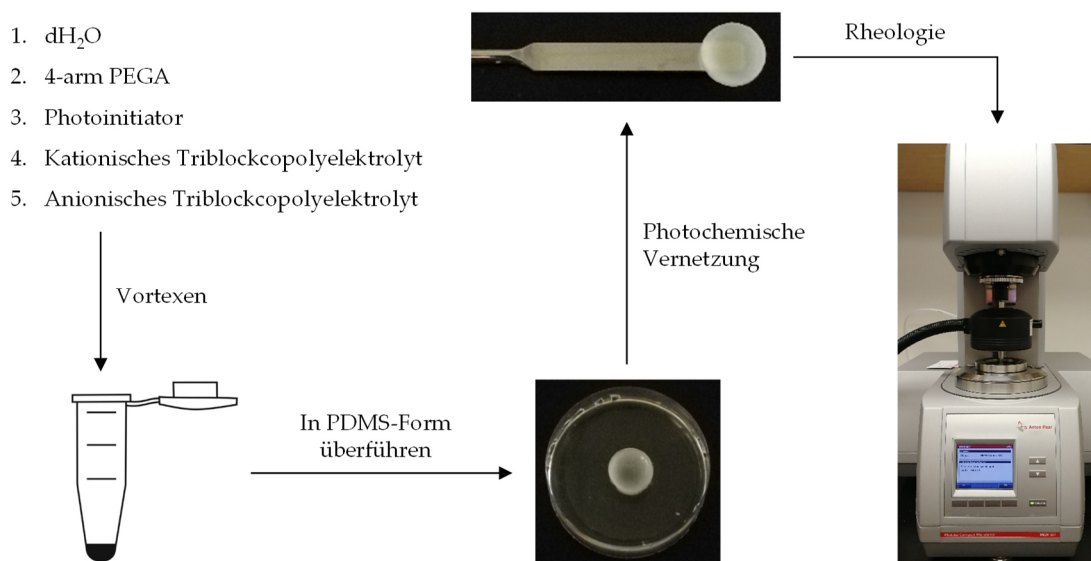


Abbildung 43: Schematische Übersicht über die Herstellung der Hydrogelproben für die rheologische Charakterisierung.

3.1.3.2.4.1 Kovalente und nicht-kovalente Einzelnetzwerke

Im ersten Schritt wurden die beiden Einzelnetzwerke – g/s-PEC-Hydrogele und 4-arm PEGA-Hydrogele – jeweils isoliert betrachtet, um die viskoelastischen Eigenschaften von rein elektrostatisch assemblierten bzw. photochemisch vernetzten Hydrogelen zu untersuchen. Hierzu wurden Oszillationsmessungen mit variabler Frequenz (sog. Frequenz-Sweeps) durchgeführt, um die Anteile der elastischen (Speichermodul G') und viskosen (Verlustmodul G'') Eigenschaften der Hydrogele zu bestimmen (Abbildung 44 B,F). Für alle Frequenz-Sweeps lag der jeweilige Wert des Speichermoduls im gemessenen Frequenzbereich stets über dem Verlustmodul. Dies bedeutete, dass die elastischen Eigenschaften dominierten, weswegen sowohl die physikalisch als auch chemisch vernetzten Hydrogele einen größeren Feststoff- als Flüssigkeitscharakter besaßen.

Zusätzlich wurden die Schubmodule bei einer Kreisfrequenz von $1,12 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ mit zunehmender Polyelektrolyt- bzw. Photomonomer-Konzentration miteinander verglichen (*Abbildung 44 A,E*). Wurde die Polyelektrolyt-Konzentration von 10 % auf 30 % (w/v) erhöht, wurde eine deutliche Steigerung des Speichermoduls um Faktor 32 gemessen. Wie oben bereits diskutiert und im Einklang mit der Literatur blieb die Größe der PEC-Domänen bei einer Erhöhung der Konzentration der Triblockcopolyelektrolyte konstant. Stattdessen führte die größere Polyelektrolyt-Konzentration zu einer Erhöhung der Anzahl der PEC-Domänen, die im nicht-kovalenten Polymernetzwerk als Vernetzungspunkte fungierten. Die daraus resultierende höhere Vernetzungsdichte trug bis zu einer gewissen Grenze zu einer Steigerung der elastischen Eigenschaften der physikalisch vernetzten Hydrogele bei. Bei weiterer Erhöhung der Polyelektrolyt-Konzentration von 30 % auf 40 % (w/v) wurde keine signifikante Änderung von G' mehr nachgewiesen, sondern lediglich eine Zunahme von G'' . Anhand der SAXS-Daten wurde oben bereits gezeigt, dass sich die Abstände zwischen den PEC-Domänen bei Erhöhung der Polyelektrolyt-Konzentration von 30 % auf 40 % (w/v) nur noch geringfügig verkleinerten, woraus die Schlussfolgerung gezogen werden konnte, dass die maximal mögliche Anzahl an PEC-Domänen erreicht wurde. Dementsprechend wurde lediglich eine Steigerung von G'' aufgrund der zunehmenden Gesamtkonzentration an PEG-Ketten beobachtet. Im kovalenten Polymernetzwerk führte dagegen eine steigende 4-arm PEGA-Konzentration zu einer kontinuierlichen Zunahme von G' und G'' . Aufgrund der kovalenten Vernetzung wurden bei vergleichbaren Polymerkonzentrationen zudem höhere Schubmodule als in den elektrostatisch assemblierten PEC-Hydrogelen erreicht.

Darüber hinaus wurden zyklische Deformations-Sweeps durchgeführt, um das elastische Erholungsvermögen der Hydrogele nach Deformation zu beurteilen (*Abbildung 44 D,H*). Sowohl das nicht-kovalente als auch das kovalente Polymernetzwerk zeigten eine nahezu instantane Regeneration von G' auf das Ausgangsniveau. Die Abnahme von G' in Phasen hoher Scherbelastung war in den PEC-Hydrogelen aufgrund der schwächeren Wechselwirkungen stärker ausgeprägt als in den kovalent vernetzten 4-arm PEGA-Hydrogelen. Dies verdeutlichte die Eignung der nicht-kovalenten Polymernetzwerke als injizierbare Hydrogele, bei denen sowohl eine schnelle Strukturregeneration als auch eine signifikante Erhöhung des Flüssigkeitscharakters bei einwirkender Scherbelastung benötigt wird.

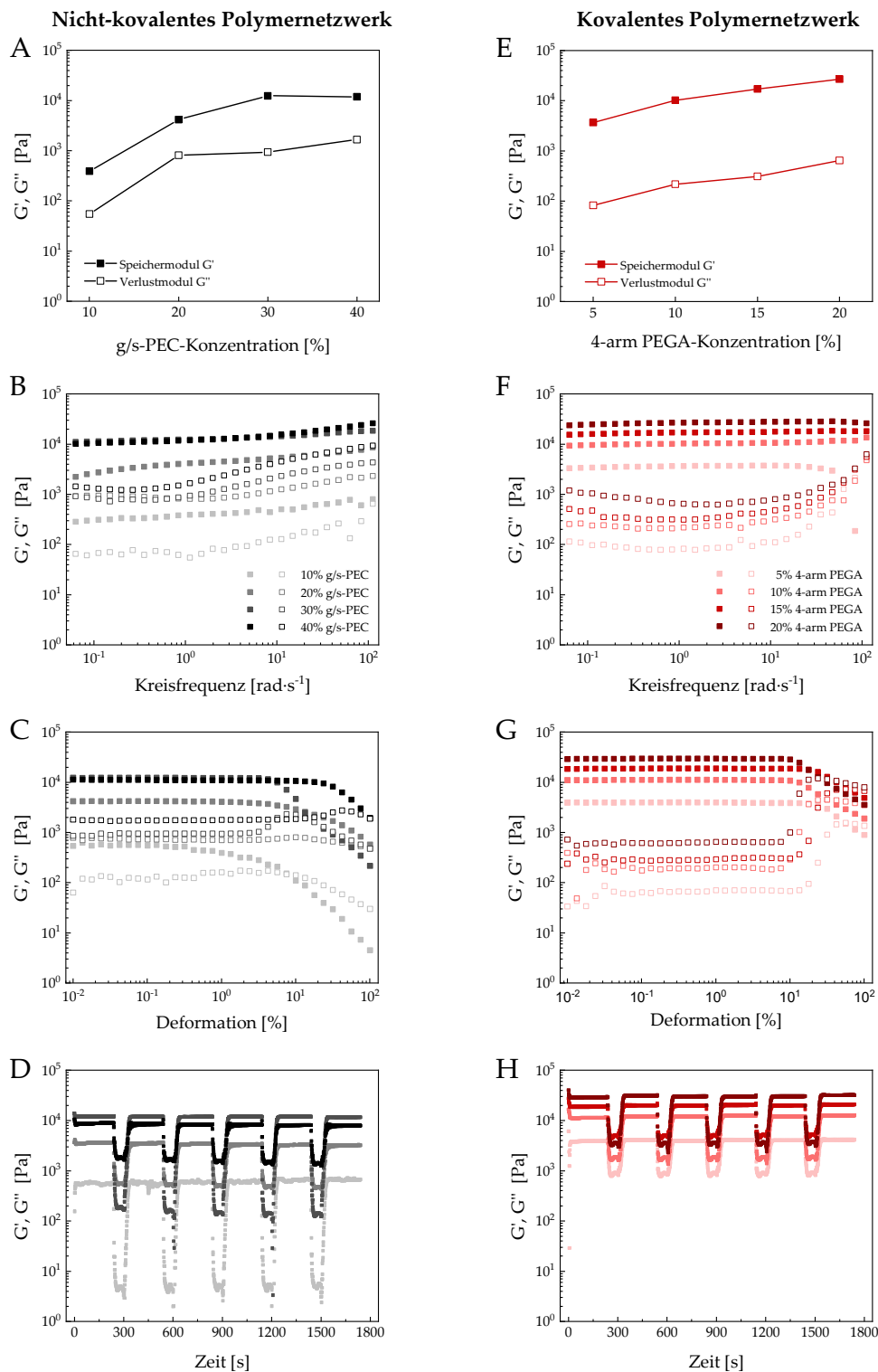


Abbildung 44: Rheologische Charakterisierung der Einzelnetzwerke: (A-D) elektrostatisch assembliertes Polymernetzwerk und (E-H) kovalentes Polymernetzwerk. (A,E) Gemessene Schubmodule bei einer Kreisfrequenz von $1,12 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit von der PEC- bzw. 4-arm PEGA-Konzentration. Aufnahmen von (B,F) Frequenz-Sweeps ($0,01\text{-}100 \text{ Hz}$, $\gamma = 0,3 \%$), (C,G) Amplituden-Sweeps ($\gamma = 0,01\text{-}100 \%$, $\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) und (D,H) zyklischen Deformations-Sweeps ($\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, $\gamma = 0,3 \%$ für 240 s , $\gamma = 100 \%$ für 60 s).

3.1.3.2.4.2 g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele

Im nächsten Schritt wurden die rheologischen Eigenschaften von PEC/C-Hybrid-Hydrogelen mit konstantem elektrostatischen, jedoch steigendem kovalenten Polymernetzwerkanteil untersucht. Dazu wurden die Schubmodule sowohl vor als auch nach der photochemischen Vernetzung der 4-arm PEGA-Monomere gemessen.

Interessanterweise hatte ein zunehmender Anteil des kovalenten Polymernetzwerks einen gegensätzlichen Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften der photopolymerisierten und chemisch unvernetzten Hybrid-Hydrogele. So wurde bei Erhöhung der 4-arm PEGA-Konzentration in einem 30%igen (w/v) g/s-PEC-Hydrogel von 5 % auf 20 % (w/v) und anschließender photochemischer Vernetzung ein kontinuierlicher Anstieg von G' und G'' beobachtet (*Abbildung 45 B*). Ferner zeigten alle vier IPN-Hydrogele ein feststoffähnliches Verhalten über den gesamten Frequenzbereich.

Im Gegensatz dazu wurde in den photochemisch unvernetzten Hybrid-Hydrogelen eine deutliche Abnahme von G' und G'' gemessen (*Abbildung 45 B*). Die Reduktion der Schubmodule fiel dabei umso stärker aus, je höher die 4-arm PEGA-Konzentration war. Das anfängliche Speichermodul von 12 446 Pa, das für ein 30%iges (w/v) g/s-PEC-Hydrogel ermittelt wurde, reduzierte sich dabei deutlich auf 847, 320, 126, 39 Pa bei Inkorporation von 5, 10, 15, 20 % (w/v) PEGA-Monomeren. Darüber hinaus wurde sowohl in Abwesenheit des Photomonomers als auch bei einer niedrigen 4-arm PEGA-Konzentration von 5 % (w/v) kein Crossover von G' und G'' beobachtet. In chemisch unvernetzten Hybrid-Hydrogelen mit 10, 15 und 20 % (w/v) 4-arm PEGA-Anteil wurde dagegen ein Crossover nachgewiesen, der einen Übergang von feststoffähnlichen zu komplexen Eigenschaften anzeigte (*Abbildung 45 A*). Da die Crossover-Frequenz mit steigender 4-arm PEGA-Konzentration abnahm, überwog für das unvernetzte Hybrid-Hydrogel zunehmend der Flüssigkeitscharakter. Diese Beobachtungen standen im Einklang mit den gemessenen SAXS-Daten. Ohne photochemische Vernetzung trugen die 4-arm PEGA-Monomere nicht zu einer Vergrößerung der elastischen Eigenschaften des Polymernetzwerks bei und die Schubmodule der unvernetzten Hybrid-Hydrogele wurden hauptsächlich von den elektrostatischen Wechselwirkungen der PECs bestimmt. Da die Photomonomere mit den Triblockcopolyelektrolyten um den verfügbaren Platz konkurrierten und zusätzlich die Annäherung der geladenen

Endblöcke behinderten, wurde die Assemblierung des nicht-kovalenten Polymernetzwerks erschwert. Eine zunehmende 4-arm PEGA-Konzentration führte daher zu einer Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen, was zu einer Verringerung von Speicher- und Verlustmodulen führte.

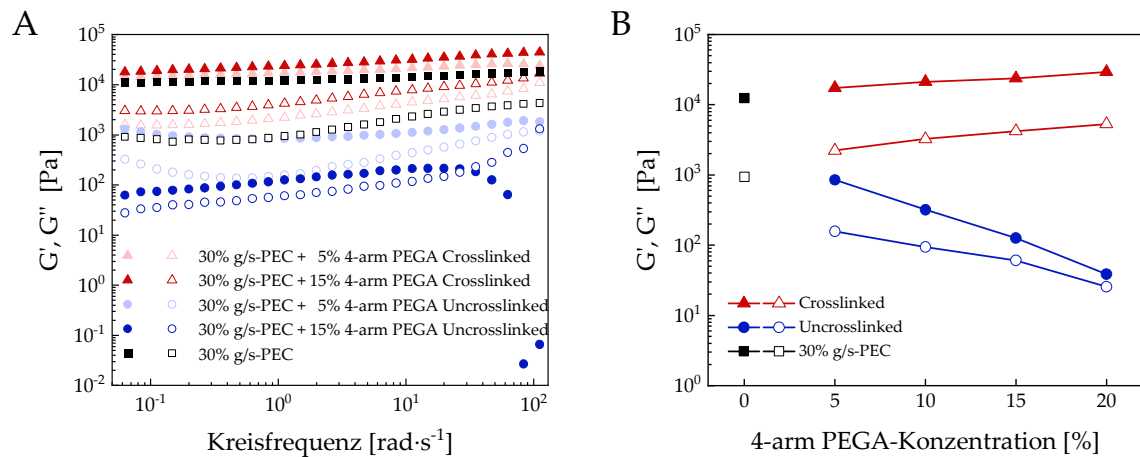


Abbildung 45: Rheologische Charakterisierung von Speicher- und Verlustmodulen (G' und G'') von Hybrid-Hydrogelen mit konstantem elektrostatischen (30 % g/s-PEC) und steigendem kovalentem Polymernetzwerkanteil (0-20 % 4-arm PEGA). PEC-Hydrogele sind in Schwarz, g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele vor chemischer Vernetzung in Blau und nach photochemischer Vernetzung in Rot dargestellt. (A) Messdaten ausgewählter Frequenz-Sweeps. (B) Gemessene Schubmodule bei einer Kreisfrequenz von $1,12 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit von der 4-arm PEGA-Konzentration (in Kollaboration mit Defu Li).

Als Nächstes wurden die rheologischen Eigenschaften von PEC/C-Hybrid-Hydrogelen mit konstantem kovalentem, jedoch steigendem elektrostatischem Polymernetzwerkanteil untersucht. Aus Sicht der unvernetzten Photomonomer-Vorläuferlösung sorgte das zusätzliche elektrostatische Polymernetzwerk für eine signifikante Steigerung der elastischen Eigenschaften (Abbildung 46 B). Während das Speichermodul einer 5%igen (w/v) 4-arm PEGA-Lösung vernachlässigbar klein war ($\approx 0 \text{ Pa}$), resultierte aus der Inklusion eines steigenden Anteils von g/s-PEC (10-40 % (w/v)) eine kontinuierliche Erhöhung von G' auf 53, 752, 847 und 1224 Pa. Dieser beträchtliche Anstieg von Speichermodul und folglich auch Viskosität durch Inkorporation eines interpenetrierenden elektrostatischen Netzwerks könnte für verschiedene Anwendungen interessant sein. Der Einsatz von chemisch vernetzbaren Hydrogelen in lichtbasierten Biofabrikationsprozessen, wie z. B. dem extrusionsbasierten *3D-Bioprinting*, stellt aufgrund der niedrigviskosen Eigenschaften der Vorläuferlösungen häufig eine

besondere Herausforderung dar. Die Vorläuferlösungen tendieren nach erfolgter Extrusion zu verlaufen und ihre gewünschte 3D-Struktur zu verlieren, bevor sie durch chemische Methoden vernetzt werden. Die Inklusion eines elektrostatischen Netzwerks, welches die Viskosität der Vorläuferlösung so stark erhöht, dass sie ihre Strukturintegrität aufrechterhalten können, würde einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Darüber hinaus wäre der Einsatz von PEC-Hydrogelen als Additiv für wirkstoffbeladene, chemisch vernetzbare Hydrogele bei medizinischen Injektionen denkbar. Auch hier besteht das Problem in den flüssigkeitsähnlichen Eigenschaften der injizierten Hydrogelvorläuferlösungen, wodurch ein Großteil des Wirkstoffs bereits zu Beginn freigesetzt wird und in die umliegenden Gewebe diffundiert. Polyelektrolyte könnten die viskoelastischen Eigenschaften der injizierten Hydrogele vor ihrer chemischen Vernetzung entscheidend verstärken. Die Inklusion des elektrostatischen Polymernetzwerks führte zusätzlich zu einer Steigerung der Schubmodule der photopolymerisierten PEC/C-Hybrid-Hydrogele (Abbildung 46 B).

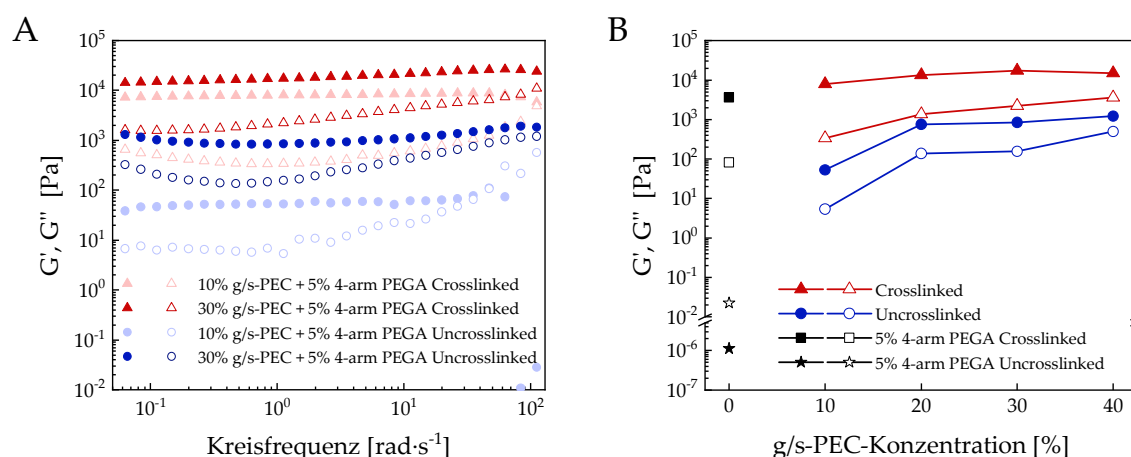


Abbildung 46: Rheologische Charakterisierung der Speicher- und Verlustmodule (G' und G'') von Hybrid-Hydrogelen mit konstantem kovalenten (5 % 4-arm PEGA) und steigendem elektrostatischen Polymernetzwerkanteil (0-40 % g/s-PEC). 4-arm PEGA-Hydrogele sind in Schwarz, g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele vor chemischer Vernetzung in Blau und nach photochemischer Vernetzung in Rot dargestellt. (A) Messdaten ausgewählter Frequenz-Sweeps. (B) Gemessene Schubmodule bei einer Kreisfrequenz von $1,12 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit von der g/s-PEC-Konzentration (in Kollaboration mit Defu Li).

Im letzten Schritt wurden die Viskositäten aller Hydrogelformulierungen durch Rotationsmessungen bestimmt. Dabei zeigten sowohl eine 5%ige (w/v) 4-arm PEGA-Lösung als auch PEC-Hydrogele sowie PEC/C-Hybrid-Hydrogele vor und nach chemischer Vernetzung jeweils ein scherverdünnendes Verhalten, d. h. ihre Viskosität nahm bei steigender Scherrate ab (*Abbildung 47 A,C*). Diese Eigenschaft ist insbesondere für das extrusionsbasierte *3D-Bioprinting* von entscheidender Bedeutung, um die auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte zu minimieren. Die beobachtete Instabilität in der Viskosität bei unvernetzten PEC/C-Hybrid-Hydrogelen mit 30%igem g/s-PEC-Anteil wurde vermutlich durch Strukturumwandlungsprozesse verursacht, die bei erhöhten Scherraten induziert wurden.

Zusätzlich wurden die Viskositäten bei einer Scherrate von 1 s^{-1} bei steigender Polyelektrolyt-Konzentration bzw. steigender 4-arm PEGA-Konzentration miteinander verglichen. Eine Zunahme der Polyelektrolyt-Konzentration führte sowohl für PEC-Hydrogele als auch chemisch unvernetzte PEC/C-Hybrid-Hydrogele zu einem Anstieg in der Viskosität (*Abbildung 47 B*). Die Ursachen lagen in der zunehmenden Verdichtung des elektrostatischen Polymernetzwerks sowie einer steigenden Verflechtung der PEG-Polymerketten, wodurch insgesamt der Widerstand der Hydrogellösungen gegenüber Scherung erhöht wurde. Der beobachtete Viskositätsanstieg mit steigendem PEC-Anteil verdeutlichte das Potenzial der Triblockcopolyelektrolyte für den Einsatz als Additive, um die Viskosität von niedrigviskosen Lösungen zu modulieren. Im Zuge der photochemischen Vernetzung wurden die 4-arm PEGA-Monomere durch kovalente Bindungen miteinander verknüpft, wodurch die Mobilität der Polymerketten stark eingeschränkt wurde. Aus der Vernetzung resultierte ein deutlicher Anstieg in der Viskosität, weswegen der Einfluss des elektrostatischen Polymernetzwerks vernachlässigbar wurde. In den photochemisch unvernetzten PEC/C-Hybrid-Hydrogelen führte dagegen eine steigende 4-arm PEGA-Konzentration zu einer kontinuierlichen Abnahme der Viskosität (mit Ausnahme von 20 % (w/v) 4-arm PEGA, wobei es sich vermutlich um einen experimentellen Fehler handelt) (*Abbildung 47 D*). Der Grund hierfür lag, wie oben bereits beschrieben, in der Beeinträchtigung des elektrostatischen Assemblierungsprozesses der Triblockcopolyelektrolyte.

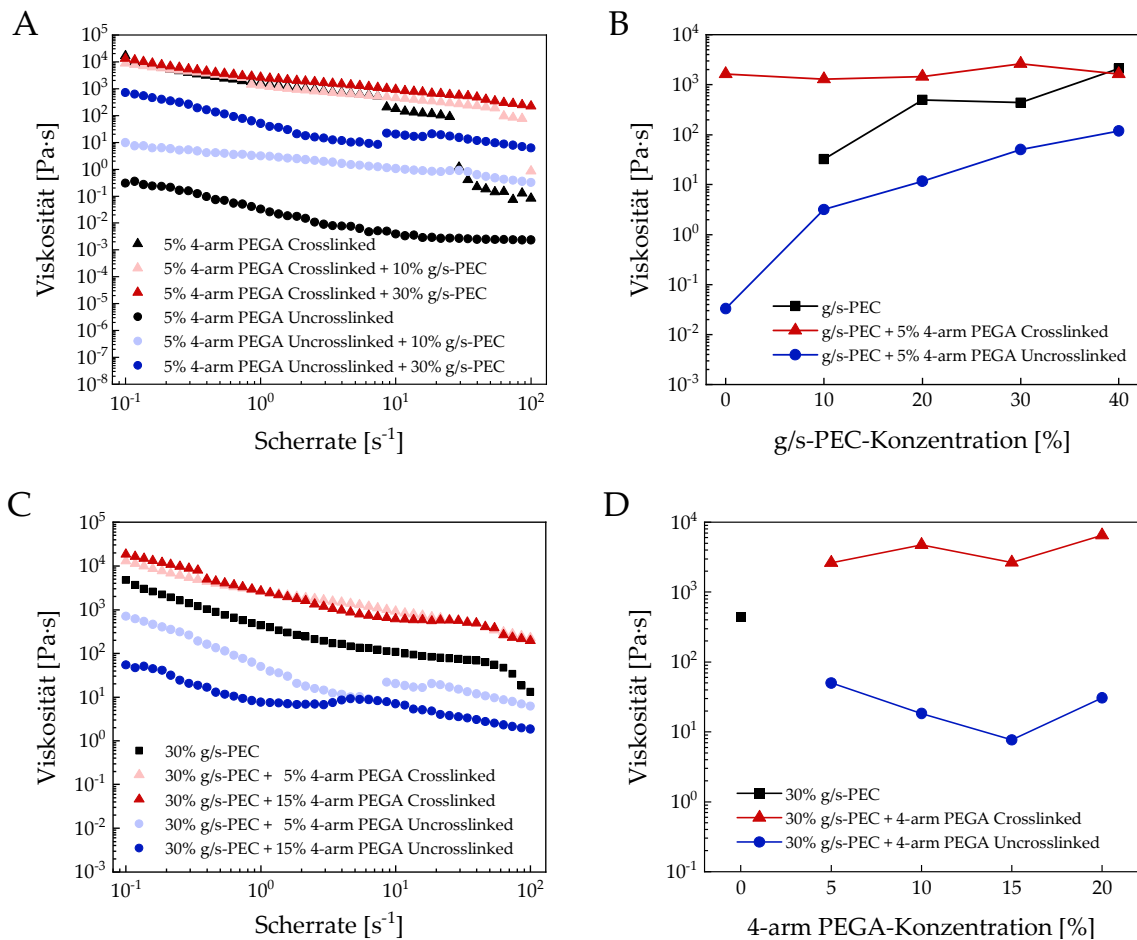


Abbildung 47: Rheologische Charakterisierung der Viskosität von (A,B) PEC-Hydrogelen (10-40 % g/s-PEC) und Hybrid-Hydrogelen mit konstantem kovalenten (5 % 4-arm PEGA) und steigendem elektrostatischen Polymernetzwerkanteil (0-40 % g/s-PEC) sowie (C,D) Hybrid-Hydrogelen mit konstantem elektrostatischen (30 % g/s-PEC) und steigendem kovalenten Polymernetzwerkanteil (0-20 % 4-arm PEGA). PEC-Hydrogele bzw. 4-arm PEGA-Hydrogele sind in Schwarz, g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele vor chemischer Vernetzung in Blau und nach photochemischer Vernetzung in Rot dargestellt. (A,C) Messdaten ausgewählter Viskositätsprofile. Alle Hydrogellösungen und photovernetzte Hydrogele zeigten ein scherverdünnendes Verhalten. Gemessene Viskositäten bei einer Scherrate von $1 s^{-1}$ in Abhängigkeit von der (B) g/s-PEC-Konzentration und (D) 4-arm PEGA-Konzentration (in Kollaboration mit Defu Li).

3.1.3.2.5 Adaptive Eigenschaften bei NaCl-Exposition

Physikalisch vernetzte Hydrogele, deren Assemblierung auf elektrostatischen Anziehungskräften beruhen, zeigen eine hohe Sensitivität gegenüber externen Einflüssen, wie pH-Wert oder Salzen, da diese die ionischen Wechselwirkungen schwächen. In der Literatur wurde bereits in zahlreichen Studien gezeigt, dass eine Salzexposition zu strukturellen und viskoelastischen Veränderungen der Eigenschaften von PEC-Hydrogelen führt.^{279,285-288} Die Maskierung von Ladungen durch Salzionen bietet daher die Möglichkeit zur Modulation der Eigenschaften. Die Adaptivität der Hydrogele kann beispielsweise zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung genutzt werden. Geladene Wirkstoffe, Proteine oder Nukleinsäuren, die durch ionische Wechselwirkungen im PEC-Hydrogel gehalten werden, können durch einen gezielten Stimulus, wie eine Veränderung von pH-Wert oder Salzkonzentration, freigesetzt werden.²⁹⁵⁻³⁰¹

Während das adaptive Verhalten für rein elektrostatisch assemblierte Hydrogele bereits umfassend charakterisiert wurde, gibt es in der Literatur bisher noch keine Studien, die sich mit dem Einfluss von Salzen in Hybrid-Hydrogelen mit interpenetrierenden elektrostatischen und kovalenten Polymernetzwerken beschäftigen. Im Folgenden bestand daher das Ziel, zwei PEC/C-Hybrid-Hydrogelsysteme auf Basis unterschiedlicher elektrostatischer Polymernetzwerke miteinander zu vergleichen und den Einfluss von NaCl auf die Eigenschaften des IPN-Netzwerks zu evaluieren. Grundlage für die beiden PEC-Hydrogele bildeten funktionalisierte Triblockcopolyelektrolyte mit a) Guanidinium und Sulfonat (g/s) sowie b) Ammonium und Sulfonat (a/s). Die Stärke der jeweiligen ionischen Gruppen bestimmte die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkung. Da Sulfonat ($pK_s \approx 2$) in beiden Varianten als anionische Gruppe fungierte, wurde die Stärke der Interaktion lediglich durch die kationische Gruppe bestimmt. Die Guanidinium-Gruppe ($pK_s \approx 13,6$) besitzt eine höhere Basizität als die Ammonium-Gruppe ($pK_s \approx 9,25$) und liegt daher über einen größeren pH-Bereich protoniert vor. Der Grund hierfür liegt in der Resonanzstabilisierung der positiven Ladung bei Protonierung der Guanidinium-Gruppe. Folglich war auch die ionische Wechselwirkung zwischen Guanidinium und Sulfonat höher als die von Ammonium und Sulfonat in den jeweiligen PEC-Hydrogelen. Eine höhere Ionenstärke ist allgemein mit einer höheren Resistenz gegenüber Salzen verbunden.

Für die Evaluation des Salzeinflusses wurden PEC/C-Hybrid-Hydrogele mit 5%igem 4-arm PEGA und 30%igem g/s-PEC bzw. a/s-PEC-Anteil herangezogen und ihre adaptiven Eigenschaften gegenüber Salzexposition in einem Konzentrationsbereich von 0 mM bis 1000 mM NaCl untersucht.

Die SAXS-Analyse zeigte eine unterschiedliche Anfälligkeit der beiden elektrostatisch assemblierten Polymernetzwerke auf eine steigende Salzkonzentration (*Abbildung 48 A*). Dabei demonstrierten die g/s-Hybrid-Hydrogele eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber NaCl. Die Abstände zwischen den PEC-Domänen blieben sowohl für das photovernetzte als auch das chemisch unvernetzte g/s-Hybrid-Hydrogel überwiegend konstant und variierten nur geringfügig zwischen 316 Å und 338 Å mit Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 mM auf 1000 mM. Ebenso waren die Radien der g/s-PEC-Domänen konstant und betrugen etwa 130 Å.

Im Gegensatz dazu wiesen die a/s-Hybrid-Hydrogele eine hohe Sensitivität gegenüber NaCl auf. Eine steigende NaCl-Konzentration führte zu einer signifikanten Verringerung der Distanzen der PEC-Domänen zueinander von 316 Å auf 246 Å in den unvernetzten und von 285 Å auf 240 Å in den chemisch vernetzten a/s-Hybrid-Hydrogelen. Da die Ammonium-Gruppe im Vergleich zur Guanidinium-Gruppe eine schwächere ionische Gruppe darstellte, kam hier der Maskierungseffekt der Salzionen stärker zum Tragen. Dadurch wurden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Ammonium und Sulfonat herabgesetzt. Zusätzlich wurde Salz von den PEG-Ketten in Lösung gebunden, was zu ihrer Schrumpfung führte und aufgrund der nur noch schwach wechselwirkenden PEC-Domänen eine Gesamtkompression des Systems bei steigender NaCl-Konzentration induzierte.

Aus der Salzexposition resultierten nicht nur strukturelle Unterschiede, sondern auch eine Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele (*Abbildung 48 B*). Dabei wurden deutliche Unterschiede zwischen rein elektrostatisch assemblierten Hydrogelen und Hybrid-Hydrogelen mit interpenetrierenden kovalenten und nicht-kovalenten Polymernetzwerken beobachtet. Da die Bildung von PEC-Hydrogelen ausschließlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhte, besaßen sie eine hohe Sensitivität gegenüber NaCl. So wurde beispielsweise für g/s-PEC-Hydrogele eine Reduktion von Speicher- und Verlustmodul von 12 446 Pa bzw. 944 Pa (0 mM NaCl) auf 332 Pa bzw. 76 Pa (1000 mM NaCl) gemessen, wodurch sich der Verlustfaktor $\tan \delta = G''/G'$ von 0,08 auf 0,23 erhöhte. Eine ähnlich starke Abnahme der Schubmodule

wurde ebenso für a/s-PEC-Hydrogele beobachtet, wobei sich der Verlustfaktor von 0,27 auf 0,50 erhöhte. Die Erhöhung des Verlustfaktors im Zuge der Salzexposition sowohl für a/s-PEC- als auch g/s-PEC-Hydrogele zeigte, dass die viskosen Eigenschaften der Hydrogele zunahmen, während die elastischen Eigenschaften an Bedeutung verloren. Dies spiegelte die adaptiven Eigenschaften beider PEC-Hydrogele gegenüber Salzen wider. Die Exposition ging dabei mit einem erheblichen Verlust der mechanischen Festigkeit der Hydrogele einher.

Im Unterschied zu den rein elektrostatisch vernetzten Hydrogelen demonstrierten die PEC/C-Hybrid-Hydrogele eine hohe Robustheit gegenüber Salzen. Die Schubmodule wurden daher in nur geringem Maße beeinflusst. So reduzierte sich das Speichermodul von g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogelen von 17 317 Pa (0 mM NaCl) auf 6473 Pa (1000 mM NaCl). Analog wurde für a/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele eine Abnahme des Speichermoduls von 9720 Pa (0 mM NaCl) auf 6402 Pa (1000 mM NaCl) gemessen. Die Ursache in der moderaten Abnahme lag darin, dass das kovalente Polymernetzwerk im IPN-Hydrogel nicht durch Salz beeinträchtigt wurde, jedoch überwiegend die elastischen Eigenschaften der PEC/C-Hybrid-Hydrogele bestimmte. Der Verlust der elektrostatischen Wechselwirkung innerhalb des IPN konnte daher durch das kovalente Polymernetzwerk kompensiert werden.

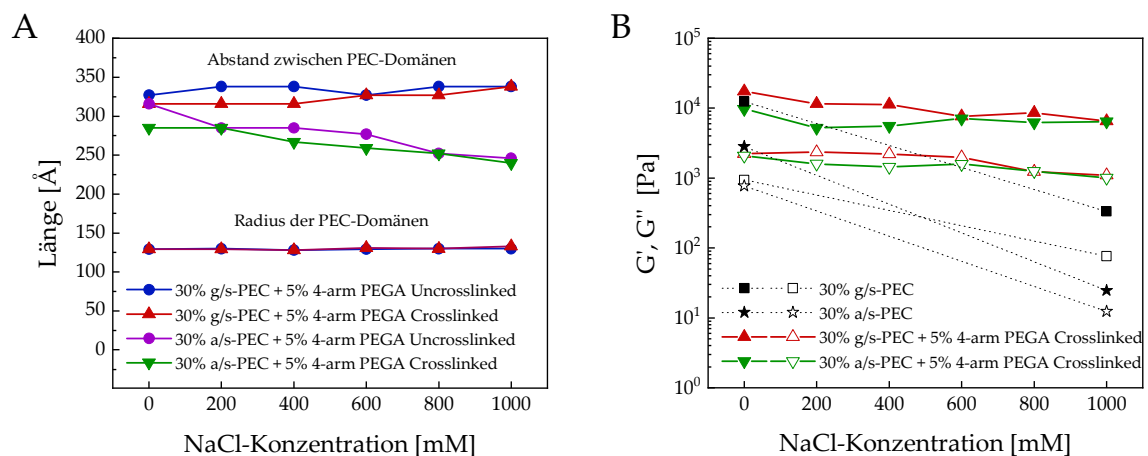


Abbildung 48: (A) Aus der SAXS-Analyse ermittelte Radien und Abstände der PEC-Domänen in chemisch unvernetzten g/s-Hybrid- (blau) und a/s-Hybrid-Hydrogelen (violett) sowie chemisch vernetzten g/s-Hybrid- (rot) und a/s-Hybrid-Hydrogelen (grün) in Abhängigkeit zur NaCl-Konzentration (0-1000 mM). (B) Rheologische Charakterisierung der Speicher- und Verlustmodule (G' und G'') von g/s-PEC- (schwarz, quadratisch) und a/s-PEC-Hydrogelen (schwarz, sternförmig) sowie g/s-Hybrid- (rot) und a/s-Hybrid-Hydrogelen (grün) bei Salzexposition (0-1000 mM NaCl). Gemessene Schubmodule bei einer Kreisfrequenz von $1,12 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (in Kollaboration mit Defu Li).

3.1.3.2.6 Physikalisch-mechanische Charakterisierung

3.1.3.2.6.1 Zugversuche

Neben der Strukturanalyse und rheologischen Charakterisierung wurden zusätzlich die physiko-mechanischen Eigenschaften untersucht und der Einfluss des interpenetrierenden kovalenten Netzwerks auf die PEC-Hydrogele bewertet. Hierfür wurden in Kollaboration mit Defu Li Zugversuche (engl. *tensile tests*) durchgeführt, um die jeweilige Zugfestigkeit (engl. *ultimate strength*), Dehnbarkeit (engl. *extensibility*), Zähigkeit (Tenazität, engl. *toughness*) sowie das Elastizitätsmodul (engl. *Young's modulus*) zu bestimmen (Abbildung 49).

Zunächst wurde eine isolierte Betrachtung des kovalenten Polymernetzwerks vorgenommen. Eine steigende 4-arm PEGA-Konzentration von 5 % auf 15 % (w/v) führte zu einer Erhöhung der Zugfestigkeit, Zähigkeit und des Elastizitätsmoduls, welches die Steifigkeit eines Materials angibt. Das dichtere Polymernetzwerk sowie ein höherer Vernetzungsgrad sorgten dafür, dass mehr Energie benötigt wurde, um das kovalente Netzwerk aufzubrechen. Gleichzeitig ging eine steigende 4-arm PEGA-Konzentration mit einer reduzierten Dehnbarkeit der Hydrogele einher, da die PEG-Ketten mit steigender Netzwerkdichte in ihrer Beweglichkeit und Restrukturierbarkeit eingeschränkt wurden.

Ein analoges Verhalten hinsichtlich der Zugfestigkeit, Zähigkeit, Steifigkeit und Dehnbarkeit wurde für die g/s- und a/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele festgestellt, wenn der Anteil des kovalenten Netzwerks von 5 % auf 15 % (w/v) erhöht wurde. Lediglich für die a/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele wurde mit steigender PEGA-Konzentration keine signifikante Abnahme in der Dehnbarkeit beobachtet. Der Grund hierfür lag in der schwachen Strukturintegrität von 5 % 4-arm PEGA + 30 % a/s-PEC, wodurch die Hydrogelprobe bereits bei geringer Dehnung riss. Bei quantitativem Vergleich zwischen kovalent vernetzten 4-arm PEGA-Hydrogelen und PEC/C-Hybrid-Hydrogelen war insbesondere eine Reduktion des Elastizitätsmoduls der IPN-Hydrogele auffällig. Durch die elektrostatische Assemblierung der Triblockcopolyelektrolyte war der Platz zur Ausbildung des kovalenten Polymernetzwerks begrenzt und führte insgesamt zu einer geringeren Anzahl von chemischen Vernetzungen, weshalb ein niedrigeres Elastizitätsmodul für die Hybrid-Hydrogele gemessen wurde. Das zusätzliche elektrostatische Netzwerk sorgte insbesondere für eine signifikante Steigerung der Dehnbarkeit der g/s-Hybrid-Hydrogele aufgrund der reversiblen physikalischen

Verknüpfungen. Während des Zugversuchs konnten die nicht-kovalenten Bindungen reversibel gelöst und neu geknüpft werden. Dadurch wurde ein großer Teil der einwirkenden Zugspannung durch das physikalische Netzwerk absorbiert, wodurch die Belastung auf das kovalente Netzwerk reduziert wurde. Die damit verbundene Energiedissipation sowie Umstrukturierung der PEC-Domänen führte insgesamt zu einer größeren Dehnbarkeit der g/s-PEC/C-Hybrid-Hydrogele.

In Abwesenheit des kovalenten Polymernetzwerks waren die elektrostatischen Wechselwirkungen von rein physikalisch vernetzten PEC-Hydrogelen zu schwach, um die Strukturintegrität aufrechtzuerhalten. Der Mangel an mechanischer Stabilität machte daher eine Charakterisierung der PEC-Hydrogele unmöglich. Nur mit Unterstützung eines interpenetrierenden kovalenten Netzwerks wurde eine ausreichende Strukturstabilität erreicht. Die Inkorporation eines geringen kovalenten Netzwerkanteils von 5 % (w/v) führte bereits zu einer deutlichen Verbesserung der mechanischen Eigenschaften.

Insgesamt vereinten die PEC/C-Hybrid-Hydrogele die vorteilhaften Eigenschaften der beiden ihnen zugrundeliegenden Polymernetzwerke, nämlich mechanische Stabilität und Dehnbarkeit. Im Vergleich zum kovalenten Netzwerk blieben trotz moderatem Rückgang in der Steifigkeit Eigenschaften wie Zugfestigkeit und Zähigkeit weitestgehend konstant. Das elektrostatische Netzwerk trug zusätzlich zu einer signifikanten Steigerung der Dehnbarkeit der IPN-Hydrogele bei.

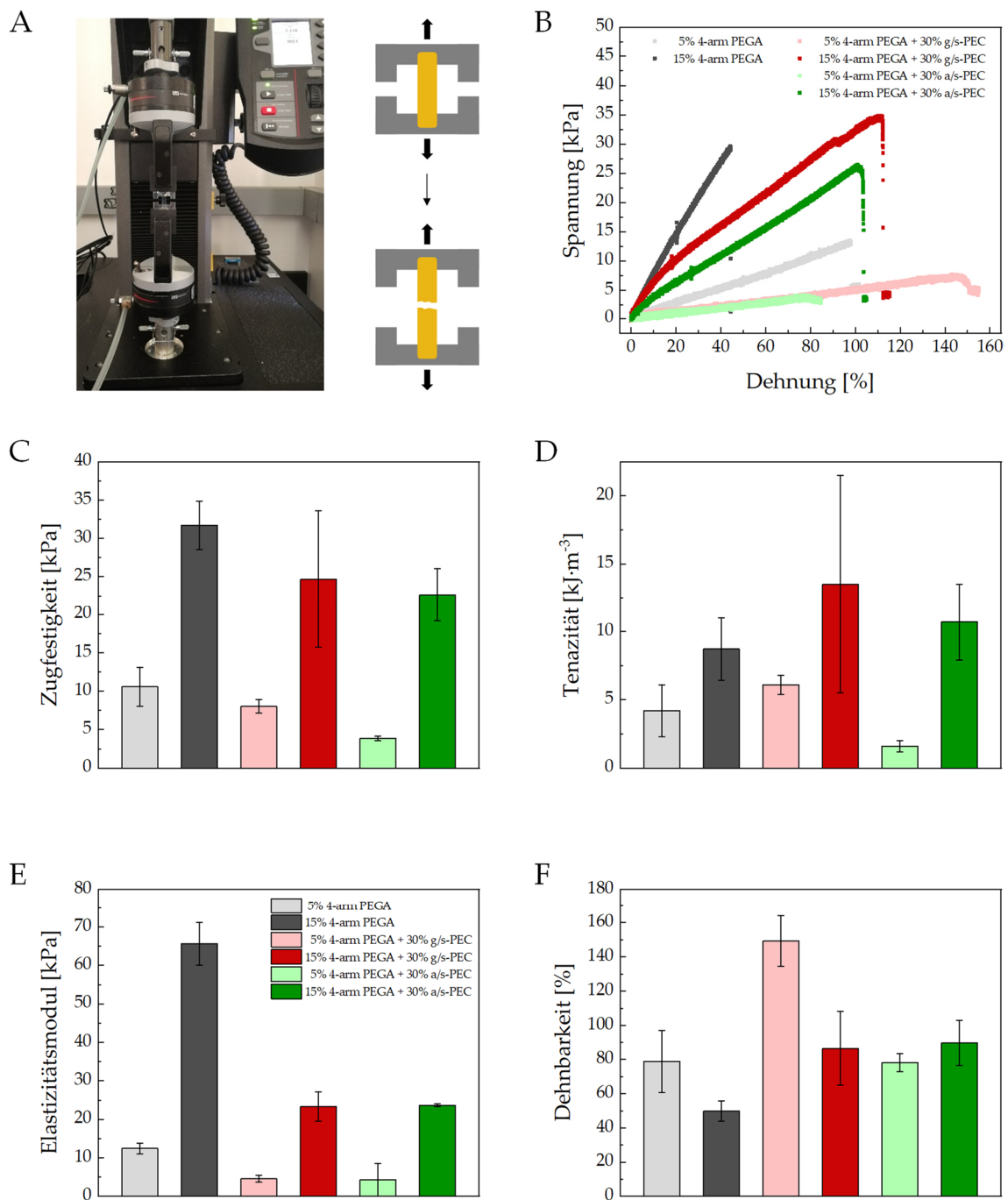


Abbildung 49: Zugversuche mit kovalent vernetzten 4-arm PEGA-Hydrogelen und PEC/C-Hybrid-Hydrogelen in Abhängigkeit von der kationischen Gruppe (Guanidinium, Ammonium) und der 4-arm PEGA-Konzentration (5 %, 15 %). (A) Schematische Darstellung des Zugversuchs. (B) Repräsentative Spannungs-Dehnungs-Diagramme und daraus abgeleitete (C) Zugfestigkeit, (D) Zähigkeit, (E) Elastizitätsmodul und (F) Dehnbarkeit der Hydrogele. 4-arm PEGA-Hydrogele sind in Grau, g/s-Hybrid-Hydrogele in Rot und a/s-Hybrid-Hydrogele in Grün dargestellt (in Kollaboration mit Defu Li).

3.1.3.2.6.2 Quelleigenschaften

Abschließend wurden die Hydrogele hinsichtlich ihrer Quelleigenschaften charakterisiert. Die Quellbarkeit von Hydrogelen hängt allgemein von einer Vielzahl an Faktoren ab, insbesondere von der Polymerkonzentration und dem Vernetzungsgrad.³⁰² Die Quelleigenschaften spielen eine wichtige Rolle im *Tissue Engineering* und im gezielten Wirkstofftransport, da mit der Volumenzunahme des Hydrogels Auswirkungen auf die Biokompatibilität, mechanischen Eigenschaften, Wirkstofffreisetzung sowie das Diffusionsvermögen von Molekülen im Hydrogel einhergehen.³⁰³⁻³⁰⁵ Im Rahmen einer Quellbarkeitsstudie wurde in Kollaboration mit Defu Li die Abhängigkeit der Quelleigenschaften der IPN-Hydrogele von der 4-arm PEGA-Konzentration und der Wahl der kationischen Gruppe untersucht (*Abbildung 50*). Grundlage bildeten 5%ige und 15%ige 4-arm PEGA-Hydrogele mit bzw. ohne 30%igem g/s-PEC bzw. a/s-PEC-Anteil.

Elektrostatisch assemblierte g/s-PEC und a/s-PEC-Hydrogele ohne kovalentem Netzwerkanteil besaßen eine nicht messbare bzw. unendliche Quellbarkeit, da sie über keinerlei Strukturintegrität verfügten und nahezu vollständig in Wasser aufgelöst werden konnten. Durch Inklusion eines kovalenten Polymernetzwerks erhielten die PEC/C-Hybrid-Hydrogele mechanische Stabilität und ihr Quellverhalten wurde messbar. Im Vergleich zum kovalenten 4-arm PEGA-Netzwerk führte das zusätzliche elektrostatische Polymernetzwerk für beide Polyelektrolyt-Kombinationen zu einer signifikanten Steigerung in der Quellbarkeit. Dabei wiesen die g/s-Hybrid-Hydrogele eine höhere Quellbarkeit auf als die entsprechenden a/s-Hybrid-Hydrogele. Dies war auf eine höhere Wechselwirkung in Form von Wasserstoffbrücken zwischen der Guanidinium-Gruppe und Wasser zurückzuführen. Innerhalb der ersten Stunden wurde für die Hybrid-Hydrogele ein schneller Gewichtsanstieg verzeichnet. Nach Erreichen des maximalen Quellverhältnisses wurde nach etwa neun Stunden eine leichte Abnahme beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass aus der starken Quellung der Hydrogele kleinere Netzwerkdefekte resultierten, wodurch Polymerketten freigesetzt wurden. Zwei mögliche Erklärungsansätze konnten für diese Beobachtung herangezogen werden. Da die PEG-Ketten der Triblockcopolyelektrolyte und der 4-arm PEGA-Monomere um denselben Platz konkurrierten, war es wahrscheinlich, dass nur eine geringere photochemische Vernetzung in den Hybrid-Hydrogelen erreicht wurde und die unvernetzten Monomere während des Quellvorgangs freigesetzt

wurden. Darüber hinaus wurden durch die starke Volumenzunahme die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen geschwächt und dadurch das nicht-kovalente Netzwerk destabilisiert. Im Vergleich dazu wiesen die kovalent vernetzten 4-arm PEGA-Hydrogele über den gesamten Messzeitraum ein konstantes Quellverhältnis auf.

Insgesamt zeichneten sich die PEC/C-Hybrid-Hydrogele im Vergleich zu ihren zugrundeliegenden Einzelnetzwerken durch verbesserte Quelleigenschaften aus. Aus Sicht des kovalenten Netzwerks wurde durch Inklusion des elektrostatischen Netzwerks die Quellbarkeit um Faktor 1,5 bis 2,7 gesteigert. Umgekehrt erhielten elektrostatisch vernetzte Hydrogele durch den kovalenten Netzwerkanteil eine definierte Quellbarkeit.

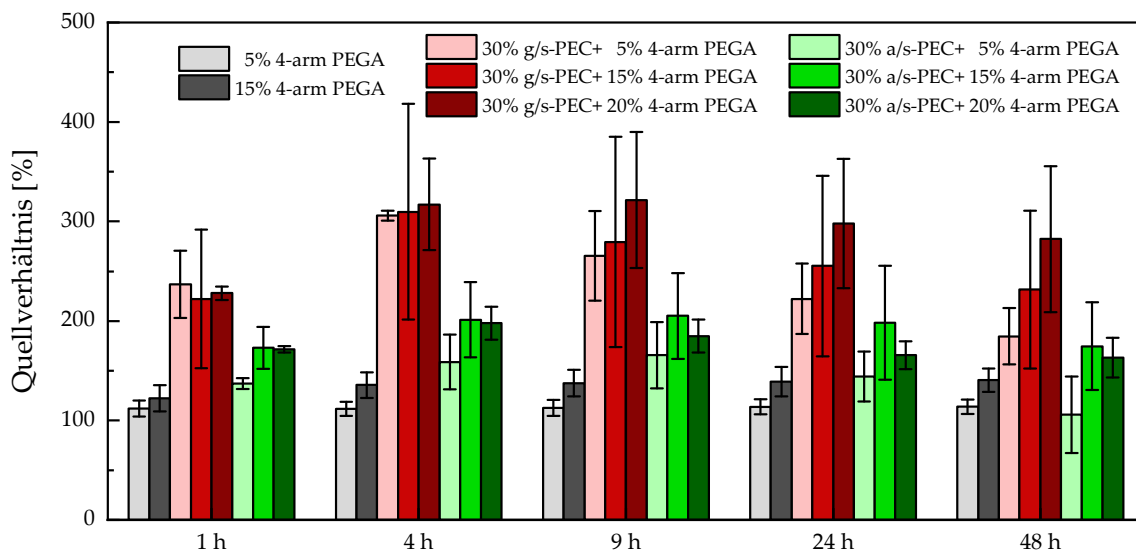


Abbildung 50: Bestimmung des Quellverhältnisses (engl. *swelling ratio*) von kovalent vernetzten 4-arm PEGA-Hydrogelen und PEC/C-Hybrid-Hydrogelen in Abhängigkeit von der kationischen Gruppe (Guanidinium, Ammonium) und der 4-arm PEGA-Konzentration (5 %, 15 %). 4-arm PEGA-Hydrogele sind in Grau, g/s-Hybrid-Hydrogele in Rot und a/s-Hybrid-Hydrogele in Grün dargestellt (in Kollaboration mit Defu Li).

3.1.3.2.7 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel ein Hybrid-Hydrogel mit interpenetrierenden kovalenten und elektrostatischen Polymernetzwerken entwickelt, das die Vorteile der jeweiligen Einzelnetzwerke aufsummierte und die individuellen Nachteile minimierte. Die Herstellung der IPN-Hydrogele erfolgte durch eine sequentielle Synthese. Das nicht-kovalente Netzwerk wurde durch elektrostatische Assemblierung von funktionalisierten PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolyelektrolyten gebildet, bei denen Sulfonat als anionische und Ammonium und Guanidinium als kationische Gruppen fungierten. Das kovalente Netzwerk entstand dagegen durch Photopolymerisation von 4-arm PEGA. Das vorgestellte IPN-Modellsystem wurde in einer umfangreichen Materialstudie hinsichtlich seiner strukturellen, viskoelastischen und physiko-mechanischen Eigenschaften charakterisiert. Besonderes Interesse lag dabei auf dem Einfluss steigender Anteile des kovalenten bzw. nicht-kovalenten Polymernetzwerks sowie das Verhalten des IPN-Hydrogels im Vergleich zu den jeweils zugrundeliegenden Einzelnetzwerken. Für die Hybrid-Hydrogele wurde eine Kombination an vorteilhaften Eigenschaften nachgewiesen, die mit keinem der beiden Einzelnetzwerke zugänglich waren.

Die Inkorporation eines zusätzlichen kovalenten Polymernetzwerks hatte nur geringe Auswirkungen auf die strukturellen Eigenschaften von elektrostatisch assemblierten Hydrogelen, wie beispielsweise eine Verringerung der Abstände zwischen den PEC-Domänen. Gleichzeitig resultierten aus dem kovalenten Netzwerkanteil definierte Quelleigenschaften, höhere Schubmodule sowie eine höhere Resistenz der PEC-Hydrogele gegenüber externen Umwelteinflüssen wie Salzen, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen der Polyelektrolyte herabsetzten. Dies eröffnet der Materialklasse mögliche Anwendungen, welche eine Kombination aus guten mechanischen und adaptiven Eigenschaften erfordern. PEC/C-Hybrid-Hydrogele könnten beispielsweise für den gezielten Wirkstofftransport eingesetzt werden, bei dem das physikalische Netzwerk die Aufnahme und Freisetzung des Wirkstoffs sicherstellt, während das kovalente Netzwerk für eine ausreichend hohe mechanische Stabilität sorgt.

Darüber hinaus profitierten ebenso kovalent vernetzte Hydrogele von einem interpenetrierenden elektrostatischen Polymernetzwerk, woraus eine höhere Quellbarkeit, Dehnbarkeit, kontrollierbare Schubmodule und eine moderate Adaptivität gegenüber Salzen resultierten. Insbesondere sorgte das zusätzliche physikalische Netzwerk für eine erhebliche Steigerung der Viskosität und Schubmodule für chemisch unvernetzte, niedrigviskose Hydrogelvorläuferlösungen. Die Fähigkeit von Triblockcopolyelektrolyten, die Viskosität entscheidend zu modulieren, macht sie daher zu vielversprechenden Additiven für Biotinten in extrusionsbasierten 3D-Druckverfahren.

Die durchgeführte Materialstudie lieferte ein Grundverständnis über die Zusammenhänge sowie Einflüsse von kovalentem und nicht-kovalentem Polymernetzwerk auf strukturelle, viskoelastische sowie physiko-mechanische Eigenschaften der IPN-Hydrogele und bildet damit die Basis für zukünftige biomedizinische Anwendungen.

3.2 Biotinten für subtraktive Fertigungsverfahren

Während es sich bei den bisher vorgestellten Druckverfahren (DLW und 3BP) um additive Fertigungsverfahren handelte, bei denen Licht zur gezielten Photopolymerisation eingesetzt wurde, liegt der Fokus im folgenden Kapitel auf einem subtraktiven Fertigungsverfahren. Je nach Wellenlänge kann Licht als Werkzeug zum Knüpfen oder Spalten chemischer Bindungen fungieren.³⁰⁶ Bei subtraktiven Fertigungsverfahren führt die Einstrahlung von Licht einer bestimmten Wellenlänge dazu, dass photolabile Bindungen gespalten werden, wodurch licht-sensitive Materialien aufgelöst werden können.³⁰⁷ Eine spatiotemporale Kontrolle erfolgt dabei beispielsweise über eine Photomaske, die an bestimmten Stellen lichtdurchlässig bzw. lichtundurchlässig ist.^{138,308} Dadurch kann eine lokal gezielte Photodegradation des Materials induziert werden, deren Eindringtiefe von der Wellenlänge und Dauer des eingestrahnten Lichts abhängig ist.³⁰⁹ Subtraktive Fertigungsverfahren sind insbesondere für quellbare Polymernetzwerke von großem Interesse, da Strukturierungen erst nach dem vollständigen Quellen der Polymere stattfinden und sie damit keiner quellungsinduzierten Verzerrung von Größenverhältnissen unterliegen.^{310,311} In diesem Kapitel wird ein auf Gelatine- und Polyethylenglykol-basiertes Hybrid-Hydrogelsystem vorgestellt, welches Photodegradierbarkeit und Biokompatibilität vereint, und seine Vorteile gegenüber gängigen lichtsensitiven Hydrogelen diskutiert.

3.2.1 Photodegradierbare Hydrogele

Klassische Methoden zur Generierung photodegradierbarer Hydrogele beruhen auf der chemischen Funktionalisierung der Hydrogelvorläufermoleküle mit photolabilen Gruppen. Die prominentesten Vertreter sind dabei *o*-Nitrobenzyl-derivate³¹²⁻³¹⁴ neben weiteren photospaltbaren Verbindungen wie z. B. Cumarine³¹⁵, Disulfide³⁰⁸ oder Polypyridylkomplexe von Ruthenium(II)³¹⁶. In der Literatur konnte bereits die erfolgreiche Inkorporation der *o*-Nitrobenzyl-Gruppe (ONB) in Gelatine-basierte Hydrogele sowohl durch direkte Funktionalisierung der Gelatine als auch durch Verwendung eines ONB-tragenden Crosslinkers gezeigt werden.^{317,318} Dennoch ist die Auswahl an photolabilen Gruppen für Biopolymer-basierte Hydrogelsysteme stark limitiert. Die eingesetzten Synthesemethoden müssen mit dem verwendeten Biopolymer kompatibel sein und erfordern zudem einen hohen präparativen Aufwand

bei gleichzeitig moderaten Ausbeuten, die eine breite Anwendung im *Tissue Engineering* bisher erschweren. Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse an photodegradierbaren Hydrogelen, die auf einfache Weise aus kommerziell erhältlichen Monomeren hergestellt werden können.

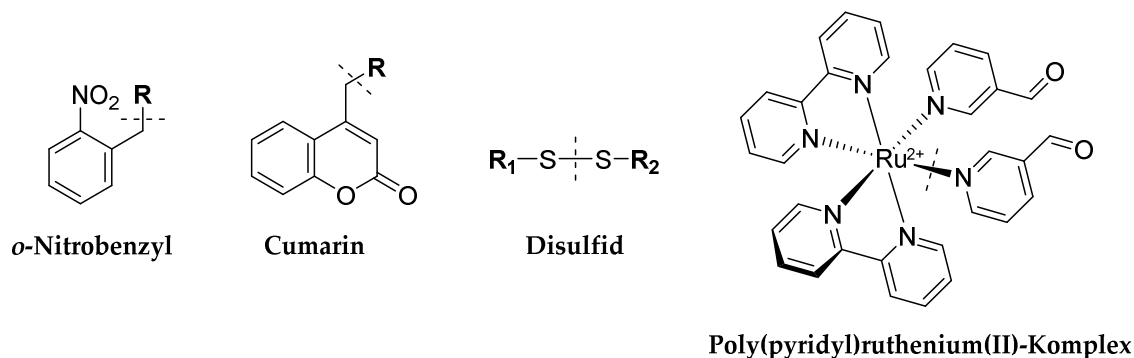


Abbildung 51: Übersicht über gängige photospaltbare Gruppen zur Herstellung lichtabbaubarer Hydrogele.

Kürzlich wurde von der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Pavel Levkin ein Polyethylenglycolmethacrylat (PEGMA)-basiertes Hydrogelsystem entwickelt, das eine hervorragende Photoabbaubarkeit aufweist.³¹⁹ Die schnelle Auflösung des Hydrogels innerhalb weniger Minuten ist auf ein Zusammenspiel der inhärenten Photodegradierbarkeit von Methacrylat-funktionalisierten Polymeren, der UV-Transparenz von Wasser und der starken Quelleigenschaften des Hydrogelnetzwerks zurückzuführen. Die Besonderheit dieses Hydrogelsystems besteht darin, dass die funktionellen Gruppen eine duale Funktion erfüllen, da sie – wenn auch über unterschiedliche Reaktionsmechanismen – sowohl die Photopolymerisation (Vernetzung der Methacrylat-Gruppen) als auch die Photodegradation (Seitenkettenspaltung der Ester-Gruppen) des Hydrogels gewährleisten. Welcher der beiden Prozesse stattfindet, hängt dabei von der eingestrahlten Wellenlänge ab. Im langwelligen UV-Bereich (360 nm) wird eine Photopolymerisation der PEGMA-Monomere induziert, während durch die anschließende Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (270 nm) Seitenkettenspaltungen hervorgerufen werden, wodurch das Polymernetzwerk fragmentiert und das Hydrogel aufgelöst wird. Eine erneute Vernetzung wird verhindert bzw. minimiert, da die im Zuge des Photoabbaus entstehenden Polymerradikale im gequollenen Hydrogel räumlich weit voneinander getrennt vorliegen. Aus diesem Grund werden

Kettenspaltungsreaktionen gegenüber Wiedervernetzungsreaktionen durch Rekombination zweier Polymerradikale begünstigt. Als Faustregel gilt dabei: je besser die Quellbarkeit des Hydrogels, desto besser ist seine Photodegradierbarkeit.

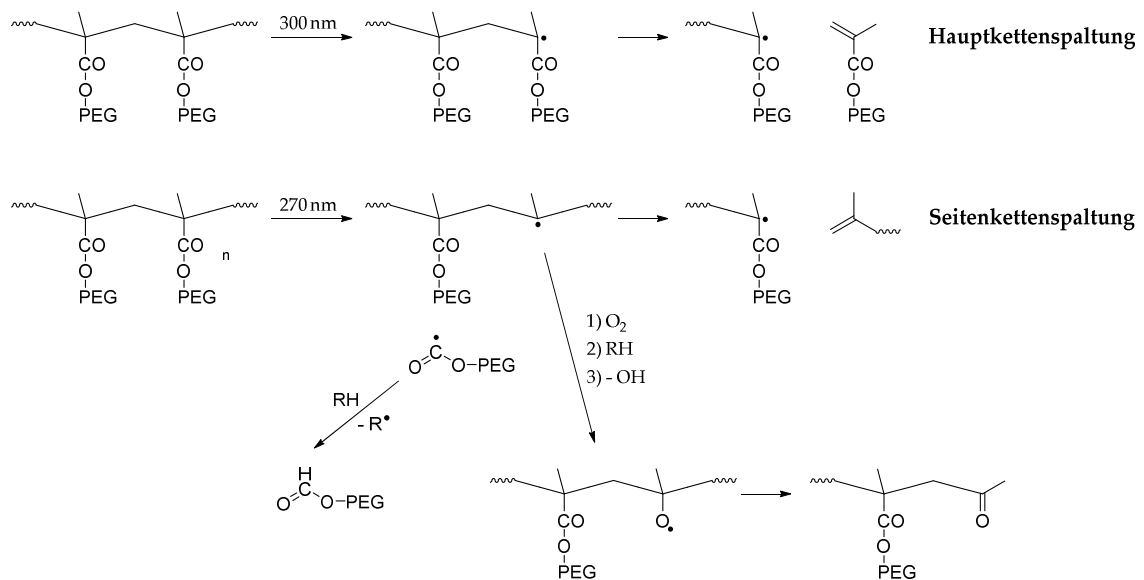


Abbildung 52: Mechanismus der Photodegradation von Methacrylat-basierten Hydrogelen (Li *et al.*³¹⁹).

Dieser Ansatz ist besonders einfach, weil er keine Inkorporation der eingangs erwähnten photolabilen Gruppen erfordert. Zudem sind Methacrylat-funktionalisierte Vorläufermoleküle synthetisch sehr einfach zugänglich oder können kommerziell erworben werden. Für die biologische Anwendung im *Tissue Engineering* sind die PEGMA-Hydrogele jedoch aufgrund ihres Mangels an bioaktiven Domänen ungeeignet, wodurch eine Interaktion der Zellen mit dem Polymernetzwerk verhindert wird.

Andere Methacrylat-basierte Hydrogele, wie z. B. GelMA, haben sich aufgrund ihrer exzellenten Biokompatibilität sowie Bioabbaubarkeit als zellbeladene 3D-Stützstrukturen im *Tissue Engineering* etabliert.^{86,139,320} Das natürliche Vorkommen bioaktiver Domänen entlang der Aminosäuresequenz unterscheidet die Gelatine von synthetischen Polymeren. So vermitteln RGD-Domänen Zell-Matrix-Interaktionen, während MMP-Domänen die enzymatische Degradierbarkeit sicherstellen, die für die Ausrichtung der Zellen im Hydrogel von zentraler Bedeutung ist.^{140,326,327} Subtraktive Fertigungsverfahren, die beispielsweise bei den genannten PEGMA-Hydrogelen erfolgreich angewendet werden konnten, sind jedoch auf GelMA-Hydrogele nicht übertragbar, da

die Photodegradierbarkeit von GelMA sehr stark eingeschränkt ist. Ein Grund hierfür liegt in der chemischen Verknüpfung der Methacrylat-Gruppe mit dem Gelatine-rückgrat. Die Anknüpfung der photoreaktiven Gruppe erfolgt fast ausschließlich an den freien Aminogruppen der Gelatine über eine Amidbindung (Methacrylamid), deren C-N-Bindung aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters eine höhere photolytische Stabilität aufweist. Im Unterschied dazu ist die Methacrylat-Gruppe von PEGMA über eine Esterbindung verknüpft, die eine photoinduzierte Seitenketten-spaltung stärker begünstigt.³²¹ Ein weiterer Grund für die schlechte Photodegradierbarkeit von GelMA ist auf die Anwesenheit von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Histidin und Phenylalanin in der Gelatine zurückzuführen.³²² Diese absorbieren UV-Licht bei 270 nm und fangen damit einen Großteil der eingestrahlten UV-Strahlung ab. Für eine 1,25%ige (w/v) GelMA-Lösung wurde bereits eine Absorption von 0,76 bei 270 nm nachgewiesen (*Abbildung 56 A*). Des Weiteren konnte in der Literatur gezeigt werden, dass ein Zusatz von GelMA in PEGDMA-Hydrogelen zu einem reduzierten Quellverhalten führt, was sich nachteilig auf das Degradationsverhalten auswirkt.³²³ Trotz identischer photoreaktiven Gruppen bedingen die genannten Gründe eine stark unterschiedliche Photodegradierbarkeit von GelMA- und PEGMA/PEGDMA-Hydrogelen. Im nachfolgenden Kapitel sollte daher ein Hydrogelsystem entwickelt werden, welches die individuellen Vorteile der genannten Biomaterialien aufsummierte.

3.2.1.1 Synthese und Screening einer kombinatorischen Hybrid-Hydrogel-Bibliothek

Das Ziel bestand darin, PEGMA-Hydrogele mit einer niedrigen GelMA-Menge zu komplementieren, um die Verkapselung und Kultivierung von Zellen im Hydrogel zu ermöglichen, ohne jedoch dessen Photodegradierbarkeit zu stark zu beeinträchtigen. In Kollaboration mit Dr. Alisa Rosenfeld³²⁴ und Mariia Kuzina (Institut für Biologische und Chemische Systeme - Funktionelle molekulare Systeme (IBC-FMS), KIT, AG Prof. Dr. Pavel Levkin) und Prof. Dr. Markus Reischl (Institut für Automation und angewandte Informatik, KIT) wurde ein Hybrid-Hydrogel entwickelt, dessen Bausteine auf methacryliertem Polyethylenglykol und GelMA basierten (*Abbildung 53 A*).³²⁵ Es wurde kommerziell erhältliches einfach funktionalisiertes (PEGMA, $M_n = 475 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sowie bifunktionalisiertes Polyethylenglykol (PEGDMA, $M_n = 750 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) mit kurzer

Kettenlänge gewählt, um eine ausreichend hohe Dichte an Estergruppen im Hydrogel für eine schnelle Degradierbarkeit zu gewährleisten. GelMA wurde aus Gelatine Typ A mit drei unterschiedlichen Methacrylierungsgraden (*Low, Medium, High*) synthetisiert.

Eine kombinatorische Bibliothek aus Hybrid-Hydrogelen bestehend aus PEGMA, PEGDMA und GelMA wurde von Dr. Alisa Rosenfeld synthetisiert und bildete die Grundlage für eine umfangreiche Degradationsstudie, um geeignete Mischungen der Photomomere zu identifizieren, die eine schnelle Photoabbaubarkeit aufwiesen. Als maximaler Zeitrahmen für die vollständige Auflösung der Hydrogele wurde dabei eine Dauer von zehn Minuten festgelegt, um sowohl ein einfaches Handling zu gewährleisten als auch eingeschlossene Zellen im Hydrogel vor Überhitzung zu schützen. Ziel der kombinatorischen Bibliothek war es, den Einfluss verschiedener Faktoren – insbesondere die Menge des Crosslinkers PEGDMA, die Menge der Monomere PEGMA und GelMA sowie der Methacrylierungsgrad von GelMA – auf die Photoabbaubarkeit quantitativ zu untersuchen. Um fundierte Aussagen über deren Bedeutung treffen zu können, wurden 32 verschiedene Hydrogelformulierungen hergestellt (*Abbildung 53 C*). Die Vernetzung zu entsprechenden Hydrogelen wurde durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (360 nm, 6 mW·cm⁻², 2 min) in Anwesenheit des Photoinitiators LAP induziert. Die Verwendung von Silikonformen erlaubte dabei die Herstellung von Hydrogelblöcken definierter Größenabmessungen. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogelblöcke für 24 Stunden in Wasser gequollen, wobei die Volumenzunahme der Hydrogele stark von der jeweiligen Zusammensetzung abhängig war (*Abbildung 53 B*). Jede der 32 Hydrogelkompositionen wies daher einen individuellen Quellfaktor auf, der unter anderem mit der Photoabbaubarkeit der Hydrogele korrelierte. Die Anwesenheit von GelMA führte in den entsprechenden Hydrogelmischungen zu einer Reduktion des Quellvermögens.

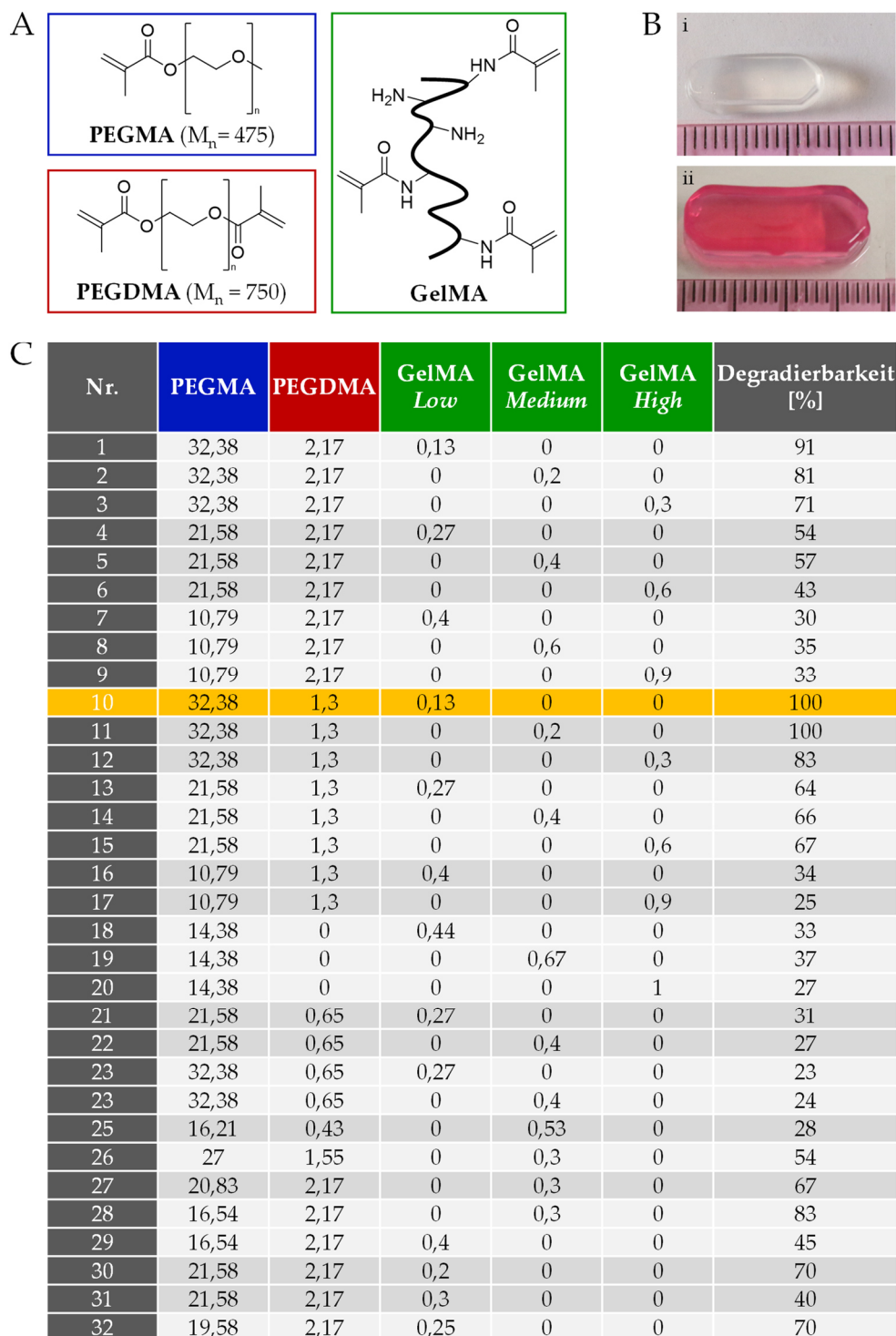


Abbildung 53: (A) Chemische Strukturformeln der verwendeten Monomere und Crosslinker für die Herstellung von photodegradierbaren Hybrid-Hydrogelen. (B) Demonstration der quellungsinduzierten Volumenzunahme der Hydrogele durch exemplarische Aufnahmen eines Hydrogels (i) vor dem Quellen sowie (ii) nach dem Quellen in DMEM. (C) Kombinatorische Bibliothek aus 32 Hydrogelmischungen, die nach erfolgter Photopolymerisation auf ihre Photoabbaubarkeit untersucht wurden. Die jeweiligen Einträge der Komponenten sind in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ angegeben (in Kollaboration mit Dr. Alisa Rosenfeld).

Für die Degradationsstudie wurden die Hydrogelblöcke mit kurzwelligem UV-Licht (270 nm, 22 mW·cm⁻², 10 min) bestrahlt. Die Masse der Hydrogele wurde jeweils vor und nach der Degradation gemessen, nachdem die flüssigen Degradationsprodukte entfernt wurden. Die Photodegradierbarkeit jedes Hydrogels wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Photodegradierbarkeit [\%]} = \frac{w(\text{vor Degrad.}) - w(\text{nach Degrad.})}{w(\text{vor Degrad.})} \times 100 \% \quad (5)$$

Die ermittelte Photoabbaubarkeit reichte dabei von vollständig degradierbar (100 %) bis teilweise degradierbar (23 %). Für jede der Hydrogelmischungen ist die entsprechende Degradierbarkeit in *Abbildung 53 C* angegeben.

Zunächst soll der Einfluss des Vernetzers PEGDMA auf die Photodegradierbarkeit der Hybrid-Hydrogele diskutiert werden. Beim Vergleich der Formulierungen 1 - 3 mit 10 - 12, bei denen der PEGDMA-Anteil um Faktor 0,6 reduziert wurde, war eine deutliche Zunahme der Degradierbarkeit aufgrund eines verbesserten Quellvermögens für alle drei GelMA-Varianten zu beobachten. Für GelMA *Low* und *Medium* enthaltende Hydrogele stieg die Abbaubarkeit von 91 % (1) bzw. 81 % (2) auf je 100 % (10 - 11) an. Derselbe Trend zeigte sich ebenso bei niedrigerem PEGMA-Anteil. Auch hier führte eine Reduktion des Crosslinkers PEGDMA zu einer Erhöhung der Degradierbarkeit von durchschnittlich 51 % (4 - 6) zu durchschnittlich 66 % (13 - 15). Wurde der Crosslinker-Anteil dagegen bei gleichbleibender PEGMA-Konzentration weiter halbiert, wurde der gegenteilige Effekt beobachtet. Die Abbaubarkeit von durchschnittlich 65 % (13 - 14) sank deutlich auf durchschnittlich 29 % (21 - 22).

Neben dem Vernetzer hatte insbesondere der GelMA-Anteil einen erheblichen Einfluss auf die Photodegradierbarkeit der Hydrogele (4, 30, 31). Bei einem Anteil von 1,92 % (w/v) GelMA *Low* sowie gleichbleibenden Mengen von PEGMA und PEGDMA wurde ein 70%iger Abbau (30) festgestellt. Wurde die Konzentration von GelMA *Low* um Faktor 1,35 bzw. 1,5 erhöht, reduzierte sich die Abbaubarkeit auf 54 % (4) bzw. 40 % (31).

Aus dem Screening der Hydrogel-Bibliothek ergab sich lediglich für zwei Hydrogelmischungen (10 - 11) eine vollständige Abbaubarkeit innerhalb der festgelegten Zeitspanne. Für GelPEG-10 – bestehend aus 16,5 % (w/v) PEGMA, 1,63 % (w/v) PEGDMA und 1,25 % (w/v) GelMA – wurde eine hervorragende Quellbarkeit auf das 2,4-fache Volumen nachgewiesen. Die relativ niedrige GelMA-Konzentration sorgte dafür, dass das Hydrogel innerhalb von zehn Minuten aufgelöst werden konnte, zugleich jedoch biologisch aktive Domänen (RGD, MMP) in das Polymernetzwerk inkorporiert wurden. Für die weiteren biologischen Experimente wurde die Hydrogelkomposition GelPEG-10 ausgewählt und bildete die Grundlage für eine umfangreiche Biokompatibilitätsstudie.

3.2.1.2 Biokompatibilität

Die hohe Dichte an Methacrylat-Gruppen in der flüssigen Biotinte stellte einen kritischen Faktor für die Zellviabilität dar, da die photoreaktiven Gruppen vor ihrer Vernetzung potenzielle Nebenreaktionen mit Komponenten der Zelloberfläche eingehen konnten. In einem ersten Schritt wurde daher die Zeitspanne bestimmt, in dem die Zellen nach Suspension in der Hydrogelvorläuferlösung unbeschadet verbringen konnten. Mittels eines MTT-Proliferationsassays mit HeLa-Zellen wurde die Toxizität der Hydrogelvorläufer PEGMA, PEGDMA und GelMA für drei verschiedene Expositionszeiten (10 min, 1 h, 24 h) untersucht. Die jeweiligen Zellviabilitäten wurden dabei sowohl für die gleiche Polymerkonzentration (5 % (w/v)) als auch für die jeweils charakteristischen Konzentrationen der GelPEG-10-Formulierung verglichen.

Bei gleicher Polymerkonzentration ließ sich eine zunehmende Toxizität von GelMA < PEGMA < PEGDMA beobachten (*Abbildung 54 A*). Bereits eine zehnmünütige Expositionszeit von PEGDMA verursachte eine Reduktion der Zellviabilität auf 26 %. Für PEGMA wurde dagegen bei kurzer Inkubationszeit eine höhere Zellviabilität von 74 % nachgewiesen, die erst nach einer Stunde stark abfiel. Die erheblich größere Toxizität von PEGDMA im Vergleich zu PEGMA war auf die erhöhte Methacrylat-Gruppendichte des Crosslinkers zurückzuführen, wodurch statistisch mehr zellschädigende Nebenreaktionen auftraten und das Proliferationsvermögen reduziert wurde. Lediglich für GelMA wurde der LD₅₀-Wert erst nach mehreren Stunden unterschritten.

Wurden dagegen die Vorläufer in der jeweiligen GelPEG-10-spezifischen Konzentration getestet, wurde eine ansteigende Toxizität in der Reihenfolge GelMA < PEGDMA < PEGMA festgestellt (Abbildung 54 B). Aufgrund des relativ geringen PEGDMA-Anteils (1,63 % (w/v)) kam dessen erhöhte Toxizität kaum zum Tragen. Stattdessen spielte der 10-fache (w/v) PEGMA-Anteil (16,5 % (w/v)) eine wesentlich größere Rolle. So führte eine zehnmütige Expositionszeit zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 85 % für PEGDMA und auf lediglich 6 % für PEGMA. Die hohe PEGMA-Konzentration in der Biotinte erforderte daher eine unmittelbare Photopolymerisation von GelPEG-10, nachdem die Zellen in der Hydrogelmischung suspendiert wurden, um eine hohe Zellviabilität sicherzustellen. Nach erfolgter Aushärtung zum Hydrogel war die Toxizität der Vorläufermoleküle weitgehend vernachlässigbar, da Methacrylat-Gruppen in der Regel vollständig abreagieren und damit keine Nebenreaktionen mehr zuließen.

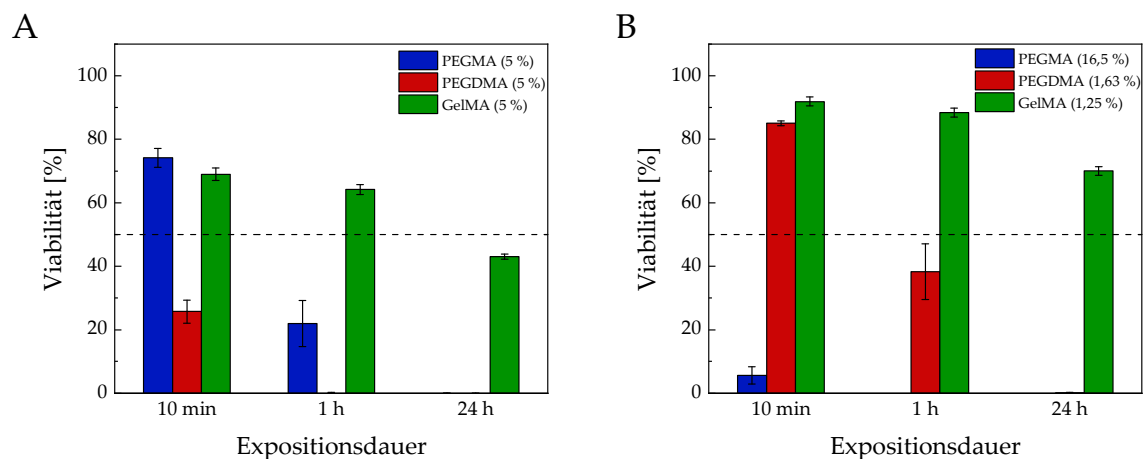


Abbildung 54: Bestimmung der Zytotoxizität der unvernetzten Hydrogelvorläufer PEGMA, PEGDMA und GelMA in (A) 5%iger (w/v) Polymerkonzentration und in der (B) GelPEG-10-spezifischen Konzentration durch einen MTT-Test mit HeLa-Zellen für verschiedene Expositionszeiten (10 min, 1 h, 24 h).

Im nächsten Schritt wurde das biologische Potenzial des Hybrid-Hydrogels für die Zellverkapselung in einem 3D-Zellkulturexperiment bewertet. Dazu wurden humane Fibroblasten (NHDF) im Hydrogelnetzwerk eingeschlossen und die Viabilität und Zellausrichtung anhand von Lebend-/Tot-Färbungen über einen Zeitraum von 14 Tagen studiert (*Abbildung 55 A*). Entsprechende PEGMA/PEGDMA-Hydrogele ohne GelMA-Zusatz (PEG-10) fungierten als Kontrolle. Das Ziel bestand darin, herauszufinden, ob der geringe GelMA-Anteil von 1,25 % (w/v) im GelPEG-10 ausreichend war, um die Biokompatibilität des photodegradierbaren Hydrogels im Vergleich zu ausschließlich PEG-basierten Hydrogelen so stark zu verbessern, dass es für die Zellverkapselung geeignet war. Die NHDF in den GelMA-freien Hydrogelen wiesen erwartungsgemäß eine niedrige Zellviabilität aufgrund fehlender RGD- und MMP-Domänen auf, die für die Adhäsion und Ausrichtung der Zellen eine entscheidende Rolle spielten. Im Hybrid-Hydrogel konnte sowohl eine hohe Viabilität über einen Zeitraum von 14 Tagen als auch eine charakteristische morphologische Ausrichtung der NHDF nachgewiesen werden (*Abbildung 55 B i*). Darüber hinaus demonstrierten eingeschlossene Krebszellen (HepG2) im GelPEG-10-Hydrogel eine homogene Zellverteilung aufgrund der bioaktiven Domänen, die durch das GelMA bereitgestellt wurden. Im Gegensatz dazu wurde im PEG-10-Hydrogel eine starke Zellakkumulation beobachtet (*Abbildung 55 B ii,iii*). Zusätzlich wurde das Proliferationsverhalten der HepG2-Zellen im Hydrogel über einen Zeitraum von sieben Tagen mittels PrestoBlue-Assay verfolgt (*Abbildung 55 C*). Für das GelPEG-10-Hydrogel ließ sich für den gemessenen Zeitraum keine signifikante Veränderung der Zellzahl feststellen. Die Zellen mussten sich zunächst an die neuen Umweltbedingungen anpassen, weswegen eine moderate Abnahme des Fluoreszenzsignals in den ersten Kultivierungstagen beobachtet wurde. An Tag 7 zeigte sich allerdings erstmals eine leichte Zunahme der metabolischen Aktivität. Für das PEG-10-Hydrogel wurde dagegen ein kontinuierlicher Rückgang der metabolischen Aktivität nachgewiesen. Dabei wurde eine 90%ige Abnahme des Fluoreszenzsignals beim Vergleich zwischen Tag 1 und Tag 7 gemessen.

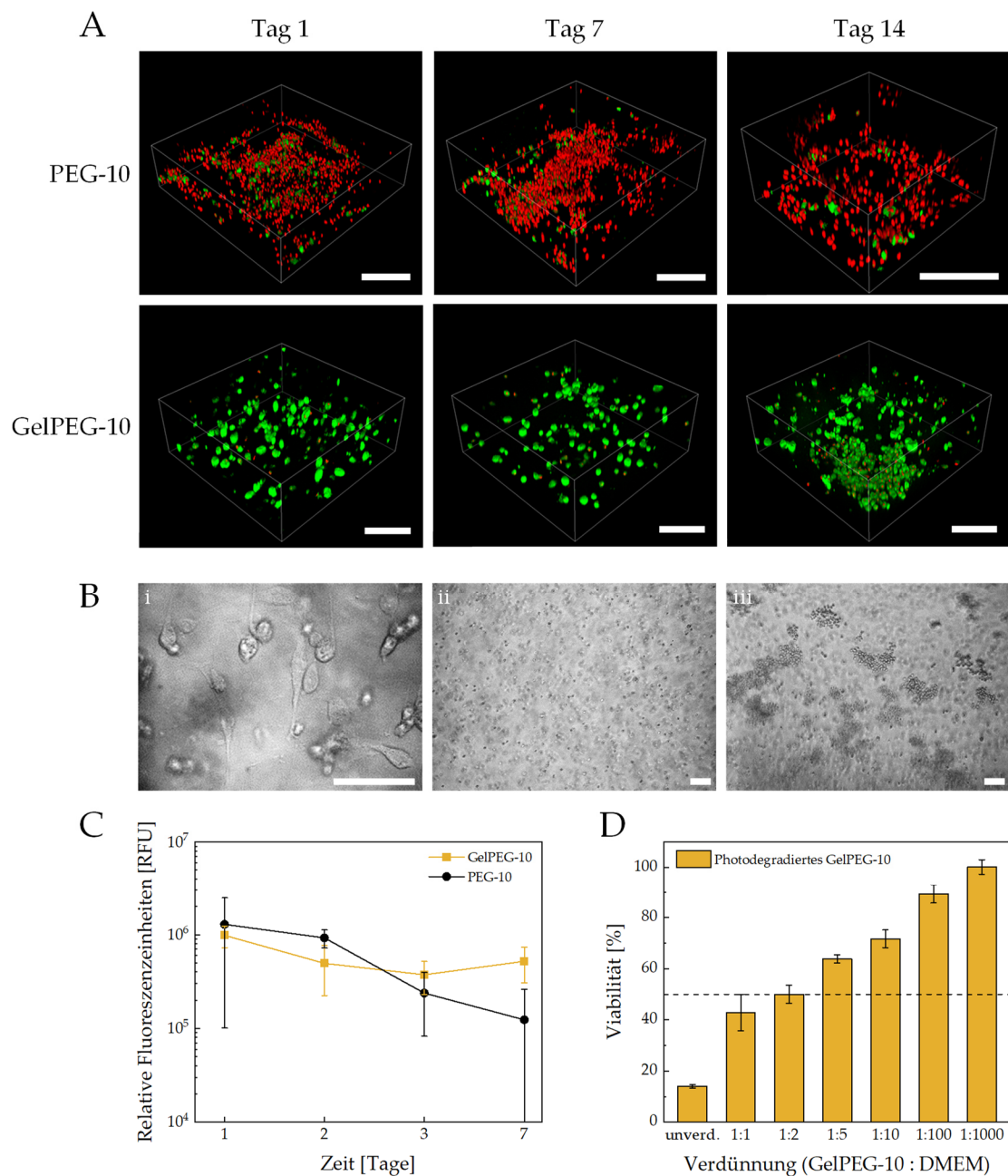


Abbildung 55: (A) Lebend-/Tot-Färbung von NHDF in PEG-10- und GelPEG-10-Hydrogelen mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 495$ -584 nm) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{ex} = 532$ nm, $\lambda_{em} = 610$ -700 nm) an den Tagen 1, 7 und 14 sowie anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B, Maßstab: 200 μ m). (B) (i) Ausrichtung einzelner NHDF an Tag 1 nach Einschluss im GelPEG-10-Hydrogel. Vergleich von eingebetteten HepG2-Zellen in (ii) GelPEG-10- und (iii) PEG-10-Hydrogelen (Leica DM IL LED, Maßstab: 100 μ m). (C) Vergleich des Proliferationsverhaltens von eingeschlossenen HepG2-Zellen in GelPEG-10- und PEG-10-Hydrogelen über einen Zeitraum von 7 Tagen mittels PrestoBlue-Assay. (D) Bestimmung der Toxizität der Photoabbauprodukte von GelPEG-10 durch einen MTT-Assay mit HeLa-Zellen bei 72-stündiger Exposition. Die Konzentration der unverdünnten Abbauprodukte betrug 53 mg·mL⁻¹.

Neben den Hydrogelvorläufern wurde ebenso die Toxizität der Photoabbauprodukte in einem MTT-Assay bestimmt (*Abbildung 55 D*). Dazu wurden GelPEG-10-Hydrogele hergestellt, die nach vollständigem Quellen durch Bestrahlung mit UV-C-Licht (270 nm, 22 mW·cm⁻², 10 min) aufgelöst wurden. Für die resultierende Degradationslösung wurde dabei eine Konzentration von 53 mg·mL⁻¹ ermittelt. Anschließend wurden HeLa-Zellen mit der Abbaulösung sowie verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1 - 1:1000) behandelt und für 72 Stunden inkubiert. Die unverdünnten Abbauprodukte besaßen einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation, der mit steigender Verdünnung jedoch abnahm. Aus den bestimmten Zellviabilitäten wurde ein LD₅₀-Wert von 18 mg·mL⁻¹ ermittelt. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Rahmenbedingungen im Hydrogel deutlich vom 2D-Zellkultursystem unterscheiden. Während des subtraktiven Fertigungsverfahrens fand eine Exposition nur dann statt, wenn die Degradationslösung in die umliegenden, nicht degradierten Bereiche des Hydrogels diffundierte. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die effektive Konzentration, die auf die Zellen einwirkte, sehr gering und auch nur von kurzer Dauer war. Da die Hydrogele unmittelbar nach erfolgter Photostrukturierung in einen Überschuss an Zellkulturmedium eingelegt wurden, wurden die Degradationsprodukte aus dem Hydrogel rasch entfernt. Wie in *Abbildung 57* und *Abbildung 59* zu sehen ist, wurde kein signifikanter Einfluss der Degradationsprodukte auf die Zellviabilität für die im Hydrogel verbleibenden Zellen nachgewiesen. GelPEG-10 stellte damit eine geeignete Hydrogelformulierung dar, die zwei entgegenwirkende Einflussfaktoren (Photodegradierbarkeit und Biokompatibilität) ausbalancierte und dadurch die vorteilhaften Eigenschaften beider Hydrogelsysteme aufsummierte.

3.2.1.3 Photodegradation

Neben GelMA enthielt auch das für die Zellkultur verwendete Medium (DMEM) UV-absorbierende Komponenten, welche die effektive UV-Intensität reduzierten und sich dadurch nachteilig auf die Photodegradierbarkeit auswirkten. Ihr jeweiliger Einfluss wurde in einer Degradationsstudie in Kollaboration mit Dr. Alisa Rosenfeld³²⁴ und Mariia Kuzina (IBCS-FMS, KIT, AG Prof. Dr. Pavel Levkin) untersucht und quantifiziert. Dazu wurden GelPEG-10-Hydrogele in fünf verschiedenen Lösungen gequollen:

1. PBS
2. DMEM (ohne FCS, ohne Phenolrot)
3. DMEM (ohne FCS, mit Phenolrot)
4. DMEM (mit FCS, ohne Phenolrot)
5. DMEM (mit FCS, mit Phenolrot)

Anschließend wurde der Degradationsverlauf über einen Bestrahlungszeitraum von zehn Minuten (270 nm, 22 mW·cm⁻²) zunächst visuell verfolgt (*Abbildung 56 B*). In PBS gequollenes GelPEG-10 konnte innerhalb von fünf Minuten vollständig aufgelöst werden. Die Anwesenheit von Phenolrot und weiteren Nährstoffzusätzen im Zellkulturmedium schien aufgrund der niedrigen Konzentration nur einen geringfügigen Einfluss auf die Photoabbaubarkeit zu haben. Bei Verwendung von FCS-freiem DMEM sowohl mit als auch ohne Phenolrot wurde jeweils eine vollständige Degradation innerhalb von siebeneinhalb Minuten beobachtet. Auffällig war jedoch eine damit einhergehende Bleichung (engl. *Bleaching*) des Farbstoffmoleküls. Einen wesentlich größeren Einflussfaktor auf die Photodegradierbarkeit stellte dagegen FCS dar, das einen Hauptbestandteil (10 % (v/v)) des Zellkulturmediums bildete. Die im FCS enthaltenen Proteine, insbesondere deren aromatische Aminosäuren, absorbierten einen Großteil des UV-Lichts, sodass selbst bei zehnminütiger Bestrahlung lediglich eine partielle Degradation erzielt werden konnte. Ein vollständiger Abbau konnte auch bei weiterer Bestrahlung nicht erreicht werden, da die Hydrogele zuvor austrockneten.

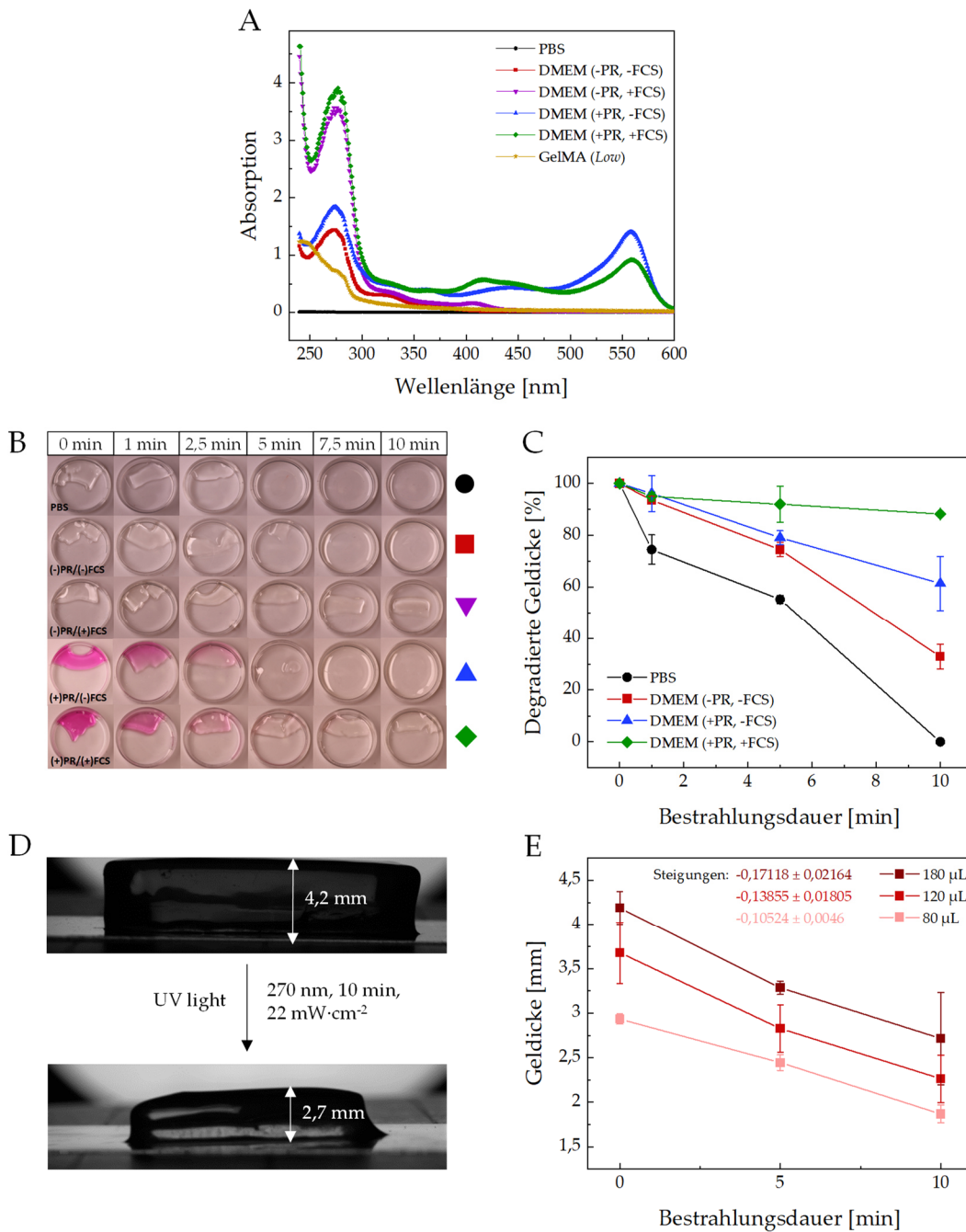


Abbildung 56: (A) Absorptionsspektren von PBS (schwarz) sowie verschiedenen Zellmedien mit bzw. ohne PR-/FCS-Zusätzen, die zum Quellen von GelPEG-10-Hydrogelen verwendet wurden (rot: -PR, -FCS; lila: -PR, +FCS; blau: +PR, -FCS; grün: +PR, +FCS). Zusätzlich wurde ein Spektrum einer 1,25%igen (w/v) GelMA-Lösung (orange) gemessen. (B) Aufnahmen, die den zeitlichen Verlauf der Photodegradation von GelPEG-10-Hydrogelen zeigen, die in den genannten Lösungen gequollen wurden. (C) Quantifizierung des Degradationsverlaufs von GelPEG-10-Hydrogelblöcken in verschiedenen Medien anhand der abnehmenden Geldicke. (D) Aufnahme eines GelPEG-10-Hydrogels, das in FCS- und PR-freiem DMEM gequollen wurde, vor und nach zehninütiger UV-C-Bestrahlung. (E) Abhängigkeit der benötigten Bestrahlungsdauer von der Geldicke der GelPEG-10-Hydrogele (in Kollaboration mit Dr. Alisa Rosenfeld und Mariia Kuzina).

Für alle Lösungen sowie für eine 1,25%ige (w/v) GelMA-Lösung wurden darüber hinaus Absorptionsspektren aufgenommen, die im Einklang mit den beobachteten Ergebnissen der Degradationsstudie standen (*Abbildung 56 A*). Während PBS keine Absorption bei 270 nm zeigte, wurden für FCS-freies DMEM sowie für die GelMA-Lösung moderate Absorptionen bei dieser Wellenlänge gemessen. Die FCS-haltigen Medien wiesen dagegen eine sehr hohe Absorption bei 270 nm auf, wodurch der Abbauprozess der Hydrogele stark verlangsamt wurde. Zusätzlich zur visuellen Beobachtung wurde der Degradationsverlauf bei anhaltender UV-C-Exposition quantitativ anhand der abnehmenden Geldicke der GelPEG-10-Hydrogele verfolgt (*Abbildung 56 C-E*). Neben dem Einfluss der unterschiedlichen Medien auf die Photoabbaubarkeit wurde auch die Abhängigkeit von einer zunehmenden Geldicke untersucht. Für alle drei Hydrogelproben, deren Quellung in FCS-freiem Zellkulturmedium erfolgte, wurden dabei ähnliche Abbauraten von durchschnittlich 0,1 bis 0,17 mm·min⁻¹ für den zehnminütigen Bestrahlungszeitraum gemessen (*Abbildung 56 E*).

Für die Anwendung des subtraktiven Verfahrens an zellenthaltenden Hydrogelen war es notwendig, das FCS aus dem Hydrogel zu entfernen, um die Bestrahlungszeit und damit den auf die Zellen wirkenden Hitzestress zu minimieren. Dazu wurden drei unterschiedliche Strategien erprobt und ihr jeweiliger Erfolg anhand einer Lebend-/Totfärbung von HeLa-Zellen vor und nach der Beseitigung des FCS gemessen (*Abbildung 57*).

Beim ersten Ansatz wurden die HeLa-Zellen nach Einschluss im GelPEG-10-Hydrogel zunächst in FCS-haltigem DMEM kultiviert. Am Folgetag wurde das Zellkulturmedium unmittelbar vor der Photodegradation für drei Stunden gegen PBS getauscht. Die fehlende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen über mehrere Stunden wirkte sich jedoch negativ auf die Zellviabilität aus. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der kein DMEM-zu-PBS-Tausch stattfand, ließ sich ein deutlich höherer Anteil toter Zellen nachweisen. Anstelle von PBS wurde daher im zweiten Ansatz FCS-freies DMEM für den Mediumaustausch eingesetzt, um die Nährstoffversorgung aufrechtzuerhalten. Trotz des Fehlens von Wachstumsfaktoren für eine Dauer von drei Stunden wurde eine vergleichbar hohe Zellviabilität wie in der Kontrolle erhalten. Im letzten Ansatz wurde bereits zu Beginn FCS-freies DMEM als Kultivierungsmedium verwendet, das erst nach erfolgter Photodegradation durch FCS-haltiges DMEM ersetzt wurde. Dabei zeigte sich, dass die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren selbst für 24 Stunden keinen negativen

Einfluss auf die Zellviabilität hatte. Zusätzlich wurde der Einfluss der UV-C-Bestrahlung (270 nm, 22 mW·cm⁻², 10 min) auf die im Hydrogel zurückbleibenden HeLa-Zellen bewertet. Da die Zellen durch die lichtundurchlässigen Bereiche der Photomaske vor einer direkten Exposition gegenüber der zellschädigenden UV-Strahlung geschützt waren, wurde bei allen drei Ansätzen im Vergleich zur jeweiligen unbestrahlten Kontrolle keine weitere Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen.

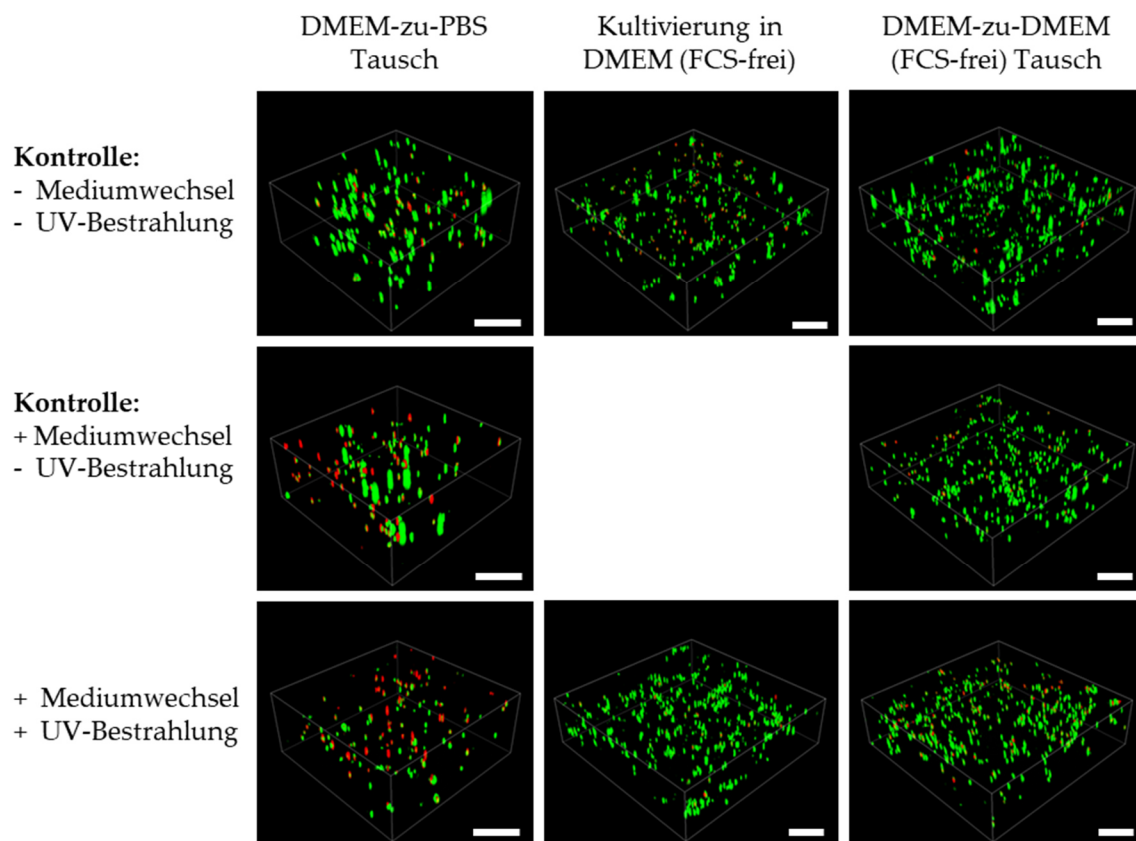


Abbildung 57: Evaluation von drei unterschiedlichen Strategien zur transienten Entfernung von FCS anhand von Lebend-/Tot-Färbungen von HeLa-Zellen in GelPEG-10-Hydrogelen mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584 \text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700 \text{ nm}$). Färbung und anschließende Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B) der verschiedenen Ansätze und der jeweiligen Kontrollen wurden an Tag 3 (entspricht dem Folgetag der Photodegradation) durchgeführt. Maßstab: 200 μm .

3.2.1.4 Subtraktives *Photopatterning*

Die räumlich und zeitlich kontrollierbare Photodegradation erlaubte je nach Wahl der verwendeten Photomaske und Dauer der UV-Bestrahlung den Zugang zu unterschiedlichen Strukturmerkmalen und Geometrien der resultierenden Hydrogele (*Abbildung 58*). Diese reichten von freistehenden 3D-Strukturen definierter Größenabmessungen bis hin zu Hydrogelen mit festgelegten Kavitäten oder Poren. Für alle drei Möglichkeiten wurden entsprechende Beispielstrukturen generiert.

Es wurden Arrays aus freistehenden, zylinderförmigen Hydrogelblöcken mit eingeschlossenen HeLa-Zellen erzeugt, die beispielsweise als miniaturisierte 3D-Zellkultursysteme für Hochdurchsatz-Screeningverfahren fungieren könnten (*Abbildung 59 A*). Abhängig von der Dicke der Hydrogele waren unterschiedlich lange Bestrahlungszeiten notwendig, um eine vollständige Auflösung entlang der lichtdurchlässigen Bereiche der Photomaske zu erreichen. Die geringe Eindringtiefe von kurzweiligem UV-C-Licht sorgte dafür, dass die Hydrogele entlang der z-Achse nicht gleichmäßig aufgelöst wurden. Kurze Bestrahlungszeiten führten daher zunächst zur Bildung von Kavitäten. Durch Wahl einer geeigneten Photomaske konnten auf diese Weise definierte 3D-Kompartimente geschaffen werden (*Abbildung 59 B*). Kavitäten könnten beispielsweise dazu genutzt werden, um unterschiedliche Zelltypen räumlich getrennt voneinander zu kultivieren und ihr Einwachsen ins Hydrogel sowie ihre spätere Interaktion im Hydrogel zu studieren. Bei anhaltender Bestrahlungsdauer wurden die Kavitäten zu durchgängigen Poren erweitert (*Abbildung 59 C*). Die Erhöhung der Porosität von Hydrogelen ist eine wichtige Voraussetzung, um größere Hydrogelkonstrukte zu erzeugen. Ab einer bestimmten Größe von Hydrogelen werden Transportprozesse in und aus dem Hydrogel durch passive Diffusion so stark verlangsamt, dass die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie der Abtransport von Zellmetaboliten nicht mehr ausreichend sichergestellt werden kann. Das vorgestellte Verfahren bietet daher eine einfache Möglichkeit, zusätzliche Poren zu integrieren und dadurch das Diffusionsvermögen ins Hydrogel stark zu verbessern. Zudem ist es ebenso denkbar, ein weiteres Material in die Kavitäten bzw. Poren zu inkorporieren, wodurch neue Hydrogeleigenschaften, wie beispielweise Formgedächtnis oder elektrische Leitfähigkeit, erworben werden.

Insgesamt war der subtraktiven Fertigungsmethode trotz ihrer harschen Bedingungen eine hohe Biokompatibilität zuzuschreiben. Die zellschädigende UV-C-Strahlung wurde vollständig durch die lichtundurchlässigen Bereiche der Photomaske abgehalten, sodass keine Strahlung auf die im Hydrogel verbleibenden Zellen einwirkte. Entlang der lichtdurchlässigen Bereiche der Photomaske wurde dagegen das Hydrogel aufgelöst und zusammen mit den darin eingeschlossenen Zellen in die umgebende Lösung freigesetzt. Auf diese Weise wurden alle durch UV-Strahlung potenziell geschädigten Zellen dem System entzogen. Da Licht im kurzwelligen Wellenlängenbereich UV-induzierte DNA-Schäden und Mutationen hervorruft, sollte auf eine Anwendung der Methode zur gezielten Freisetzung von Zellen bzw. auf eine Weiterverwendung der freigesetzten Zellen verzichtet werden.

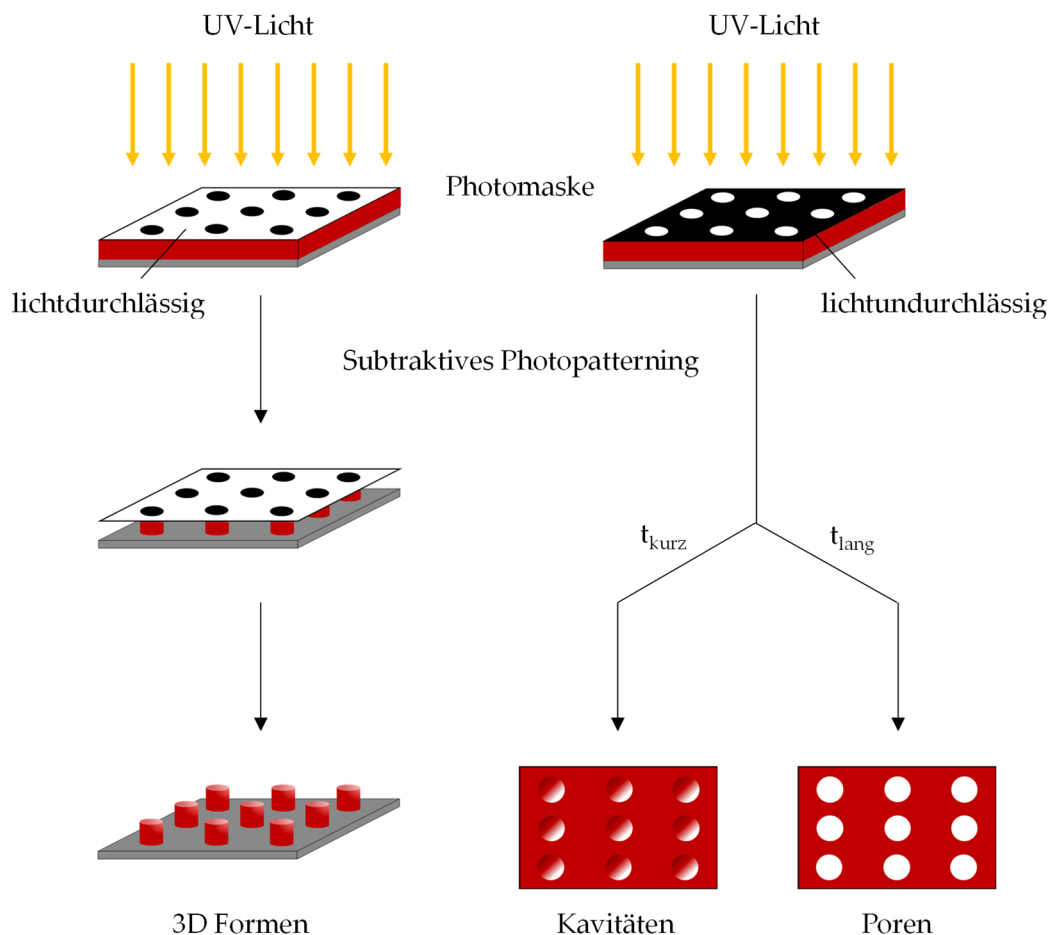


Abbildung 58: Schematische Übersicht über die Bandbreite an Möglichkeiten des subtraktiven Fertigungsverfahrens für photodegradierbare Hydrogele. Je nach Wahl der Photomaske sowie Dauer der UV-C-Bestrahlung können unterschiedliche Struktur motive erzeugt werden, wie beispielsweise freistehende Hydrogelblöcke mit definierten Größenabmessungen, Kavitäten (bei kurzer Bestrahlungsdauer) sowie durchgängige Poren (bei längerer Bestrahlungsdauer).

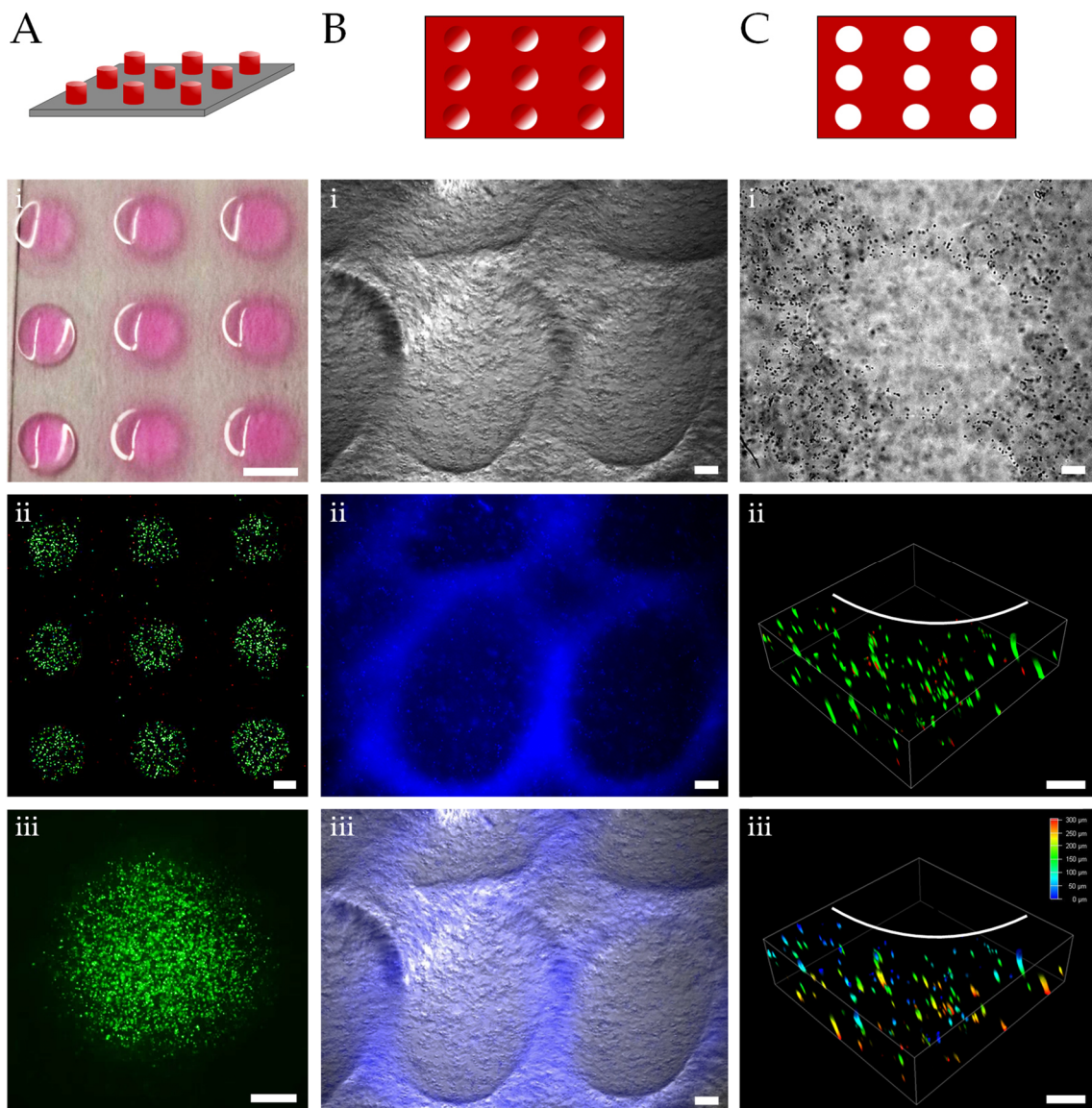


Abbildung 59: (A) Generierung eines Arrays aus Hydrogelblöcken mit eingeschlossenen HeLa-Zellen durch Verwendung einer geeigneten Photomaske. Die Herstellung erfolgte aus gequollenen GelPEG-10-Hydrogelen mit (i) + (ii) 0,5 mm Dicke bei 1,5-minütiger UV-C-Bestrahlung und (iii) 4,5 mm Dicke bei zehnminütiger UV-C-Bestrahlung (270 nm , $22\text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Die mikroskopische Visualisierung der Zellen erfolgte durch Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584\text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700\text{ nm}$). Maßstab: 1 mm. (B) Generierung von Kavitäten in einem gequollenen GelPEG-10-Hydrogel und anschließende mikroskopische Visualisierung der HeLa-Zellen im verbleibenden Hydrogel: (i) Hellfeld, (ii) Fluoreszenzkanal Hoechst 33342 (blau) und (iii) Überlagerung der Kanäle (Leica DM IL LED). Maßstab: $200\text{ }\mu\text{m}$. (C) Generierung von Poren im GelPEG-10-Hydrogel und anschließende mikroskopische Visualisierung der HeLa-Zellen im verbleibenden Hydrogel: (i) Hellfeld, (ii) Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 495\text{-}584\text{ nm}$) und Propidiumiodid (rot, tote Zellen, $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700\text{ nm}$) sowie (iii) Tiefencodierung ($300\text{ }\mu\text{m}$) (SPE Leica TCS SPE DMI4000B). Maßstab: $200\text{ }\mu\text{m}$ (in Kollaboration mit Dr. Alisa Rosenfeld).

3.2.1.5 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel ein neues Hybrid-Hydrogelsystem basierend auf methacryliertem Polyethylenglykol und Gelatine entwickelt, welches die Vorteile seiner jeweiligen Hydrogelbestandteile aufsummierte. Das Screening einer kombinatorischen Bibliothek lieferte eine Hydrogelmischung (GelPEG-10), deren jeweilige Anteile von PEGMA, PEGDMA und GelMA dafür sorgten, dass eine Balance zwischen Photodegradierbarkeit und Biokompatibilität des Hydrogels sichergestellt wurde. Die Abbaubarkeit wurde dabei stark von verschiedenen Faktoren beeinflusst, insbesondere von den Quelleigenschaften der Hydrogele, der GelMA-Konzentration sowie der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von FCS im Zellkulturmedium. Es wurden zwei biokompatible Strategien zur transienten Entfernung von FCS entwickelt, um eine schnelle und vollständige Degradierbarkeit der Hydrogele zu gewährleisten. Die verbesserte Biokompatibilität im Vergleich zur entsprechenden Gelatine-freien Variante wurde an zwei Zelllinien (HeLa und NHDF) demonstriert, die erfolgreich im Hydrogel kultiviert werden konnten. Ferner wurde gezeigt, dass das subtraktive Strukturierungsverfahren keinen negativen Einfluss auf die verbleibenden Zellen im Hydrogel hatte. Der wesentliche Vorteil gegenüber additiven Fertigungsverfahren besteht im zeitlichen Versatz zwischen Photopolymerisation und Photodegradation, wodurch dem Hydrogel die Möglichkeit gegeben wird, vor dem Strukturierungsprozess auf das entsprechende Endvolumen zu quellen. Quellungsinduzierte Verzerrungen von Geometrien und Größenverhältnissen, die typischerweise im Anschluss an additive Fertigungsverfahren auftreten, werden bei der vorgestellten subtraktiven Methode elegant umgangen.

4 Abschlussdiskussion

Mit dem Einzug der additiven Fertigungsmethoden in die Bio- und Medizinwissenschaften sind große Hoffnungen für zukünftige Anwendungen verbunden. 3D-Zellkulturen statt konventioneller Petrischale, miniaturisierte Organsysteme für eine zielgerichtete Wirkstofftestung und Reduktion von Tierversuchen, die Rekonstruktion von Geweben und Organen für medizinische Transplantationen bis hin zum Steak aus dem 3D-Drucker sind nur einige potenzielle Einsatzfelder.⁶⁻⁹ Trotz des beachtlichen Fortschritts in den vergangenen Jahren bleibt der dreidimensionale Aufbau von funktionalem Gewebe via 3D-Druckverfahren noch immer eine große Herausforderung aufgrund der hohen Anforderungen, die an geeignete druckbare Materialien gestellt werden.

Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der Weiterentwicklung bestehender sowie dem chemisch-biologischen Design von neuen Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse. Durch chemische Modifikation von Biopolymeren wie Gelatine, Polyethylenglykol oder Polycaprolacton wurden photoreaktive Materialien erzeugt, die mit Hilfe von Licht zu maßgeschneiderten 3D-Gerüststrukturen verarbeitet wurden. Dadurch konnten künstliche Mikroumgebungen für Zellen geschaffen werden, welche die natürliche extrazelluläre Matrix (EZM) imitieren und das Zellwachstum in 3D fördern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Materialkompositionen vorgestellt und umfassend physikalisch, chemisch sowie biologisch untersucht (*Tabelle 2*). Die neu entwickelten Materialien zielten darauf ab, typische Schwachpunkte etablierter Biomaterialien bzw. Biotinten zu überwinden. Hierzu zählten insbesondere die geringe Bioverträglichkeit der unvernetzten Vorläuferlösungen, hohe benötigte Photoiniator-Konzentrationen, zellschädigende Nebenreaktionen mit Zellkomponenten, eine langsame Reaktionskinetik, keine oder nur eine langsame Abbaubarkeit der Photopolymere sowie begrenzte adaptive Eigenschaften gegenüber externen Stimuli wie Licht, Salz oder pH-Wert. Mit jedem der fünf Materialsysteme sollten jeweils einige der genannten Probleme gelöst bzw. signifikant verbessert werden. Jeweilige Ansatzpunkte waren dabei die Wahl von Biopolymer, funktionellen Gruppen und Polymerisationsmechanismus, die Inkorporation von bio- oder photospaltbaren Domänen, die Inklusion

eines zusätzlichen elektrostatischen Polymernetzwerks sowie die Verwendung von Hybridmaterialien (*Double-Network* und *Interpenetrating Polymer Network*), welche die Vorteile der jeweiligen Einzelnetzwerke aufsummierten.

Tabelle 2: Übersicht über die im Rahmen der Arbeit entwickelten Biomaterial- und Biotintensysteme.

Nr.	Komposition	Biopolymer	Photoreaktive Gruppe	Strukturierungsprozess	Anwendung
1	PCLTA	Polycaprolacton	Acrylat	Licht, Photopolymerisation	DLW
2	GelMA	Gelatine	Methacrylat/ Methacrylamid	Licht, Photopolymerisation	3BP
3	GelNB/GelS	Gelatine	Norbornen/ Thiol	Licht, Photopolymerisation	3BP
4	PEC/ 4-arm PEGA	Polyethylen- glykol	Guanidinium/Sulfonat Ammonium/Sulfonat Acrylat	Elektrostatische WW, Selbstassemblierung Licht, Photopolymerisation	Injektion, 3BP
5	PEGMA/ PEGDMA/ GelMA	Polyethylen- glykol Gelatine	Methacrylat/ Methacrylamid	Licht, Photodegradation	Photo- patterning

Im Folgenden werden die wesentlichen Fortschritte des jeweiligen Materialsystems und dessen Anwendungen nochmals kurz beleuchtet. Die Ergebnisse sollen dabei im Kontext der Literatur diskutiert und anschließend zukünftige Trends in den Bereichen von Materialdesign und Fertigungstechnologien aufgezeigt werden.

1. Das erste Projekt widmete sich dem chemisch-biologischen Design eines biologisch abbaubaren Photolacks auf Basis von Polycaprolacton (PCL) für das DLW. Konventionelle Photolacke erlauben zwar hohe Auflösungen; allerdings sind sie unter biologischen Bedingungen nicht abbaubar, sondern erfordern in der Regel harsche Bedingungen, wie hohe Temperaturen, chemische Reagenzien oder Säuren bzw. Basen. Durch die Entwicklung eines Acrylat-funktionalisierten PCL-Photomonomers (PCLTA) mit hydrolytisch spaltbaren Ester-Gruppen sollte daher das Problem der mangelnden Bioabbaubarkeit gängiger Photolacke adressiert werden. Das synthetisierte PCLTA wies eine hervorragende 3D-Strukturierbarkeit mittels DLW auf und zeigte darüber hinaus eine verbesserte Biokompatibilität und Zellinteraktion im Vergleich zum Referenzlack PETA. Das angestrebte Ziel, ein Photolacksystem mit einer beschleunigten Abbaurate unter physiologischen Bedingungen (PBS, 37 °C) zu entwickeln, konnte jedoch nicht erreicht werden. Trotz des hohen Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnisses der gedruckten Boxringstrukturen, die eine schnelle Hydrolyse begünstigen sollten, erwiesen sich die Estergruppen des PCL als zu stabil. Eine höhere Hydrolysegeschwindigkeit könnte durch Verwendung labilerer Bindungen erreicht werden, wie sie beispielsweise im Imin, Hydrazon oder Oxim vorkommen.³²⁶ Ferner haben Houck *et al.* kürzlich einen PEG-basierten Photolack entwickelt, der über einen bifunktionalen Triazolindion (TAD)-Crosslinker vernetzt wird und dessen DLW-Strukturen in Wasser innerhalb von 36 Stunden vollständig aufgelöst werden konnten.³²⁷

Ein zunehmender Trend in Bezug auf die Materialauswahl im DLW geht ferner dahin, weichere Materialien – insbesondere Hydrogele – zu verschreiben, welche die natürlichen Eigenschaften der EZM besser widerspiegeln. Auch wenn die starke Quellbarkeit von Hydrogelen mit einer Reduktion der Auflösung einhergeht, gewährleistet die hohe Porosität der Hydrogele optimale Diffusions- und damit Abbaubedingungen. In diesem Zusammenhang sind vor allem Gelatine-basierte Hydrogele hervorzuheben, da sie aufgrund ihrer inhärenten enzymatischen Spaltsequenzen (MMP-Sequenzen) hervorragend von Zellen abgebaut werden

können. Erste Arbeiten auf diesem Gebiet wurden von Wang *et al.* durchgeführt, bei denen GelMA mittels DLW zu helikalen Mikroschwimmern verdruckt und anschließend enzymatisch durch Kollagenase wieder aufgelöst wurde.¹¹²

Bei der Anwendung von DLW für die 3D-Zellkultur erfolgen Strukturierungsprozess und Zellbesiedlung typischerweise zeitlich entkoppelt, d. h. die Zellen werden erst nach erfolgter Photopolymerisation auf den erzeugten Gerüststrukturen ausgesät. Neuere Ansätze zielen dagegen vermehrt darauf ab, die Zellen ähnlich wie beim *3D-Bioprinting* direkt während des Druckprozesses im Hydrogel einzubetten. So konnten Dobos *et al.* beispielhaft L929-Fibroblasten erfolgreich in einem DLW-gedruckten GelNB/DTT-Hydrogelquader ($500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$) einschließen und über mehrere Wochen kultivieren.³²⁸ Die DLW-Technologie dringt damit in den letzten Jahren immer weiter in die Biowissenschaften vor. Durch die hohe Auflösung der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) bietet die Fabrikationsmethode die Möglichkeit, maßgeschneiderte 3D-Gerüststrukturen im Mikro- bis Nanometermaßstab bereitzustellen. Die hohe Auflösung geht jedoch mit einer verhältnismäßig langen Produktionszeit einher, weswegen größere Objekte, wie beispielsweise ein hochaufgelöstes Organ, mit derartigen Verfahren bisher noch nicht zugänglich sind.

2. Während im ersten Teil der Arbeit ein Biomaterial entwickelt wurde, dessen Photomonomerlösung nicht für die Suspension von Zellen geeignet war, lag in den Projekten 2, 3 und 5 dagegen der Fokus auf dem chemisch-biologischen Design diverser Biotinten, die sich aus einer zellulären Komponente und einem Biomaterial zusammensetzen. Ausgehend vom Goldstandard GelMA wurde dabei die Weiterentwicklung verschiedener Gelatine-basierter Hydrogelsysteme vorangetrieben.

In Projekt 2 wurden jedoch zunächst einige grundlegende Zusammenhänge zwischen den Polymernetzwerkeigenschaften der Hydrogele und ihrem Einfluss auf das Zellverhalten sowie die Diffusion studiert. Die Herstellung von GelMA-Hydrogelen mit variierender Vernetzungsdichte (*Low, Medium, High*) erfolgte aus unterschiedlich stark funktionalisierten Gelatinederivaten mit Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppen. Im Gegensatz zur Polymerkonzentration stellt der Vernetzungsgrad des Hydrogels ein feineres Werkzeug zur Modulation der

viskoelastischen Eigenschaften dar. Während die Zellaussaat auf einer Hydrogeloberfläche typischerweise hohe Polymerkonzentrationen von 10 % bis 20 % (w/v) erfordert, übersteigt die Hydrogelkonzentration von zellenthaltenden Biotinten selten 5 % bis 10 % (w/v). Für die in der GelMA-Biotinte eingeschlossenen Fibroblasten zeigte sich, dass der Einfluss des Funktionalisierungsgrads der GelMA-Hydrogelvorläufer einen erheblichen Einfluss auf die Ausrichtung und Proliferation der Zellen hatte. Eine niedrige Vernetzungsdichte korrelierte dabei mit einer raschen Ausbildung eines dichten Zellnetzwerks innerhalb von 14 Tagen.

Das GelMA-Hydrogel diente ferner als Modellsystem für eine Diffusionsstudie, in der verschiedene Einflussfaktoren auf die Größe des Diffusionskoeffizienten quantifiziert wurden. Es wurde gezeigt, dass die Diffusionsgeschwindigkeit sowohl von den Netzwerkeigenschaften des Hydrogels (Polymerkonzentration, Vernetzungsdichte, Vernetzungsmechanismus) als auch vom diffundierenden Molekül (Molekülgröße) abhängig war. Trotz der hohen Porosität von Hydrogelen reichen Diffusionsprozesse allein nicht aus, um beispielsweise die Versorgung in einem Hydrogelwürfel der Kantenlänge von einem Zentimeter sicherzustellen. In der Literatur wird die Grenze, bei der gerade noch ein ausreichender Nährstofftransport im Gewebe gewährleistet ist, auf eine Dicke von 2 Millimeter beziffert.³²⁹ Aus diesem Grund wurden vielfältige Strategien zur Vaskularisierung von Hydrogelen entwickelt.^{167,330,331} Der verbreitetste Ansatz stellt hierbei der Einsatz von Pluronic® F-127 dar, welches die Rolle eines Opfermaterials einnimmt. Wässrige Lösungen des thermosensitiven Poloxamers bilden in Konzentrationen von 15 % bis 20 % (w/v) bei Raumtemperatur Gele, die bei Abkühlung auf 4 °C wieder verflüssigt werden können. Da sich Pluronic® F-127 zudem hervorragend mittels 3D-Druck verarbeiten lässt, können auf diese Weise gewünschte Strukturelemente, die zur Vaskularisierung beitragen, ins Hydrogel integriert werden.³³² Nach Auflösung des Poloxamers werden Kanäle gebildet, die anschließend Anwendung in mikrofluidischen Plattformen finden können.³³³

3. Während das GelMA-Hydrogel aufgrund seiner einfachen synthetischen Zugänglichkeit eine weite Verbreitung im *Tissue Engineering* erlangt hat und für lange Zeit als Goldstandard galt, haben in den letzten Jahren alternative Strategien zur photochemischen Vernetzung von Gelatine, welche ohne die toxische Methacrylat-/Methacrylamid-Gruppe auskommen, eine zunehmende Bedeutung gewonnen. Das in der Arbeit vorgestellte Thiol-En-Photoclick-Hydrogelsystem – bestehend aus Norbornen- und Thiol-funktionalisierter Gelatine – zeichnete sich durch eine Reihe an vorteilhaften Eigenschaften im Vergleich zum Goldstandard GelMA aus.¹⁹¹ Diese umfassten eine schnellere Photopolymerisation bei gleichzeitig verringerter Photoinitiator-Menge, weniger Nebenreaktionen, eine bessere Bioverträglichkeit der photoreaktiven Gruppen, eine höhere Netzwerkhomogenität infolge des Stufenpolymerisationsmechanismus sowie eine höhere Biokompatibilität der Vorläuferlösung. Diese Faktoren führten letztlich zu einer signifikant höheren Überlebensrate der Zellen im *3D-Bioprinting*. So wiesen die in der GelNB/GelS-Biotinte suspendierten Fibroblasten unabhängig vom Funktionalisierungsgrad der Hydrogelvorläufer eine hohe Überlebensrate von über 80 % auf, während für die GelMA-Biotinte eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf etwa 50 % bei steigendem Anteil der photoreaktiven Gruppen nachgewiesen wurde. Die Dauer, für welche die Zellen den unvernetzten Photomonomeren und dem Photoinitiator ausgesetzt waren, beeinflusste maßgeblich die Zellviabilität. Wurden die Biotinten dagegen unmittelbar nach Suspension der Fibroblasten photopolymerisiert, wurde kein signifikanter Unterschied in der Viabilität beobachtet. Eine hohe Überlebensfähigkeit in der unvernetzten Biotinte über einen längeren Zeitraum ist jedoch unverzichtbar, da die typische Fertigungszeit im *3D-Bioprinting* von Minuten bis Stunden reicht. Das GelNB/GelS-System profitiert zudem von der schnellen Reaktionskinetik der Thiol-En-Click-Chemie, wodurch die Herstellungszeit und die Strahlungsbelastung im *3D-Bioprinting* deutlich verringert werden.

Aufgrund der hervorragenden Eignung des Thiol-En-Photoclick-Hydrogels im *3D-Bioprinting* ist die GelNB/GelS-Biotinte darüber hinaus prädestiniert für den Einsatz in weiteren Biofabrikationsprozessen, bei denen eine hohe Biokompatibilität der Vorläuferlösung erforderlich ist. Das Hydrogelsystem könnte beispielsweise durch DLW zu hochaufgelösten Mikrostrukturen verdruckt werden. Die Zellen könnten dabei entweder in kleinen Hydrogelblöcken eingeschlossen oder die

gewünschte Zielstruktur um eine Zelle herum gedruckt werden. Erste vielversprechende Ansätze hierzu wurden bereits für GelMA- und GelNB/DTT-Hydrogele publiziert, deren Vorläuferlösungen jedoch nur eine schlechte Bioverträglichkeit aufwiesen.^{88,112,328,334}

Die auf der Norbornen- und der Thiol-Gruppe basierende Strategie zur photochemischen Vernetzung von Gelatine könnte zudem leicht auf andere Biopolymere, wie beispielsweise Kollagen oder Hyaluronsäure, übertragen werden. Ebenso sind *Double-Networks* bestehend aus einem Norbornen-funktionalisierten Biopolymer 1 und einem thiolierten Biopolymer 2 denkbar, um eine höhere biologische Komplexität und bessere Imitation der natürlichen EZM zu erzielen. Die chemische Funktionalisierbarkeit des Thiol-En-Hydrogels bei nicht äquimolarem Norbornen-zu-Thiol-Verhältnis bietet darüber hinaus die Möglichkeit, weitere biologisch relevante Moleküle, wie z. B. bestimmte Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren, kovalent in das Polymernetzwerk zu inkorporieren, ohne dass diese durch Diffusionsprozesse dem Hydrogel wieder entzogen werden. Das Thiol-En-Photoclick-Hydrogel demonstriert daher neben seiner exzellenten Biokompatibilität und 3D-Verdruckbarkeit eine hohe Flexibilität hinsichtlich zukünftiger Einsatzmöglichkeiten.

4. Steigende Anforderungen im *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin haben dazu geführt, dass die mechanischen und biologischen Eigenschaften, die ein gewünschtes Biomaterial aufweisen sollte, häufig nicht mehr durch ein einziges Material repräsentiert werden können. Aus diesem Grund haben Mehrkomponenten-Hydrogele, welche die Vorteile ihrer zugrundeliegenden Polymere vereinen, eine wachsende Bedeutung erlangt. Im Rahmen eines Forschungsaufenthalts an der UCLA (Los Angeles, USA) wurde dazu ein PEG-basiertes PEC/C-Hybrid-Hydrogel mit interpenetrierenden kovalenten und elektrostatischen Polymernetzwerken entwickelt.²⁹³ Das IPN-Hydrogel fungierte als Modellsystem, um die vorteilhaften Eigenschaften, die sich aus der Verflechtung der beiden Polymernetzwerke ergaben, zu studieren und mit den Materialeigenschaften der jeweils zugrundeliegenden Einzelnetzwerke zu vergleichen. Das nicht-kovalente Polymernetzwerk wurde dabei durch elektrostatische Assemblierung von gegensätzlich geladenen Triblockcopolyelektrolyten erhalten. Die Bildung des

kovalenten Netzwerks erfolgte dagegen durch photochemische Vernetzung des Photomonomers 4-arm PEGA.

Die Auswirkungen auf die Mikrostruktur der elektrostatisch assemblierten PEC-Hydrogele durch die Inkorporation eines zusätzlichen kovalenten Netzwerks waren lediglich gering, führten jedoch zu definierten Quelleigenschaften, höheren Schubmodulen sowie einer höheren Resistenz gegenüber Salzen und Änderungen des pH-Werts. Der Zugewinn an mechanischer Stabilität und Strukturintegrität bei gleichzeitigem Erhalt der adaptiven Eigenschaften liefert damit eine vielversprechende Kombination an Materialeigenschaften, die für eine Anwendung des IPN-Hydrogels bei medizinischen Injektionen bestens geeignet ist. Weder das kovalente noch das nicht-kovalente Hydrogel sind allein imstande, den benötigten Anforderungen gerecht zu werden. So führt die niedrige Viskosität der Vorläuferlösung des chemisch vernetzbaren Polymernetzwerks dazu, dass die Hydrogelvorläufer rasch von der Injektionsstelle wegdiffundieren und dabei den ggf. eingeschlossenen Wirkstoff verfrüht freisetzen. Das elektrostatisch assemblierte Netzwerk dagegen besitzt nach erfolgter Injektion allein keine ausreichende Strukturintegrität, da es in Wasser einer unendlichen Quellung unterliegt. Nur in Kombination von chemisch und elektrostatisch vernetzbaren Hydrogelen gelingt es, die jeweiligen Nachteile der Einzelnetzwerke zu kompensieren.

Gleichermaßen profitierte das kovalent vernetzte Polymernetzwerk von der Inkorporation eines zusätzlichen interpenetrierenden, elektrostatischen Netzwerks durch eine Erhöhung der Quellbarkeit, Dehnbarkeit und Schubmodule der Hydrogele sowie einer moderaten Adaptivität gegenüber Salzen. Den stärksten Einfluss hatten die Triblockcopolyelektrolyte jedoch auf die unvernetzte, niedrigviskose Hydrogelvorläuferlösung, deren Viskosität und Schubmodule durch die elektrostatischen Wechselwirkungen erheblich gesteigert wurden. Die Fähigkeit zur Modulation der Viskosität macht die Triblockcopolyelektrolyte damit zu einem vielversprechenden Additiv für niedrigviskose Biotinten im *3D-Bioprinting*. Während bei Gelatine-basierten Hydrogelen der erforderliche Viskositätsanstieg durch Abkühlung auf 22 °C erzielt wurde, ist der Ansatz der Triblockcopolyelektrolyte nicht auf temperatursensitive Biopolymerlösungen beschränkt, sondern allgemein auf alle niedrigviskosen Biotinten anwendbar. Die rheologischen Messungen der Viskositäten und Schubmodule geben Anlass zu der

Annahme, dass die Triblockcopolyelektrolyte für eine ausreichend hohe Strukturintegrität der Hydrogelvorläuferlösung sorgen, um ein Verlaufen der extrudierten Biotinte zu verhindern. Ist der Anteil des elektrostatischen Netzwerks hoch genug, wird darüber hinaus ein kontinuierlicher Fabrikationsprozess der 3D-Struktur ermöglicht, wodurch ein separater Aushärtungsschritt nach jeder gedruckten Schicht nicht länger erforderlich wäre. Auf diese Weise würden Fertigungszeit und Strahlungsbelastung signifikant reduziert werden. Zudem könnte mit einem einzigen finalen Photopolymerisationsschritt eine zusammenhängende 3D-Struktur erhalten werden anstelle von sichtbar gestapelten Schichten im Falle multipler Aushärtungsschritte. Darüber hinaus bieten die PEC-Domänen den Vorteil, dass geladene Wirkstoffe, Proteine oder Nukleinsäuren über ionische Wechselwirkungen auf einfache Weise in das Hydrogel inkorporiert werden können, ohne dass hierfür eine kovalente Anknüpfung erforderlich wäre. Die spontan selbstassemblierenden Triblockcopolyelektrolyte stellen damit ein vielversprechendes Additiv für gängige Hydrogelsysteme dar. Ihre Inklusion führt zu IPN-Hydrogelen, welche die jeweiligen Vorteile der Einzelpolymernetzwerke aufsummieren, was ihren Einsatz für eine Reihe von biomedizinischen Anwendungen im *Tissue Engineering* interessant macht.

5. Bei den zuvor diskutierten Materialkompositionen 1 - 4 wurde Licht in additiven Fertigungsverfahren (DLW, 3BP) zur gezielten Photopolymerisation eingesetzt. Im letzten Projekt wurde dagegen eine Biotinte für ein subtraktives Fertigungsverfahren entwickelt, bei dem Licht eine räumlich und zeitlich begrenzte Photodegradation des Hydrogels induzierte.³²⁵ Die Grundlage der Biotinte bildeten einfach und doppelt Methacrylat-funktionalisiertes Polyethylenglykol sowie Methacrylat-/Methacrylamid-modifizierte Gelatine. Durch das Screening einer kombinatorischen Bibliothek wurde eine geeignete Hydrogelmischung identifiziert, deren Anteile von PEGMA, PEGDMA und GelMA so aufeinander abgestimmt waren, dass eine Balance zwischen der Photodegradierbarkeit und der Biokompatibilität des Hybrid-Hydrogels erzielt wurde. Der wesentliche Vorteil gegenüber additiven Fertigungsverfahren besteht bei diesem Ansatz in der zeitlichen Entkopplung der Photopolymerisation vom Strukturierungsprozess des Hydrogels. Da die Polymernetzwerke nach ihrer photochemischen Vernetzung in Wasser einer starken Quellung unterliegen, kommt es in der Regel zu einer starken

Volumenzunahme. Erfolgen Strukturierungsprozess und Photopolymerisation gleichzeitig, wie beispielsweise beim *3D-Bioprinting*, treten in der Folge quellungsinduzierte Verzerrungen von Geometrien und Größenverhältnissen auf. Dieses Problem wird beim subtraktiven Verfahren dagegen umgangen, da die Strukturierung erst am vollständig gequollenen Hydrogel vorgenommen wird. Trotz der harschen Degradationsbedingungen wies das Verfahren eine hohe Zellverträglichkeit auf, da die Zellen in den nicht degradierten Bereichen des Hydrogels durch die lichtundurchlässigen Stellen der Photomaske vor Exposition der UV-C-Strahlung geschützt waren. Die Verwendung diverser Photomasken erlaubte die Herstellung verschiedener Struktur motive, darunter freistehende Hydrogelblöcke, Poren oder Kavitäten. Kompliziertere 3D-Strukturen, wie z. B. ein Boxring, sind dagegen mit der Photomaske nicht zugänglich. Ein weiterer Nachteil besteht im höheren Materialverbrauch im Vergleich zu additiven Fertigungsverfahren. Bis dato besitzt die subtraktive Fertigung bei Hydrogelen einen vergleichsweise geringen Stellenwert im *Tissue Engineering*. Auch wenn in der Literatur bereits einige Hydrogelsysteme entwickelt wurden, deren Polymergerüste mit photodegradierbaren Gruppen funktionalisiert sind, werden die Biomaterialien selten zur gezielten 3D-Strukturierung verwendet. Das Ziel der Photodegradation besteht bei diesen Systemen entweder in der lokalen Modulation der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogele oder in der Freisetzung der eingeschlossenen Zellen für die weitere biologische Analyse durch Verflüssigung des gesamten Hydrogels.³³⁵⁻³³⁷ Für den Einsatz von photodegradierbaren Hydrogelen – wie das im Rahmen der Arbeit entwickelte GelPEG-10 – in subtraktiven Fertigungsverfahren bestehen jedoch vielversprechende Anwendungen. Diese reichen von der gezielten Kompartimentierung und Vaskularisierung von Hydrogelen bis hin zur Herstellung von 3D-Hydrogel-Mikroarrays für das Hochdurchsatz-Screening.

Dem enormen Fortschritt in den letzten Jahren sowie der intensiven Forschung über verschiedenste Disziplinen hinweg ist der Einzug des 3D-Drucks in die Bio- und Medizinwissenschaften zu verdanken. Mit dem ersten künstlichen Herz aus dem 3D-Drucker im Jahr 2019 wurde ein wichtiger Meilenstein auf dem Weg zu transplantierbaren Organen erreicht.³⁰ Dennoch wird es noch viel Neugier, Forschungsdrang und innovative Ideen benötigen, um die verbleibenden Herausforderungen zu meistern. Die in der Arbeit vorgestellten Materialsysteme liefern daher einen wichtigen Beitrag, um die Bandbreite und Komplexität der zur Verfügung stehenden, druckbaren Materialien für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse zu erweitern. Die Motivation und Vorteile der jeweiligen Materialkomposition wurden abschließend nochmals beleuchtet und zukünftige Trends im chemisch-biologischen Design von Biomaterialien und Biotinten aufgezeigt.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Zellen und Organismen

HeLa	humane Zervixkarzinomzellen, adhären
HepG2	humane Leberkarzinomzellen, adhären
HUVEC	humane Endothelzellen (Nabelschnurvene), adhären
NHDF	humane Fibroblasten, adhären

5.1.2 Zellkulturmedien

HeLa, HepG2, NHDF	89 % DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
HUVEC	EGM-2 EGM-2-Zusätze

5.1.3 Zusammengesetzte Medien und Chemikalien

Trypsininhibitor	90 % DPBS ^{-/-} 10 % FCS
Einfriermedium (alle Zellen)	50 % FCS 40 % zellspezifisches Kultivierungsmedium 10 % DMSO
Natrium-Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 10)	60 % Na ₂ CO ₃ (0,1 M) 40 % NaHCO ₃ (0,1 M)
Natrium-Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 8,5)	95 % NaHCO ₃ (0,1 M) 5 % Na ₂ CO ₃ (0,1 M)
Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)	80 % Na ₂ HPO ₄ (0,1 M) 20 % NaH ₂ PO ₄ (0,1 M) 1 mM EDTA

5.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Carl Roth GmbH
Acryloylchlorid	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
AHCT (<i>N</i> -Acetyl-DL-homocysteinethiolacton)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Allylglycidylether	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Aluminiumoxid, basisch	Alfa Aesar
Calcein-AM	ThermoFisher Scientific Inc.
Calciumhydrid	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
CDCl ₃ (Chloroform-d)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Celite® Hyflo Supercel	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
CellTracker Green CMFDA	ThermoFisher Scientific Inc.
Cysteaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
D ₂ O (Deuteriumoxid)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
DCM (Dichlormethan)	Carl Roth GmbH
DCM (Dichlormethan), wasserfrei	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
DETC (7-Diethylamino-3-thenoylcoumarin)	TCI GmbH
Dextran (2,5 / 10 / 100 / 500 kDa)	Carl Roth GmbH
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco® Thermo Fisher Scientific
DMF (Dimethylformamid)	Carl Roth GmbH
DMPA (2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH

DPBS ^{-/-} (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> ^{-/-})	Gibco® Thermo Fisher Scientific
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth GmbH
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Carl Roth GmbH
EGM-2 (<i>Endothelial Growth Medium-2</i>)	Lonza
ELASTOSIL® RT 601 A/B	Wacker Chemie AG
Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Ethanol, absolut	VWR International GmbH
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochlorid	Carl Roth GmbH
FCS (<i>Fetal Calf Serum</i>)	Gibco® Thermo Fisher Scientific
Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Glucose	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
<i>n</i> -Hexan	Carl Roth GmbH
Hoechst 33342	Promega GmbH
Immersionsöl Leica Typ F (<i>n</i> = 1,5180)	ThermoFisher Scientific Inc.
Irgacure 2959	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Irgacure 369	TCI GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Kaliumnaphthalid	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
KOH (Kaliumhydroxid)	Carl Roth GmbH
Kollagen Typ 1 (aus Rattenschwanz)	Enzo Life Sciences, Inc.

Kollagenase (10 U·mL ⁻¹ , Typ 1, aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
LAP (Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat)	TCI GmbH
MAA (Methacrylsäureanhydrid)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
MES (2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH
Methylenblau	Carl Roth GmbH
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Carl Roth GmbH
MTT Dye Solution	Promega GmbH
MTT Stop Solution	Promega GmbH
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Carl Roth GmbH
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Carl Roth GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth GmbH
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Carl Roth GmbH
NaHCO ₃ (Natriumhydrogencarbonat)	Carl Roth GmbH
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth GmbH
Natrium-3-mercaptopropansulfonat	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
NBCA (5-Norbornen-2-carbonsäure)	TCI GmbH
NHS (<i>N</i> -Hydroxysuccinimid)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
PCL-triol (M _n = 300 g·mol ⁻¹) (Polycaprolactontriol)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
PEG (M _n = 20 000 g·mol ⁻¹) (Polyethylenglykol)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA

4-arm PEGA ($M_n = 20\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (4-arm Polyethylenglykolacrylat)	JenKem Technology USA Inc.
PEGDMA ($M_n = 750\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Polyethylenglykoldimethacrylat)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
PEGMA ($M_n = 475\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Polyethylenglykolmethacrylat)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
PenStrep (Penicillin/Streptomycin)	Gibco® Thermo Fisher Scientific
PETA (Pentaerythritoltriacrylat)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Phalloidin-FITC	ThermoFisher Scientific Inc.
Phenol	Carl Roth GmbH
PrestoBlue Reagenz	ThermoFisher Scientific Inc.
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
1H-Pyrazol-1-carboxamidin	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Pyrogallol	Carl Roth GmbH
Salzsäure (konz.)	Carl Roth GmbH
Schwefelsäure (konz.)	Carl Roth GmbH
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Carl Roth GmbH
Stickstoff, flüssig	Air Liquide
THF (Tetrahydrofuran)	Carl Roth GmbH
TNBSA (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Triethylamin	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Triton X-100	Sigma-Aldrich® Merck KGaA
Trypsin-EDTA, 0,25 %	Gibco® Thermo Fisher Scientific
Vinylphosphonsäure	Sigma-Aldrich® Merck KGaA

5.1.5 Verbrauchsmaterialien

8-Well μ -Slide, ibiTreat	ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
Adhäsionsobjektträger, Q-Path plus	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Dialyseschläuche, Cellulose-Membran (MWCO: 14 kDa, Breite: 43 mm)	Sigma-Aldrich® Merck KGaA (St. Lewis, USA)
Einmalspritzen Omnifix, 1 mL	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Falconröhrchen CELLSTAR® 15 / 50 mL	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Kartusche Optimum, 3 cc, klar Optimum, 3 cc, schwarz	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Kartuschenadapter Optimum, für 3 cc Kartuschen	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Kartuschenverschluss unten, drehbar	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Klebeband VHB™	Scotch (Saint Paul, USA)
Kryoröhrchen 2 mL, mit Silikonring	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Messpipetten AR-Glas, 5 / 10 / 20 mL	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Microman® Spitzen CP25 3-25 μ L	Gilson Inc. (Middleton, USA)
Nadeln 0,15 mm, lila, konisch, Standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Nadeln 0,25 mm, rot, konisch, Standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)

Nadeln 0,41 mm, blau, konisch, Standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Parafilm M 4 in. × 125 ft. Roll	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Pasteurpipetten Natron-Kalk-Glas	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen Next Generation Reloadsystem 0,1-10 µL / 10-200 µL	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen blau, 100-1000 µL	Corning, Inc. (New York, USA)
Reaktionsgefäße farblos, 0,5 / 1,5 / 2,0 mL	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Reaktionsgefäße schwarz, 1,5 mL	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Einwegküvetten UVette® 220-1600 nm	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Spritzen Inkjet, 1 / 5 / 10 mL	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzenfilter Rotilabo®, PTFE, Porengröße: 0,22 µm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Sterican® Einmalinjektionskanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilfilter Rotilabo®, Porengröße: 0,22 µm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Stopfen 3 cc, rot	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Verschlusskappe oben, blau, für 3cc Kartuschen	Nordson EFD (Erkrath, Deutschland)
Zählkammer, Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG (Lauda, Deutschland)

Zellkultur Multiwellplatte CELLSTAR®
6 / 12 / 24 / 48 / 96 Well, PS, F-Boden,
transparent

Greiner Bio-One GmbH
(Frickenhausen, Deutschland)

Zellkulturflasche CELLSTAR®
75 cm², 175 cm², Filterschraubverschluss

Greiner Bio-One GmbH
(Frickenhausen, Deutschland)

Zellkulturschalen CELLSTAR®,
35 mm, 60 mm, 100 mm, PS

Greiner Bio-One GmbH
(Frickenhausen, Deutschland)

5.1.6 Geräte

Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
Absorptionsspektrometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Beamline 12-ID-B	Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory (Chicago, USA)
3D-Bioprinter 3D Discovery Gen 1	regenHU (Villaz-St-Pierre, Schweiz)
CO ₂ -Inkubator, C170	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Feinwaage PR 124	OHAUS Europe GmbH (Nänikon, Schweiz)
Konfokalmikroskop Leica TCS SPE DMI4000B	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Kontaktwinkel-Goniometer DSA 25	KRÜSS GmbH (Hamburg, Deutschland)
Kühlsystem für 3D Discovery, Umwälzkühler Huber Pilot One	Peter Huber Kältemaschinenbau AG (Offenburg, Deutschland)
Lampe OSRAM Ultra Vitalux 300W E27	Osram Licht AG (München, Deutschland)
Lichtmikroskop (invers) Leica DM IL LED	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Lyophilisator	LSL Secfroid (Aclens, Schweiz)
Magnetrührer mit Heizplatte VWR Advanced	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Mehrkanalpipetten 1-10 µL / 20-200 µL	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Microman® E M25E 3-25 µL	Gilson Inc. (Middleton, USA)
NMR-Spektrometer AVANCE 400	Bruker BioSpin GmbH (Rheinstetten, Deutschland)
Omniculture R2000 UV Radiometer	igb-tech GmbH (Friedelsheim, Deutschland)
pH-Meter	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Photonic Professional GT	Nanoscribe GmbH (Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland)
Pipetten Eppendorf Research Plus 1-10 µL / 10-100 µL / 100-1000 µL	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Punktstrahler Omnicure S2000 (Lichtleiter 320-500 nm)	igb-tech GmbH (Friedelsheim, Deutschland)
Rasterelektronenmikroskop Zeiss Supra 55VP	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Rheometer MCR 302 Platte-Platte-System Kegel-Platte-System	Anton Paar USA Inc. (Torrance, USA)
Rotationsverdampfer LABOROTA 4000	Heidolph Instruments GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
SpectraMax iD3 Mikroplattenleser	Molecular Devices, LLC. (San José, USA)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Ultimaker ³ Extended 3D-Drucker	Ultimaker (Utrecht, Niederlande)
Ultraschallreiniger Palssonic UD06	Allpax GmbH & Co. KG (Papenburg, Deutschland)
UV-A-Quelle Bio-Link BLX-365	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH (Eberhardzell, Deutschland)

UV-C-Quelle UVACUBE 2000	Dr. Hönle AG (Gräfelfing, Germany)
Vortexmischer Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG (Hänigsen, Deutschland)
Werkbank ENVAIR eco air	ENVAIR GmbH (Emmendingen, Deutschland)
Zentrifuge Megafuge 2.0R Heraeus Sepatech	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Wesseling, Deutschland)
Zugprüfmaschine Instron 5542	Instron GmbH (Norwood, USA)

5.1.7 Software

ChemOffice Professional

Leica Application Suite

Microsoft Office 2019

Origin Pro Professional 2019

Python

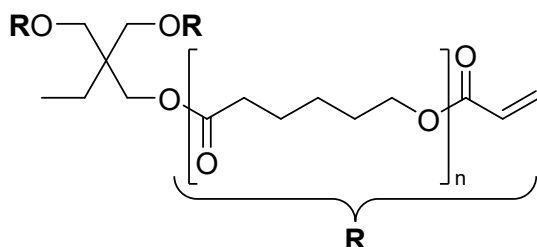
RheoCompass

TopSpin 4.0.6

5.2 Methoden

5.2.1 Synthesevorschriften

5.2.1.1 Synthese von Polycaprolactontriacrylat (PCLTA)



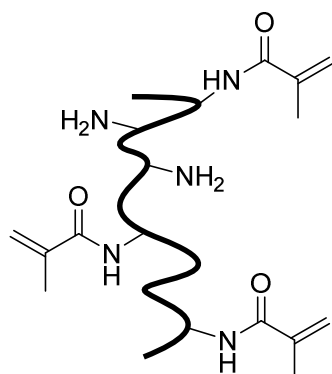
Unter Argon wurden 3,00 g PCL-triol ($M_n = 300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 10,0 mmol, 1,00 Äq.) in 45 mL trockenem DCM gelöst. Nach Zugabe von 9,4 mL Triethylamin (6,83 g, 67,5 mmol, 6,75 Äq.) wurde die Reaktions-

lösung auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 9,2 mL Acryloylchlorid (10,17 g, 112,4 mmol, 11,24 Äq.) in 25 mL trockenem DCM gelöst, auf 0°C gekühlt und tropfenweise zur Reaktionslösung unter starkem Rühren zugegeben. Dabei färbte sich die Lösung orangegelb. Nach Erwärmen auf RT wurde die Reaktionslösung für 18 h gerührt. Ausfallendes Triethylaminhydrochlorid wurde durch Filtration über Celite® Hyflo Supercel abgetrennt. Die Lösung wurde auf ein Volumen von 50 mL eingengt und mit 3 % (w/v) $\text{KOH}_{(\text{aq})}$ gewaschen. Bei KOH-Zugabe bildete sich eine cremeartige, gelbe Suspension, die durch Zentrifugation (4000 rpm, 30 min) abgetrennt wurde. Die Waschschrte wurden mehrfach wiederholt, bis die Waschlösung farblos war. Die organische Phase wurde mehrfach mit 1 % (v/v) $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ gewaschen. Anschließend wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurde eine goldgelbe, ölige Flüssigkeit (74 %) erhalten, die lichtgeschützt bei 4°C gelagert wurde.³³⁸

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta/\text{ppm} = 6,40$ (dd, $^3J=17,3 \text{ Hz}$, $^2J=1,5 \text{ Hz}$, 3H, H_b), 6,11 (dd, $^3J=17,3 \text{ Hz}$, $^3J=10,4 \text{ Hz}$, 3H, H_c), 5,82 (dd, $^3J=10,4 \text{ Hz}$, $^2J=1,5 \text{ Hz}$, 3H, H_a), 4,18-4,00 (m, 6H, H_i , $n\times 6H$, H_d), 2,36-2,27 (m, $n\times 6H$, H_h), 1,74-1,57 (m, $n\times 12H$, $H_{g,e}$), 1,57-1,48 (m, 2H, H_j), 1,45-1,31 (m, $n\times 6H$, H_f), 0,96-0,86 (m, 3H, H_k).

	Äq.	n [mmol]	m [g]	V [mL]
PCL-triol	1,00	10,0	3,00	–
NEt ₃	6,75	67,5	6,83	9,4
DCM (trocken)	–	–	–	45
Acryloylchlorid	11,24	112,4	10,17	9,2
DCM (trocken)	–	–	–	25

5.2.1.2 Synthese von Gelatine-Methacryloyl (GelMA)



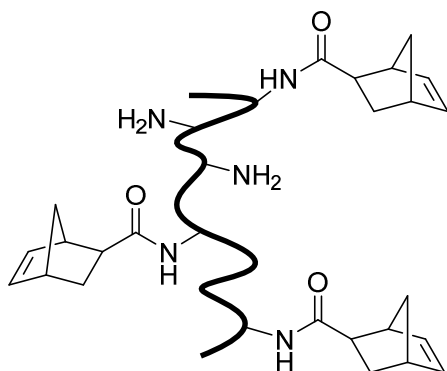
Die Synthese von GelMA erfolgte in Anlehnung an gängige Synthesevorschriften aus der Literatur.^{86,139} Es wurde 1 g Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH₂-Gruppen, 1 Äq.) in 10 mL PBS unter Rühren bei 50 °C gelöst. Anschließend wurden 792 µL Methacrylsäureanhydrid (5,32 mmol, 0,82 g, 20 Äq.) tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung bei 50 °C für 2 h gerührt. Die Lösung wurde daraufhin mit 10 mL PBS

verdünnt und in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) überführt. Es wurde bei 40 °C für 7 Tage gegen dH₂O dialysiert, wobei zweimal täglich ein Wasserwechsel erfolgte. Die aufgereinigte Lösung wurde bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Als Produkt wurde ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde. GelMA mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad (*Low*, *Medium*, *High*) wurde durch Variation der Mengen von Methacrylsäureanhydrid (1 Äq., 8 Äq., 20 Äq. bezogen auf die NH₂-Gruppen in Gelatine) synthetisiert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 315 K): $\delta/ppm = 7,60-7,40$ (*H_{aromat}*, *Gelatine*), 5,88 (1H, *Vinyl-H*, *H_a*), 5,64 (1H, *Vinyl-H*, *H_b*), 5,24-0,99 (*Gelatine*), 3,20 (*bs*, 2H, *NH₂*), 2,11 (*s*, 3H, *CH₃*, *H_c*).

pro 1 g Gelatine	DoF	Äq.	n [mmol]	m [mg]	V [µL]
MAA		0,5	0,133	20,5	19,8
	<i>Low</i>	1	0,266	41,0	39,6
		2	0,532	82,0	79,2
		4	1,064	164	158
	<i>Medium</i>	8	2,128	328	317
		10	2,66	410	396
		12	3,192	492	475
		16	4,256	656	634
	<i>High</i>	20	5,32	820	792
		30	7,98	1230	1189

5.2.1.3 Synthese von Norbornen-funktionalisierter Gelatine (GelNB)

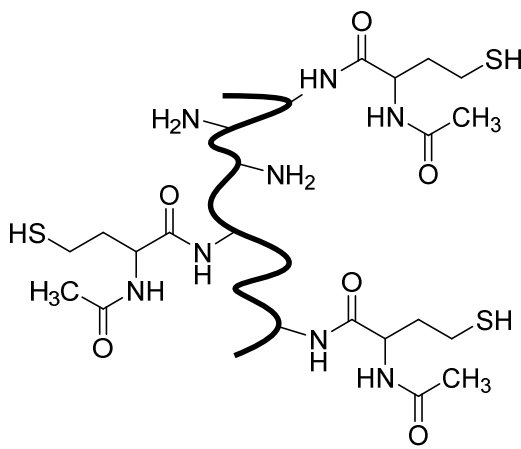


326 μL 5-Norbornen-2-carbonsäure (368 mg, 2,66 mmol, 10 Äq.) wurden in 10-20 mL MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst und 1,02 g EDC·HCl (5,32 mmol, 20 Äq.) sowie 0,306 g NHS (2,66 mmol, 10 Äq.) zugegeben. Die Lösung wurde bei 50 °C für 15 min gerührt. Nach Zugabe von 1 g Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH_2 -Gruppen, 1 Äq.) wurde mit NaOH (10 M) pH 7,5-7,8 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde bei 50 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (2000 rpm, 3 min), um nicht lösliche Rückstände zu entfernen. Der Überstand wurde in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) überführt und bei 40 °C für 7 Tage gegen dH_2O dialysiert, wobei zweimal täglich ein Wasserwechsel erfolgte. Die aufgereinigte Lösung wurde bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Als Produkt wurde ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -20 °C gelagert wurde. GelNB mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad (*Low*, *Medium*, *High*) wurde durch Variation der Mengen von 5-Norbornen-2-carbonsäure (0,3 Äq., 2 Äq., 10 Äq. bezogen auf die NH_2 -Gruppen in Gelatine), EDC·HCl (0,6 Äq., 4 Äq., 20 Äq.) und NHS (0,3 Äq., 2 Äq., 10 Äq.) synthetisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , 315 K): $\delta/\text{ppm} = 7,60\text{-}7,40$ (H_{aromat} , Gelatine), 6,44 (1H, H_a , endo), 6,39 (1H, H_a' , exo), 6,37 (1H, H_b' , exo), 6,11 (1H, H_b , endo), 5,24-0,99 (Gelatine), 3,20 (bs, 2H, NH_2).

pro 1 g Gelatine	DoF	Äq.	n [mmol]	m [mg]	V [µL]
NBCA		0,1	0,0266	3,7	3,3
	<i>Low</i>	0,3	0,0798	11,0	9,8
		0,5	0,133	18,4	16,3
		1	0,266	36,8	32,6
	<i>Medium</i>	2	0,532	73,5	65,1
		2,5	0,665	91,9	81,4
		3	0,798	110	97,7
		3,5	0,931	129	114
		4	1,064	147	130
		8	2,128	294	260
	<i>High</i>	10	2,66	368	326
EDC·HCl		0,2	0,0532	10,2	–
	<i>Low</i>	0,6	0,1596	30,6	–
		1	0,266	51,0	–
		2	0,532	102	–
	<i>Medium</i>	4	1,064	204	–
		5	1,33	255	–
		6	1,596	306	–
		7	1,862	357	–
		8	2,128	408	–
		16	4,256	816	–
	<i>High</i>	20	5,32	1020	–
NHS		0,1	0,0266	3,1	–
	<i>Low</i>	0,3	0,0798	9,2	–
		0,5	0,133	15,3	–
		1	0,266	30,6	–
	<i>Medium</i>	2	0,532	61,2	–
		2,5	0,665	76,5	–
		3	0,798	91,8	–
		3,5	0,931	107	–
		4	1,064	122	–
		8	2,128	245	–
	<i>High</i>	10	2,66	306	–

5.2.1.4 Synthese von Thiol-funktionalisierter Gelatine (Gels)

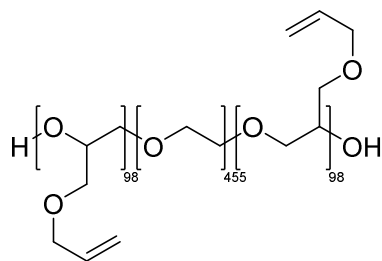


Die Synthese von Gels erfolgte nach einem Protokoll von Van Vlierberghe *et al.*¹⁹⁶ Unter Argon wurde 1 g Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom, 0,266 mmol NH₂-Gruppen, 1 Äq.) in 10-20 mL entgastem Natrium-Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 10) gelöst und die Lösung auf 40 °C erhitzt. Anschließend wurden 0,212 g *N*-Acetyl-DL-homocysteinthiolacton (1,33 mmol, 5 Äq.) zugegeben. Um eine Oxidation der Thiol-Gruppen zu vermeiden, wurden Metalle durch die Zugabe von 1 mM EDTA komplexiert.³³⁹ Die Reaktionslösung wurde unter Argon bei 40 °C für 3 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 10 mL dH₂O verdünnt und in Dialyseschläuche (Cellulose, MWCO: 14 kDa) überführt. Es wurde bei 40 °C für einen Tag gegen entgastes dH₂O unter Argonatmosphäre dialysiert, wobei viermal ein Wasserwechsel erfolgte. Die aufgereinigte Lösung wurde bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Als Produkt wurde ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten, der bei -80 °C unter Argonatmosphäre gelagert wurde. Gels mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad (*Low*, *Medium*) wurde durch Variation der Menge von *N*-Acetyl-DL-homocysteinthiolacton (1 Äq., 5 Äq. bezogen auf die NH₂-Gruppen in Gelatine) synthetisiert.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, 315 K): $\delta/ppm = 7,60-7,40$ (*H_{aromat}*, *Gelatine*), $5,24-0,99$ (*Gelatine*), $3,20$ (*bs*, 2H, NH₂), $2,23$ (*s*, 3H, CH₃, H_a).

pro 1 g Gelatine	DoF	Äq.	n [mmol]	m [mg]	V [µL]
AHCT	<i>Low</i>	1	0,266	42,3	-
		3	0,798	127	-
	<i>Medium</i>	5	1,33	212	-
		10	2,66	423	-

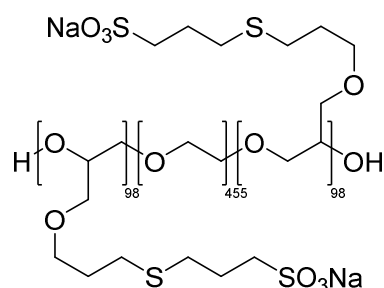
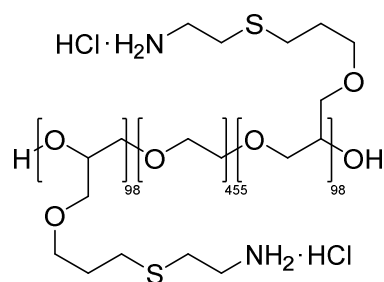
5.2.1.5 Synthese von PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolymeren



Allylglycidylether (AGE) wurde über Calciumhydrid über Nacht getrocknet. Anschließend wurde die AGE-Lösung durch drei *Freeze-Pump-Thaw*-Zyklen entgast und durch Destillation gereinigt. Polyethylenglykol (PEG, $M_n = 20\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) wurde im Vakuum über Nacht getrocknet. Für die Synthese des Triblock-

copolymers wurden 10 g PEG in wasserfreiem THF gelöst und mit Kaliumnaphthalid (0,4 M in trockenem THF) titriert, bis die Farbe der Lösung hellgrün bis grün wurde. Anschließend wurde AGE zum PEG-Dialkoxid-Makroinitiator gegeben und die Reaktionslösung bei 45 °C für 48 h gerührt. Die anionische Polymerisationsreaktion wurde durch Zugabe von entgastem Methanol gestoppt. Das Reaktionsprodukt Poly(allylglycidylether)₉₈-poly(ethylenglykol)₄₅₅-poly(allylglycidylether)₉₈ (PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈) wurde in einem Liter Hexan ausgefällt, filtriert und getrocknet. Als Produkt wurde ein weißer Feststoff erhalten. Das Molekulargewicht und die Polymerzusammensetzung wurden über ¹H-NMR Spektroskopie und Größenausschlusschromatographie bestimmt.²⁷⁹

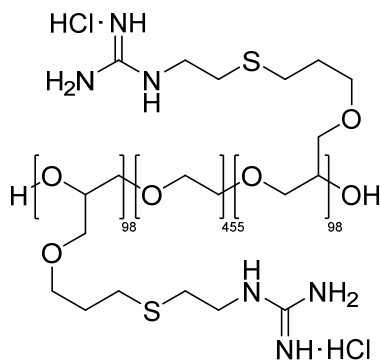
5.2.1.6 Funktionalisierung von PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolymeren mit Ammonium- und Sulfonat-Gruppen



Für die Modifikation des Triblockcopolymers mittels Thiol-En-Click-Chemie wurden PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ und die jeweilige, über einen Thiol-Linker verknüpfte funktionelle Gruppe (Cysteaminhydrochlorid bzw. Natrium-3-mercaptopropansulfonat, 5 Äq. pro Alken-Gruppe) in einem DMF/H₂O (1:1) Gemisch gelöst. Nach Zugabe des Photoinitiators 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPA, 0,05 Äq. pro Alken-Gruppe) wurde die Reaktionslösung unter N₂-Atmosphäre mit UV-Licht (365 nm, 5 W) und unter Rühren für 6 h bestrahlt. Anschließend wurde das Reaktionsprodukt mit dH₂O verdünnt, in Dialyseschläuche überführt (Cellulose, MWCO: 3,5 kDa) und gegen dH₂O für 7 Tage dialysiert.

Nach Lyophilisation wurden die Triblockcopolyelektrolyte a-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ und s-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ als weiße Feststoffe erhalten.²⁷⁹

5.2.1.7 Funktionalisierung von PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolymeren mit Guanidinium-Gruppen



Für die Guanidinium-Modifikation wurde a-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ in PBS gelöst und 1H-Pyrazol-1-carboxamidin (4 Äq. pro Alkengruppe) zugegeben. Anschließend wurde ein pH-Wert von 10 durch Zugabe von 10 M NaOH-Lösung eingestellt. Die Reaktionslösung wurde bei RT für 3 Tage gerührt, während der pH-Wert bei 10 gehalten wurde. Das Reaktionsprodukt wurde mit dH₂O verdünnt, in Dialyseschläuche überführt (Cellulose, MWCO: 3,5 kDa) und gegen dH₂O für 7 Tage dialysiert. Nach Lyophilisation wurde das Triblockcopolyelektrolyt g-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ als weißer bis gelblicher Feststoff erhalten.²⁷⁹

5.2.2 Chemische Analytik

5.2.2.1 NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren wurden mit einem 400 MHz NMR-Spektrometer (AVANCE 400, Bruker) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* (ppm) tieffeldverschoben von der Tetramethylsilan (TMS)-Referenz angegeben und auf das deuterierte Lösungsmittel D₂O (4,80 ppm) bzw. CDCl₃ (7,26 ppm) kalibriert. Die Beschreibung der Signale umfasst: s = Singulett, bs = breites Signal, dd = Dublett von Dublett, m = Multiplett. ¹H-NMR-Spektren von Gelatine, GelMA, GelNB und GelS wurden bei einer Temperatur von 315 K gemessen, um eine Gelierung der Probe während der Messung zu vermeiden.

5.2.2.2 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA)-Assay

5.2.2.2.1 Bestimmung des Gehalts an freien Aminogruppen in Gelatine Typ A

Die quantitative Bestimmung primärer Aminogruppen in Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, Gelierkraft: ~ 300 g Bloom) erfolgte kolorimetrisch mittels TNBSA-Assay über eine Standardkurve mit Glycin ($2\text{-}12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Der TNBSA-Assay wurde in Anlehnung an ein Protokoll aus der Literatur durchgeführt.¹⁵⁶ Zu jeweils 500 μL Probevolumen in Natrium-Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 8,5) wurden 250 μL TNBSA (0,01 % (v/v)) gegeben und die Reaktionslösung bei 37 °C für 4 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 125 μL HCl (1 M) abgestoppt und 250 μL SDS (10 % (w/v)) zugegeben. Für den jeweiligen Blank wurden 500 μL Probevolumen mit 125 μL HCl (1 M) versetzt, anschließend 250 μL TNBSA (0,01 % (v/v)) zugegeben und unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden 250 μL SDS (10 % (w/v)) zum Blank zugegeben. Die Absorption der Proben und Blanks wurde bei 335 nm gemessen (SmartSpec™ 3000, Bio-Rad Laboratories). Für die erhaltenen Absorptionswerte der Glycin-Verdünnungsreihe wurde eine lineare Trendlinie erstellt. Die durchschnittliche Stoffmenge freier Aminogruppen pro Gramm Gelatine wurde aus dem gemessenen Absorptionswert einer Gelatine-Probe ($200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) berechnet.

5.2.2.2.2 Bestimmung des Funktionalisierungsgrads der Hydrogelvorläufer

Der Anteil von modifizierten freien Aminogruppen der synthetisierten Gelatinederivate wurde mittels TNBSA-Assay bestimmt. Grundlage bildeten Lösungen von Gelatine, GelMA, GelNB und Gels (je $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in Natrium-Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0,1 M, pH 8,5). Die Durchführung des TNBSA-Assays erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Funktionalisierungsgrad (DoF) wurde aus dem Verhältnis der gemessenen Absorptionswerte von funktionalisierter und unfunktionalisierter Gelatine berechnet.

$$\text{DoF [\%]} = \left(1 - \frac{A(\text{Gelatinederivat})}{A(\text{Gelatine})} \right) \times 100\ \% \quad (6)$$

5.2.3 Herstellung der Biomaterial- bzw. Biotinten-Formulierungen

5.2.3.1 PETA-Photolack

PETA wurde mit 2 % (w/v) DETC versetzt und die Lösung anschließend gevortext. Als Photolack wurde eine transparente, gelbliche Flüssigkeit erhalten.

5.2.3.2 Acrylat-basierter PCL-Photolack

PCLTA wurde mit 2 % (w/v) Irgacure 369 versetzt. Anschließend wurde die 10- bis 50-fache Menge an DCM zugegeben, um den Lösungsvorgang des Photoinitiators in der viskosen Photomonomer-Lösung zu beschleunigen. Das Gemisch wurde gevortext und mittels PTFE-Filter (Porengröße: 0,2 μm) filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Photolack wurde eine transparente, gelbliche Flüssigkeit erhalten.

5.2.3.3 Thiol-Acrylat-basierter PCL-Photolack

PCLTA (1 Äq.) wurde mit einer äquimolaren Menge an Trimethylolpropantri(3-mercaptopropionat) (1 Äq.), den Stabilisatoren Pyrogallol (0,02 Äq.) und Vinylphosphonsäure (0,04 Äq.) sowie 2 % (w/v) Irgacure 369 versetzt. Anschließend wurde die 10- bis 50-fache Menge an DCM zugegeben, das Gemisch gevortext und mittels PTFE-Filter (0,2 μm) filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Als Photolack wurde eine transparente, gelbliche Flüssigkeit erhalten.

5.2.3.4 GelMA-Hydrogele

Der Hydrogelvorläufer GelMA wurde bei 40 °C in DPBS^{-/-} gelöst. Es wurde eine 5%ige (w/v) GelMA-Hydrogelvorläuferlösung mit 0,3 % (w/v) Photoinitiator LAP hergestellt. Die Photopolymerisation zum Hydrogel erfolgte durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) für 1 min (Omniculture S2000, igb-tech).

Low/Medium/High

	GelMA <i>Low, Medium, High</i> (10 %)	LAP (10 %)	DPBS ^{-/-}
(w/v) in Hydrogel	5 %	0,3 %	
für 1 mL Hydrogel	500 µL	30 µL	470 µL

5.2.3.5 GelNB/DTT-Hydrogele

Der Hydrogelvorläufer GelNB wurde bei 40 °C in DPBS^{-/-} gelöst. Es wurde eine 5%ige (w/v) GelNB-Hydrogelvorläuferlösung mit 0,3 % (w/v) Photoinitiator LAP hergestellt. Zuletzt wurde DTT in einer Konzentration von 15 mM zugegeben. Die Photopolymerisation zum Hydrogel erfolgte durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) für 30 s (Omniculture S2000, igb-tech).

Medium

	GelNB <i>Medium</i> (10 %)	DTT (1 M)	LAP (10 %)	DPBS ^{-/-}
(w/v), Konz. in Hydrogel	5 %	15 mM	0,3 %	
für 1 mL Hydrogel	500 µL	15 µL	30 µL	455 µL

5.2.3.6 GelNB/GelS-Hydrogele

Es wurden Stammlösungen der jeweiligen Hydrogelvorläufer GelNB und GelS in DPBS^{-/-} hergestellt. Um den Lösungsvorgang von GelS zu beschleunigen, wurde die Temperatur auf 50-70 °C erhöht. Nach vollständigem Lösen wurden GelNB (*Low*, *Medium*, *High*) und GelS (*Low*, *Medium*) in äquimolarem Verhältnis hinsichtlich der photoreaktiven Gruppen (NB:S = 1:1) gemischt und eine 5%ige (w/v) GelNB/GelS-Hydrogelvorläuferlösung hergestellt. Zuletzt wurde LAP in einer Konzentration von 0,03 % (w/v) zugegeben. Die Photopolymerisation zum Hydrogel erfolgte durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻²) für 1-10 s (Omniculture S2000, igb-tech).

Low

	GelNB <i>Low</i> (10 %)	GelS <i>Low</i> (5 %)	LAP (10 %)	DPBS ^{-/-}
(w/v) in Hydrogel	2,5 %	2,5 %	0,03 %	
für 1 mL Hydrogel	250 µL	500 µL	3 µL	247 µL

Medium

	GelNB <i>Medium</i> (10 %)	GelS <i>Medium</i> (5 %)	LAP (10 %)	DPBS ^{-/-}
(w/v) in Hydrogel	2,5 %	2,5 %	0,03 %	
für 1 mL Hydrogel	250 µL	500 µL	3 µL	247 µL

High

	GelNB <i>High</i> (10 %)	GelS <i>Medium</i> (5 %)	LAP (10 %)	DPBS ^{-/-}
(w/v) in Hydrogel	1,7 %	3,3 %	0,03 %	
für 1 mL Hydrogel	170 µL	660 µL	3 µL	167 µL

5.2.3.7 Polyelektrolyt-Komplex (PEC)-Hydrogele

Für die Herstellung der PEC-Hydrogele wurden Stammlösungen der funktionalisierten PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolyelektrolyte (50 % (w/v)) in dH₂O verwendet. Das kationische Triblockcopolyelektrolyt (a-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ bzw. g-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈) wurde mit dH₂O gemischt und anschließend für 60 s gevortext, um eine homogene Lösung zu erhalten. Anschließend wurde das anionische Triblockcopolyelektrolyt (s-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈) in äquimolarem Verhältnis zu den geladenen Gruppen (kationisch/anionisch = 1:1) zugegeben und die Hydrogellösung für 60 s gevortext.

5.2.3.8 Interpenetrating-Polymer-Network (IPN)-Hydrogele

Für die Herstellung der IPN-Hydrogele wurden Stammlösungen der funktionalisierten PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈-Triblockcopolyelektrolyte (50 % (w/v)), des Photomonomers 4-arm PEGA (50 % (w/v)) und des Photoinitiators Irgacure 2959 (5 % (w/v)) jeweils in dH₂O verwendet. Das kationische Triblockcopolyelektrolyt (a-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈ bzw. g-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈) wurde zu einer Lösung aus 4-arm PEGA und Irgacure 2959 gegeben. Die Reihenfolge der Zugabe sowie eine gute Durchmischung durch intensives Vortexen nach jedem Schritt waren essenziell, um eine homogene Interpenetration zwischen 4-arm PEGA-Monomeren und kationischen Triblockcopolyelektrolyten zu erreichen. Zuletzt wurde das anionische Triblockcopolyelektrolyt (s-PAGE₉₈-PEG₄₅₅-PAGE₉₈) in äquimolarem Verhältnis zu den geladenen Gruppen (kationisch/anionisch = 1:1) zugegeben und das semi-IPN für 60 s gevortext. Anschließend erfolgte die photochemische Vernetzung der 4-arm PEGA-Monomere durch Bestrahlung mit UV-Licht (302 nm, 5 W) für 5 min. Als Produkt wurde ein IPN-Hydrogel mit interpenetrierenden kovalenten und nicht-kovalenten Polymernetzwerken erhalten.

5.2.3.9 Synthese einer kombinatorischen GelPEG-Bibliothek

Für die kommerziell erworbenen PEGMA- und PEGDMA-Photomomere wurden im ersten Schritt die Inhibitoren durch Filtration über basisches Aluminiumoxid (Alfa Aesar) entfernt. Eine kombinatorische Bibliothek aus Hydrogelvorläuferlösungen mit variierenden Anteilen von PEGMA, PEGDMA und GelMA (*Low, Medium, High*) wurde gemäß der Tabelle in *Abbildung 53 C* hergestellt. Anschließend wurden je 240 μl der jeweiligen Vorläuferlösung in eine Silikon-Form (14 mm \times 5 mm \times 3 mm) überführt und durch Bestrahlung mit langwelligem UV-A-Licht (360 nm, 6 mW \cdot cm $^{-2}$, 2 min) zum Hydrogel ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die erhaltenen Hydrogelblöcke für 24 h in dH $_2$ O gequollen.

5.2.4 Materialcharakterisierung

5.2.4.1 Quellverhältnis von GelNB/GelS-Hydrogelen

Es wurde das Quellverhältnis von 5%igen (w/v) GelNB/GelS-Hydrogelen (*Low, Medium, High*) ermittelt. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach Lyophilisation wurde das Trockengewicht bestimmt und die Hydrogelproben in DPBS/- bei RT für 48 h gequollen. Nach Entfernung von überschüssigem Wasser von der Hydrogeloberfläche mit einem Tuch wurde das Gewicht der gequollenen Proben gemessen. Das Quellverhältnis der Hydrogele wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei w_{trocken} das Gewicht der lyophilisierten Hydrogelprobe und $w_{\text{gequollen}}$ das Gewicht nach vollständigem Quellen darstellt.

$$\text{Massenquellverhältnis} = \frac{w_{\text{gequollen}}}{w_{\text{trocken}}} \quad (7)$$

5.2.4.2 Ellman's Assay

Mittels Ellman's Assay wurde der Anteil freier Thiol-Gruppen in photopolymerisierten GelNB/GelS-Hydrogelen mit variierendem Thiol-zu-Norbornen-Verhältnis (NB:S = 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10) bestimmt. Entsprechende GelS-Hydrogele ohne GelNB-Zusatz dienten als Kontrolle und wurden durch Abkühlung der Vorläuferlösung auf 4 °C für 20 min hergestellt. Der Ellman's Assay wurde in Anlehnung an ein Protokoll aus der Literatur durchgeführt.³⁴⁰ Die GelNB/GelS-Hydrogele und die jeweiligen Kontrollen wurden in Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,4, 1 mM EDTA) zusammen mit dem Ellman's Reagenz (0,2 mM) bei RT für 6 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 200 µL der Lösung in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption bei 412 nm gemessen (SpectraMax iD3, Molecular Devices). Der Anteil nicht-reagierter Thiol-Gruppen wurde nach folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Freie Thiol-Gruppen [\%]} = \frac{A (\text{GelNB/GelS})}{A (\text{GelS-Kontrolle})} \times 100 \% \quad (8)$$

5.2.4.3 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

PEC- bzw. PEC/C-Hydrogelproben wurden in den Löchern (Durchmesser: 3 mm) eines SAXS-Aluminiumstreifens wie in 5.2.3.7 und 5.2.3.8 beschreiben hergestellt, der anschließend auf beiden Seiten mit Kaptonband verschlossen wurde, um die Evaporation von Wasser zu verhindern. Kleinwinkel-Röntgenstreuungsmessungen wurden mit Röntgenstrahlen von 13 keV an der *Beamline 12-ID-B* der *Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory*, durchgeführt. Der Abstand zwischen Probe und Detektor war 4 m und der Wellenvektor (q) reichte von $0,0002 \text{ \AA}^{-1}$ bis $0,5 \text{ \AA}^{-1}$. Die Belichtungszeit betrug 0,1 s. Alle Experimente wurden bei RT durchgeführt. Die 2D-Streudaten wurden mit Hilfe des SAXSLee-Pakets in 1D-Daten umgewandelt. Die Streuintensität der Probe wurde durch Subtraktion des Lösungsmittelhintergrunds von der gemessenen Streuintensität erhalten. Aus den ermittelten SAXS-Daten wurden Durchmesser und Abstände der PEC-Domänen berechnet. SAXS-Messungen und Berechnungen wurden von Defu Li (*Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Samuelli School of Engineering, UCLA, AG Asst. Prof. Dr. Samanvaya Srivastava*) durchgeführt.

5.2.4.4 Rheologische Messungen

Oszillationsmessungen wurden an einem Rheometer (Anton Paar, MCR 302) unter Verwendung eines Platte-Platte-Systems (Durchmesser: 8 mm, Messspalt: 5 mm) für chemisch vernetzte PEC/C-Hydrogele und eines Kegel-Platte-Systems (Durchmesser: 10 mm, Kegelwinkel: 2°) für chemisch unvernetzte PEC- bzw. PEC/C-Hydrogellösungen durchgeführt. Für die Herstellung der chemisch vernetzten Proben wurden $75 \mu\text{L}$ Hydrogelvorläuferlösung in eine PDMS-Form mit zylindrischer Vertiefung (Durchmesser: 8 mm, Höhe: 8 mm) pipettiert und anschließend durch Photopolymerisation ausgehärtet. Alle rheologischen Messungen wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Lösungsmittelfalle verwendet, um ein Austrocknen der Hydrogele während der Messung zu vermeiden. Vor Erfassung der rheologischen Daten wurden alle Proben zur Equilibration für 40 min vorab geschert. Amplituden-Sweeps (0,01-100 %) wurden bei einer Kreisfrequenz von $\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessen, um den linear-viskoelastischen Bereich (LVE) zu bestimmen. Frequenz-Sweeps (0,01-100 Hz) wurden bei einer Scherdeformation von $\gamma = 0,3 \text{ \%}$ gemessen. Ein zyklischer Deformations-Sweep (engl. *cyclic strain sweep*) mit aufeinanderfolgenden Perioden geringer ($\gamma = 0,3 \text{ \%}$, 240 s) und hoher

($\gamma = 100 \%$, 60 s) Scherdeformation wurde durchgeführt, um die Erholung der Hydrogele nach erfolgter Deformation zu bewerten. Rotationsmessungen mit steigender Scherrate (0,1-100 s^{-1}) zur Bestimmung der Viskosität wurden bei einer Kreisfrequenz von $\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Scherdeformation von $\gamma = 0,3 \%$ durchgeführt.

5.2.4.5 Zugversuche von IPN-Hydrogelen

Die Zugversuche wurden mit der mechanischen Zugprüfmaschine Instron 5542 durchgeführt. Für die Herstellung der Proben wurden 70 μL Hydrogelvorläuferlösung in eine PDMS-Form mit rechteckiger Vertiefung (14 mm \times 5 mm \times 1 mm) pipettiert und anschließend durch Photopolymerisation vernetzt. Die Hydrogele wurden zwischen doppelseitiges Klebeband innerhalb der Klemmen des Geräts eingespannt. Die Dehngeschwindigkeit betrug 1 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Alle Daten wurden bis zum Zerreißen der jeweiligen Hydrogelprobe akquiriert. Aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm wurden Zugfestigkeit, Zähigkeit, Elastizitätsmodul und Dehnbarkeit der Hydrogele bestimmt.

5.2.4.6 Quellverhältnis von IPN-Hydrogelen

Für die Herstellung der Proben zur Untersuchung der Quellbarkeit wurden 60 μL Hydrogelvorläuferlösung in eine PDMS-Form mit zylindrischer Vertiefung pipettiert und durch Photopolymerisation vernetzt. Anschließend wurden die Proben in dH_2O für einen Zeitraum von insgesamt 48 h gequollen. Nach 0 h, 1 h, 4 h, 9 h, 24 h, 48 h wurde das Gewicht der Hydrogelproben gemessen, nachdem das Wasser an der Hydrogeloberfläche vorsichtig mit einem Tuch entfernt wurde. Das Quellverhältnis der Hydrogele wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei w_0 das Startgewicht und w_t das Gewicht zum Zeitpunkt t darstellt.

$$\text{Quellverhältnis [\%]} = \frac{w_t - w_0}{w_0} \times 100 \% \quad (9)$$

5.2.5 Diffusionsstudie

Für die Diffusionsstudie wurden Gelatine-basierte Hydrogelfilme definierter Größenabmessungen (3 cm × 3 cm × 1 mm) hergestellt. Dazu wurde die flüssige GelMA-Lösung mit dem Photoinitiator LAP (0,3 % (w/v)) und dem zu untersuchenden Stoff (Methylenblau: 2 mM, Glucose und Dextran: je 30 mg·mL⁻¹) versetzt. Anschließend wurden 900 µL der Hydrogelvorläuferlösung in eine 3D-gedruckte Gussform (Ultimaker³ Extended 3D-Drucker) überführt und durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻², 2 min) zum Hydrogel ausgehärtet (Omnicure S2000, igb-tech). Der Hydrogelfilm wurde in ein Becherglas mit 50 mL dH₂O, das auf 37 °C vorgewärmt wurde, überführt. Die Gussform wurde dabei mit dem Hydrogelfilm nach unten zeigend auf die Wasseroberfläche gesetzt. Die Freisetzung des gelösten Stoffes gemäß der Fick'schen Diffusion wurde bei 37 °C unter leichtem Rühren über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Nach festgelegten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 1440 min) wurden jeweils Proben aus dem Becherglas entnommen und die freigesetzte Menge des untersuchten Stoffes aus dem Hydrogelfilm bestimmt. Die partielle Freisetzung wurde gemäß den Approximationen des Ritger-Peppas-Modells aufgetragen. Nach Erstellung einer linearen Trendlinie wurde der Diffusionskoeffizient D_K für kurze Zeiten bzw. D_L für lange Zeiten aus der jeweiligen Steigung m berechnet.

$$D_K \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right] = \left(\frac{m_K}{4} \right)^2 \cdot \frac{\pi \cdot 1^2}{60 \text{ s}} \quad (10)$$

$$D_L \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right] = - \frac{m_L \cdot 1^2}{\pi^2 \cdot 60 \text{ s}} \quad (11)$$

5.2.5.1 Photometrischer Nachweis von Methylenblau

Die Freisetzung von Methylenblau aus dem Hydrogelfilm in die umgebende Lösung wurde durch Absorptionsmessung bei 660 nm bestimmt. Dazu wurden aus dem Becherglas 1 mL Probe entnommen, in eine Küvette überführt und die Absorption gemessen (SmartSpec™ 3000, Bio-Rad Laboratories). Anschließend wurde das Probenvolumen der Gesamtlösung wieder zugeführt.

5.2.5.2 Kolorimetrischer Nachweis von Glucose und Dextran

Die Menge an freigesetzter Glucose bzw. Dextran (2,5, 10, 100, 500 kDa) in die umgebende Lösung wurde kolorimetrisch bestimmt. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll der Phenol-Schwefelsäure-Methode verwendet.³⁴¹ Es wurden 40 μL Probevolumen mit 40 μL einer 5%igen (v/v) wässrigen Phenollösung und 200 μL konzentrierter Schwefelsäure (95-97 %) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 s gevortext und anschließend für 10 min bei 90 °C auf dem Thermomixer inkubiert. Nach Abkühlung auf RT wurden 200 μL in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption bei 490 nm gemessen (SpectraMax iD3, Molecular Devices).

5.2.6 Degradationsstudien

5.2.6.1 Hydrolytischer Abbau von PCL-Würfeln

Die flüssigen PCL-Photomonomerlösungen (Acrylat- und Thiol-Acrylat-basiert) wurden in eine PDMS-Form mit einer würfelförmigen Vertiefung mit einer Kantenlänge von 4 mm pipettiert und durch Bestrahlung mit UV-A-Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻², 2 min, Omnicure S2000, igb-tech) vernetzt. Die erhaltenen Würfel bildeten die Grundlage für eine makroskopische Degradationsstudie. Die Würfel wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 56 Tagen in PBS und 24 Tagen in NaOH-Lösung (0,1 M, 1 M, 10 M) inkubiert, wobei alle zwei Tage die Degradationslösung gewechselt wurde. Der Abbauprozess wurde durch tägliche Gewichtsmessungen verfolgt. Die Berechnung des verbleibenden Gewichts erfolgte nach folgender Gleichung, wobei w_0 das Startgewicht und w_t das Gewicht zum Zeitpunkt t darstellt.

$$\text{Verbleibendes Gewicht [\%]} = \frac{w_t}{w_0} \times 100 \% \quad (12)$$

5.2.6.2 Hydrolytischer Abbau von DLW-Boxringen unter zellfreien Bedingungen

Es wurde ein 5 × 5 Boxring-Array aus dem PCLTA-Photolack auf einem silanisierten Glassubstrat mittels DLW erzeugt, der die Grundlage für die Degradationsstudie bildete. Die Glassubstrate wurden bei 37 °C über einen Zeitraum von 31 Tagen in PBS und 1 M NaOH-Lösung inkubiert und der Abbauprozess der Boxringe mikroskopisch verfolgt (Leica DM IL LED, Leica Microsystems).

5.2.6.3 Hydrolytischer Abbau von DLW-Boxringen unter Zellkulturbedingungen

Ein Tropfen mit einem Volumen von 50 µL, in dem 1 × 10⁴ NHDF suspendiert waren, wurde auf das bedruckte Glassubstrat so aufgebracht, dass der 5 × 5 Boxring-Array vollständig bedeckt war. Für das Anwachsen der Fibroblasten wurde das Glassubstrat für ca. 3 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Um dabei ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden jede Stunde einige Mikroliter zusätzliches DMEM zugegeben. Anschließend wurde das Glassubstrat in eine DMEM-befüllte Petrischale überführt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Alle drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Der Abbauprozess der Boxringe wurde mikroskopisch verfolgt (Leica DM IL LED, Leica Microsystems).

5.2.6.4 Biodegradation von GelNB/GelS-Hydrogelen

Es wurde die *in-vitro*-Bioabbaubarkeit von 5%igen (w/v) GelNB/GelS-Hydrogelen (*Low*, *Medium*, *High*) untersucht. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach Lyophilisation wurde das Trockengewicht bestimmt und die Proben in DPBS⁻ mit 10 % (v/v) FCS für 14 Tage inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Die Degradationslösung wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Nach 1, 2, 3, 4, 7 und 14 Tagen wurden die Hydrogelproben lyophilisiert und das Gewicht gemessen. Grundlage für den jeweiligen Zeitpunkt bildeten separate Hydrogelproben. Das verbleibende Gewicht in Prozent wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei w_0 das Trockengewicht der Hydrogelprobe vor der Degradation und w_t das Trockengewicht zum Zeitpunkt t darstellt.

$$\text{Verbleibendes Gewicht [\%]} = \frac{w_t}{w_0} \times 100 \% \quad (12)$$

5.2.6.5 Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit von variierenden PEGMA/PEGDMA/GelMA-Anteilen

Die Photodegradierbarkeit der jeweiligen Hydrogelformulierung aus der kombinatorischen GelPEG-Bibliothek wurde durch Gewichtsmessungen vor und nach Bestrahlung mit UV-C-Licht (270 nm, 22 mW·cm⁻², 10 min) bestimmt. Die flüssigen Degradationsprodukte wurden dabei vor dem Wiegen vorsichtig mit einem Tuch entfernt. Die Photodegradierbarkeit der Hydrogele wurde nach folgender Gleichung berechnet.

$$\text{Photodegradierbarkeit [\%]} = \frac{w \text{ (vor Degrad.)} - w \text{ (nach Degrad.)}}{w \text{ (vor Degrad.)}} \times 100 \% \quad (5)$$

5.2.6.6 Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit von der Geldicke

Um die Abhängigkeit des Degradationsverlaufs von der Dicke der Hydrogele zu untersuchen, wurden unterschiedliche Volumina (80 μL , 120 μL , 180 μL) der Vorläuferlösung in die Silikon-Form (14 mm \times 5 mm \times 3 mm) gegeben und zum Hydrogel photopolymerisiert. Nach vollständigem Quellen in DMEM (ohne FCS, ohne Phenolrot) wurden die Hydrogele mit UV-C-Licht (270 nm, 22 mW \cdot cm $^{-2}$) bestrahlt und die Dicke der jeweiligen Hydrogele nach unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 5 min, 10 min) gemessen.

5.2.6.7 Photodegradierbarkeit von GelPEG-Hydrogelen in Abhängigkeit des verwendeten Zellkulturmediums

Um den Degradationsverlauf in unterschiedlichen Kultivierungsmedien zu untersuchen, wurden die mit Hilfe der Silikon-Form (14 mm \times 5 mm \times 3 mm) hergestellten Hydrogelblöcke (aus je 240 μL Vorläuferlösung) über Nacht in verschiedenen Medien gequollen:

1. PBS
2. DMEM (ohne FCS, ohne Phenolrot)
3. DMEM (ohne FCS, mit Phenolrot)
4. DMEM (mit FCS, ohne Phenolrot)
5. DMEM (mit FCS, mit Phenolrot)

Es wurde die jeweilige Dicke der gequollenen Hydrogele bestimmt. Anschließend wurden die Hydrogele mit UV-C-Licht (270 nm, 22 mW \cdot cm $^{-2}$) bestrahlt und der Degradationsverlauf sowohl optisch als auch durch Messung der jeweiligen Dicke nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1 min, 5 min, 10 min) verfolgt (DSA 25 Kontaktwinkel-Goniometer).

5.2.7 *In-vitro*-Experimente in 2D-/3D-Zellkultur

5.2.7.1 Steriles Arbeiten und Sterilisation

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. Vor dem Beginn der sterilen Arbeiten wurden die Arbeitsfläche sowie verwendete Geräte, Materialien und Handschuhe mit 70%igem EtOH desinfiziert. Kultivierungsmaterialien, Medien, Reagenzien und Lösungen wurden erst unter der Sterilbank geöffnet. Alle Abfälle wurden vor ihrer Entsorgung autoklaviert.

5.2.7.2 Verwendete Zelllinien

Für die Zellexperimente wurden vier verschiedene humane Zelllinien herangezogen:

HeLa: humane Zervixkarzinomzellen

HepG2: humane Leberkarzinomzellen (*human hepatoma G2*)

NHDF: humane Fibroblasten (*normal human dermal fibroblasts*)

HUVEC: humane Nabelvenenendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*)

Für die Zelllinien HeLa, HepG2 und NHDF wurde als Kultivierungsmedium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) verwendet, das mit 10 % (v/v) FCS (*Fetal Calf Serum*) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Für die Zelllinie HUVEC wurde das Kultivierungsmedium EGM-2 (*Endothelial Cell Growth Medium-2*) mit EGM-2-Zusätzen eingesetzt.

5.2.7.3 Auftauen der Zellen

Die verwendeten Zelllinien HeLa, HepG2, NHDF und HUVEC wurden bei -196 °C im Stickstofftank gelagert. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die entsprechenden Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 75 cm^2 -Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben. Die Zellkulturflasche wurde bei 37 °C und 5 % CO_2 -Gehalt im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das im Einfriermedium enthaltene und für die Zellen schädigende DMSO zu entfernen. Dazu wurde das vorhandene Kultivierungsmedium entfernt, die adhärente Zellschicht mit DPBS⁻ (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) gewaschen und anschließend frisches Kultivierungsmedium zugegeben.

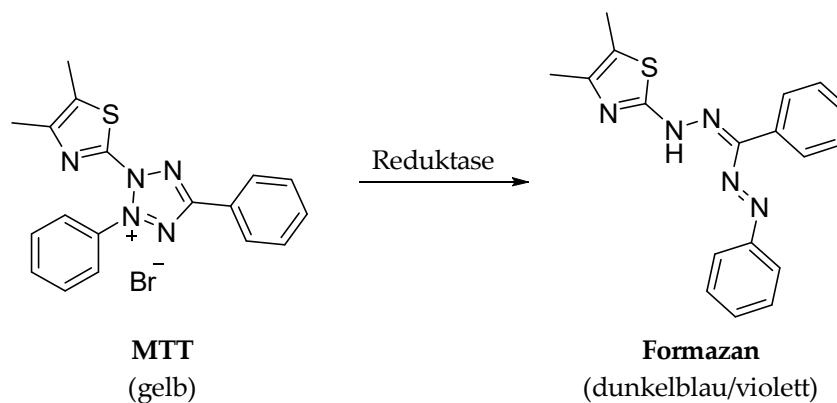
5.2.7.4 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen in EGM-2 (HUVEC) bzw. DMEM (HeLa, HepG2, NHDF) in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt sowie gesättigter Luftfeuchtigkeit. Nach dem Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen entweder im Verhältnis 1:5, 1:10 oder 1:20 passagiert. Dazu wurde das vorhandene Kultivierungsmedium entfernt und die adhärenzte Zellschicht mit DPBS⁻ gewaschen, um tote Zellen sowie Medienrückstände zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,125 % (HUVEC) bzw. 0,25 % (HeLa, HepG2, NHDF) Trypsin-EDTA-Lösung behandelt und für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche überprüft und gegebenenfalls durch leichtes Klopfen mit der Hand unterstützt. Anschließend wurde die Wirkung von Trypsin durch die Zugabe des Trypsininhibitors (HUVEC) bzw. des entsprechenden Zellkulturmediums (HeLa, HepG2, NHDF) gestoppt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und nach erfolgter Verdünnung in eine neue Kulturflasche mit vorgelegtem Medium zur weiteren Kultivierung überführt. Für den Einsatz der Zellen in den jeweiligen 2D-/3D-Zellkulturexperimenten wurde ein kleines Volumen (ca. 10 µL) der unverdünnten Zellen in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die Zellzahl ermittelt und die Zellsuspension auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt. Der nicht benötigte Rest der Zellsuspension wurde verworfen.

5.2.7.5 Einfrieren der Zellen

Das Einfrieren von Zellen erfolgte, sobald eine Konfluenz von 80 % bis 90 % erreicht wurde. Die Zellen wurden, wie bereits in 5.2.7.4 beschrieben, geerntet und in ein Falconröhrchen überführt. Das Kultivierungsmedium wurde abzentrifugiert (1200 rpm, 3 min) und das erhaltene Zellpellet in einem entsprechenden Volumen an Einfriermedium aufgenommen, sodass eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen·mL⁻¹ erzielt wurde. Je 1 mL der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde dieses in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gesetzt, der mit 1 °C·min⁻¹ auf -80 °C heruntergekühlt wurde. Am nächsten Tag wurde das Kryoröhrchen in den Stickstofftank überführt und dort bei -196 °C bis zur erneuten Verwendung der Zellen gelagert.

5.2.7.6 MTT-Proliferationsassay



Schema 1: Enzymatische Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan-Derivat im Mitochondrium lebender Zellen.

a) Für wasserlösliche Testverbindungen

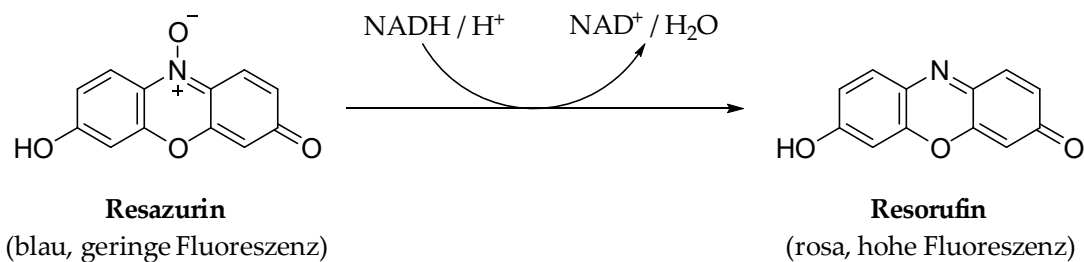
Es wurde ein MTT-Proliferationsassay durchgeführt, um die jeweilige Toxizität von Hydrogelvorläufern, Hydrogelabbauprodukten (enzymatisch bzw. nach Photodegradation), Photoinitiator und Crosslinker zu bestimmen. Es wurden 1×10^4 Zellen in je 100 μL Zellkulturmedium in einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert (37 $^\circ\text{C}$, 5 % CO_2). Nach 24 h wurden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt. Dazu wurde das vorhandene Medium entfernt und die Testsubstanzen in Kulturmedium in den gewünschten Konzentrationen zugegeben und für ausgewählte Expositionszeiten inkubiert (37 $^\circ\text{C}$, 5 % CO_2). Bei einer Expositionsdauer von unter 72 h wurden die Testsubstanzen zum jeweiligen Zeitpunkt wieder entfernt und frisches Zellkulturmedium zugegeben. In den jeweiligen Lebend- und Totkontrollen erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten ein Medienwechsel. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen der Totkontrolle mit 5 μL Triton X-100 (20 % (v/v)) abgetötet. Danach wurden in jedes Well 15 μL MTT gegeben und die 96-Well-Platte für weitere 3 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μL Lysispuffer gestoppt. Am Folgetag wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (SpectraMax iD3, Molecular Devices) gemessen. Die jeweiligen Zellviabilitäten wurden in Relation zur Lebend- und Totkontrolle ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus $n = 3$ berechnet.

	Konzentration	Expositionsdauer	Zelltyp	Zellkulturmedium
Hydrogelvorläufer (GelMA, GelNB, GelS)	5 %	10 min, 2 h, 24 h	HepG2	DMEM
Enzymatische Abbauprodukte (GelMA, GelNB/DTT, GelNB/GelS)	0,1 %, 1 %, 2 %	72 h	HepG2	DMEM
Photoabbauprodukte (GelPEG)	53 mg·mL und 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 Verdünnung	72 h	HeLa	DMEM
Photoinitiator (LAP)	0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,3 %	24 h	HUVEC	EGM-2
Crosslinker (DTT)	15 mM	10 min, 20 min, 40 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h	HepG2	DMEM

b) Photolack-Beschichtungen

Für die Evaluation der Biokompatibilität von PETA und PCLTA wurden die Wells einer 96-Well-Platte mit dem jeweiligen Photolack beschichtet und durch Bestrahlung mit UV-A-Licht ausgehärtet. Anschließend wurden 2×10^4 HepG2-Zellen in je 100 μ L DMEM auf den beschichteten Wells ausgesät. Als Lebendkontrolle dienten unbeschichtete Wells. Nach 72-stündiger Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO₂) wurden die Zellen der Totkontrolle mit 5 μ L Triton X-100 (20 % (v/v)) abgetötet. Danach wurden in jedes Well 15 μ L MTT gegeben und die 96-Well-Platte für weitere 3 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ L Lysispuffer gestoppt. Am Folgetag wurden 150 μ L aus jedem Well in eine neue unbeschichtete 96-Well-Platte überführt und die Absorption der Lösungen bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (SpectraMax iD3, Molecular Devices) gemessen. Die Zellviabilitäten für die PCLTA- und PETA-Beschichtungen wurden in Relation zur Lebend- und Totkontrolle ermittelt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus $n = 5$ berechnet.

5.2.7.7 PrestoBlue-Proliferationsassay



Schema 2: NADH-abhängige Reduktion von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin in lebenden Zellen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität.

Die Zellviabilität und das Proliferationsverhalten von eingebetteten HepG2-Zellen in GelPEG-10- und PEG-10-Hydrogelen wurden mittels PrestoBlue Assay über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt. Grundlage hierfür bildeten 200 μL zellbeladene Hydrogele ($2,5 \times 10^6$ Zellen $\cdot\text{mL}^{-1}$) in einer 48-Well-Platte, die mit 1 mL DMEM überschichtet wurden. Entsprechende zellfreie Hydrogele fungierten als jeweilige Blanks. Die metabolische Aktivität wurde nach erfolgter Zelleinbettung an den Tagen 1, 2, 3 und 7 gemessen. Dazu wurde das vorhandene Zellkulturmedium entfernt, das Hydrogel einmal mit DPBS⁻ gewaschen und 300 μL PrestoBlue-Lösung (DMEM / PrestoBlue = 9:1) zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Danach wurden 100 μL des Überstands der jeweiligen Proben und Blanks in eine 96-Well-Platte überführt und die Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 600$ nm, Integrationszeit: 400 ms) mit einem Mikrotiterplatten-Spektralphotometer (SpectraMax iD3, Molecular Devices) gemessen. Die aufgetragene Fluoreszenzintensität ergab sich nach Abzug der Blanks für die gemessenen Zeitpunkte. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus $n = 3$ berechnet.

5.2.7.8 Färbung mit CellTracker Green CMFDA

Die NHDF wurden in DMEM für einen Tag auf den DLW-bedruckten Glassubstraten mit 5×5 Boxringen (aus PCLTA) kultiviert. Anschließend wurde das vorhandene Zellkulturmedium entfernt, das Glas einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellen mit CellTracker Green CMFDA (10 μ M) für 30 min bei 37 °C im Dunkeln gefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung wurde mit DPBS^{-/-} gewaschen und frisches DMEM zugegeben. Die Proben wurden durch Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B, Leica Microsystems) analysiert. Es wurden z-Stacks (Schrittgröße: 2 μ m bzw. 0,5 μ m) aufgenommen, die durch die LasX Software in 3D-Bilder umgewandelt wurden.

Mikroskop	Leica TCS SPE DMI4000B
Objektiv	ACS APO 10 \times /0.30 DRY bzw. ACS APO 40 \times /1.15 OIL
Format	1024 \times 1024 Pixel (400 Hz)
Lochblende	1 AU
Frame Average	6
Laser	405 nm 488 nm
Emission	PMT 1: 430 - 490 nm PMT 2: 490 - 540 nm

5.2.7.9 Färbung mit Phalloidin-FITC und Hoechst 33342

Die NHDF wurden auf den DLW-bedruckten Glassubstraten mit 5×5 Boxringen (aus PCLTA bzw. PETA) für 4 Tage bzw. 14 Tage in DMEM kultiviert. Anschließend wurde das vorhandene Zellkulturmedium entfernt, das Glas einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und die Zellen mit 4%iger (w/v) PFA-Lösung für 10 min bei RT im Dunkeln fixiert. Nach erneutem Waschen mit eisgekühltem DPBS^{-/-} wurden die Substrate bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Das Aktinzytoskelett der NHDF wurde mit Phalloidin-FITC (100 nM) für 40 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Zellkerne der NHDF mit Hoechst 33342 (2 μ g \cdot mL⁻¹) für 5 min bei RT gefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung wurde einmal mit DPBS^{-/-} gewaschen und neues DPBS^{-/-} zugegeben. Die Proben wurden durch Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B, Leica Microsystems) analysiert. Es wurden z-Stacks (Schrittgröße: 1 μ m) aufgenommen, die durch die LasX Software in 3D-Bilder umgewandelt wurden.

Mikroskop	Leica TCS SPE DMI4000B
Objektiv	ACS APO 40×/1.15 OIL
Format	1024 × 1024 Pixel (400 Hz)
Lochblende	1 AU
Frame Average	12
Laser	405 nm 532 nm
Emission	PMT 1: 415 - 480 nm PMT 2: 545 - 625 nm

5.2.7.10 Zelleinbettung in Gelatine-basierten Hydrogelen

NHDF (Passage 6-8, $2,5 \times 10^6$ Zellen·mL⁻¹ im Hydrogel) wurden in 5%igen Hydrogelvorläuferlösungen von GelMA, GelNB/DTT und GelNB/GelS mit einem Anteil von 0,3 % bzw. 0,03 % (w/v) des Photoinitiators LAP suspendiert. Anschließend wurden jeweils 200 µL der Hydrogelvorläuferlösung in einen 8-Well µ-slide (ibiTreat, ibidi) überführt und durch Bestrahlung mit UV-A-/sichtbarem Licht (320-500 nm, 500 mW·cm⁻², 1 s bis 1 min) zum Hydrogel ausgehärtet (Omniculture S2000, igb-tech). Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200 µl DMEM überschichtet und über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2-3 Tage durchgeführt.

5.2.7.11 Zelleinbettung im PEG- bzw. GelPEG-Hybrid-Hydrogel

NHDF (Passage 6-8, $2,5 \times 10^6$ Zellen·mL⁻¹ im Hydrogel), HeLa- oder HepG2-Zellen wurden in den Hydrogelvorläuferlösungen von PEG-10 bzw. GelPEG-10 mit einem Anteil von 0,3 % (w/v) des Photoinitiators LAP suspendiert. Aufgrund der hohen Toxizität der unvernetzten PEGMA- und PEGDMA-Monomere wurden die Zellen als letztes zugegeben. Anschließend wurden jeweils 200 µL der Biotinte sofort in einen 8-Well µ-slide (ibiTreat, ibidi) überführt und durch Bestrahlung mit langwelligem UV-A-Licht (360 nm, 6 mW·cm⁻², 2 min) zum Hydrogel ausgehärtet. Nach erfolgter Photopolymerisation wurden die Hydrogele mit 200 µl DMEM überschichtet und über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Regelmäßige Medienwechsel wurden alle 2-3 Tage durchgeführt.

5.2.7.12 Lebend-/Tot-Färbung

Die Viabilität der im jeweiligen Hydrogel eingebetteten Zellen wurde durch Lebend-/Tot-Färbungen bestimmt. Dazu wurde das überstehende Zellkulturmedium entfernt und die Hydrogele mit Calcein-AM ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und Propidiumiodid ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) für 20 min (37°C , 5 % CO_2) gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, die Hydrogele mehrmals mit DPBS⁻ gewaschen und frisches DMEM zugegeben. Die Proben wurden durch Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B, Leica Microsystems) analysiert. Es wurden z-Stacks (Höhe: $300 \mu\text{m}$, Schrittgröße: $5 \mu\text{m}$) aufgenommen, die durch die LAS X Software in 3D-Bilder umgewandelt wurden.

Mikroskop	Leica TCS SPE DMI4000B
Objektiv	ACS APO 10×/0.30 DRY
Format	1024×1024 Pixel (400 Hz)
Lochblende	1-1,5 AU
Frame Average	4
Laser	488 nm 532 nm
Emission	PMT 1: 495 - 584 nm PMT 2: 610 - 700 nm

5.2.8 Fabrikationsprozesse

5.2.8.1 *Direct Laser Writing*

Die DLW-Experimente wurden mit dem Photonic Professional GT (Nanoscribe) durchgeführt, dessen Laser Femtosekundenpulse bei einer Wellenlänge von 780 nm emittierte. Als Substrat fungierte ein silanisiertes Deckglas, auf welches ein Flüssigkeitstropfen mit einem Volumen von ca. 50 μL des PCLTA- bzw. PETA-Photolacks aufgebracht wurde. Der Laserstrahl wurde durch ein Ölimmersionsobjektiv (Zeiss Plan-Apochromat 63 \times /1,40 Öl) auf die Grenzfläche zwischen Deckglas und Photolack gerichtet, wodurch eine Zwei-Photonen-Polymerisation im Laserfokus induziert wurde. Aus der relativen Veränderung der Position des Glassubstrats zum Laserfokus durch ein galvanometrisches System erfolgte der Aufbau der 3D-Struktur. Nach Beendigung des Schreibprozesses wurde das Glassubstrat zur Entwicklung in ein Becherglas mit Aceton gegeben, um nicht polymerisierte Monomere zu entfernen. Die auf dem Glassubstrat zurückbleibenden DLW-Gerüststrukturen wurden anschließend entweder mittels Rasterelektronenmikroskopie (Zeiss Supra 55VP, Carl Zeiss) analysiert oder in Biokompatibilitäts- bzw. Degradationsstudien eingesetzt.

5.2.8.2 *Extrusionsbasiertes 3D-Bioprinting*

Die *3D-Bioprinting*-Experimente wurden mit einem extrusionsbasierten 3D-Drucker (3D Discovery Gen 1, regenHU) durchgeführt, der mit einem Kartuschensystem (Nordson EFD), Dosiernadeln (konisch, Durchmesser: 0,15 mm, Vieweg) und einem Kühlsystem (Pilote ONE, Peter Huber Kältemaschinenbau) ausgestattet war. Grundlage für das *3D-Bioprinting* bildeten 5%ige (w/v) Biotinten von GelMA (*Low, Medium, High*) und GelNB/GelS (*Low, Medium, High*). Nach Suspension der NHDF in der Vorläuferlösung ($2,5 \times 10^6$ Zellen·mL⁻¹) wurde die Biotinte in die Kartusche überführt, die anschließend verschlossen und über Kopf bei RT gelagert wurde, um eine Blasenbildung im Gel zu vermeiden. Die Kartusche wurde in den Druckkopf eingesetzt und die konische Nadel angeschlossen. Die Biotinte wurde mittels Kühlsystem auf eine Temperatur von 22 °C für 30 min gekühlt, um einen Viskositätsanstieg aufgrund der physikalischen Gelierung zu erzielen. Der Extrusionsdruck erfolgte bei einer Temperatur von 22 °C, einem Druck von 0,075 MPa und einer Druckgeschwindigkeit von 20 mm·min⁻¹. Es wurde eine zellbeladene Gitterstruktur (1 cm \times 1 cm) bestehend aus vier Schichten gedruckt, bei der jede Schicht durch Bestrahlung mit UV-A-/

sichtbarem Licht für 20 s vernetzt wurde (315-400 nm, 13,6 W, OSRAM Ultra Vitalux 300W E27, Osram-Licht). Die auf den Objektträger gedruckte Struktur wurde mit DPBS^{-/-} gewaschen und für die weitere Kultivierung in eine Petrischale mit DMEM überführt (37 °C, 5 % CO₂). Lebend-/Tot-Färbungen wurden an den Tagen 0, 7 und 14 durchgeführt mit anschließender Konfokalmikroskopie (Leica TCS SPE DMI4000B, Leica Microsystems) und Zellviabilitätsanalyse (Python-Software).

5.2.8.3 Subtraktives *Photopatterning*

Grundlage für die subtraktive Fertigung bildete die GelPEG-10-Biotinte mit HeLa-Zellen ($2,5 \times 10^6$ Zellen·mL⁻¹) und 0,3 % (w/v) LAP. Es wurde 1 mL der Biotinte in eine Teflon-Form (37,6 mm × 13,8 mm × 3 mm) gegeben und durch Bestrahlung mit langwelligem UV-A-Licht (360 nm, 6 mW·cm⁻², 2 min) zum Hydrogel photopolymerisiert. Nach Freisetzung der Hydrogelfilme aus der Teflon-Form wurden sie in eine Petrischale überführt und über Nacht in DMEM gequollen. Um eine schnelle UV-C-Degradation des GelPEG-10-Hydrogels zu gewährleisten, wurde FCS durch jeweils eine der folgenden drei Methoden transient entfernt:

1. Tausch von DMEM gegen DPBS^{-/-} für 3 h
2. Tausch von DMEM gegen FCS-freies DMEM für 3 h
3. Quellung des GelPEG-10-Hydrogels über Nacht in FCS-freiem DMEM

Die photodegradationsbasierte Strukturierung des FCS-freien GelPEG-10-Hydrogels erfolgte durch Bestrahlung mit UV-C-Licht (270 nm, 22 mW·cm⁻², 10 min) unter Verwendung einer jeweils geeigneten Chrom-beschichteten Photomaske aus Quarzglas. Nach erfolgtem *Photopatterning* wurde das strukturierte, zellbeladene Hydrogel in eine Petrischale mit DMEM für die weitere Kultivierung überführt.

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
γ	Scherdeformation
δ	chemische Verschiebung
λ_{em}	Emissionswellenlänge (engl. <i>emission wavelength</i>)
λ_{ex}	Anregungswellenlänge (engl. <i>excitation wavelength</i>)
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μmol	Mikromol
ω	Kreisfrequenz (engl. <i>angular frequency</i>)
^1H	Proton
2D	zweidimensional
2PA	Zwei-Photonen-Absorption
2PP	Zwei-Photonen-Polymerisation
3BP	<i>3D-Bioprinting</i>
3D	dreidimensional
Å	Ångström
a/s-PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈	Ammonium/Sulfonat-funktionalisiertes PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈
a/s-PEC	Ammonium/Sulfonat-basierter Polyelektrolyt-Komplex
AG	Arbeitsgruppe

AGE	Allylglycidylether
AHCT	<i>N</i> -Acetyl-DL-homocysteinthiolacton
Ala	Alanin
a-PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈	Ammonium-funktionalisiertes PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈
aq	in wässriger Lösung (engl. <i>aqueous solution</i>)
Äq.	Äquivalent/e
Arg	Arginin
ASC	adipöse Stammzellen (engl. <i>adipose-derived stem cells</i>)
Asp	Asparaginsäure
bs	breites Signal
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAD	rechnerunterstütztes Konstruieren (engl. <i>computer-aided design</i>)
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CDCl ₃	Chloroform-d
CellTracker Green CMFDA	CellTracker Green 5-Chloromethyl- fluoresceindiacetat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ColMA	Kollagen-Methacryloyl
d. h.	das heißt
D ₂ O	Deuteriumoxid
DCM	Dichlormethan

dd	Dublett von Dublett
DETC	7-Diethylamino-3-thenoylcoumarin
dH ₂ O	destilliertes Wasser
D _K	Diffusionskoeffizient (kurze Zeiten)
D _L	Diffusionskoeffizient (lange Zeiten)
DLW	<i>Direct Laser Writing</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	<i>Double-Network</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DoF	Funktionalisierungsgrad (engl. <i>degree of functionalization</i>)
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGM-2	<i>Endothelial Growth Medium-2</i>
EZM	Extrazellulärmatix
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FDM	Schmelzschtung (engl. <i>fused deposition modeling</i>)
g	Gramm
g/s-PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈	Guanidinium/Sulfonat-funktionalisiertes PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈

g/s-PEC	Guanidinium/Sulfonat-basierter Polyelektrolyt-Komplex
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
GelMA	Gelatine-Methacryloyl
GelNB	Norbornen-funktionalisierte Gelatine
GelPEG	Hybrid-Hydrogel auf Basis von methacrylierter Gelatine und Polyethylenglykol
GelS	thiolierte Gelatine
ggf.	gegebenenfalls
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
g-PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈	Guanidinium-funktionalisiertes PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈
h	Stunde/n
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAMA	Hyaluronsäure-Methacrylat
HCl _(aq)	Salzsäure
HeLa	humane Zervixkarzinomzellen
HepG2	humane Leberkarzinomzellen (engl. <i>human hepatoma G2</i>)
His	Histidin
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen (<i>human mesenchymal stem cells</i>)
HP	<i>Hewlett-Packard</i>

HUVEC	humane Nabelvenenendothelzellen (engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
Hyl	Hydroxylysin
Hyp	Hydroxyprolin
Hz	Hertz
IBCS-FMS	Institut für Biologische und Chemische Systeme - Funktionelle molekulare Systeme
Ile	Isoleucin
IPN	<i>Interpenetrating Polymer Network</i>
ITX	Isopropylthioxanthon
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KIT	Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
kJ	Kilojoule
LAP	Lithiumphenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LD ₅₀	letale Dosis 50 %
LED	lichtemittierende Diode (engl. <i>light-emitting diode</i>)
Leu	Leucin
LIFT	Laser-induzierter Vorwärtstransfer (engl. <i>laser-induced forward transfer</i>)
LVE-Bereich	linear-viskoelastischer Bereich (engl. <i>linear viscoelastic region</i>)
Lys	Lysin
m	Masse
m	Meter
m	Multipllett

M	Molarität
M	Molekulargewicht
m ³	Kubikmeter
MAA	Methacrylsäureanhydrid
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
Met	Methionin
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute/n
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
M _n	zahlenmittleres Molekulargewicht
mol	Mol
MPa	Megapascal
MPL	Multiphotonen-Lithographie
ms	Millisekunde/n
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
MWCO	Molekulargewichts-/Ausschlussgrenze (engl. <i>molecular weight cut-off</i>)
n	Stoffmenge
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NB:S	Norbornen-zu-Thiol-Verhältnis
NBCA	5-Norbornen-2-carbonsäure
NEt ₃	Triethylamin
NH ₂	Aminogruppe/n
NHDF	humane Fibroblasten (engl. <i>normal human dermal fibroblasts</i>)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	Kernspinresonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
o	ortho
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
ONB	o-Nitrobenzylgruppe
Pa	Pascal
PAA	Polyacrylsäure
PAGE _m -PEG _n -PAGE _m	Poly(allylglycidylether) _m -poly(ethylenglykol) _n - poly(allylglycidylether) _m
PAM	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCL	Polycaprolacton
PCLTA	Polycaprolactontriacylat
PDMS	Polydimethylsiloxan

PEC	Polyelektrolyt-Komplex
PEC/C	Hybrid-Hydrogel mit elektrostatischen (PEC) und kovalenten (C) Polymernetzwerkanteilen
PEG	Polyethylenglykol
PEGA	Polyethylenglykolacrylat
PEGDA	Polyethylenglykoldiacrylat
PEGDMA	Polyethylenglykoldimethacrylat
PEGMA	Polyethylenglykolmethacrylat
PEI	Polyethylenimin
PETA	Pentaerythritoltriacyrat
PETTA	Pentaerythritoltetraacrylat
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglykolid
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
Phalloidin-FITC	Phalloidin-Fluoresceinisothiocyanat
Phe	Phenylalanin
PI	Propidiumiodid
PLA	Polylactid
polyDADMAC	Polydiallyldimethylammoniumchlorid
ppm	Millionstel (engl. <i>parts per million</i>)
PR	Phenolrot
Pro	Prolin
PSS	Polystyrolsulfonsäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVA	Polyvinylalkohol
rad	Radiant

RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
s	Singulett
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (engl. <i>small-angle X-ray scattering</i>)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLA	Stereolithographie (engl. <i>stereolithography</i>)
SLS	Selektives Lasersintern (engl. <i>selective laser sintering</i>)
SN	<i>Single-Network</i>
s-PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈	Sulfonat-funktionalisiertes PAGE ₉₈ -PEG ₄₅₅ -PAGE ₉₈
STED	Abregung durch stimulierte Emission (engl. <i>stimulated emission depletion</i>)
TAD	Triazolindion
TED	<i>Technology, Entertainment, Design</i>
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
TMS	Tetramethylsilan
TNBSA	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
Tyr	Tyrosin
UCLA	<i>University of California, Los Angeles</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
UV-A	Ultraviolettstrahlung A (315-380 nm)
UV-C	Ultraviolettstrahlung C (100-280 nm)

V	Volumen
Val	Valin
vgl.	vergleichsweise
w	Gewicht (engl. <i>weight</i>)
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
w ₀	Startgewicht
w _{gequollen}	Gewicht nach Quellung
w _t	Gewicht zum Zeitpunkt t
w _{trocken}	Trockengewicht
z. B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

- (1) Obama, B. State of the Union Address. *U.S. Capitol, Washington, D.C.* **2013**.
- (2) 3D Printing Trends 2020: Industry highlights and market trends. *3D Hubs* **2020**.
- (3) Li, M. N.; Porter, A. L. Facilitating the discovery of relevant studies on risk analysis for three-dimensional printing based on an integrated framework. *Scientometrics* **2018**, *114* (1), 277.
- (4) Tack, P.; Victor, J.; Gemmel, P.; Annemans, L. 3D-printing techniques in a medical setting: a systematic literature review. *Biomed Eng Online* **2016**, *15* (1), 115.
- (5) Luo, H. X.; Meyer-Szary, J.; Wang, Z. M.; Sabiniewicz, R.; Liu, Y. H. Three-dimensional printing in cardiology: Current applications and future challenges. *Cardiol J* **2017**, *24* (4), 436.
- (6) Zhu, W.; Ma, X. Y.; Gou, M. L.; Mei, D. Q.; Zhang, K.; Chen, S. C. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotech* **2016**, *40*, 103.
- (7) Yi, H. G.; Lee, H.; Cho, D. W. 3D Printing of Organs-On-Chips. *Bioengineering (Basel)* **2017**, *4* (1).
- (8) Murphy, S. V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology* **2014**, *32* (8), 773.
- (9) Dick, A.; Bhandari, B.; Prakash, S. 3D printing of meat. *Meat Sci* **2019**, *153*, 35.
- (10) Radenkovic, D.; Solouk, A.; Seifalian, A. Personalized development of human organs using 3D printing technology. *Med Hypotheses* **2016**, *87*, 30.
- (11) Awad, A.; Trenfield, S. J.; Goyanes, A.; Gaisford, S.; Basit, A. W. Reshaping drug development using 3D printing. *Drug Discov Today* **2018**, *23* (8), 1547.
- (12) Sun, J.; Zhou, W. B.; Huang, D. J.; Fuh, J. Y. H.; Hong, G. S. An Overview of 3D Printing Technologies for Food Fabrication. *Food Bioprocess Tech* **2015**, *8* (8), 1605.
- (13) Kharb, A. INDUSTRIAL REVOLUTION – FROM INDUSTRY 1.0 TO INDUSTRY 4.0. *Journal of Advances in Computational Intelligence and Communication Technologies* **2018**, *2* (1).
- (14) Krafft, M.; Sajtos, L.; Haenlein, M. Challenges and Opportunities for Marketing Scholars in Times of the Fourth Industrial Revolution. *J Interact Mark* **2020**, *51*, 1.
- (15) Berman, B. 3-D printing: The new industrial revolution. *Bus Horizons* **2012**, *55* (2), 155.
- (16) Gu, Z.; Fu, J.; Lin, H.; He, Y. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2019**, <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>.

- (17) Savini, A.; Savini, G. G. 2015 ICOHTEC/IEEE International History of High-Technologies and their Socio-Cultural Contexts Conference (HISTELCON), 2015; p 1.
- (18) Junk, S.; Kuen, C. Review of Open Source and Freeware CAD Systems for Use with 3D-Printing. *Procedia CIRP* **2016**, *50*, 430.
- (19) Atala, A.; Forgacs, G. Three-Dimensional Bioprinting in Regenerative Medicine: Reality, Hype, and Future. *Stem Cells Transl Med* **2019**, *8* (8), 744.
- (20) Gibbs, D. M. R.; Vaezi, M.; Yang, S.; Oreffo, Richard O. Hope versus hype: what can additive manufacturing realistically offer trauma and orthopedic surgery? *Regenerative Medicine* **2014**, *9* (4), 535.
- (21) Schniederjans, D. G. Adoption of 3D-printing technologies in manufacturing: A survey analysis. *Int J Prod Econ* **2017**, *183*, 287.
- (22) Aimar, A.; Palermo, A.; Innocenti, B. The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art. *J Healthc Eng* **2019**, *2019*, 5340616.
- (23) Tappa, K.; Jammalamadaka, U.; Weisman, J. A.; Ballard, D. H.; Wolford, D. D.; Pascual-Garrido, C.; Wolford, L. M.; Woodard, P. K.; Mills, D. K. 3D Printing Custom Bioactive and Absorbable Surgical Screws, Pins, and Bone Plates for Localized Drug Delivery. *J Funct Biomater* **2019**, *10* (2).
- (24) Wilson, W. C., Jr.; Boland, T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **2003**, *272* (2), 491.
- (25) Boland, T.; Mironov, V.; Gutowska, A.; Roth, E. A.; Markwald, R. R. Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec Part A* **2003**, *272a* (2), 497.
- (26) Murphy, S. V.; De Coppi, P.; Atala, A. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. *Nat Biomed Eng* **2020**, *4* (4), 370.
- (27) Ho, C. M. B.; Ng, S. H.; Yoon, Y. J. A review on 3D printed bioimplants. *Int J Precis Eng Man* **2015**, *16* (5), 1035.
- (28) Dababneh, A. B.; Ozbolat, I. T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *J Manuf Sci E-T Asme* **2014**, *136* (6).
- (29) Passamai Romero, V.; Dernowsek, J.; Nogueira, J.; Lara, V.; Vilalba, F.; Mironov, V.; Rezende, R.; Silva, J. From 3D Bioprinters to a fully integrated Organ Biofabrication Line. *Journal of Physics: Conference Series* **2016**, *705*, 012010.
- (30) Noor, N.; Shapira, A.; Edri, R.; Gal, I.; Wertheim, L.; Dvir, T. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci (Weinh)* **2019**, *6* (11), 1900344.
- (31) Tibbits, S. 4D Printing: Multi-Material Shape Change. *Architectural Design* **2014**, *84* (1), 116.
- (32) Tibbits, S.; Mcknelly, C.; Olguín, C.; Dikovsky, D.; Hirsch, S., 2014.

- (33) Kuang, X.; Roach, D. J.; Wu, J. T.; Hamel, C. M.; Ding, Z.; Wang, T. J.; Dunn, M. L.; Qi, H. J. Advances in 4D Printing: Materials and Applications. *Adv Funct Mater* **2019**, *29* (2).
- (34) Chu, H.; Yang, W.; Sun, L.; Cai, S.; Yang, R.; Liang, W.; Yu, H.; Liu, L. 4D Printing: A Review on Recent Progresses. *Micromachines (Basel)* **2020**, *11* (9).
- (35) Gladman, A. S.; Matsumoto, E. A.; Nuzzo, R. G.; Mahadevan, L.; Lewis, J. A. Biomimetic 4D printing. *Nat Mater* **2016**, *15* (4), 413.
- (36) Ge, Q.; Sakhaei, A. H.; Lee, H.; Dunn, C. K.; Fang, N. X.; Dunn, M. L. Multimaterial 4D Printing with Tailorable Shape Memory Polymers. *Sci Rep* **2016**, *6*, 31110.
- (37) Wu, J.; Yuan, C.; Ding, Z.; Isakov, M.; Mao, Y.; Wang, T.; Dunn, M. L.; Qi, H. J. Multi-shape active composites by 3D printing of digital shape memory polymers. *Sci Rep* **2016**, *6*, 24224.
- (38) Mao, Y.; Yu, K.; Isakov, M. S.; Wu, J.; Dunn, M. L.; Jerry Qi, H. Sequential Self-Folding Structures by 3D Printed Digital Shape Memory Polymers. *Sci Rep* **2015**, *5*, 13616.
- (39) Arslan-Yildiz, A.; El Assal, R.; Chen, P.; Guven, S.; Inci, F.; Demirci, U. Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication* **2016**, *8* (1), 014103.
- (40) Pereira, R. F.; Bartolo, P. J. 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Engineering* **2015**, *1* (1), 90.
- (41) Knowlton, S.; Yenilmez, B.; Anand, S.; Tasoglu, S. Photocrosslinking-Based Bioprinting: Examining Crosslinking Schemes. *Bioprinting* **2017**, *5*.
- (42) Jakab, K.; Norotte, C.; Marga, F.; Murphy, K.; Vunjak-Novakovic, G.; Forgacs, G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* **2010**, *2* (2).
- (43) Jakab, K.; Norotte, C.; Damon, B.; Marga, F.; Neagu, A.; Besch-Williford, C. L.; Kachurin, A.; Church, K. H.; Park, H.; Mironov, V. et al. Tissue engineering by self-assembly of cells printed into topologically defined structures. *Tissue Eng Pt A* **2008**, *14* (3), 413.
- (44) Martin, I.; Malda, J.; Rivron, N. Organs by design: can bioprinting meet self-organization? *Current Opinion in Organ Transplantation* **2019**, *24*, 1.
- (45) Ozbolat, I. T.; Yu, Y. Bioprinting Toward Organ Fabrication: Challenges and Future Trends. *Ieee T Bio-Med Eng* **2013**, *60* (3), 691.
- (46) Malda, J.; Visser, J.; Melchels, F. P.; Jungst, T.; Hennink, W. E.; Dhert, W. J. A.; Groll, J.; Huttmacher, D. W. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Adv Mater* **2013**, *25* (36), 5011.

- (47) Duocastella, M.; Colina, M.; Fernandez-Pradas, J. M.; Serra, P.; Morenza, J. L. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Appl Surf Sci* **2007**, *253* (19), 7855.
- (48) Kattamis, N. T.; Purnick, P. E.; Weiss, R.; Arnold, C. B. Thick film laser induced forward transfer for deposition of thermally and mechanically sensitive materials. *Appl Phys Lett* **2007**, *91* (17).
- (49) Smeets, R.; Alkildani, S.; Rider, P.; Perić Kačarević, Ž.; Kuhnel, I.; Jung, O.; Wolff, J.; Barbeck, M.; Retnasingh, S. Aktuelle Methoden der additiven Fertigung und des Bioprintings in der Zahnmedizin sowie der MKG-Chirurgie. *Die Quintessenz* **2018**, *2018*;69, 1070.
- (50) Mandrycky, C.; Wang, Z.; Kim, K.; Kim, D. H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv* **2016**, *34* (4), 422.
- (51) Landers, R.; Hubner, U.; Schmelzeisen, R.; Mulhaupt, R. Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* **2002**, *23* (23), 4437.
- (52) Freeman, F. E.; Kelly, D. J. Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. *Sci Rep-Uk* **2017**, *7*.
- (53) Maruo, S.; Nakamura, O.; Kawata, S. Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization. *Opt Lett* **1997**, *22* (2), 132.
- (54) Greiner, A. M.; Richter, B.; Bastmeyer, M. Micro-engineered 3D scaffolds for cell culture studies. *Macromol Biosci* **2012**, *12* (10), 1301.
- (55) Hippler, M.; Lemma, E. D.; Bertels, S.; Blasco, E.; Barner-Kowollik, C.; Wegener, M.; Bastmeyer, M. 3D Scaffolds to Study Basic Cell Biology. *Adv Mater* **2019**, *31* (26).
- (56) Three-Dimensional Microfabrication by Two-Photon Polymerization. *Technology and Applications Center Newport Corporation* **2008**, *Application Note* 37.
- (57) Ovsianikov, A.; Chichkov, B. N. Three-dimensional microfabrication by two-photon polymerization technique. *Methods Mol Biol* **2012**, *868*, 311.
- (58) Takada, K.; Sun, H. B.; Kawata, S. Improved spatial resolution and surface roughness in photopolymerization-based laser nanowriting. *Appl Phys Lett* **2005**, *86* (7).
- (59) Grafe, D.; Walden, S. L.; Blinco, J.; Wegener, M.; Blasco, E.; Barner-Kowollik, C. It's in the Fine Print: Erasable Three-Dimensional Laser-Printed Micro- and Nanostructures. *Angew Chem Int Edit* **2020**, *59* (16), 6330.
- (60) Selimis, A.; Mironov, V.; Farsari, M. Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing. *Microelectronic Engineering* **2015**, *132*, 83.

- (61) Fischer, J.; Wegener, M. Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit. *Laser Photonics Rev* **2013**, *7* (1), 22.
- (62) Barner-Kowollik, C.; Bastmeyer, M.; Blasco, E.; Delaittre, G.; Muller, P.; Richter, B.; Wegener, M. 3D Laser Micro- and Nanoprinting: Challenges for Chemistry. *Angew Chem Int Edit* **2017**, *56* (50), 15828.
- (63) Zhang, Y. S.; Oklu, R.; Dokmeci, M. R.; Khademhosseini, A. Three-Dimensional Bioprinting Strategies for Tissue Engineering. *Csh Perspect Med* **2018**, *8* (2).
- (64) Groll, J.; Burdick, J. A.; Cho, D. W.; Derby, B.; Gelinsky, M.; Heilshorn, S. C.; Jungst, T.; Malda, J.; Mironov, V. A.; Nakayama, K. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* **2019**, *11* (1).
- (65) Dzobo, K.; Motaung, K. S. C. M.; Adesida, A. Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (18).
- (66) Williams, D. F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 5897.
- (67) Hudecki, A.; Kiryczyński, G.; Łos, M. J. In *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*; Łos, M. J.; Hudecki, A.; Wiecheć, E., Eds.; Academic Press, 2019, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00007-1>.
- (68) Khanna, V. K. In *Implantable Medical Electronics: Prosthetics, Drug Delivery, and Health Monitoring*; Khanna, V. K., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2016, DOI:10.1007/978-3-319-25448-7_8 10.1007/978-3-319-25448-7_8.
- (69) Dang, T. T.; Nikkhah, M.; Memic, A.; Khademhosseini, A. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*; Kumbar, S. G.; Laurencin, C. T.; Deng, M., Eds.; Elsevier: Oxford, 2014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00020-X>.
- (70) O'Brien, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* **2011**, *14* (3), 88.
- (71) Nikolova, M. P.; Chavali, M. S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact Mater* **2019**, *4*, 271.
- (72) Lee, P.; Tran, K.; Chang, W.; Fang, Y. L.; Zhou, G.; Junka, R.; Shelke, N. B.; Yu, X. J.; Kumbar, S. G. Bioactive polymeric scaffolds for osteochondral tissue engineering: in vitro evaluation of the effect of culture media on bone marrow stromal cells. *Polym Advan Technol* **2015**, *26* (12), 1476.
- (73) Alaribe, F. N.; Manoto, S. L.; Motaung, S. C. K. M. Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia* **2016**, *71* (4), 353.
- (74) Mallick, K. K.; Cox, S. C. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Front Biosci (Elite Ed)* **2013**, *5*, 341.

- (75) Gremare, A.; Guduric, V.; Bareille, R.; Heroguez, V.; Latour, S.; L'heureux, N.; Fricain, J. C.; Catros, S.; Le Nihouannen, D. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **2018**, *106* (4), 887.
- (76) Cubo-Mateo, N.; Rodriguez-Lorenzo, L. M. Design of Thermoplastic 3D-Printed Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Influence of Parameters of "Hidden" Importance in the Physical Properties of Scaffolds. *Polymers (Basel)* **2020**, *12* (7).
- (77) Klein, F.; Richter, B.; Striebel, T.; Franz, C. M.; von Freymann, G.; Wegener, M.; Bastmeyer, M. Two-Component Polymer Scaffolds for Controlled Three-Dimensional Cell Culture. *Adv Mater* **2011**, *23* (11), 1341.
- (78) Heitz, J.; Plamadeala, C.; Wiesbauer, M.; Freudenthaler, P.; Wollhofen, R.; Jacak, J.; Klar, T. A.; Magnus, B.; Kostner, D.; Weth, A. et al. Bone-forming cells with pronounced spread into the third dimension in polymer scaffolds fabricated by two-photon polymerization. *J Biomed Mater Res A* **2017**, *105* (3), 891.
- (79) Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev* **2012**, *64*, 18.
- (80) Rana, D.; Kumar, T. S. S.; Ramalingam, M. Cell-Laden Hydrogels for Tissue Engineering. *J Biomater Tiss Eng* **2014**, *4* (7), 507.
- (81) Seliktar, D. Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. *Science* **2012**, *336* (6085), 1124.
- (82) Das, S.; Basu, B. An Overview of Hydrogel-Based Bioinks for 3D Bioprinting of Soft Tissues. *J Indian I Sci* **2019**, *99* (3), 405.
- (83) Donderwinkel, I.; van Hest, J. C. M.; Cameron, N. R. Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *Polym Chem-Uk* **2017**, *8* (31), 4451.
- (84) Zhu, J. M.; Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devic* **2011**, *8* (5), 607.
- (85) Park, S.; Park, K. M. Engineered Polymeric Hydrogels for 3D Tissue Models. *Polymers-Basel* **2016**, *8* (1).
- (86) Yue, K.; Trujillo-de Santiago, G.; Alvarez, M. M.; Tamayol, A.; Annabi, N.; Khademhosseini, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **2015**, *73*, 254.
- (87) Baier Leach, J.; Bivens, K. A.; Patrick, C. W., Jr.; Schmidt, C. E. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioeng* **2003**, *82* (5), 578.
- (88) Van Hoorick, J.; Gruber, P.; Markovic, M.; Rollot, M.; Graulus, G. J.; Vagenende, M.; Tromayer, M.; Van Erps, J.; Thienpont, H.; Martins, J. C. et al. Highly Reactive Thiol-Norbornene Photo-Click Hydrogels: Toward Improved Processability. *Macromol Rapid Commun* **2018**, *39* (14), e1800181.

- (89) Gramlich, W. M.; Kim, I. L.; Burdick, J. A. Synthesis and orthogonal photopatterning of hyaluronic acid hydrogels with thiol-norbornene chemistry. *Biomaterials* **2013**, *34* (38), 9803.
- (90) Wang, L. L.; Li, L.; Wang, X.; Huang, D.; Yang, F.; Shen, H.; Li, Z. C.; Wu, D. C. UV-triggered thiol-disulfide exchange reaction towards tailored biodegradable hydrogels. *Polym Chem-Uk* **2016**, *7* (7), 1429.
- (91) Su, J. Thiol-Mediated Chemoselective Strategies for In Situ Formation of Hydrogels. *Gels* **2018**, *4* (3).
- (92) Yoshii, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *37* (4), 517.
- (93) Guvendiren, M.; Lu, H. D.; Burdick, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **2012**, *8* (2), 260.
- (94) Blaeser, A.; Campos, D. F. D.; Puster, U.; Richtering, W.; Stevens, M. M.; Fischer, H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv Healthc Mater* **2016**, *5* (3), 326.
- (95) Muller, S. J.; Mirzahosseini, E.; Iftekhar, E. N.; Bacher, C.; Schrufer, S.; Schubert, D. W.; Fabry, B.; Gekle, S. Flow and hydrodynamic shear stress inside a printing needle during biofabrication. *PLoS One* **2020**, *15* (7), e0236371.
- (96) Miri, A. K.; Mirzaee, I.; Hassan, S.; Oskui, S. M.; Nieto, D.; Khademhosseini, A.; Zhang, Y. S. Effective bioprinting resolution in tissue model fabrication. *Lab on a Chip* **2019**, *19* (11), 2019.
- (97) Zhuang, P.; Ng, W. L.; An, J.; Chua, C. K.; Tan, L. P. Layer-by-layer ultraviolet assisted extrusion-based (UAE) bioprinting of hydrogel constructs with high aspect ratio for soft tissue engineering applications. *Plos One* **2019**, *14* (6).
- (98) Lee, J. H.; Kim, H. W. Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering* **2018**, *9*.
- (99) Xing, F.; Li, L.; Zhou, C. C.; Long, C.; Wu, L. N.; Lei, H. Y.; Kong, Q. Q.; Fan, Y. J.; Xiang, Z.; Zhang, X. D. Regulation and Directing Stem Cell Fate by Tissue Engineering Functional Microenvironments: Scaffold Physical and Chemical Cues. *Stem Cells Int* **2019**, 2019.
- (100) Truby, R. L.; Lewis, J. A. Printing soft matter in three dimensions. *Nature* **2016**, *540* (7633), 371.
- (101) Bagheri, A.; Jin, J. Photopolymerization in 3D Printing. *ACS Applied Polymer Materials* **2019**, *1* (4), 593.
- (102) Qin, X.-H.; Ovsianikov, A.; Stampfl, J.; Liska, R. Additive manufacturing of photosensitive hydrogels for tissue engineering applications. *BioNanoMaterials* **2014**, *15*, 49.

- (103) Merkininkaitė, G.; Gailevičius, D.; Šakirzanovas, S.; Jonušauskas, L. Polymers for Regenerative Medicine Structures Made via Multiphoton 3D Lithography. *International Journal of Polymer Science* **2019**, 2019, 3403548.
- (104) Quick, A. S. Functional Microstructures via Direct Laser Writing. *Doktorarbeit* **2015**, DOI:10.5445/IR/1000049780 10.5445/IR/1000049780.
- (105) Schafer, K. J.; Hales, J. M.; Balu, M.; Belfield, K. D.; Van Stryland, E. W.; Hagan, D. J. Two-photon absorption cross-sections of common photoinitiators. *J Photoch Photobio A* **2004**, 162 (2-3), 497.
- (106) Blasco, E.; Wegener, M.; Barner-Kowollik, C. Photochemically Driven Polymeric Network Formation: Synthesis and Applications. *Adv Mater* **2017**, 29 (15).
- (107) Hohmann, J. K.; Renner, M.; Waller, E. H.; von Freymann, G. Three-Dimensional μ -Printing: An Enabling Technology. *Advanced Optical Materials* **2015**, 3 (11), 1488.
- (108) Delaittre, G.; Greiner, A. M.; Pauloehrl, T.; Bastmeyer, M.; Barner-Kowollik, C. Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter* **2012**, 8 (28), 7323.
- (109) Adzima, B. J.; Kloxin, C. J.; DeForest, C. A.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. 3D Photofixation Lithography in Diels-Alder Networks. *Macromol Rapid Comm* **2012**, 33 (24), 2092.
- (110) Zieger, M. M.; Mueller, P.; Quick, A. S.; Wegener, M.; Barner-Kowollik, C. Cleaving Direct-Laser-Written Microstructures on Demand. *Angew Chem Int Edit* **2017**, 56 (20), 5625.
- (111) Zieger, M. M.; Muller, P.; Blasco, E.; Petit, C.; Hahn, V.; Michalek, L.; Mutlu, H.; Wegener, M.; Barner-Kowollik, C. A Subtractive Photoresist Platform for Micro- and Macroscopic 3D Printed Structures. *Adv Funct Mater* **2018**, 28 (29).
- (112) Wang, X. P.; Qin, X. H.; Hu, C. Z.; Terzopoulou, A.; Chen, X. Z.; Huang, T. Y.; Maniura-Weber, K.; Pane, S.; Nelson, B. J. 3D Printed Enzymatically Biodegradable Soft Helical Microswimmers. *Adv Funct Mater* **2018**, 28 (45).
- (113) Batchelor, R.; Messer, T.; Hippler, M.; Wegener, M.; Barner-Kowollik, C.; Blasco, E. Two in One: Light as a Tool for 3D Printing and Erasing at the Microscale. *Adv Mater* **2019**, 31 (40).
- (114) Manavitehrani, I.; Fathi, A.; Badr, H.; Daly, S.; Negahi Shirazi, A.; Dehghani, F. Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters. *Polymers (Basel)* **2016**, 8 (1).
- (115) Haers, P. E.; Suuronen, R.; Lindqvist, C.; Sailer, H. Biodegradable polylactide plates and screws in orthognathic surgery: technical note. *J Craniomaxillofac Surg* **1998**, 26 (2), 87.
- (116) Konan, S.; Haddad, F. S. A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. *Knee* **2009**, 16 (1), 6.

- (117) Jeong, S. I.; Kim, B.-S.; Kang, S. W.; Kwon, J. H.; Lee, Y. M.; Kim, S. H.; Kim, Y. H. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* **2004**, *25* (28), 5939.
- (118) Vieira, A.; Costa Vieira, J.; Guedes, R.; Marques, A. Degradation and viscoelastic properties of PLA-PCL, PGA-PCL, PDO and PGA fibres. *Materials Science Forum* **2010**, *636-637*, 825.
- (119) Liu, H.; Slamovich, E. B.; Webster, T. J. Less harmful acidic degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition. *Int J Nanomed* **2006**, *1* (4), 541.
- (120) Gunatillake, P. A.; Adhikari, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* **2003**, *5*, 1.
- (121) Li, C. M.; Guo, C. C.; Fitzpatrick, V.; Ibrahim, A.; Zwierstra, M. J.; Hanna, P.; Lechtig, A.; Nazarian, A.; Lin, S. J.; Kaplan, D. L. Design of biodegradable, implantable devices towards clinical translation. *Nat Rev Mater* **2020**, *5* (1), 61.
- (122) Liu, A.; Xue, G.-h.; Sun, M.; Shao, H.-f.; Ma, C.-y.; Gao, Q.; Gou, Z.-r.; Yan, S.-g.; Liu, Y.-m.; He, Y. 3D Printing Surgical Implants at the clinic: A Experimental Study on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Sci Rep-Uk* **2016**, *6*, 21704.
- (123) Do, A. V.; Khorsand, B.; Geary, S. M.; Salem, A. K. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Adv Healthc Mater* **2015**, *4* (12), 1742.
- (124) Gladman, A.; Garcia-Leiner, M.; Sauer-Budge, A. Emerging polymeric materials in additive manufacturing for use in biomedical applications. *AIMS Bioengineering* **2019**, *6*, 1.
- (125) Melchels, F. P. W.; Grijpma, D. W.; Feijen, J. Properties of porous structures prepared by stereolithography using a polylactide resin. *Journal of Controlled Release* **2008**, *132* (3), e71.
- (126) Melissinaki, V.; Gill, A. A.; Ortega, I.; Vamvakaki, M.; Ranella, A.; Haycock, J. W.; Fotakis, C.; Farsari, M.; Claeysens, F. Direct laser writing of 3D scaffolds for neural tissue engineering applications. *Biofabrication* **2011**, *3* (4), 045005.
- (127) Rydholm, A. E.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. Effects of neighboring sulfides and pH on ester hydrolysis in thiol-acrylate photopolymers. *Acta Biomater* **2007**, *3* (4), 449.
- (128) Richter, B.; Hahn, V.; Bertels, S.; Claus, T. K.; Wegener, M.; Delaittre, G.; Barner-Kowollik, C.; Bastmeyer, M. Guiding Cell Attachment in 3D Microscaffolds Selectively Functionalized with Two Distinct Adhesion Proteins. *Adv Mater* **2017**, *29* (5).
- (129) Scheiwe, A. C.; Frank, S. C.; Autenrieth, T. J.; Bastmeyer, M.; Wegener, M. Subcellular stretch-induced cytoskeletal response of single fibroblasts within 3D designer scaffolds. *Biomaterials* **2015**, *44*, 186.

- (130) Greiner, A. M.; Klein, F.; Gudzenko, T.; Richter, B.; Striebel, T.; Wundari, B. G.; Autenrieth, T. J.; Wegener, M.; Franz, C. M.; Bastmeyer, M. Cell type-specific adaptation of cellular and nuclear volume in micro-engineered 3D environments. *Biomaterials* **2015**, *69*, 121.
- (131) Hospodiuk, M.; Dey, M.; Sosnoski, D.; Ozbolat, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnol Adv* **2017**, *35* (2), 217.
- (132) Camacho, P.; Busari, H.; Seims, K. B.; Tolbert, J. W.; Chow, L. W. In *3D Bioprinting in Medicine: Technologies, Bioinks, and Applications*; Guvendiren, M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2019, DOI:10.1007/978-3-030-23906-0_2 10.1007/978-3-030-23906-0_2.
- (133) Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* **2015**, *6* (2), 105.
- (134) Unagolla, J. M.; Jayasuriya, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl Mater Today* **2020**, *18*.
- (135) Zhang, Y. S.; Khademhosseini, A. Advances in engineering hydrogels. *Science* **2017**, *356* (6337).
- (136) Li, L.; Yu, F.; Zheng, L. M.; Wang, R. L.; Yan, W. Q.; Wang, Z. X.; Xu, J.; Wu, J. X.; Shi, D. Q.; Zhu, L. Y. et al. Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *J Orthop Transl* **2019**, *17*, 26.
- (137) Bryant, S.; Anseth, K., 2005, DOI:10.1201/9781420027563.ch6 10.1201/9781420027563.ch6.
- (138) Brown, T. E.; Anseth, K. S. Spatiotemporal hydrogel biomaterials for regenerative medicine. *Chem Soc Rev* **2017**, *46* (21), 6532.
- (139) Van Den Bulcke, A. I.; Bogdanov, B.; De Rooze, N.; Schacht, E. H.; Cornelissen, M.; Berghmans, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **2000**, *1* (1), 31.
- (140) Nichol, J. W.; Koshy, S. T.; Bae, H.; Hwang, C. M.; Yamanlar, S.; Khademhosseini, A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **2010**, *31* (21), 5536.
- (141) Brinkman, W. T.; Nagapudi, K.; Thomas, B. S.; Chaikof, E. L. Photo-cross-linking of type I collagen gels in the presence of smooth muscle cells: mechanical properties, cell viability, and function. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (4), 890.
- (142) Ravichandran, R.; Islam, M. M.; Alarcon, E. I.; Samanta, A.; Wang, S.; Lundstrom, P.; Hilborn, J.; Griffith, M.; Phopase, J. Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications. *J Mater Chem B* **2016**, *4* (2), 318.
- (143) Gaudet, I. D.; Shreiber, D. I. Characterization of Methacrylated Type-I Collagen as a Dynamic, Photoactive Hydrogel. *Biointerphases* **2012**, *7* (1-4).

- (144) Masters, K. S.; Shah, D. N.; Leinwand, L. A.; Anseth, K. S. Crosslinked hyaluronan scaffolds as a biologically active carrier for valvular interstitial cells. *Biomaterials* **2005**, *26* (15), 2517.
- (145) Burdick, J. A.; Chung, C.; Jia, X.; Randolph, M. A.; Langer, R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (1), 386.
- (146) Bertassoni, L. E.; Cardoso, J. C.; Manoharan, V.; Cristino, A. L.; Bhise, N. S.; Araujo, W. A.; Zorlutuna, P.; Vrana, N. E.; Ghaemmaghami, A. M.; Dokmeci, M. R. et al. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. *Biofabrication* **2014**, *6* (2).
- (147) Bektas, C. K.; Hasirci, V. Cell loaded 3D bioprinted GelMA hydrogels for corneal stroma engineering. *Biomater Sci-Uk* **2020**, *8* (1), 438.
- (148) Pereira, R. F.; Bartolo, P. J. 3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs. *Journal of Applied Polymer Science* **2015**, *132* (48).
- (149) Klotz, B. J.; Gawlitta, D.; Rosenberg, A. J. W. P.; Malda, J.; Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in Biotechnology* **2016**, *34* (5), 394.
- (150) Liu, W. J.; Heinrich, M. A.; Zhou, Y. X.; Akpek, A.; Hu, N.; Liu, X.; Guan, X. F.; Zhong, Z.; Jin, X. Y.; Khademhosseini, A. et al. Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Adv Healthc Mater* **2017**, *6* (12).
- (151) Pepelanova, I.; Kruppa, K.; Scheper, T.; Lavrentieva, A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering (Basel, Switzerland)* **2018**, *5* (3), 55.
- (152) Haase, S. Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck. *Doktorarbeit* **2020**.
- (153) Kempfer, X. Synthese und Charakterisierung photopolymerisierbarer Hydrogele auf Gelatinebasis. *Masterarbeit* **2018**.
- (154) Yue, K.; Li, X. Y.; Schrobback, K.; Sheikhi, A.; Annabi, N.; Leijten, J.; Zhang, W. J.; Zhang, Y. S.; Hutmacher, D. W.; Klein, T. J. et al. Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives. *Biomaterials* **2017**, *139*, 163.
- (155) Gelatin Handbook. *Gelatin Manufacturers Institute of America* **2019**.
- (156) Kale, R.; Bajaj, A. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. *J Young Pharm* **2010**, *2* (1), 90.
- (157) Lee, B. H.; Shirahama, H.; Cho, N.-J.; Tan, L. P. Efficient and controllable synthesis of highly substituted gelatin methacrylamide for mechanically stiff hydrogels. *Rsc Adv* **2015**, *5* (128), 106094.

- (158) Bott, K.; Upton, Z.; Schrobback, K.; Ehrbar, M.; Hubbell, J. A.; Lutolf, M. P.; Rizzi, S. C. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials* **2010**, *31* (32), 8454.
- (159) Raeber, G. P.; Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. Mechanisms of 3-D migration and matrix remodeling of fibroblasts within artificial ECMs. *Acta Biomater* **2007**, *3* (5), 615.
- (160) McMurtrey, R. J. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids. *Tissue Eng Part C Methods* **2016**, *22* (3), 221.
- (161) Figueiredo, L.; Pace, R.; D'Arros, C.; Rethore, G.; Guicheux, J.; Le Visage, C.; Weiss, P. Assessing glucose and oxygen diffusion in hydrogels for the rational design of 3D stem cell scaffolds in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* **2018**, *12* (5), 1238.
- (162) Parlato, M.; Murphy, W. In *Hydrogels in Cell-Based Therapies*; The Royal Society of Chemistry, 2014, DOI:10.1039/9781782622055-00001 10.1039/9781782622055-00001.
- (163) Lee, Y.; Lee, J. M.; Bae, P. K.; Chung, I. Y.; Chung, B. H.; Chung, B. G. Photocrosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. *Electrophoresis* **2015**, *36* (7-8), 994.
- (164) Kaemmerer, E.; Melchels, F. P.; Holzapfel, B. M.; Meckel, T.; Huttmacher, D. W.; Loessner, D. Gelatine methacrylamide-based hydrogels: an alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* **2014**, *10* (6), 2551.
- (165) Miri, A. K.; Hosseinabadi, H. G.; Cecen, B.; Hassan, S.; Zhang, Y. S. Permeability mapping of gelatin methacryloyl hydrogels. *Acta Biomater* **2018**, *77*, 38.
- (166) Muehleder, S.; Ovsianikov, A.; Zipperle, J.; Redl, H.; Holnthoner, W. Connections matter: channeled hydrogels to improve vascularization. *Front Bioeng Biotechnol* **2014**, *2*, 52.
- (167) Kolesky, D. B.; Homan, K. A.; Skylar-Scott, M. A.; Lewis, J. A. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (12), 3179.
- (168) Ko, H. C.; Milthorpe, B. K.; McFarland, C. D. Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *Eur Cell Mater* **2007**, *14*, 1.
- (169) Papamanoglou, E. Diffusionsstudie und Rekonstruktion von dreidimensionalen Geweben mithilfe Gelatine-basierter Hydrogele. *Bachelorarbeit* **2020**.
- (170) Konetschny, B. Physikalische und biologische Charakterisierung photopolymerisierbarer Hydrogele. *Bachelorarbeit* **2019**.
- (171) Amsden, B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* **1998**, *31* (23), 8382.

- (172) Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* **1987**, *5* (1), 23.
- (173) Ritger, P. L.; Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release* **1987**, *5* (1), 37.
- (174) Djabourov, M.; Leblond, J. Thermally Reversible Gelation of the Gelatin Water-System. *Acs Sym Ser* **1987**, *350*, 211.
- (175) Djabourov, M.; Leblond, J.; Papon, P. Gelation of Aqueous Gelatin Solutions .1. Structural Investigation. *J Phys-Paris* **1988**, *49* (2), 319.
- (176) Djabourov, M.; Leblond, J.; Papon, P. Gelation of Aqueous Gelatin Solutions .2. Rheology of the Sol-Gel Transition. *J Phys-Paris* **1988**, *49* (2), 333.
- (177) Sun, M. Y.; Sun, X. T.; Wang, Z. Y.; Guo, S. Y.; Yu, G. J.; Yang, H. Z. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers-Basel* **2018**, *10* (11).
- (178) Lee, S.; Tong, X. M.; Yang, F. The effects of varying poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking density and the crosslinking mechanism on protein accumulation in three-dimensional hydrogels. *Acta Biomater* **2014**, *10* (10), 4167.
- (179) Yoon, H. J.; Shin, S. R.; Cha, J. M.; Lee, S. H.; Kim, J. H.; Do, J. T.; Song, H.; Bae, H. Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *Plos One* **2016**, *11* (10).
- (180) Lin, C. C.; Ki, C. S.; Shih, H. Thiol-norbornene photo-click hydrogels for tissue engineering applications. *J Appl Polym Sci* **2015**, *132* (8).
- (181) Munoz, Z.; Shih, H.; Lin, C. C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomater Sci-Uk* **2014**, *2* (8), 1063.
- (182) Tibbitt, M. W.; Kloxin, A. M.; Sawicki, L.; Anseth, K. S. Mechanical Properties and Degradation of Chain and Step Polymerized Photodegradable Hydrogels. *Macromolecules* **2013**, *46* (7).
- (183) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angew Chem Int Edit* **2010**, *49* (9), 1540.
- (184) McCall, J. D.; Anseth, K. S. Thiol-ene photopolymerizations provide a facile method to encapsulate proteins and maintain their bioactivity. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2410.
- (185) Cramer, N. B.; Bowman, C. N. Kinetics of thiol-ene and thiol-acrylate photopolymerizations with real-time Fourier transform infrared. *J Polym Sci Pol Chem* **2001**, *39* (19), 3311.

- (186) Greene, T.; Lin, C. C. Modular Cross-Linking of Gelatin-Based Thiol-Norbornene Hydrogels for in Vitro 3D Culture of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Acs Biomater Sci Eng* **2015**, *1* (12), 1314.
- (187) Azagarsamy, M. A.; Anseth, K. S. Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. *Acs Macro Lett* **2013**, *2* (1), 5.
- (188) Aimetti, A. A.; Machen, A. J.; Anseth, K. S. Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by thiol-ene photopolymerization for enzyme-responsive protein delivery. *Biomaterials* **2009**, *30* (30), 6048.
- (189) Shih, H.; Lin, C. C. Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2003.
- (190) Tytgat, L.; Van Damme, L.; Van Hoorick, J.; Declercq, H.; Thienpont, H.; Ottevaere, H.; Blondeel, P.; Dubruel, P.; Van Vlierberghe, S. Additive manufacturing of photo-crosslinked gelatin scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomater* **2019**, *94*, 340.
- (191) Göckler, T., Haase, S., Kempter, X., Pfister, R., Maciel, B.R., Grimm, A., Willenbacher, N., Schepers, U. Tuning superfast-curing Thiol-Norbornene Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Biomaterials (submitted)* **2020**.
- (192) Galvao, J.; Davis, B.; Tilley, M.; Normando, E.; Duchon, M. R.; Cordeiro, M. F. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J* **2014**, *28* (3), 1317.
- (193) Yi, X.; Liu, M.; Luo, Q.; Zhuo, H.; Cao, H.; Wang, J.; Han, Y. Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio* **2017**, *7* (4), 485.
- (194) de Abreu Costa, L.; Henrique Fernandes Ottoni, M.; Dos Santos, M. G.; Meireles, A. B.; Gomes de Almeida, V.; de Fatima Pereira, W.; Alves de Avelar-Freitas, B.; Eustaquio Alvim Brito-Melo, G. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes. *Molecules* **2017**, *22* (11).
- (195) Thermo Scientific Technical Handbook: Easy Molecular Bonding - Crosslinking Technology. *Thermo Fisher Scientific*.
- (196) Van Vlierberghe, S.; Schacht, E.; Dubruel, P. Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties. *Eur Polym J* **2011**, *47* (5), 1039.
- (197) Gyarmati, B.; Nemethy, A.; Szilagyi, A. Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications. *Eur Polym J* **2013**, *49* (6), 1268.

- (198) Duggan, S.; O'Donovan, O.; Owens, E.; Cummins, W.; Hughes, H. Synthesis of mucoadhesive thiolated gelatin using a two-step reaction process. *Eur J Pharm Biopharm* **2015**, *91*, 75.
- (199) Dondoni, A. The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry. *Angew Chem Int Edit* **2008**, *47* (47), 8995.
- (200) Fairbanks, B. D.; Schwartz, M. P.; Halevi, A. E.; Nuttelman, C. R.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. A Versatile Synthetic Extracellular Matrix Mimic via Thiol-Norbornene Photopolymerization. *Adv Mater* **2009**, *21* (48), 5005.
- (201) Grimm, A. Synthese und Charakterisierung gelatinebasierter Hydrogele. *Masterarbeit* **2020**.
- (202) Stevens, R.; Stevens, L.; Price, N. C. The stabilities of various thiol compounds used in protein purifications. *Biochemical Education* **1983**, *11* (2), 70.
- (203) Munday, R. Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic Biol Med* **1989**, *7* (6), 659.
- (204) Held, K. D.; Sylvester, F. C.; Hopcia, K. L.; Biaglow, J. E. Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiat Res* **1996**, *145* (5), 542.
- (205) Hu, W. K.; Wang, Z. J.; Xiao, Y.; Zhang, S. M.; Wang, J. L. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater Sci-Uk* **2019**, *7* (3), 843.
- (206) Morozowich, N. L.; Nichol, J. L.; Allcock, H. R. Hydrogels based on schiff base formation between an amino-containing polyphosphazene and aldehyde functionalized-dextrans. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2016**, *54* (18), 2984.
- (207) Zhang, Y. L.; Tao, L.; Li, S. X.; Wei, Y. Synthesis of Multiresponsive and Dynamic Chitosan-Based Hydrogels for Controlled Release of Bioactive Molecules. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (8), 2894.
- (208) Ding, F. Y.; Wu, S. P.; Wang, S. S.; Xiong, Y.; Li, Y.; Li, B.; Deng, H. B.; Du, Y. M.; Xiao, L.; Shi, X. W. A dynamic and self-crosslinked polysaccharide hydrogel with autonomous self-healing ability. *Soft Matter* **2015**, *11* (20), 3971.
- (209) Grover, G. N.; Lam, J.; Nguyen, T. H.; Segura, T.; Maynard, H. D. Biocompatible Hydrogels by Oxime Click Chemistry. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (10), 3013.
- (210) Choi, J. R.; Yong, K. W.; Choi, J. Y.; Cowie, A. C. Recent advances in photocrosslinkable hydrogels for biomedical applications. *Biotechniques* **2019**, *66* (1), 40.
- (211) Nguyen, K. T.; West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **2002**, *23* (22), 4307.
- (212) Madl, C. M.; Heilshorn, S. C. Rapid Diels-Alder Cross-linking of Cell Encapsulating Hydrogels. *Chem Mater* **2019**, *31* (19), 8035.

- (213) Smith, L. J.; Taimoory, S. M.; Tam, R. Y.; Baker, R. E. G.; Mohammad, N. B.; Trant, J. F.; Shoichet, M. S. Diels Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (3), 926.
- (214) Yu, F.; Cao, X.; Du, J.; Wang, G.; Chen, X. Multifunctional Hydrogel with Good Structure Integrity, Self-Healing, and Tissue-Adhesive Property Formed by Combining Diels-Alder Click Reaction and Acylhydrazone Bond. *ACS Appl Mater Interfaces* **2015**, *7* (43), 24023.
- (215) Yigit, S.; Sanyal, R.; Sanyal, A. Fabrication and Functionalization of Hydrogels through "Click" Chemistry. *Chem-Asian J* **2011**, *6* (10), 2648.
- (216) Nagahama, K.; Kimura, Y.; Takemoto, A. Living functional hydrogels generated by bioorthogonal cross-linking reactions of azide-modified cells with alkyne-modified polymers. *Nature Communications* **2018**, *9*.
- (217) Han, S. S.; Yoon, H. Y.; Yhee, J. Y.; Cho, M. O.; Shim, H. E.; Jeong, J. E.; Lee, D. E.; Kim, K.; Guim, H.; Lee, J. H. et al. In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels using copper free click chemistry for cartilage tissue engineering. *Polym Chem-Uk* **2018**, *9* (1), 20.
- (218) Mather, B. D.; Viswanathan, K.; Miller, K. M.; Long, T. E. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog Polym Sci* **2006**, *31* (5), 487.
- (219) Liu, Z. Q.; Wei, Z.; Zhu, X. L.; Huang, G. Y.; Xu, F.; Yang, J. H.; Osada, Y.; Zrinyi, M.; Li, J. H.; Chen, Y. M. Dextran-based hydrogel formed by thiol-Michael addition reaction for 3D cell encapsulation. *Colloid Surface B* **2015**, *128*, 140.
- (220) Jin, R.; Teixeira, L. S. M.; Krouwels, A.; Dijkstra, P. J.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Feijen, J. Synthesis and characterization of hyaluronic acid-poly(ethylene glycol) hydrogels via Michael addition: An injectable biomaterial for cartilage repair. *Acta Biomater* **2010**, *6* (6), 1968.
- (221) Pupkaite, J.; Rosenquist, J.; Hilborn, J.; Samanta, A. Injectable Shape-Holding Collagen Hydrogel for Cell Encapsulation and Delivery Cross-linked Using Thiol-Michael Addition Click Reaction. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (9), 3475.
- (222) Sperinde, J. J.; Griffith, L. G. Synthesis and characterization of enzymatically-cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogels. *Macromolecules* **1997**, *30* (18), 5255.
- (223) McHale, M. K.; Setton, L. A.; Chilkoti, A. Synthesis and in vitro evaluation of enzymatically cross-linked elastin-like polypeptide gels for cartilaginous tissue repair. *Tissue Engineering* **2005**, *11* (11-12), 1768.
- (224) Jin, R.; Hiemstra, C.; Zhong, Z. Y.; Feijen, J. Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials* **2007**, *28* (18), 2791.

- (225) Jin, R.; Teixeira, L. S. M.; Dijkstra, P. J.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Feijen, J. Chondrogenesis in injectable enzymatically crosslinked heparin/dextran hydrogels. *Journal of Controlled Release* **2011**, *152* (1), 186.
- (226) Kim, K. S.; Park, S. J.; Yang, J. A.; Jeon, J. H.; Bhang, S. H.; Kim, B. S.; Hahn, S. K. Injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Biomater* **2011**, *7* (2), 666.
- (227) Akhtar, M. F.; Hanif, M.; Ranjha, N. M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharm J* **2016**, *24* (5), 554.
- (228) Talebian, S.; Mehrali, M.; Taebnia, N.; Pennisi, C. P.; Kadumudi, F. B.; Foroughi, J.; Hasany, M.; Nikkhah, M.; Akbari, M.; Orive, G. et al. Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Adv Sci (Weinh)* **2019**, *6* (16), 1801664.
- (229) Sun, Y. N.; Nan, D.; Jin, H. Q.; Qu, X. Z. Recent advances of injectable hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Polym Test* **2020**, *81*.
- (230) Uman, S.; Dhand, A.; Burdick, J. A. Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science* **2020**, *137* (25), 48668.
- (231) Sivashanmugam, A.; Kumar, R. A.; Priya, M. V.; Nair, S. V.; Jayakumar, R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur Polym J* **2015**, *72*, 543.
- (232) Kuo, C. K.; Ma, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* **2001**, *22* (6), 511.
- (233) Seo, J. Y.; Lee, B.; Kang, T. W.; Noh, J. H.; Kim, M. J.; Ji, Y. B.; Ju, H. J.; Min, B. H.; Kim, M. S. Electrostatically Interactive Injectable Hydrogels for Drug Delivery. *Tissue Eng Regen Med* **2018**, *15* (5), 513.
- (234) Proctor, C. M.; Chan, C. Y.; Porcarelli, L.; Udabe, E.; Sanchez-Sanchez, A.; del Agua, I.; Mecerreyes, D.; Malliaras, G. G. Ionic Hydrogel for Accelerated Dopamine Delivery via Retrodialysis. *Chem Mater* **2019**, *31* (17), 7080.
- (235) Deng, Y.; Hussain, I.; Kang, M. M.; Li, K. W.; Yao, F.; Liu, S. L.; Fu, G. D. Self-recoverable and mechanical-reinforced hydrogel based on hydrophobic interaction with self-healable and conductive properties. *Chem Eng J* **2018**, *353*, 900.
- (236) Tuncaboylu, D. C.; Sari, M.; Oppermann, W.; Okay, O. Tough and Self-Healing Hydrogels Formed via Hydrophobic Interactions. *Macromolecules* **2011**, *44* (12), 4997.
- (237) Klouda, L.; Mikos, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**, *68* (1), 34.

- (238) Lue, S. J.; Chen, C. H.; Shih, C. M. Tuning of Lower Critical Solution Temperature (LCST) of Poly(N-Isopropylacrylamide-co-Acrylic acid) Hydrogels. *J Macromol Sci B* **2011**, *50* (3), 563.
- (239) Fu, W. X.; Zhao, B. Thermoreversible physically crosslinked hydrogels from UCST-type thermosensitive ABA linear triblock copolymers. *Polym Chem-Uk* **2016**, *7* (45), 6980.
- (240) Li, F.; Zhu, Y.; You, B.; Zhao, D.; Ruan, Q.; Zeng, Y.; Ding, C. Smart Hydrogels Co-switched by Hydrogen Bonds and π - π Stacking for Continuously Regulated Controlled-Release System. *Adv Funct Mater* **2010**, *20* (4), 669.
- (241) Ahn, J.; Park, S.; Lee, J. H.; Jung, S. H.; Moon, S.-J.; Jung, J. H. Fluorescent hydrogels formed by CH- π and π - π interactions as the main driving forces: an approach toward understanding the relationship between fluorescence and structure. *Chem Commun* **2013**, *49* (21), 2109.
- (242) Cui, J. X.; del Campo, A. Multivalent H-bonds for self-healing hydrogels. *Chem Commun* **2012**, *48* (74), 9302.
- (243) Hofmeier, H.; Hoogenboom, R.; Wouters, M. E. L.; Schubert, U. S. High molecular weight supramolecular polymers containing both terpyridine metal complexes and ureidopyrimidinone quadruple hydrogen-bonding units in the main chain. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (9), 2913.
- (244) Guo, M. Y.; Pitet, L. M.; Wyss, H. M.; Vos, M.; Dankers, P. Y. W.; Meijer, E. W. Tough Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels with Hydrogen-Bonding Network Junctions. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (19), 6969.
- (245) Dai, X. Y.; Zhang, Y. Y.; Gao, L. N.; Bai, T.; Wang, W.; Cui, Y. L.; Liu, W. G. A Mechanically Strong, Highly Stable, Thermoplastic, and Self-Healable Supramolecular Polymer Hydrogel. *Adv Mater* **2015**, *27* (23), 3566.
- (246) Liu, G. T.; Yuan, Q. J.; Hollett, G.; Zhao, W.; Kang, Y.; Wu, J. Cyclodextrin-based host-guest supramolecular hydrogel and its application in biomedical fields. *Polym Chem-Uk* **2018**, *9* (25), 3436.
- (247) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Harada, A. Highly Elastic Supramolecular Hydrogels Using Host-Guest Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *Macromolecules* **2013**, *46* (11), 4575.
- (248) Ma, X.; Zhao, Y. L. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions. *Chem Rev* **2015**, *115* (15), 7794.
- (249) Rodell, C. B.; Kaminski, A. L.; Burdick, J. A. Rational Design of Network Properties in Guest-Host Assembled and Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (11), 4125.
- (250) Osman, S. K.; Brandl, F. P.; Zayed, G. M.; Tessmar, J. K.; Gopferich, A. M. Cyclodextrin based hydrogels: Inclusion complex formation and micellization of adamantane and cholesterol grafted polymers. *Polymer* **2011**, *52* (21), 4806.

- (251) Li, H.; Yang, P.; Pageni, P.; Tang, C. Recent Advances in Metal-Containing Polymer Hydrogels. *Macromol Rapid Commun* **2017**, *38* (14).
- (252) Chujo, Y.; Sada, K.; Saegusa, T. Iron(II) Bipyridyl-Branched Polyoxazoline Complex as a Thermally Reversible Hydrogel. *Macromolecules* **1993**, *26* (24), 6315.
- (253) Chujo, Y.; Sada, K.; Saegusa, T. Synthesis of Bipyridyl-Branched Polyoxazoline and Its Gelation by Means of Metal Coordination. *Polym J* **1993**, *25* (6), 599.
- (254) Bahram, M.; Mohseni, N.; Moghtader, M. In *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, 2016, DOI:10.5772/64301 10.5772/64301.
- (255) Wang, H. Y.; Heilshorn, S. C. Adaptable Hydrogel Networks with Reversible Linkages for Tissue Engineering. *Adv Mater* **2015**, *27* (25), 3717.
- (256) Wang, W.; Narain, R.; Zeng, H. Rational Design of Self-Healing Tough Hydrogels: A Mini Review. *Front Chem* **2018**, *6*, 497.
- (257) Lee, J. H. Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res* **2018**, *22*, 27.
- (258) Liang, K.; Bae, K. H.; Kurisawa, M. Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy. *J Mater Chem B* **2019**, *7* (24), 3775.
- (259) Le, T. M. D.; Jung, B. K.; Li, Y.; Duong, H. T. T.; Nguyen, T. L.; Hong, J. W.; Yun, C. O.; Lee, D. S. Physically crosslinked injectable hydrogels for long-term delivery of oncolytic adenoviruses for cancer treatment. *Biomater Sci* **2019**, *7* (10), 4195.
- (260) Ahadian, S.; Savoji, H.; Khademhosseini, A. Recent Advances in Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem Eng Prog* **2018**, *114* (5), 56.
- (261) Vega, S. L.; Kwon, M. Y.; Burdick, J. A. Recent Advances in Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Eur Cells Mater* **2017**, *33*, 59.
- (262) Ferreira, N. N.; Ferreira, L. M. B.; Cardoso, V. M. O.; Boni, F. I.; Souza, A. L. R.; Gremiao, M. P. D. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *Eur Polym J* **2018**, *99*, 117.
- (263) Chen, Q.; Chen, H.; Zhu, L.; Zheng, J. Fundamentals of double network hydrogels. *J Mater Chem B* **2015**, *3* (18), 3654.
- (264) Gu, Z.; Huang, K.; Luo, Y.; Zhang, L.; Kuang, T.; Chen, Z.; Liao, G. Double network hydrogel for tissue engineering. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2018**, *10* (6), e1520.
- (265) Gong, J. P.; Katsuyama, Y.; Kurokawa, T.; Osada, Y. Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv Mater* **2003**, *15* (14), 1155.

- (266) Zhang, X.; Guo, X.; Yang, S.; Tan, S.; Li, X.; Dai, H.; Yu, X.; Zhang, X.; Weng, N.; Jian, B. et al. Double-network hydrogel with high mechanical strength prepared from two biocompatible polymers. *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *112* (5), 3063.
- (267) Shivashankar, M.; Mandal, B. K. A review on interpenetrating polymer network. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 1.
- (268) Sperling, L. H. Interpenetrating Polymer Networks. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* **2004**, DOI:10.1002/0471440264.pst170 10.1002/0471440264.pst170.
- (269) Sperling, L. H. In *Interpenetrating Polymer Networks*; American Chemical Society, 1994; Vol. 239.
- (270) Nakajima, T.; Gong, J. P. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*; Kobayashi, S.; Müllen, K., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2021, DOI:10.1007/978-3-642-36199-9_67-1 10.1007/978-3-642-36199-9_67-1.
- (271) Dragan, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chem Eng J* **2014**, *243*, 572.
- (272) Myung, D.; Waters, D.; Wiseman, M.; Duhamel, P. E.; Noolandi, J.; Ta, C. N.; Frank, C. W. Progress in the development of interpenetrating polymer network hydrogels. *Polym Advan Technol* **2008**, *19* (6), 647.
- (273) Banerjee, S.; Ray, S.; Maiti, S.; Sen, K.; Bhattacharyya, U. K.; Kaity, S.; Ghosh, A. Interpenetrating polymer network (IPN): A novel biomaterial. *Int J Appl Pharmac* **2010**, *2*, 28.
- (274) Fares, M. M.; Sani, E. S.; Lara, R. P.; Oliveira, R. B.; Khademhosseini, A.; Annabi, N. Interpenetrating network gelatin methacryloyl (GelMA) and pectin-g-PCL hydrogels with tunable properties for tissue engineering. *Biomater Sci-Uk* **2018**, *6* (11), 2938.
- (275) Haque, M. A.; Kurokawa, T.; Gong, J. P. Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials. *Polymer* **2012**, *53* (9), 1805.
- (276) Nonoyama, T.; Gong, J. P. Double-network hydrogel and its potential biomedical application: A review. *P I Mech Eng H* **2015**, *229* (12), 853.
- (277) Mortimer, D. A. Synthetic Polyelectrolytes - a Review. *Polym Int* **1991**, *25* (1), 29.
- (278) Caseri, W.; Thieme Gruppe: RÖMPP, 2009.
- (279) Hunt, J. N.; Feldman, K. E.; Lynd, N. A.; Deek, J.; Campos, L. M.; Spruell, J. M.; Hernandez, B. M.; Kramer, E. J.; Hawker, C. J. Tunable, high modulus hydrogels driven by ionic coacervation. *Adv Mater* **2011**, *23* (20), 2327.
- (280) Baraniak, B. M.; Waleriańczyk, E. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*; Caballero, B., Ed.; Academic Press: Oxford, 2003, <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00485-5>.

- (281) Kwon, H. J.; Yasuda, K.; Gong, J. P.; Ohmiya, Y. Polyelectrolyte hydrogels for replacement and regeneration of biological tissues. *Macromol Res* **2014**, *22* (3), 227.
- (282) Ishihara, M.; Kishimoto, S.; Nakamura, S.; Sato, Y.; Hattori, H. Polyelectrolyte Complexes of Natural Polymers and Their Biomedical Applications. *Polymers-Basel* **2019**, *11* (4).
- (283) Lee, C. J.; Wu, H. Y.; Hu, Y.; Young, M.; Wang, H. F.; Lynch, D.; Xu, F. J.; Cong, H. B.; Cheng, G. Ionic Conductivity of Polyelectrolyte Hydrogels. *Acs Appl Mater Inter* **2018**, *10* (6), 5845.
- (284) de Kruif, C. G.; Weinbreck, F.; de Vries, R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr Opin Colloid In* **2004**, *9* (5), 340.
- (285) Krogstad, D. V.; Choi, S. H.; Lynd, N. A.; Audus, D. J.; Perry, S. L.; Gopez, J. D.; Hawker, C. J.; Kramer, E. J.; Tirrell, M. V. Small Angle Neutron Scattering Study of Complex Coacervate Micelles and Hydrogels Formed from Ionic Diblock and Triblock Copolymers. *J Phys Chem B* **2014**, *118* (45), 13011.
- (286) Srivastava, S.; Andreev, M.; Levi, A. E.; Goldfeld, D. J.; Mao, J.; Heller, W. T.; Prabhu, V. M.; de Pablo, J. J.; Tirrell, M. V. Gel phase formation in dilute triblock copolyelectrolyte complexes. *Nature Communications* **2017**, *8*.
- (287) Krogstad, D. V.; Lynd, N. A.; Choi, S. H.; Spruell, J. M.; Hawker, C. J.; Kramer, E. J.; Tirrell, M. V. Effects of Polymer and Salt Concentration on the Structure and Properties of Triblock Copolymer Coacervate Hydrogels. *Macromolecules* **2013**, *46* (4), 1512.
- (288) Krogstad, D. V.; Lynd, N. A.; Miyajima, D.; Gopez, J.; Hawker, C. J.; Kramer, E. J.; Tirrell, M. V. Structural Evolution of Polyelectrolyte Complex Core Micelles and Ordered-Phase Bulk Materials. *Macromolecules* **2014**, *47* (22), 8026.
- (289) Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R. M. Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. *Indian J Pharm Sci* **2009**, *71* (5), 481.
- (290) Kang, H.-S.; Park, S. H.; Lee, Y.-G.; Son, T.-I. Polyelectrolyte complex hydrogel composed of chitosan and poly(γ -glutamic acid) for biological application: Preparation, physical properties, and cytocompatibility. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *103*, 386.
- (291) Wu, H. D.; Yang, J. C.; Tsai, T.; Ji, D. Y.; Chang, W. J.; Chen, C. C.; Lee, S. Y. Development of a chitosan-polyglutamate based injectable polyelectrolyte complex scaffold. *Carbohydr Polym* **2011**, *85* (2), 318.
- (292) Hamman, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Mar Drugs* **2010**, *8* (4), 1305.
- (293) Li, D., Göckler, T., Schepers, U., Srivastava, S. Hybrid Hydrogels with Interpenetrating Electrostatic and Covalent Networks. (*in preparation*) **2020**.

- (294) Srivastava, S.; Levi, A. E.; Goldfeld, D. J.; Tirrell, M. V. Structure, Morphology, and Rheology of Polyelectrolyte Complex Hydrogels Formed by Self-Assembly of Oppositely Charged Triblock Polyelectrolytes. *Macromolecules* **2020**, *53* (14), 5763.
- (295) Choi, S.; Kim, S. W. Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer depot in ZDF rats. *Pharm Res* **2003**, *20* (12), 2008.
- (296) Jeong, B.; Bae, Y. H.; Lee, D. S.; Kim, S. W. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* **1997**, *388* (6645), 860.
- (297) Ramasamy, T.; Poudel, B. K.; Ruttala, H.; Choi, J. Y.; Hieu, T. D.; Umadevi, B., K.; Youn, Y. S.; Choi, H. G.; Yong, C. S.; Kim, J. O. Cationic drug-based self-assembled polyelectrolyte complex micelles: Physicochemical, pharmacokinetic, and anticancer activity analysis. *Colloid Surface B* **2016**, *146*, 152.
- (298) Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* **2003**, *24* (24), 4495.
- (299) Harada, A.; Kataoka, K. Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: Preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer in aqueous medium. *Macromolecules* **1998**, *31* (2), 288.
- (300) Osada, K.; Christie, R. J.; Kataoka, K. Polymeric micelles from poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery. *J R Soc Interface* **2009**, *6*, S325.
- (301) Mano, J. F. Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications. *Adv Eng Mater* **2008**, *10* (6), 515.
- (302) Khan, S.; Ranjha, N. M. Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. *Polym Bull* **2014**, *71* (8), 2133.
- (303) Lee, S.; Tong, X. M.; Yang, F. Effects of the poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking mechanism on protein release. *Biomater Sci-Uk* **2016**, *4* (3), 405.
- (304) Sannino, A.; Madaghiele, M.; Ambrosio, L. In *Cellular Response to Biomaterials*; Di Silvio, L., Ed.; Woodhead Publishing, 2009, <https://doi.org/10.1533/9781845695477.1.114>.
- (305) Hoshino, K.; Nakajima, T.; Matsuda, T.; Sakai, T.; Gong, J. P. Network elasticity of a model hydrogel as a function of swelling ratio: from shrinking to extreme swelling states. *Soft Matter* **2018**, *14* (47), 9693.
- (306) Li, L.; Scheiger, J. M.; Levkin, P. A. Design and Applications of Photoresponsive Hydrogels. *Adv Mater* **2019**, *31* (26), e1807333.

- (307) Pasparakis, G.; Manouras, T.; Argitis, P.; Vamvakaki, M. Photodegradable Polymers for Biotechnological Applications. *Macromol Rapid Comm* **2012**, *33* (3), 183.
- (308) Fairbanks, B. D.; Singh, S. P.; Bowman, C. N.; Anseth, K. S. Photodegradable, Photoadaptable Hydrogels via Radical-Mediated Disulfide Fragmentation Reaction. *Macromolecules* **2011**, *44* (8), 2444.
- (309) Tibbitt, M. W.; Kloxin, A. M.; Anseth, K. S. Modeling controlled photodegradation in optically thick hydrogels. *J Polym Sci Pol Chem* **2013**, *51* (9), 1899.
- (310) Dortdivanlioglu, B.; Linder, C. Diffusion-driven swelling-induced instabilities of hydrogels. *J Mech Phys Solids* **2019**, *125*, 38.
- (311) DuPont, S. J.; Cates, R. S.; Stroot, P. G.; Toomey, R. Swelling-induced instabilities in microscale, surface-confined poly(N-isopropylacryamide) hydrogels. *Soft Matter* **2010**, *6* (16), 3876.
- (312) Kloxin, A. M.; Kasko, A. M.; Salinas, C. N.; Anseth, K. S. Photodegradable hydrogels for dynamic tuning of physical and chemical properties. *Science* **2009**, *324* (5923), 59.
- (313) Siltanen, C.; Shin, D. S.; Sutcliffe, J.; Revzin, A. Micropatterned Photodegradable Hydrogels for the Sorting of Microbeads and Cells. *Angew Chem Int Edit* **2013**, *52* (35), 9224.
- (314) Rosales, A. M.; Vega, S. L.; DelRio, F. W.; Burdick, J. A.; Anseth, K. S. Hydrogels with Reversible Mechanics to Probe Dynamic Cell Microenvironments. *Angew Chem Int Edit* **2017**, *56* (40), 12132.
- (315) Azagarsamy, M. A.; McKinnon, D. D.; Age, D. L.; Anseth, K. S. Coumarin-Based Photodegradable Hydrogel: Design, Synthesis, Gelation, and Degradation Kinetics. *Acs Macro Lett* **2014**, *3* (6), 515.
- (316) Rapp, T. L.; Highley, C. B.; Manor, B. C.; Burdick, J. A.; Dmochowski, I. J. Ruthenium-Crosslinked Hydrogels with Rapid, Visible-Light Degradation. *Chem-Eur J* **2018**, *24* (10), 2328.
- (317) Truong, V. X.; Tsang, K. M.; Simon, G. P.; Boyd, R. L.; Evans, R. A.; Thissen, H.; Forsythe, J. S. Photodegradable Gelatin-Based Hydrogels Prepared by Bioorthogonal Click Chemistry for Cell Encapsulation and Release. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2246.
- (318) Yanagawa, F.; Sugiura, S.; Takagi, T.; Sumaru, K.; Camci-Unal, G.; Patel, A.; Khademhosseini, A.; Kanamori, T. Activated-Ester-Type Photocleavable Crosslinker for Preparation of Photodegradable Hydrogels Using a Two-Component Mixing Reaction. *Adv Healthc Mater* **2015**, *4* (2), 246.

- (319) Li, L.; Scheiger, J. M.; Tronser, T.; Long, C.; Demir, K.; Wilson, C. L.; Kuzina, M. A.; Levkin, P. A. Inherent Photodegradability of Polymethacrylate Hydrogels: Straightforward Access to Biocompatible Soft Microstructures. *Adv Funct Mater* **2019**, *29* (33).
- (320) Benton, J. A.; DeForest, C. A.; Vivekanandan, V.; Anseth, K. S. Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function. *Tissue Eng Pt A* **2009**, *15* (11), 3221.
- (321) Choi, J. O.; Moore, J. A.; Corelli, J. C.; Silverman, J. P.; Bakhru, H. Degradation of Poly(Methylmethacrylate) by Deep Ultraviolet, X-Ray, Electron-Beam, and Proton-Beam Irradiations. *J Vac Sci Technol B* **1988**, *6* (6), 2286.
- (322) Eastoe, J. E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem J* **1955**, *61* (4), 589.
- (323) Hutson, C. B.; Nichol, J. W.; Aubin, H.; Bae, H.; Yamanlar, S.; Al-Haque, S.; Koshy, S. T.; Khademhosseini, A. Synthesis and Characterization of Tunable Poly(Ethylene Glycol): Gelatin Methacrylate Composite Hydrogels. *Tissue Eng Pt A* **2011**, *17* (13-14), 1713.
- (324) Rosenfeld, A. Miniaturized combinatorial screening of small molecules, responsive hydrogels, and biomaterials. *Doktorarbeit* **2020**, DOI:10.5445/IR/1000122483 10.5445/IR/1000122483.
- (325) Rosenfeld, A., Göckler, T., Reischl, M., Kuzina, M., Schepers, U., Levkin, P.A. Designing inherently photodegradable cell-adhesive hydrogels for 3D cell culture. *Adv Healthc Mater (submitted)* **2020**.
- (326) Boehnke, N.; Cam, C.; Bat, E.; Segura, T.; Maynard, H. D. Imine Hydrogels with Tunable Degradability for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2101.
- (327) Houck, H. A.; Muller, P.; Wegener, M.; Barner-Kowollik, C.; Du Prez, F. E.; Blasco, E. Shining Light on Poly(ethylene glycol): From Polymer Modification to 3D Laser Printing of Water Erasable Microstructures. *Adv Mater* **2020**, *32* (34), e2003060.
- (328) Dobos, A.; Van Hoorick, J.; Steiger, W.; Gruber, P.; Markovic, M.; Andriotis, O. G.; Rohatschek, A.; Dubruel, P.; Thurner, P. J.; Van Vlierberghe, S. et al. Thiol-Gelatin-Norbornene Bioink for Laser-Based High-Definition Bioprinting. *Adv Healthc Mater* **2020**, *9* (15).
- (329) Griffith, C. K.; Miller, C.; Sainson, R. C.; Calvert, J. W.; Jeon, N. L.; Hughes, C. C.; George, S. C. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* **2005**, *11* (1-2), 257.
- (330) Kolesky, D. B.; Truby, R. L.; Gladman, A. S.; Busbee, T. A.; Homan, K. A.; Lewis, J. A. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv Mater* **2014**, *26* (19), 3124.

- (331) Miri, A. K.; Khalilpour, A.; Cecen, B.; Maharjan, S.; Shin, S. R.; Khademhosseini, A. Multiscale bioprinting of vascularized models. *Biomaterials* **2019**, *198*, 204.
- (332) Bioprinting Pluronic F127 Protocol. *Allevi Protocols* **2020**.
- (333) Bertassoni, L. E.; Cecconi, M.; Manoharan, V.; Nikkhah, M.; Hjortnaes, J.; Cristino, A. L.; Barabaschi, G.; Demarchi, D.; Dokmeci, M. R.; Yang, Y. Z. et al. Hydrogel bioprinted microchannel networks for vascularization of tissue engineering constructs. *Lab on a Chip* **2014**, *14* (13), 2202.
- (334) Van Hoorick, J.; Tytgat, L.; Dobos, A.; Ottevaere, H.; Van Erps, J.; Thienpont, H.; Ovsianikov, A.; Dubruel, P.; Van Vlierberghe, S. (Photo-)crosslinkable gelatin derivatives for biofabrication applications. *Acta Biomater* **2019**, *97*, 46.
- (335) Tamura, M.; Yanagawa, F.; Sugiura, S.; Takagi, T.; Sumaru, K.; Matsui, H.; Kanamori, T. Optical cell separation from three-dimensional environment in photodegradable hydrogels for pure culture techniques. *Sci Rep* **2014**, *4*, 4793.
- (336) Kloxin, A. M.; Tibbitt, M. W.; Kasko, A. M.; Fairbairn, J. A.; Anseth, K. S. Tunable Hydrogels for External Manipulation of Cellular Microenvironments through Controlled Photodegradation. *Adv Mater* **2010**, *22* (1), 61.
- (337) Jay, S. M.; Saltzman, W. M. Shining light on a new class of hydrogels. *Nat Biotechnol* **2009**, *27* (6), 543.
- (338) Johnson, D. W.; Langford, C. R.; Didsbury, M. P.; Lipp, B.; Przyborski, S. A.; Cameron, N. R. Fully biodegradable and biocompatible emulsion templated polymer scaffolds by thiol-acrylate polymerization of polycaprolactone macromonomers. *Polym Chem-Uk* **2015**, *6* (41), 7256.
- (339) Kelly, S. T.; Zydney, A. L. Effects of intermolecular thiol-disulfide interchange reactions on bsa fouling during microfiltration. *Biotechnol Bioeng* **1994**, *44* (8), 972.
- (340) User Guide: Ellman's Reagent. *Thermo Fisher Scientific* **2011**.
- (341) Masuko, T.; Minami, A.; Iwasaki, N.; Majima, T.; Nishimura, S.; Lee, Y. C. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* **2005**, *339* (1), 69.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die durch ihr fachliches und persönliches Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ute Schepers bedanken für die Möglichkeit an der spannenden Thematik rund um den biologischen 3D-Druck zu arbeiten, für ihre vielfältigen Anregungen während der gesamten Zeit sowie ihre stetige Unterstützung bei all meinen Ideen und Vorhaben. Danke Ute für die unvergesslichen drei Jahre.

Prof. Dr. Pavel Levkin danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die fachliche Betreuung. Ebenso ein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe, insbesondere an Dr. Alisa Rosenfeld und Mariia Kuzina für die hervorragende Zusammenarbeit.

Bei Prof. Dr. Martin Wegener und Tobias Messer möchte ich mich für die enge Kollaboration, den fachlichen Austausch und die stetige Bereitschaft bedanken, die Verdruckbarkeit meiner synthetisierten Materialien im *Direct Laser Writing* zu erproben.

Ein besonderer Dank geht an Asst. Prof. Dr. Samanvaya Srivastava, der mich für einen dreieinhalbmonatigen Forschungsaufenthalt an der *University of California, Los Angeles* (UCLA) freundlich in seinen Arbeitskreis aufgenommen, ein spannendes Kollaborationsprojekt auf den Weg gebracht und mich dabei stets tatkräftig unterstützt hat. Ein großes Dankeschön auch an die gesamte Arbeitsgruppe, insbesondere an Defu Li für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung bei den rheologischen Messungen. Ebenso möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die meine Zeit in den USA auch außerhalb des Labors zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht haben, darunter Shilin Chen, Joonbaek Jang, Martina Rüscher, Advait Holkar, Simran Kumari, Celin Tesvara, Vaidish Sumaria und Karen Safaryan. Danke für die vielen gemeinsamen Aktivitäten, kulinarischen Ausflüge und Karaokeabende, das exzessive Spielen von *Codenames* während der wöchentlichen *Coffee-Hour*, den spontanen Roadtrip nach Death Valley und so vieles mehr.

Bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des AK Schepers bedanke ich mich für die harmonische Arbeitsatmosphäre, wodurch der Laboralltag stets mit großer Freude verbunden war. Meinen ganz besonderen Dank möchte ich dabei Dr. Anna

Meschkov und dem INKIT-Team Sonja Haase, Rebecca Pfister und Xenia Kempter aussprechen, die mich über die letzten drei Jahre begleitet haben; dank ihrer Spontaneität, Kreativität und ihres unermüdlichen Tatendrangs wurden auch die unvorhergesehensten Komplikationen stets gemeistert. Zudem wäre das Doktorandendasein ohne die gemeinsamen Teepausen, gemütlichen Grillabende, Joggingrunden um den Campus Nord sowie Ausflüge zum Casino oder zur Pferderennbahn sicherlich nur halb so schön gewesen. Ein herzliches Dankeschön gilt ebenso der Stammzell-Unit Nicole Pleschka, Tamara Molitor und Hannah Buntz, dem Peptoid-Team Dr. Ilona Wehl, Dr. Bettina Fleck und Dominik Feser, dem Nanopartikel- und Fluorophor-Team Dr. Bettina Olshausen und Juliana Pfeifer sowie dem vasQlab-Team Dr. Vanessa Kappings, Dr. Eva Zittel, Christoph Grün, Michael Grün und Ludwig Pollich. Meinen Bachelor- und Masterstudenten Benjamin Konetschny, Eleftheria Papamanoglou, Alisa Grimm, Sonja Leopold und Ebruhan Asci danke ich für ihre wissenschaftliche Neugier und zuverlässige Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei meinem *Thesis Advisory Committee* (TAC) Prof. Dr. Ute Schepers, Prof. Dr. Patrick Théato und Prof. Dr. Frank Breitling für die fachliche Unterstützung und den interdisziplinären Wissensaustausch bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Larissa Kaufmann und Carmen Manz sowie der gesamten *BioInterfaces International Graduate School* (BIF-IGS) für die umfangreichen Weiterbildungsmöglichkeiten sowie die finanzielle Unterstützung bei Konferenzbesuchen. Gleichermaßen gilt mein Dank Stefanie Peer und der *HEiKA Graduate School on Functional Materials* für die Möglichkeit, an einem *MBA Fundamentals Program* der *HECTOR School of Engineering and Management* des KIT teilzunehmen.

Dem Verband der Chemischen Industrie (VCI) und der Landesgraduiertenförderung (LGF) möchte ich für die erhaltenen Stipendien zur Finanzierung meines Promotionsvorhabens danken. Dem *Karlsruhe House of Young Scientists* (KHYS) danke ich für die finanzielle Unterstützung bei meinem Forschungsaufenthalt an der UCLA. Weiterhin möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für den im Rahmen der Exzellenzinitiative des Bundes geförderten Exzellenzcluster *3D Matter Made to Order* (3DMM2O) (EXC-2082/1 – 390761711) und beim Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für das *3D-Bio-Net* im Rahmen der KMU-NetC-Förderlinie (FKZ 03VNE1034D) bedanken hinsichtlich der finanziellen Unterstützung und der interdisziplinären Vernetzung mit anderen Universitäten und Forschungsgruppen.

Abschließend möchte ich noch einen ganz besonderen Dank an meine Familie aussprechen, die mich bei all meinen Entscheidungen meines bisherigen Werdegangs unterstützt haben und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen. Ebenso ein großes Dankeschön an meine Freunde, die sowohl in den besten als auch in den schwierigsten Zeiten immer für mich da sind, sowie an meine Basketballmannschaft, die stets den perfekten Ausgleich zum teilweise stressigen Laboralltag bildete.