

# Entwicklung von Hydrogelen zur Herstellung von Organmodellen mit dem 3D-Biodruckverfahren

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. Alisa Leonie Grimm

aus

Pforzheim, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers

2. Referentin: PD Dr. Beate Köberle

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2023



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Ute Schepers von Oktober 2020 bis November 2023 am Institut für Funktionelle Grenzflächen des Karlsruher Instituts für Technologie angefertigt.

Frau PD Dr. Beate Köberle möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.



## **Eidesstaatliche 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.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

(Marie Curie)



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 <i>Tissue Engineering</i> .....	3
1.2 3D-Biodrucktechniken.....	5
1.3 Materialentwicklung für den 3D-Biodruck.....	7
1.3.1 Hydrogele .....	8
1.4 Entwicklung von artifiziellem Herzgewebe .....	11
1.4.1 Das menschliche Herz.....	11
1.4.2 Zellulärer Aufbau der Herzwand .....	14
1.4.3 Kardiomyozyten.....	15
1.4.4 Kardiales <i>Tissue Engineering</i> .....	18
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>21</b>
3.1 Anwendung gelatinebasierter Hydrogele zum Aufbau eines Herzgewebes.....	21
3.1.1 Synthese gelatinebasierter Hydrogele .....	21
3.1.1.1 Gelatinemethacrylat.....	22
3.1.1.2 Norbornenfunktionalisierte Gelatine.....	23
3.1.1.3 Thiolierte Gelatine .....	24
3.1.1.4 Bestimmung des Funktionalisierungsgrades der Photopolymere.....	25
3.1.2 Chemische Charakterisierung.....	27
3.1.2.1 Vernetzung der gelatinebasierten Hydrogele .....	27
3.1.3 Aufbau des Herzmuskels aus verschiedenen Zelltypen .....	30
3.1.3.1 Zytotoxizität des Photoinitiators und der Bestrahlung.....	31
3.1.3.2 Wachstumskurve .....	37
3.1.3.3 Untersuchung des Proliferationsverhaltens herzspezifischer Zellarten ....	39
3.1.3.4 Lebend-/Tot-Färbungen.....	41
3.1.3.5 Lebend-/Tot-Färbungen der Kokulturen.....	51
3.1.3.6 Aufbau einer Kokultur von Herzmuskelzellen und Herzfibroblasten .....	65
3.1.3.7 3D-Biodruck von herzspezifischen Zellarten .....	67
3.1.4 Kapitelzusammenfassung.....	74
3.2 Verwendung von hiPSC zum Aufbau von Organmodellen .....	75
3.2.1 Nachweis der Pluripotenz der hiPSC der Zelllinie HDII .....	76

3.2.2	Differenzierung von hiPSC der Zelllinie HDII zu Kardiomyozyten.....	77
3.2.2.1	Antikörpermarkierung differenzierter Kardiomyozyten.....	79
3.2.2.2	Genexpression kardialer Marker.....	81
3.2.2.3	Visualisierung der Kontraktionen der differenzierten Kardiomyozyten.....	82
3.2.3	Verwendung von semi-synthetischen Hydrogelen für die Anwendung mit hiPSC	84
3.2.3.1	Untersuchung der Toxizität des Photoinitiators auf hiPSC und auf differenzierte Kardiomyozyten.....	85
3.2.3.2	3D-Kultivierung der differenzierten Kardiomyozyten im Hydrogel.....	88
3.2.3.3	Kokultur mit HCF.....	91
3.2.4	Kapitelzusammenfassung.....	93
3.3	Hydrogele mit Doppelnetzwerken.....	94
3.3.1	Synthese der Blockcopolyelektrolyte.....	96
3.3.2	Chemische Charakterisierung der GelMA/bPE.....	100
3.3.2.1	Rheologische Charakterisierung.....	101
3.3.2.2	Zugversuche der GelMA/bPE-Hydrogele.....	105
3.3.2.3	Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen von GelMA/bPE.....	107
3.3.2.4	Untersuchung der Freisetzung der Masse.....	108
3.3.2.5	Quelleigenschaften der GelMA/bPE.....	109
3.3.2.6	Aushärtungszeiten.....	110
3.3.2.7	3D-Biodruck mehrerer Schichten.....	111
3.3.3	Biologische Charakterisierung.....	113
3.3.3.1	Zytotoxizität der Vorläuferlösungen.....	113
3.3.3.2	3D-Einbettung von Zellen.....	114
3.3.3.3	3D-Biodruck.....	117
3.3.3.3.1	Extrusionsbasiertes Druckscreening der GelMA/bPE.....	117
3.3.3.3.2	Extrusionsbasierter 3D-Biodruck mit Zellen.....	120
3.3.4	Kapitelzusammenfassung.....	121
3.4	Fazit und Abschlussdiskussion.....	123
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>125</b>
4.1	Material.....	125
4.1.1	Verwendete Zelllinien.....	125
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	125
4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	129
4.1.4	Geräte.....	130

---

4.1.5	Zellkulturmedien .....	132
4.1.6	Zusammengesetzte Medien und Chemikalien .....	133
4.1.7	Antikörper .....	133
4.1.8	<i>Primer</i> .....	134
4.1.9	Software .....	134
4.2	Methoden .....	135
4.2.1	Synthesen .....	135
4.2.1.1	Synthese von Gelatinemethacrylat (GelMA) .....	135
4.2.1.2	Synthese von norbornenfunktionalisierter Gelatine (GelN).....	135
4.2.1.3	Synthese von thiolierter Gelatine (GelS) .....	136
4.2.1.4	Synthese von PAGE <sub>30</sub> -PEG <sub>454</sub> -PAGE <sub>30</sub> -Triblockcopolymeren und mPEG <sub>113</sub> -PAGE <sub>45</sub> -Diblockcopolymeren .....	137
4.2.1.5	Modifizierung der Triblockpolymere und Diblockcopolymere mit Guanidinium- oder Sulfonatgruppen.....	137
4.2.2	Herstellung der Hydrogele .....	138
4.2.2.1	Photopolymere .....	138
4.2.2.2	Doppelnetzwerk-Hydrogele.....	139
4.2.3	Chemische Charakterisierung der verschiedenen Polymere.....	139
4.2.3.1	NMR-Spektroskopie.....	139
4.2.3.2	TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades der Photopolymere .....	139
4.2.3.3	Rheologische Charakterisierung von Doppelnetzwerk-Hydrogelen.....	140
4.2.3.4	Zugversuche von Doppelnetzwerk-Hydrogelen.....	140
4.2.3.5	Untersuchung der Freisetzung der Masse von Doppelnetzwerk-Hydrogelen 141	
4.2.3.6	Quellverhältnis von Doppelnetzwerk-Hydrogelen.....	141
4.2.3.7	Rasterelektronenmikroskopie der Doppelnetzwerk-Hydrogele.....	141
4.2.4	Zellkultur.....	142
4.2.4.1	Kultivierung von HepG2.....	142
4.2.4.2	Kultivierung von HUVEC.....	142
4.2.4.3	Kultivierung von HCM.....	142
4.2.4.4	Kultivierung von HCF.....	143
4.2.4.5	Kultivierung von hiPSC der Linie HDII .....	143
4.2.4.6	Differenzierung von Kardiomyozyten aus HDII.....	143
4.2.4.7	Ablösen der differenzierten Kardiomyozyten.....	144

4.2.4.8	Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	145
4.2.5	Einbettung von Zellen in und auf Hydrogelen.....	145
4.2.5.1	Ansetzen einer 3D-Kultur in Hydrogelen .....	145
4.2.5.2	Kultivierung von Zellen auf den Hydrogeloberflächen. ....	146
4.2.5.3	Ansetzen von Biotinten .....	146
4.2.6	Visualisierung von Zellen und Zellstrukturen.....	146
4.2.6.1	Fixieren der Zellen .....	146
4.2.6.2	Permeabilisieren der Zellen .....	147
4.2.6.3	Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen.....	147
4.2.6.4	Immunfluoreszenzmarkierung spezifischer Zellstrukturen.....	147
4.2.6.5	Färbung der Zellkerne .....	148
4.2.6.6	Färbung des Aktinzytoskeletts .....	148
4.2.6.7	Verwendete Volumina.....	148
4.2.7	Wachstums- und Viabilitätsuntersuchungen der Materialien .....	148
4.2.7.1	Wachstumskurve .....	148
4.2.7.2	Presto-Blue™ Assay zur Bestimmung der Zellproliferation .....	149
4.2.7.3	MTT-Assay zur Überprüfung der Zytotoxizität.....	149
4.2.7.4	Lebend-/Tot-Färbung im Hydrogel .....	150
4.2.7.5	<i>Calcium Imaging</i> der differenzierten Kardiomyozyten .....	150
4.2.8	Molekularbiologische Methoden.....	151
4.2.8.1	RNA Isolation.....	151
4.2.8.2	DNA-Verdau .....	151
4.2.8.3	Reverse Transkription.....	152
4.2.8.4	Kontroll-PCR.....	152
4.2.8.5	Gelelektrophorese .....	153
4.2.8.6	RT-qPCR.....	153
4.2.9	Statistische Auswertung.....	154
	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>163</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>167</b>

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist die Zahl der Organspender immer weiter zurückgegangen, während viele Menschen vergeblich auf ein Organ warten. Das Forschungsfeld *Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der Herstellung von artifiziellem Gewebe, um dieses Problem anzugehen. Die rekonstruierten *in vitro* Gewebemodelle können zur Erneuerung oder als Ersatz von Gewebe oder Organen eingesetzt werden. Ein Teilgebiet des *Tissue Engineerings* stellt der 3D-Biodruck (*3D-Bioprinting*) dar, bei dem verschiedene Materialien und Drucktechniken kombiniert werden, um komplexe Gewebestrukturen herzustellen, die transplantiert werden können. Hierbei können patientenspezifische Zellen dem Körper entnommen und anschließend in einer geeigneten Stützmatrix differenziert und daraufhin transplantiert werden, wodurch das Risiko von Abstoßungsreaktionen minimiert wird. Diese sogenannten Stützmaterialien müssen gewissen Anforderungen entsprechen, damit sie für den 3D-Biodruck in Frage kommen. So müssen diese zum Beispiel eine gute Biokompatibilität besitzen, damit eine hohe Zellviabilität und Gewebebildung erreicht werden kann und außerdem den physikalischen Anforderungen des Druckprozesses standhalten. Hydrogele sind häufig verwendete Stützmaterialien und können durch eine chemische Modifizierung von natürlichen in semi-synthetische Hydrogele umgewandelt werden, die die positiven Eigenschaften der synthetischen und natürlichen Hydrogele vereinen. In dieser Arbeit wurden semi-synthetische Materialien für den Einsatz in 3D-Biodruckprozessen hergestellt und auf deren Anwendung im artifiziiellen Gewebeaufbau evaluiert.

Aus dem natürlichen Material Gelatine konnte im Arbeitskreis Schepers (IFG, KIT) ein Zweikomponenten-Hydrogel aus norbornenfunktionalisierter Gelatine und thiolierter Gelatine (GelNB/GelS) etabliert werden. Neben dem GelNB/GelS ist bereits das semi-synthetische Hydrogel Gelatinemethacrylat (GelMA) etabliert. Durch den Einsatz von unterschiedlichen Mengen der Edukte kann die Gelatine unterschiedliche Funktionalisierungsgrade aufweisen. Diese Materialien wurden für die Eignung der Rekonstruktion eines humanen Herzgewebes analysiert. Dabei wurden humane Kardiomyozyten (*engl. human cardiac myocytes*, HCM), humane Herzfibroblasten (*engl. human cardiac fibroblasts*, HCF) und humane Nabelschnurendothelzellen (*engl. human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) als Zelltypen eingesetzt. Nachdem eine Toxizität während des Vernetzungsprozesses auf die Zellen ausgeschlossen werden konnte, wurden die Zellen zur Untersuchung der Viabilität und Proliferation einzeln in den Hydrogelen kultiviert. Innerhalb der Hydrogele zeigten sich Unterschiede aufgrund der verschieden starken Funktionalisierungen der Gelatine und geringe Ausbildungen von zellulären Ausläufern. Eine Kokultur aus den HCF oder HCM mit den Endothelzellen führte zu einer erhöhten Zellviabilität und verbesserten Zell-Zell-Kontakten in den mittel und hoch funktionalisierten Hydrogelen. Des Weiteren wurde eine Kokultur der HCM mit dem HCF innerhalb des Hydrogels erzeugt, welche zu einer verbesserten Elongation der Zellen führte. Darüber hinaus wurden aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (*engl. human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) Kardiomyozyten differenziert, die für das Herz charakteristische Kontraktionen aufwiesen. Durch eine immunhistologische Markierung von kardialem Troponin T (cTnT) konnte die Differenzierung verifiziert werden. Nachdem der Vernetzungsprozess geringe toxische Auswirkungen auf die differenzierten Kardiomyozyten zeigte, wurden diese innerhalb der mittel funktionalisierten Hydrogele eingebettet. Im GelMA zeigten die differenzierten Kardiomyozyten zelluläre Ausrichtungen und die charakteristischen

Kontraktionen. Durch eine immunhistochemische Markierung konnte die erfolgreiche 3D-Einbettung der differenzierten Kardiomyozyten validiert werden. Anschließend konnte anhand der Kokultivierung mit HCF erfolgreich ein Herzgewebe etabliert werden.

Um den extrusionsbasierten 3D-Biodruck von makroskopischen Hohlstrukturen zu ermöglichen, wurde das semi-synthetische chemisch vernetzte Hydrogel GelMA außerdem in einer Kooperation mit der *University of California, Los Angeles* (UCLA) mit der Arbeitsgruppe von Ass. Prof. Samanvaya Srivastava mit einem zweiten physikalischen Netzwerk aus geladenen Tri- oder Diblockcopolyelektrolyten (TbPE oder DbPE) ergänzt. Es wurden festgelegte Formulierungen der GelMA mit den Blockcopolyelektrolyten (GelMA/bPE) hinsichtlich der mechanischen und chemischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei erhöhte das zusätzliche zweite physikalische Netzwerk die mechanische Stabilität des GelMAs bei physiologischen Temperaturen und das GelMA verlieh den DbPE oder TbPE eine definierte Quellbarkeit. Somit konnten die positiven Eigenschaften der Einzelnetzwerke in dem Doppelnetzwerk vereint werden. Anschließend wurden die GelMA/bPE biologisch charakterisiert. Durch den Zusatz der bPE konnte die Viskosität des GelMA bei physiologischen Temperaturen erhöht werden, so dass dies den Einsatz im extrusionsbasierten 3D-Biodruck bei 37 °C ermöglichte. Außerdem wurde durch das Doppelnetzwerk eine erhöhte Strukturintegrität erreicht, wodurch ein 3D-Druck mehrerer Schichten mit einem letzten Aushärtungsschritt möglich wurde. Mit dem Einsatz der Doppelnetzwerk-Hydrogele konnten makroskopische Hohlstrukturen im extrusionsbasierten 3D-Biodruck erzeugt werden.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnten zwei unterschiedliche Materialien entwickelt und deren Eignung zum artifiziellen Gewebeaufbau evaluiert werden. Die Ergebnisse bieten vielversprechende Ansätze für die Erforschung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden. Diese Arbeit zeigt vielversprechende Ansätze für die Gewebezüchtung und den 3D-Biodruck auf und liefert wichtige Erkenntnisse für die Zukunft der Medizin und Organtransplantationen.

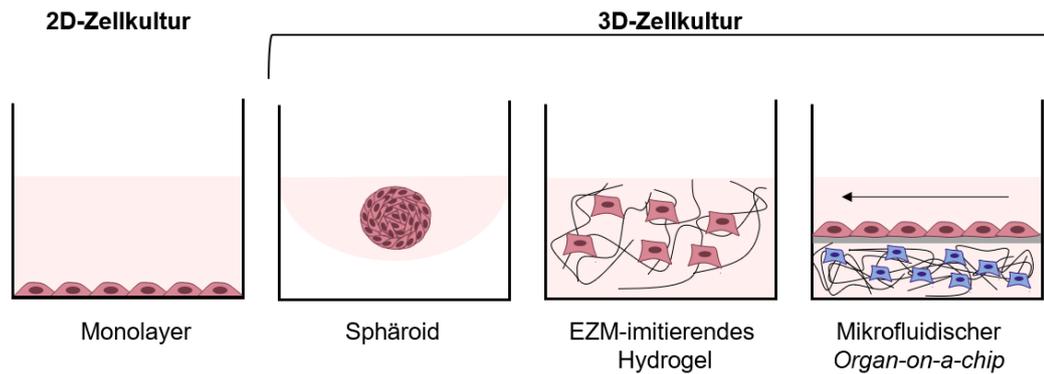
# 1 Einleitung

Weltweit stellt eine der Hauptursachen für menschliche Todesfälle das allgemeine Organversagen dar.<sup>1</sup> Behandlungsmaßnahmen von Organversagen sind üblicherweise Organtransplantationen oder der Einsatz von künstlichen Systemen zur Unterstützung, die hauptsächlich außerhalb des Körpers eingesetzt werden, wie Dialyseverfahren.<sup>2</sup> Über 100.000 Menschen stehen aktuell weltweit auf der Warteliste für das erhoffte Spenderorgan durch eine Organtransplantation.<sup>3</sup> Allein in Deutschland sind über 8.000 Menschen für eine potenzielle Organtransplantation gelistet.<sup>4</sup> Alle 10 Minuten wird weltweit einer neuer Patient der Warteliste hinzugefügt, was die enorme Nachfrage nach Organtransplantationen verdeutlicht. Im Jahr 2022 konnten über 40.000 Organe transplantiert werden, was den Bedarf an Organtransplantationen bei weitem nicht abdeckt.<sup>3</sup> Außerdem besteht die Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion aufgrund einer körpereigenen Immunabwehr gegen das transplantierte Organ.<sup>5</sup> Durch den Mangel an Organspendern und der Abstoßungsreaktionen steht der aktuelle Fokus der Forschung zur Erzeugung von artifiziellen Organen und Geweben im Vordergrund. Durch den Einsatz von patientenspezifischen Zellen können Abstoßungsreaktionen zudem umgangen werden.<sup>6,7</sup>

## 1.1 *Tissue Engineering*

Hierbei spielt das neu entwickelte Forschungsgebiet des *Tissue Engineerings* eine entscheidende Rolle. Es beschäftigt sich mit der Rekonstruktion von *in vivo* Geweben oder Organen durch die Herstellung artifizieller *in vitro* Gewebemodelle, mit dem Ziel, in Zukunft ganze Organe zu rekonstruieren.<sup>8,9</sup> Das *Tissue Engineering* stellt einen interdisziplinären Bereich dar, das die Felder von Ingenieurs- und Biowissenschaften vereint und neue Technologien entwickelt, um *in vitro* Gewebemodelle herzustellen.<sup>10</sup> Seit den 1990er Jahren werden intensive Forschungen im Bereich des *Tissue Engineerings* durchgeführt, wodurch bereits erfolgreich artifizielle Organe oder Gewebemodelle, die zu Transplantationszwecken eingesetzt werden können, entwickelt wurden.<sup>10-12</sup> Durch die Kombination von Zellen, Gerüststrukturen und zellspezifischen Wachstumsfaktoren können transplantierbare Gewebemodelle entwickelt werden.<sup>5</sup> Zusammen mit der Entwicklung der humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (*engl. human induced pluripotent stem cells*, hiPSC), die direkt aus körpereigenen Zellen des Patienten gewonnen werden, können diese Gewebe personalisiert hergestellt werden.<sup>13-15</sup> Neben der direkten Herstellung von Ersatzgeweben bietet das *Tissue Engineering* auch die Möglichkeit Testgewebe für die Entwicklung von Wirkstoffen herzustellen. Die erreichten Fortschritte in der kombinatorischen Synthese ermöglichen es in kurzer Zeit viele neue Wirkstoffkandidaten zu entwickeln.<sup>16,17</sup> Diese potentiellen Wirkstoffe bedürfen in der präklinischen Phase Voruntersuchungen, die überwiegend an Tieren zur Untersuchung der Toxizität und des Penetrationsverhaltens der Wirkstoffe durchgeführt werden.<sup>18,19</sup> Anschließend können die in der präklinischen Phase validierten Wirkstoffe in klinischen Studien an Menschen getestet werden. Bis hin zur klinischen Testungsphase an Menschen können teilweise mehrere Jahre vergehen. Die Ergebnisse, die durch die Tierversuche generiert werden, sind jedoch nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da es

genetische Unterschiede in metabolischen und physiologischen Prozessen zum Menschen gibt.<sup>20,21</sup> Diese speziesspezifische Unterschiede sowie die ethische Vertretbarkeit von Tierversuchen stellt die Notwendigkeit der Entwicklung von Alternativen zu Tierversuchen dar.<sup>22,23</sup> An den durch das *Tissue Engineering* entwickelten humanen Geweben können anschließend Krankheiten modelliert und potentielle Wirkstoffkandidaten getestet werden.<sup>24</sup> In der Vergangenheit wurden in der Wirkstoffentwicklung humane Zellen in einer zweidimensionalen (2D) Kultur verwendet. Die Zellen werden in einem *Monolayer* adhärent auf Plastikmaterialien in dem zellspezifischen Kultivierungsmedium kultiviert. Diese Methode zeichnet sich durch niedrige Kosten und eine hohe Reproduzierbarkeit aus.<sup>25</sup> Diese 2D-Kultivierungsmethode spiegelt jedoch nicht die *in vivo* Bedingungen wieder. Im menschlichen Körper liegen die Zellen in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung vor, wobei sie von einer extrazellulären Matrix (*engl. extracellular matrix*, EZM) umgeben sind. Die Zellen können mit umliegenden Zellen und der EZM durch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte kommunizieren.<sup>26</sup> Durch die einfachen Modelle der adhären 2D-Kultur von Zellen kann somit die Komplexität eines gesamten Gewebes oder Organs nicht abgebildet werden. Aus diesem Grund hat sich die Forschung auf die Entwicklung von 3D-Gewebemodellen fokussiert. Die umgebende EZM wird normalerweise vom Gewebe selbst sekretiert und besteht aus zahlreichen Proteinen und bildet eine Stützfunktion für das Gewebe. Außerdem bietet sie den Zellen die Möglichkeit zur Differenzierung, Proliferation und Migration.<sup>27,28</sup> In einer 2D-Kultivierung der Zellen auf meist steifen Plastikmaterialien kann es zu einem Funktionsverlust durch Dedifferenzierung kommen, was durch die 3D-Kultur verhindert wird und die Zelle ihre vollständige Funktion beibehalten kann.<sup>29</sup> Als erste 3D-Modelle wurden sogenannte Sphäroide nachgebildet. Die Zellen bilden durch Akkumulation Zellaggregate aus, die durch intrazelluläre Kontakte zusammengehalten werden.<sup>30,31</sup> Die Zellaggregate werden durch den Einsatz von Schwerkraft oder durch nichtadhäsive Oberflächenbeschichtungen generiert.<sup>32,33</sup> Sphäroide werden häufig zur Tumormodellierung in der Tumordiagnostik eingesetzt.<sup>34,35</sup> Heute werden sie häufig durch sogenannte Organoiden ersetzt, die durch Differenzierung von Stammzellen oder hiPSC einzelne Organstrukturen abbilden.<sup>36</sup> Eine weitere Möglichkeit, die Zellen in einer 3D-Umgebung zu kultivieren, bietet das Einbringen in EZM-imitierende Gerüststrukturen.<sup>38-40</sup> Hierbei werden als Gerüststrukturen häufig Hydrogele eingesetzt, die natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein können. Durch unterschiedliche Vernetzungsmechanismen werden die Zellen innerhalb der Hydrogele eingebettet, wodurch die *in vivo* Bedingungen einer 3D-Umgebung nachgeahmt werden.<sup>41,42</sup> Weitere Anforderungen, die in den generierten Modellen berücksichtigt werden sollten, sind die Integration einer Durchblutung und die Ausbildung von Grenzflächen und Barrieren. Mit der Weiterentwicklung der 3D-Kultivierungsmodelle zu sogenannten *Organ-on-a-chip* Systemen können externe Stimuli, wie ein artifizierender Blutstrom, durch die Kombination mit Pumpen integriert werden. Hierdurch konnte ein dynamisches, fluidisches 3D-Modell entwickelt werden.<sup>43,44</sup> Die verschiedenen Kultivierungssysteme sind in Abbildung 1 dargestellt.



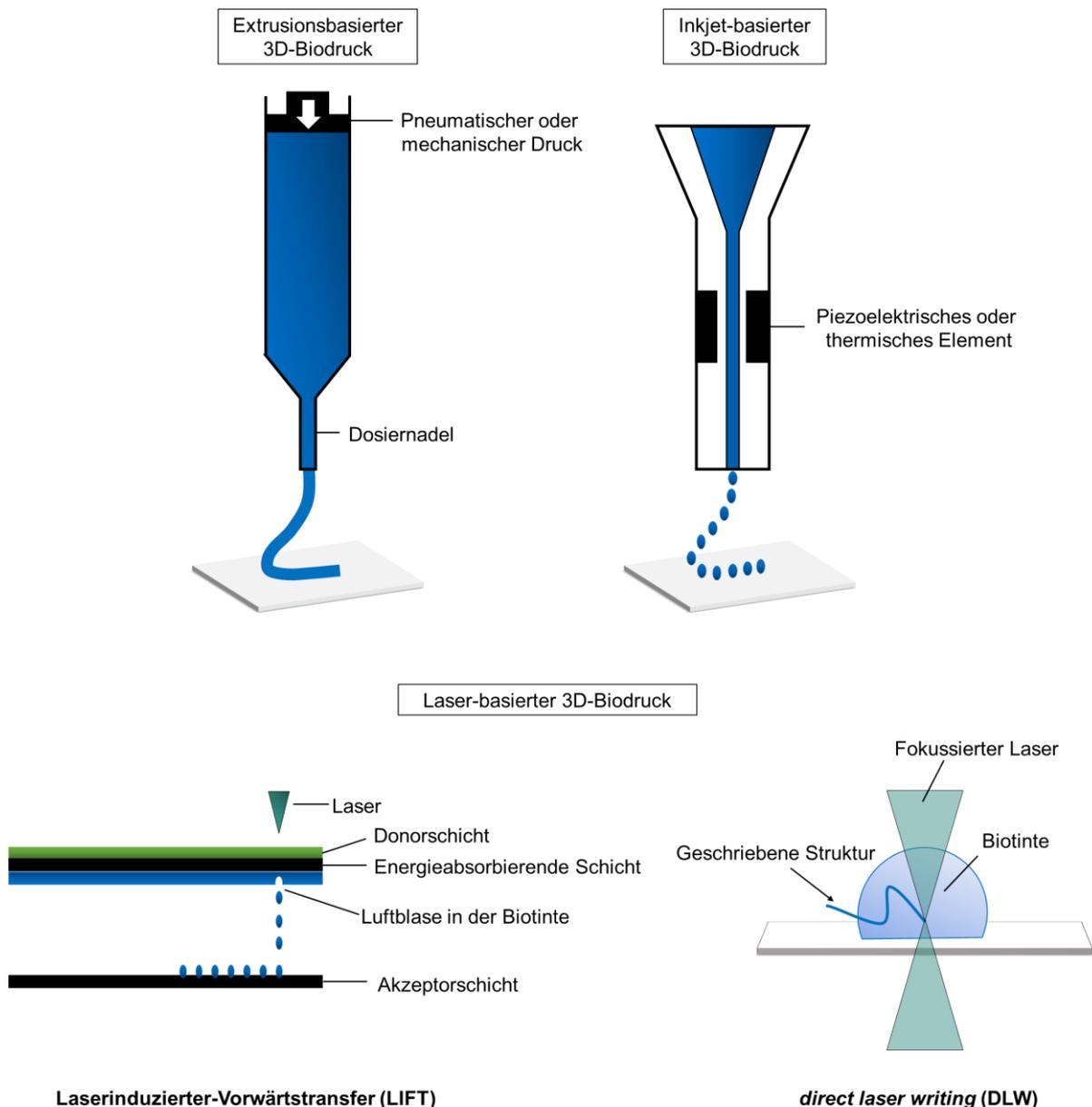
**Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Kultivierungssysteme zur Herstellung von Gewebemodellen.** Die 2D-Zellkultur stellt das einfachste Modellsystem dar. Hier werden die Zellen in einem planaren *Monolayer* kultiviert. In einer 3D-Zellkultur wird zusätzlich die physiologische Umgebung der Zellen imitiert. Bei der Sphäroidbildung liegen die Zellen als Zellaggregate vor. Eine weitere Möglichkeit bietet die Einbettung von Zellen in ein EZM-imitierendes Hydrogel. Mit einem *Organ-on-a-chip* Systemen kann zusätzlich ein artifizierlicher Blutstrom simuliert werden. Modifiziert nach Pfister.<sup>44</sup>

## 1.2 3D-Biodrucktechniken

Durch die Entwicklung einer 3D-Kultur wurde es möglich, die physiologische Umgebung von Zellen nachzuahmen und dadurch *in vivo* Gewebe *in vitro* nachzubilden. Eine einheitliche und präzise Anordnung von Zellen kann durch diese Modelle jedoch nicht erreicht werden. Durch die Erweiterung mit additiven Fertigungsverfahren, speziell mit dem 3D-Biodruck (*engl. 3D-Bioprinting*), wurde die gezielte Positionierung von Zellen in dem 3D-Gewebemodell erzielt.<sup>46,47</sup> Die Geschichte des 3D-Drucks ohne Zellkomponenten geht zurück bis in die 1980er Jahre. Mit der Stereolithographie (SLA), dem selektiven Lasersintern (SLS) und dem *Fused deposition modeling* (FDM) wurden die Grundbausteine für den 3D-Druck gelegt.<sup>47,48</sup> Mit der Entwicklung von CAD-Programmen (computergeterstütztes Design, *engl. computer aided design*, CAD) wurde eine maßgeschneiderte Konstruktion von Modellen am Computer möglich.<sup>50,51</sup> Der kommerzielle 3D-Druck findet eine Vielzahl an Anwendungen in den Gebieten der Industrie, Medizin und vielen weiteren Gebieten. Der 3D-Biodruck wird eingesetzt, um beispielsweise menschliche Zellen in definierte Gerüststrukturen zu drucken und damit artifizielle Organe und Gewebe reproduzierbar herzustellen. In einem schichtweisen (*engl. layer-by-layer*) Verfahren können die Materialien in Kombination mit lebenden Zellen präzise positioniert werden.<sup>52,53</sup> Die Entwicklung von reproduzierbaren humanen Organen und Geweben für Transplantationszwecke wird noch einige Jahre Forschung in Anspruch nehmen, dennoch finden 3D-gedruckte Gewebemodelle, wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, in der Arzneimittelforschung und der Modellierung von Krankheiten Anwendung.<sup>54–56</sup> Im 3D-Biodruck wird zwischen drei Techniken unterschieden. Hierzu zählen der Inkjet-basierte, Laser-basierte (*engl. laser-assisted*) und extrusionsbasierte Druckprozess.

Bei dem Inkjet-basierten 3D-Biodruck, auch *Drop-on-Demand-Druck* genannt, werden aus einer Biotinte, bestehend aus Gerüstmaterialien und lebensfähigen Zellen, Tropfen eines bestimmten Volumens erzeugt und kontaktlos und präzise auf eine Oberfläche aufgebracht.<sup>57–59</sup> Die Tropfen werden mit Hilfe eines thermischen oder piezoelektrischen

Elements erzeugt. Das thermische Element benutzt die elektrische Erwärmung des Druckkopfes, um damit Druckimpulse zu erzeugen, die die Tropfen formen.<sup>58,60</sup> Durch den Einsatz von hohen Temperaturen (200-300 °C) kann jedoch das Überleben von Zellen nicht gewährleistet werden.<sup>61</sup> Piezoelektrische Elemente nutzen akustische Wellen, um aus der eingesetzten Flüssigkeit Tropfen zu erzeugen.<sup>62,63</sup> Dieser Biofabrikationsprozess erlaubt eine hohe Auflösung der gedruckten Strukturen und zeigt außerdem Vorteile wie beispielsweise niedrige Kosten, eine schnelle Produktion von Konstrukten und die Verwendung von kleinen Volumina.<sup>64,65</sup> Durch eine hohe Kompatibilität mit vielen biologischen Materialien zeichnet sich diese Technik aus. Diese Methode beschränkt sich jedoch auf den Einsatz von Flüssigkeiten, weshalb das Drucken von viskosen Materialien erschwert wird.<sup>66</sup> Inkjet-basierte Druckprozesse wurden bereits zur Regeneration von Haut und Knorpel *in situ* eingesetzt.<sup>67,68</sup> Beim Laser-basierten 3D-Biodruck werden Systeme aus einem gepulsten Laserstrahl, einem Donor- und einem Akzeptorsubstrat verwendet.<sup>69,70</sup> Zunächst muss auf das Donorsubstrat eine Schicht aus dem zellbeladenen Material aufgebracht werden, bevor durch einen gepulsten Laserstrahl ein Tropfen aus dem zellbeladenen Material erzeugt werden kann. Dieser Tropfen wird anschließend auf das Akzeptorsubstrat, was durch eine parallele Anordnung des Donor- und Akzeptorsubstrates ermöglicht wird, aufgebracht. Diese Methode wird als Laserinduzierter-Vorwärtstransfer (*engl. laser induced forward transfer*, LIFT) bezeichnet.<sup>71,72</sup> Eine Alternative stellt das *direct laser writing* (DLW) dar. Bei diesem Verfahren wird mit einem fokussierten Laser in einen Tropfen des eingesetzten Materials gedruckt, was auch als Schreiben bezeichnet wird. Durch das DLW können hohe Auflösungen erzielt werden, was auf die Nutzung der Zwei-Photonen-Absorption (2PA) zurückzuführen ist.<sup>73,74</sup> Laser-induzierte 3D-Biodruckprozesse erlauben den Einsatz von viskosen Materialien, da die Verwendung einer Dosiernadel nicht notwendig ist. Zudem können mit dem LIFT-Verfahren hohe Zellkonzentrationen ( $10^8$  Zellen/ml) eingesetzt werden.<sup>75,76</sup> Die hohen Kosten und der hohe Zeitaufwand erschweren jedoch die Rekonstruktion von makroskopischen Materialien, wie sie klinisch notwendig sind. Der extrusionsbasierte 3D-Biodruck ist die herkömmlichste 3D-Biodruckmethode. Die zellbeladenen Materialien werden in einen Druckkopf eingesetzt und mit Hilfe von mechanischem oder pneumatischem Druck durch eine Dosiernadel extrudiert. Dadurch wird ein kontinuierliches Filament des Materials erzeugt, das auf ein Substrat abgelegt werden kann.<sup>77,78</sup> Der pneumatische Druck kann durch den Einsatz von komprimierten Gasen, wie Luft oder Stickstoff, erzeugt werden, wobei der mechanische Druck auf einem Kolben- oder Schraubmechanismus basiert.<sup>79-81</sup> Die extrusionsbasierte 3D-Biodruckmethode zeichnet sich durch ihre Kosteneffizienz und einfache Handhabung aus. Außerdem können hohe Zellkonzentrationen ( $10^8$  Zellen/ml) verdruckt werden.<sup>82</sup> Limitationen zeigen sich in der Wahl des Materials. Das Material muss hohe Viskositäten für den Einsatz im extrusionsbasierten 3D-Biodruck aufzeigen. Zudem benötigt es scherverdünnende Eigenschaften, damit die Zellviabilität bei dem Druck durch eine schmale Dosiernadel nicht beeinträchtigt wird.<sup>83,84</sup> Weitere Nachteile zeigen sich in der geringen Auflösung von 200 µm, die jedoch durch eine hohe Fabrikationsgeschwindigkeit ausgeglichen wird.<sup>85</sup> Mit Hilfe des extrusionsbasierten 3D-Biodrucks konnten bereits Strukturen von klinisch relevanter Größe hergestellt werden.<sup>86,87</sup> Die schematischen Darstellungen der verschiedenen 3D-Biodrucktechniken sind in Abbildung 2 aufgezeigt.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der 3D-Biodrucktechniken.** Im 3D-Biodruck wird zwischen dem extrusionsbasierten, Inkjet-basierten und Laser-basierten 3D-Biodruckverfahren unterschieden. Im extrusionsbasierten 3D-Biodruck wird durch mechanischen oder pneumatischen Druck ein durchgängiges Filament extrudiert und auf einem Substrat abgelegt. Durch ein piezoelektrisches oder thermisches Element können beim Inkjet-basierten 3D-Biodruck Tropfen erzeugt werden und kontaktlos auf das Substrat übertragen werden. Beim Laser-basierten 3D-Biodruck werden mit Hilfe von Lasern die biologischen Strukturen erzeugt. Hierzu zählen das *direct laser writing* (DLW) und der Laserinduzierte-Vorwärtstransfer (LIFT). Modifiziert nach Fulden.<sup>87</sup>

### 1.3 Materialentwicklung für den 3D-Biodruck

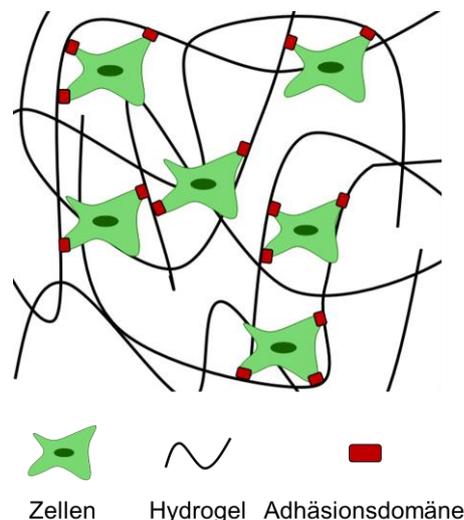
Der kommerzielle 3D-Druck wurde für das Drucken von Metallen, thermoplastischen Polymeren oder Keramik entwickelt. Es werden hohe Temperaturen und organische Lösungsmittel eingesetzt, welche keine Kompatibilität mit lebensfähigen Zellen zeigen.<sup>89</sup> Da die Zellen in den meisten Biodrucktechniken mit dem Material zuvor vermischt werden, was zur Herstellung einer Biotinte führt, muss das Material bestimmte biologische Eigenschaften

aufweisen und keinen toxischen Effekt auf die Zellen haben. Der Hauptfokus im Bereich des 3D-Biodrucks liegt deshalb in der Entwicklung von Materialien, die den Anforderungen des 3D-Biodrucks standhalten und gleichzeitig eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Zunächst ist es notwendig, dass das Material präzise innerhalb des Druckprozesses abgelegt werden kann, um eine räumliche und zeitliche Kontrolle zu gewährleisten.<sup>55</sup> Außerdem werden in bestimmten Biodrucktechniken spezifische viskoelastische Eigenschaften des Materials gefordert. Für den extrusionsbasierten 3D-Biodruck ist es notwendig, dass das Material eine hohe Viskosität besitzt, wobei im Laser-basierten 3D-Biodruck eine niedrige Viskosität notwendig ist. Abhängig von der verwendeten Technik ist außerdem der Vernetzungsmechanismus, der gewählt werden muss. So werden beispielsweise bei dem Laser-basierten 3D-Biodruck schnelle Vernetzungen nach dem Druck benötigt, um die Herstellung von komplexen 3D-Gerüsten zu gewährleisten.<sup>90</sup> Hiermit wird die Anforderung der Druckbarkeit an das Material gestellt. Durch den Einsatz von Zellen in der Biotinte ist es außerdem unerlässlich, dass das Material biokompatibel ist und möglichst nahe den *in vivo* Bedingungen von Zellen aufgebaut wird.<sup>91</sup> Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Biodegradation. Durch den enzymatischen Abbau der Materialien wird den Zellen die Möglichkeit gegeben, ihre EZM zu rekonstruieren und neues Gewebe herzustellen. Außerdem dürfen bei der Biodegradation keine toxischen Nebenprodukte oder Nebenbedingungen gebildet werden, die die Zellviabilität vermindern können.<sup>92</sup> Eine Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff muss in dem Material gewährleistet sein, was unter anderem durch die Porosität des Materials gewährleistet wird.<sup>93</sup> Außerdem müssen kontrollierbare Quell- und Kontraktionseigenschaften gegeben sein. Das Material muss den Zellen die Möglichkeit zur Proliferation, Migration und Differenzierung bieten. In jedem Organ herrschen unterschiedliche Bedingungen, weshalb das Material organspezifische strukturelle und mechanische Eigenschaften aufweisen muss. Ein Herzgewebe muss beispielsweise den Kontraktionen des Herzens standhalten, während eine Leber unterschiedlichen Giftstoffen ausgesetzt wird und eine hohe Filtrationsleistung aufzeigen muss. Außerdem muss das Material gewisse rheologische Eigenschaften gemäß der Steifigkeit des reproduzierenden Organs darstellen.<sup>94,95</sup>

### 1.3.1 Hydrogele

Als geeignete Materialien für den 3D-Biodruck haben sich sogenannte Hydrogele etabliert, die den zuvor genannten Anforderungen entsprechen. Hydrogele sind hydrophile vernetzte Polymere, die große Mengen an Flüssigkeiten absorbieren und speichern können, ohne dabei aufgelöst zu werden.<sup>96</sup> Die hohe Hydrophilie resultiert aus vielen wasserlöslichen Gruppen, wie Carboxyl-, Hydroxyl- oder Aminogruppen, die innerhalb des Hydrogels vorhanden sind und zu einer ausgezeichneten Biokompatibilität führen.<sup>97</sup> Durch diese Biokompatibilität ist der Grundstein für den Einsatz im *Tissue Engineering* für den Aufbau von artifiziellen Gewebemodellen gelegt. In den 1950er Jahren wurden das erste Mal Hydrogele in der Kontaktlinsenherstellung eingesetzt.<sup>98</sup> Neben dem *Tissue Engineering* finden Hydrogele außerdem in dem Medikamententransport und bei der Herstellung von Wundmaterialien zur Förderung der Wundheilung Anwendung.<sup>99,100</sup> Durch die Porosität erlaubt ein Hydrogel außerdem den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff und anderen wasserlöslichen

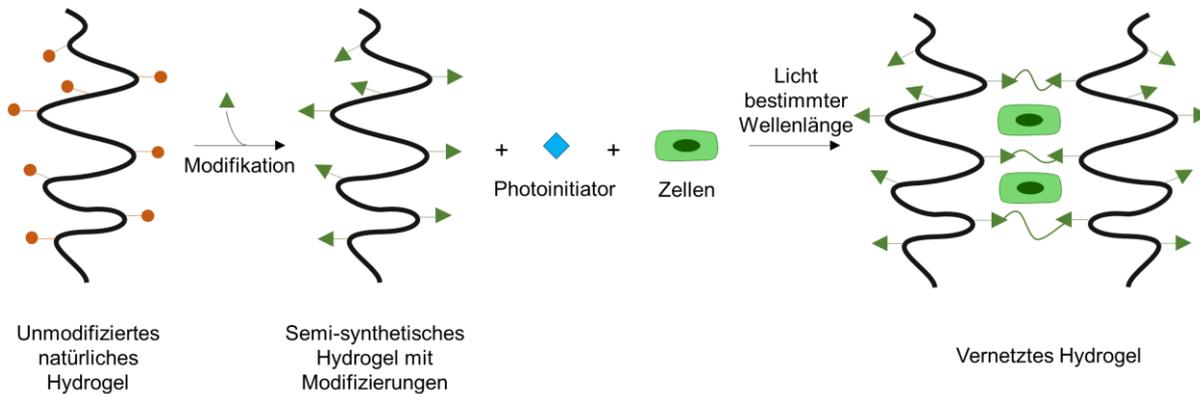
Molekülen.<sup>101</sup> Viele Eigenschaften, die die native EZM aufweist, werden von den Hydrogelen repräsentiert, wodurch die Kultivierung von Zellen in einer möglichst *in vivo* getreuen Umgebung möglich wird. Hydrogele können im Allgemeinen in natürliche und synthetische Hydrogele unterschieden werden. Zu den synthetischen Hydrogelen werden unter anderem Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVA) oder Polymilchsäure (*engl. poly lactic acid*, PLA) gezählt.<sup>102–104</sup> Zu den natürlichen Hydrogelen gehören Kollagen, Fibrin, Alginate oder Gelatine.<sup>105–108</sup> Synthetische Hydrogele zeichnen sich durch ihre mechanische Stabilität aus. Jedoch besitzen diese meist keine Adhäsionsdomänen für die Zellen, was in einer geringen Biokompatibilität resultiert. Die Eigenschaften der synthetischen Hydrogele sind kontrollierbar und eine Inkonsistenz durch Chargenunterschiede kann ausgeschlossen werden.<sup>109,110</sup> Durch die EZM-ähnlichen Eigenschaften besitzen natürliche Hydrogele eine hohe Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit.<sup>111,112</sup> Außerdem zeigen sie eine geringe Antigenität.<sup>113</sup> Einige Vertreter besitzen zudem Zelladhäsionsdomänen. So besitzt beispielsweise das Kollagen, und ebenso die aus der Hydrolyse des Kollagens gewonnene Gelatine, sogenannte RGD-Sequenzen, welche aus dem Aminosäure-Motiv Arginin(R)-Glycin(G)-Aspartat(D) aufgebaut werden.<sup>114</sup> Diese Sequenzen können als Integrinrezeptoren fungieren, womit sich die Zellen an das Hydrogel verankern können. Hierdurch können spezifische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ausgebildet und eine Elongation von Zellen innerhalb der 3D-Gerüststruktur ermöglicht werden.<sup>115</sup> Die Einbettung von Zellen in Hydrogelen mit Adhäsionsdomänen ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Einbettung von Zellen in Hydrogelen mit Adhäsionsdomänen.** Innerhalb des Hydrogels können die Zellen mit ihren Integrinen an die Adhäsionsdomänen binden. Hierdurch kann eine Elongation und eine Morphologieänderung der Zellen stattfinden. Modifiziert nach Ahearne.<sup>116</sup>

Durch ursprungsbedingte Chargenunterschiede und einer mangelnden Stabilität von natürlichen Hydrogelen wurde sich in der Forschung auf die Entwicklung von semi-synthetischen Hydrogelen fokussiert. Durch eine chemische Modifikation von natürlichen Materialien können die Vorteile von natürlichen und synthetischen Polymeren vereint werden.<sup>117,118</sup> Semi-synthetische Hydrogele zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität sowie einer hohen mechanischen Stabilität aus.<sup>119</sup> Außerdem sind innerhalb des Hydrogels die notwendigen Zelladhäsionsdomänen aufzufinden. Ein Beispiel hierfür ist die Modifizierung

von Gelatine zu Gelatinemethacrylat (GelMA) von van del Bulcke *et al.*<sup>38</sup> Gelatine zeigt bei physiologischen Temperaturen von 37 °C keine mechanische Stabilität, deshalb wurden die basischen Seitengruppen der Gelatine mit Methacrylatgruppen substituiert. Hierdurch konnte ein temperaturstabiles semi-synthetisches Hydrogel generiert werden. Durch den Einsatz eines Photoinitiators und der Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge lassen sich die Methacrylatgruppen miteinander vernetzen, womit die Möglichkeit besteht, Zellen einzukapseln.<sup>120</sup>



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Herstellung eines semi-synthetischen Hydrogels und anschließender photoinduzierter Vernetzung.** Ein natürliches Hydrogel kann durch Modifikation der Seitengruppe mit photovernetzbaaren Gruppen zu einem semi-synthetischen Hydrogel funktionalisiert werden. Die photovernetzbaaren Gruppen können durch Zugabe eines Photoinitiators und Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge vernetzt werden. Hierbei können Zellen innerhalb des Hydrogels zwischen den Vernetzungen eingebettet werden. Modifiziert nach Rutz *et al.*<sup>121</sup>

Die Photopolymerisation als Vernetzungsmechanismus wurde an dem Beispiel von GelMA dargestellt. Hierbei werden chemisch kovalente Bindungen neu gebildet. Bei dem photoinduzierten Vernetzungsprozess bildet der Photoinitiator, bei einer Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Radikale und initiiert die Polymerisation zu einem Netzwerk, bei dem Zellen innerhalb des Hydrogels eingeschlossen werden können (Abbildung 4).<sup>122–124</sup> Als wasserlöslicher Photoinitiator hat sich Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) etabliert, der ein Absorptionsmaximum bei 365 nm besitzt, welches nahe dem sichtbaren Licht liegt.<sup>125</sup> Mögliche toxische Faktoren sind sowohl der radikalbildende Photoinitiator als auch UV-Licht, die vor dem Einsatz des Hydrogels als Biotinte untersucht werden sollten.<sup>126</sup> Mit der Photopolymerisation wird es ermöglicht, die Vernetzung räumlich und zeitlich zu kontrollieren.<sup>123</sup> Weitere chemische Vernetzungsmechanismen stellen Kondensationsreaktionen dar.<sup>127</sup> Bei physikalischen Vernetzungsprozessen wird das Netzwerk aufgrund von nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken oder elektrostatischen Wechselwirkungen zusammengehalten.<sup>128,129</sup> Alginate stellt ein Beispiel für ein Hydrogel aus elektrostatischen Wechselwirkungen dar. Durch die Zugabe von zweiwertigen Calciumionen kann die physikalische Vernetzung der Zuckermoleküle durch Anlagerung an die Calciumionen stattfinden.<sup>130</sup> Vorteil dieses Vernetzungsmechanismus stellt die Herstellung unter milden Bedingungen, wie physiologischem pH und Raumtemperatur (RT), dar.<sup>131</sup>

Durch die Reversibilität der physikalischen Vernetzungen können die Bindungen jedoch schnell wieder aufgebrochen und das Netzwerk zerstört werden.<sup>132</sup> Deshalb finden immer häufiger eine Kombination von physikalisch vernetzten Polymeren mit chemisch vernetzten Polymeren Anwendung.<sup>133,134</sup>

## 1.4 Entwicklung von artifiziellem Herzgewebe

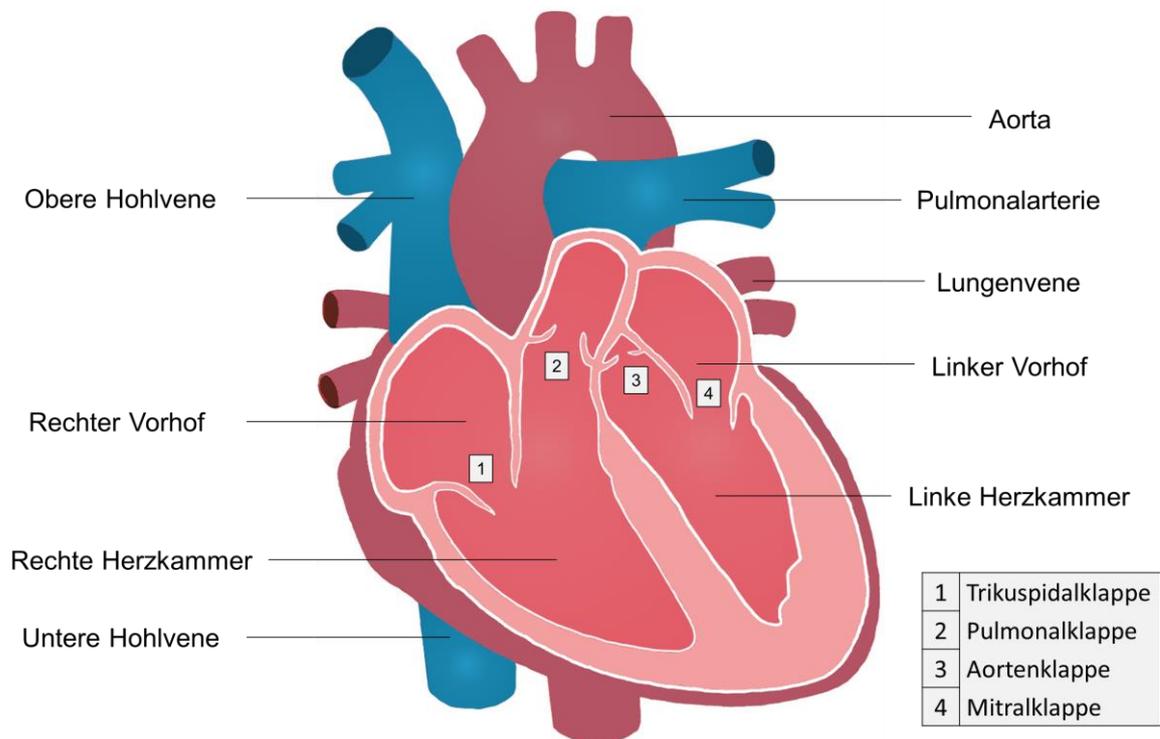
Durch den Einsatz des *Tissue Engineerings* erhofft sich besonders die Entwicklung von Herzgewebe zielbringende Ergebnisse. Kardiovaskuläre Krankheiten stellen mit 17,9 Millionen Sterbefällen pro Jahr die häufigste Todesursache weltweit dar.<sup>134</sup> Hauptfaktoren, die zu einer kardiovaskulären Krankheit führen sind eine ungesunde Ernährungsweise, körperliche Inaktivität sowie übermäßiger Tabak- oder Alkoholkonsum. Da adulte Kardiomyozyten, welche den Hauptbestandteil des Herzmuskels bilden, nicht in der Lage sind, sich zu teilen und dadurch keine Regeneration geschädigter Kardiomyozyten stattfinden kann, soll mit Hilfe *in vitro* hergestellter Herzgewebe die Regeneration unterstützt werden.<sup>136</sup> Zudem stellt die Entwicklung von artifiziellem Herzgewebe die Möglichkeit zur Remodellierung von kardiovaskulären Krankheiten und die Untersuchung pharmakologischer Effekte dar.<sup>137,138</sup> Für die Entwicklung von funktionsfähigem kardialen Gewebe ist es essenziell, den Aufbau und die Funktion des Herzens vollständig zu verstehen.

### 1.4.1 Das menschliche Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, welches etwa die Größe einer Faust in der Mitte des Brustkorbes, dem *Sternum*, einnimmt.<sup>138</sup> Es ist lebensnotwendig im menschlichen Körper, da es für die Blutversorgung des gesamten Organismus verantwortlich ist.<sup>140</sup> Zusammen mit den Blutgefäßen stellt das Herz das kardiovaskuläre System, auch Herz-Kreislauf-System genannt, dar.<sup>140</sup> Dabei existieren zwei Kreisläufe innerhalb des Herzens, der große Körperkreislauf und der kleinere Lungenkreislauf. Durch die Kreuzung dieser beiden Kreisläufe kann das Blut mit Sauerstoff aus den Lungen angereichert werden. Das Herz fungiert als Pumpe, die 60-80 Mal pro Minute schlägt und dabei 5-6 l Blut durch den Körper transportiert, wodurch Zellen, Gewebe und Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und Stoffwechselendprodukte abtransportiert werden.<sup>141,142</sup>

Anatomisch wird das Herz in die linke und rechte Herzhälfte eingeteilt, welche durch die Herzscheidewand, dem *Septum*, getrennt werden. Innerhalb einer Hälfte des Herzens gibt es zwei Innenräume. Der kleinere Innenraum wird als Vorhof, auch Atrium, bezeichnet und in den Hälften als linker und rechter Vorhof definiert. Der größere Innenraum wird aus der Herzkammer gebildet und wird analog als rechte und linke Herzkammer, auch Ventrikel genannt, bezeichnet.<sup>144</sup> Die Herzklappen sind zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern sowie an den Öffnungen des Herzmuskels zu den großen Arterien angesiedelt. Die Herzklappen arbeiten als Rückschlagventile und geben dem Blutstrom die Richtung vor und regulieren das durchfließende Volumen.<sup>140</sup> Allgemein können die Herzklappen aufgrund ihrer Form und Aufgabe in Taschenklappen, auch als Semilunarklappen bezeichnet, und

Atrioventrikularklappen, auch Segelklappen genannt, separiert werden. Die Segelklappen befinden sich zwischen den Ventrikel und den Vorhöfen. Die rechte Segelklappe wird Trikuspidalklappe und die linke Mitralklappe genannt.<sup>145</sup> Die Segelklappen sind dafür verantwortlich, dass das Blut einzig vom Vorhof in die Herzkammer fließt. Die Taschenklappen sind zwischen den Herzkammern und den großen Blutlaufbahnen lokalisiert und regulieren den Blutstrom in eine bestimmte Richtung durch ihre halbmondförmige Struktur. Zu den Taschenklappen gehören die Aortenklappe, die den Blutstrom aus dem linken Ventrikel in die Aorta reguliert, und die Pulmonalklappe, die für die Regulierung des Blutstroms aus dem rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie zuständig ist. Die Pulmonalarterie, auch als Lungenarterie bezeichnet, bringt das Blut in die Lungen, wo es mit Sauerstoff angereichert wird. Mit der Öffnung der Aortenklappe fließt Sauerstoff-angereichertes Blut in die Aorta und kann von dort aus den ganzen Körper versorgen.<sup>146</sup> Innerhalb des Herzens gibt es drei Arten von Blutgefäßen. Die Arterien befördern Blut von dem Herzen in den gesamten Organismus, während die Venen Blut zurück zum Herz transportieren. Mit den Blutkapillaren findet ein Austausch zwischen sauerstoffarmem und sauerstoffreichem Blut statt. Die Herzkranzgefäße, auch Koronararterien genannt, versorgen das Herz selbst mit Nährstoffen.<sup>146</sup> Die obere und untere Hohlvene (*Vena cava superior* und *inferior*) führen das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf in den rechten Vorhof des Herzens. Anschließend fließt das Blut weiter in die rechte Herzkammer, wobei das Zurückfließen durch die Trikuspidalklappe verhindert wird. Von der rechten Herzkammer fließt das Blut weiter in die Lungenarterien, durch die das sauerstoffarme Blut dem Lungenkreislauf zugeführt wird.<sup>148</sup> Durch die Pulmonalklappe wird der Rückstrom des Blutes in die rechte Herzkammer verhindert. Aus den Lungenvenen wird das sauerstoffreiche Blut aus der Lunge in den linken Vorhof des Herzens transportiert, welches dann in die linke Herzkammer weiter strömt. Die Richtung des Blutes wird von der Mitralklappe, als Pendant zur Trikuspidalklappe auf der rechten Seite des Herzens, reguliert. Von der linken Herzkammer aus wird das sauerstoffreiche Blut über die Aorta in den Körperkreislauf gebracht. Das Zurückströmen wird durch die Aortenklappe verhindert. Die rechte Herzhälfte ist somit verantwortlich dafür, das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf in den Lungenkreislauf zu befördern. Hier kann das Blut unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) angereichert werden. Die linke Seite transportiert das sauerstoffreiche Blut aus dem Lungenkreislauf in den Körperkreislauf, womit die Versorgung der Organe gewährleistet werden kann.<sup>149,150</sup> Die Anatomie des Herzens wird schematisch in Abbildung 5 dargestellt.



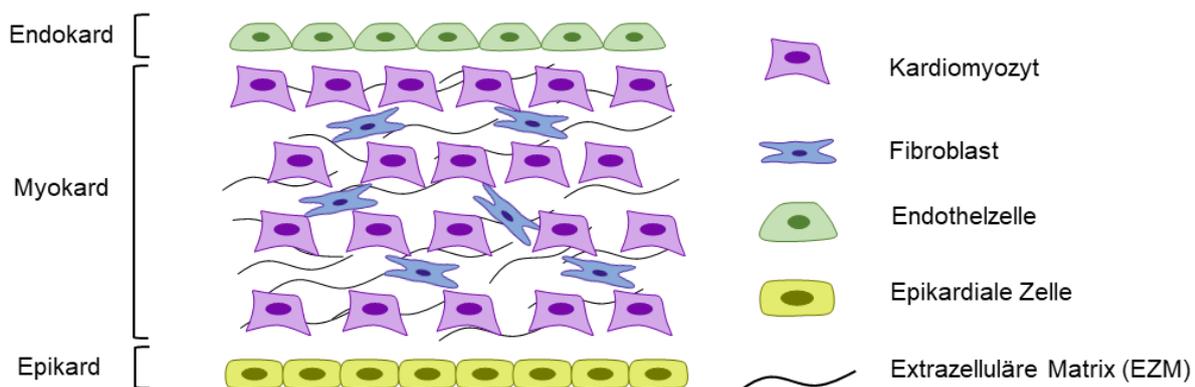
**Abbildung 5: Anatomie des menschlichen Herzens.** Das Herz wird in eine linke und eine rechte Hälfte aufgeteilt, die jeweils einen Vorhof und eine Herzkammer besitzen. Sauerstoffarmes Blut fließt über die obere und untere Hohlvene in den rechten Vorhof. Dies wird über die rechte Herzkammer in die Pulmonalarterie in den Lungenkreislauf transportiert, wo das Blut mit Sauerstoff angereichert wird. Von der Lunge gelangt das sauerstoffreiche Blut über die Lungenvenen in den linken Vorhof. Über die linke Herzkammer fließt das Blut in die Aorta und kann den gesamten Organismus mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen. In der rechten Herzhälfte sorgen die Trikuspidalklappe und Pulmonalklappe und in der linken Herzhälfte die Mitralklappe und Aortenklappe für die Regulierung des Blutstromes. Modifiziert nach Hammer.<sup>150</sup>

Das Herz ist für die Versorgung des gesamten menschlichen Körpers mit Blut zuständig. Hierfür arbeitet es in rhythmischen Abständen in einer Kontraktionsphase (Systole) und Erschlaffungsphase (Diastole). Der Herzzyklus kann in vier Herzaktionen unterteilt werden. Dabei bilden die Anspannungs- und Austreibungsphase die Systole und die Entspannungs- und Füllungsphase die Diastole.<sup>151,152</sup> Vor Beginn der Anspannungsphase, und somit der Systole, sind die Herzkammern gefüllt, so befindet sich in der rechten Herzkammer sauerstoffarmes Blut und in der linken Herzkammer sauerstoffreiches Blut. In der Anspannungsphase steigt der Blutdruck innerhalb der Herzkammern aufgrund der Kontraktion an. Die Segelklappen, also die Trikuspidal- und Mitralklappe schließen, da der Kammerdruck den Druck der Vorhöfe übersteigt. Dieser Vorgang dauert nur 0,1 s. Dieser maximal vorherrschende Blutdruck wird systolischer Blutdruck genannt und kann durch ein Blutdruckmessgerät bestimmt werden.<sup>153</sup> Übersteigt der Kammerdruck den vorherrschenden Druck in der Aorta oder der Pulmonalarterie beginnt die Austreibungsphase. Die Taschenklappen, die Pulmonalklappe und die Aortenklappe, öffnen sich und ein Ausstrom des Blutes in die Aorta oder Pulmonalarterie kann erfolgen. Der Druck innerhalb der Herzkammern sinkt. Untersteigt der Druck den vorherrschenden Druck der Aorta oder der Pulmonalarterie, schließen sich die Taschenklappen, womit die Entspannungsphase und somit die Diastole beginnt. Während dieser Phase fällt der Kammerdruck schnell ab.<sup>154</sup> Der niedrigste vorherrschende Druck wird diastolischer Blutdruck genannt und kann wie der systolische

Blutdruck mit einem Blutdruckmessgerät bestimmt werden.<sup>153</sup> Fällt der Kammerdruck unter den Druck der Vorhöfe, öffnen sich die Segelklappen und die Füllungsphase, bei der das Blut von den Vorhöfen in die Kammern fließt, beginnt. Eine Vorhofkontraktion schließt die Diastole ab. Erreicht diese Kontraktion die Herzkammern, so beginnt der Herzzyklus erneut.<sup>155–158</sup> Dieser rhythmische Wechsel von Systole und Diastole wird über ein neuronales Erregungsleitungssystem koordiniert. Der Ursprung der Erregung ist im Sinusknoten, breitet sich dann über die Vorhöfe aus, bis es über den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) die Herzkammern erreicht und die Kontraktion durchgeführt wird.<sup>147,157</sup>

### 1.4.2 Zellulärer Aufbau der Herzwand

Die Herzwand besteht von außen nach innen aus dem Perikard, dem Epikard, dem Myokard und dem Endokard. Das Perikard bildet in der äußersten Schicht den Herzbeutel, der das gesamte Herz umschließt.<sup>159,160</sup> Innerhalb des Perikards wird in die äußere Bindegewebsschicht (*Pericardium fibrosum*) und die innere Schicht (*Pericardium serosum*) aufgeteilt. Nach dem Perikard folgt das Epikard. Zwischen diesen beiden Schichten besitzt das Herz einen flüssigkeitsgefüllten Spalt, der als Perikardhöhle bezeichnet wird, und die Reibungen und Ausdehnungen des Herzens ermöglichen. Das Epikard bildet eine Fettschicht aus Epithelzellen, in der die Koronargefäße (Herzkranzgefäße) liegen. Von innen wird das gesamte Herz mit dem Endokard ausgekleidet. Dies wird aus einer Schicht von Endothelzellen gebildet und kleidet das gesamte Herz von innen aus, um die Oberflächenreibung durch den Blutstrom zu minimieren.<sup>161</sup> Die eigentliche Herzmuskulatur befindet sich zwischen dem Epikard und dem Endokard und wird als Myokard bezeichnet. Diese Schicht ist für den Vorgang der Kontraktion des Herzens verantwortlich.<sup>161</sup> Eine schematische Darstellung der Herzwand ist in Abbildung 6 aufgezeigt.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herzwand inklusive Zellen.** Die Herzwand besteht aus dem Endokard, Myokard und dem Epikard. Die äußerste Schicht ist das Epikard. Die mittlere Schicht, das Myokard wird hauptsächlich von Fibroblasten und Kardiomyozyten gebildet. Die äußerste Schicht, das Endokard wird aus einer Schicht von Endothelzellen gebildet und kleidet das Herz von innen aus. Modifiziert nach Veldhuizen *et al.*<sup>163</sup>

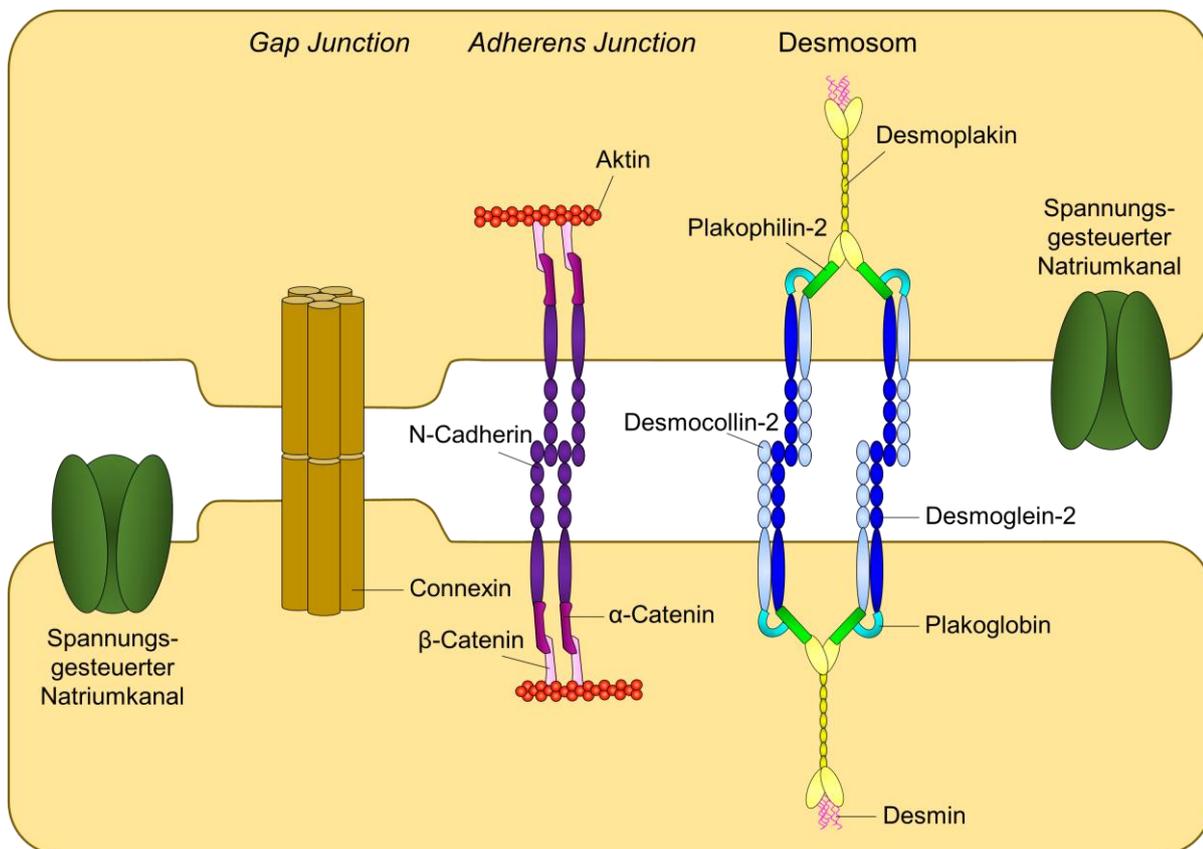
Das Myokard besteht aus unterschiedlichen Zellen, zu denen Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und Immunzellen gehören. Die Kardiomyozyten nehmen im gesamten Herz einen Anteil von 30 % ein, während 70 % Nicht-Myozyten sind.<sup>161</sup> Dabei sind die Endothelzellen und die Perizyten an der Regulation der Gefäßkontraktion und Durchblutung beteiligt.<sup>164–166</sup> Die quergestreifte Muskulatur des Herzens wird von den

Kardiomyozyten gebildet, wobei die Fibroblasten parallel dazu verlaufen und für die Sekretion von Proteinen der EZM sowie einer elektrischen Kopplung mit den Kardiomyozyten verantwortlich sind.<sup>167</sup> Sie zeigen außerdem Zell-Zell-Kontakte zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen.<sup>168</sup> Die Hauptaufgabe der Herzfibroblasten besteht in der Organisation der EZM, die die Zellen umgibt.<sup>169,170</sup> Die EZM ist aus verschiedenen Proteinen wie Hyaluronsäure, Fibronectin, Proteoglykanen und Kollagen aufgebaut.<sup>171</sup> Sie ist in der Lage Wachstumsfaktoren, Chemokine oder Zytokine zu speichern und bei Bedarf freizugeben. Reguliert wird dies durch die Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP), die in der Lage sind, die EZM-Bestandteile abzubauen.<sup>172</sup> Bei einem geschädigten Gewebe werden die MMPs erhöht exprimiert und die EZM abgebaut und neu aufgebaut, wodurch die Wundheilung gefördert wird. Die Organisation der Zellen und der EZM sorgen für ein Zusammenspiel aus mechanischen, elektrischen und chemischen Signalen zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion.<sup>173</sup> Im Gesamten stehen alle Zellen des Herzens miteinander in Kontakt.<sup>174</sup> Es kann durch chemische Signale, wie beispielsweise Zytokinen oder Wachstumsfaktoren, eine Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung stattfinden oder eine mechanische oder elektrische Signalweiterleitung, die über die EZM vermittelt werden. Außerdem stehen manche Zellen über *Gap Junctions* in direktem Kontakt, wodurch eine direkte Diffusion von kleinen Molekülen oder Ionen zwischen den Zellen ermöglicht wird. Zudem kann die Zellinteraktion auf dem parakrinen oder autokrinen Signalweg erfolgen. Hierbei stellt der parakrine Weg die Kommunikation zwischen einer Sender- und Empfängerzelle dar, wobei Sender- und Empfängerzelle dieselbe Zelle ist. Bei dem autokrinen Weg sind Sender- und Empfängerzelle unterschiedliche Zellen. Durch die extrazelluläre parakrine oder autokrine Signalweiterleitung werden anschließend intrazelluläre Signalwege aktiviert, die beispielsweise zu einer geänderten Genexpression führen, und somit der Zelle die Möglichkeit zur Anpassung geben.<sup>175,176</sup>

### 1.4.3 Kardiomyozyten

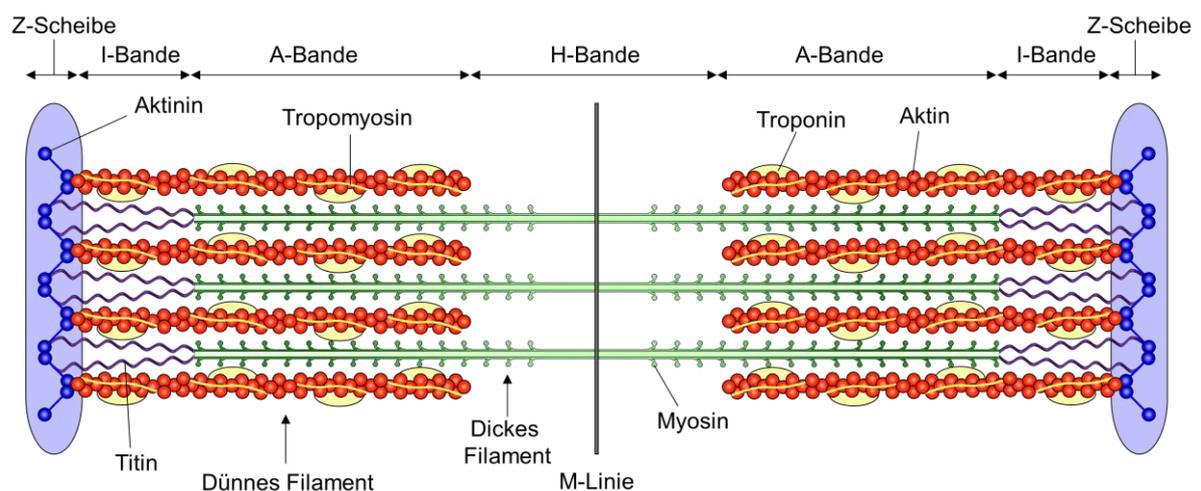
Kardiomyozyten, auch als Herzmuskelzellen bekannt, sind in der mittleren Schicht der Herzwand, dem Myokard, vorzufinden. Diese Zellen werden im Herzen je nach Funktion in Kardiomyozyten der Arbeitsmuskulatur und Kardiomyozyten des Erregungsweiterleitungssystems unterschieden.<sup>177</sup> Die Kardiomyozyten des Erregungsweiterleitungssystem werden auch als Schrittmacherzellen bezeichnet und können durch spontane Depolarisation elektrische Signale erzeugen, die sie an die Arbeitsmuskulatur weitergeben.<sup>178</sup> Die Kardiomyozyten der Arbeitsmuskulatur sind für die Kontraktion und die Kardiomyozyten des Erregungsweiterleitungssystem für die Bildung und Weiterleitung der Erregung verantwortlich. Nachfolgend wird der Aufbau der Herzmuskelzellen der Arbeitsmuskulatur beschrieben, welche in der Ventrikelmuskulatur lokalisiert sind. Kardiomyozyten besitzen ein oder zwei Zellkerne und sind in der Regel 10-20 µm im Durchmesser und ungefähr 100 µm lang. Die Struktur wird durch einen zylinderförmigen Aufbau definiert.<sup>164</sup> Die Verbindung zwischen zwei Kardiomyozyten wird über sogenannte Glanzstreifen (*Disci intercalares*, engl. *intercalated discs*) hergestellt.<sup>179</sup> Diese Glanzstreifen besitzen sogenannte *Gap Junctions*, die für die Impulsübertragung zwischen zwei Zellen verantwortlich sind.<sup>180</sup> *Gap Junctions* bilden sich aus 12 Connexin-Proteinen, wobei je sechs von einer Zelle bereitgestellt werden. Hierbei

wird eine Verbindung zwischen den Zytosolen benachbarter Zellen hergestellt.<sup>181</sup> Desmosomen in den Glanzstreifen sorgen für die Stabilität während der Systole und Diastole zwischen den Zellen.<sup>182</sup> Die Verbindung wird über desmosomale Cadherine (Desmocollin und Desmoglein) gebildet, die Heterodimere zwischen benachbarten Zellen ausbilden. Intrazellulär wird die Verbindung von den Proteinen Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin durch die Bindung an Desmin stabilisiert. Desmin bildet ein Intermediärfilament im Zytoskelett.<sup>183,184</sup> Zusätzlich zu den *Gap Junctions* und den Desmosomen sind in den Glanzstreifen die *Adherens Junctions* lokalisiert. Diese sorgen für eine gezielte Kraftübertragung zwischen den einzelnen Kardiomyozyten.<sup>185</sup> Die *Adherens Junctions* bestehen aus Transmembran-Cadherinen und zytosolischen Cateninen. Die Transmembran-Cadherine (N-Cadherine) verankern sich in der Membran und binden intrazellulär die Catenine ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin), die sich mit dem Aktinzytoskelett des Kardiomyozyt verbinden. Zusätzlich zu diesen Verbindungen zwischen den Kardiomyozyten besitzen die einzelnen Kardiomyozyten spannungsgesteuerte Natriumkanäle.<sup>186</sup> Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau der Glanzstreifen zwischen zwei benachbarten Kardiomyozyten.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Glanzstreifen zwischen den Kardiomyozyten.** Die Verbindung zwischen zwei Kardiomyozyten stellen Glanzstreifen dar. In diesem Glanzstreifen sind benachbarte Kardiomyozyten über *Gap Junctions*, *Adherens Junctions* und Desmosomen miteinander verbunden und können Signale weiterleiten. Modifiziert nach Rampazzo *et al.*<sup>187</sup>

Die Gesamtheit bildet eine Herzmuskelfaser aus, die durch mehrere Myofibrillen gebildet wird. Die Sarkomere bilden die kleinste kontraktile Einheit des Herzmuskels und befinden sich in den Myofibrillen.<sup>188</sup> Ein Sarkomer wird aus zwei Filamenten gebildet. Das dünne Filament wird auch als Aktinfilament bezeichnet und ist über das Verankerungsprotein Aktinin an die Z-Scheiben (*engl. z-discs*) gebunden.<sup>189</sup> Wesentliche Bestandteile dieses Filaments sind Aktin, Tropomyosin, Troponin und Nebulin. Das dicke Filament, auch als Myosinfilament bezeichnet, besteht hauptsächlich aus Myosin.<sup>190</sup> Das Myosinfilament ist an der M-Linie des Sarkomers verankert. Durch das Verankerungsprotein Titin wird eine Verbindung zur nächsten Z-Scheibe hergestellt. Die Myosinfilamente liegen zwischen den Aktinfilamenten. Das Sarkomer kann allgemein in verschiedene Bereiche aufgeteilt werden. Die Z-Scheiben definieren die Ränder eines Sarkomers und setzen somit eine Begrenzung. Hier werden zwei Aktinfilamente miteinander verbunden.<sup>191</sup> Die Aktinfilamente befinden sich in der sogenannten I-Bande, während die Myosinfilamente in der A-Bande vorzufinden sind. Die H-Bande stellt einen mittleren Bereich dar, der nur Myosin enthält. Mit der M-Linie wird die Mitte des Sarkomers definiert, welche durch Verbindungen von Myosinfilamenten entsteht. Mit den I- und A-Banden wird die quergestreifte Muskulatur gebildet.<sup>192,193</sup> Eine schematische Darstellung eines Sarkomers ist in Abbildung 8 aufgezeigt.



**Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Sarkomers.** Das Sarkomer besteht aus einem dünnen Filament, dem Aktinfilament, und einem dicken Filament, dem Myosinfilament. Die Einteilung erfolgt in verschiedenen Banden (I-Bande, A-Bande, H-Bande). Durch die Z-Scheiben wird ein Sarkomer zum nächsten Sarkomer getrennt und in der Mitte befindet sich die M-Linie. Im Ruhezustand wird die Bindung von Myosin an das Aktinfilament durch Tropomyosin und Troponin inhibiert. Durch eine Konformationsänderung kann das Myosin an das Aktinfilament binden und die Filamente gleiten aneinander vorbei, wodurch das ganze Sarkomer verkürzt wird. Dies beschreibt den Kontraktionsvorgang im Kardiomyozyt anhand der Gleitfilamenttheorie. Modifiziert nach Kobirumaki-Shimozawa *et al.*<sup>194</sup>

Die Muskelkontraktion kann durch die Gleitfilamenttheorie, die von Huxley und Hanson 1954 definiert wurde, beschrieben werden.<sup>195–197</sup> Durch das Zusammenspiel von Aktin und Myosin kann die Kontraktion des Herzmuskels erfolgen. Die Aktinfilamente und die Myosinfilamente gleiten ineinander, ohne sich dabei selbst zu verkürzen. Die gesamte Sarkomereinheit verkürzt sich.<sup>197</sup> Die Muskelkontraktion wird von den Proteinen Troponin und Tropomyosin reguliert. Im Ruhezustand blockieren sie die Bindungsstellen des Myosins an die Aktinfilamente.<sup>199</sup> Der Myosinkopf befindet sich 90° zu dem Aktinfilament. Wird ein Schwellenwert des einströmenden Calciums überstiegen, werden die Bindungsstellen freigelegt und das Myosin

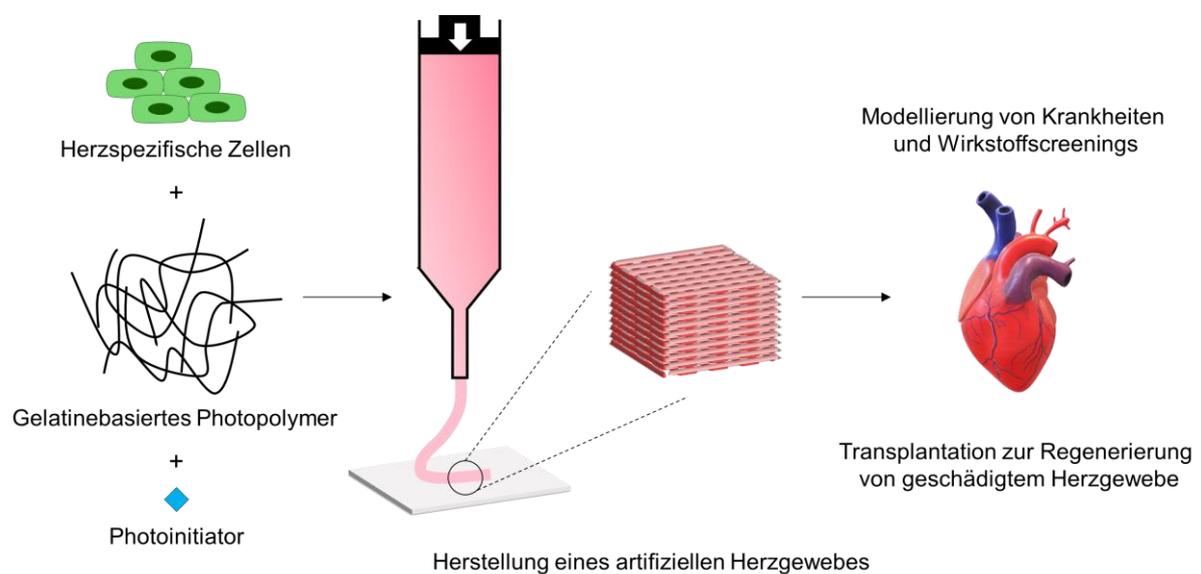
kann an das Aktinfilament binden, was als Querbrücke bezeichnet wird. Die Erzeugung einer Querbrücke ist ein energieverbrauchender Prozess, wobei die Energie aus einer Adenosintriphosphat (ATP)-Spaltung bereitgestellt wird. Durch eine Konformationsänderung des Myosins wird der Winkel der Querbrücke auf 50° reduziert und die Filamente gleiten aneinander vorbei. Dies resultiert in einer Verkürzung des Sarkomers und der Kontraktion des Muskels.<sup>200–202</sup> Durch eine Anreicherung von Mitochondrien innerhalb der Herzmuskelzelle wird das benötigte ATP bereitgestellt, da Mitochondrien ATP in dem Prozess der Zellatmung generieren.<sup>203,204</sup>

### 1.4.4 Kardiales *Tissue Engineering*

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind für ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich und damit die häufigste Todesursache in Deutschland.<sup>204</sup> Die Regenerationsrate der Kardiomyozyten nimmt mit dem Alter stetig ab. So können bei einem 25-Jährigen noch 1 % der Kardiomyozyten regeneriert werden und bei einem 75-Jährigen nur noch 0,3 %.<sup>164</sup> Durch die vorhandenen Fibroblasten werden zur Wundheilung vermehrt EZM-Proteine sekretiert, wodurch es zur Generierung von fibrotischem Narbengewebe kommen kann. Hierdurch wird die Kontraktilität des Herzens geschwächt und kann in einer Herzschwäche resultieren.<sup>206</sup> Bei einer Herzschwäche, auch als Herzinsuffizienz bekannt, wird der Organismus aufgrund mangelnder Pumpleistung des Herzens mit sauerstoffreichem Blut unterversorgt.<sup>206</sup> Herzklappenfehler sind häufig auftretende Fehlstellungen der Herzklappen, wodurch das Blut nicht in die richtige Richtung strömen kann.<sup>208</sup> Eine Verstopfung einer Koronararterie kann beispielsweise zu einem Herzinfarkt, auch Myokardinfarkt genannt, führen. Hierdurch kann der Herzmuskel nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden, wodurch Teile des Herzmuskels irreversibel absterben können.<sup>209</sup> Außerdem können als Folge von Arteriosklerose Herzrhythmusstörungen hervorgerufen werden.<sup>210</sup> Häufig ist die einzige Alternative, all diese möglichen Herzerkrankungen zu behandeln, eine Transplantation. Mit dem aktuellen Mangel an Spenderorganen und den möglichen Abstoßungsreaktionen der Transplantate wurde mit dem kardialen *Tissue Engineering* ein alternatives Forschungsgebiet aufgebaut.<sup>211,212</sup> Zahlreiche Forscher beschäftigten sich bereits mit der Injektion von Herzzellen zur Förderung der Regeneration von geschädigtem Herzgewebe. Jedoch konnten keine gewinnbringenden Ergebnisse erzielt werden, da die Überlebensrate der injizierten Zellen gering ausfiel.<sup>213,214</sup> Mit der Einbettung der Herzzellen in Gerüststrukturen soll ein *in vivo* getreues Konstrukt erzeugt werden, welches nach einer Transplantation die Regeneration des geschädigten Herzgewebes fördern soll. Dies stellt das Hauptziel des kardialen *Tissue Engineerings* dar. Außerdem konnten bereits artifiziell hergestellte Herzklappen transplantiert werden.<sup>215</sup> Mit der Entwicklung von geeigneten Gerüststrukturen ist es zukünftig möglich, geschädigtes Herzgewebe durch artifizielles Herzgewebe zu ersetzen oder die Heilung zu unterstützen. Außerdem können Krankheitsmodelle anhand des künstlichen Herzgewebes rekonstruiert und potenzielle Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Toxizität analysiert werden. Die wachsenden und stetig variierenden Anforderungen an das Materialdesign und die Erweiterung der 3D-Biodrucktechnologien erfordern die Entwicklung neuer innovativer, druckbarer Materialien.

## 2 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf dem Design und der Etablierung neuer Materialien für den 3D-Biodruck. Im Folgenden sollten die neu entwickelten Hydrogele ausgehend von Gelatine synthetisiert werden. Diese Materialien sollten für die Rekonstruktion eines artifiziellen Herzgewebes eingesetzt werden. Hierfür sollten die Materialien hinsichtlich der Biokompatibilität auf herzspezifische Zellen untersucht und die Eigenschaften für den 3D-Biodruck angepasst werden. Mit Hilfe von Stammzelltechnologien und der Kokultivierung verschiedener herzspezifischer Zellen sollte ein *in vitro* Herzgewebe aufgebaut werden, welches für die Rekonstruktion von Krankheitsmodellen eingesetzt werden kann.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung von künstlichem Herzgewebe.** Durch die Kombination von Herzzellen und gelatinebasierten Photopolymeren sollten mit Hilfe des 3D-Biodrucks *in vitro* Herzgewebe hergestellt werden. Diese können zur Modellierung von Krankheiten mit anschließendem Wirkstoffscreening oder zur Transplantation für die Regenerierung von geschädigten Herzgewebe eingesetzt werden.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

Das Forschungsgebiet des *Tissue Engineerings* beschäftigt sich, wie in der Einleitung in Kapitel 1.1 beschrieben, mit der Entwicklung von biologischen Materialien, die als Gewebe- oder Organersatz dienen sollen. An diesen entwickelten biologischen Materialien können Arzneimittelscreenings durchgeführt werden, so dass die Anzahl an durchgeführten Tierversuchen reduziert werden kann. Außerdem können die artifiziell erzeugten Organe als Transplantat eingesetzt werden, womit der hohe Bedarf an Transplantationen gedeckt werden kann.<sup>215,216</sup> Gewebespezifische Zellen müssen in einer Stützmatrix eingebettet werden. Als Stützmatrix werden im *Tissue Engineering* häufig Hydrogele eingesetzt, die sich durch ihre Fähigkeit große Mengen an Wasser aufzunehmen und zu speichern, kennzeichnen.<sup>217</sup>

#### 3.1 Anwendung gelatinebasierter Hydrogele zum Aufbau eines Herzwebes

Hydrogele können basierend auf natürlichen oder synthetischen Materialien aufgebaut werden. Natürliche Materialien zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit aus. Ein großer Nachteil ist jedoch die mangelnde mechanische Stabilität. Synthetische Materialien zeigen hingegen eine hohe mechanische Stabilität und besitzen kontrollierbare Eigenschaften, sind jedoch nicht biokompatibel.<sup>218</sup> Als Ausgangsmaterialien werden häufig Materialien eingesetzt, die ähnlich zur extrazellulären Matrix (EZM) sind, da diese die natürliche Umgebung der Zellen *in vivo* widerspiegeln.<sup>219</sup> Gelatine wird dabei häufig in Betracht gezogen, da es aus der Hydrolyse von Kollagen gewonnen wird und somit EZM-ähnliche Eigenschaften aufweist. Zudem ist Gelatine bioabbaubar, biokompatibel und kostengünstig in der Herstellung.<sup>220</sup> Die physiologische Umgebungstemperatur zur Kultivierung von Zellen liegt bei 37 °C. Gelatine weist bei 37 °C jedoch eine geringe mechanische Stabilität auf, weshalb reine Gelatine ungeeignet für den Einsatz in der 3D-Kultur ist. Durch die Modifizierung der Gelatine mit funktionellen Gruppen können sogenannte semi-synthetische Hydrogele hergestellt werden, die sich mit Hilfe von UV-Licht zu einem formstabilen Konstrukt kovalent vernetzen lassen.<sup>221</sup> Dadurch lässt sich die funktionalisierte Gelatine bei den gewünschten 37 °C kultivieren und bietet ein geeignetes Material für den Einsatz im Aufbau von 3D-Kulturen.

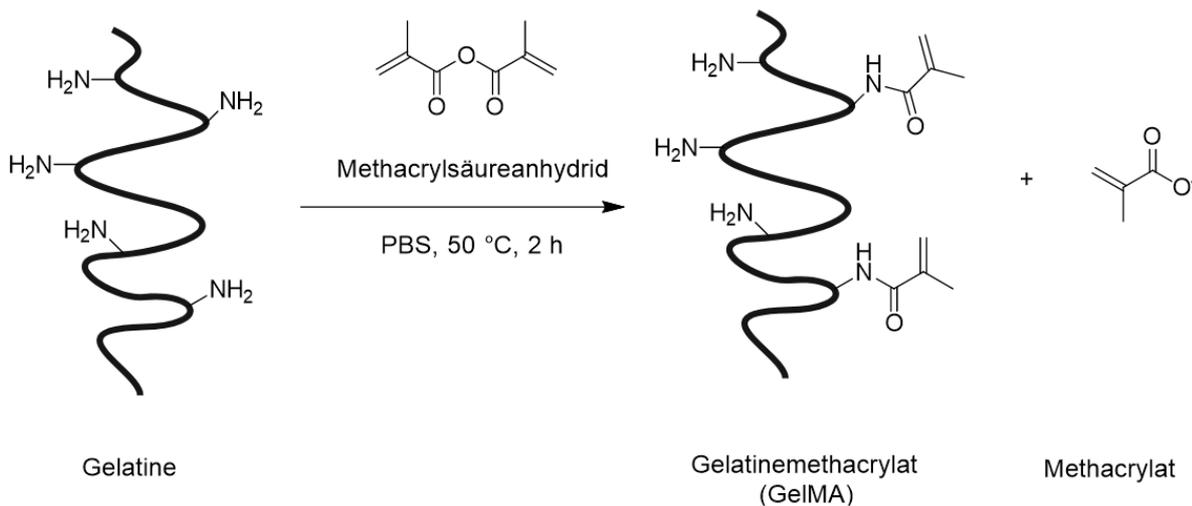
##### 3.1.1 Synthese gelatinebasierter Hydrogele

Bereits in den letzten Jahren wurde in dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Ute Schepers (AK Schepers, IFG) auf dem Gebiet der gelatinebasierten Hydrogele geforscht. Somit konnten bereits Hydrogele auf Gelatinebasis entwickelt werden, denen durch die angefügten funktionellen Gruppen bestimmte Eigenschaften verliehen wurden. Es wurden Hydrogele entwickelt, deren funktionelle Gruppen anschließend photochemisch miteinander vernetzt werden können.

Das bereits etablierte Gelatinemethacrylat (GelMA) und ein Zweikomponenten-Hydrogel GelNB/GelS wurden hierbei verwendet. Das GelNB/GelS ist eine Kombination aus norbornenfunktionalisierter Gelatine (GelNB) und thiolierter Gelatine (GelS).

### 3.1.1.1 Gelatinemethacrylat

Für die folgenden Studien wurden die oben genannten semi-synthetischen Hydrogele verwendet. Als Edukt diente Gelatine aus der Schweinehaut. Für die Synthese von GelMA wurde die Gelatine in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und anschließend die gewünschte Menge an Methacrylsäureanhydrid (MAA) hinzugegeben und die Reaktion für 2 h bei 50 °C gerührt. Die eingesetzten Mengen sind in Kapitel 4.2.1.1 aufgeführt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch mit vorgewärmten DPBS<sup>-/-</sup> (50 °C) verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde eine Dialyse gegen ddH<sub>2</sub>O für 7 Tage durchgeführt. Hierbei wurde zweimal täglich das Wasser gewechselt. Nach der Dialyse wurde eine Lyophilisation durchgeführt und ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten. Die Reaktionsgleichung der Synthese ist in Schema 1 dargestellt.



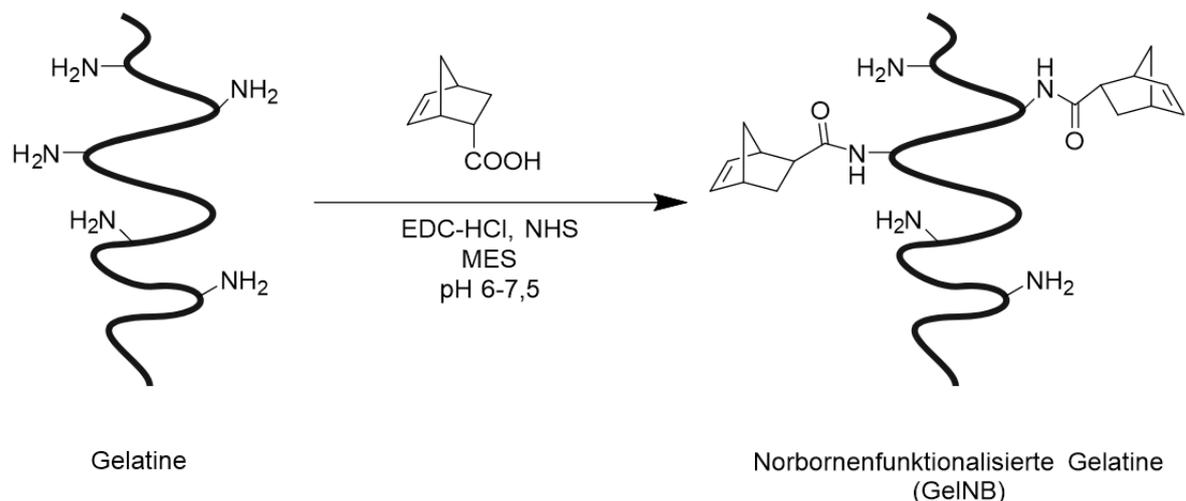
**Schema 1: Synthese des semi-synthetischen Hydrogels GelMA.** Die Gelatine wurde zunächst in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und anschließend die gewünschte Menge an MAA hinzugegeben und die Reaktion für 2 h bei 50 °C gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch mit DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt, dialysiert und lyophilisiert. Es wurde ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten.

Die GelMA-Synthese wurde das erste Mal von van del Bulcke *et al.* durchgeführt.<sup>37</sup> Die Reaktion läuft in einer nucleophilen Substitution ab, wobei die basischen Seitengruppen der Aminosäuren Lysin (Lys) und Hydroxylysin (Hyl) durch Methacrylatgruppen substituiert werden. Durch die eingesetzte Menge an MAA kann der Funktionalisierungsgrad der Gelatine mit substituierten Methacrylatgruppen variiert werden. In den Dissertationen von Dr. S. Haase, Dr. T. Göckler und Dr. X. Kempter wurden hierbei weitreichende Screenings durchgeführt, um die notwendige Menge an MAA zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass der Einsatz von 1 Äq., 8 Äq. und 30 Äq. von MAA einen großen Bereich der unterschiedlichen Grade an Funktionalisierungen abdeckte. Des Weiteren wurden die Hydrogele äquivalent zum Grad der

Funktionalisierung benannt. Somit resultierten hieraus die Hydrogele *GelMA low* (1 Äq.), *GelMA medium* (8 Äq.) und *GelMA high* (30 Äq.).<sup>222-224</sup> Im Folgenden werden die Hydrogele mit *GelMA low*, *GelMA medium* und *GelMA high* beschrieben.

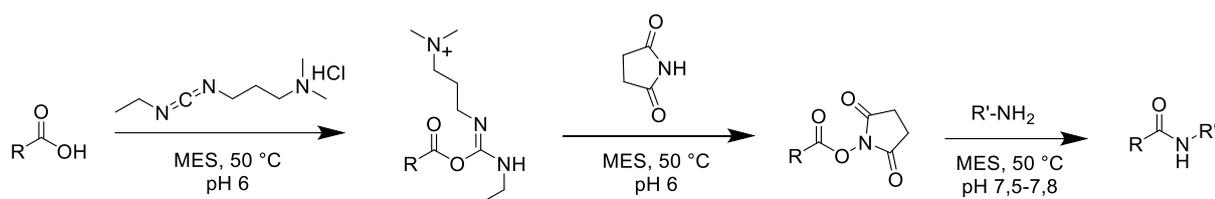
### 3.1.1.2 Norbornenfunktionalisierte Gelatine

Im Zusammenhang mit vorangegangenen Dissertationen wurde bereits ein weiteres semi-synthetisches Hydrogel entwickelt, welches sich durch eine Funktionalisierung von Gelatine mit Norbornengruppen auszeichnet. 5-Norbornen-2-carboxylsäure (NCA) wurde zunächst mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC-HCl) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) umgesetzt, um die Carboxylsäure zu aktivieren. Dies wurde für 15 min bei 50 °C in MES-Puffer (pH 6) gerührt. Anschließend wurde die Gelatine als Feststoff der Reaktionslösung hinzugegeben und der pH-Wert auf 7,5-7,8 eingestellt. Die eingesetzten Mengen sind in Kapitel 4.2.1.2 aufgeführt. Die Reaktion wurde bei 50 °C über Nacht gerührt. Anschließend wurde eine Dialyse gegen ddH<sub>2</sub>O für 7 Tage durchgeführt, bei der zweimal täglich das Wasser gewechselt wurde. Nach der Dialyse wurde das Produkt zentrifugiert und das Pellet verworfen. Anschließend erfolgte eine Lyophilisation, wobei als Endprodukt ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten wurde. In Schema 2 ist der Syntheseweg dargestellt.



**Schema 2: Synthese des semi-synthetischen Hydrogels GelNB.** Zunächst erfolgte eine Aktivierung der Norbornencarboxylsäure mit EDC-HCl und NHS für 15 min bei 50 °C. Anschließend wurde die Gelatine dem Reaktionsgemisch hinzugegeben und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,5-7,8 eingestellt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 50 °C gerührt. Zur Aufreinigung wurde das Produkt dialysiert, zentrifugiert und lyophilisiert. Als Endprodukt wurde ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten.

Analog zur GelMA-Synthese läuft diese Reaktion nach einer nucleophilen Substitution ab. Die Lysin- und Hydroxyl-Lysin-Seitengruppen werden durch eine Norbornengruppe substituiert. Da die Norbornencarboxylsäure als unreaktiv gilt, wurde zunächst eine Aktivierung nach einer Reaktion in der Peptidchemie durchgeführt (Schema 3). Die Carboxylgruppe von NCA bildet mit EDC-HCl zunächst ein Intermediat, welches mit NHS weiter zu einem Aktivester reagiert. Aktivester besitzen eine hohe Reaktivität, weshalb anschließend eine Reaktion mit dem primären Amin erfolgen kann. Dadurch wird eine Amidbindung gebildet.

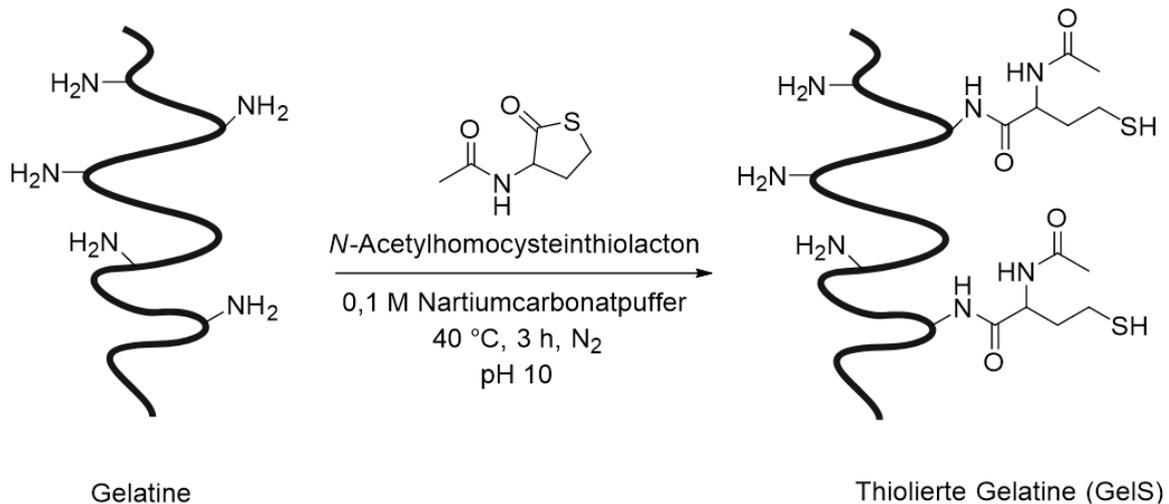


**Schema 3: Aktivierung von 5-Norbornen-2-carboxylsäure (NCA).** Durch den Umsatz der NCA mit EDC-HCl wird ein Intermediat gebildet, welches mit NHS einen Aktivester bilden kann. Anschließend kann die Substitution des Restes, beispielsweise der Norbornengruppe, an die primäre Aminogruppe erfolgen.

Da dieses Hydrogel bereits ausführlich in den Dissertationen von Dr. S. Haase, Dr. T. Göckler und Dr. X. Kempter entwickelt und untersucht wurde, waren keine erneuten Synthesescreenings notwendig. Es wurden die Ergebnisse aus den Dissertationen und aus der gemeinsamen Publikation als gegeben erachtet.<sup>225</sup> Durch die Variation der Äquivalente an NCA, EDC-HCl und NHS können unterschiedlich stark funktionalisierte Gelatinestränge erhalten werden. Auch hier wurde darauf geachtet, dass das Spektrum der Funktionalisierungsgrade einen möglichst großen Bereich an Funktionalisierung abdeckte. Dabei stellte sich der Einsatz von 0,3 Äq., 2 Äq. und 10 Äq. NCA als geeignet heraus. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Hydrogele als GelNB *low* (0,3 Äq.), GelNB *medium* (2 Äq.) und GelNB *high* (10 Äq.) bezeichnet.

### 3.1.1.3 Thiolierte Gelatine

Neben dem GelNB wurde ein weiteres Hydrogel mit semi-synthetischen Eigenschaften entwickelt. Gelatine wurde hier mit Thiolgruppen funktionalisiert (GelS), um eine Photoclick-Reaktion mit dem GelNB durchzuführen und hierdurch ein Netzwerk zu erzeugen. Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species*, ROS) oder Disulfidbrücken zu vermeiden, wurde die gesamte Reaktion unter Schutzgas (Stickstoff, N<sub>2</sub>) durchgeführt. Die Gelatine wurde zusammen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zunächst dreimal entgast und mit N<sub>2</sub> geflutet. Anschließend wurde die Gelatine in einem entgasten Natriumcarbonatpuffer bei 40 °C gelöst und, nachdem diese vollständig gelöst war, die gewünschte Menge an *N*-Acetylhomocysteinthiolacton (AHCT), gelöst in entgastem Natriumcarbonatpuffer, hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 3 h unter N<sub>2</sub> bei 40 °C gerührt und anschließend mit entgastem ddH<sub>2</sub>O verdünnt und gestoppt. Es erfolgte eine Dialyse unter N<sub>2</sub> für 24 h, wobei mehrfach ein Wasserwechsel stattfand. Nach einer Lyophilisation konnte ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten werden. Die Synthese ist in Schema 4 dargestellt.

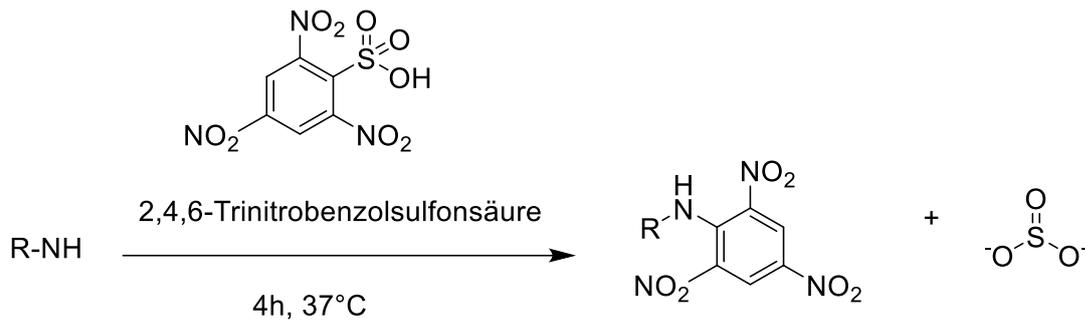


**Schema 4: Synthese des semi-synthetischen Hydrogels GelS.** Die gesamte Reaktion wurde unter Schutzgas ( $\text{N}_2$ ) durchgeführt. Die Gelatine wurde in einem entgasten Natriumcarbonatpuffer bei 40 °C gelöst und anschließend die gewünschte Menge an AHCT hinzugegeben und für 3 h bei 40 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionslösung mit entgastem  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt. Es erfolgte eine Dialyse und eine Lyophilisation, wodurch als Produkt ein weißer, styroporartiger Feststoff erhalten wurde.

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine nucleophile Substitution, bei der die basischen Seitenketten, die Aminogruppen, durch Thiolgruppen substituiert werden. Analog zu den Synthesen des GelMA und GelNB kann auch bei dieser Synthese der Funktionalisierungsgrad der Gelatine eingestellt werden. Durch die Variation der Menge an AHCT können unterschiedliche Funktionalisierungsgrade erzielt werden. Aus den Dissertationen von Dr. S. Haase, Dr. T. Göckler und Dr. X. Kempfer ging hervor, dass ein Funktionalisierungsgrad von über 50 % nicht erreicht werden konnte.<sup>222–224</sup> Es wurde der Einsatz von 1 Äq. AHCT als GelS *low* und 5 Äq. AHCT als GelS *high* bezeichnet, was in der vorliegenden Arbeit übernommen wurde.

#### 3.1.1.4 Bestimmung des Funktionalisierungsgrades der Photopolymere

Durch die Zugabe von unterschiedlichen Äquivalenten der Edukte während den Synthesen können unterschiedlich viele Aminogruppen der Gelatine substituiert werden. Um die verschiedenen erzeugten Funktionalisierungsgrade zu bestimmen, wurde ein TNBSA-Assay durchgeführt. 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA) reagiert mit den freien  $\epsilon$ -Aminogruppen der Gelatine zu einem gelben Derivat, welches durch die Messung der Absorption bei 335 nm kolorimetrisch quantifiziert werden kann (Schema 5).<sup>226</sup> Es wurden Lösungen der Hydrogele von 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  angesetzt und anschließend mit dem Reagenz TNBSA umgesetzt. Die Reaktion erfolgte für 4 h bei 37 °C unter Lichtausschluss. Um die Reaktion nach Ablauf der Reaktionszeit zu stoppen, wurden 1 M HCl und 10 % SDS den einzelnen Proben beigemischt, bevor die Messung der Absorption bei 335 nm erfolgte.

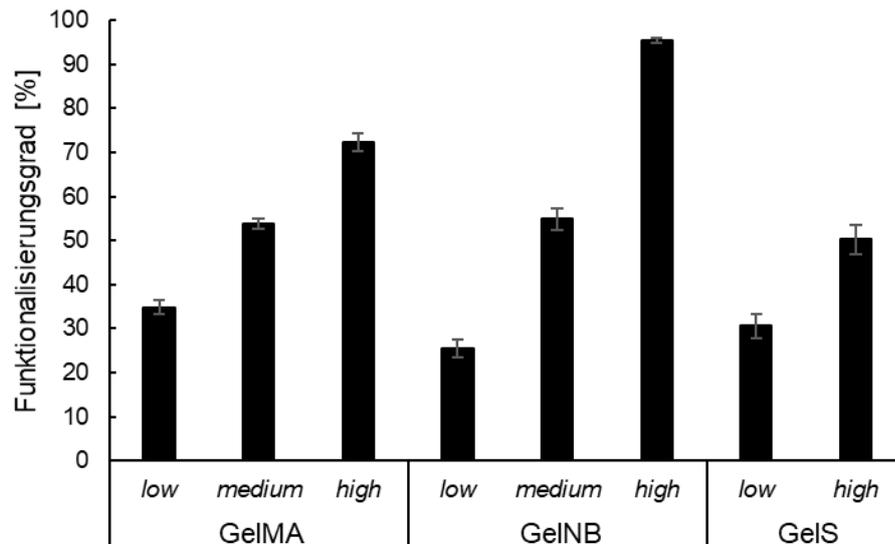


**Schema 5: Reaktionsgleichung des TNBSA-Assays.** 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBSA) reagiert mit den freien Aminogruppen der Gelatine zu einem gelben Derivat, welches durch die Absorption bei 335 nm kolorimetrisch quantifiziert werden kann.

Durch die Umsetzung des TNBSA mit den Lösungen der Hydrogele konnten die restlichen freien Aminogruppen der funktionalisierten Gelatine bestimmt werden und anschließend mit der Absorption der reinen Gelatine verglichen werden. Mit Hilfe der unten stehenden Formel (1) wurde anschließend der Funktionalisierungsgrad ermittelt.

$$\text{Funktionalisierungsgrad [\%]} = \left( 1 - \frac{A(\text{funktionalisierte Gelatine})}{A(\text{Gelatine})} \right) * 100 \quad \text{Formel (1)}$$

Das Ergebnis des TNBSA-Assays ist in Abbildung 10 dargestellt. Mit dem Einsatz von mehr Äquivalenten an Edukten konnte eine proportionale Zunahme des Funktionalisierungsgrades festgestellt werden. Eine breite Verteilung der unterschiedlichen Funktionalisierungsgrade von 35 % für GelMA *low*, über 54 % für GelMA *medium* und 72 % für GelMA *high* konnte hiermit verifiziert werden. Analog hierzu war das Ergebnis für GelNB mit einem Funktionalisierungsgrad von 25 % für GelNB *low*, 55 % für GelNB *medium* und 95 % für GelNB *high*. Es wurde eine breite Variation zwischen den Funktionalisierungsgraden festgestellt. Für das Hydrogel GelS ließ sich ein ähnliches Verhalten beobachten. Jedoch ist hier die einzige Ausnahme, dass nicht das ganze Spektrum abgedeckt werden konnte, da ein Funktionalisierungsgrad von mehr als 50 % nicht erreicht werden konnte. So wurde eine Funktionalisierung von 31 % für GelS *low* und 50 % für GelS *high* erreicht.

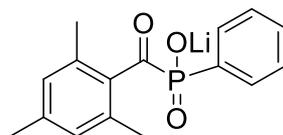


**Abbildung 10: Ermittelte Funktionalisierungsgrade der Hydrogele GelMA (low, medium high), GelNB (low, medium, high) und GelS (low, high).** Mit allen Hydrogelen wurde mit Hilfe eines TNBSA-Assays die Absorption bei 335 nm bestimmt und anschließend der Funktionalisierungsgrad ermittelt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 3$  ermittelt.

### 3.1.2 Chemische Charakterisierung

#### 3.1.2.1 Vernetzung der gelatinebasierten Hydrogele

Die photoinduzierte Vernetzung von GelMA konnte durch den Einsatz eines Photoinitiators und Bestrahlung mit UV-Licht induziert werden. Als Photoinitiator wurde Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) eingesetzt, dessen Strukturformel in Abbildung 11 dargestellt ist. LAP wird bereits häufig zum Aufbau von Gewebekonstrukten im Bereich des *Tissue Engineerings* eingesetzt.<sup>227–229</sup> Dieser ist wasserlöslich und besitzt ein Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich des Lichtes.<sup>230,231</sup>

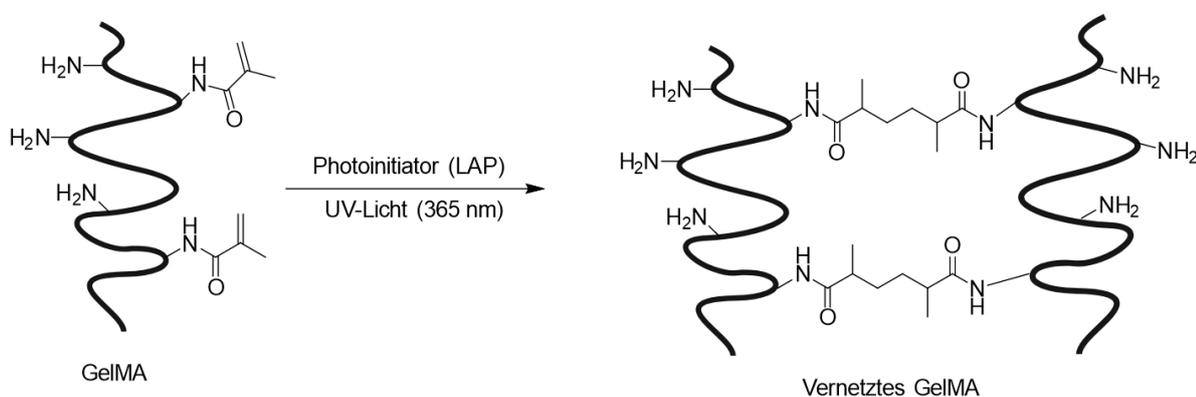


Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP)

**Abbildung 11: Strukturformel des Photoinitiators LAP.**

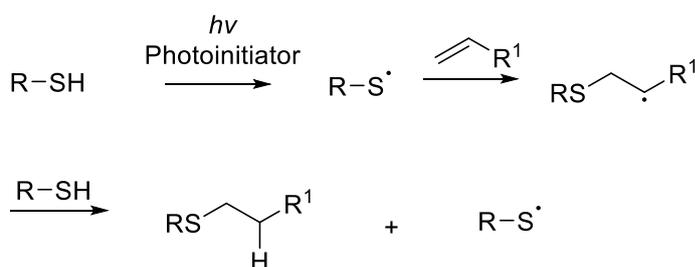
Als Bestrahlungsquelle wurde das Omnicure S2000 benutzt, welches Wellenlängen im Bereich von 320-500 nm erzeugt. So wurde zwischen den GelMA-Strängen eine radikalische Kettenpolymerisation induziert, wodurch die Acrylatgruppen miteinander verbunden und das GelMA-Netzwerk ausgebildet werden konnte, was in Schema 6 dargestellt ist.<sup>232,233</sup> Je nach Funktionalisierungsgrad des eingesetzten GelMA-Monomers konnten dichtere oder weniger dichte Netzwerke erzeugt werden. Ein Nachteil dieser Vernetzungsart besteht darin, dass eine hohe Anzahl an Radikalen erzeugt werden muss, damit die Reaktion stattfinden

kann und diese möglicherweise die Zellviabilität beeinträchtigen können.<sup>234</sup> Ein weiterer Nachteil der radikalischen Kettenpolymerisation ist, dass dies zu Homopolymerisationen innerhalb einzelner GelMA-Stränge führen kann.<sup>235</sup>



**Schema 6: Vernetzung des semi-synthetischen Hydrogels GelMA.** 10 % der GelMA-Lösung wurden in DPBS<sup>-/-</sup> angesetzt. Mit DPBS<sup>-/-</sup> wurde die Lösung auf 5 % verdünnt und mit 0,3 % LAP versetzt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht (320-500 nm, Omnicure S2000, 30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>) konnten die GelMA-Stränge miteinander vernetzt werden.

Das GelNB und das GelS bilden zusammen ein Zweikomponenten-Hydrogel, kurz GelNB/GelS genannt. Um eine Vernetzung zwischen den beiden Komponenten zu erzielen, wurde die Thiol-En Click Chemie benutzt, da die Norbornengruppe des GelNBs als Alken mit der Thiolgruppe des GelS reagieren kann. Der Ablauf einer Thiol-En Reaktion ist in Schema 7 aufgezeigt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht und dem Einsatz eines Photoinitiators wird ein Thiyl-Radikal erzeugt, welches anschließend als Elektrophil fungieren kann. Mit Alkenen kann dieses Thiyl-Radikal danach zu Thioethern reagieren.<sup>236</sup> Die Thiol-En Reaktion zeichnet sich durch eine Stereoselektivität, hohe Ausbeuten und eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit aus. Sie wird auch als Click-Reaktion bezeichnet, da sie eine thermodynamische Triebkraft besitzt.<sup>237</sup> Die Vernetzung des GelNB/GelS ist in Schema 8 dargestellt.

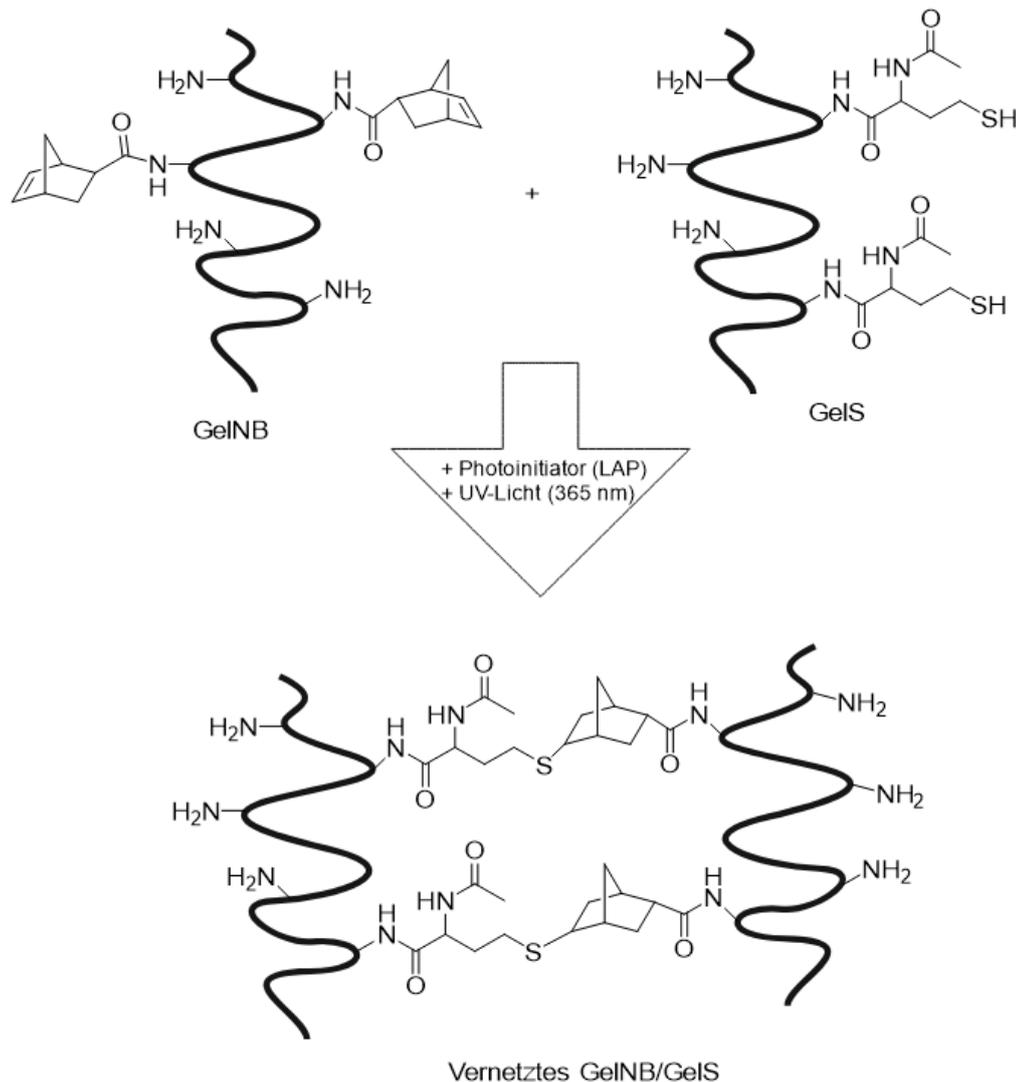


**Schema 7: Reaktionsgleichung einer Thiol-En Klick-Reaktion.** Durch die Zugabe eines Photoinitiators und der Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge können Thiyl-Radikale erzeugt werden, die anschließend elektrophil mit Alkenen zu Thioethern reagieren können. Modifiziert nach Machado *et al.*<sup>238</sup>

Die Vernetzung mit Hilfe der Thiol-En-Reaktion läuft im Gegensatz zur Kettenpolymerisation beim GelMA nach einer Stufenpolymerisation ab. Dadurch wird die Anzahl an freien Radikalen minimiert und es kann keine Homopolymerisation der einzelnen Stränge stattfinden.<sup>239,240</sup>

Anhand der Dissertationen von Dr. S. Haase, Dr. T. Göckler und Dr. X. Kempter konnten bereits die Bestrahlungsdauer sowie die LAP-Konzentration festgelegt werden, die zur Vernetzung der Photopolymere notwendig sind. Durch Experimente, die die unterschiedlichen

Polymerisationszeiten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an LAP untersuchten, hat sich herausgestellt, dass eine Polymerisationszeit von 30 s für den Einsatz von 0,3 % LAP bei den GelMA-Hydrogelen und eine Polymerisationszeit von 15 s für den Einsatz von 0,03 % LAP bei den GelNB/GelS-Hydrogelen als ideal angesehen werden können. Es wurde dabei eine Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  eingesetzt. So konnte mit dem GelNB/GelS ein Hydrogel entwickelt werden, welches eine niedrigere Konzentration des Photoinitiators sowie zusätzlich eine kürzere Polymerisationszeit zum Aushärten benötigt.<sup>222-224</sup>



**Schema 8: Vernetzung des Zweikomponentenhydrogels GelNB/GelS.** Durch Mischen von GelNB- und GelS-Lösungen in einem bestimmten Verhältnis können unterschiedlich stark vernetzte GelNB/GelS-Hydrogele hergestellt werden. Die Stammlösungen werden in DPBS<sup>-</sup> angesetzt. Durch die Zugabe von 0,03 % LAP und der Bestrahlung mit UV-Licht (320-500 nm, Omnicure S2000, 15 s,  $500 \text{ mW/cm}^2$ ) können vernetzte Zweikomponenten-Hydrogele aus GelNB und GelS hergestellt werden. Die Vernetzung erfolgt über eine Thiol-En Click-Reaktion mit dem Alken des GelNBs und des Thiols des GelS.

In der Vergangenheit wurden weitere Charakterisierungen der Hydrogele vorgenommen. So wurden die Hydrogele rheologisch charakterisiert, das Quellverhalten sowie das Degradationsverhalten untersucht und erste Biokompatibilitätsstudien in Bezug auf die Einbettung der Zellen und das Verhalten im 3D-Biodruck untersucht. Hierbei konnten

scherverdünnende Verhalten, eine hohe Quellbarkeit und ausgezeichnete Biokompatibilitäten verzeichnet werden.<sup>222–225</sup> Auf die chemischen Charakterisierungen wird im Verlauf der Arbeit nicht näher eingegangen. Da sich jedoch jede Zellart unterschiedlich verhält und jedes Gewebe unterschiedlich aufgebaut ist, wurden einige Versuche spezifisch für den Aufbau eines Herzgewebes im nachfolgenden Kapitel 3.1.3 wiederholt.

### 3.1.3 Aufbau des Herzmuskels aus verschiedenen Zelltypen

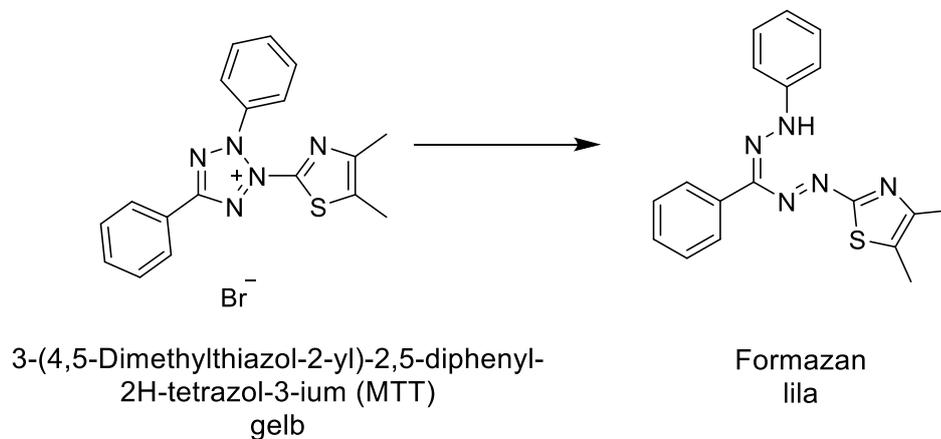
Das *Tissue Engineering* beschäftigt sich, wie bereits in Kapitel 1.1 ausführlich beschrieben, mit der Entwicklung artifizierender Gewebekonstrukte, um geschädigtes Gewebe zu regenerieren oder zu ersetzen.<sup>241</sup> Besonders die Entwicklung von Herzgewebe erhofft sich hierdurch einen Durchbruch. Da adulte Kardiomyozyten nicht in der Lage sind, sich zu teilen und dadurch keine Regeneration geschädigter Kardiomyozyten stattfinden kann, soll mit Hilfe artifizierender Gewebe die Regeneration von Herzgewebe unterstützt werden.<sup>135</sup> Die häufigste Todesursache bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist der Herzinfarkt, der auch als Myokardinfarkt bezeichnet wird. Ein Myokardinfarkt resultiert aus einer Verstopfung der Koronararterien, was zu einer Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff führt. Durch den Myokardinfarkt können Teile des Herzmuskels irreversibel absterben, wodurch es zu einer Narbenbildung kommt.<sup>242</sup> Durch den Einsatz von artifiziellem Gewebe mit Zellen des Myokards kann die Regeneration des abgestorbenen Gewebes induziert oder unterstützt werden. Wie bereits in der Einleitung in Kapitel 1.4.2 beschrieben, besteht die Herzwand aus drei Schichten, dem Endokard, Myokard und Epikard. Das Endokard wird durch eine Zellschicht von Endothelzellen gebildet. Das Myokard, der Herzmuskel, besteht aus den Kardiomyozyten, Herzfibroblasten, Perizyten sowie Immunzellen und ist für die Kontraktion des Herzmuskels verantwortlich.<sup>160,243</sup> Aufgrund der genannten Faktoren ist es notwendig, ein artifizielles Herzgewebe herzustellen, weshalb sich diese Arbeit auf die *in vitro* Rekonstruktion eines Herzgewebes mit Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen fokussiert.

In der Vergangenheit wurde bereits die Biokompatibilität der gelatinebasierten Hydrogele mit Hilfe humaner Zellen getestet, die als Standardzelllinien eingesetzt werden. So wurden bereits HepG2, eine Leberkrebszelllinie, und NHDF (humane Hautfibroblasten, *engl. normal human dermal fibroblasts*), eine Fibroblastenzelllinie, in den Hydrogelen eingebettet und deren Zellviabilität untersucht.<sup>222–225</sup> In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Aufbau eines Herzmodells mit Hilfe verschiedener Hydrogele. Dabei wurden GelMA-Hydrogele sowie die im Arbeitskreis etablierten GelNB/GelS-Hydrogele verwendet, um deren Eignung für den Aufbau eines artifizierenden Herzgewebes zu untersuchen. Da die Hydrogele bisher nur auf die Biokompatibilität an Standardzelllinien getestet wurden und die hier verwendeten herzspezifischen Zellen andere Verhaltensweisen aufweisen können, wurde erneut die Zytotoxizität der Photoinitiatoren untersucht und außerdem eine Biokompatibilitätsstudie durchgeführt. Hierbei wurden humane Herzfibroblasten (HCF, *engl. human cardiac fibroblasts*), humane Herzmuskelzellen (HCM, *engl. human cardiac myocytes*) und als Modellendothelzelllinie HUVEC (humane Nabelschnurendothelzellen, *engl. human umbilical vein endothelial cells*) näher untersucht, da diese Zellarten am häufigsten im Herzmuskel vertreten sind.

Da adulte Kardiomyozyten eine geringe Teilungsrate aufweisen, wurden in den nachfolgenden Experimenten primäre humane Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, HCM) eingesetzt. Diese Zellen zeigten eine hohe Teilungsrate und konnten über mehrere Passagen subkultiviert werden. Jedoch zeigten diese Zellen aufgrund der hohen Teilungsrate keine charakteristischen Kontraktionen.

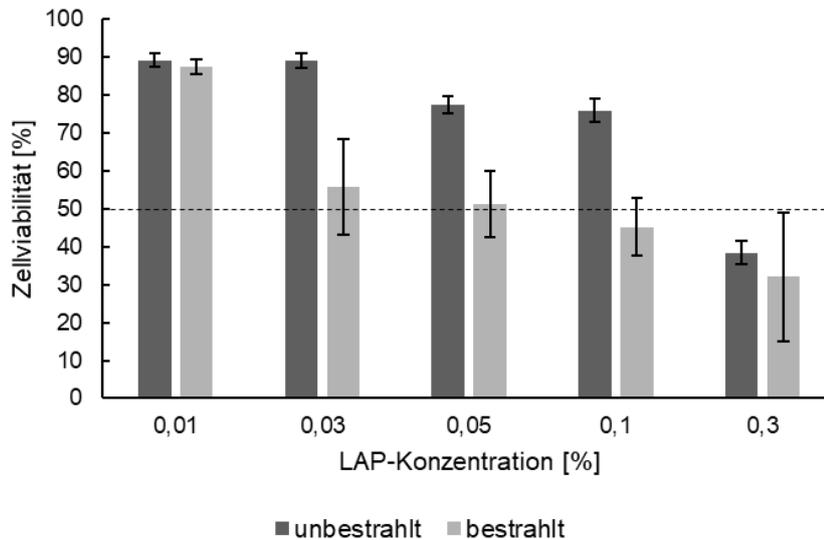
### 3.1.3.1 Zytotoxizität des Photoinitiators und der Bestrahlung

Da bei der Aushärtung der Hydrogele ein wasserlöslicher Photoinitiator eingesetzt werden musste, welcher durch die intrinsische Radikalbildung während der Photoreaktion Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen haben kann, wurde zunächst die Zytotoxizität verschiedener Konzentrationen des Photoinitiators Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) mit Hilfe eines MTT-Assays untersucht. LAP wird für die Vernetzung von GelMA- (0,3 %) und GelNB/GelS-Hydrogelen (0,03 %) eingesetzt. Der MTT-Assay bietet die Möglichkeit durch eine kolorimetrische Quantifizierung die metabolische Aktivität der Zellen zu bestimmen. Das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium (MTT) wird durch intrazelluläre mitochondriale Dehydrogenasen zum violetten Formazan metabolisiert, was in Schema 9 dargestellt ist.<sup>244,245</sup> Die kolorimetrische Quantifizierung erfolgte bei 595 nm.



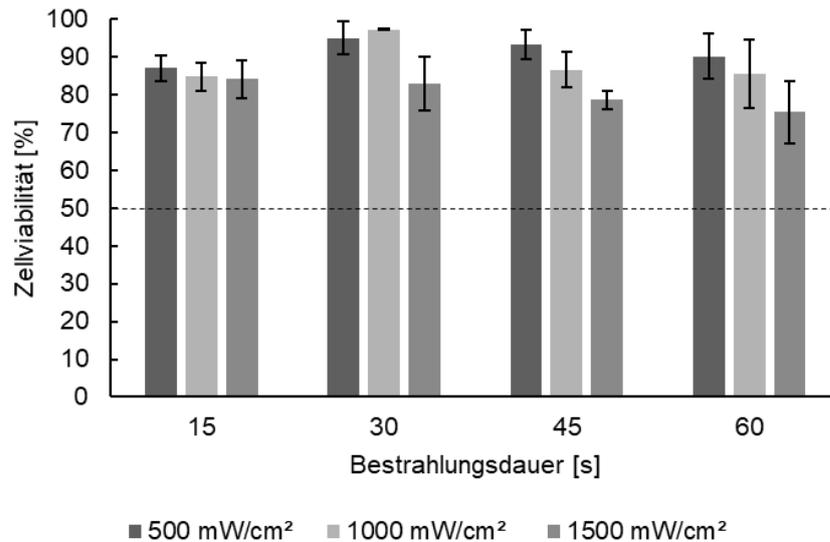
**Schema 9: Reaktionsgleichung des MTT-Assays.** Das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium (MTT) wird in lebendigen Zellen enzymatisch zu dem lilafarbenen Formazan reduziert. Durch eine Messung des Formazan bei einer Absorption von 595 nm kann die Viabilität der Zellen quantifiziert werden.

Zunächst wurden  $1 \cdot 10^4$  humane Herzfibroblasten (*engl. human cardiac fibroblasts*, HCF) in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an LAP (0,3 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,03 %, 0,01 %) behandelt und für 72 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 72 h wurde die Zellviabilität anhand eines MTT-Assays bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.



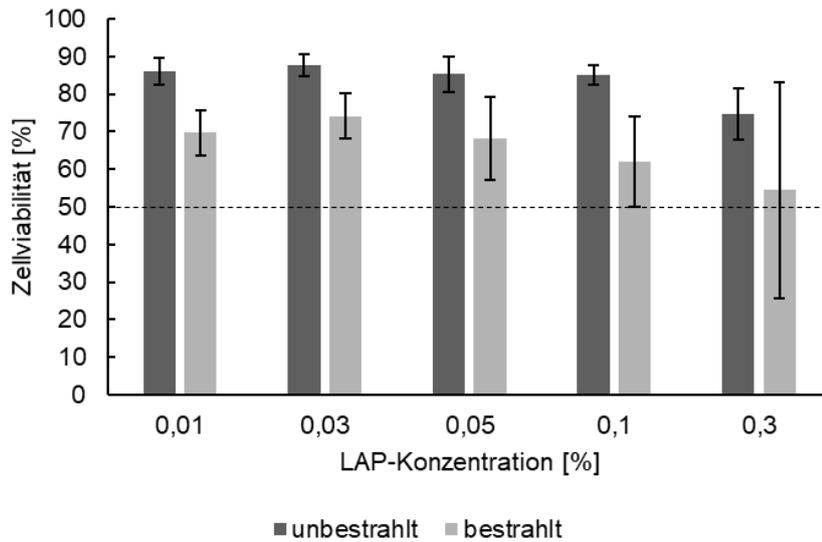
**Abbildung 12: Zytotoxizität des Photoinitiators LAP auf HCF.**  $1 \cdot 10^4$  HCF wurden in FGM-3 ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen LAP-Konzentrationen behandelt. In einem gesonderten Ansatz erfolgte zusätzlich nach Behandlung der Zellen mit dem Photoinitiator eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s bei einer Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniculture S2000, 320-500 nm). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Da ein Photoinitiator bei der Bestrahlung mit UV-Licht in Radikale zerfällt, wurde sowohl die Zytotoxizität des Photoinitiators ohne anschließende Bestrahlung und mit anschließender Bestrahlung untersucht. Dabei zeigte sich für die Behandlung der HCF mit dem Photoinitiator eine abnehmende Viabilität mit steigender Konzentration an LAP. Zudem führte eine zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht zu einer verringerten Viabilität verglichen mit der Behandlung mit LAP ohne zusätzliche Bestrahlung. In den GelNB/GelS-Hydrogelen wird eine Konzentration von 0,03 % LAP eingesetzt, wobei die HCF eine Viabilität von 89 % ohne Bestrahlung und 56 % mit Bestrahlung aufwiesen. Für die GelMA-Hydrogele wird eine Konzentration von 0,3 % LAP benötigt. Hier lag die Viabilität der HCF bei 38 % ohne Bestrahlung und 32 % mit Bestrahlung. Der  $LD_{50}$ -Wert liegt bei 0,23 % LAP für das Experiment ohne Bestrahlung und bei 0,13 % LAP für das Experiment mit Bestrahlung.



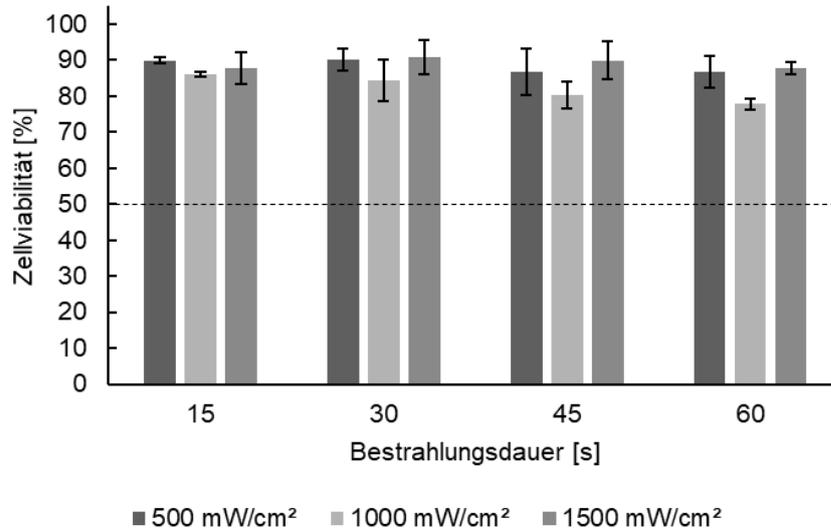
**Abbildung 13: Zytotoxizität der Leistungsdichte sowie der Bestrahlungsdauer auf HCF.**  $1 \cdot 10^4$  HCF wurden in FGM-3 ausgesät und nach 24 h unterschiedlichen Leistungsdichten sowie unterschiedlichen Bestrahlungsdauern ausgesetzt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Während des Vernetzungsvorgangs werden die Zellen für eine bestimmte Zeit dem UV-Licht ausgesetzt. Um den Einfluss der Bestrahlungsdauer sowie der Leistungsdichte, denen die Zellen während des Vernetzungsvorganges ausgesetzt werden, zu untersuchen, wurde erneut ein MTT-Assay durchgeführt (Abbildung 13). Hierbei wurden die Zellen wie zuvor im Experiment ausgesät und anschließend mit verschiedenen Leistungsdichten ( $500 \text{ mW/cm}^2$ ,  $1000 \text{ mW/cm}^2$ ,  $1500 \text{ mW/cm}^2$ ) und verschiedenen Zeitintervallen (15 s, 30 s, 45 s, 60 s) bestrahlt. Es zeigte sich für alle unterschiedlich eingesetzten Faktoren eine hohe Zellviabilität, wobei sich daraus schließen lässt, dass UV-Licht auf die Zellviabilität der HCF keinen erheblichen Einfluss nimmt. Da sich dieser Assay ausschließlich auf die Viabilität fokussiert, ist jedoch nicht auszuschließen, dass eventuell Mutationen in der DNA (*engl. desoxyribonucleic acid*) stattgefunden haben, welche die Zelle in der Ausübung ihrer Normalfunktion einschränken kann. Jedoch deckt das Omnicure S2000 einen Wellenlängenbereich von 320-500 nm ab, welches hauptsächlich aus UV A-Strahlung (315-400 nm) besteht und diese im Gegensatz zur UV B-Strahlung (280-315 nm) und UV C-Strahlung (200-280 nm) nicht direkt von der DNA absorbiert wird. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Photoschäden innerhalb der DNA induziert wurden.<sup>246,247</sup>



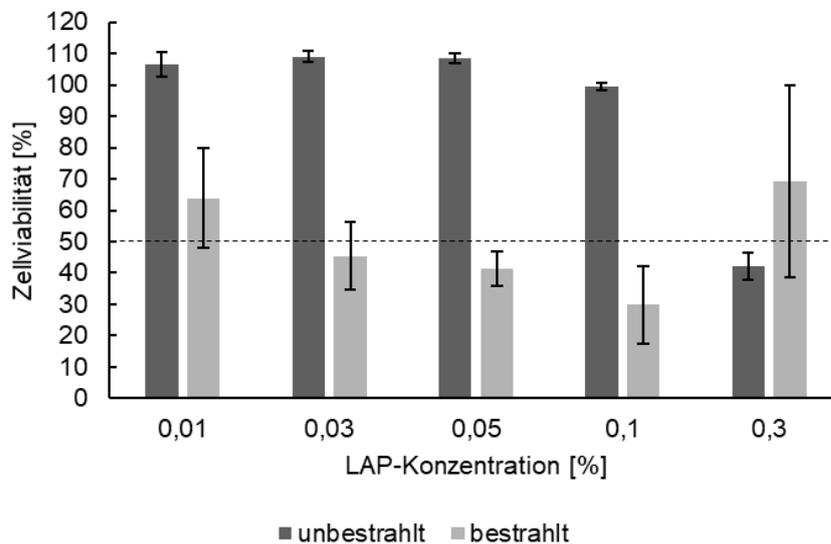
**Abbildung 14: Zytotoxizität des Photoinitiators LAP auf HCM.**  $1 \cdot 10^4$  HCM wurden in MGM ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen LAP-Konzentrationen behandelt. In einem gesonderten Ansatz erfolgte zusätzlich nach Behandlung der Zellen mit dem Photoinitiator eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s mit einer Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniculture S2000, 320-500 nm). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Eine weitere Zelllinie, die zum Aufbau des Herzmuskels (Myokard) benutzt wurde, ist die primäre Zelllinie von humanen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, HCM). Hier wurde ebenfalls der Einfluss verschiedener Konzentrationen des Photoinitiators LAP mit und ohne Bestrahlung untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Es konnte für alle getesteten Konzentrationen, unabhängig von dem Einsatz der Bestrahlung und dem Zerfall des Photoinitiators in Radikale, eine hohe Zellviabilität erzielt werden. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit UV-Licht nahm die Zellviabilität ab, lag jedoch immer über 50 %. Bei der Exposition mit dem Photoinitiator LAP zeigten sich die HCM robuster im Vergleich mit den HCF.



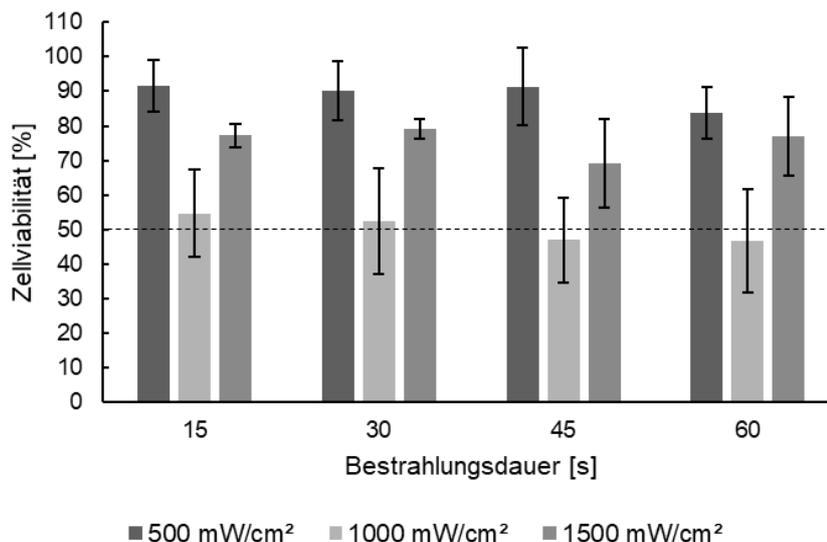
**Abbildung 15: Zytotoxizität der Leistungsdichte sowie der Bestrahlungsdauer auf HCM.**  $1 \cdot 10^4$  HCM wurden in MGM ausgesät und nach 24 h unterschiedlichen Leistungsdichten sowie unterschiedlichen Bestrahlungsdauern ausgesetzt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT Assays ausgewertet. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Die Untersuchung der Auswirkungen der Bestrahlungsdauer und der Leistungsdichte auf die Zellviabilität der HCM wurde analog zu dem MTT Assay der HCF durchgeführt (Abbildung 15). Es konnten konstant hohe Zellviabilitäten von 80-90 % erreicht werden, wodurch UV-Licht als Faktor zur Verringerung der Zellviabilität ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 16: Zytotoxizität des Photoinitiators LAP auf HUVEC.**  $1 \cdot 10^4$  HUVEC wurden in EGM-2 ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen LAP-Konzentrationen behandelt. In einem gesonderten Ansatz erfolgte zusätzlich nach Behandlung der Zellen mit dem Photoinitiator eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s mit einer Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniculture S2000, 320-500 nm). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT Assays ausgewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Um das Modell des Herzmuskels *in vivo* getreu zu rekonstruieren, wurde die Endothelzelllinie HUVEC zur Abbildung des Endokards verwendet. Um die Auswirkungen des Photoinitiators auf diese Zellen zu untersuchen, wurde der MTT Assay analog, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Abbildung 16). Dabei konnten bei einer Zunahme der LAP-Konzentration und ohne zusätzliche Behandlung mit UV-Licht hohe Viabilitäten erreicht werden, mit Ausnahme von 0,3 % LAP. Bei der Konzentration von 0,3 % fiel die Viabilität unter 50 %. Der LD<sub>50</sub>-Wert für die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an LAP ohne Bestrahlung liegt bei 0,28 % LAP. Nachdem die Zellen mit LAP behandelt und zusätzlich mit UV-Licht bestrahlt wurden, verringerte sich die Viabilität deutlich. Mit Ausnahme von 0,3 % LAP verringerte sich die Zellviabilität mit Zunahme der Konzentration.



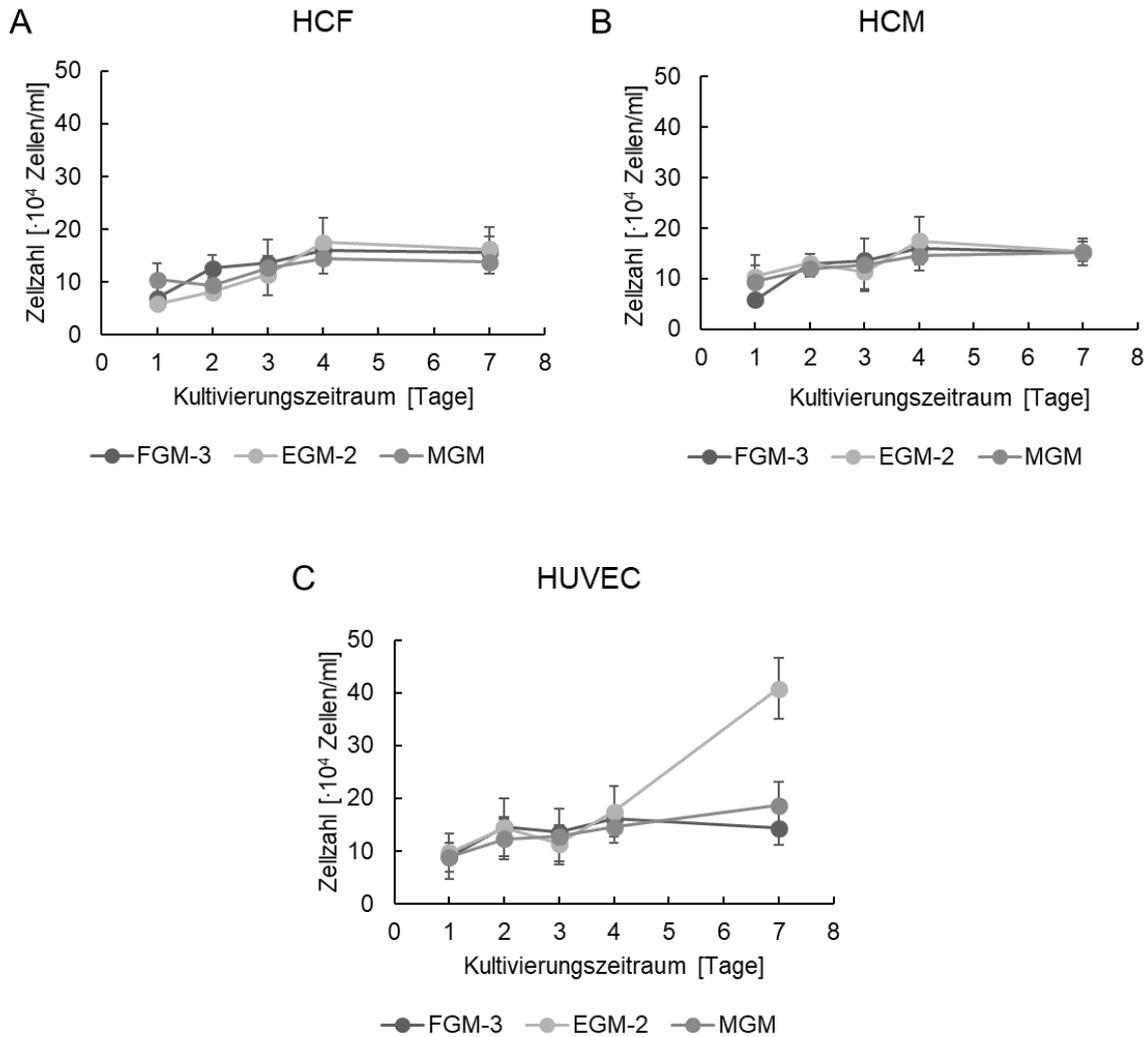
**Abbildung 17: Zytotoxizität der Leistungsdichte sowie der Bestrahlungsdauer auf HUVEC.**  $1 \cdot 10^4$  HUVEC wurden in EGM-2 ausgesät und nach 24 h unterschiedlichen Leistungsdichten sowie unterschiedlichen Bestrahlungsdauern ausgesetzt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT Assays ausgewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 5$  ermittelt.

Zur Untersuchung der Auswirkung des UV-Lichts wurde analog zu den vorherigen MTT-Assays dieses Experiment erneut mit den HUVEC durchgeführt (Abbildung 17). Bei 500 mW/cm<sup>2</sup> und 1500 mW/cm<sup>2</sup> wurden hohe Zellviabilitäten erreicht. Für 1000 mW/cm<sup>2</sup> wurden geringere Viabilitäten erzielt. Für den LD<sub>50</sub>-Wert für die Leistungsdichte von 1000 mW/cm<sup>2</sup> wurden 38,4 s ermittelt.

Für GelMA-Hydrogele wird eine Photoinitiatorkonzentration von 0,3 % und eine Bestrahlungsdauer von 30 s benötigt damit eine vollständige Vernetzung stattfinden konnte. Die HCM zeigten hierbei hohe Viabilitäten, wobei die HCF und HUVEC teilweise eine Überlebensrate von unter 50 % aufwiesen. Dies kann bei der Einkapselung der Zellen einen möglichen Einfluss auf die Zellviabilität haben, welches berücksichtigt werden musste. Bei GelNB/GelS werden 0,03 % an Photoinitiator und eine Bestrahlungsdauer von 15 s eingesetzt, wobei alle Zellarten eine hohe Überlebensrate zeigten und dies die Viabilität bei einer Einbettung der Zellen innerhalb der Hydrogele nicht negativ beeinflussen sollte.

### 3.1.3.2 Wachstumskurve

Um ein humanes Herzmuskelmodell (Myokard) möglichst nahe dem natürlichen Herzmuskel aufzubauen, ist es notwendig, dass verschiedene Zellarten miteinander interagieren und im zellulären Austausch miteinander stehen. Für diesen Aufbau wird eine Kokultur aus drei humanen Zellarten benötigt. Es werden Herzmuskelzellen, Herzfibroblasten und Endothelzellen benötigt, um den humanen *in vivo* Herzmuskel möglichst genau zu rekonstruieren. Da diese Zelltypen jedoch in der allgemeinen Zellkultur jeweils in unterschiedlichen Zellkulturmedien kultiviert werden, musste zunächst ein passendes Nährmedium für die Kokultivierung der drei Zellarten bestimmt werden. Dabei war es wichtig, dass das passende Nährmedium die Proliferation aller drei Zellarten begünstigt. Die Herzmuskelzellen (HCM) wurden in *Myocyte Growth Medium* (MGM), die Herzfibroblasten (HCF) in *Fibroblast Growth Medium-3* (FGM-3) und die Endothelzellen (HUVEC) in *Endothelial Cell Growth Medium-2* (EGM-2) kultiviert. Um innerhalb dieser drei Medien ein geeignetes Nährmedium zu identifizieren, wurde eine Wachstumskurve durchgeführt, in der das Wachstum der Zellen in den jeweils verschiedenen Medien über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen beobachtet wurde. Es wurden zu Beginn  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml pro Well ausgesät und in dem jeweiligen Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurden die Zellen enzymatisch abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Ein Medienwechsel wurde alle 2-3 Tage mit dem spezifisch eingesetzten Medium durchgeführt.

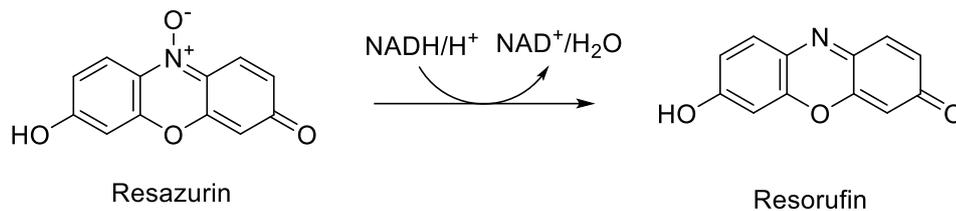


**Abbildung 18: Wachstumskurve der HCF, HCM und HUVEC in verschiedenen Nährmedien.** Es wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml in den spezifischen Nährmedien in ein Well einer 24-Well-Platte ausgesät und kultiviert. An Tag 1, 2, 3, 4 und 7 wurden die Zellen jeweils mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. (A) HCF, (B) HCM, (C) HUVEC. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 3$  ermittelt.

Zwischen den Zellarten waren keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen (Abbildung 18). Bei den verschiedenen Medien wurden vergleichbare Zellzahlen bestimmt. Eine Ausnahme sind die HUVEC, die in ihrem zellspezifischen Medium EGM-2 ein starkes Wachstum von Tag 4 bis Tag 7 auf die doppelte Zellzahl aufzeigten. Die HCM und die HCF sind in allen Medien vergleichbar gut gewachsen. Jedoch ist die größte Zunahme des Zellwachstums ebenfalls in dem Medium EGM-2 zu erkennen. Für die HCF konnte eine Zunahme des 2,8-fachen und für die HCM des 2,5-fachen zur Zellzahl an Tag 1 in EGM-2 verzeichnet werden. Anhand der Ergebnisse der Wachstumskurve wurde für die Kokultur der drei Zellarten das EGM-2 als Kultivierungsmedium gewählt.

### 3.1.3.3 Untersuchung des Proliferationsverhaltens herzspezifischer Zellarten

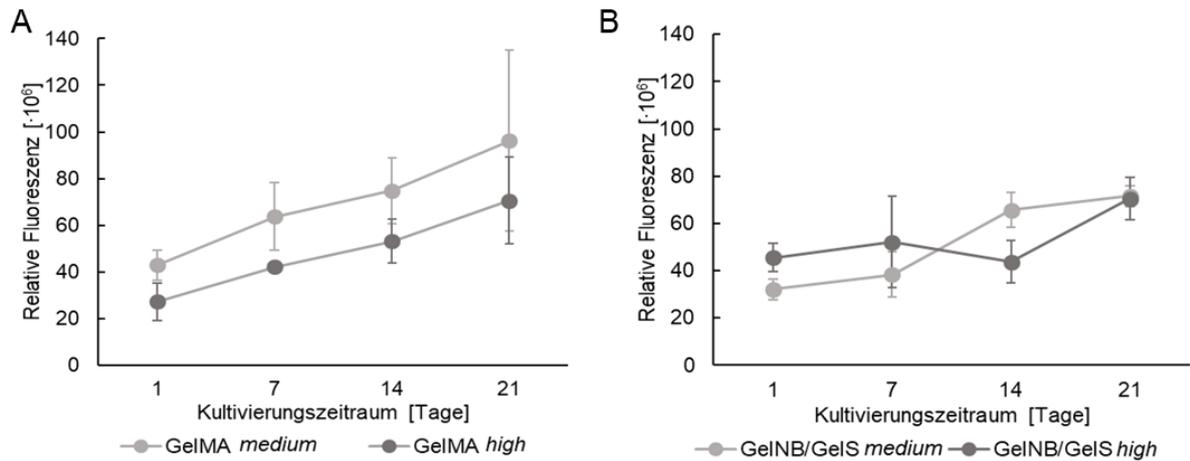
Da die Hydrogele ein unterschiedlich dichtes Netzwerk aufgrund von unterschiedlich stark funktionalisierten Gelatineketten bilden können, werden somit auch unterschiedlich große Poren erzeugt. Dieser Größenunterschied der Poren führt zu einem unterschiedlichen Diffusionsverhalten, wobei Nährstoffe und Gase zur Versorgung der Zellen möglicherweise schlechter in das Hydrogel durchdringen. Um das Proliferationsverhalten der Zellen innerhalb der Hydrogele spezifisch zu untersuchen, wurden Presto-Blue™ Proliferationsassays durchgeführt. Die Reaktionsgleichung ist in Schema 10 aufgezeigt.



**Schema 10: Reaktionsgleichung des Presto-Blue™ Assays.** Das blaue Resazurin wird in lebendigen Zellen zu dem rosafarbenen Resorufin metabolisiert. Dabei wird NADH als Elektronenüberträger genutzt. Bei einer hohen Proliferationsrate sollte die Fluoreszenz des Resorufin zunehmen.

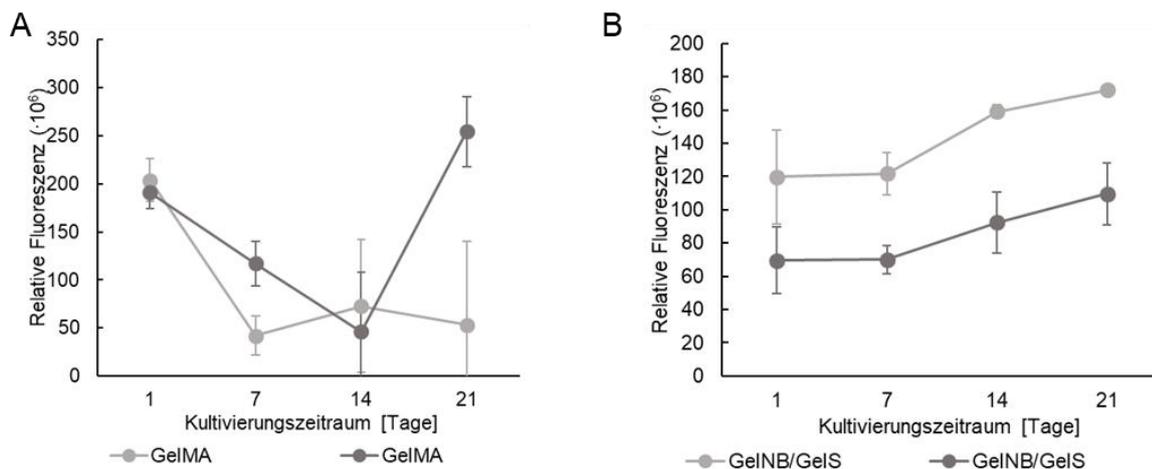
Das Presto-Blue™ Reagenz wird hierbei eingesetzt, da das blaue Resazurin in viablen Zellen zu Resorufin NADH-abhängig reduziert wird.<sup>248</sup> Ist eine hohe Proliferation innerhalb des Hydrogels vorhanden, so findet eine Farbänderung von blau nach rosa statt und die gemessene Fluoreszenz nimmt zu. Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit den Hydrogelen 1:1 gemischt und mit Hilfe von UV-Licht vernetzt, wodurch eine Einbettung der Zellen innerhalb des Hydrogeles stattfand. Anschließend wurde jeweils an Tag 1, 7, 14 und 21 ein Presto-Blue™ Assay durchgeführt. Hierbei wurde das Presto-Blue™ Reagenz 1:10 im zellspezifischen Nährmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde die Fluoreszenz mit einem Multiplattenleser ( $\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 600 \text{ nm}$ , Integrationszeit= 400 ms) quantifiziert.

Dabei wurden nur die *medium*- und *high*-Hydrogele getestet, da sich die *low*-Hydrogele in dem Zeitraum von 21 Tagen bereits abgebaut hatten und keine Kultivierung über 21 Tage möglich war. Die HCF zeigten in allen eingesetzten Gelen eine Zunahme der relativen Fluoreszenz (Abbildung 19). GelMA *medium* zeigte die höchsten Werte, wobei die restlichen Gele vergleichbare Werte zeigten. Die Zunahme von GelMA *medium* betrug 57 %, GelMA *high* zeigte eine Zunahme von 61,7 %, GelNB/GelS *medium* von 54,9 % und GelNB/GelS *high* von 35,5 %.



**Abbildung 19: Proliferationsverhalten der in Hydrogelen eingebetteten HCF.**  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden in den verschiedenen Hydrogelen eingebettet und in FGM-3 kultiviert. Nach 1, 7, 14 und 21 Tagen wurde ein Presto-Blue™ Assay durchgeführt. Hierzu wurde das Presto-Blue™ Reagenz 1:10 in FGM-3 verdünnt und zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde die Absorption an einem Multiplattenleser ( $\lambda_{ex}$ = 560 nm,  $\lambda_{em}$ = 600 nm, Integrationszeit= 400 ms) bestimmt. (A) GelMA; (B) GelNB/GelS. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt.

Die HCM zeigten in allen Hydrogelen, mit Ausnahme von GelMA *medium*, einen Anstieg der relativen Fluoreszenz und somit eine Proliferation (Abbildung 20). In dem Hydrogel GelMA *medium* wurde im Vergleich zur relativen Fluoreszenz zu Beginn eine Abnahme gemessen. In GelMA *high* fiel die relative Fluoreszenz an Tag 1 zu Tag 14 ab und stieg von Tag 14 bis Tag 21 auf einen Wert von  $250 \cdot 10^6$  an. In den GelNB/GelS-Hydrogelen war ein konstanter Anstieg der Proliferation zu beobachten, wobei GelNB/GelS *medium* höhere Werte aufzeigte. Es konnte eine Zunahme der Fluoreszenz von 24,81 % für GelMA *high*, 30,9 % für GelNB/GelS *medium* und 36,5 % für GelNB/GelS *high* erzielt werden. Des Weiteren konnte für GelMA *medium* eine Abnahme von 73,9 % festgestellt werden.

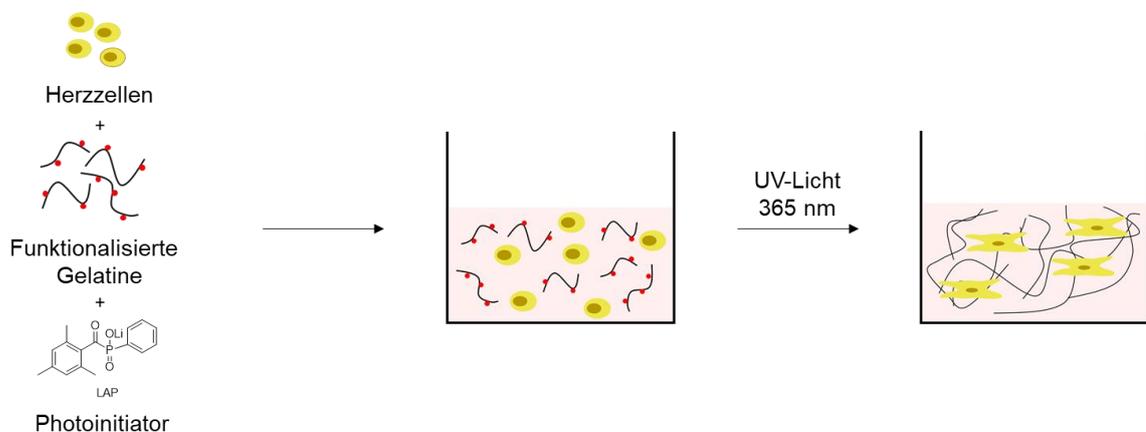


**Abbildung 20: Proliferationsverhalten der in Hydrogelen eingebetteten HCM.**  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden in den verschiedenen Hydrogelen eingebettet und in MGM kultiviert. Nach 1, 7, 14 und 21 Tagen wurde ein Presto-Blue™ Assay durchgeführt. Hierzu wurde das Presto-Blue™ Reagenz 1:10 in MGM verdünnt und zu den Zellen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurde die Absorption an einem Multiplattenleser ( $\lambda_{ex}$ = 560 nm,  $\lambda_{em}$ = 600 nm, Integrationszeit= 400 ms) bestimmt. (A) GelMA; (B) GelNB/GelS. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 ermittelt.

Insgesamt konnte ein besseres Proliferationsverhalten für die HCF in den Hydrogelen festgestellt werden. Außerdem zeigte sich eine höhere prozentuale Zunahme der Fluoreszenz in den GelMA-Hydrogelen für die HCF. Die HCM zeigten größere Schwankungen. Adulte Kardiomyozyten besitzen allgemein eine niedrigere Teilungsrate, weshalb damit eine geringe Proliferation erreicht wird. Jedoch sind die eingesetzten primären Kardiomyozyten (HCM) nicht vollständig ausdifferenziert, damit sie über mehrere Passagen subkultiviert werden können und zeigen aufgrund dessen auch keine charakteristischen Kontraktionen. Deshalb konnten hohe relative Fluoreszenzen und eine erhöhte Proliferation im GelNB/GelS für die HCM ermittelt werden.

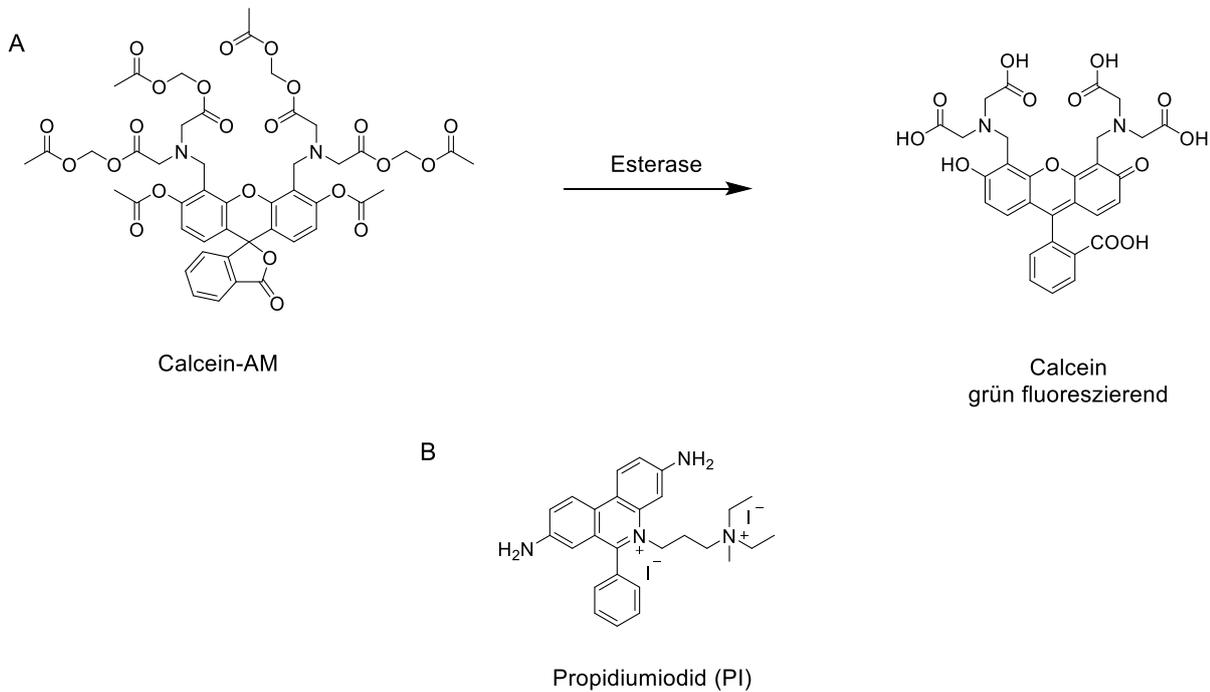
### 3.1.3.4 Lebend-/Tot-Färbungen

Um ein natürliches Gewebe nachzubilden, können Hydrogele als Stützstrukturen eingesetzt werden. Die Biokompatibilität der Hydrogele ist von essentieller Bedeutung, da Zellen zur Migration, Proliferation und Differenzierung spezifische Anforderungen an ihre Mikroumgebung stellen.<sup>249</sup> Da die eingesetzten Hydrogele auf Gelatinebasis aufgebaut sind, werden die Eigenschaften der Gelatine repräsentiert. So besitzen die Hydrogele sogenannte RGD-Domänen, welche ein Motiv aus den Aminosäuren Arginin(R)-Glycin(G)-Aspartat(D) sind. Die Sequenzen dienen als Zellbindedomänen, da die Zellen sich an dieser Sequenz über zelleigene Integrinrezeptoren verankern können.<sup>114,250</sup> Außerdem weisen die Hydrogele Spaltsequenzen für Matrix-Metalloproteinasen (MMP) auf, welche eine enzymatische Degradation ermöglichen. Diese Eigenschaft der Biodegradierbarkeit ist von essentieller Bedeutung in der Migration und Ausbreitung der Zellen.<sup>251,252</sup> Durch die Vernetzung der funktionellen Gruppen an den Gelatinesträngen entstehen Poren, in deren Zwischenräume Zellen eingekapselt werden können, wodurch eine dreidimensionale Kultivierung ermöglicht wird. Die schematische Herstellung einer 3D-Kultur im Hydrogel ist in Abbildung 21 dargestellt. Dabei wurden das GelMA-Hydrogel und das GelNB/GelS-Hydrogel bezüglich deren Biokompatibilität für herzspezifische Zellen untersucht. Hierfür wurden jeweils  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 200  $\mu$ l Hydrogel eingebettet.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung der Herstellung einer 3D-Kultur.** Die Zellen wurden mit einer Photopolymerlösung und dem Photoinitiator gemischt und in ein Well platziert. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge von 365 nm erfolgte die Vernetzung, wodurch die Zellen innerhalb der Photopolymerlösungen eingebettet wurden und an den RGD-Domänen der Gelatine adhären konnten.

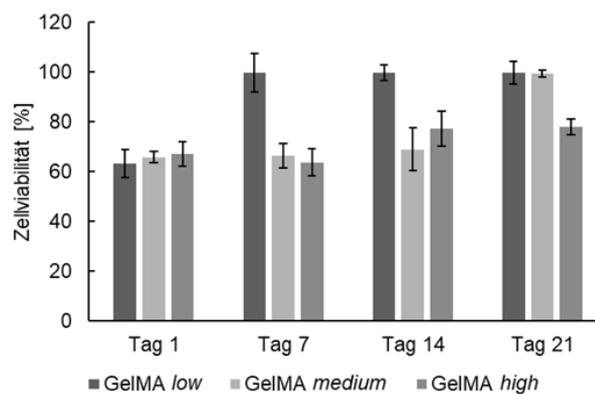
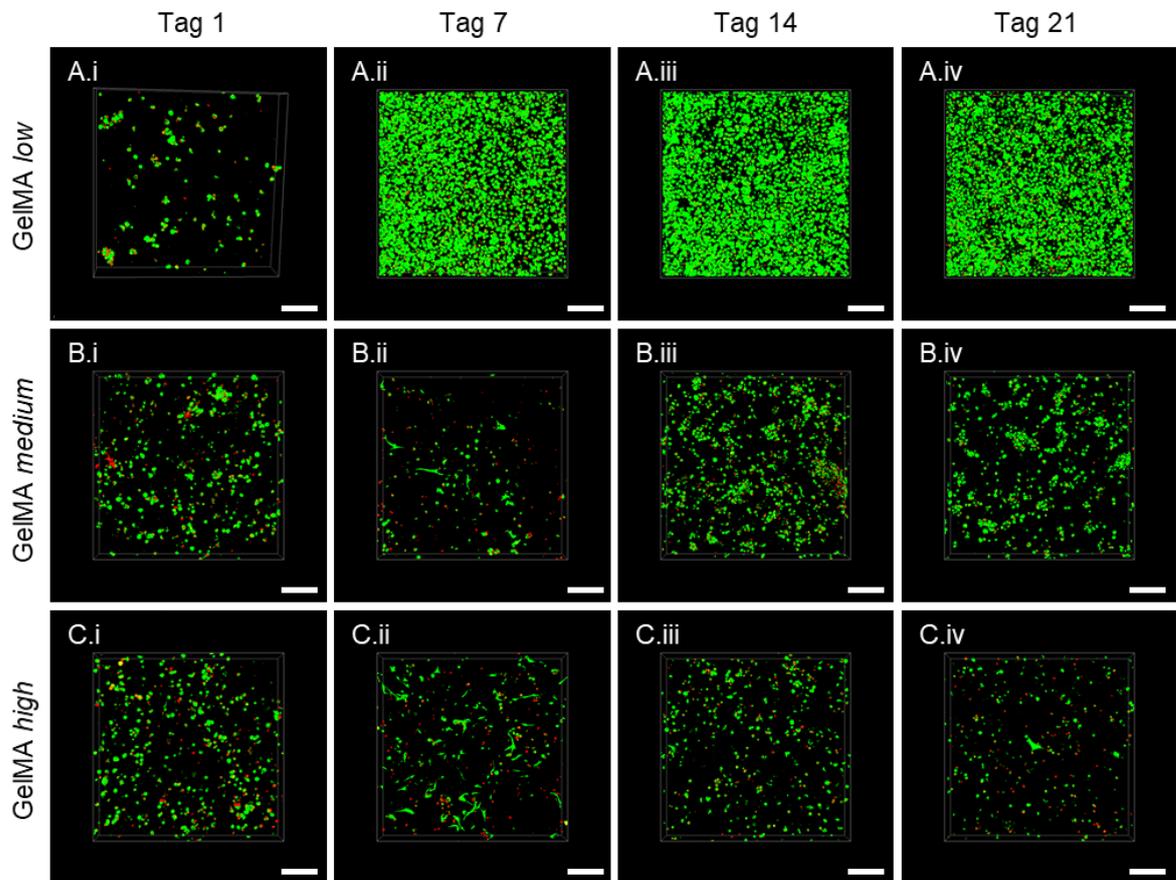
An Tag 1, 7, 14 und 21 wurden jeweils Lebend-/Tot-Färbungen durchgeführt, um die Zellviabilität innerhalb des Hydrogels zu untersuchen. Als Markierung der lebenden Zellen wurde Calcein-AM eingesetzt, welches in lebenden Zellen von Esterasen zu dem grün fluoreszierenden Calcein umgesetzt wird. Als Markierung der toten Zellen wurde das nicht membrangängige Propidiumiodid (PI) verwendet, welches in die DNA interkaliert und somit nur in Zellen vorzufinden ist, deren Zellmembran beschädigt wurde. Diese Markierung wird in Rot dargestellt.<sup>253–255</sup> Die Strukturformeln des Calcein-AM und PI sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Experimente wurden in Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen durchgeführt.<sup>256</sup>



**Abbildung 22: Strukturformeln der Färbereagenzien Calcein-AM und PI.** (A) Calcein-AM kann durch die Zellmembran diffundieren und wird in lebendigen Zellen durch die enthaltenen Esterasen zu Calcein umgewandelt, welches eine grüne Fluoreszenz aufweist und somit lebendige Zellen grün markieren kann. (B) Propidiumiodid (PI) visualisiert tote Zellen, da es nicht membrangängig ist und somit nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen kann und in die DNA interkaliert. Dies führt zu einer roten Markierung der toten Zellen.

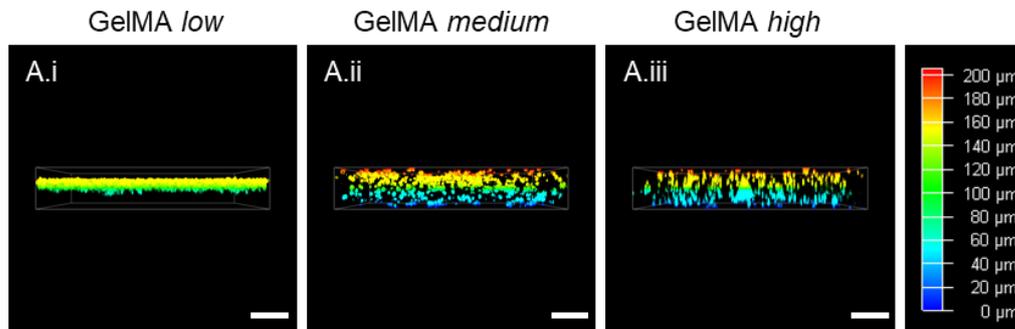
Das Ergebnis der Lebend-/Tot-Färbung der HCF innerhalb der GelMA-Hydrogele ist in Abbildung 23 dargestellt. Innerhalb des Hydrogels konnte eine hohe Zellviabilität über den Zeitraum von 21 Tagen erreicht werden. Es sind überwiegend grün fluoreszierende Zellen detektiert worden. Das GelMA *low*-Hydrogel hatte sich bereits nach 7 Tagen vollständig abgebaut, weshalb sich eine 2D-Zellschicht aus HCF auf dem Boden des Wells ausbildete und keine 3D-Struktur mehr zu erkennen war. Dies wird auch durch die Quantifizierung der Zellviabilität, welche mit der Software *ImageJ* ermittelt wurde, bestätigt, da an Tag 1 eine niedrigere Zellviabilität im Vergleich mit Tag 7, 14 und 21 erzielt wurde. Durch den Abbau des Hydrogels konnten die Zellen in einem *Monolayer* wachsen und einheitlich mit Nährstoffen aus dem Kultivierungsmedium versorgt werden. In GelMA *medium* und GelMA *high* waren zudem leichte zelluläre Ausläufer an Tag 7 erkennbar, was jedoch bis Tag 21 in keiner Verstärkung resultierte. GelMA *medium* und GelMA *high* zeigten Zellviabilitäten von ungefähr 60-70 % über nahezu den gesamten Zeitraum verteilt. Die hohe eingesetzte Konzentration an LAP kann die Überlebensrate an Tag 1 verringert haben. Außerdem können die ausgebildeten Netzwerke

der GelMA-Hydrogele für die HCF zu dicht sein, weshalb sie einerseits nicht migrieren und proliferieren konnten und andererseits nicht mit ausreichend Nährstoffen aus dem Nährmedium versorgt wurden.



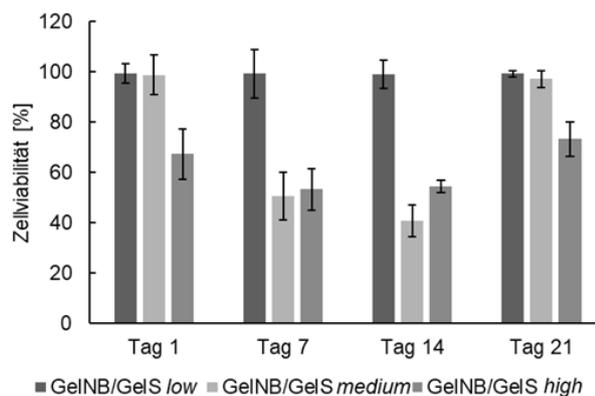
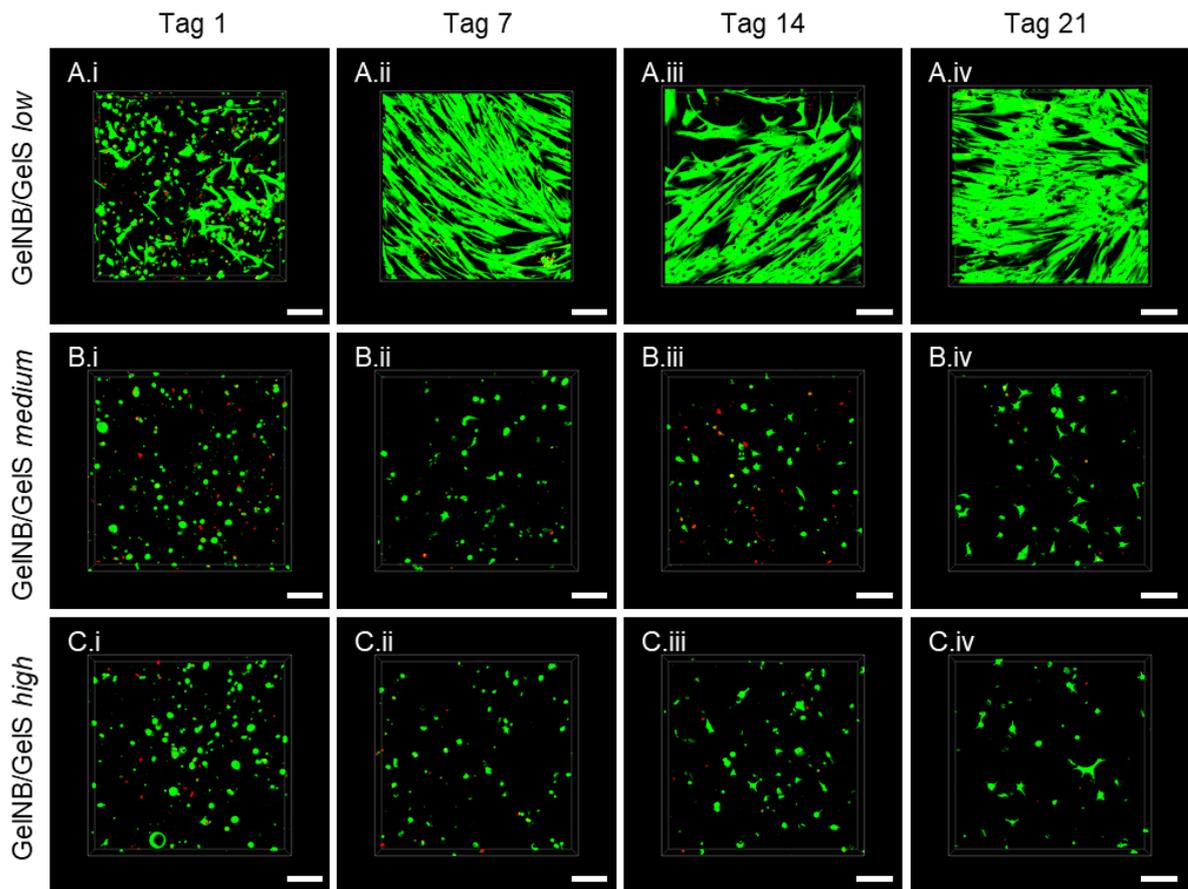
**Abbildung 23: Lebend-/Tot-Färbung von HCF im GelMA-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einem GelMA-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelMA-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500  $mW/cm^2$ , Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *low*, (B) GelMA *medium*, (C) GelMA *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Durch das Tiefenprofil in Abbildung 24 konnte die Verteilung der Zellen innerhalb des Hydrogels in einer Höhe von 200  $\mu\text{m}$  gezeigt werden. Dagegen konnte im GelMA *low* eine 2D-Zellschicht in einer Ebene erkannt werden, was den Abbau des Hydrogels bestätigt. In den Hydrogelen GelMA *medium* und GelMA *high* war über 21 Tage eine 3D-Struktur erkennbar und die Zellen in den verschiedenen Ebenen des Hydrogels verteilt, was auf eine Adhäsion der Zellen an die RGD-Sequenzen schließen lässt.



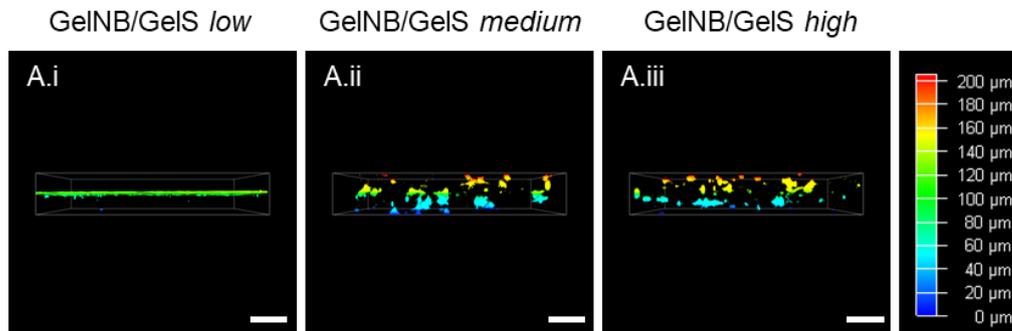
**Abbildung 24: Tiefenprofil der HCF in GelMA-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelMA *low*, (ii) GelMA *medium*, (iii) GelMA *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Es konnte zwischen der Einkapselung der HCF in den GelMA-Hydrogelen eine ähnliche Verhaltensweise zu der Einkapselung in den GelNB/GelS-Hydrogelen beobachtet werden. Die Ergebnisse der Einbettung der HCF in den GelNB/GelS-Hydrogelen ist in Abbildung 25 dargestellt. Wie das GelMA *low* wurde das GelNB/GelS *low* ebenfalls innerhalb weniger Tage abgebaut, sodass an Tag 7 kein Hydrogel mehr sichtbar war. Dadurch konnten die Zellen am Boden des Wells adhären. Aufgrund dessen konnte auch bei der Quantifizierung der lebenden Zellen eine hohe Überlebensrate erfasst werden. Jedoch war die Viabilität im Gesamten betrachtet in den GelNB/GelS-Hydrogelen mit knapp 100 % für GelNB/GelS *medium* und 80 % für GelNB/GelS *high* nach 21 Tagen hoch. Bereits nach 7 Tagen konnten Ausrichtungen im GelNB/GelS *medium* und im GelNB/GelS *high* ab Tag 14 beobachtet werden. Eine zelluläre Vernetzung der Fibroblasten fand jedoch nicht statt.



**Abbildung 25: Lebend-/Tot-Färbung von HCF im GelNB/GelS-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einem GelNB/GelS-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelNB/GelS-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (15 s, 500  $mW/cm^2$ , Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelNB/GelS *low*, (B) GelNB/GelS *medium*, (C) GelNB/GelS *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Über eine Höhe von 200  $\mu\text{m}$  konnte eine homogene Verteilung durch das erstellte Tiefenprofil gezeigt werden (Abbildung 26). Lediglich im *low*-Hydrogel befanden sich die Zellen ausschließlich in einer Ebene. Dies ist auf den vollständigen Abbau des Hydrogels und damit das Anwachsen der Zellen auf dem Boden des Wells zurückzuführen.

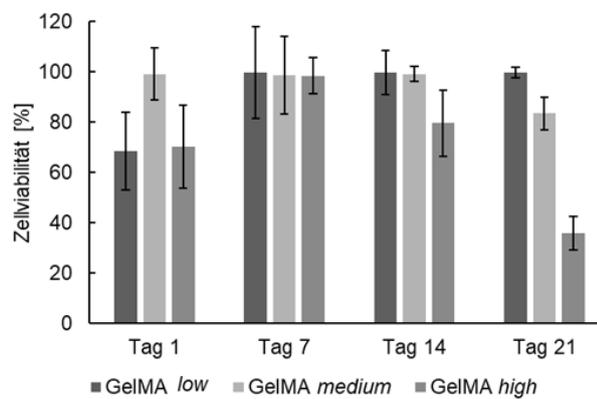
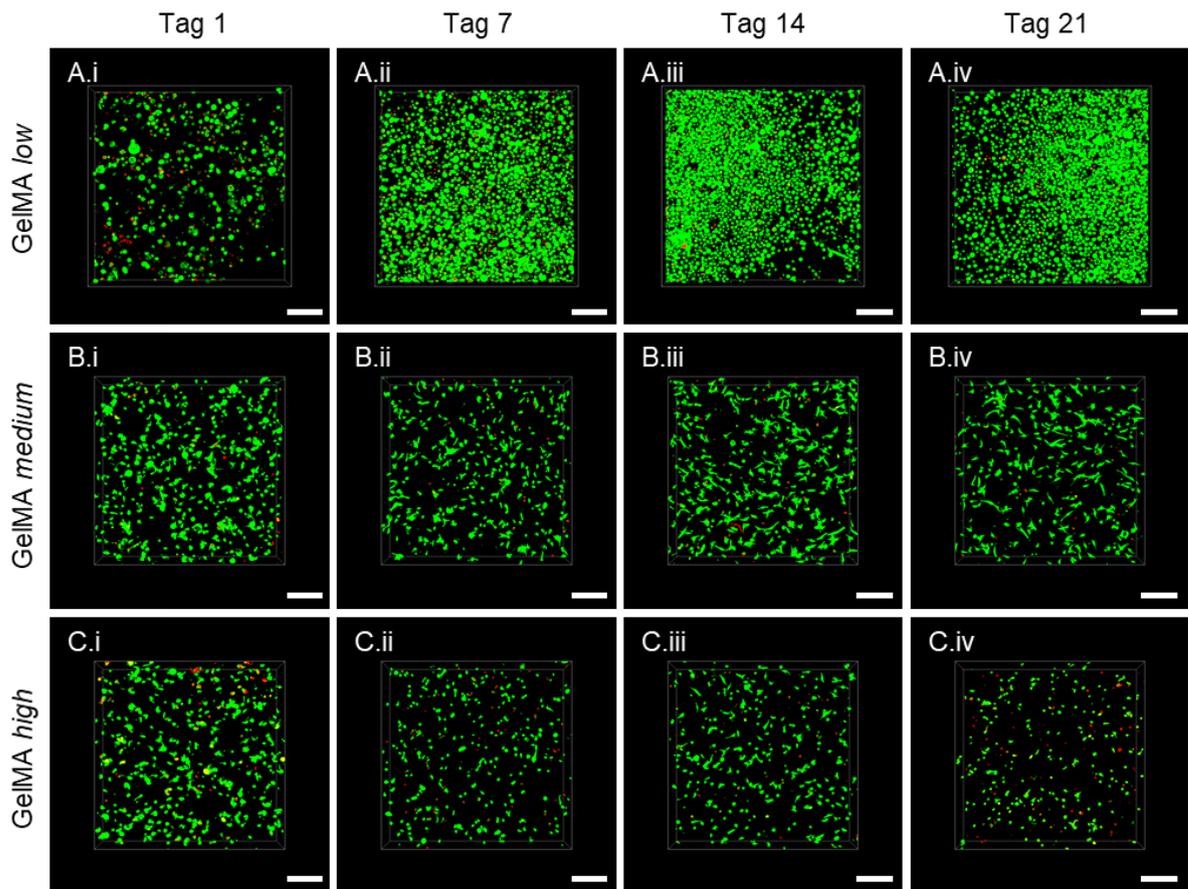


**Abbildung 26: Tiefenprofil der HCF in GelNB/GelS-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelNB/GelS *low*, (ii) GelNB/GelS *medium*, (iii) GelNB/GelS *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Neben den HCF sollten auch die HCM in das Herzmodell integriert werden, weshalb, analog zu den Versuchen der HCF, die gleichen Experimente mit den HCM durchgeführt wurden. Hierfür wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 200  $\mu\text{l}$  Hydrogel eingekapselt und chemisch vernetzt. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurden Leben-/Tot-Färbungen durchgeführt, um die Viabilität und Morphologie der HCM in den Hydrogelen zu visualisieren.

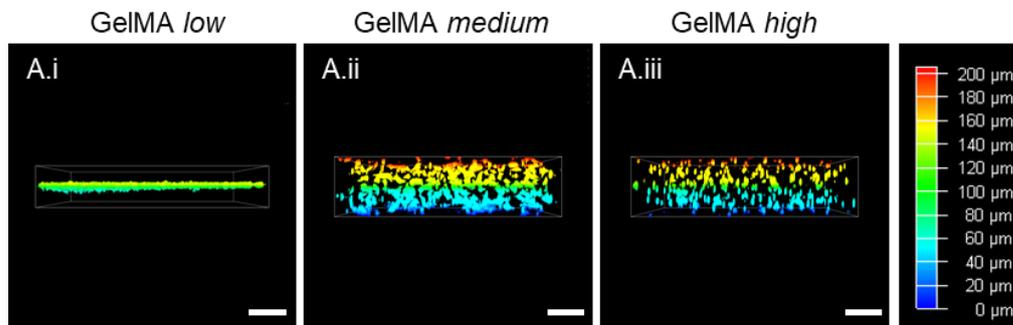
Wie bereits bei der Einkapselung der HCF in den GelMA-Hydrogelen wurde das GelMA *low* über den Zeitraum abgebaut, wodurch eine 3D-Kultivierung über 21 Tage nicht möglich war. An Tag 7 ist eine erneute adhärenente 2D-Zellschicht auf dem Boden des Wells erkennbar, was die hohen Viabilitäten an allen Tagen erklärt. Die Viabilität der HCM war höher im Vergleich mit der Viabilität der HCF (Abbildung 27). Eine Ausrichtung der Zellen im GelMA *medium* war ab Tag 7 visualisiert und beginnende Zell-Zell-Kontakte an den Tagen 14 und 21 zu erkennen. Auch im GelMA *high* war eine Elongation und Ausrichtung der Zellen detektierbar, jedoch war die zelluläre Netzwerkbildung geringer verglichen mit den Zellen im GelMA *medium*.

Die Quantifizierung der Lebend-/Tot-Färbungen erfolgte mit Hilfe der Software *ImageJ*. An Tag 1 sind im GelMA *low* und GelMA *high* ungefähr 65 % der Zellen viabel, was im Vergleich zu Tag 7 und 21, bei denen Viabilitäten von knapp 100 % erreicht wurden, gering ist. Möglicherweise haben der Vernetzungsvorgang und der Einsatz von 0,3 % LAP die Zellviabilität verringert. GelMA *high* zeigte an Tag 21 eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf ungefähr 40 %. Dies kann auf das dichte Netzwerk zurückzuführen sein. Je höher der Funktionalisierungsgrad ist, desto dichter ist das Netzwerk, welches durch das Hydrogel ausgebildet wird, da mehr funktionelle Gruppen zur Vernetzung zur Verfügung stehen. GelMA *medium* zeigte an allen Tagen hohe Viabilitäten von 90-100 %.



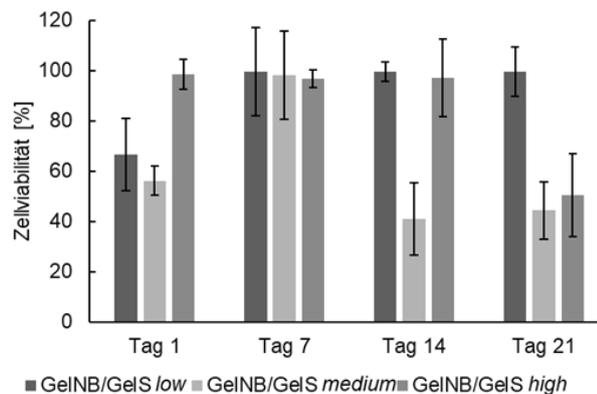
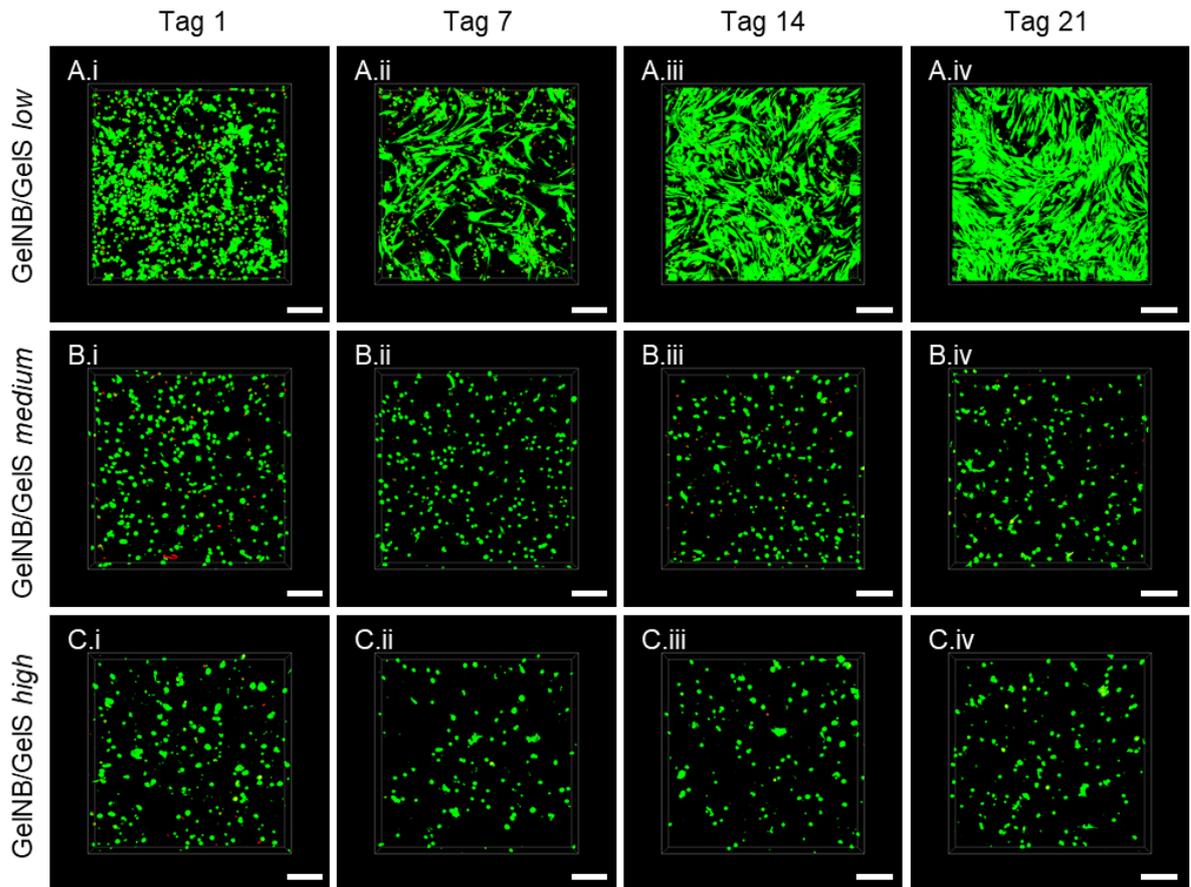
**Abbildung 27: Lebend-/Tot-Färbung von HCM im GelMA-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einem GelMA-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelMA-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *low*, (B) GelMA *medium*, (C) GelMA *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Mit der Aufnahme der Z-Stacks über eine Höhe von 200  $\mu\text{m}$  konnten anschließend Tiefenprofile erstellt werden, die in Abbildung 28 dargestellt sind. Es kann in GelMA *medium* und GelMA *high* eine homogene Verteilung über die verschiedenen Ebenen beobachtet werden, was auf eine Adhäsion der Zellen an die RGD-Domänen der Gelatine schließen lässt. Im GelMA *low* befinden sich die Zellen, aufgrund des abgebauten Hydrogels, in einer Ebene.



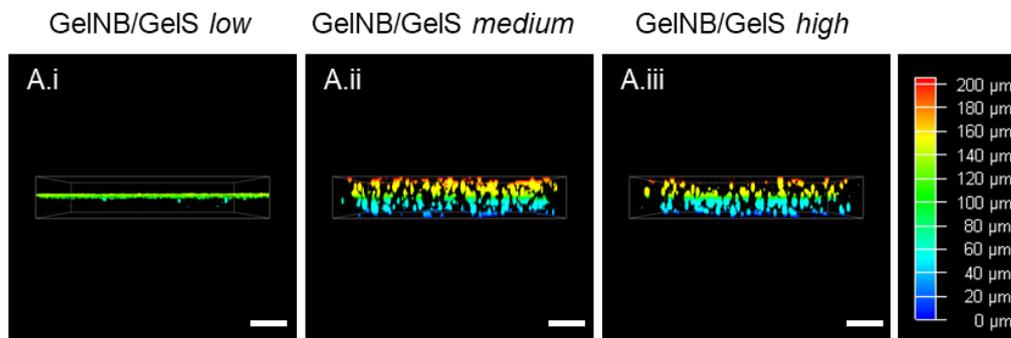
**Abbildung 28: Tiefenprofil der HCM in GelMA-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelMA *low*, (ii) GelMA *medium*, (iii) GelMA *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Ähnliche Ergebnisse konnten in den GeINB/GeIS-Hydrogelen erzielt werden. Das Ergebnis der Einbettung der HCM in den GeINB/GeIS-Hydrogelen ist in Abbildung 29 dargestellt. Ein Abbau des Hydrogels *low* erfolgte analog zu vorherigen Experimenten und eine 2D-Zellschicht der HCM war erkennbar. Es konnten Viabilitäten von 63 % an Tag 1 und knapp 100 % an Tag 7, 14 und 21 aufgrund des Abbaus des Hydrogels erzielt werden. Die Zellviabilität zeigte ähnliche Ergebnisse wie in den GelMA-Hydrogelen. Die Ausrichtung der Zellen war in den GeINB/GeIS-Hydrogelen jedoch geringer, wobei lediglich an Tag 21 im GeINB/GeIS *medium* eine leichte Ausrichtung und Elongation der HCM erkennbar war. An den anderen Tagen wurden in allen Hydrogelen runde, aber viable Zellen detektiert. An Tag 1 konnten im GeINB/GeIS *medium* eine Viabilität von 58 % erreicht werden. Die HCM zeigten im GeINB/GeIS *high* an Tag 1, 7 und 14 eine Viabilität von 100 %. Die Verringerung der Viabilität in dem GeINB/GeIS *medium* an Tag 1 kann auf den Vernetzungsprozess zurückzuführen sein. GeINB/GeIS *medium* zeigte an Tag 14 und Tag 21 und GeINB/GeIS *high* an Tag 21 eine deutliche Abnahme der Zellviabilität.



**Abbildung 29: Lebend-/Tot-Färbung von HCM im GeINB/GelS-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einem GeINB/GelS-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GeINB/GelS-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (15 s, 500  $mW/cm^2$ , Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GeINB/GelS *low*, (B) GeINB/GelS *medium*, (C) GeINB/GelS *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Die HCM, eingekapselt in den GeINB/GeIS-Hydrogelen, zeigten eine homogene Verteilung über eine Höhe von 200  $\mu\text{m}$ , was aus dem Tiefenprofil in Abbildung 30 ersichtlich wird. Mit Ausnahme des GeINB/GeIS *low*, da die Zellen auf dem Boden des Wells in einer Ebene angewachsen sind. Die Zellen im GeINB/GeIS *medium* und GeINB/GeIS *high* konnten an die RGD-Domänen der Gelatine binden und somit im Hydrogel adhärieren.



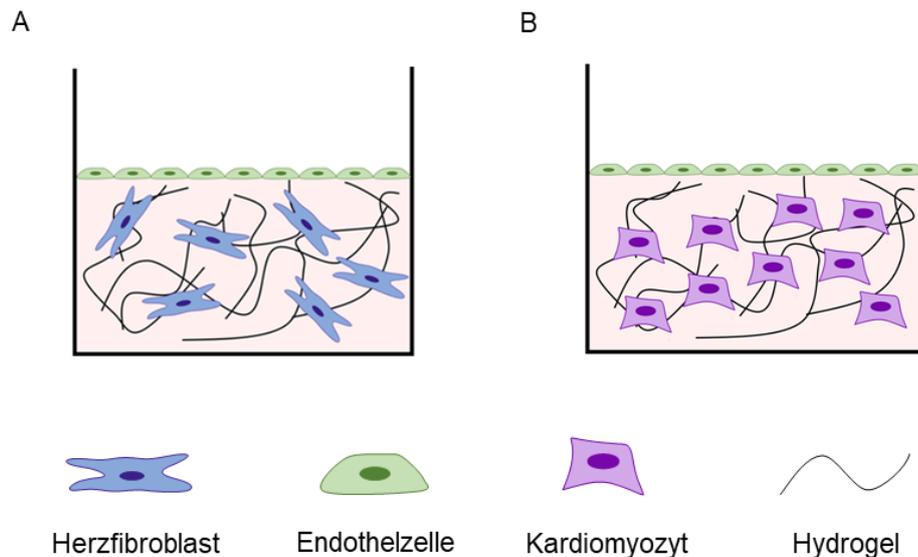
**Abbildung 30: Tiefenprofil der HCM in GeINB/GeIS-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GeINB/GeIS *low*, (ii) GeINB/GeIS *medium*, (iii) GeINB/GeIS *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 200  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit M. Sc. Alina Möltgen. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend konnten die herzspezifischen Zellen erfolgreich im GelMA- und GeINB/GeIS-Hydrogel kultiviert werden, was eine gewebetypische Nachbildung des Herzmuskels ermöglicht. Außerdem konnten hohe Viabilitäten der Zellen erzielt werden, was von einer hohen Biokompatibilität der gelatinebasierten Hydrogele zeugt. Des Weiteren waren die Zellen in allen Hydrogelen, mit Ausnahme der *low*-Hydrogele, die sich über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen abbauten, homogen verteilt. Kai *et al.* konnten bereits durch das Herstellen von Nanofasern durch Elektrosponnen aus den Materialien Melanin, Gelatine und Poly-L-Milchsäure-co- $\epsilon$ -caprolacton (PLCL) und dem anschließenden Aussäen von primären humanen Herzmuskelzellen eine hohe Zellviabilität erzielen.<sup>257</sup> Außerdem konnten Reynolds *et al.* erfolgreich primäre humane Herzmuskelzellen innerhalb eines Kollagen-Hydrogels einbetten und deren Zellausrichtung bei dynamischer uniaxialer Dehnung untersuchen.<sup>258</sup>

Im Herzmuskel interagieren die Zellen jedoch mit anderen Zelltypen in einem Zellverbund. Das menschliche Herz besteht aus 30 % Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten), 60 % Herzfibroblasten und 10 % anderen Zellarten wie Perizyten, Schrittmacherzellen und Endothelzellen, die das Endokard des Herzens bilden.<sup>259</sup> Das Myokard wird aus den Kardiomyozyten zusammen mit den Herzfibroblasten gebildet. Dies wird ummantelt durch das Endokard, welches aus Endothelzellen gebildet wird. Aus diesem Grund wurde im folgenden Kapitel 3.1.3.5 untersucht, wie die HCM und HCF sich jeweils in Kokultur mit den HUVEC, den Endothelzellen, verhalten.

### 3.1.3.5 Lebend-/Tot-Färbungen der Kokulturen

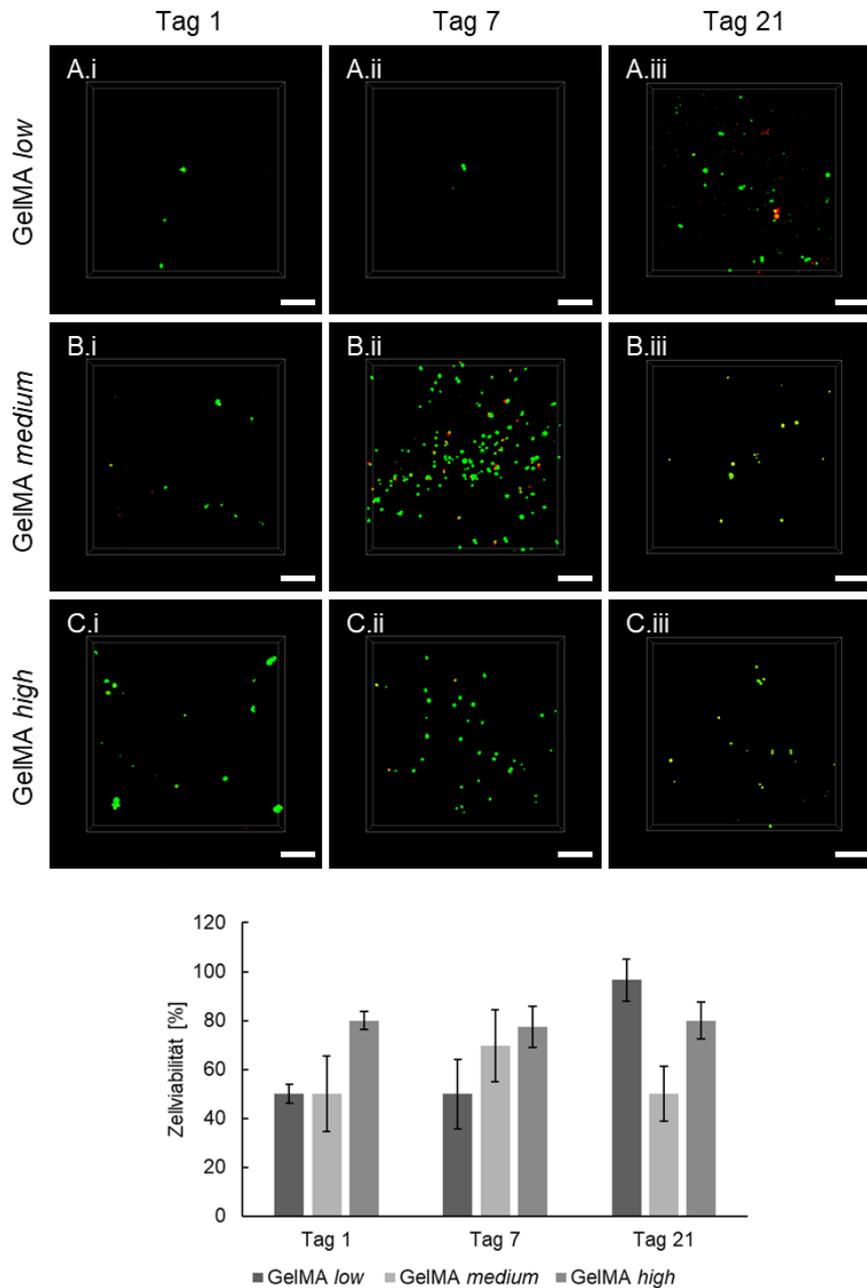
Die Kokultur für das humane Herzmodell wurde aus drei verschiedenen Zellarten aufgebaut. Dabei wurden die HCM und HCF in einem *in vivo* ähnlichen Verhältnis innerhalb des Hydrogels eingekapselt, um das Myokard nachzubilden. Zur Abbildung des Endokards wurden die HUVEC auf dem Hydrogel ausgesät, damit eine einzelne Zellschicht gebildet werden kann. Um den Einfluss der HUVEC jeweils auf die HCF und HCM zu untersuchen, wurden diese einzeln in den Hydrogelen eingebettet und die HUVEC anschließend auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. Eine schematische Darstellung der etablierten Kokulturen zum Aufbau der Herzmodelle sind in Abbildung 31 dargestellt.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der Kokultur von Endothelzellen und HCF oder HCM.** Die HCM oder HCF wurden in einer Zellkonzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in dem Hydrogel eingebettet. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml auf der Hydrogeloberfläche ausgesät. Somit konnte eine Kokultur mit einer Zellart innerhalb den Hydrogelen und den HUVEC als Zellschicht auf den Hydrogelen gebildet werden. (A) Kokultur HCF und HUVEC, (B) Kokultur HCM und HUVEC.

Zunächst wurde das Anwachsen und die Viabilität der HUVEC nach dem Aussäen auf die Hydrogeloberflächen untersucht. Hierfür wurden die Hydrogele zunächst ohne Zellen ausgehärtet und die HUVEC anschließend in einer Zelldichte von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. Um die Viabilität der HUVEC zu untersuchen, wurde an Tag 1, 7 und 21 eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog zu den Versuchen in Kapitel 3.1.3.4. Es wurde Calcein-AM zur Markierung der lebenden Zellen eingesetzt und PI zur Markierung der nekrotischen Zellen. Die Experimente wurden in Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll durchgeführt.<sup>260</sup> Dabei konnte beobachtet werden, dass nur wenige Zellen auf den GelMA-Hydrogelen adhären konnten (Abbildung 32). So konnten vereinzelte Zellen auf allen Hydrogelen detektiert werden, wobei keine zelluläre Netzwerkbildung stattfand. Ein Grund für die geringe Zellzahl war, dass nicht angewachsene Zellen bei einem Medienwechsel oder einem Waschvorgang mit abgenommen wurden, da diese nicht am Hydrogel über die RGD-Domäne verankern konnten.

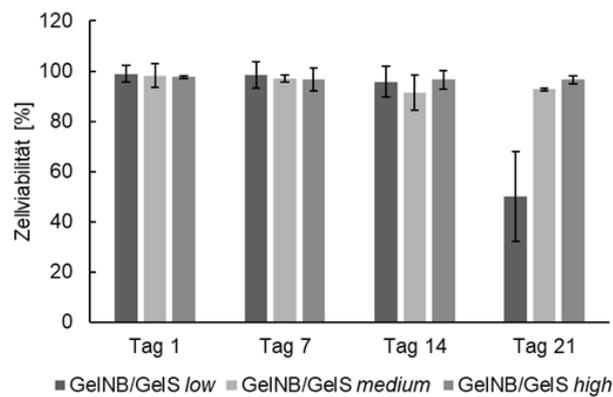
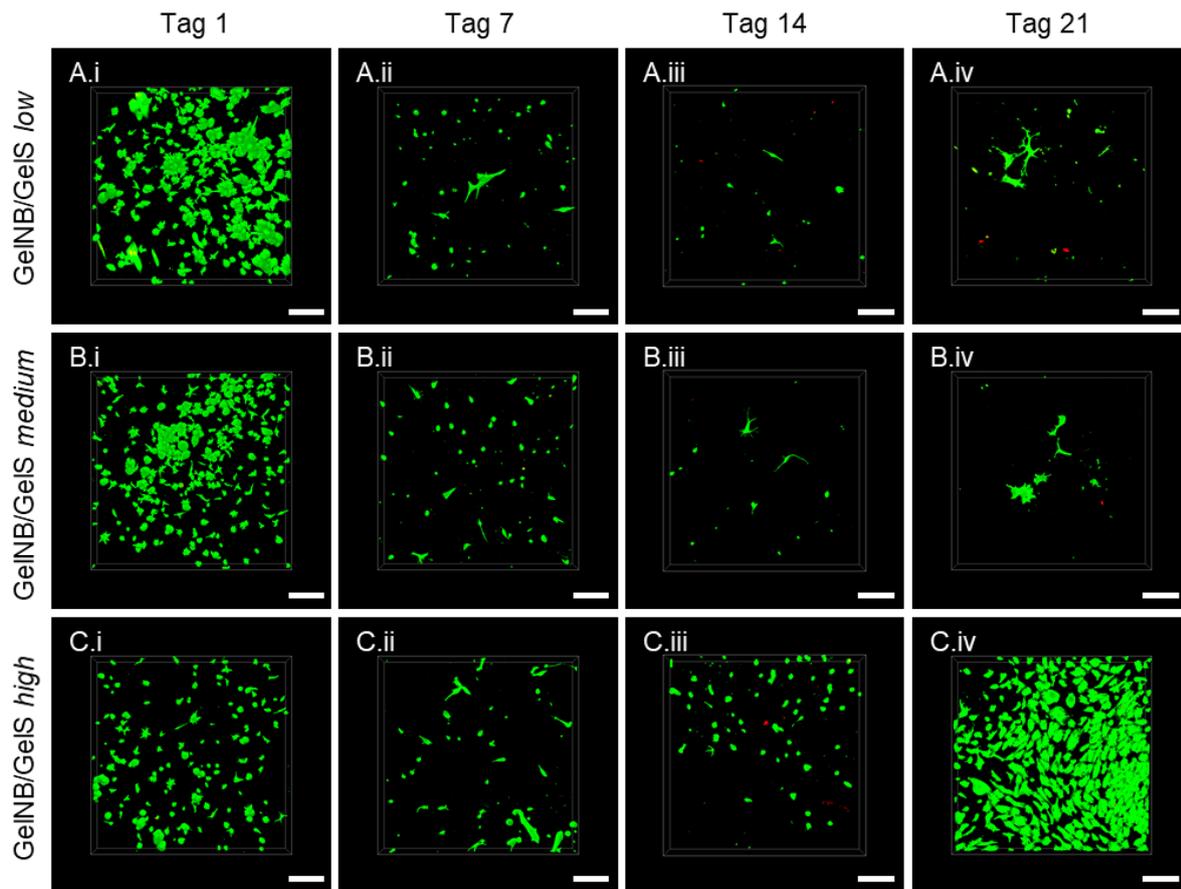
Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die Lebend-/Tot-Färbungen der HUVEC auf den GelMA-Oberflächen quantifiziert. Es konnten Viabilitäten von 50 % auf GelMA *low* und GelMA *medium* an Tag 1 erzielt werden. GelMA *high* zeigte eine Viabilität von 80 % an allen Tagen. GelMA *low* wies eine Zunahme der Zellviabilität bis Tag 21 von knapp 100 % auf.



**Abbildung 32: Lebend-/Tot-Färbung von HUVEC auf GelMA-Hydrogelen mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf einem GelMA-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l ausgesät. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelMA-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7 und 21 wurde jeweils eine Lebend-Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$  = 488 nm,  $\lambda_{em}$  = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$  = 532 nm,  $\lambda_{em}$  = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe=200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *low*, (B) GelMA *medium*, (C) GelMA *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebenden Zellen bestimmt. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Das Aussäen der HUVEC auf den GelNB/GelS-Hydrogelen zeigte eine höhere Rate in Bezug auf das Anwachsen der Zellen auf den Hydrogeloberflächen (Abbildung 33). An Tag 1 waren in allen drei Hydrogelen mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden Zellen auf der Oberfläche angewachsen. Außerdem konnte eine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auf dem GelNB/GelS *low* und *medium* beobachtet werden. An Tag 7 und 14 nahm die Zellzahl, die sich auf den Hydrogeloberflächen befanden, ab. Die Zellen, die nicht an der Oberfläche der Hydrogele adhärten, wurden mit einem Medienwechsel entfernt. GelNB/GelS *high* zeigte an Tag 21 eine hohe Ansammlung an angewachsenen HUVEC auf der Oberfläche. Zudem konnte eine zelluläre Netzwerkbildung erkannt werden.

Auf allen Hydrogeloberflächen konnte, mit Ausnahme von GelNB/GelS *low* an Tag 21, eine Viabilität von ungefähr 100 % erzielt werden. Hier wurde lediglich eine Zellviabilität von 50 % erreicht. Durch die Waschschrte und Medienwechsel können nekrotische Zellen, die nicht adhärten, abgenommen werden, weshalb sich wenige nekrotische Zellen auf den Hydrogeloberflächen befanden. Verglichen mit den GelMA-Hydrogelen zeigten die Zellen auf den GelNB/GelS-Hydrogelen eine höhere Viabilität und zudem zelluläre Ausläufer der HUVEC.

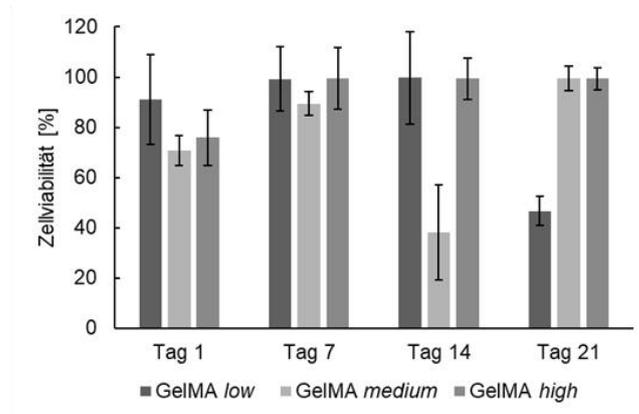
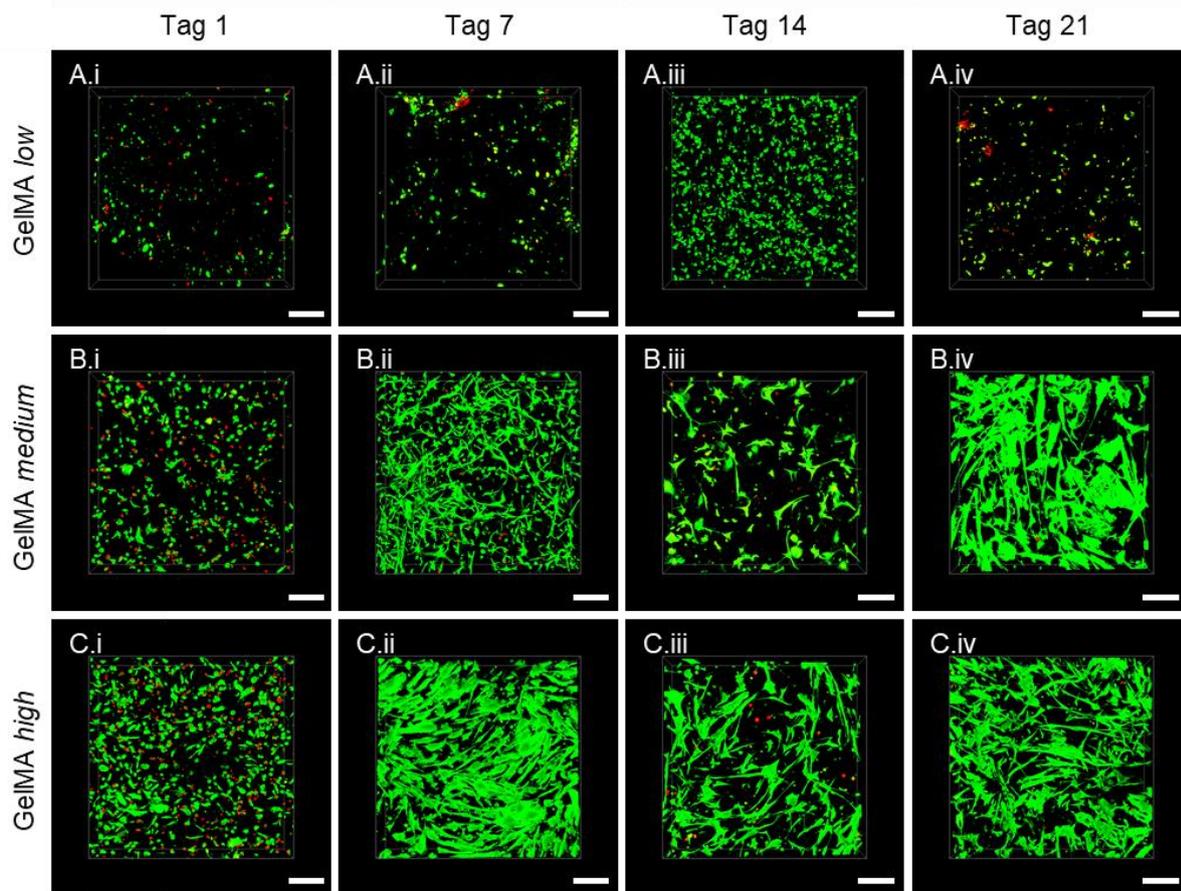


**Abbildung 33: Lebend-/Tot-Färbung von HUVEC auf GeINB/GelS-Hydrogelen mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf einem GeINB/GelS-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l ausgesät. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GeINB/GelS-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (15 s, 500  $mW/cm^2$ , Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe=200  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GeINB/GelS *low*, (B) GeINB/GelS *medium*, (C) GeINB/GelS *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Um den Einfluss einer Zellschicht aus HUVEC auf die eingekapselten Zellen im Hydrogel zu untersuchen, wurde eine Kokultur aus den HCF und den HUVEC sowie den HCM und den HUVEC erstellt. Hierzu wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml der HCF oder HCM innerhalb der Hydrogele eingekapselt und anschließend mit UV-Licht chemisch vernetzt. Daraufhin wurden die HUVEC in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde analog zu den Experimenten in Kapitel 3.1.3.4 eine Lebend-/Tot-Färbung durchgeführt.

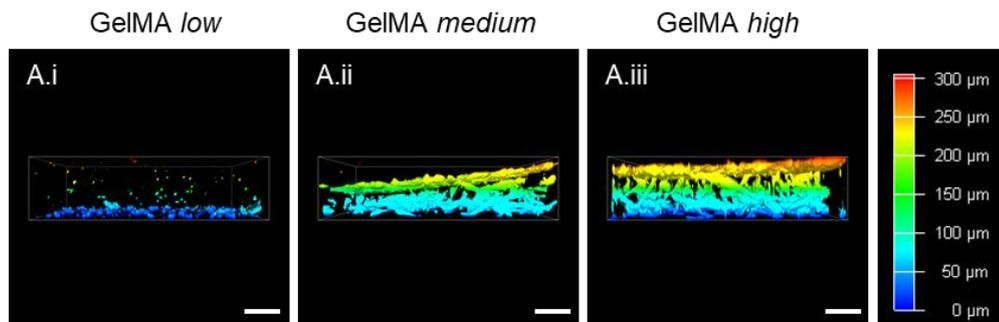
Durch die Kokultivierung konnte in den GelMA-Hydrogelen eine deutliche Erhöhung der Viabilität sowie der Ausrichtung der Zellen beobachtet werden (Abbildung 34). In GelMA *low* wurde ein Anwachsen der Zellen beobachtet, jedoch wurde keine Ausrichtung detektiert. Das GelMA *low* wurde jedoch nicht abgebaut, was durch das Tiefenprofil in Abbildung 35A.i bestätigt wird. An Tag 1 ließ sich auf den *medium*- und *high*-Hydrogelen ebenfalls ein Anwachsen der HUVEC beobachten. Außerdem waren ab Tag 7 Zell-Zell-Kontakte der HUVEC auf den Hydrogeloberflächen zu erkennen, die ein *Zelllayer* bildeten. Zudem zeigten auch die HCF verknüpfte zelluläre Netzwerke. Im Vergleich zur Kultivierung der HCF ohne die HUVEC in den GelMA-Hydrogelen konnte hier eine deutliche Ausrichtung der Zellen beobachtet werden. Durch die Nutzung des EGM-2 als Medium kann die Zellausrichtung und -migration durch darin vorhandene Wachstumsfaktoren erhöht worden sein. Zudem kann die Zell-Zell-Kommunikation zwischen den HUVEC und den HCF zu einer verbesserten Zellausrichtung geführt haben.

Mit Hilfe von *ImageJ* wurde die Lebend-/Tot-Färbung der HCF in Kokultur mit HUVEC quantifiziert. Im GelMA *low* wurden bis auf Tag 21, wobei nur eine Zellviabilität von 44 % detektiert werden konnte, hohe Viabilitäten von knapp 100 % erzielt. GelMA *medium* zeigte ebenfalls hohe Viabilitäten, mit Ausnahme von Tag 14. GelMA *high* wies an allen Tagen eine hohe Zellviabilität von meist 100 % beider Zelltypen auf.



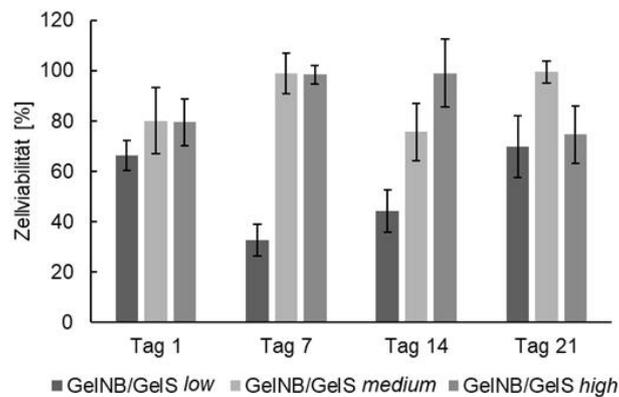
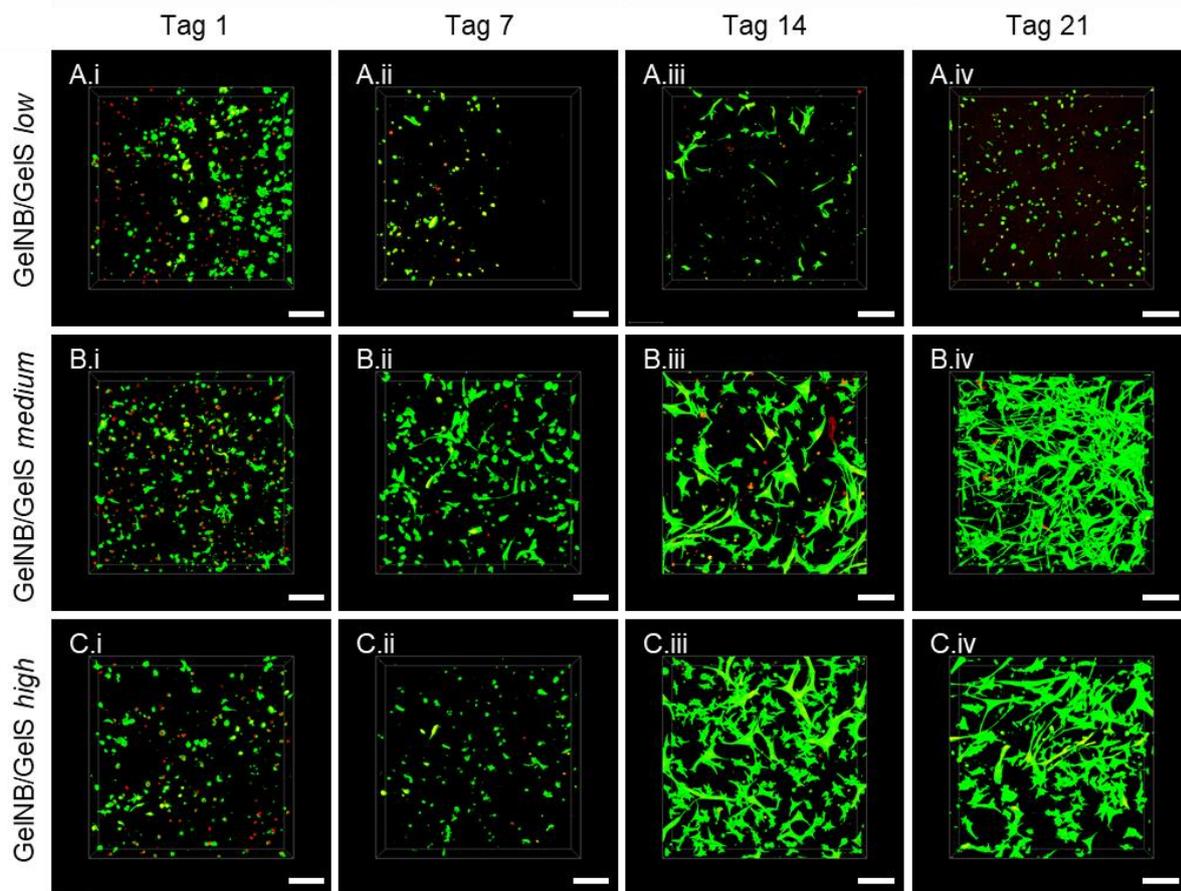
**Abbildung 34: Lebend-/Tot-Färbung von HCF in Kokultur mit HUVEC im GelMA-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCF/ml in einem GelMA-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelMA-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml in 200  $\mu$ l EGM-2 auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *low*, (B) GelMA *medium*, (C) GelMA *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

In Abbildung 35 ist das Tiefenprofil der Kokultur der HCF mit den HUVEC abgebildet. Hierbei konnte über eine Höhe von 300  $\mu\text{m}$  eine homogene Verteilung der Zellen in allen Ebenen und in allen Hydrogelen beobachtet werden. Außerdem wird die Zellschicht der HUVEC auf den Hydrogeloberflächen der GelMA *medium*- und GelMA *high*-Hydrogele deutlich, da diese eine einheitliche Schicht in einer Ebene zeigten, welche zur nächsten Zellschicht abgegrenzt war.



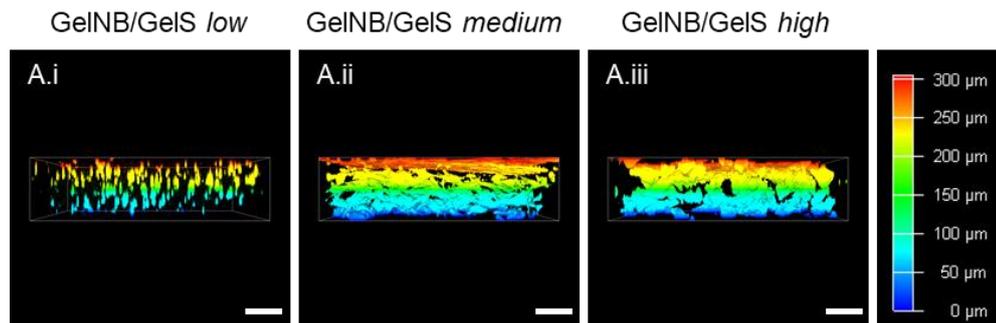
**Abbildung 35: Tiefenprofil der HCF in Kokultur mit HUVEC in GelMA-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelMA *low*, (ii) GelMA *medium*, (iii) GelMA *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Bereits im GelMA-Hydrogel konnte eine hohe Viabilität von knapp 100 % der HCF in Kokultur mit dem HUVEC nach 21 Tagen nachgewiesen werden. Analog wurde das Experiment mit den Hydrogelen GelNB/GelS *low*, *medium* und *high* durchgeführt (Abbildung 36). Es zeigte sich, dass sich das GelNB/GelS *low* über den Zeitraum von 21 Tagen nicht abbaute und eine Kultivierung der Kokultur über diesen Zeitraum möglich war. Jedoch ließen sich keine zellulären Ausrichtungen feststellen, lediglich die HUVEC auf der Hydrogeloberfläche zeigten einzelne ausgerichtete Zellen. Im GelNB/GelS *medium* und GelNB/GelS *high* konnten ähnliche Verhaltensweisen der Zellen wie im GelMA-Hydrogel beobachtet werden. Bereits an Tag 1 waren die HUVEC auf den Hydrogeloberflächen angewachsen und zeigten Ausrichtungen. Der Anteil an nekrotischen Zellen ist an Tag 1 mit einer Zellviabilität von 60-80 % am höchsten und nimmt über den restlichen Kultivierungszeitraum ab. Da nekrotische Zellen innerhalb des Hydrogels nicht adhären, können diese Zellen aus dem Hydrogel diffundieren und mit einem Medienwechsel abgenommen werden. An Tag 7 waren bereits Ausrichtungen der HCF innerhalb der Hydrogele zu erkennen. Dies wird bis Tag 21 immer verstärkt und es waren deutliche Zell-Zell-Kontakte zwischen den Zellen zu erkennen. Mit Hilfe der *ImageJ* Software wurden die Viabilitäten der Lebend-/Tot-Färbungen quantifiziert. So konnten für GelNB/GelS *low* die niedrigsten Viabilitäten erzielt werden, was bereits durch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen ersichtlich wurde. Die Überlebensrate an Tag 1 und Tag 21 lag bei über 60 %, wobei an Tag 7 und Tag 14 Viabilitäten von unter 50 % ermittelt werden konnten. GelNB/GelS *medium* und GelNB/GelS *high* zeigten konstant eine hohe Zellviabilität. Hierfür konnten für den gesamten Zeitraum Viabilitäten von nahezu über 80 % verzeichnet werden.



**Abbildung 36: Lebend-/Tot-Färbung von HCF in Kokultur mit HUVEC im GeINB/GeIS-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCF/ml in einem GeINB/GeIS-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GeINB/GeIS-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (15 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml in 200  $\mu$ l EGM-2 auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GeINB/GeIS *low*, (B) GeINB/GeIS *medium*, (C) GeINB/GeIS *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Durch die Tiefenprofile, welche in Abbildung 37 dargestellt sind, konnte die Verteilung der Zellen innerhalb der Hydrogele über eine Höhe von 300  $\mu\text{m}$  untersucht werden. Hierbei sind die Seitenansichten dargestellt. Das Tiefenprofil zeigt, dass das GelNB/GelS *low* nach einem Kultivierungszeitraum von 21 Tagen noch vollständig vorhanden war. Das Vorhandensein der Zellen in allen Ebenen konnte hiermit bestätigt werden. Durch die Seitenansicht der Tiefenprofile der GelNB/GelS *medium* und GelNB/GelS *high* konnte außerdem darauf geschlossen werden, dass die HUVEC auf der Hydrogeloberfläche einen einheitlichen *Zelllayer* ausgebildet haben. Eine Abgrenzung der beiden Zellschichten, den HCF innerhalb des Hydrogels und der HUVEC auf der Hydrogeloberfläche, konnte deutlich erkannt werden.

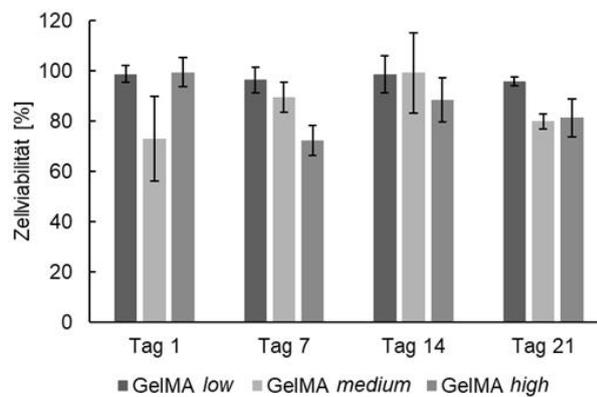
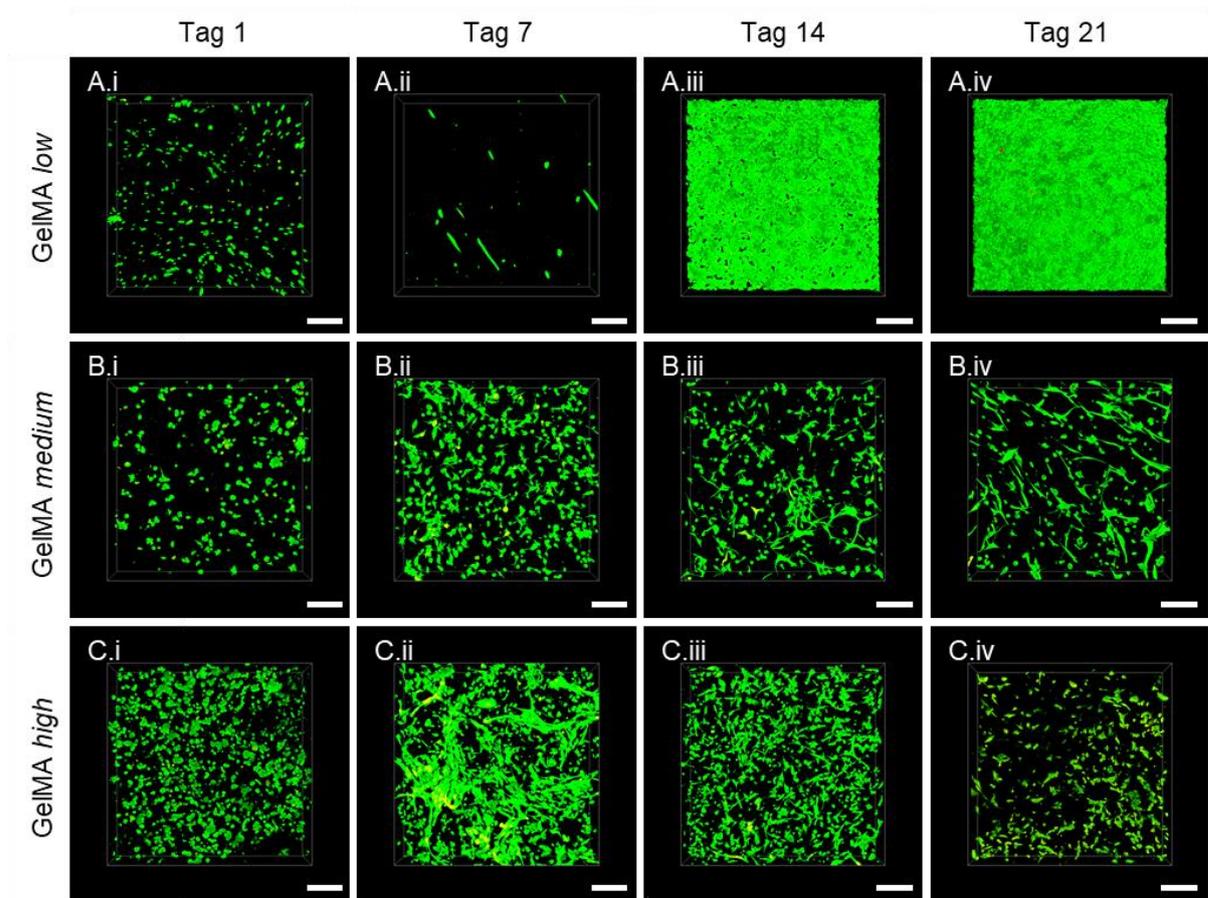


**Abbildung 37: Tiefenprofil der HCF in Kokultur mit HUVEC in GelNB/GelS-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelNB/GelS *low*, (ii) GelNB/GelS *medium*, (iii) GelNB/GelS *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt konnte anhand der Kokultivierung der HCF mit den HUVEC und der Wahl von EGM-2 als Kultivierungsmedium eine erhöhte Zellviabilität innerhalb der Hydrogele verglichen mit der Einzelkultivierung der HCF in denselben Hydrogelen festgestellt werden. Dies kann einerseits auf das geänderte Kultivierungsmedium zurückzuführen sein, andererseits kann auch die Kokultivierung dafür verantwortlich sein. Die HUVEC und die HCF kommunizieren zellulär über Signalstoffe in nativem Gewebe. Außerdem sekretieren HCF Faktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *platelet derived growth factor* (PDGF), die angiogene Faktoren sind und die Proliferation und zelluläre Netzwerkbildung der HUVEC fördern können.<sup>261,262</sup> Als Angiogenese wird die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen beschrieben.<sup>263</sup> In dem eingesetzten Medium EGM-2 sind verglichen mit dem für HCF-spezifischen Kultivierungsmedium FGM-3 mehr Wachstumsfaktoren enthalten, die die Zellausrichtung der HCF fördern.<sup>264</sup> Bereits Twardowski *et al.* konnten zeigen, dass kardiale Fibroblasten in Kokultur mit Endothelzellen die zelluläre Netzwerkbildung und Elongation von Endothelzellen in einem Fibrin-Hydrogel fördern können.<sup>265</sup>

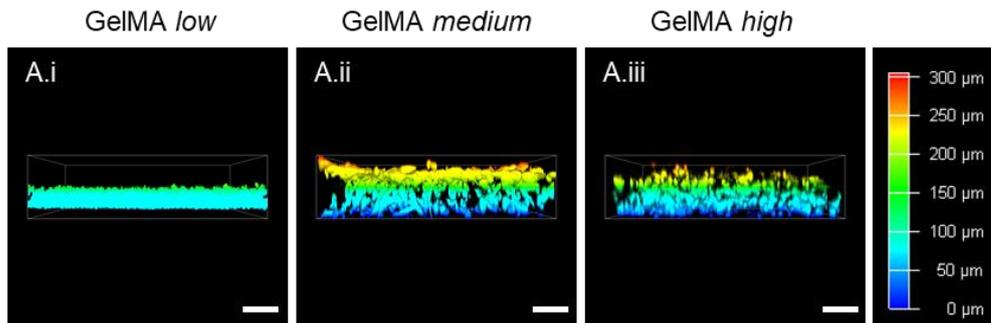
Die zweite Zellart, die HCM, wurden ebenfalls mit den HUVEC in Kokultur in den Hydrogelen eingebettet. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zum Aufbau der Kokultur der HCF mit den HUVEC. Zunächst wurde das GelMA-Hydrogel mit dem Einsatz der drei unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden *low*, *medium* und *high* untersucht. Die Ergebnisse der Lebend-/Tot-Färbungen sind in Abbildung 38 dargestellt. In allen eingesetzten Hydrogelen konnten hohe Viabilitäten von 80-100 % beider Zellarten nach 21 Tagen erzielt werden. Das GelMA *low* hatte sich an Tag 14 vollständig abgebaut, weshalb eine lebende 2D-Zellschicht an Tag 14 und

Tag 21 detektiert werden konnte. An Tag 1 konnte eine hohe Viabilität von knapp 100 % im GelMA *low* ermittelt werden, jedoch keine zellulären Ausläufer. An Tag 7 war der Abbau des Hydrogels bereits so weit fortgeschritten, dass nur erschwert konfokalmikroskopische Aufnahmen gemacht werden konnten, da das Hydrogel und die darin befindlichen Zellen nicht statisch waren. GelMA *medium* und GelMA *high* zeigten erneut ähnliche Ergebnisse. In beiden Hydrogelen war eine Kultivierung beider Zellarten über einen Zeitraum von 21 Tagen möglich und damit einher gingen überwiegend hohe Zellviabilitäten von über 80 %. Eine Ausnahme stellt GelMA *medium* an Tag 1 dar. Jedoch ist hierbei auch die Zellzahl geringer, verglichen mit den restlichen Aufnahmen. Vermutlich sind hierbei Fehler während des Herstellungsvorganges unterlaufen, weshalb die Zellviabilität an Tag 1 beeinträchtigt wurde. Während des Vernetzungsprozess sind die Zellen zudem den Radikalen des Photoinitiators ausgesetzt, was die Zellviabilität verringern kann. Jedoch regenerierten die Zellen schnell und erreichten an Tag 7 bereits eine Zellviabilität von über 90 %. Bereits an Tag 7 zeigten die angewachsenen HUVEC auf der Oberfläche einzelne Zell-Zell-Kontakte und ab Tag 14 konnten zelluläre Ausläufer der HCM, die innerhalb des Hydrogels eingekapselt wurden, erkannt werden.



**Abbildung 38: Lebend-/Tot-Färbung von HCM in Kokultur mit HUVEC im GelMA-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCM/ml in einem GelMA-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GelMA-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml in 200  $\mu$ l EGM-2 auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500-580$  nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 610-700$  nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *low*, (B) GelMA *medium*, (C) GelMA *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

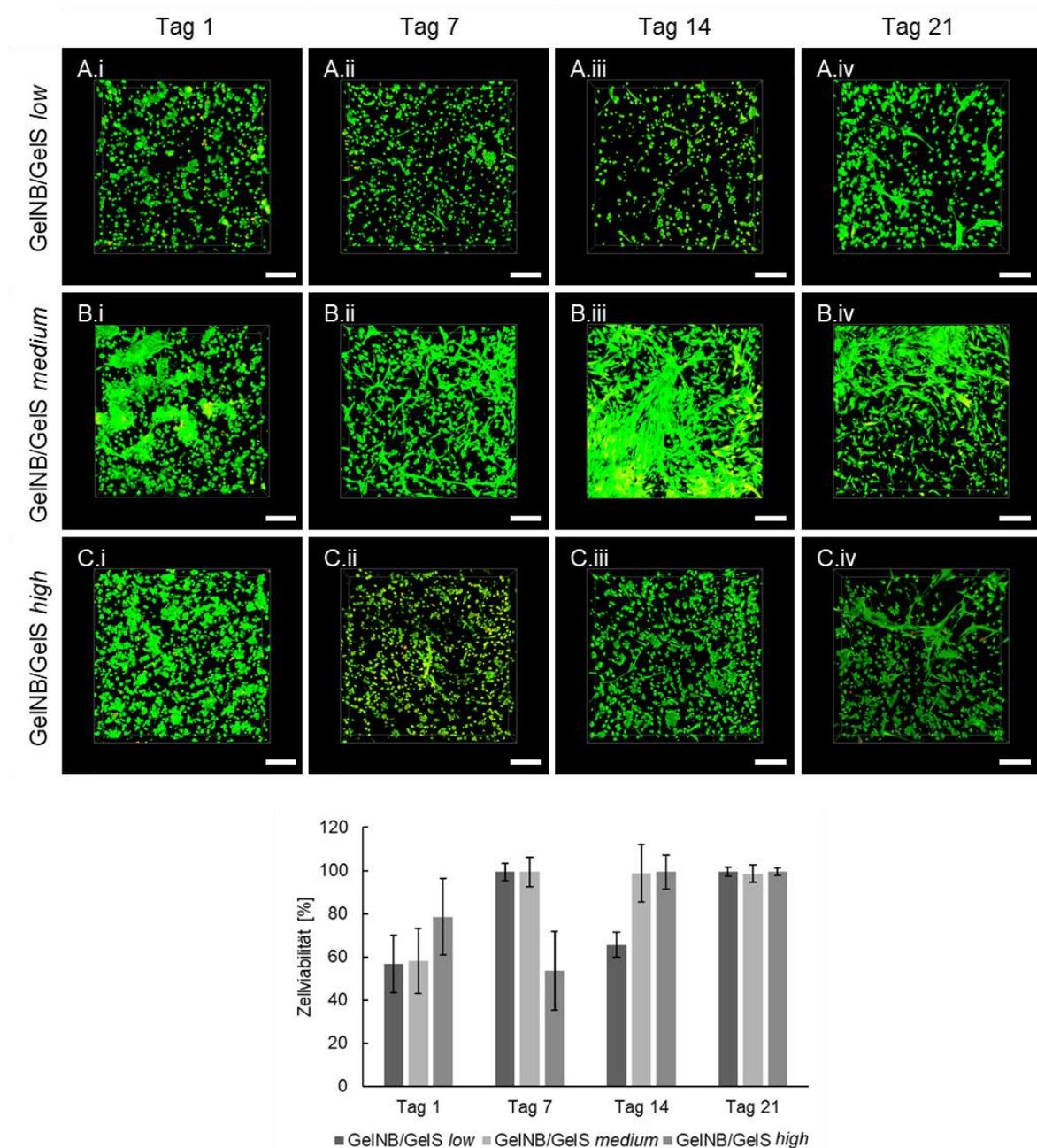
Durch die Tiefenprofile in Abbildung 39 konnte die einheitliche Verteilung der HCM innerhalb der Hydrogele über eine Höhe von 300  $\mu\text{m}$  bestätigt werden. Außerdem konnte der Abbau des GelMA *low* verifiziert werden, da ein einziger *Zelllayer* in einer Ebene aufgezeigt wurde. Im GelMA *medium* konnte deutlich die HUVEC-Schicht auf dem Hydrogel erkannt werden. Diese zeigten eine gute Abgrenzung zu den HCM, welche eingekapselt innerhalb des Hydrogels vorlagen. Dennoch zeigten die Zellarten eine zelluläre Interaktion zueinander. Im GelMA *high* war es schwierig zu beurteilen, ob die HUVEC auf der Oberfläche angewachsen sind oder mittlerweile in das Hydrogel hineingewachsen sind. Dennoch war eine homogene Verteilung der Zellen über 300  $\mu\text{m}$  innerhalb des Hydrogels erkennbar.



**Abbildung 39: Tiefenprofil der HCM in Kokultur mit HUVEC in GelMA-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GelMA *low*, (ii) GelMA *medium*, (iii) GelMA *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

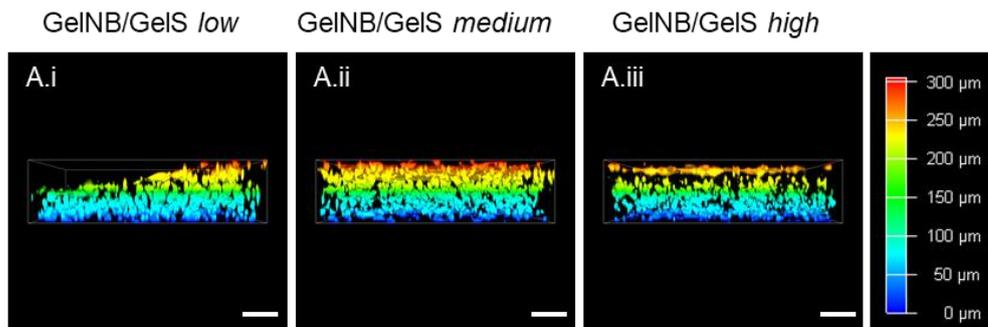
Im nächsten Schritt wurde das identische Experiment im GelNB/GelS-Hydrogel durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 40 dargestellt sind. Die HCM wurden innerhalb des Hydrogels eingebettet und anschließend die HUVEC auf das jeweilige Hydrogel ausgesät. Verglichen mit zuvor durchgeführten Experimenten wurde das GelNB/GelS *low* über den Zeitraum von 21 Tagen nicht abgebaut und eine Kultivierung der beiden Zellarten in und auf diesem Hydrogel war möglich. Dies kann auf den Wechsel des Mediums zurückzuführen sein. Das eingesetzte EGM-2 enthält verglichen mit dem HCM-spezifischen Medium MGM weniger fetales Kälberserum (*engl. fetal calf serum, FCS*), weshalb weniger Proteasen vorlagen, die das Hydrogel abbauen konnten. Jedoch konnten auch die Wechselwirkungen der Zellen das Hydrogel stabilisieren, weshalb nur ein Teilabbau des Hydrogels stattfand. Es konnte in allen Hydrogelen eine hohe Zellviabilität von knapp 100 % nach 21 Tagen detektiert werden. An Tag 1 zeigten GelNB/GelS *low* und GelNB/GelS *medium* eine geringere Viabilität von unter 60 %. Dies kann auf den zellulären Stress während des Vernetzungsprozesses des Hydrogels zurückzuführen sein. Im *low*-Hydrogel waren nur an Tag 21 zelluläre Ausläufer zu erkennen. Diese zellulären Ausläufer wurden außerdem von den HUVEC, die auf der Hydrogeloberfläche angewachsen sind, verzeichnet. An Tag 7 konnten vereinzelt angewachsene HUVEC auf der GelNB/GelS *low* Oberfläche beobachtet werden. Im GelNB/GelS *medium* konnte bereits an Tag 1 eine Ausrichtung der HUVEC Zellen auf der Oberfläche des Hydrogels verzeichnet werden. An Tag 1 bestand dies hauptsächlich aus einzelnen HUVEC-Ansammlungen, wobei über den Kultivierungszeitraum von 21 Tagen ein großflächiges zelluläres Netzwerk aus HUVEC auf der Hydrogeloberfläche beobachtet werden konnte. Außerdem zeigten die HCM ebenfalls zelluläre Ausläufer, die an Tag 7 begannen und sich bis Tag 21 intensivierten. Auf

dem GeINB/GelS *high* konnte ebenfalls ein Anwachsen der HUVEC beobachtet werden. An Tag 21 konnte eine deutliche Elongation der Endothelzellen detektiert werden. Auch die HCM, die innerhalb des Hydrogels eingebettet waren, zeigten zelluläre Ausrichtungen, jedoch bildeten sie keine Zell-Zell-Kontakte.



**Abbildung 40: Lebend-/Tot-Färbung von HCM in Kokultur mit HUVEC im GeINB/GelS-Hydrogel mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCM/ml in einem GeINB/GelS-Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*low*, *medium*, *high*) der GeINB/GelS-Hydrogele verwendet. Durch Zugabe von 0,03 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (15 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml in 200  $\mu$ l EGM-2 auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 488 nm,  $\lambda_{em}$ = 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ = 532 nm,  $\lambda_{em}$ = 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GeINB/GelS *low*, (B) GeINB/GelS *medium*, (C) GeINB/GelS *high*. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14, (iv) Tag 21. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Durch das Tiefenprofil in Abbildung 41 wurde sichtbar, dass in allen Hydrogelen eine homogene Verteilung der Zellen in einer Höhe von 300  $\mu\text{m}$  vorlag. Außerdem konnten die Abgrenzungen der beiden Zellschichten im GeINB/GeIS *medium* und *high* erkannt werden. Im GeINB/GeIS *medium* waren die Zellschichten weniger gut sichtbar, da die HUVEC ein sehr dichtes Netzwerk ausgebildet hatten und möglicherweise bereits einige der HUVEC in das Hydrogel gewachsen waren. Die Grenze der beiden Zellschichten im GeINB/GeIS *high* war deutlich erkennbar.



**Abbildung 41: Tiefenprofil der HCM in Kokultur mit HUVEC in GeINB/GeIS-Hydrogelen nach 21 Tagen.** (i) GeINB/GeIS *low*, (ii) GeINB/GeIS *medium*, (iii) GeINB/GeIS *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit B. Sc. Clara Hüll. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

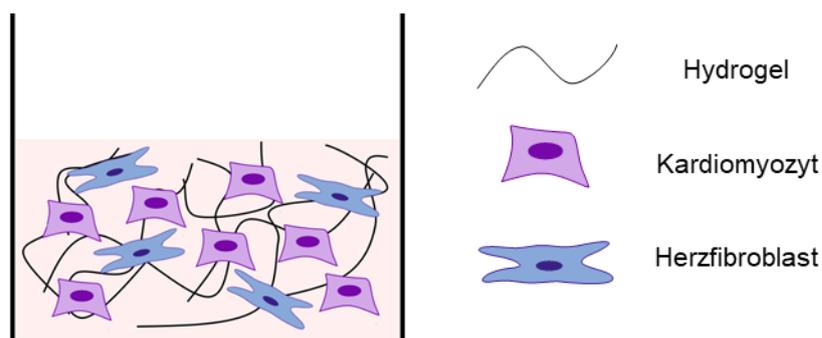
Die Kokultur von HCM und HUVEC erhöhte die Zellviabilität und führte außerdem zu Zell-Zell-Kontakten. Die Kultivierung der HCM ohne die zweite Zellart zeigte kaum zelluläre Netzwerkbildungen und niedrigere Zellviabilitäten. Dies kann auf die Kultivierung in EGM-2 zurückzuführen sein. In dem endothelzellspezifischen Medium EGM-2 sind, verglichen mit dem HCM-spezifischen Medium MGM, mehr Wachstumsfaktoren und kleine Signalstoffe enthalten, welches die Bildung von Zell-Zell-Kontakten der HCM erhöhen kann.<sup>264,266</sup> Außerdem kann die Kokultivierung der beiden Zellarten die Proliferation und Elongation durch Sekretion von Wachstumsfaktoren fördern. Durch die Kokultivierung von Kardiomyozytschichten aus einer Ratte mit Endothelzellen konnten Sekine *et al.* bereits zeigen, dass eine verbesserte Ausrichtung der Endothelzellen erzielt werden konnte und, dass durch die Kokultivierung eine erhöhte Sekretion von Wachstumsfaktoren gemessen werden konnte.<sup>267</sup>

Anhand der Ergebnisse der Lebend-/Tot-Färbungen der Kokultur von HCF mit den HUVEC und HCM mit den HUVEC konnten verbesserte Eigenschaften festgestellt werden. Verglichen mit den Lebend-/Tot-Färbungen der einzelnen Zellarten in den Hydrogelen konnten höhere Zellviabilitäten und Zell-Zell-Kontakte erzielt werden. Außerdem war ein Anwachsen der Endothelzellen auf den Hydrogeloberflächen in der Kokultur möglich. Somit zeigten die Kokulturen der Zellen einen gegenseitigen positiven Einfluss. Diese Erkenntnisse wurden in den folgenden Kapiteln zum Aufbau eines humanen Herzmodells gewinnbringend eingesetzt.

### 3.1.3.6 Aufbau einer Kokultur von Herzmuskelzellen und Herzfibroblasten

Im vorherigen Kapitel 3.1.3.5 wurde bereits die Kokultur untersucht, in dem eine Zellart (HCM oder HCF) innerhalb des Hydrogels eingebettet wurde und die Endothelzellen (HUVEC) als einzelne Zellschicht auf die Hydrogeloberflächen ausgesät wurden. Dies zeigte eine deutliche Verbesserung der Zellausrichtungen und der Gewebekonstruktion verglichen mit der Kultivierung der HCM oder HCF ohne die zusätzliche Zellschicht der HUVEC.

Um die beiden Zellarten, HCM und HCF, zu vereinen, um das native Myokard besser rekonstruieren zu können, wurden die beiden Zellarten gemeinsam in das Hydrogel eingebettet und kokultiviert. In der Literatur wird beschrieben, dass das menschliche Herz aus 30 % Kardiomyozyten und 70 % Nicht-Myozyten besteht, weshalb dieses Verhältnis für die Kokultur der HCF und HCM gewählt wurde.<sup>268,269</sup> Die schematische Darstellung der Kokultur von HCF und HCM ist in Abbildung 42 aufgezeigt. Hierfür wurden die Zellen enzymatisch abgelöst, gezählt und in einem Verhältnis von HCF:HCM 7:3 sowie einer Gesamtzellkonzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in den Hydrogelen eingebettet. Da sich die *medium*-Hydrogele in Kapitel 3.1.3.4 und 3.1.3.5 als vielversprechend herausgestellt hatten, wurden lediglich GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* eingesetzt. Die Kokultur wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert und alle 2-3 Tage ein Medienwechsel durchgeführt. Die Morphologie der Zellen wurden mikroskopisch verfolgt. Nach 30 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit sarkomerischem  $\alpha$ -Aktinin (Anti- $\alpha$ -Aktinin (*sarcomeric*) aus der Maus) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Markierung des  $\alpha$ -Aktinin mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 568 Ziege anti-Maus.  $\alpha$ -Aktinin ist ein 100 kDa großes Protein, welches an der Vernetzung der Aktinfilamente beteiligt ist. Es ist an den Z-Scheiben der Sarkomere wiederzufinden und ist außerdem an der Kraftübertragung zwischen den Myofibrillen beteiligt.<sup>270-272</sup>  $\alpha$ -Aktinin diente zur Markierung der HCM.

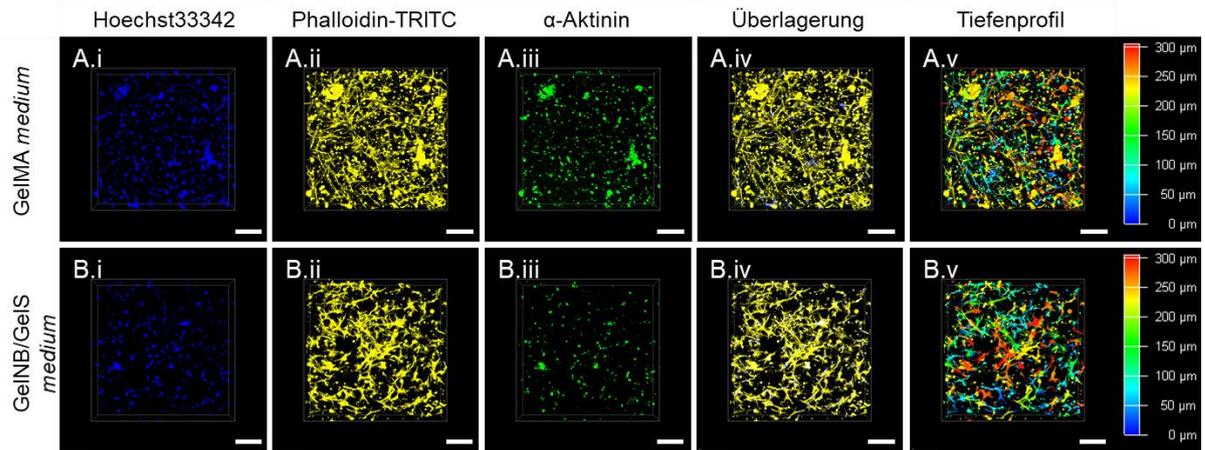


**Abbildung 42: Schematische Darstellung der Kokultur von HCM und HCF.** HCM und HCF wurden in einem Verhältnis von 7:3 HCF:HCM in der Hydrogel-Vorläuferlösung resuspendiert und anschließend mit UV-Licht vernetzt. Hierdurch wurde eine Kokultur aus HCM und HCF ausgebildet.

Zur Visualisierung der Zellkerne wurden diese zusätzlich mit Hoechst33342 gefärbt. Außerdem wurde das Aktinzytoskelett der Zellen mit Phalloidin-TRITC markiert, damit eine Unterscheidung zwischen den HCM und den HCF möglich war. Das  $\alpha$ -Aktinin bindet ausschließlich die HCM, während Phalloidin-TRITC alle Aktinfilamente, unabhängig von der Zellart, markiert. Die Visualisierung der Markierungen erfolgte durch inverse Konfokalmikroskopie. Durch den Vergleich der Antikörpermarkierung und der

Phalloidin-TRITC-Färbung konnte somit zwischen HCM und HCF unterschieden werden. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 43 dargestellt. Es konnte zunächst eine homogene Verteilung der Zellen über einen Zeitraum von 30 Tagen durch das Tiefenprofil gezeigt werden. Über eine Höhe von 300  $\mu\text{m}$  waren in jeder Ebene Zellen vorzufinden, die an den RGD-Sequenzen der Gelatine adhärten. Außerdem baute sich keines der Hydrogele ab, was auf eine Stabilität der *medium*-Hydrogele schließen lässt. Es konnte zudem eine Ausrichtung der Zellen innerhalb der Hydrogele detektiert werden. Anhand der Markierung der HCM mit dem Antikörper konnte jedoch geschlossen werden, dass es sich bei den ausgestreckten Zellen hauptsächlich um HCF handelt. Jedoch waren im GelMA *medium* auch einige HCM mit zellulären Ausläufern zu erkennen. Außerdem konnten Zell-Zell-Kontakte erfasst werden, was bei der Kultivierung der Zellarten einzeln in den Hydrogelen nicht erzielt werden konnte. In der Literatur konnte bereits häufig gezeigt werden, dass kardiale Fibroblasten benötigt werden, damit Kardiomyozyten innerhalb von Hydrogelen elongieren und Muskelfasern ausbilden können.<sup>273</sup> In der Kokultur sind eine höhere Anzahl an Zell-Zell-Interaktionen vorhanden. Außerdem wird vermutet, dass Fibroblasten und Kardiomyozyten über parakrine Signalfaktoren kommunizieren. Durch die Freisetzung von parakrinen Faktoren, wie bFGF oder *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), die in der Kokultur sekretiert werden, kann die zelluläre Ausrichtung und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten der Zellen gegenseitig gefördert werden.<sup>274</sup> Die Forschungsgruppe um Saini konnte erfolgreich eine Kokultur aus isolierten Rattenkardiomyozyten und Rattenherzfibroblasten in einem GelMA-Hydrogel etablieren.<sup>275</sup> Es lässt sich schlussfolgern, dass die eingesetzten Hydrogele ein gewisses Potenzial aufweisen, um ein Herzgewebe zu entwickeln. Jedoch muss das Verhältnis der beiden Zelltypen weiter angepasst werden, da eine Ausrichtung beider Zellen notwendig ist, um ein funktionsfähiges Modell zu rekonstruieren.

Ein Modell aller drei erforderlichen Zellarten (HCF, HCM, HUVEC) wurde aufgrund der fehlenden Ausrichtung der HCM nicht durchgeführt. Stattdessen wurde der Fokus auf die Differenzierung von humanen Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (*engl. human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) gelegt (Kapitel 3.2), um sich den nativen Eigenschaften des Herzmuskels zu nähern. Lesman *et al.* konnten eine Kokultur der drei Zellarten Herzmuskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen aufbauen. Sie erzielten durch zusätzliche Zellarten wie Fibroblasten und Endothelzellen zu den Kardiomyozyten eine gesteigerte Vaskularisierung des artifiziellen Herzmuskelgewebes.<sup>276</sup> Außerdem konnten Ravenscroft *et al.* zeigen, dass eine Sphäroidbildung aus den drei Zellarten in einem Verhältnis 4:2:1 (Kardiomyozyten:Fibroblasten:Endothelzellen) in einem positiven pharmazeutischen Effekt resultierte. Durch die Kokultur der drei Zellarten konnten erhöhte kontraktile Eigenschaften ermittelt werden.<sup>277</sup>

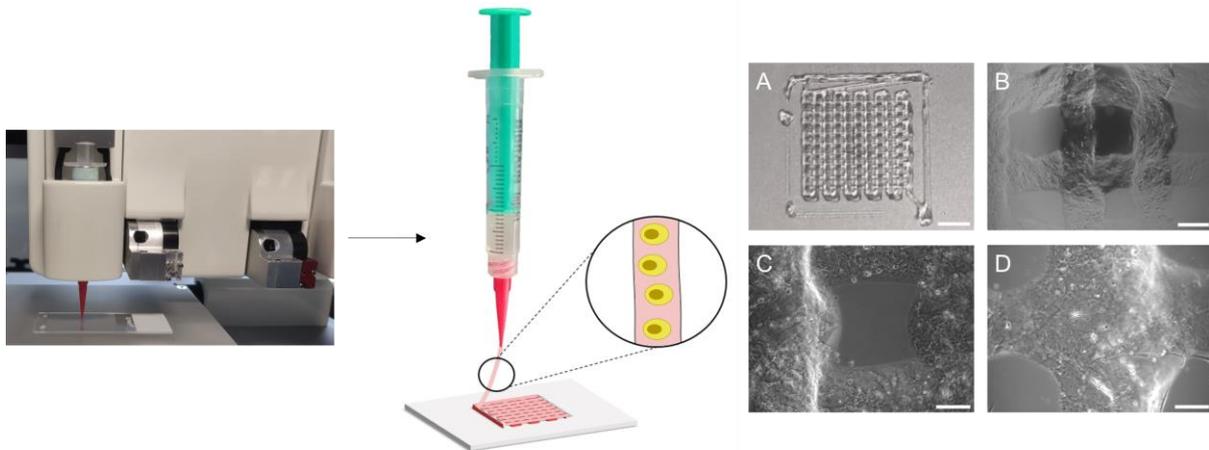


**Abbildung 43: Immunfluoreszenzmarkierung der Kokultur von HCM und HCF in Hydrogelen.** HCM und HCF wurden in einem Verhältnis von 7:3 HCF:CHM und einer Zellkonzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit den Hydrogelen gemischt, mit 0,3 % oder 0,03 % LAP versetzt und in einem Well eines ibidi  $\mu$ -Slides vernetzt (30/15 s, 320-500 nm, Omnicure S2000, 500 mW/cm<sup>2</sup>). Über 30 Tage wurden die Zellen kultiviert und anschließend fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit  $\alpha$ -Aktinin (Anti- $\alpha$ -Aktinin (*sarcomeric*) aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 415-480 nm); (ii) Phalloidin-TRITC, Gelb ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 532 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 545-625 nm); (iii)  $\alpha$ -Aktinin, Grün ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 532 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 600-630 nm); (iv) Überlagerung; (v) Tiefenprofil. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Daraus konnten Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) erzeugt werden. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.7 3D-Biodruck von herzspezifischen Zellarten

Durch 3D-Biodruckverfahren kann die Reproduzierbarkeit der Herstellung von artifiziellem Gewebe erhöht werden, da einem Konstrukt eine einheitliche Form gegeben werden kann und die Zellen darin gedruckt und präzise positioniert werden können.<sup>278</sup> Da sich der Druckvorgang aufgrund der Kühlung der Biotinten im Druckkopf, des Durchmessers der konischen Nadel und vielen anderen Faktoren negativ auf die Zellviabilität auswirken kann, wurden die HCF und HCM einzeln in den Hydrogelen im extrusionsbasierten 3D-Biodruck untersucht. Hierfür wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit den jeweiligen Hydrogelen und LAP in der erforderlichen Konzentration (0,3 % für GelMA und 0,03 % für GelNB/GelS) gemischt und in eine 3 ml Spritze (Luer-Lock) überführt. Anschließend wurde die Biotinte in den Druckkopf des BioSpot BP (Biofluidix GmbH) eingesetzt und es erfolgte eine Temperierung auf die erforderliche Drucktemperatur für 30 min. Durch Dr. X. Kempter konnten bereits die optimalen Drucktemperaturen für die verschiedenen Hydrogele bestimmt werden. Es wurden Drucktemperaturen von 23 °C für GelMA *medium*, 20 °C für GelMA *high*, 22 °C für GelNB/GelS *medium* und 19 °C für GelNB/GelS *high* verwendet.<sup>224</sup> Anschließend wurde eine konische Nadel (Durchmesser 0,25 mm) angebracht und die Viskosität der Tinte überprüft. Die Z-Höhe wurde manuell normiert und Gitterstrukturen der Größe 12 x 12 mm gedruckt. Zur Überprüfung der Zellviabilität wurde an Tag 7, 14 und 21 eine Lebend-/Tot-Färbung, wie in Kapitel 3.1.3.4 beschrieben, mit Calcein-AM und PI durchgeführt. Calcein-AM diente als Markierung von lebenden Zellen und PI als Markierung von nekrotischen Zellen.

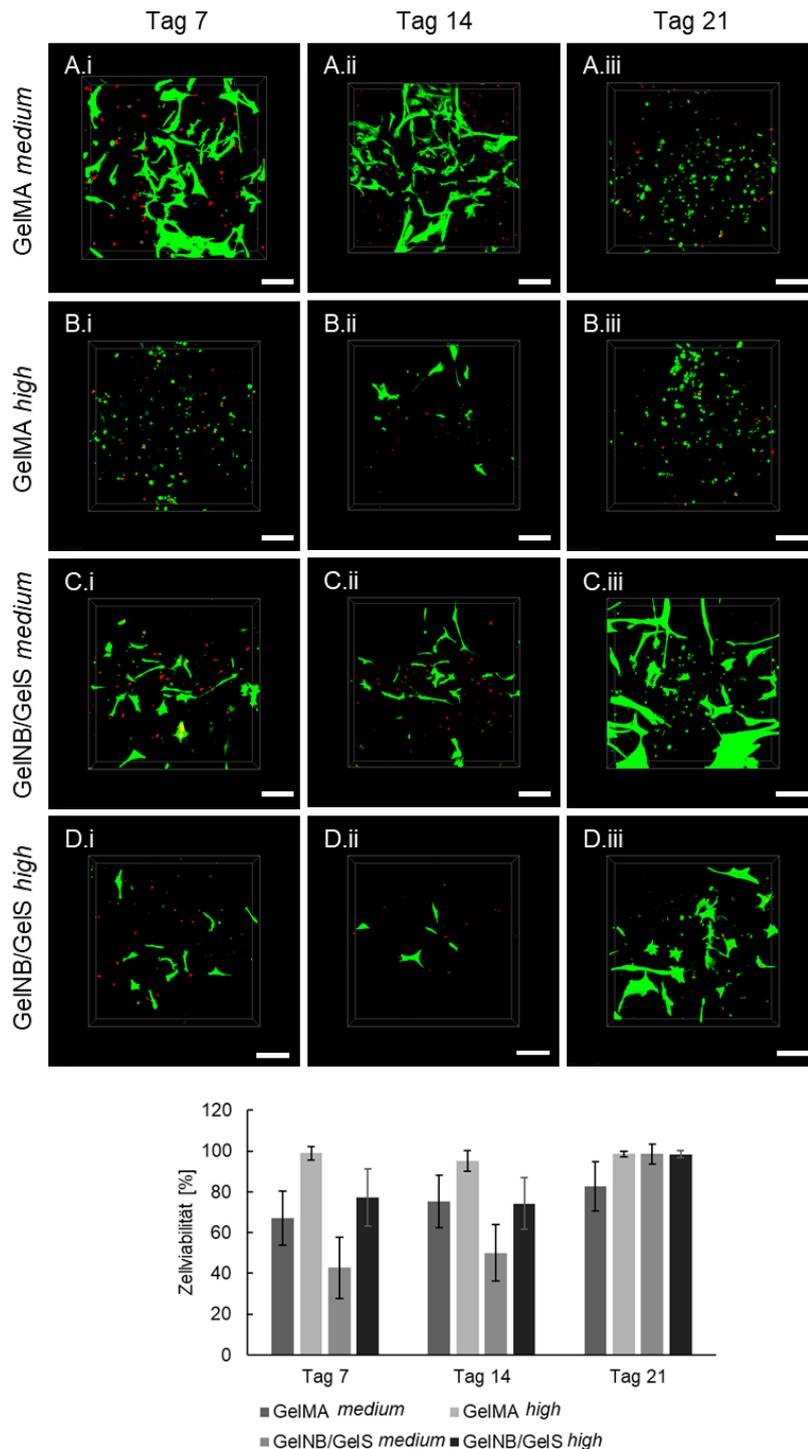
Auf eine Färbung an Tag 1 wurde verzichtet, da die Zellen hier lediglich, wie durch die 3D-Kultur ohne extrusionsbasierten Druck bewiesen, eine kreisrunde Form aufweisen und keine zellulären Ausläufer zeigen. Eine schematische Darstellung des 3D-Biodrucks ist unten in Abbildung 44 aufgezeigt.



**Abbildung 44: Schematische Darstellung des 3D-Biodrucks (3D-Bioprinting).** Die Biotinte, bestehend aus Photopolymerlösung, dem Photoinitiator LAP und den Zellen (HCF oder HCM), wurde in den Druckkopf des 3D-Biodruckers eingesetzt und temperiert. Anschließend wurden Gitterstrukturen der Größe 12 x 12 mm gedruckt. (A) Aufnahme der gedruckten Struktur. Der Maßstab entspricht 3 mm. (B) Nahaufnahme der Gitterstruktur. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ . (C) und (D) zeigen charakteristische Nahaufnahmen an bestimmten Stellen der Gitterstruktur. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

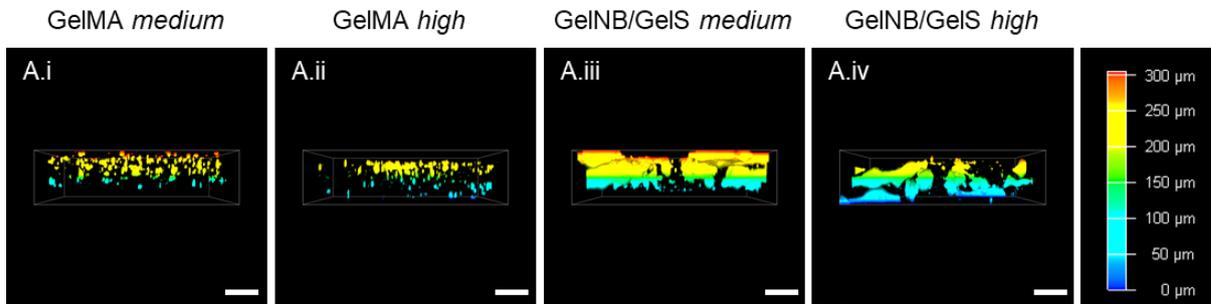
Zunächst wurden die HCF in den Hydrogelen *GeIMA medium*, *GeIMA high*, *GeINB/GeIS medium* und *GeINB/GeIS high* gedruckt und anschließend in einer Petrischale in FGM-3 kultiviert. Auf das Drucken der *low*-Hydrogele wurde verzichtet, da sich aus der 3D-Kultur ohne extrusionsbasierten Druck zeigte, dass diese sich nach wenigen Tagen Kultivierung aufgrund des im Medium enthaltenen FCS abbauten. In FCS sind Proteasen enthalten, die das Gelatinerückgrat spalten können und somit zum Abbau des Hydrogels führen.<sup>279</sup> Abbildung 45 zeigt die Ergebnisse der Lebend-/Tot-Färbungen der gedruckten Strukturen mit eingebetteten HCF. Dabei ist auffällig, dass die HCF in den *high*-Hydrogelen eine deutlich geringere Elongation zeigen und meist eine runde Form aufweisen. Im Vergleich der Viabilität der Zellen der *GeIMA*-Hydrogele und der *GeINB/GeIS*-Hydrogele, fällt auf, dass die Viabilität der HCF in den *GeINB/GeIS*-Hydrogelen mit knapp 100 % an Tag 21 deutlich höher war. In *GeIMA medium* zeigte sich bereits an Tag 7 und an Tag 14 eine deutliche zelluläre Ausrichtung entlang des Kreuzes der Gitterstruktur, bei der sich zwei Schichten überlagern. Außerdem war die Gitterstruktur deutlich erkennbar. An Tag 21 war jedoch keine Ausrichtung zu erkennen, weil möglicherweise Fehler bei der Herstellung unterlaufen sein können. Da für jeden Tag eine separate Struktur gedruckt wurde, kann es zu Unterschieden zwischen den einzelnen Strukturen kommen. Im Vergleich zu Tag 7 und Tag 21 zeigten die Zellen an Tag 14 im *GeIMA high* zelluläre Ausläufer. *GeINB/GeIS medium* zeigte an allen Tagen ausgerichtete HCF und deutlich sichtbare Gitterstrukturen. Im *GeINB/GeIS high* konnten ebenfalls ausgerichtete Zellen detektiert werden, jedoch konnte die Gitterstruktur nicht mehr vollständig anhand der Zellverteilung erkannt werden. Auffällig ist zudem, dass die Zellen ein stärkeres zelluläres Netzwerk an den Rändern der gedruckten Strukturen aufweisen. Durch die Poren innerhalb der Hydrogele besitzen die Zellen die Möglichkeit zu migrieren, weshalb die Möglichkeit

besteht, dass sich vermehrt an den Rändern der Strukturen Zellen ansammeln, da hier der direkte Kontakt zum Zellkulturmedium besteht. Aufgrund der Oberflächenspannung und der mechanischen Kräfte die am Rand der Hydrogelstrukturen auftreten kann außerdem die Geometrie der Struktur die Ausrichtung der Zellen zusätzlich beeinflussen. Die Viabilität konnte mit Hilfe der Software *ImageJ* quantifiziert werden. GelMA *medium* zeigte vergleichbare Viabilitäten an allen Tagen in einem Bereich von 70-80 %. Im GelMA *high* war der Anteil lebendiger Zellen bei über 95 % an allen Tagen. Im GelNB/GelS *medium* konnten an Tag 7 und Tag 14 niedrigere Zellviabilitäten ermittelt werden, welche an Tag 21 auf 98 % anstieg. Durch die nicht-adhärenenten nekrotischen Zellen können diese aus der Struktur diffundieren und mit einem Medienwechsel abgenommen werden. GelNB/GelS *high* erzielte Zellviabilitäten von 80-99 % an allen Tagen.



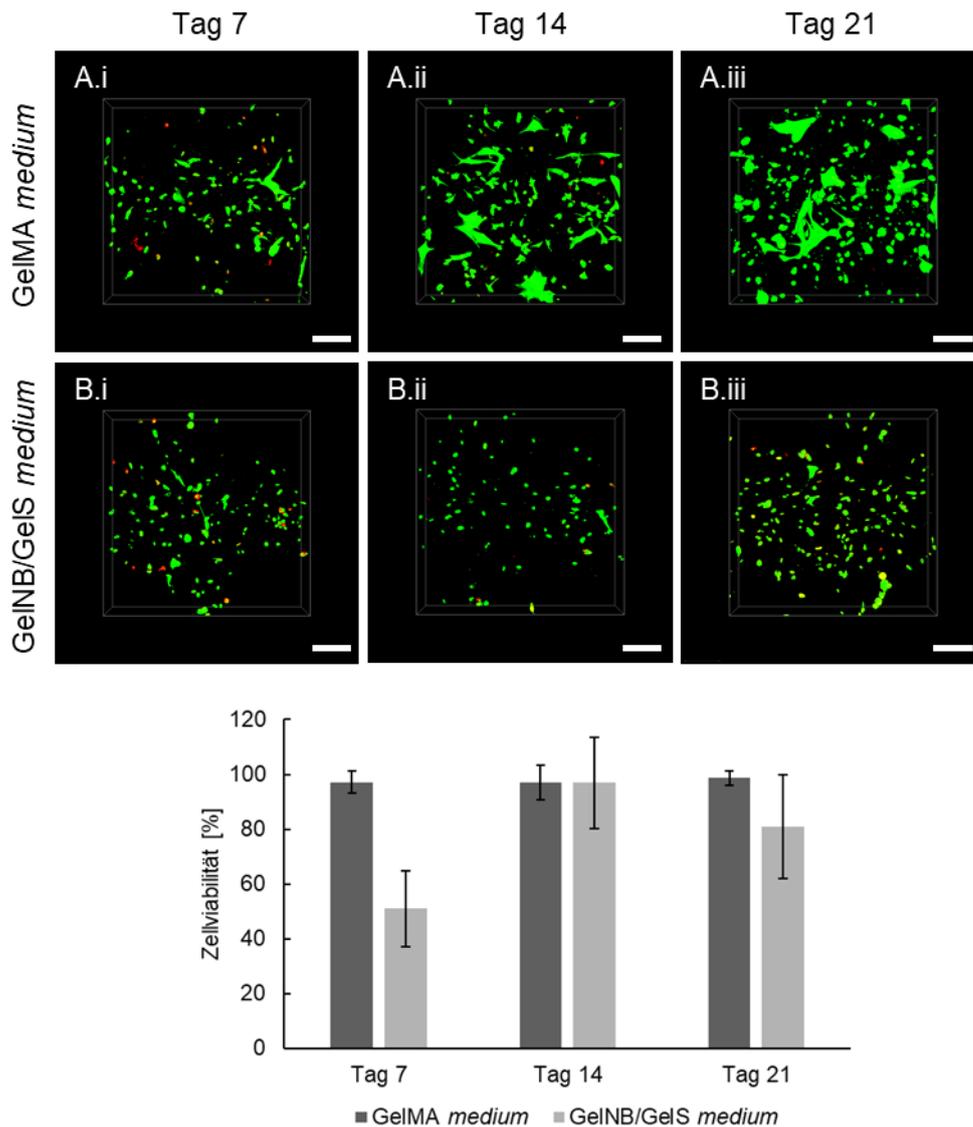
**Abbildung 45: Lebend-/Tot-Färbung des 3D-Biodrucks der HCF.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCF/ml mit 5 % Hydrogel-Vorläuferlösungen und 0,3 % LAP (GelMA) oder 0,03 % LAP (GelNB/GelS) gemischt. Dabei wurden verschiedene Funktionalisierungsgrade (*medium*, *high*) der Hydrogele verwendet. Die Biotinte wurde in den Drucker eingesetzt, anschließend erfolgte eine Temperierung der Tinte für 30 min. Daraufhin konnte die Tinte für den extrusionsbasierten Biodruck verwendet werden. Anschließend wurden zwei Schichten einer Gitterstruktur gedruckt und für 30 s (GelMA) oder 15 s (GelNB/GelS) mit UV-Licht der Leistungsdichte  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omnicure S2000, 320-500 nm) ausgehärtet. An Tag 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}580 \text{ nm}$ ) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 610\text{-}700 \text{ nm}$ ) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe=  $300 \mu\text{m}$ , Abstand=  $5 \mu\text{m}$ ) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *medium*, (B) GelMA *high*, (C) GelNB/GelS *medium*, (D) GelNB/GelS *high*. (i) Tag 7, (ii) Tag 14, (iii) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. Der Maßstab entspricht  $200 \mu\text{m}$ .

Das Tiefenprofil der gedruckten Strukturen (Abbildung 46) nach einem Kultivierungszeitraum von 21 Tagen zeigte außerdem, dass die 3D-Struktur über 300  $\mu\text{m}$  vorhanden war und die Zellen innerhalb der 300  $\mu\text{m}$  homogen verteilt waren. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Kultivierung über 21 Tage möglich war, ohne dass die Strukturen abgebaut wurden.



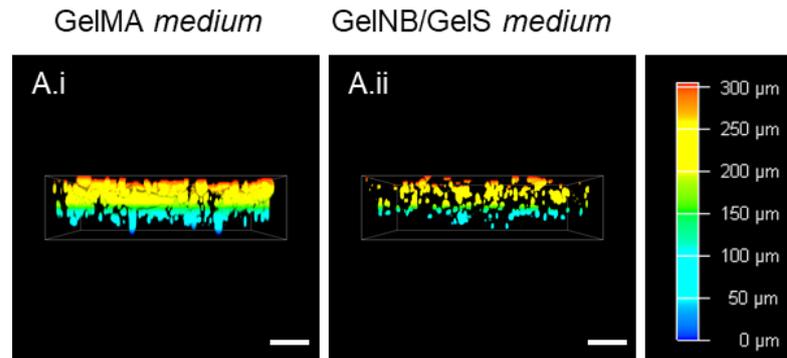
**Abbildung 46: Tiefenprofil der gedruckten HCF nach 21 Tagen.** (i) GelMA *medium*, (ii) GelMA *high*, (iii) GelNB/GelS *medium*, (iv) GelNB/GelS *high*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu\text{m}$ , Abstand= 5  $\mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Analog zu vorherigen Experimenten wurde der Einfluss des extrusionsbasierten Biodrucks auf die HCM untersucht. Hierbei wurden die Hydrogele GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* verwendet (Abbildung 47), da diese in den zuvor durchgeführten Experimenten die vielversprechendsten Ergebnisse erzielten. Es konnten überwiegend viable Zellen mit 80-100 % über den gesamten Zeitraum detektiert werden. Lediglich an Tag 7 waren im GelNB/GelS *medium* 50 % nekrotische Zellen aufzufinden. Das Kreuz der Gitterstruktur konnte in allen Aufnahmen erkannt werden, was bedeutet, dass eine Kultivierung über einen Zeitraum von 21 Tagen möglich war und nicht zum Abbau der Hydrogelstruktur führte. An Tag 7 konnten einzelne HCM mit zellulären Ausläufern erkannt werden, welches im GelMA *medium* bis Tag 21 zunahm. Es kam zur Ausbildung von zellulären Netzwerken innerhalb der gedruckten Struktur im GelMA *medium*. Im GelNB/GelS *medium* waren nur einzelne zelluläre Ausläufer zu sehen.



**Abbildung 47: Lebend-/Tot-Färbung des 3D-Biodrucks der HCM.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HCM/ml mit 5 % Hydrogel-Vorläuferlösungen und 0,3 % LAP (GelMA) oder 0,03 % LAP (GelNB/GelS) gemischt. Dabei wurde der Funktionalisierungsgrad *medium* der Hydrogele verwendet. Die Biotinte wurde in den Drucker eingesetzt, anschließend erfolgte eine Temperierung der Tinte für 30 min. Daraufhin konnte die Tinte für den extrusionsbasierten Biodruck verwendet werden. Es wurden zwei Schichten einer Gitterstruktur gedruckt und anschließend für 30 s (GelMA) oder 15 s (GelNB/GelS) mit UV-Licht der Leistungsdichte  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniscure S2000, 320-500 nm) ausgehärtet. An Tag 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{\text{ex}}= 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 500\text{-}580 \text{ nm}$ ) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{\text{ex}}= 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 610\text{-}700 \text{ nm}$ ) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (Höhe=  $300 \mu\text{m}$ , Abstand=  $5 \mu\text{m}$ ) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA *medium*, (B) GelNB/GelS *medium*. (i) Tag 7, (ii) Tag 14, (iii) Tag 21. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen bestimmt. Der Maßstab entspricht  $200 \mu\text{m}$ .

Durch das Tiefenprofil (Abbildung 48) konnte gezeigt werden, dass es zu einer homogenen Verteilung der Zellen innerhalb des gedruckten Hydrogels kam. Die Zellen konnten an den RGD-Domänen der Gelatine adhären. Nach 21 Tagen war eine Z-Stack-Aufnahme von  $300 \mu\text{m}$  möglich, was gegen den Abbau der Hydrogele spricht.



**Abbildung 48: Tiefenprofil der gedruckten HCM nach 21 Tagen.** (i) GelMA *medium*, (ii) GelNB/GelS *medium*. Anhand der Z-Stacks (Höhe= 300 µm, Abstand= 5 µm) der Lebend-Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstab entspricht 200 µm.

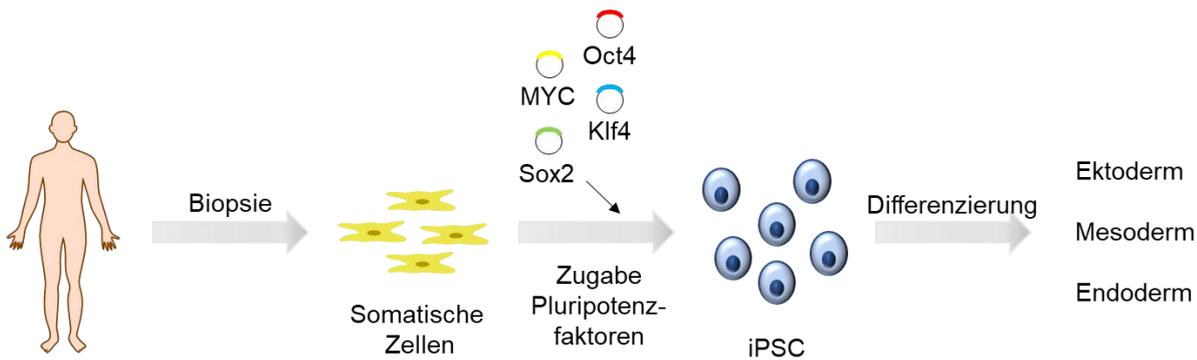
Zusammenfassend zeigte sich, dass die gelatinebasierten Hydrogele sich für den Einsatz im extrusionsbasierten Druck zum Aufbau von Herzgewebe eignen. Bei allen gedruckten Strukturen war eine Z-Stack-Aufnahme über 300 µm möglich, wodurch kein Abbau der Hydrogele über den Zeitraum von 21 Tagen stattfand. Insgesamt konnten hohe Zellviabilitäten an allen Tagen in allen Hydrogelen erzielt werden. Außerdem konnte in den *medium*-Hydrogelen eine Ausrichtung und Elongation der Zellen detektiert werden. Die HCF sowie die HCM zeigten, verglichen mit der 3D-Kultur innerhalb der Hydrogele ohne den Einsatz des extrusionsbasierten Druck, vermehrt zelluläre Ausrichtungen. Die gedruckten Strukturen wurden auf Objektträger gedruckt und anschließend in Petrischalen kultiviert, wodurch bei der Kultivierung der gedruckten Strukturen mehr Kultivierungsmedium eingesetzt wurde, um die gesamte Struktur zu bedecken. Die 3D-Kultur ohne extrusionsbasierten Druck wurde in *ibidi µ-Slides* durchgeführt, bei dem weniger Kultivierungsmedium eingesetzt wurde. Durch die vermehrte Nährstoffzufuhr und Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren konnten die Zellen in den gedruckten Strukturen vermehrt Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Dies sind optimale Voraussetzungen für ein myokardiales 3D-*Bioprinting* einer Kokultur aus Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten. Bereits Daly *et al.* konnten mit einem *Support*-Hydrogel aus Hyaluronsäure modifiziert mit Adamantan oder  $\beta$ -Cyclodextrin ein Herzgewebe aus hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten und Herzfibroblasten aufbauen. Hierfür wurde ein Mikromanipulator mit Mikropipetten versetzt. So konnte ein Herzgewebe nachgestellt werden, welches den Zustand eines Post-Myokardinfarkts imitiert und an dem miRNA-Therapeutika getestet wurden.<sup>280</sup> Kumar *et al.* zeigten heterozelluläre Kupplungen von gedruckten hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten in Kokultur mit Herzfibroblasten in einem Fibrin-Gelatine-Hydrogel.<sup>281</sup>

### 3.1.4 Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel wurden gelatinebasierte Hydrogele in ihrer Eignung für den Aufbau von artifiziellem herzspezifischem Gewebe untersucht. Hierbei wurden die Hydrogele GelMA und GelNB/GelS mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden eingesetzt. Da für die Vernetzung der Hydrogele ein Photoinitiator und UV-Licht benötigt wird, wurde die Zytotoxizität des eingesetzten Photoinitiators LAP mit und ohne anschließende Bestrahlung auf humane Herzfibroblasten (HCF), humane Herzmuskelzellen (HCM) und humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) untersucht. Bei Exposition mit UV-Licht zerfällt der Photoinitiator in Radikale, was toxische Effekte auf die Zellen haben kann. Durch einen MTT-Assay wurde die Zellviabilität quantifiziert. Mit einer zunehmenden Konzentration des Photoinitiators konnte eine Abnahme der Zellviabilität beobachtet werden. Außerdem zeigte die zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht nach einer Behandlung mit dem Photoinitiator einen toxischen Effekt und niedrigeren Zellviabilitäten. Das UV-Licht erzielte hohe Viabilitäten der Zellen und zeigte keine toxische Wirkung auf alle verwendeten Zellarten. Um die Biokompatibilität der gelatinebasierten Hydrogele für herzspezifische Zellen zu analysieren, wurden HCF und HCM innerhalb der Hydrogele eingebettet und Lebend-/Tot-Färbungen durchgeführt. Es konnten hohe Zellviabilitäten in den Hydrogelen mit dem Funktionalisierungsgrad *medium* und *high* erzielt werden, jedoch wurden wenig zelluläre Ausläufer beobachtet. Durch eine Kokultur aus HCF oder HCM, welche in das Hydrogel eingebettet, und HUVEC, welche auf die Hydrogeloberflächen ausgesät wurden, wurde das Anwachsen der HUVEC auf der Oberfläche der Hydrogele und die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten der Zellen, die im Hydrogel eingekapselt waren, gefördert. Es konnte eine deutliche zelluläre Netzwerkbildung beobachtet werden. Ähnliches konnte auch in einer 3D-Kokultur von HCF und HCM in einem Verhältnis von 7:3 erzielt werden. Beide Zellarten wurden gemeinsam in dem Hydrogel eingebettet und die Zellen mit Hilfe immunhistochemischer Markierungen visualisiert. Im extrusionsbasierten 3D-Biodruck zeigten die HCF und die HCM, verglichen mit den Einzelkulturen, deutliche Zellausrichtungen, womit der 3D-Biodruck die Morphologie positiv beeinflusst hat. Mit den erzielten Ergebnissen wurden erfolgreich erste Schritte für die Herstellung von artifiziellem Herzgewebe erzielt. In zukünftigen Experimenten kann ein Myokard aus den Herzmuskelzellen und den Herzfibroblasten aufgebaut werden, welche von dem Endokard, den HUVEC, ummantelt werden. Dies kann für Arzneimittelscreenings eingesetzt werden, indem beispielsweise ein Myokardinfarkt simuliert wird und anschließend potentielle Medikamente zur Behandlung getestet werden können.

### 3.2 Verwendung von hiPSC zum Aufbau von Organmodellen

In den zuvor durchgeführten Experimenten in dem Kapitel 3.1 wurden humane primäre Kardiomyozyten (HCM) benutzt, welche eine hohe Teilungsrate aufweisen und somit über mehrere Passagen kultiviert werden können. Primäre Zellen werden direkt aus Geweben von Menschen entnommen und sind deshalb nur begrenzt verfügbar. Dennoch können sie subkultiviert und ohne einen zusätzlichen Differenzierungsschritt direkt verwendet werden.<sup>282,283</sup> Durch die Möglichkeit der Teilung fehlen den HCM einige Eigenschaften, die native Kardiomyozyten des Herzens besitzen. So können die HCM beispielsweise keine Kontraktionen durchführen und weisen einige Marker, die ausdifferenzierte Kardiomyozyten aufzeigen, nicht auf. Dies deutet auf eine unvollständige Differenzierung oder eine Dedifferenzierung der HCM hin. Aufgrund der mangelnden Eigenschaften der primären Kardiomyozyten wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (*engl. human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) benutzt, um humane Kardiomyozyten zu differenzieren. Die hiPSC werden gewonnen, in dem somatische Zellen durch bestimmte Faktoren reprogrammiert werden, sodass diese wieder pluripotente Eigenschaften aufweisen. Die Faktoren, die für die Reprogrammierung eingesetzt werden, sind die sogenannten Yamanaka-Faktoren. Unter den Yamanaka-Faktoren sind die Faktoren *octamer binding transcription factor 4* (Oct-4), *sex determining region Y (SRY)-box 2* (Sox2), *kruppel-like factor 4* (Klf4) und *myelocytomatosis oncogene* (MYC) bekannt.<sup>284</sup> Oct-4 bezeichnet einen Transkriptionsfaktor der POU-Domäne, welcher in embryonalen Zellen exprimiert wird und im Erwachsenenalter lediglich in den Keimzellen vorhanden ist.<sup>285,286</sup> Sox2 ist als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Embryonalentwicklung beteiligt.<sup>287</sup> Klf4 gehört zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und ist an Vorgängen wie der Differenzierung und Reprogrammierung von somatischen Zellen beteiligt.<sup>288</sup> Das Protein, das von MYC codiert wird, wird in der Literatur als expressionsverstärkend für andere Gene beschrieben.<sup>289</sup> Eine pluripotente Stammzelle ist in der Lage, sich in jede Zelle der drei Keimblätter zu differenzieren. Zu den Keimblättern gehören der Mesoderm, Ektoderm und Endoderm.<sup>290,291</sup> Eine schematische Darstellung der Reprogrammierung ist in Abbildung 49 aufgezeigt. Ziel des kardialen *Tissue Engineerings* ist es, zukünftig patientenspezifische Stammzellen zu benutzen, um artifizielles Herzgewebe herzustellen.<sup>292,293</sup> Mit dem Einsatz von hiPSC wird der Grundstein dafür gelegt. In dieser Arbeit wurden hiPSC der Linie HDII verwendet. Die HDII wurden mit Hilfe des Sendai Virus aus humanen Fibroblasten reprogrammiert.

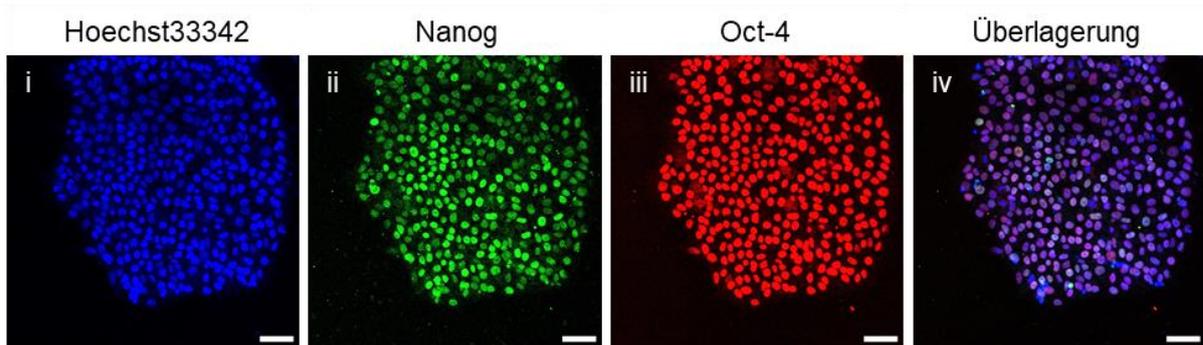


**Abbildung 49: Herstellung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC).** Bei einer Biopsie werden dem Menschen somatische Zellen entnommen. Diese werden mit den Pluripotenzfaktoren Oct-4, Sox2, Klf4 und MYC zu hiPSC reprogrammiert, die eine pluripotente Eigenschaften aufweisen. Anschließend können hiPSC in Zellen von einem der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) differenziert werden. Modifiziert nach Yamanaka *et al.*<sup>294</sup>

### 3.2.1 Nachweis der Pluripotenz der hiPSC der Zelllinie HDII

hiPSC besitzen durch die Pluripotenz die Eigenschaft, sich nahezu unbegrenzt zu teilen und gleichzeitig ihre Funktion vollständig beizubehalten.<sup>295</sup> Um die pluripotenten Eigenschaften der Stammzellen der Linie HDII zu validieren, wurde zunächst untersucht, ob die Stammzellen verschiedene Pluripotenzmarker aufwiesen. Dies erfolgte durch eine Immunfluoreszenzmarkierung.

Es wurden hiPSC der Linie HDII auf einem Matrigel hESC-beschichteten 6-Well in mTeSR™ Plus mit Doxycyclin-hyclat und Normocin bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Matrigel kann bei 37 °C ein Gel ausbilden und somit durch eine Beschichtung von Zellkulturmaterialien die Adhäsion der hiPSC ermöglichen.<sup>296</sup> Matrigel wird aus Engelbreth-Holm-Swarm-Tumorzellen aus einer Maus gewonnen und enthält viele EZM-Proteine wie beispielsweise Laminin und Kollagen.<sup>297,298</sup> Außerdem sind zahlreiche Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF) oder *platelet-derived growth factor* (PDGF) und weitere unbekannte Faktoren enthalten.<sup>299</sup> Die hiPSC der Linie HDII wurden nach einer Kultivierung von 4 Tagen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die Primärantikörper Oct-4 (Anti-Oct-4 aus dem Hase) und Nanog (Anti-Nanog aus der Maus) den Zellen hinzugegeben. Oct-4 und Nanog wurden als Pluripotenzmarker für die Immunfluoreszenzmarkierung ausgewählt, da diese Transkriptionsfaktoren sind, die für die Selbsterneuerung und Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen verantwortlich sind.<sup>300,301</sup> Nach der Inkubation konnten die Sekundärantikörper, welche mit einem Fluorophor zur Markierung gekuppelt sind, hinzugegeben werden. Dabei wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus für den Primärantikörper Nanog und Alexa Fluor® 647 Huhn anti-Hase für Oct-4 eingesetzt. Anschließend erfolgte die Detektion mit Hilfe inverser Konfokalmikroskopie.



**Abbildung 50: Immunfluoreszenzmarkierung der hiPSC der Linie HDII.** HDII wurden in einem 6-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung kultiviert und nach 4 Tagen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit Oct-4 (Anti-Oct-4 aus dem Hase) und Nanog (Anti-Nanog aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 415-480 nm); (ii) Nanog, Grün (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Ziege anti-Maus,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500-550 nm); (iii) Oct-4, Rot (Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Huhn anti-Hase,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 635 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 650-700 nm); (iv) Überlagerung. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Der Maßstab entspricht 75  $\mu\text{m}$ .

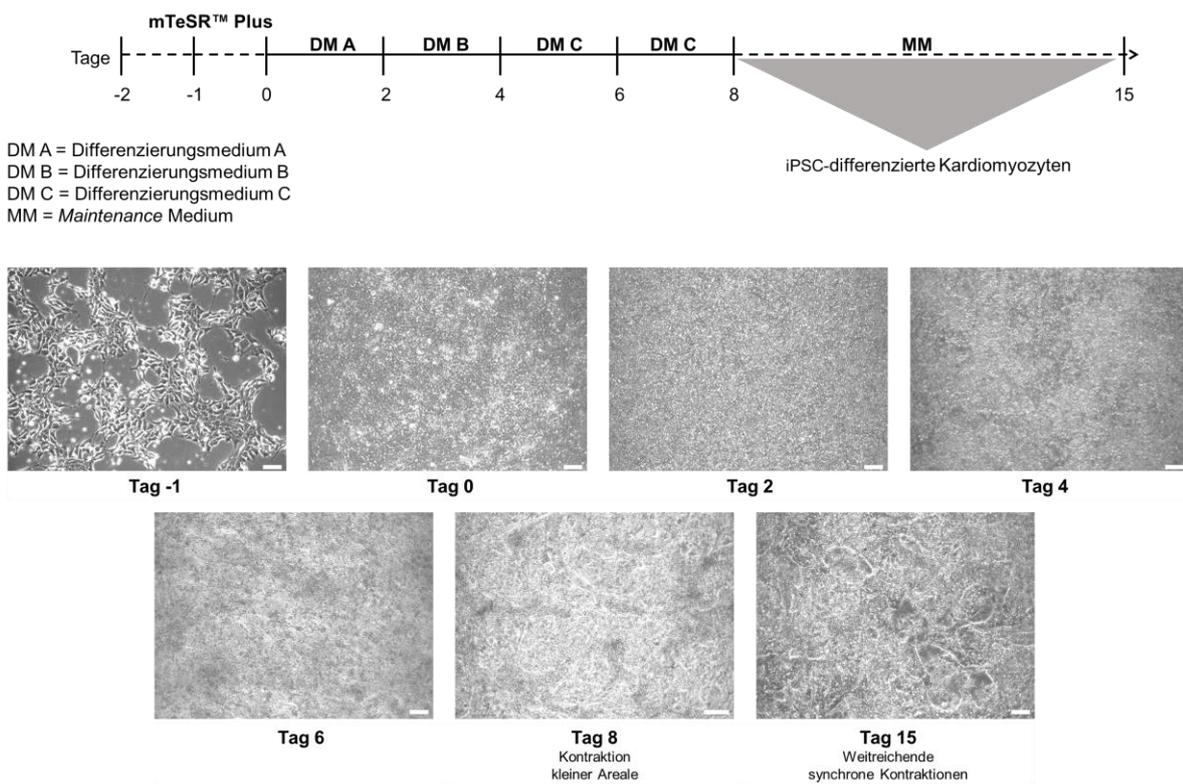
In Abbildung 50 wird das Ergebnis der Immunfluoreszenzmarkierung der HDII dargestellt. In Blau wird Hoechst33342 gezeigt, welches in die DNA interkaliert und die Zellkerne markiert.<sup>302</sup> In Grün wird Nanog und in Rot Oct-4 dargestellt. hiPSC wachsen in Zellkolonien, da hierdurch eine Aufrechterhaltung der Pluripotenz gewährleistet werden kann. Somit kann die natürliche Zellnische durch die notwendigen Zell-Zell-Kontakte simuliert werden.<sup>303,304</sup> Diese typische Morphologie zeigten die HDII in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen. Die Zellen wurden außerdem einheitlich mit den Pluripotenzmarkern Oct-4 und Nanog markiert und es wurden keine Zellen ohne Markierung beobachtet. Somit kann angenommen werden, dass die HDII eine ausreichende Pluripotenz aufweisen, welches als idealer Ausgangspunkt für die Differenzierung zu Kardiomyozyten diene.

### 3.2.2 Differenzierung von hiPSC der Zelllinie HDII zu Kardiomyozyten

Stammzellen weisen pluripotente Eigenschaften auf, was bedeutet, dass sie die Möglichkeit besitzen, sich in Zellen der drei Keimblätter zu differenzieren. Durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder ähnlichen Signalmolekülen können diese in beispielsweise Kardiomyozyten differenziert werden. Die bisher verwendeten primären Kardiomyozyten (HCM) wiesen keine Kontraktionsfähigkeit auf und sind außerdem laut Hersteller nicht ausdifferenziert, da sie ansonsten keine Teilungsfähigkeit mehr aufweisen würden. Aus diesem Grund wurden aus hiPSC der Linie HDII humane Kardiomyozyten differenziert.

Die Differenzierung wurde mit Hilfe des STEMdiff<sup>™</sup> *Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit* von StemCell<sup>™</sup> durchgeführt. Hierfür wurden die HDII mit Hilfe des Dissoziationsreagenz Accutase abgelöst und  $3,5\text{-}5 \cdot 10^5$  Zellen/ml in ein hESC Matrigel beschichtetes 12-Well ausgesät. Bei einer Konfluenz von  $> 95\%$  konnte die Differenzierung gestartet werden. Hierfür wurden die Zellen an Tag 0 mit dem Differenzierungsmedium A (DM A), versetzt mit Matrigel (1:100 Verdünnung), behandelt. Nach 2 Tagen erfolgte ein Medienwechsel und die anschließende Behandlung mit dem Differenzierungsmedium B (DM B). Dies wurde erneut für 2 Tage inkubiert, bis ein Medienwechsel zum Differenzierungsmedium C (DM C) erfolgte. An

Tag 6 wurde ein erneuter Medienwechsel mit DM C durchgeführt. Ab Tag 8 wurden die Zellen mit dem *Maintenance Medium* (MM) behandelt, wobei alle 2 Tage ein Medienwechsel stattfand. Es konnte eine Änderung der Morphologie der Zellen mit jedem Wechsel des Kultivierungsmediums festgestellt werden. An Tag -1 wurden die angewachsenen Zellen mikroskopisch überprüft, die an Tag 0 eine Konfluenz > 95 % aufwiesen und somit eine Differenzierung gestartet werden konnte. Mit dem Medienwechsel zum DM A erfolgte eine Änderung der Zellmorphologie und die hiPSC wurden zu Zellen des Mesoderms differenziert. Bis Tag 4 wurden die Zellen weiter zu kardialen Zellen des Mesoderms mit DM B entwickelt. Mit dem DM C bis Tag 6 wurden kardiale Vorläuferzellen erzeugt, welche durch eine erneute Behandlung mit DM C zu Kardiomyozyten differenzierten. Ab Tag 8 konnte die Ausbildung von sogenannten Myofibrillen beobachtet werden. Ebenfalls ließen sich ab Tag 8 spontan schlagende Areale erkennen. Ab Tag 15 galt die Differenzierung als beendet. Die Zellen zeigten weitreichende synchrone Kontraktionen über das gesamte Well verteilt, was auf eine erfolgreiche Differenzierung schließen lässt. Die differenzierten Kardiomyozyten konnten anschließend für Folgeexperimente eingesetzt oder bis zu 4 Wochen weiter kultiviert werden, wobei die Kontraktionen der Zellen aufrecht erhalten blieben. Eine schematische Ausführung der Differenzierung ist in Abbildung 51 dargestellt.



**Abbildung 51: Differenzierung der hiPSC Linie HDII zu Kardiomyozyten.** Es wurden  $3,5-5 \cdot 10^5$  HDII/ml in ein mit hESC Matrigel beschichtetes 12-Well ausgesät und in mTeSR™ Plus kultiviert bis eine Konfluenz von > 95 % erreicht wurde. An Tag 0 wurde die Differenzierung gestartet und das Differenzierungsmedium A (DM A) eingesetzt. An Tag 2 wurde das Medium zu Differenzierungsmedium B (DM B) gewechselt und an Tag 4 zu Differenzierungsmedium C (DM C). Ab Tag 8 wurde ein Medienwechsel nur noch mit dem *Maintenance Medium* (MM) vorgenommen. Es wurde jeweils das alte Medium abgenommen und 2 ml des neuen Mediums hinzugegeben. Diese Differenzierung wurde nach dem Protokoll von StemCell™ durchgeführt. An Tag 15 war die Differenzierung beendet und schlagende Kardiomyozyten konnten erhalten werden. Der Maßstab entspricht 100 µm.

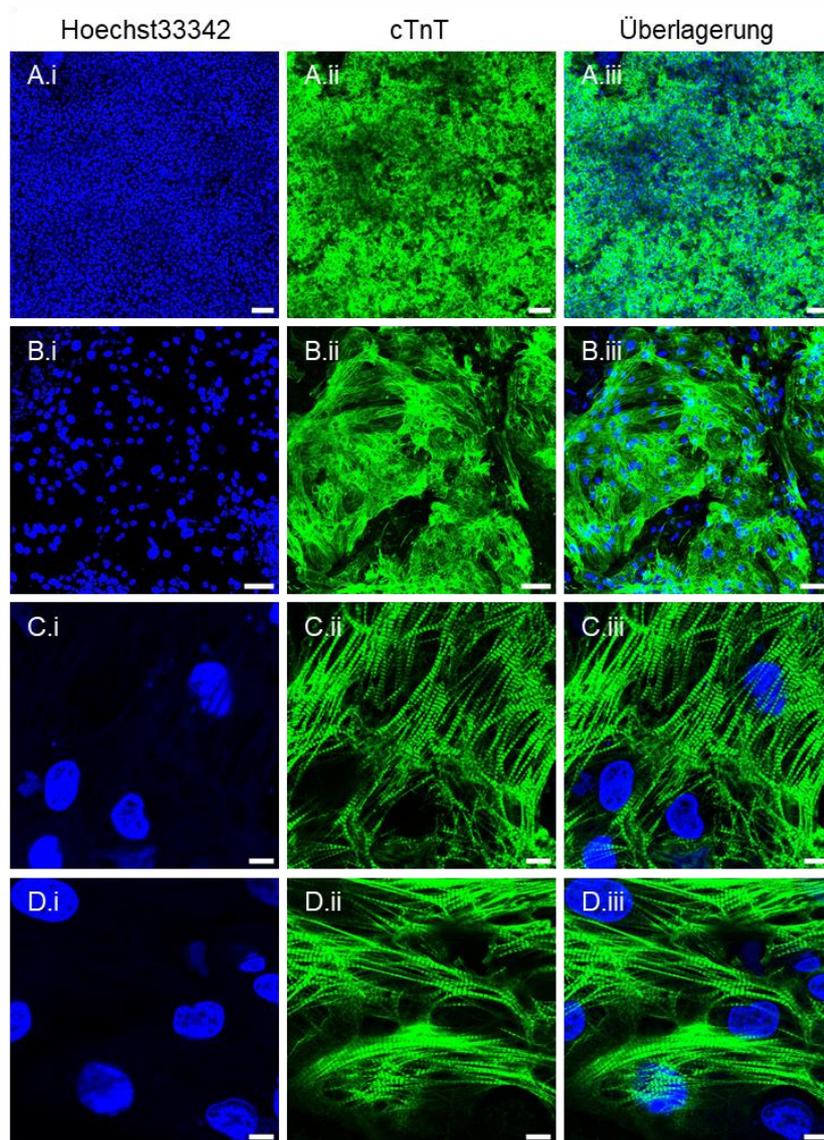
In der Literatur werden viele unterschiedliche Protokolle zur Differenzierung von Kardiomyozyten beschrieben. So gibt es erhebliche Unterschiede in der Wahl des Zellkulturformates. Es wurden bereits Differenzierungen mit dreidimensionalen Embryoidkörperchen (*engl. embryoid bodies*, EB) oder mit einem zweidimensionalen *Zelllayer* durchgeführt.<sup>305–309</sup> Verschiedene Kombinationen von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren werden verwendet, um die Differenzierung von Kardiomyozyten durchzuführen. Die kardiale Differenzierung erfolgt meist über die Modulation des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges. Dieser muss zunächst aktiviert werden, um die mesodermale Entwicklung der Zellen zu induzieren. Anschließend muss eine Inhibition des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges erfolgen, damit eine Differenzierung zu kardialen Zellen resultieren kann. Durch die Kombination von den Zytokinen *bone morphogenic protein 4* (BMP4), Aktivin A und bFGF kann die mesodermale Differenzierung induziert werden. Anschließend wird ein Wnt-Inhibitor eingesetzt, um die kardiale Differenzierung zu induzieren.<sup>310–312</sup> Eine andere Möglichkeit für die Aktivierung des Wnt-Signalweges stellt der Einsatz von CHIR99021 dar. CHIR99021 inhibiert die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3), wodurch der Wnt-Signalweg aktiviert wird. Anschließend wird der Wnt-Signalweg durch einen Wnt-Inhibitor gestoppt.<sup>313,314</sup> Der Zeitpunkt und die Art der Inhibition des Wnt-Signalweges beeinflusst die Differenzierung bezüglich dessen, ob Kardiomyozyten und welche Art von Kardiomyozyten generiert werden können. Durch den Einsatz von IWR1 als Wnt-Inhibitor konnte die Generierung von überwiegend ventrikulären Kardiomyozyten gefördert werden.<sup>315–318</sup> Die Differenzierung von Kardiomyozyten zeigt eine Komplexität, die durch die vielen verschiedenen Protokolle bestätigt wird.

### 3.2.2.1 Antikörpermarkierung differenzierter Kardiomyozyten

Um die Differenzierung der Kardiomyozyten aus hiPSC der Linie HDII zu validieren, wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, differenziert und an Tag 17 der Differenzierung fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Es folgte eine immunhistochemische Markierung mit dem kardialen Marker Troponin T (*engl. cardiac Troponin T*, cTnT). Bereits in der Literatur wurde cTnT eingesetzt, um eine erfolgreiche Differenzierung von Kardiomyozyten aus hiPSC zu verifizieren.<sup>319,320</sup> Troponin T ist ein 30-40 kDa großes Protein, welches an das Tropomyosin bindet. Es reguliert die quergestreifte Muskelkontraktion als Reaktion auf die intrazelluläre Änderung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Es ist außerdem wichtig für die Bildung von Myofibrillen und die ordnungsgemäße Muskelfunktion.<sup>321–323</sup> Bei einem Herzinfarkt können Troponin-Moleküle vermehrt ins Blut übertreten, was ein Indiz für eine Beschädigung des Herzmuskels darstellen kann.<sup>324</sup> Als Primärantikörper wurde Anti-cTnT aus der Maus und als Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus eingesetzt.

In Abbildung 52 sind die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Immunfluoreszenzmarkierung dargestellt. Es konnte eine einheitliche Markierung der Zellen innerhalb des Wells erkannt werden, was auf eine erfolgreiche Differenzierung schließen lässt. In einer vergrößerten Aufnahme (Abbildung 52 C/D) konnten die Zellen in höherer Auflösung

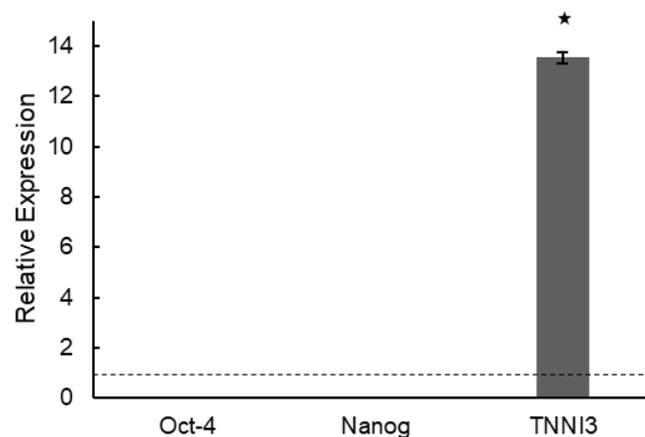
beobachtet werden. Durch die Vergrößerung konnte außerdem die charakteristische quergestreifte Muskulatur visualisiert werden. Die quergestreifte Muskulatur wird aus den Aktin- und Myosinfilamenten in den Sarkomeren der Kardiomyozyten gebildet.<sup>325</sup> Anhand dieser Immunfluoreszenzmarkierung der Kardiomyozyten mit cTnT konnte eine erfolgreiche Differenzierung validiert werden.



**Abbildung 52: Immunfluoreszenzmarkierung der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten.** HDII wurden in einem 12-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurden die Kardiomyozyten fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit cTnT (Anti-cTnT aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 415-480 nm); (ii) cTnT, Grün (Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500-550 nm); (iii) Überlagerung. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Maßstab: (A) 100 µm; (B) 75 µm; (C) 10 µm.

### 3.2.2.2 Genexpression kardialer Marker

Um die Differenzierung der Kardiomyozyten aus hiPSC weiter zu verifizieren, wurde eine Genexpressionsanalyse mit Hilfe einer RT-qPCR (*engl. Real-Time quantitative polymerase chain reaction*) durchgeführt. Hierbei wurde die Genexpression des kardialen Marker Troponin I3 (TNNI3) sowie der Pluripotenzmarker Oct-4 und Nanog untersucht. TNNI3 kodiert für das Protein Troponin I, welches, wie das Troponin T, an der Regulierung der Muskelkontraktion verantwortlich ist.<sup>326,327</sup> Zur Untersuchung der Genexpression wurden die Kardiomyozyten wie in Kapitel 3.2.2 differenziert und an Tag 17 die mRNA (*engl. messenger ribonucleic acid*) isoliert. Die vorhandene genomische DNA (*engl. desoxyribonucleic acid*) wurde mit einer DNase verdaut und in cDNA (*engl. complementary desoxyribonucleic acid*) mit einer reversen Transkriptase umgeschrieben. Anschließend konnte die Expression der cDNA mit der farbstoffbasierten RT-qPCR quantifiziert werden. Als Referenzgen diente das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und es wurde auf die Kontrolle (= 1) normiert. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ermittelt und sind in Abbildung 53 dargestellt.

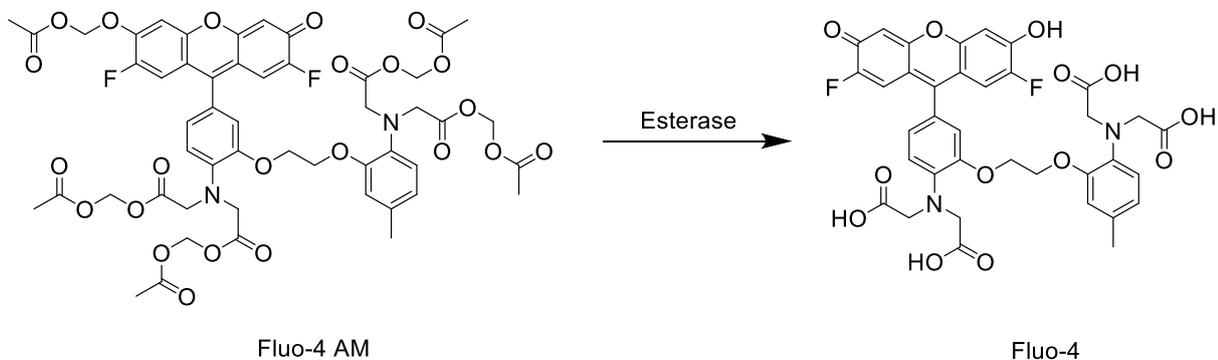


**Abbildung 53: Relative mRNA-Expression der differenzierten Kardiomyozyten.** HDII wurden in einem 12-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurde die mRNA der differenzierten Kardiomyozyten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der RT-qPCR quantifiziert. Mit Hilfe der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wurden die Werte auf die undifferenzierten hiPSC normiert (= 1). Als Referenzgen diente das Haushaltsgen GAPDH. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 3$  ermittelt. Die Statistik wurde durch einen einfachen Student t-Test bestimmt, wobei  $\star = p < 0,05$ .

Der kardiale Marker TNNI3 konnte mit einer 13,5-fachen  $\pm 0,22$  zur Kontrolle an Tag 17 detektiert werden. Oct-4 und Nanog wurden, gemäß den Erwartungen, an Tag 17 der Differenzierung nicht detektiert. In der Literatur wurde bereits eine erfolgreiche Differenzierung von Kardiomyozyten mit dem kardialen Marker TNNI3 verifiziert.<sup>328–330</sup> Anhand dieser Ergebnisse konnte eine Differenzierung in ausgereifte Kardiomyozyten bestätigt werden.

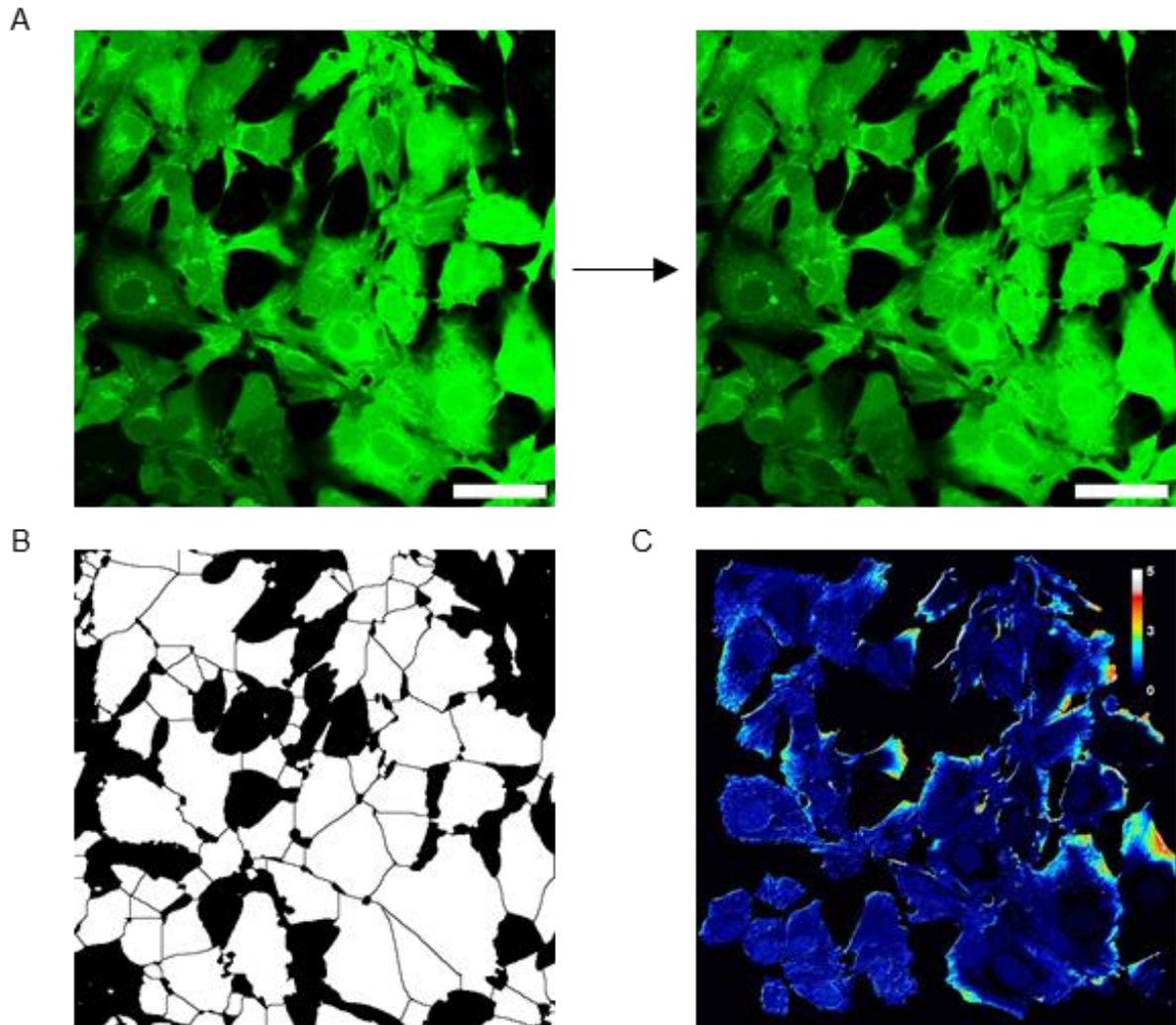
## 3.2.2.3 Visualisierung der Kontraktionen der differenzierten Kardiomyozyten

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spielen im Herzen eine große Rolle, da sie an der charakteristischen Kontraktionsbewegung des Herzens beteiligt sind. Wird ein Schwellenwert des einströmenden Calciums überschritten, wie in Kapitel 1.4.3 beschrieben, wird das Aktinfilament freigelegt und der Myosinkopf kann das Aktinfilament binden, woraufhin die Kontraktion durch eine Konformationsänderung durchgeführt werden kann.<sup>200,201</sup> Um den Calcium-Strom innerhalb der Kardiomyozyten und deren Aktivität zu verfolgen, wurde ein *Calcium Imaging* durchgeführt. Hierfür wurde Fluo-4 verwendet, welches ein grün fluoreszierendes  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Molekül ist und häufig als Indikator Verwendung findet.<sup>331</sup> Fluo-4 AM kann ungehindert die Zellmembran passieren und wird innerhalb der Zelle durch intrazelluläre Esterasen in das fluoreszierende Fluo-4 metabolisiert (Abbildung 54). Durch die stark negative Polarisierung ist das Fluo-4 in der Lage intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden, woraufhin die Fluoreszenzintensität verstärkt wird.<sup>332,333</sup>



**Abbildung 54: Strukturformel von Fluo-4 AM und Fluo-4.** Durch intrazelluläre Esterasen kann das membrangängige Fluo-4 AM zu dem fluoreszierenden Fluo-4 metabolisiert werden.

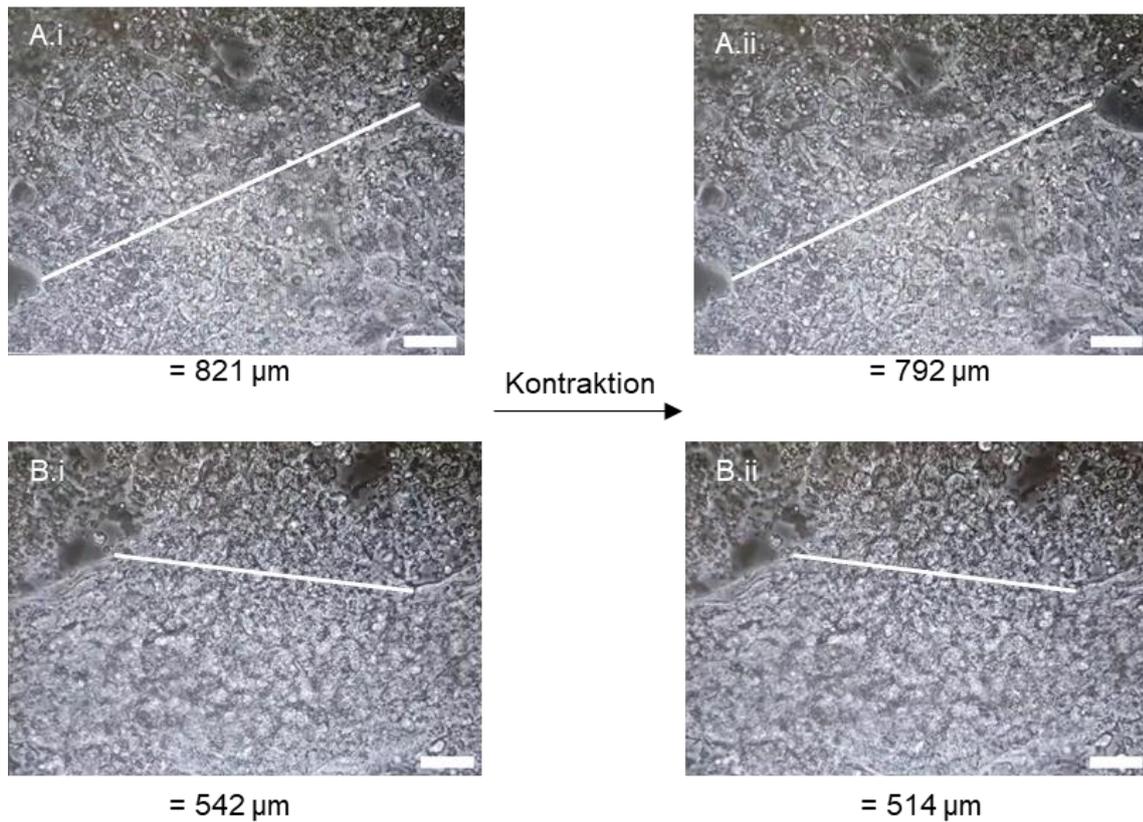
Um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom innerhalb der differenzierten Kardiomyozyten und damit die Kontraktionsrate mit Hilfe des *Calcium Imaging* zu visualisieren, wurden HDII, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurden die differenzierten Kardiomyozyten mit Fluo-4 AM behandelt. Mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie wurde die Fluoreszenz detektiert. Hierfür wurden Videosequenzen (15 min, 89 Bildfolgen) erstellt und diese mit der Software *ImageJ* in Kollaboration mit M. Sc. Hannah Wunderlich ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 dargestellt. Eine einheitliche Fluo-4-Markierung konnte in den differenzierten Kardiomyozyten festgestellt werden. Durch die Maximalüberlagerung der Fluoreszenzintensitäten wurde ein Z-Stack erzeugt und unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten waren in den Zellen zu erkennen. Innerhalb der Zellen wurde eine Fluoreszenz jedoch keine Fluoreszenzänderung detektiert. Eine hohe Fluoreszenzänderung wurde vorwiegend an den Rändern der Zellen detektiert, was auf den Calcium-Strom zwischen zwei benachbarten Zellen während der Kontraktion zurückzuführen ist. Um eine synchrone Kontraktion der differenzierten Kardiomyozyten zu gewährleisten, muss das neuronale Signal zwischen den benachbarten Kardiomyozyten weitergeleitet werden, weshalb die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration dort am höchsten ist.<sup>334</sup>



**Abbildung 55: Calcium Imaging der differenzierten Kardiomyozyten.** HDII wurden in einem 12-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurden die differenzierten Kardiomyozyten mit Fluo-4 AM behandelt. Mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (Leica Stellaris 5,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 494 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 516 nm) konnten Videosequenzen (15 min, 89 Bildfolgen) generiert werden. Die Rohdaten wurden mit der Software *ImageJ* ausgewertet. (A) zeigt die Fluo-4 Verteilung und Änderung der Fluoreszenzintensität in den differenzierten Kardiomyozyten. (B) zeigt die *region of interest* (ROI)-Einteilung und (C) einen Z-Stack der maximalen Überlagerung der Fluoreszenzänderungen während der Aufnahme wobei 0 (Blau) = keine Änderung und 5 (Weiß) = maximale Änderung der Fluoreszenzintensität. In Kollaboration mit M Sc. Hannah Wunderlich. Der Maßstab entspricht 25  $\mu\text{m}$ .

Mit Hilfe von Videoaufnahmen an einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL LED) konnten zudem die charakteristischen Kontraktionen der differenzierten Kardiomyozyten visualisiert werden. Durch die Software *ImageJ* konnten die zellulären Strukturen vor und während der Kontraktion ausgemessen werden. Es konnte eine Verkürzung der zellulären Strukturen um 29  $\mu\text{m}$  von 821  $\mu\text{m}$  vor der Kontraktion auf 792  $\mu\text{m}$  während der Kontraktion ermittelt werden. An einer anderen Stelle konnte eine Verkürzung von 28  $\mu\text{m}$  von 542  $\mu\text{m}$  auf 514  $\mu\text{m}$  ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 dargestellt.

Anhand des *Calcium Imagings* sowie der gemessenen Verkürzung der zellulären Strukturen konnte die Kontraktion der Kardiomyozyten visualisiert werden.



**Abbildung 56: Visualisierung der kontrahierenden differenzierten Kardiomyozyten.** HDII wurden in einem 12-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurden Videos mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL LED) aufgenommen und anschließend einzelne Bildsequenzen aus den Videos dargestellt. (i) vor der Kontraktion, (ii) während der Kontraktion. Mit *ImageJ* wurden die zellulären Strukturen ausgemessen. Die  $\mu\text{m}$ -Angaben unter den Aufnahmen entsprechen jeweils der Länge der in weiß eingezeichneten Distanz. Der Maßstab entspricht  $100\ \mu\text{m}$ .

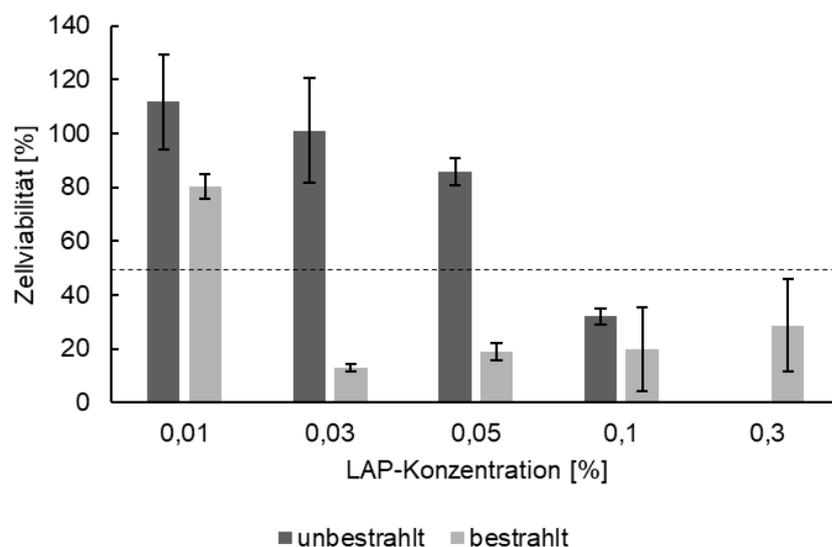
### 3.2.3 Verwendung von semi-synthetischen Hydrogelen für die Anwendung mit hiPSC

In Kapitel 3.2.2 konnten humane Kardiomyozyten aus hiPSC generiert werden. Die Kardiomyozyten besaßen eine Kontraktionsfähigkeit und wurden positiv auf kardiale Marker getestet. Durch diese Ähnlichkeit an die Kardiomyozyten *in vivo* sollte die Eignung der gelatinebasierten Hydrogele zum Aufbau einer 3D-Kultur mit den differenzierten Kardiomyozyten untersucht werden. Es wurden die Hydrogele eingesetzt, die zuvor in Kapitel 3.1.3.6 für den Aufbau der Kokultur von HCM und HCF verwendet wurden.

### 3.2.3.1 Untersuchung der Toxizität des Photoinitiators auf hiPSC und auf differenzierte Kardiomyozyten

Um die Vernetzung innerhalb der Hydrogele zu induzieren, wird ein Photoinitiator eingesetzt, der bei der Bestrahlung mit UV-Licht in Radikale zerfällt. Da diese eingesetzten Photoinitiatoren häufig eine toxische Wirkung auf Zellen zeigen, wurde ein Zytotoxizitätstest mit Hilfe eines MTT-Assays durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog wie in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben.

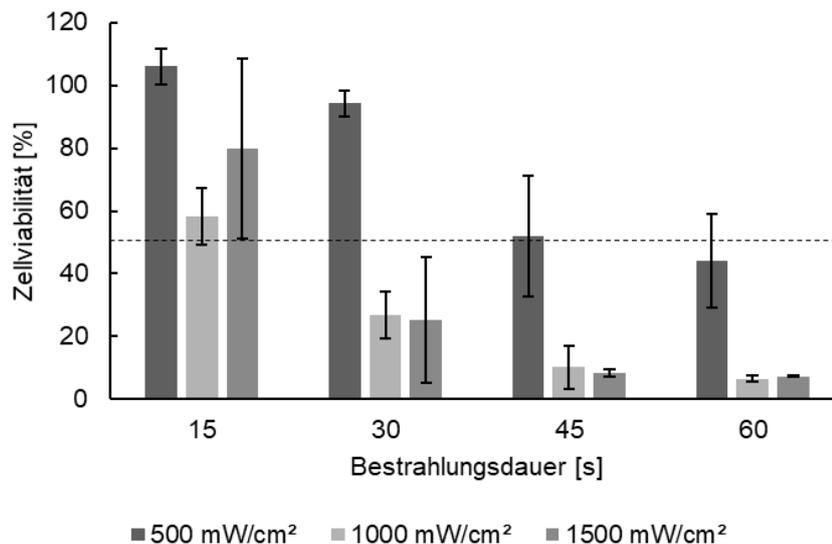
Da zunächst eine Differenzierung innerhalb der Hydrogele durchgeführt werden sollte, wurde die Toxizität des Photoinitiators LAP auf die hiPSC Linie HDII untersucht. Hierfür wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml in eine 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an LAP. In einem zweiten Ansatz wurde nach der Behandlung mit LAP eine zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht für 30 s bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniculture S2000, 320-500 nm) durchgeführt. Dies wurde für 72 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit Hilfe eines MTT-Assays die Zellviabilität quantifiziert. Es konnte eine hohe Zellviabilität ohne die zusätzliche Bestrahlung mit UV-Licht erzielt werden, da der Photoinitiator nicht in der radikalischen Form vorlag (Abbildung 57). Erst ab einer Konzentration von 0,1 % fiel die Zellviabilität unter 50 %, wobei der  $\text{LD}_{50}$ -Wert bei 0,14 % lag. Bei einer zusätzlichen Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s bei  $500 \text{ mW/cm}^2$ , bei der der Photoinitiator in Radikale zerfällt, war eine deutlich niedrigere Zellviabilität detektierbar. Ab einer Konzentration von 0,03 % LAP fiel die Zellviabilität unter 50 %. Die generierten freien Radikale haben die Möglichkeit mit Zellkomponenten wie Proteinen oder Nukleinsäuren zu reagieren und somit die Zellviabilität zu verringern.<sup>335</sup>



**Abbildung 57: Zytotoxizität des Photoinitiators LAP auf HDII.**  $1 \cdot 10^4$  HDII wurden in mTeSR Plus™ auf Matrigel hESC-beschichtete Wells ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen LAP-Konzentrationen behandelt. In einem gesonderten Ansatz erfolgte zusätzlich nach Behandlung der Zellen mit dem Photoinitiator eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s mit einer Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  (Omniculture S2000, 320-500 nm). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet.

Der Einfluss der UV-Strahlung ohne den Einsatz des Photoinitiators wurde in einem gesonderten Ansatz betrachtet. Hierbei wurden analog zu dem vorherigen Toxizitätstest die Zellen ausgesät und anschließend mit unterschiedlichen Leistungsdichten ( $500 \text{ mW/cm}^2$ ,  $1000 \text{ mW/cm}^2$ ,  $1500 \text{ mW/cm}^2$ ) und unterschiedlichen Bestrahlungsdauern (15 s, 30 s, 45 s, 60 s) bestrahlt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 dargestellt. Für die geringste Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  konnte eine hohe Viabilität der Zellen detektiert werden. Lediglich bei einer Bestrahlungsdauer von 60 s fiel die Zellviabilität unter 50 %. Der errechnete  $LD_{50}$ -Wert lag hierbei bei 53,31 s. Der Einsatz der anderen beiden eingesetzten Leistungsdichten ( $1000 \text{ mW/cm}^2$  und  $1500 \text{ mW/cm}^2$ ) zeigten ähnliche Verhaltensweisen. So war die Zellviabilität bei einer Bestrahlungsdauer von 15 s noch über einem Wert von 50 %, wobei bei allen anderen Bestrahlungsdauern diese auf unter 50 % abfiel und nach 60 s kaum noch viable Zellen detektiert werden konnten. Der  $LD_{50}$ -Wert lag hierbei bei 16,05 s für  $1000 \text{ mW/cm}^2$  und bei 24,79 s für  $1500 \text{ mW/cm}^2$ . Da jedoch für die Vernetzung von GelMA 30 s und für die Vernetzung von GelNB/GelS 15 s bei einer Leistungsdichte von  $500 \text{ mW/cm}^2$  eingesetzt wurden, wurde dies nicht als Faktor, der die Zellviabilität verringert, angesehen.

Eine Differenzierung zu Kardiomyozyten und anschließende Einbettung innerhalb der Hydrogele wurde bevorzugt, aufgrund der geringen Zellviabilität der HDII bei einer Behandlung mit 0,3 % oder 0,03 % LAP, den Konzentrationen, die bei der Vernetzung von GelMA oder GelNB/GelS eingesetzt werden.

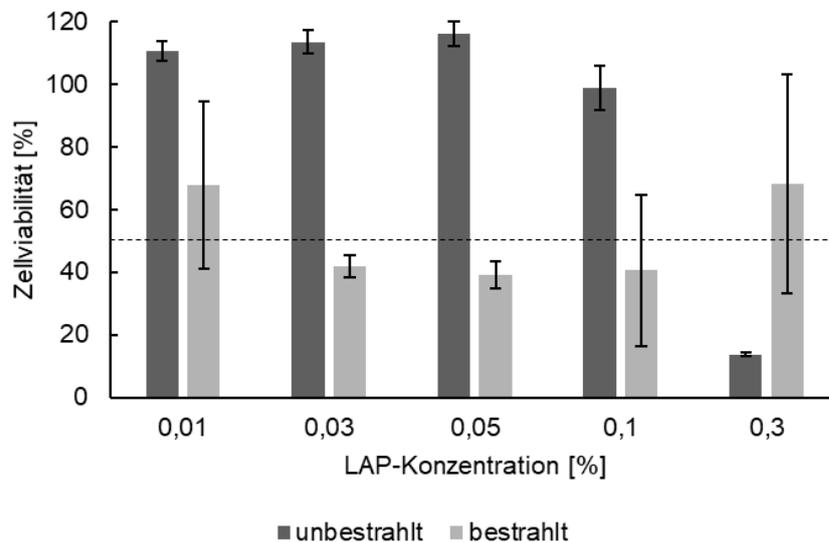


**Abbildung 58: Zytotoxizität der Leistungsdichte sowie der Bestrahlungsdauer auf HDII.**  $1 \cdot 10^4$  HDII wurden in mTeSR Plus™ auf Matrigel hESC-beschichtete Wells ausgesät und nach 24 h unterschiedlichen Leistungsdichten sowie unterschiedlichen Bestrahlungsdauern ausgesetzt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet.

Da die Toxizität des Photoinitiators im Zusammenhang mit der Bestrahlung mit UV-Licht die Zellviabilität in den für die Vernetzung der Hydrogele eingesetzten Konzentrationen minimierte, wurde die Zellviabilität bei der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des LAP auf die differenzierten Kardiomyozyten untersucht. Hierfür wurde die Differenzierung nach Kapitel 3.2.2 durchgeführt, an Tag 17 mit dem STEMdiff™ *Cardiomyocyte Dissociation Kit* abgelöst und  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden zunächst für

24 h im *Support*-Medium kultiviert. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen des Photoinitiators LAP, verdünnt in *Maintenance* Medium. In einem gesonderten Ansatz wurde zusätzlich zu der Behandlung mit LAP für 30 s mit 500 mW/cm<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt (Omicure S2000, 320-500 nm).

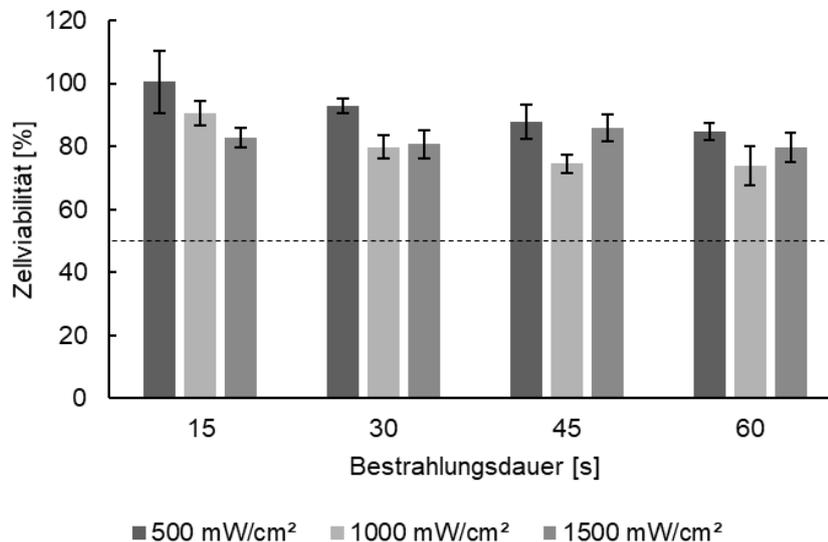
Die Ergebnisse des MTT-Assays sind in Abbildung 59 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zellen bei dem unbestrahlten Ansatz, bei der nur die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an LAP erfolgte, über alle Konzentrationen, mit Ausnahme von 0,3 %, eine hohe Viabilität aufwiesen. Bei einer Erhöhung der Konzentration von 0,1 % auf 0,3 % fiel die Viabilität ab. Der LD<sub>50</sub>-Wert lag bei 0,21 % LAP. Bei der zusätzlichen Bestrahlung mit UV-Licht konnte kein klarer Trend erkannt werden. Zunächst lag die Viabilität der Kardiomyozyten über 50 % bei 0,01 % LAP, bei den Konzentrationen 0,03 %, 0,05 % und 0,1 % lag die Viabilität unter 50 %. Schlussendlich stieg die Zellviabilität bei einer Konzentration von 0,3 % LAP wieder auf fast 70 % an.



**Abbildung 59: Zytotoxizität des Photoinitiators LAP auf differenzierte Kardiomyozyten.**  $1 \cdot 10^4$  Kardiomyozyten wurden in *Support*-Medium in Matrigel hESC-beschichtete Wells ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen LAP-Konzentrationen in *Maintenance* Medium behandelt. In einem gesonderten Ansatz erfolgte zusätzlich nach Behandlung der Zellen mit dem Photoinitiator eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s mit einer Leistungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> (Omicure S2000, 320-500 nm). Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet.

Analog wurde der Zytotoxizitätstest, um den Einfluss der Leistungsdichte und der Bestrahlungsdauer zu untersuchen, mit den differenzierten Kardiomyozyten durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden, wie zuvor beschrieben, ausgesät und zunächst in *Support*-Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch *Maintenance* Medium ausgetauscht und es erfolgte die Bestrahlung mit unterschiedlichen Leistungsdichten und unterschiedlichen Bestrahlungsdauern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 60 aufgeführt. Die differenzierten Kardiomyozyten zeigten bei allen Leistungsdichten und allen Bestrahlungsdauern eine hohe Zellviabilität. Die Zellviabilität fiel nicht unter 50 %. Dies wurde als idealer Ausgangspunkt für eine Einbettung der differenzierten Kardiomyozyten gesehen, da das UV-Licht keinen Einfluss auf die Zellviabilität auszuüben schien.

Zusammenfassend verminderten der Photoinitiator LAP sowie die Bestrahlung mit UV-Licht die Zellviabilität der Stammzellen HDII. Auf die differenzierten Zellen zeigten der Photoinitiator LAP und die Bestrahlung mit UV-Licht einen weniger toxischen Effekt, weshalb sich im Folgenden auf die Einbettung der differenzierten Kardiomyozyten fokussiert wurde.



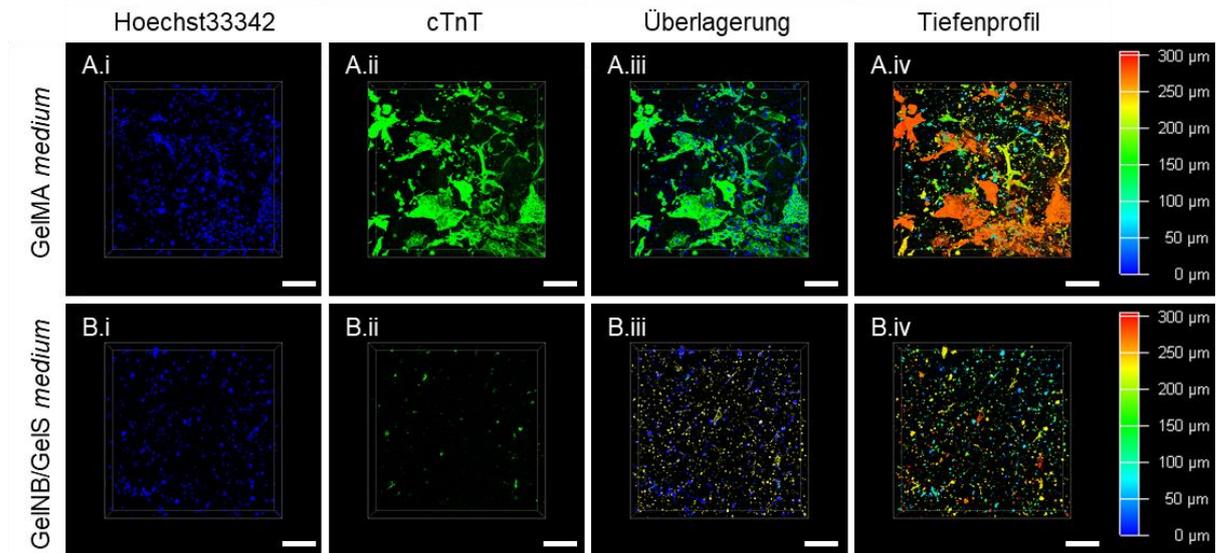
**Abbildung 60: Zytotoxizität der Leistungsdichte sowie der Bestrahlungsdauer auf differenzierte Kardiomyozyten.**  $1 \cdot 10^4$  Kardiomyozyten wurden in *Support*-Medium auf Matrigel hESC-beschichtete Wells ausgesät und nach 24 h unterschiedlichen Leistungsdichten sowie unterschiedlichen Bestrahlungsdauern ausgesetzt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT-Assays ausgewertet.

### 3.2.3.2 3D-Kultivierung der differenzierten Kardiomyozyten im Hydrogel

Bereits in vorherigen Experimenten haben sich die *medium*-Hydrogele als vielversprechend herausgestellt, weshalb sich bei der Einbettung der differenzierten Kardiomyozyten auf GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* fokussiert wurde. Hierfür wurden die Kardiomyozyten nach dem Protokoll aus Kapitel 3.2.2 aus hiPSC der Linie HDII differenziert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des STEMdiff™ *Cardiomyocyte Dissociation Kit* abgelöst und  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 200  $\mu$ l Hydrogel in einem Well eines ibidi  $\mu$ -Slide eingekapselt und die Hydrogele zur Vernetzung bestrahlt. Die Zellen wurden für 24 h in *Support*-Medium kultiviert. Es folgte eine Kultivierung über einen Zeitraum von 28 Tagen in *Maintenance* Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Nach 28 Tagen wurden die 3D-Kulturen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde eine immunhistochemische Markierung der Kardiomyozyten mit cTnT durchgeführt. Dies erfolgte analog zur cTnT-Markierung in Kapitel 3.2.2.1. Zudem wurden die Zellkerne mit Hoechst33342 markiert. Mit Hilfe von konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Stellaris 5) wurde die Markierung der differenzierten Kardiomyozyten visualisiert (Abbildung 61).

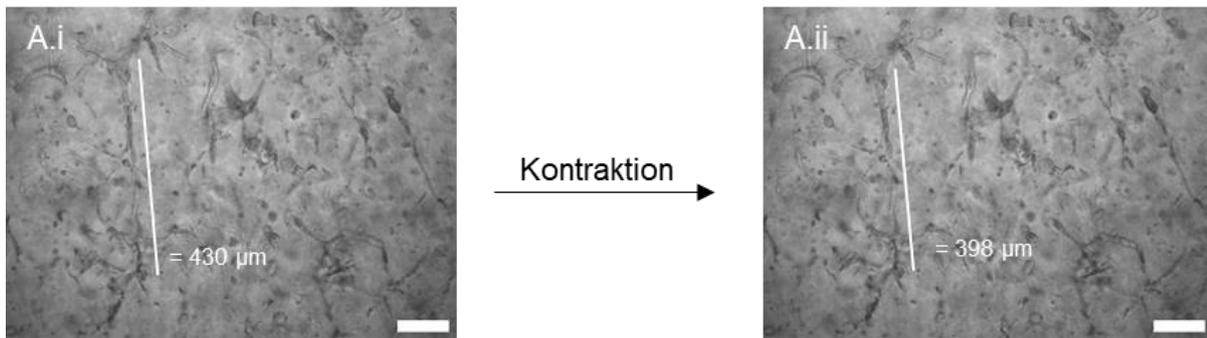
Die Auswertung der Immunfluoreszenzmarkierung ergab, dass die Zellen im GelMA *medium* im Vergleich zum GelNB/GelS *medium* eine deutliche zelluläre Ausrichtung zeigten. Im GelNB/GelS *medium* wurden lediglich runde Zellen ohne Streckung detektiert. Dennoch haben sich die Zellen innerhalb des GelNB/GelS *medium* an die RGD-Domänen der Gelatine

gebunden, da durch das Tiefenprofil eine homogene Verteilung der Zellen über eine Höhe von 300  $\mu\text{m}$  gezeigt werden konnte. Außerdem fand eine Markierung mit cTnT statt, was auf eine Einbettung der differenzierten Kardiomyozyten innerhalb des GelNB/GelS *medium* schließen lässt. Im GelMA *medium* waren zelluläre Ausläufer und zudem eine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen den Kardiomyozyten zu erkennen. Außerdem war eine Kontraktion der Zellen innerhalb des Hydrogels vorhanden. Das Tiefenprofil zeigte zudem, dass die Zellen homogen über die 300  $\mu\text{m}$  verteilt waren und an die Adhäsionsdomänen der Gelatine gebunden haben. Auch in tieferen Ebenen zeigten die Zellen eine zelluläre Ausrichtung sowie eine Kontraktion.



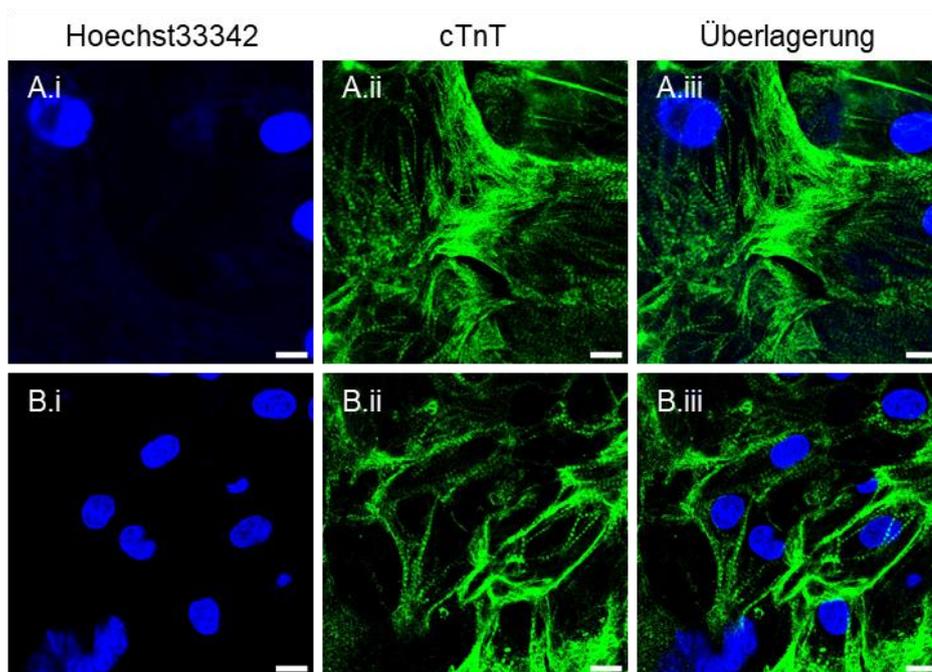
**Abbildung 61: Immunfluoreszenzmarkierung der differenzierten Kardiomyozyten in Hydrogelen.**  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden mit den Hydrogelen gemischt, mit 0,3 % oder 0,03 % LAP versetzt und 200  $\mu\text{l}$  in einem Well eines ibidi  $\mu$ -Slides vernetzt (30/15 s, 320-500 nm, Omnicure S2000, 500 mW/cm<sup>2</sup>). Zunächst wurden die Zellen für 24 h in *Support-Medium* kultiviert und anschließend in *Maintenance Medium*. Über 28 Tage wurden die Zellen kultiviert und anschließend fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit cTnT (Anti-cTnT aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 405 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 415-480 nm); (ii) cTnT, Grün (Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500-550 nm); (iii) Überlagerung; (iv) Tiefenprofil. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Daraus konnten Z-Stacks ( $h = 300 \mu\text{m}$ , Abstand = 5  $\mu\text{m}$ ) erzeugt werden. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstab entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Es konnten anhand von Videos die Kontraktionen der Zellen visualisiert werden. Mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL LED) konnten Videosequenzen (220 Bilder in 15 s) erzeugt werden. Aus diesen Videos wurden einzelne Bildsequenzen entnommen, um die Kontraktion zu visualisieren (Abbildung 62). Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurde anschließend die Distanz der Zellausläufer gemessen. Es konnte ermittelt werden, dass vor der Kontraktion die Zellausläufer eine Distanz von 430  $\mu\text{m}$  aufwiesen und während der Kontraktion sich um 32  $\mu\text{m}$  auf 398  $\mu\text{m}$  verkürzten. Dies verifiziert die charakteristische Kontraktion der differenzierten Kardiomyozyten innerhalb des GelMA *medium*.



**Abbildung 62: Abbildungen der kontrahierenden differenzierten Kardiomyozyten innerhalb des GelMA-Hydrogels.**  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden mit den Hydrogelen gemischt, mit 0,3 % LAP versetzt und 200  $\mu$ l in einem Well eines ibidi  $\mu$ -Slides vernetzt (30 s, 320-500 nm, Omnicure S2000, 500 mW/cm<sup>2</sup>). Zunächst wurden die Zellen für 24 h in *Support-Medium* kultiviert und anschließend in *Maintenance Medium*. Über 28 Tage wurden die Zellen kultiviert. Dabei wurden Videos mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL LED) aufgenommen und anschließend einzelne Bildsequenzen aus den Videos dargestellt. (i) vor der Kontraktion, (ii) während der Kontraktion. Mit *ImageJ* wurden die zellulären Ausläufer gemessen. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

Um eine höhere Auflösung der Zellen zu bekommen, wurden zudem Aufnahmen mit einer größeren Vergrößerung aufgenommen. Wie zuvor bei der Antikörpermarkierung der Kardiomyozyten in 2D war auch in 3D die charakteristische quergestreifte Muskulatur zu erkennen (Abbildung 63).



**Abbildung 63: Immunfluoreszenzmarkierung der aus hiPSC differenzierten Kardiomyozyten im GelMA-Hydrogel.** HDII wurden in einem 12-Well mit Matrigel hESC-Beschichtung zu Kardiomyozyten differenziert. Nach 17 Tagen Differenzierung wurden die differenzierten Kardiomyozyten mit Hilfe des STEMdiff™ *Cardiomyocyte Dissociation Kit* abgelöst und  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 200  $\mu$ l GelMA *medium* eingebettet. Nach einer Kultivierung von 28 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit cTnT (Anti-cTnT aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{ex}$ : 405 nm,  $\lambda_{em}$ : 415-480 nm); (ii) cTnT, Grün (Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Maus,  $\lambda_{ex}$ : 488 nm,  $\lambda_{em}$ : 500-550 nm); (iii) Überlagerung. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Der Maßstab entspricht 10  $\mu$ m.

Die differenzierten Kardiomyozyten konnten somit erfolgreich 3D in einem GelMA *medium*-Hydrogel kultiviert werden und zeigten die Eigenschaften, die Kardiomyozyten *in vivo* aufzeigen. Basara *et al.* konnten bereits hiPSC-differenzierte Kardiomyozyten in GelMA erfolgreich kultivieren. Die Kontraktionsgeschwindigkeit und -frequenz der differenzierten Kardiomyozyten konnte zusätzlich erhöht werden, indem das erzeugte *Patch* auf einer bereits schlagenden Schicht aus hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten in 2D kultiviert wurde.<sup>336</sup> Zhang *et al.* zeigten eine erfolgreiche Kultivierung von hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten auf GelMA, um ein Herzgewebe in einem *heart-on-a-chip* zu etablieren.<sup>337</sup> Im GelMA *medium* konnte ein Gewebekonstrukt aus hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten generiert werden, was vielversprechend für die Entwicklung eines myokardialen Modells in einem gelatine-basierten Hydrogel ist.

### 3.2.3.3 Kokultur mit HCF

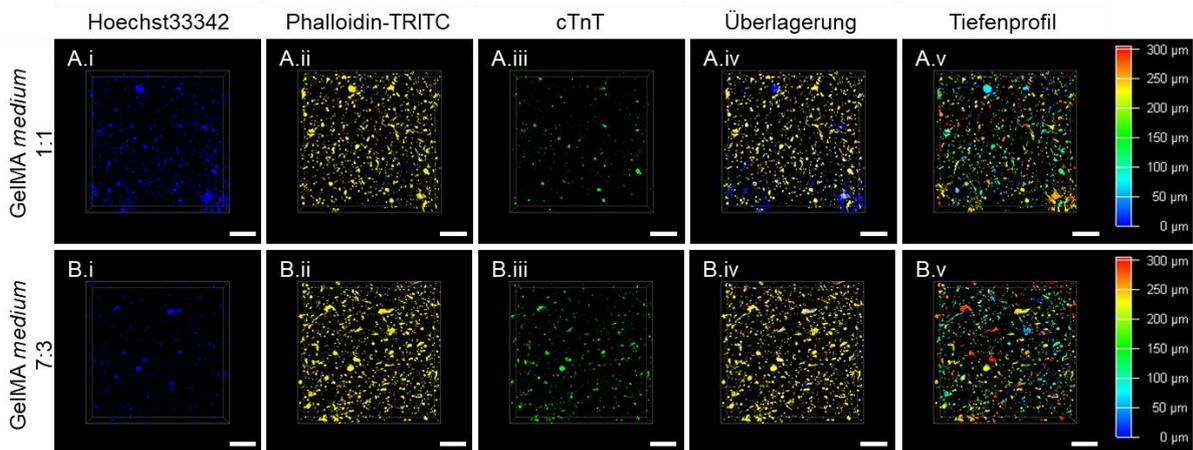
Im Herzmuskel stehen die Kardiomyozyten häufig in Kontakt mit Fibroblasten, weshalb bereits in Kapitel 3.1.3.6 Untersuchungen in Bezug auf die Kokultur zwischen HCM und HCF durchgeführt wurden. Da die HCM jedoch primäre Zellen sind, die nicht vollständig differenziert sind, da sie sonst keine Teilungsfähigkeit mehr aufweisen würden, wurden aus hiPSC Kardiomyozyten differenziert, die die charakteristische Kontraktion aufzeigten, im Gegensatz zu den HCM. Um die beiden Kokulturen miteinander vergleichen zu können, wurde das Experiment analog mit den differenzierten Kardiomyozyten durchgeführt.

Die Kardiomyozyten wurden, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, differenziert und mit Hilfe des STEMdiff™ *Cardiomyocyte Dissociation Kit* an Tag 17 abgelöst. Anschließend wurden die Kardiomyozyten mit den HCF in einem Verhältnis von 1:1 oder 3:7 gemischt (Gesamtzellzahl:  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und in dem Hydrogel GelMA *medium* eingebettet. Es wurde zunächst ein FGM-3:*Support*-Medium mit einem Verhältnis von 1:1 als Kultivierungsmedium verwendet und nach 24 h wurden die Kokulturen in FGM-3:*Maintenance* Medium 1:1 kultiviert, um die Versorgung beider Zellarten mit ihrem zellspezifischen Medium zu gewährleisten. Nach 23 Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und unspezifische Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit cTnT durchgeführt. Die Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte analog wie in Kapitel 3.2.2.1. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-TRITC markiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem inversen Konfokalmikroskop (Stellaris 5).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierung sind in Abbildung 64 dargestellt. Die Phalloidin-TRITC-Färbung markiert die Aktinzytoskelette jeder Zelle, weshalb hierdurch keine Unterscheidung der Zelltypen erfolgen kann. Jedoch markiert das cTnT lediglich die Kardiomyozyten, weshalb durch einen Vergleich der Phalloidin-TRITC-Färbung und der cTnT-Markierung unterschieden werden konnte, ob es sich um HCF oder differenzierte Kardiomyozyten handelte. Es wurde ausschließlich das Hydrogel GelMA *medium* verwendet, da mit diesem Hydrogel die besten Ergebnisse bei der Kultivierung der differenzierten Kardiomyozyten erzielt werden konnten. Unabhängig von dem Verhältnis der Zellen konnten weniger starke Zellausrichtungen detektiert werden im Vergleich mit der Kultivierung der

differenzierten Kardiomyozyten ohne eine zusätzliche Zellart. Jedoch wurde auch eine Mischung beider zellspezifischen Kultivierungsmedien verwendet, was möglicherweise zu einer schlechteren Versorgung der Kardiomyozyten mit notwendigen Nährstoffen geführt haben kann. Es konnten leichte zelluläre Ausrichtungen der HCF detektiert werden und bei einem Verhältnis von HCF:Kardiomyozyten 7:3 auch leichte bei den Kardiomyozyten. Zudem konnten Kontraktionen einzelner Kardiomyozyten innerhalb der Kokultur visuell beobachtet werden. Eine homogene Verteilung und eine Adhäsion der Zellen an den RGD-Domänen der Gelatine konnte durch das Tiefenprofil bestätigt werden.

Bereits Gartner *et al.* untersuchten die Kokultur von HCF mit hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten im GelMA-Hydrogel. Es wurden unterschiedliche Gesamtzellzahlen sowie unterschiedliche Verhältnisse zwischen den HCF und den differenzierten Kardiomyozyten eingesetzt. Die erfolgreichsten Ergebnisse wurden mit einer Gesamtzellzahl von  $28 \cdot 10^6$  Zellen/ml oder  $50 \cdot 10^6$  Zellen/ml und einem prozentualen Anteil von 70-80 % an differenzierten Kardiomyozyten erzielt.<sup>338</sup> In der in dieser Arbeit durchgeführten Kokultur wurde ein höherer prozentualer Anteil an HCF eingesetzt, was in zukünftigen Experimenten reduziert werden kann. Außerdem wurde eine Gesamtzellzahl von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingesetzt, welche geringer ist als die von Gartner *et al.* Diese kann zukünftig erhöht werden, damit mehr Zell-Zell-Kontakte geknüpft werden können. Außerdem wurde in der Literatur bereits gezeigt, dass eine Kokultur mit Endothelzellen die Reifung von hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten fördern kann.<sup>339</sup> Die gezielte Kokultur von hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen konnte bereits bei Transplantationen eingesetzt werden und erhöhte die Überlebensrate und Proliferation von hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten im Vergleich zur Einzelkultur der Kardiomyozyten. Außerdem konnte eine Prävascularisierung des artifiziellen Herzgewebes erzielt werden.<sup>340</sup>



**Abbildung 64: Immunfluoreszenzmarkierung der Kokultur von Kardiomyozyten und HCF in Hydrogelen.** Differenzierte Kardiomyozyten und HCF wurden in unterschiedlichen Verhältnissen (3:7 und 1:1) und einer Zellkonzentration von  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit dem Hydrogel GelMA *medium* gemischt, mit 0,3 % LAP versetzt und einem Well eines ibidi  $\mu$ -Slides vernetzt (30 s, 320-500 nm, Omnicure S2000, 500 mW/cm<sup>2</sup>). Über 23 Tage wurden die Zellen in FGM-3:*Maintenance* Medium 1:1 kultiviert und anschließend fixiert, permeabilisiert und die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Anschließend konnte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit cTnT (Anti-cTnT aus der Maus) durchgeführt werden. (i) Hoechst33342, Blau ( $\lambda_{ex}$ : 405 nm,  $\lambda_{em}$ : 415-480 nm); (ii) Phalloidin-TRITC, Gelb ( $\lambda_{ex}$ : 532 nm,  $\lambda_{em}$ : 545-625 nm); (iii) cTnT, Grün (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Ziege anti-Maus,  $\lambda_{ex}$ : 488 nm,  $\lambda_{em}$ : 500-550 nm); (iv) Überlagerung; (v) Tiefenprofil. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5). Daraus konnten Z-Stacks (Höhe= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) erzeugt werden. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

Durch die Kokultur der hiPSC-differenzierten Kardiomyozyten mit Herzfibroblasten konnte ein Herzgewebe konstruiert werden, welches nach einigen Optimierungsmaßnahmen eingesetzt werden kann, um Krankheiten zu modellieren oder für *Medical Drugscreenings* eingesetzt werden kann. Durch die Erweiterung mit Endothelzellen kann zukünftig ein transplantierfähiges Herzgewebe generiert werden.

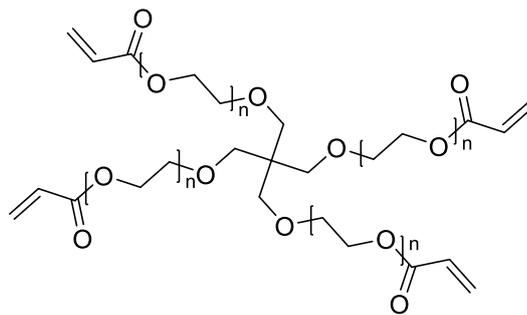
### 3.2.4 Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) der Linie HDII benutzt, um differenzierte Kardiomyozyten zu generieren. Es wurde zunächst die Pluripotenz der Stammzellen durch eine Immunfluoreszenzmarkierung validiert. Die HDII zeigten die typische Morphologie und konnten erfolgreich mit den Pluripotenzmarkern Oct-4 und Nanog markiert werden. Anschließend konnte mit Hilfe des STEMdiff™ *Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit* von StemCell™ eine erfolgreiche Differenzierung der hiPSC zu humanen Kardiomyozyten durchgeführt werden. Durch die typische Kontraktionsfähigkeit der differenzierten Kardiomyozyten, einer erfolgreichen cTnT-Markierung und einer erhöhten Expression des kardialen Markers TNNI3 wurde die Differenzierung bestätigt. Die charakteristische quergestreifte Muskulatur konnte in den konfokalmikroskopischen Aufnahmen der differenzierten Kardiomyozyten erkannt werden. Zum Aufbau einer 3D-Kultur wurde der Photoinitiator LAP und UV-Licht eingesetzt, weshalb Zytotoxizitätstests mit den Stammzellen und den differenzierten Kardiomyozyten durchgeführt wurden. Die Behandlung mit LAP mit und ohne Bestrahlung sowie die Behandlung mit UV-Licht resultierten auf einer niedrigen Zellviabilität der Stammzellen. Die differenzierten Kardiomyozyten zeigten eine höhere Robustheit gegenüber der Exposition mit LAP oder UV-Licht, sodass ein Einsatz der differenzierten Kardiomyozyten für den Aufbau einer 3D-Kultur möglich war. Für die 3D-Kultur wurden GelMA *medium* und GelNB/GelS *medium* eingesetzt. GelMA *medium* zeigte eine cTnT-Markierung der differenzierten Kardiomyozyten und Zellausrichtungen. Es konnten die charakteristische quergestreifte Muskulatur detektiert werden und die eingebetteten differenzierten Kardiomyozyten zeigten Kontraktionen. Mit dem GelMA *medium* konnte erfolgreich eine 3D-Kultur mit den differenzierten Kardiomyozyten aufgebaut werden. In einer Kokultur mit humanen Herzfibroblasten (HCF) konnten zelluläre Ausläufer der HCF, jedoch keine der differenzierten Kardiomyozyten, detektiert werden. Zukünftig muss das Verhältnis der beiden Zellarten angepasst und das eingesetzte Kultivierungsmedium optimiert werden. Durch die zelluläre Netzwerkbildung der differenzierten Kardiomyozyten im GelMA *medium* wurde die Basis für die Entwicklung eines *in vitro* Herzgewebes gelegt, an dem zukünftig verschiedene Krankheitsmodelle induziert und Medikamentenscreenings durchgeführt werden können.

### 3.3 Hydrogele mit Doppelnetzwerken

Ein besonderer Fokus im *Tissue Engineering* liegt auf den Hydrogelen, welche aus Einzelnetzwerken (*engl. single networks*) über Polymervernetzungen zu einem einzigen Netzwerk verknüpft werden können. Dabei können diese Netzwerke ausschließlich physikalisch oder chemisch induziert werden.<sup>341</sup> Chemisch vernetzte Hydrogele weisen vorteilhafte Eigenschaften wie mechanische Stabilität und Strukturintegrität auf.<sup>342</sup> Häufig stellt die Herstellung von makroskopischen Hohlstrukturen jedoch ein Problem dar, da dies auf einem langen Fabrikationsprozess beruht, da beispielsweise bei vielen Hydrogelen ein schichtweises Verfahren eingesetzt wird, bei dem nach jedem Schritt eine Vernetzung erfolgen muss. Außerdem müssen niedrigviskose Materialien häufig für den extrusionsbasierten 3D-Biodruck gekühlt werden, was in einer Verringerung der Zellviabilität resultiert. Physikalisch vernetzte Hydrogele zeigen, im Vergleich zu den chemisch kovalent vernetzten Hydrogelen, durch die nicht-kovalente Vernetzung schwächere Wechselwirkungen auf. Dies resultiert meist in einer geringeren mechanischen Stabilität.<sup>343</sup> Jedoch ist die Reversibilität ein Vorteil der physikalisch vernetzten Hydrogele.<sup>344</sup> Zudem erfolgt eine direkte Vernetzung bei physikalischen Netzwerken.<sup>345,346</sup> Durch steigende Anforderungen an das Materialdesign und der 3D-Drucktechnologien können diese Einzelnetzwerke nicht immer allen gewünschten und geforderten Eigenschaften nachkommen. Daher werden immer häufiger sogenannte Mehrkomponenten-Hydrogele eingesetzt, die ein Doppelnetzwerk (*engl. double network*) aufweisen. Diese bestehen aus einem physikalisch vernetzten Teil und einem chemisch vernetzten Teil und somit aus zwei unterschiedlichen Arten an Vernetzungen innerhalb des Hydrogels. Dabei entstehen dabei zwischen den unterschiedlichen Netzwerken keine kovalenten Verbindungen.<sup>347-349</sup> Somit können die positiven Eigenschaften der beiden Einzelnetzwerke vereint werden. Als physikalisch vernetzter Teil werden häufig geladene Polymere eingesetzt, die durch unterschiedliche Ladungen elektrostatische Netzwerke ausbilden können. Hierbei werden verbreitet Polyelektrolyte verwendet, die an ein neutrales Rückgrat angeknüpft werden. Als neutrales Rückgrat dienen beispielsweise Polyethylenglykol (PEG) oder Polyvinylalkohol (PVA).<sup>350,351</sup> Häufig verwendete synthetische Polyelektrolyte sind Polystyrolsulfonsäure (*engl. polystyrene sulfonic acid*, PSS), Polyacrylsäure (*engl. polyacrylic acid*, PAA) sowie natürliche Polyelektrolyte wie Alginat oder Hyaluronsäure.<sup>352,353</sup> Sogenannte ABA-Triblockcopolymeren haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese Triblockcopolymeren bestehen aus einem neutral geladenen Mittelblock (B), welcher an den Seiten durch geladene Blöcke (A) umschlossen wird.<sup>354</sup> Neben den Triblockcopolymeren werden hierbei auch AB-Diblockcopolymeren verwendet, die nur auf einer Seite einen geladenen Block (A) besitzen.<sup>355</sup> Beim Mischen der unterschiedlich geladenen Polyelektrolyte in wässriger Lösung kommt es zu einer Netzwerkausbildung durch elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>356</sup> Diese Netzwerkdichte kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie beispielsweise durch die Kettenlänge der Blöcke und die Art der geladenen Gruppen. Dabei hat das ausgebildete Netzwerk Einfluss auf die Eigenschaften der Polyelektrolyt-Komplexe (*engl. polyelectrolyte complexes*, PEC), die Viskoelastizität und den mechanischen Eigenschaften.<sup>357</sup>

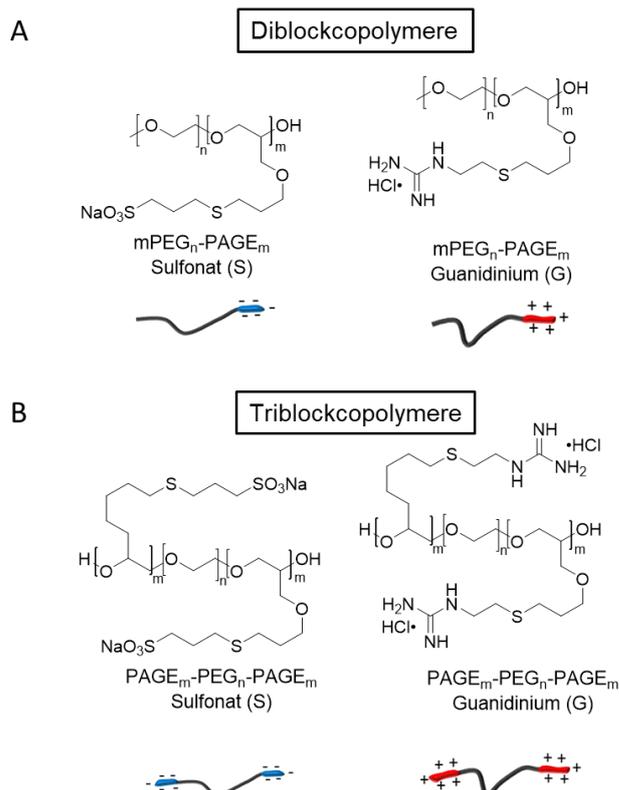
In der Arbeitsgruppe von Ass. Prof. Dr. Srivastava an der *University of California, Los Angeles* (UCLA) wurden Polyelektrolyt-Komplexe (engl. *polyelectrolyte complexes*, PEC) aus Tri- und Diblockcopolymeren auf Basis von Poly(allylglycidylether)<sub>m</sub>-poly(ethylenglykol)<sub>n</sub>-poly(allylglycidylether)<sub>m</sub> (PAGE<sub>m</sub>-PEG<sub>n</sub>-PAGE<sub>m</sub>) für die Triblockcopolyelektrolyte (TbPE) entwickelt. Für die Diblockcopolyelektrolyte (DbPE) wurde m-Polyethylenglykol (mPEG) an Stelle von PEG eingesetzt. Dies besitzt an einem Ende eine Methylgruppe anstatt einer Hydroxylgruppe. An den PAGE-Blöcken wurden jeweils Funktionalisierungen mit einer Sulfonatgruppe als Polyanion oder einer Guanidiniumgruppe als Polykation vorgenommen (Abbildung 66).<sup>358,359</sup> Um bereits ein Doppelnetzwerk mit den Triblockcopolymeren aufzubauen, wurden bereits Studien mit 4-arm Polyethylenglykolacrylat (4-arm PEGA) durchgeführt, dessen Strukturformel in Abbildung 65 dargestellt ist. Diese Experimente erwiesen sich als vielsprechend, da es möglich war, die Viskosität von zuvor niedrigviskosen Biotinten zu erhöhen und möglicherweise den 3D-Biodruck zu erleichtern, da es oft an einer hohen Viskosität von Biotinten mangelt und diese erst gekühlt werden müssen.<sup>360</sup> Dieses erzeugte Doppelnetzwerk-Hydrogel ist nicht für die Herstellung von zellbeladenen Biotinten geeignet, da PEG zellabweisend ist und die notwendigen Zelladhäsionsdomänen nicht vorhanden sind.<sup>361</sup>



4-arm Polyethylenglykolacrylat (4-arm PEGA)

**Abbildung 65: Strukturformel von 4-arm Polyethylenglykolacrylat (4-arm PEGA).**

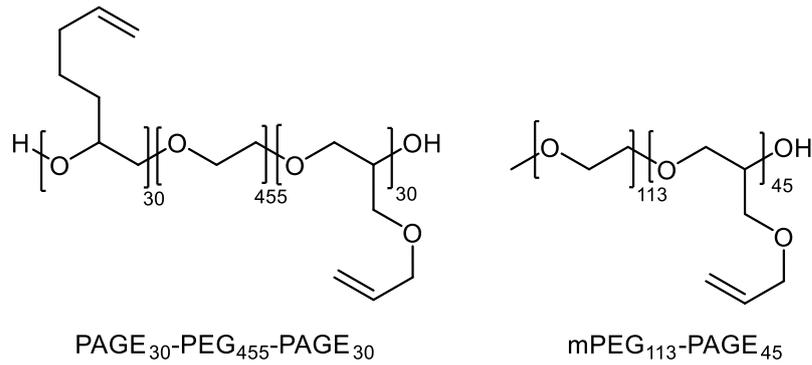
In Zusammenarbeit mit Dr. T. Göckler und Dr. D. Li (beide *Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Samueli School of Engineering, UCLA*) der Arbeitsgruppe von Ass. Prof. Dr. Srivastava wurden diese Blockcopolyelektrolyte (bPE) hergestellt, um sie mit weiteren semi-synthetischen Hydrogelen, wie beispielsweise Gelatinemethacrylat (GelMA), zu den oben beschriebenen Doppelnetzwerk-Hydrogelen zusammensetzten und diese für den 3D-Biodruck zu etablieren.



**Abbildung 66: Darstellung der unterschiedlich geladenen Polyelektrolyte.** Das Rückgrat der Polymere wird aus mPEG<sub>n</sub>-PAGE<sub>m</sub> für die Diblockcopolymer (A) oder aus PAGE<sub>m</sub>-PEG<sub>n</sub>-PAGE<sub>m</sub> für die Triblockcopolymer (B) gebildet. Die Sulfonatgruppe definiert die negativ geladenen Polyelektrolyte und die Guanidiniumgruppe die positiv geladenen Polyelektrolyte.

### 3.3.1 Synthese der Blockcopolyelektrolyte

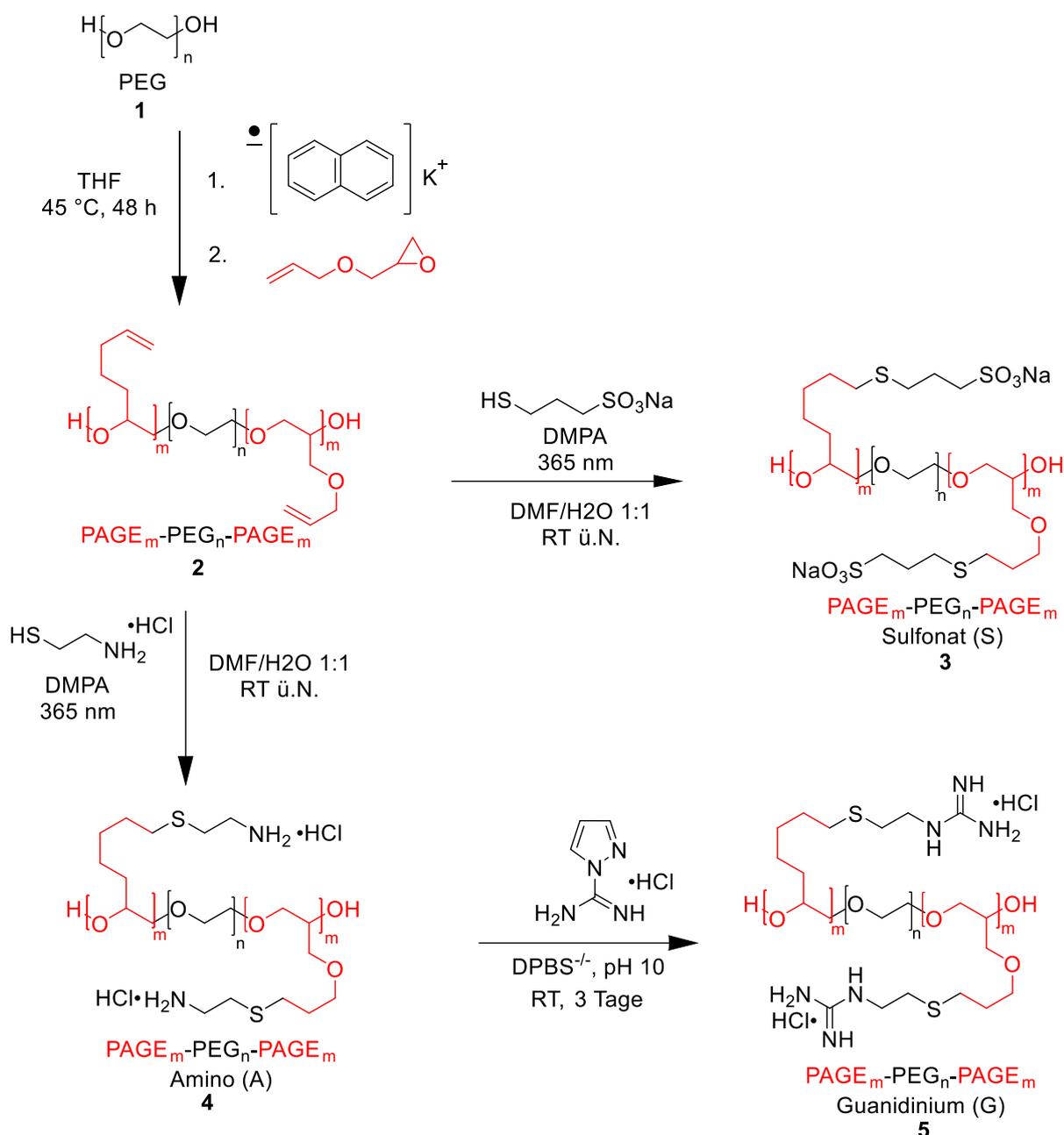
Die Synthese der Blockpolymere (PAGE-PEG-PAGE oder mPEG-PAGE) für die Polyelektrolyt-Komplexe erfolgte nach einer anionischen Ringöffnungsreaktion.<sup>356</sup> Der Ablauf der gesamten Synthese ist in Schema 11 dargestellt. Zunächst wurde das eingesetzte PEG ( $M = 20.000 \text{ g/mol}$ ) in THF gelöst und mit Kaliumnaphthalid titriert (0,4 M in THF), bis die Lösung eine hellgrüne Farbe aufwies. Anschließend wurde das benötigte Volumen an Allylglycidylether (AGE) hinzugegeben und die Reaktion für 48 h bei 45 °C gerührt. Alle Schritte wurden in einer *glove box* durchgeführt, um den Einfluss von Sauerstoff und von weiteren Umwelteinflüssen zu vermeiden. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde entgastes Methanol der Reaktion hinzugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Das Reaktionsprodukt wurde in Hexan ausgefällt und anschließend filtriert und getrocknet. Der Funktionalisierungsgrad der Blockcopolymer wurde über Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie (<sup>1</sup>H-NMR, *engl. nuclear magnetic resonance*, NMR) bestimmt. Mit Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR lässt sich die Struktur von organischen Verbindungen analysieren, in dem die magnetischen Eigenschaften von Protonen in den Molekülen gemessen wird.<sup>362,363</sup> Dies führte zu dem Produkt PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>455</sub>-PAGE<sub>30</sub> für die Triblockcopolymer und mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>45</sub> für die Diblockcopolymer (Abbildung 67).



**Abbildung 67: Strukturformeln der Triblockcopolymeren PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>455</sub>-PAGE<sub>30</sub> und der Diblockcopolymeren mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>45</sub>.**

Um die jeweils geladenen Gruppen an die AGE-Blöcke zu koppeln, musste eine weitere Funktionalisierung durchgeführt werden. Hierbei wurde die Chemie der Thiol-En Click-Chemie benutzt. PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>455</sub>-PAGE<sub>30</sub> oder mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>45</sub> wurde zusammen mit dem Photoinitiator 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPA) und Cysteamin-Hydrochlorid oder Natrium-3-mercapto-1-propansulfonat in einem DMF:Wasser 1:1-Gemisch gelöst und anschließend mit Stickstoff entgast. Daraufhin wurde die Reaktionslösung 6 h UV-Licht ausgesetzt (365 nm, 8 W). Es erfolgte eine Dialyse (MWCO: 3,5 kDa) gegen entsalztes Wasser für 10 Zyklen mit je 8 h und eine abschließende Lyophilisation. Als Produkte wurden Aminofunktionalisierte Blockcopolyelektrolyte oder Sulfonatfunktionalisierte Blockcopolyelektrolyte erhalten. Guanidiniumfunktionalisierte Blockcopolyelektrolyte wurden durch Weiterfunktionalisierung der Aminofunktionalisierten Blockcopolyelektrolyte erhalten. Das Aminofunktionalisierte Blockcopolyelektrolyt wurde mit 1H-Pyrazol-1-carboxamidin in DPBS<sup>-</sup> gelöst, der pH auf 10 eingestellt und für 3 Tage bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Es erfolgte eine erneute Dialyse (MWCO: 3,5 kDa) gegen entsalztes Wasser für 10 Zyklen je 8 h und anschließender Lyophilisation. Die erfolgreiche Funktionalisierung der Blockcopolyelektrolyte (bPE) wurde durch <sup>1</sup>H-NMR bestätigt.

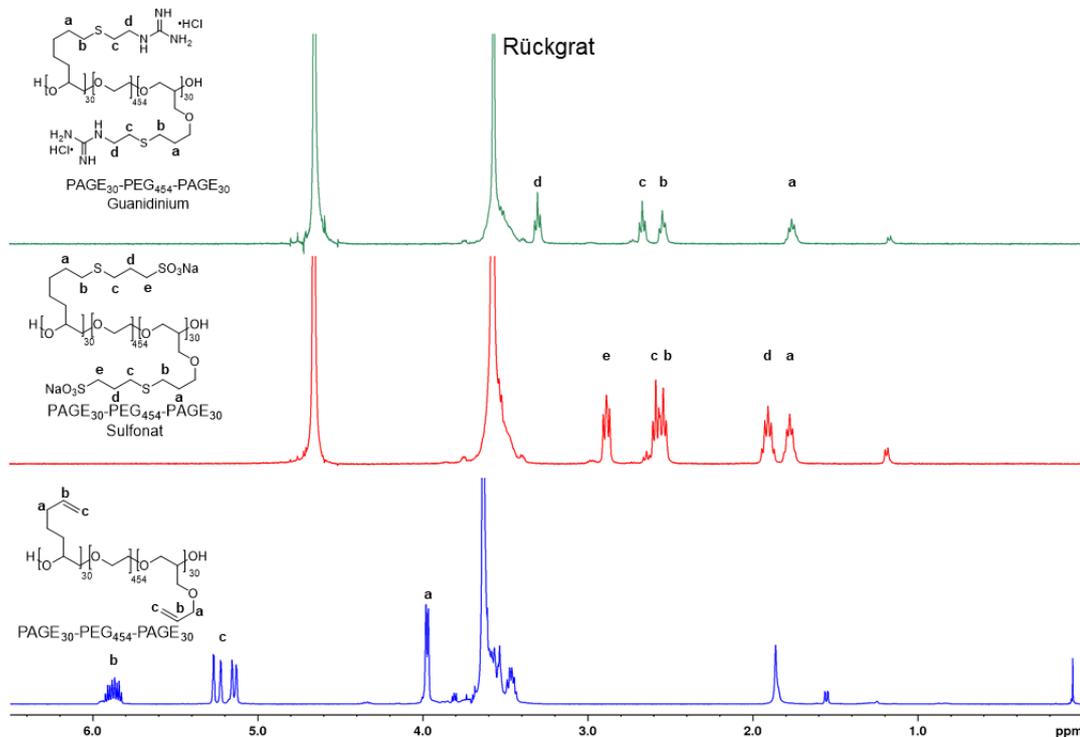
Die Diblockcopolyelektrolyt-Synthese wurde analog zur Triblockcopolyelektrolyt-Synthese durchgeführt. Dabei wurde als Edukt mPEG eingesetzt, das anstatt einer endständigen Hydroxylgruppe auf einer Seite eine Methylgruppe besitzt, weshalb die AGE-Kupplung und somit auch die Funktionalisierung der geladenen Blöcke nur einseitig stattfinden konnte. Das Reaktionsschema ist im Anhang in Schema 12 dargestellt.



**Schema 11: Synthese der Triblockcopolyelektrolyte (TbPE).** Alle Syntheseschritte wurden in einer *glove box* durchgeführt. PEG ( $M = 20.000$  g/mol) (**1**) wurde in THF gelöst und mit Kaliumnaphthalid titriert, bis eine hellgrüne Farbe erreicht wurde. AGE wurde in dem gewünschten Volumen hinzugegeben und für 48 h bei 45 °C gerührt. Danach wurde entgasetes Methanol hinzugegeben, das Produkt in Hexan ausgefällt, filtriert und getrocknet. Durch Lyophilisation wurde  $\text{PAGE}_n\text{-PEG}_{455}\text{-PAGE}_n$  (**2**) erhalten. Durch Zugabe des Thiolreagenzes, DMPA und die Bestrahlung mit UV-Licht über Nacht wurden die Funktionalisierungen mit Aminogruppen (**4**) oder Sulfonat (**3**) generiert. Aus der Aminofunktionalisierung konnte eine Guanidiniumfunktionalisierung (**5**) durch Zugabe von 1H-Pyrazol-1-carboxamidin in DPBS<sup>-/-</sup> unter Rühren nach 3 Tagen erhalten werden. Nach einer letzten Lyophilisation wurde ein weißer bis brauner styroporartiger Feststoff erhalten.

Durch die <sup>1</sup>H-NMR-Analyse des Eduktes sowie der Produkte konnte eine erfolgreiche und vollständige Funktionalisierung der Triblockcopolyelektrolyte (TbPE) bestätigt werden (Abbildung 68). Die Signale der Doppelbindungsprotonen des AGE bei chemischen Verschiebungen von 5,1 ppm und ca. 6 ppm sind bei den funktionalisierten Polymeren nicht mehr vorhanden, was auf eine erfolgreiche Kupplung der Sulfonat- oder Guanidinium-Gruppen hinweist. Im vorderen Bereich bei chemischen Verschiebungen von 1-4 ppm zeigten sich neue

Signale, die den angefügten Gruppen zugeordnet werden konnten. Bei einer chemischen Verschiebung von 3,6 ppm konnte das Rückgrat des PEG und des AGE nachgewiesen werden. Die Funktionalisierung der Diblockcopolyelektrolyte (DbPE) wurde ebenfalls durch  $^1\text{H-NMR}$  bestätigt, was im Anhang in Abbildung 88 dargestellt ist.

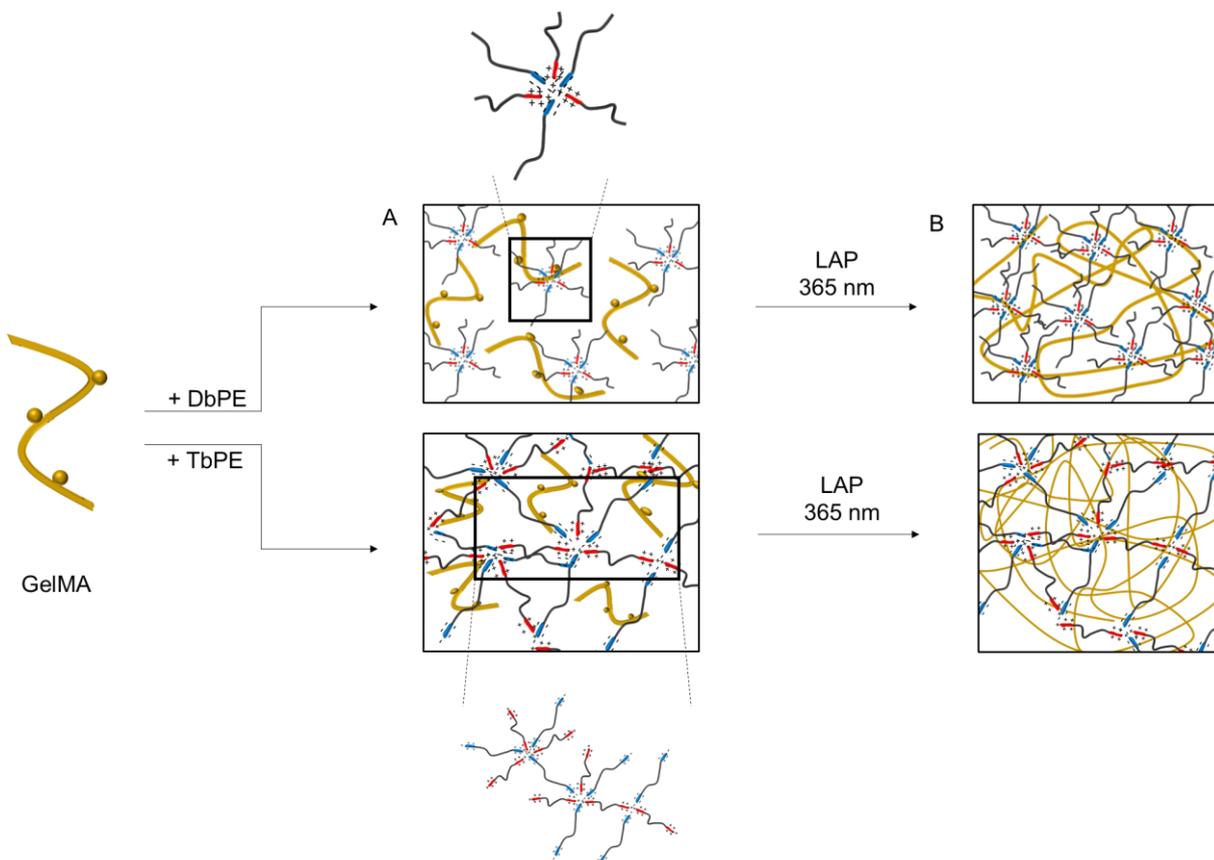


**Abbildung 68:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektren der Triblockcopolyelektrolyte (400 MHz). Sulfonat- und Guanidiniumfunktionalisierte (rot und grün) Triblockcopolyelektrolyte wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  und das Ausgangsprodukt PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>455</sub>-PAGE<sub>30</sub> (blau) in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler.

Im nächsten Schritt erfolgte nun die Herstellung der Doppelnetzwerke durch die Zugabe von dem semi-synthetischen GelMA. Da die meisten Einzelnetzwerke eine geringe Strukturintegrität bei dem 3D-Biodruck von makroskopischen Hohlorganen, wie beispielsweise Herzstrukturen, aufweisen, wurden die Netzwerke kombiniert um größere, komplexere Gewebekonstrukte zu erzeugen. In vielen Studien und Publikationen hat sich GelMA durch seine positiven Eigenschaften ausgezeichnet.<sup>364–367</sup> GelMA besitzt eine hohe Biokompatibilität und sogenannte RGD-Domänen, an denen Zellen durch deren Integrinrezeptoren anhaften können. Diese RGD-Domänen bestehen aus dem Aminosäure-Motiv Arginin(R)-Glycin(G)-Aspartat(D).<sup>368,369</sup> Hiermit erfüllt GelMA die erforderlichen Eigenschaften der Zelladhäsion und bietet eine gute Basis für den Einsatz der Tri- und Diblockcopolyelektrolyte in Kombination mit GelMA für den 3D-Biodruck. Durch Mischung der verschieden-geladenen Tri- oder Diblockcopolyelektrolyte (TbPE oder DbPE) mit GelMA wurde zunächst ein Einzelnetzwerk von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen der Blockcopolyelektrolyte (bPE) aufgebaut. Die DbPE bildeten eine Mizellenstruktur aus, wobei TbPE verbundene Netzwerke generierten. Bei zusätzlicher Zugabe eines Photoinitiators, beispielsweise Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzylphosphinat (LAP) oder 2-Hydroxy-4'-(2-

hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon (Irgacure 2959), und der anschließenden Bestrahlung mit UV-Licht bestimmter Wellenlänge konnte das zweite kovalente Netzwerk zwischen den GelMA-Strängen ausgebildet werden. Hierdurch wurden zwei einander durchdringende Netzwerke aus GelMA/TbPE und ein Hybrid-Hydrogel aus GelMA/DbPE gebildet. Die schematische Darstellung ist in Abbildung 69 aufgezeigt.

Für alle Versuche wurde GelMA *medium* eingesetzt, welches mit 8 Äq. Methacrylsäureanhydrid (MAA) umgesetzt wurde und einen Funktionalisierungsgrad von 68 % besaß. Die Vernetzung des GelMAs wurde, wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben, mit 0,3 % LAP und einer Bestrahlung mit 30 s bei 500 mW/cm<sup>2</sup> durchgeführt.



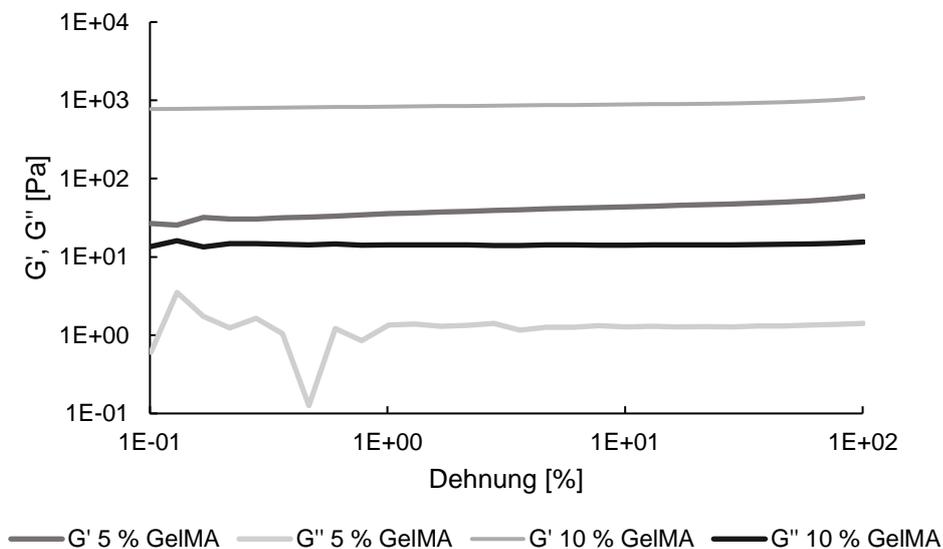
**Abbildung 69: Schematische Darstellung der Bildung der Doppelnetzwerk-Hydrogele aus GelMA und den Di- oder Triblockcopolyelektrolyten (DbPE/ TbPE).** (A) Durch die Zugabe der TbPE oder DbPE zum GelMA wird zunächst das elektrostatische Netzwerk zwischen den unterschiedlich geladenen Polyelektrolyten ausgebildet. (B) Durch die Zugabe eines Photoinitiators (LAP) und der Bestrahlung mit UV-Licht kann das GelMA chemisch vernetzt werden, wodurch Doppelnetzwerke entstehen. Die Diblockcopolymere formen eine Mizellenstruktur, während die Triblockcopolymere verbundene Netzwerke bilden. Modifiziert nach Göckler *et al.*<sup>370</sup>

### 3.3.2 Chemische Charakterisierung der GelMA/bPE

Um die Eigenschaften der Hydrogele, welche durch die Doppelnetzwerke gebildet werden, näher zu analysieren, wurden deren chemische Eigenschaften unter anderem in Bezug auf Viskoelastizität, physikomechanische Eigenschaften und Quellverhalten untersucht.

### 3.3.2.1 Rheologische Charakterisierung

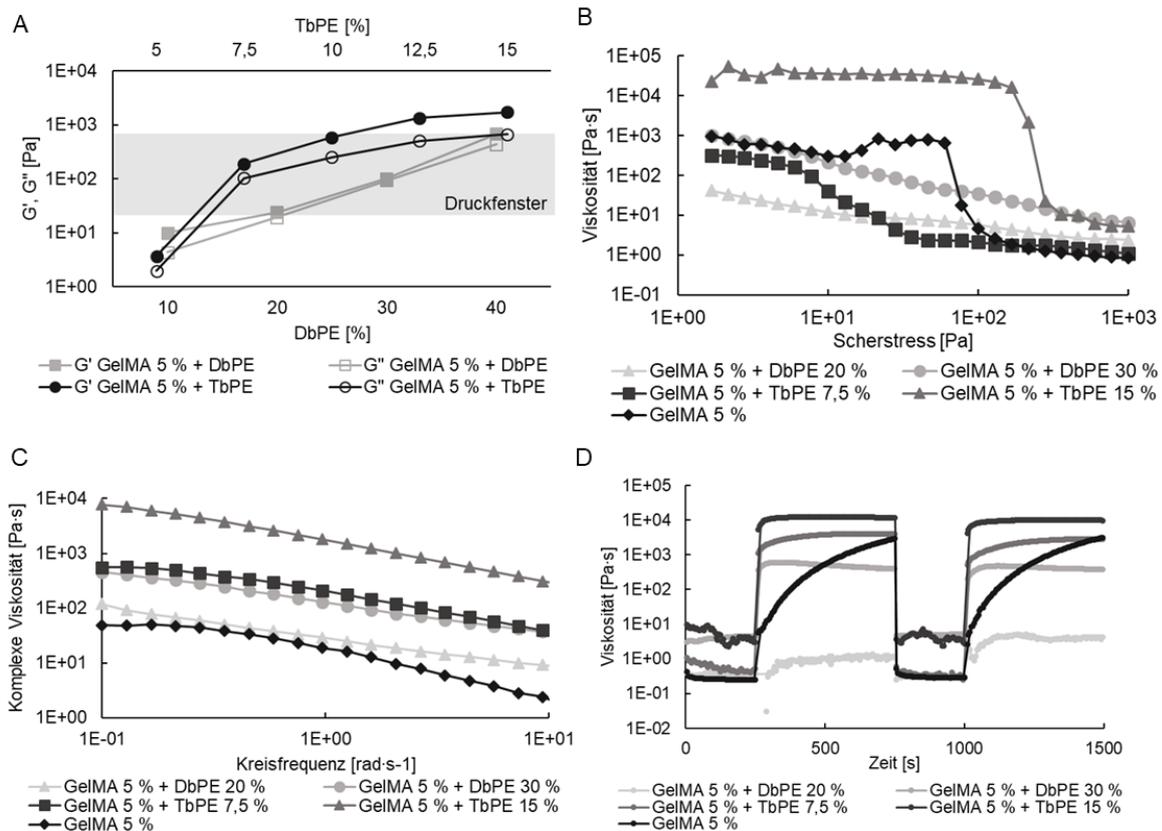
Die Doppelnetzwerk-Hydrogele sollten im 3D-Biodruck eingesetzt werden, um die Eigenschaften des GelMAs spezifisch für den extrusionsbasierten 3D-Biodruck anzupassen. Um das Druckfenster der GelMA-Konzentrationen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Blockcopolyelektrolyte (bPE) für den extrusionsbasierten 3D-Biodruck einzugrenzen, wurden rheologische Charakterisierungen durchgeführt. Dabei profitiert diese Untersuchung von einem minimalen Materialverbrauch im Vergleich zu einem Screening im extrusionsbasierten Druck.<sup>371–374</sup> Dabei diente GelMA mit einer Polymerkonzentration von 5 % und 10 % als Ausgangsmaterial. Diese Polymerkonzentrationen wurden gewählt, da diese eine mechanische Stabilität nach dem Druckvorgang aufzeigen und außerdem den Zellen die Möglichkeit zur zellulären Netzwerkbildung bieten sowie eine hohe Zellviabilität aufweisen.<sup>375,376</sup> Zunächst wurden oszillatorische Messungen mit GelMA-Lösungen bei 22 °C durchgeführt. Diese Temperatur hat sich für GelMA-Tinten als die optimale Drucktemperatur für extrusionsbasierte Druckprozesse herausgestellt.<sup>224</sup> Dadurch wurde das Druckfenster und die Speichermodule  $G'$  und Verlustmodule  $G''$  für die möglichen GelMA/bPE Tinten bestimmt. Das Verlustmodul  $G''$  beschreibt das viskose Verhalten der Materialien, da es die verlorene Deformationsenergie angibt. Mit dem Speichermodul  $G'$  wird die gespeicherte Deformationsenergie angegeben und somit das elastische Verhalten der Materialien beschrieben.<sup>377</sup>



**Abbildung 70: Speichermodul  $G'$  und Verlustmodul  $G''$  von unvernetzten GelMA 5 % und 10 %.** Es wurden rheologische Untersuchungen des GelMAs ohne den Zusatz von bPE durchgeführt, um die Grenzen des Biofabrikationsfensters zu bestimmen. Durch oszillierende Dehnungsmessungen bei 22 °C mit einer Kreisfrequenz von  $\omega = 1,25 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $\gamma = 1 \%$  wurden das Speichermodul  $G'$  und das Verlustmodul  $G''$  erhalten. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler.

Aus den oszillatorischen Messungen konnten die Speichermodule  $G'$  und die Verlustmodule  $G''$  bestimmt werden (Abbildung 70). Für GelMA 5 % wurde ein Durchschnittswert von 20,17 Pa  $G'$  erhalten und für GelMA 10 % der Wert 704,23 Pa  $G'$ . Aufgrund dieser Ergebnisse für GelMA 5 % und GelMA 10 % wurde das Druckfenster auf 20-700 Pa  $G'$  festgesetzt. Anschließend konnte die GelMA-Lösung mit einer Polymerkonzentration von 5 % mit

unterschiedlichen Konzentrationen an DbPE und TbPE versetzt werden, um zu untersuchen, welche der Zusammensetzungen in das zuvor bestimmte Druckfenster fallen. Dies wurde bei einer Temperatur von 37 °C und an den unvernetzten Polymerlösungen untersucht.

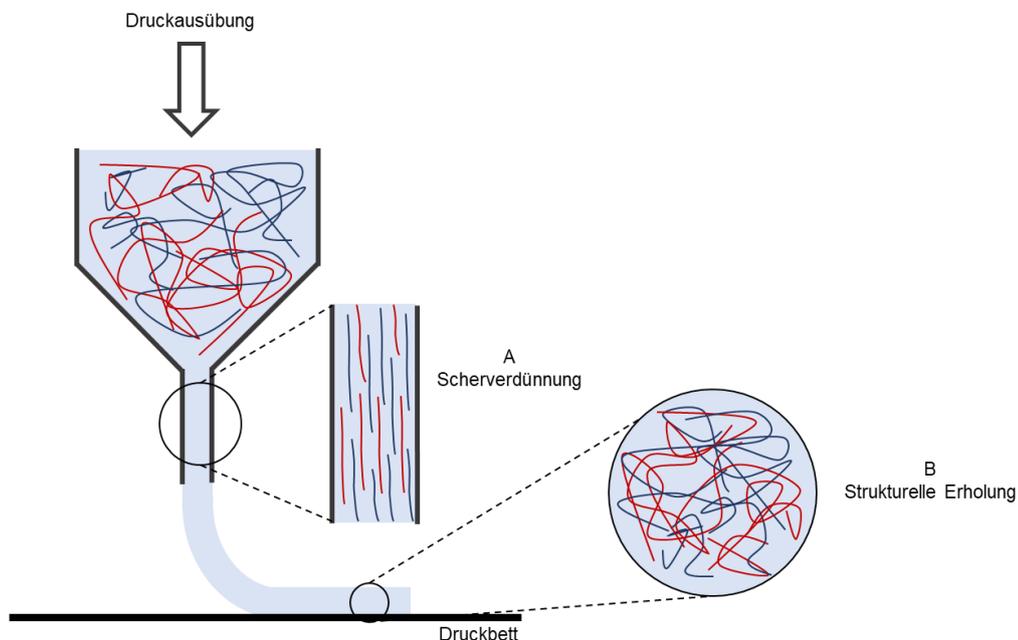


**Abbildung 71: Rheologische Untersuchungen von GelMA 5 % und verschiedenen Zusammensetzungen von GelMA/bPE bei 37 °C.** (A) stellt das Screening dar, um das Biofabrikationsfenster festzulegen. Es wurden steigende Konzentrationen an DbPE und TbPE eingesetzt. Die Hydrogele wurden unvernetzt verwendet. Speichermodul  $G'$  und Verlustmodul  $G''$  wurde durch oszillatorische Dehnungsmessungen ( $\omega = 1,25 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $\gamma = 1 \%$ ) erhalten. (B) Untersuchung der Fließspannung. Die Hydrogele wurden konstantem Stress ausgesetzt, bis eine stagnierende Viskosität erreicht wurde. (C) Untersuchung des scherverdünnenden Verhaltens der Hydrogele. (D) Untersuchung der strukturellen Erholung nach der Scherung. Es wurden zyklische Deformations-Sweeps ( $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$  für 250 s und  $\dot{\gamma} = 0,01 \text{ s}^{-1}$  für 500 s) durchgeführt. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler.

Das Mischen des GelMA-Hydrogels mit steigenden Konzentrationen an DbPE (10 %, 20 %, 30 %, 40 %) und TbPE (5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %) führte zu erhöhten Speichermodulen  $G'$  im Vergleich zur Messung der Polyelektrolyt-Komplexe ohne GelMA. Außerdem lagen die verschiedenen Zusammensetzungen größtenteils innerhalb des definierten Druckfensters (Abbildung 71A). Lediglich die niedrigen Konzentrationen mit 10 % DbPE und 5 % TbPE konnten nicht in dem Druckfenster erfasst werden. Mit dem Einsatz von höheren Konzentrationen an TbPE oder DbPE konnte eine Zunahme des Speichermoduls  $G'$  beobachtet werden. Durch die Erhöhung des physikalischen Netzwerkes wird ein dichteres Netzwerk ausgebildet. Der Unterschied in den eingesetzten Konzentrationen von TbPE und DbPE ist auf die unterschiedliche PEC-Mikrostruktur zurückzuführen. TbPE bilden verbundene Netzwerke, wobei DbPE Mizellen ausbilden.

Mit der Fließspannung wird die Spannung beschrieben, die angelegt werden muss, damit ein Fließen des Materials induziert werden kann.<sup>378</sup> Die ist erforderlich, um die Materialien im extrusionsbasierten 3D-Biodruck einzusetzen. Eine hohe Fließspannung bietet dabei den Vorteil, dass sie die Spritzbarkeit und die Strukturintegrität nach dem Drucken fördert. Ist die Fließspannung jedoch zu groß, kann dies den Druck negativ beeinflussen und die Zellviabilität vermindern. Um dies an den GelMA/TbPE- und GelMA/DbPE-Hydrogelen weiter zu untersuchen, wurden die Hydrogele einer konstanten Spannung ausgesetzt, bis eine stagnierende Viskosität erreicht werden konnte (Abbildung 71B). Wird das GelMA-Hydrogel ohne den Zusatz der bPE betrachtet, so ließ sich ein deutlicher Fließpunkt beobachten, bei dem der Übergang vom elastischen zum fließenden Verhalten erfolgt. Auch die GelMA-Hydrogele versetzt mit TbPE zeigten Fließpunkte, die aufgrund der höheren Konzentration der TbPE und der damit einhergehenden Zunahme an PEC-Domänen anstiegen. Bei den GelMA-Hydrogelen versetzt mit DbPE kann eine langsame kontinuierliche Abnahme der Viskosität beobachtet werden. Ein Fehlen des Fließpunktes bei den GelMA/DbPE-Hydrogelen kann auf die vorliegende Mizellenstruktur der DbPE zurückzuführen sein.

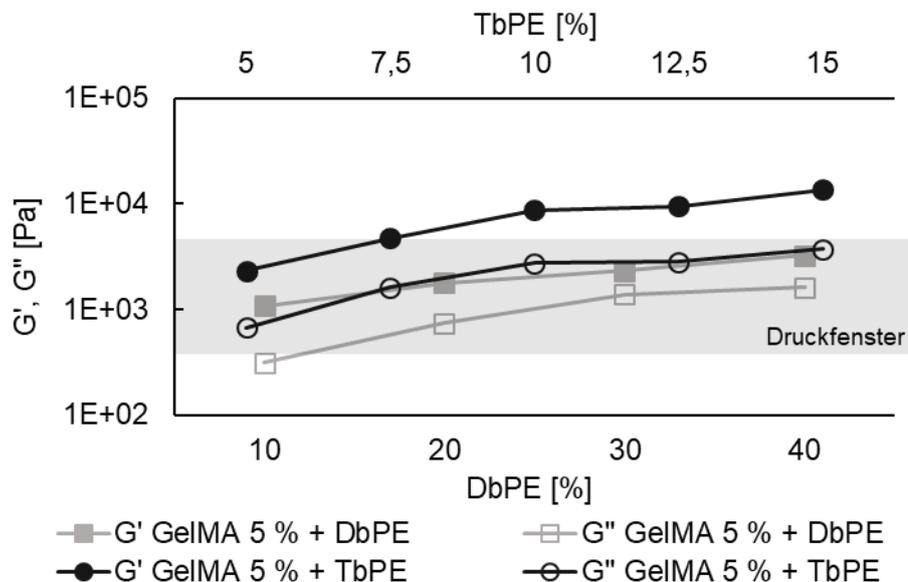
Um die Zellen während des Druckvorganges nicht durch die Scherspannung bei der Extrusion durch eine Nadel zu beanspruchen, ist es notwendig, dass die eingesetzten Materialien ein scherverdünnendes Verhalten aufzeigen. Ein scherverdünnendes Verhalten beschreibt die Abnahme der Viskosität der Materialien mit zunehmender Scherrate.<sup>379</sup> Sowohl GelMA/DbPE-Hydrogele als auch GelMA/TbPE-Hydrogele wiesen ein ausreichendes scherverdünnendes Verhalten auf, um im extrusionsbasierten 3D-Druck eingesetzt werden zu können (Abbildung 71C). In Abbildung 72 ist die schematische Darstellung des scherverdünnenden Verhaltens sowie die strukturelle Erholung nach dem Druck aufgezeigt.



**Abbildung 72: Schematische Darstellung der Scherverdünnung und der strukturellen Erholung.** (A) Bei dem Druck durch eine konische Nadel nimmt die Viskosität des Materials ab, da die Polymerstränge sich entlang der Krafteinwirkung ausrichten. Hierdurch wird ein scherverdünnendes Verhalten beobachtet. (B) Nachdem das Material verdrückt wurde und keine Kraft mehr ausgeübt wird, kommt es zu einer strukturellen Erholung und das Netzwerk bildet sich wieder aus, bis es zu einer Verfestigung kommt. Modifiziert nach Habib *et al.*<sup>380</sup>

Danach müssen sich die vorherigen Eigenschaften der Polymerketten wieder ausbilden, damit nach dem Druck ein formstabiles Konstrukt vorliegt. Der Zeitraum, bis die vorherigen Eigenschaften vor des Einnehmens des scherverdünnenden Verhaltens entsprechen, wird als elastische Erholungszeit bezeichnet.<sup>379,381</sup> Um den Übergang von einem flüssigkeitsähnlichen zu einem elastischen Verhalten zu untersuchen, wurden die Hydrogele einer hohen Scherrate für 250 s gefolgt von einer niedrigen Scherrate für 500 s ausgesetzt (Abbildung 71D). Dies wurde bei 22 °C für GelMA-Hydrogele und bei 37 °C für GelMA/bPE-Hydrogele durchgeführt. GelMA-Hydrogele zeigten eine lange Erholungszeit von über 8 min, da sich die Dreifachhelices zunächst zurückbilden müssen. Es bietet sich hierbei an bei extrusionsbasierten Druckvorgängen von GelMA, das Druckbett zu kühlen, um diesen Vorgang zu beschleunigen.<sup>382</sup> Alle GelMA/bPE-Hydrogele zeigten im Gegensatz dazu eine schnelle elastische Erholung. Innerhalb weniger Sekunden waren bereits 80 % der PEC-Mikrostrukturen wieder ausgebildet. Dies stellt eine gute Ausgangslage für den Einsatz im extrusionsbasierten 3D-Biodruck dar.

Zusätzlich zu den bisher durchgeführten Versuchen wurden die Speichermodule  $G'$  und Verlustmodule  $G''$  der vernetzten GelMA/bPE bei 37 °C untersucht und dies analog zu den unvernetzten Hydrogelen mit dem vernetzten GelMA (5 % und 10 %) bei 22 °C verglichen. Hierzu wurden die Hydrogele mit Hilfe von UV-Licht vernetzt. Auch hier lagen die eingesetzten unterschiedlichen Konzentrationen der bPE innerhalb der Speichermodule von GelMA 5 % und 10 %, welche das Druckfenster definieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 73 dargestellt. Alle eingesetzten Konzentrationen der GelMA/DbPE konnten innerhalb des definierten Druckfensters erfasst werden, während die GelMA/TbPE, mit Ausnahme von GelMA/TbPE 5 % und 7,5 %, höhere Speichermodule  $G'$  als die vom Druckfenster definierten aufzeigten.



**Abbildung 73: Rheologische Untersuchungen der Schubmodule von vernetzten GelMA 5 % und GelMA/bPE bei 37 °C.** Speichermodul  $G'$  und Verlustmodul  $G''$  wurden durch oszillatorische Dehnungsmessungen ( $\omega = 1,25 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  und  $\gamma = 1 \%$ ) erhalten. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler.

Anhand dieser weitreichenden Untersuchungen der rheologischen Eigenschaften der Hybrid-Hydrogele erwiesen sich die GelMA/bPE-Hydrogele bereits als vielversprechende Materialien für den extrusionsbasierten 3D-Biodruck. Sie zeigten das notwendige scherverdünnende Verhalten und die schnelle strukturelle elastische Erholung nach einer Kraftausübung. In weiteren Experimenten wurde sich auf die Formulierungen GelMA 5 % mit 10 % und 20 % DbPE sowie GelMA 5 % mit 7,5 % und 15 % TbPE fokussiert.

### 3.3.2.2 Zugversuche der GelMA/bPE-Hydrogele

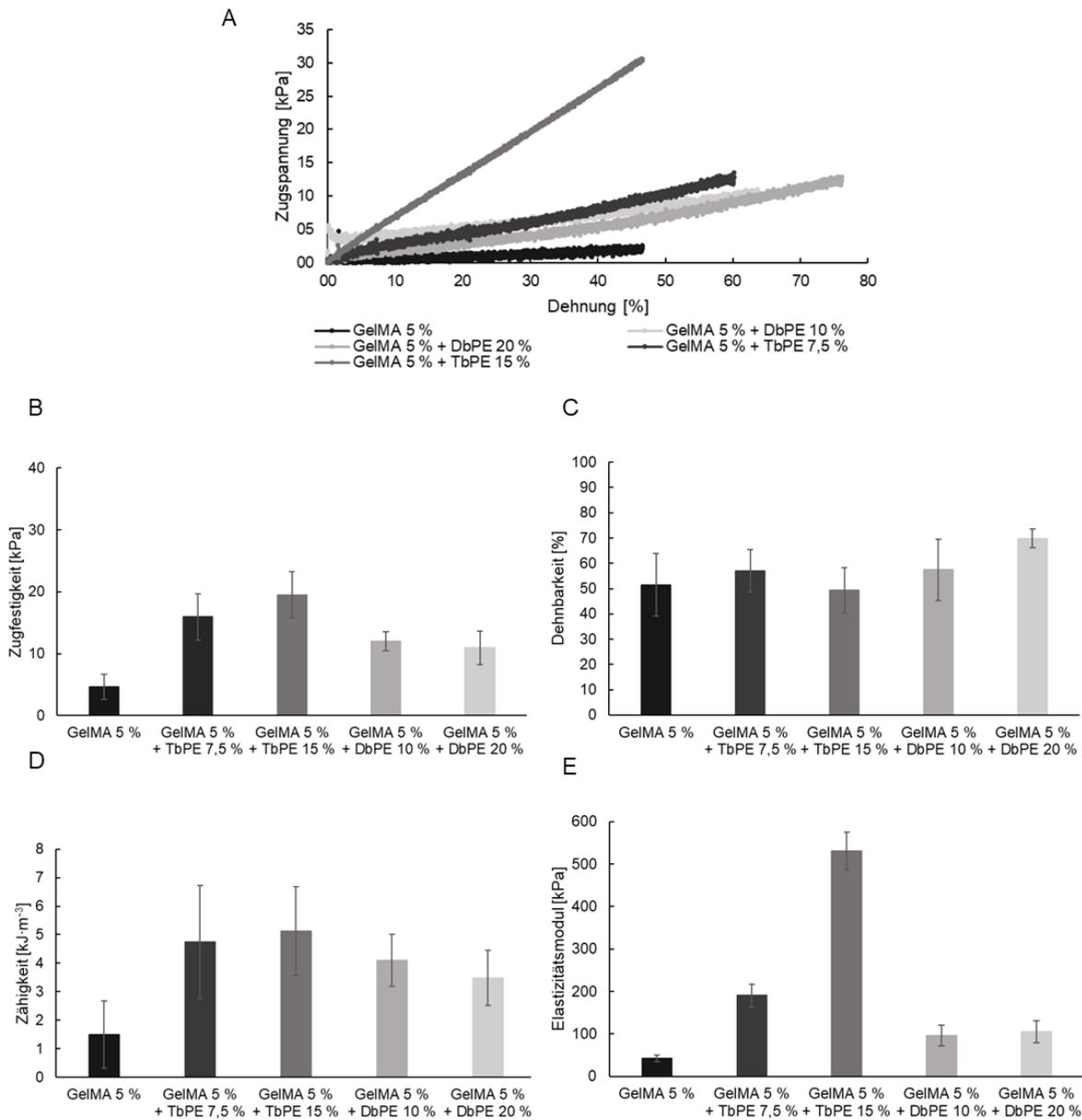
In einer natürlichen Umgebung sind Gewebe oder Organe häufig Kräften ausgesetzt, die mechanischen Stress ausüben. So können zum Beispiel Zellen ihre mechanischen Eigenschaften anpassen, um diesen Belastungen standzuhalten und, um die Funktion des Gewebes oder des Organs strukturell aufrechtzuerhalten.<sup>383–386</sup> Da Hydrogele als Stützmatrices eingesetzt werden sollen, um Gewebe oder Organe nachzubilden, müssen diese mechanische Eigenschaften aufweisen, die dem mechanischen Stress, der durch unterschiedliche Kräfte ausgeübt werden kann, standhalten.

Um die mechanischen Eigenschaften der Doppelnetzwerk-Hydrogele näher zu charakterisieren, wurden in Kollaboration mit Dr. T. Göckler und Dr. D. Li Zugversuche (*engl. tensile tests*) durchgeführt. Hierbei konnten die Zugfestigkeit, die Dehnbarkeit, die Zähigkeit und das Elastizitätsmodul genauer untersucht werden. Es wurde dabei der Einfluss der physikalisch ausgebildeten Netzwerke auf das GelMA-Hydrogel untersucht, welches durch chemische Vernetzung ein Hydrogel ausbildet. Durch das zusätzliche Netzwerk soll die Dehnung und die Robustheit des GelMA-Hydrogels gestärkt werden. In diesem Versuch wurden ausschließlich vernetzte Hydrogele eingesetzt, was bedeutet, dass nach dem Mischen des GelMA mit den bPE sowie des Photoinitiators LAP, eine chemische Vernetzung des GELMAs durch eine Bestrahlung mit UV-Licht von 30 s bei 500 mW/cm<sup>2</sup> erfolgte.

In dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm (Abbildung 74A) kann eine deutliche Zunahme der Grenzspannung beobachtet werden. Unabhängig von der Konzentration der eingesetzten bPE zeigten alle im Vergleich zu GelMA 5 % ohne den Zusatz der bPE eine höhere Grenzspannung. Es konnte außerdem eine Erhöhung der Zugfestigkeit (Abbildung 74B), der Dehnbarkeit (Abbildung 74C), der Zähigkeit (Abbildung 74D) und des Elastizitätsmoduls (*engl. Young's modulus*, Abbildung 74E) festgestellt werden. Das Elastizitätsmodul ist ein Maß für die Steifigkeit eines Materials. Die erhebliche Erhöhung des Elastizitätsmoduls mit insbesondere der TbPE führte zu einem deutlich elastischeren Material. Mit dem Zusatz der DbPE konnte keine signifikante Erhöhung des Elastizitätsmoduls erzielt werden. GelMA ohne Zusatz der bPE zeigte eine sehr geringe Zugfestigkeit und Zähigkeit. Durch die Zugabe der DbPE konnten beide Eigenschaften erhöht werden, welche mit Zugabe der TbPE noch gesteigert werden konnten. Durch den Einsatz des physikalischen Netzwerkes können während des Zugversuches die Bindungen reversibel gelöst und wieder neu gebildet werden, da diese Bindungen nicht kovalent sind. Hierdurch kann die ausgeübte Belastung auf das physikalische Netzwerk verteilt werden und die Belastung auf das kovalente Netzwerk verringert werden. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass durch den Einsatz von

energiedissipativer nicht-kovalenter Wechselwirkungen die Dehnbarkeit von GelMA erhöht werden kann.<sup>387</sup> Durch den Einsatz der bPE führte dies zu einer Energiedissipation, welches die Dehnbarkeit erhöhte.

Mit dem Zusatz der bPE konnte eine höhere mechanische Belastbarkeit des GelMA-Hydrogels festgestellt werden. Außerdem wird angenommen, dass die Robustheit ebenfalls erhöht wurde und hiermit das Verarbeiten des Materials durch anschließende Prozesse, wie beispielsweise Transplantationen, vereinfacht werden kann.

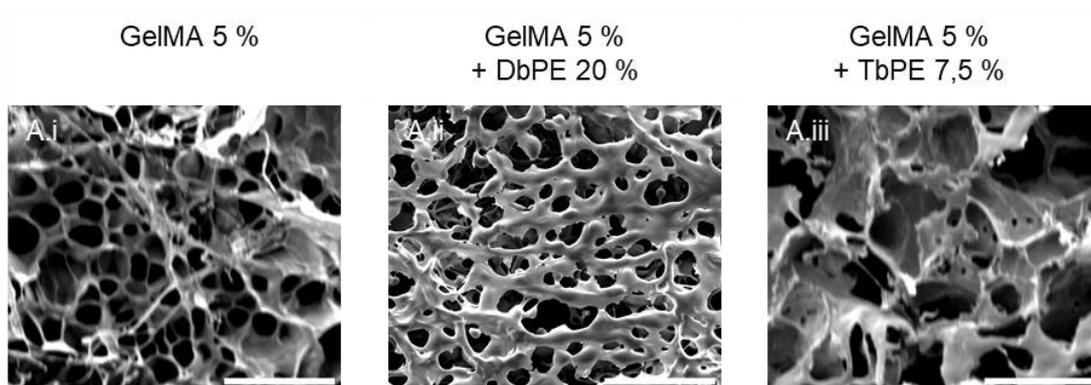


**Abbildung 74: Zugversuche von GelMA und verschiedenen Zusammensetzungen von GelMA/bPE.** (A) Repräsentative Spannung-Dehnungs-Diagramme. Daraus wurden (B) die Zugfestigkeit, (C) die Dehnbarkeit, (D) die Zähigkeit und (E) das Elastizitätsmodul abgeleitet. Alle Hydrogele lagen im vernetzten Zustand vor. Es wurde die Instron 5542 Zugmaschine benutzt und mit einer Zugrate von 6 mm/min gearbeitet. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 bestimmt.

### 3.3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen von GelMA/bPE

Um den Einfluss des Doppelnetzwerkes, bestehend aus den kovalent vernetzten GelMA-Hydrogelen und den physikalisch vernetzten bPEs, mikroskopisch zu untersuchen, wurde eine Rasterelektronenmikroskopie (*engl. scanning electron microscopy, SEM*) durchgeführt. Bei einer Rasterelektronenmikroskopie wird die zu untersuchende Probe mit Elektronen beschossen und damit die Struktur abgerastert. Dabei werden von der Probe sogenannte Sekundärelektronen freigesetzt, die von einem Sekundärelektronendetektor aufgenommen werden.<sup>388</sup> Hierfür wurden Proben (Durchmesser= 5 mm und Höhe= 3 mm) der unterschiedlichen Hydrogele erzeugt und mit Hilfe von UV-Licht vernetzt. Es folgte ein Einfrieren der Strukturen in flüssigem N<sub>2</sub> und das Durchschneiden, um den Querschnitt der Strukturen freizulegen. Anschließend wurden die Strukturen in die vorgesehenen Probenhalter gesetzt und lyophilisiert. Die Proben wurden mit Gold besputtert und eine Beschleunigungsspannung von 5-10 kV angelegt. Anschließend konnten mit Hilfe des Sekundärelektrodendetektors die Aufnahmen erzeugt werden.

Anhand der Rasterelektronenmikroskopiebilder konnten die Poren der verschiedenen Hydrogele visualisiert werden (Abbildung 75). Das GelMA-Hydrogel zeigte eine gleichmäßige Verteilung und eine einheitliche Größe der Poren von 11-14 µm. Bei dem zusätzlichen Polymernetzwerk gebildet aus GelMA und DbPE konnten Ansammlungen der PEC-Netzwerke um die GelMA-Poren erkannt werden. Aufgrund der Mizellenanordnung konnten sich die Netzwerke um die Poren anlagern und veränderten somit die Porengröße des GelMAs unmerklich. Die TbPE hingegen bildeten verbundene Netzwerke aus, welche auch die Poren des GelMAs durchdringen konnten. Hierdurch ergab sich kein gleichmäßiges Netzwerk und eine andere Porengröße, sowie keine einheitliche Porengröße für das GelMA/TbPE-Hydrogel.



**Abbildung 75: Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der vernetzten GelMA und GelMA/bPE-Hydrogele.** Es wurden Hydrogelstrukturen mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm erzeugt und vernetzt. Die Strukturen wurden in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und geschnitten, in die vorgesehenen Einrichtungen gesetzt und lyophilisiert. Die Oberflächenstrukturen wurden anschließend mit Gold besputtert und die Aufnahmen mit einer Beschleunigungsspannung von 5-10 kV und einem Sekundärelektronendetektor aufgenommen. (i) GelMA 5 %; (ii) GelMA 5 % + DbPE 20 %; (iii) GelMA 5 % + TbPE 7,5 %. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 50 µm.

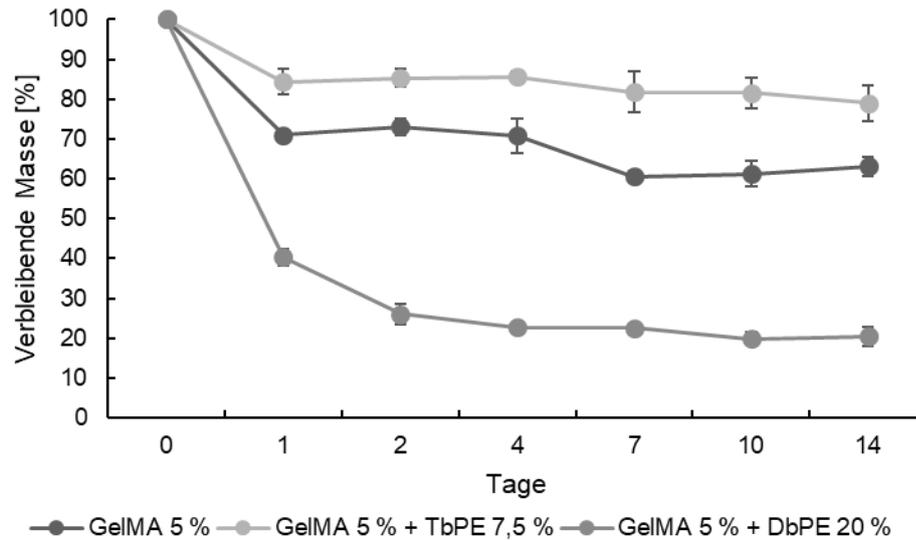
#### 3.3.2.4 Untersuchung der Freisetzung der Masse

Als weitere Charakterisierung der GelMA/bPE wurde das Quellverhalten und die damit einhergehende Freisetzung der Masse untersucht. Das Quellverhalten spielt im *Tissue Engineering* eine große Rolle, da dies Einfluss auf die Biokompatibilität, die Diffusion von Nährstoffen oder die mechanischen Eigenschaften haben kann.<sup>389,390</sup> Das Vereinen der beiden Netzwerke von dem chemisch vernetzten GelMA und den elektrostatisch vernetzten bPE führt außerdem zu einem Schutz vor unbegrenzter Quellung. Es wurde bereits beobachtet, dass die PEC-Hydrogele ohne das zusätzliche kovalente Netzwerk unbegrenzt quellen können und sich nahezu in Wasser auflösen.<sup>360</sup>

Zur Überprüfung der Massenfreisetzung während des Quellprozesses wurden die lyophilisierten, vernetzten Hydrogele gewogen, um die Trockenmasse zu bestimmen und anschließend in DPBS<sup>-/-</sup> über einen Zeitraum von 14 Tagen bei 37 °C gequollen. Nach 0, 1, 2, 4, 7, 10 und 14 Tagen wurden Proben entnommen, lyophilisiert und anschließend erneut die Masse bestimmt. Die verbleibende Masse konnte aus unten stehender Formel (2) bestimmt werden. Hierbei ist  $m_i$  die Initialmasse und  $m_t$  die Masse zum Zeitpunkt  $t$ .

$$\text{Verbleibende Masse [\%]} = \frac{m_t}{m_i} * 100 \quad \text{Formel (2)}$$

Das Ergebnis der Untersuchung der Massenfreisetzung ist in Abbildung 76 dargestellt. Es konnte an Tag 1 bei allen eingesetzten Hydrogelen ein Massenverlust beobachtet werden. Dies kann auf die Freisetzung von nicht funktionalisierter Gelatineketten oder Photoinitiatorrückständen zurückzuführen sein. Der Zusatz der TbPE zeigte einen ähnlichen Verlauf der Massenfreisetzung wie das GelMA-Hydrogel ohne das elektrostatische Netzwerk. GelMA/DbPE zeigte hingegen einen deutlichen Abfall der Masse auf eine verbleibende Masse von ca. 20 %. Wahrscheinlich führten die von den DbPE gebildeten Mizellen, die untereinander keine Netzwerke ausbilden, zu einer schnellen Freisetzung. Ein mögliches Einsatzgebiet von den DbPE wäre, dass diese als Opferstrukturen eingesetzt werden können, welche die Viskosität von niedrigviskosen Materialien für den extrusionsbasierten Biodruck erhöhen, aber anschließend aus der Struktur herausgelöst werden können.



**Abbildung 76: Massenfreisetzung von GelMA 5 % und verschiedenen Zusammensetzungen von GelMA/bPE.** Es wurde Hydrogele durch Zugabe des Photoinitiators und Bestrahlung mit UV-Licht (8 W, 302 nm) erzeugt. Die Strukturen wurden lyophilisiert, die Trockenmasse bestimmt und in DPBS<sup>-/-</sup> bei 37 °C über einen Zeitraum von 14 Tagen inkubiert. Nach Tag 0, 1, 2, 4, 7, 10 und 14 wurden die Proben entnommen, lyophilisiert und erneut die Masse bestimmt. Daraus wurde die verbleibende Masse bestimmt. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 bestimmt.

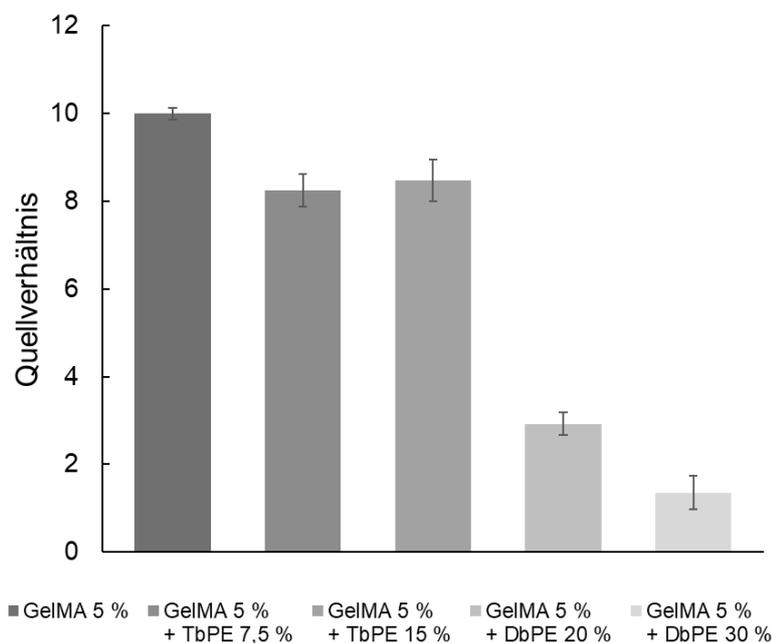
### 3.3.2.5 Quelleigenschaften der GelMA/bPE

Da Hydrogele die Eigenschaft aufweisen, große Mengen an wässrigen Flüssigkeiten aufzunehmen und zu speichern, wurden die Quelleigenschaften der GelMA/bPE näher charakterisiert. Diese Flüssigkeitsaufnahme kann durch die im Hydrogel vorhandenen hydrophilen Gruppen, wie Carboxy- oder Aminogruppen, erfolgen.<sup>391</sup> Durch die durchgeführten Experimente kann die Flüssigkeitszunahme, die maximal erreicht werden kann, sowie die Volumenzunahme untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hydrogele meist nach 24 h die maximale Flüssigkeitszunahme erreicht hatten, weshalb dieses Experiment ebenfalls auf 24 h beschränkt wurde.<sup>225,392</sup>

Es wurden Strukturen der Hydrogele mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Höhe von 3 mm hergestellt, mit Hilfe von UV-Licht vernetzt und anschließend in DPBS<sup>-/-</sup> bei Raumtemperatur (RT) gequollen. Nach 24 h wurden die Proben entnommen, überschüssiges DPBS<sup>-/-</sup> entfernt und die Masse bestimmt. Daraufhin wurden die Proben lyophilisiert und erneut gewogen. Dadurch konnte das Quellverhältnis (*engl. swelling ratio*) mit der unten stehenden Formel (3) ermittelt werden. Hierbei ist  $m_q$  die Masse der gequollenen Proben und  $m_t$  die Masse nach der Lyophilisation.

$$\text{Quellverhältnis} = \frac{m_q}{m_t} \quad \text{Formel (3)}$$

Das Quellverhältnis der verschiedenen Zusammensetzungen ist in Abbildung 77 dargestellt. Das Quellverhältnis der GelMA/TbPE zeigte ein ähnliches Verhalten wie GelMA. Das GelMA-Hydrogel ohne den Zusatz von bPE konnte eine 10-fache Flüssigkeitszunahme gegenüber der Ausgangsmasse aufzeigen, wobei beide Zusammensetzungen an GelMA/TbPE ungefähr eine 8-fache Zunahme zur Ausgangsmasse aufwiesen. Die GelMA/DbPE-Hydrogele zeigten ein niedrigeres Quellverhältnis mit ungefähr 1- bis 2-facher Zunahme zur Anfangsmasse, welches auf die Freisetzung der Mizellen der DbPE zurückzuführen ist. Die Mizellen können in wässriger Lösung aus dem gebildeten Netzwerk diffundieren, da sie keine verbundenen Netzwerke bilden. Die Quellung kann außerdem durch unterschiedliche Polymerkonzentrationen und damit einhergehende Vernetzungsdichten verringert werden. Das zusätzliche chemisch vernetzte Netzwerk konnte den bPE eine definierte Quellbarkeit verleihen.<sup>393</sup>

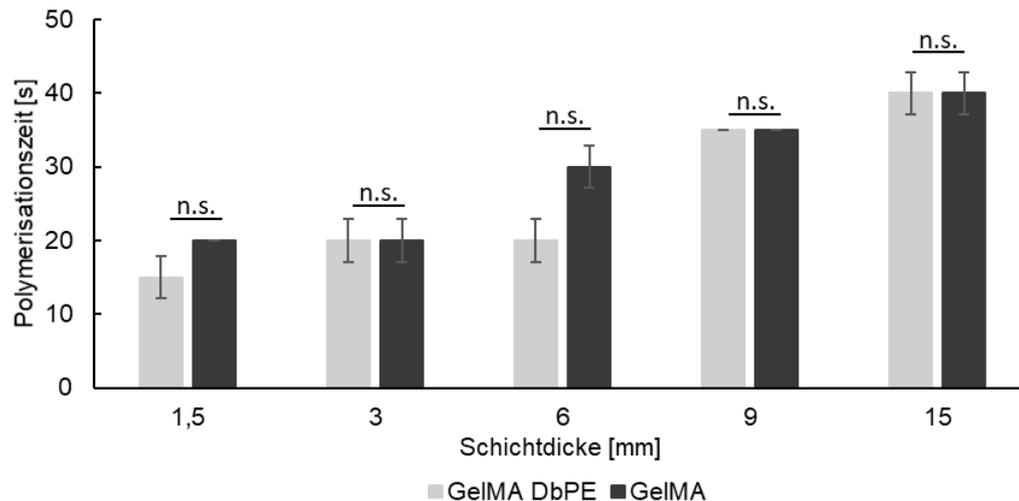


**Abbildung 77: Quellverhältnis (engl. swelling ratio) von vernetztem GelMA 5 % und verschiedenen Zusammensetzungen von vernetzten GelMA/bPE.** Es wurden Strukturen (Durchmesser= 5 mm, Höhe= 3 mm) der Hydrogele durch Zugabe eines Photoinitiators und Bestrahlung mit UV-Licht (8 W, 302 nm) hergestellt. Anschließend wurden die Strukturen in DPBS<sup>-/-</sup> für 24 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und gewogen. Daraufhin erfolgte eine Lyophilisation und eine erneute Bestimmung der Masse. Daraus konnte das Quellverhältnis bestimmt werden. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 bestimmt.

### 3.3.2.6 Aushärtungszeiten

Mit der Annahme, dass die Viskosität der GelMA Hydrogele durch die Zugabe der TbPE oder DbPE zunimmt, lässt sich vermuten, dass es möglich ist, mehrere Schichten ohne den Schritt der Zwischenaushärtung zu generieren. Für das GelMA-Hydrogel ohne die bPE wurde das Aushärtungsverhalten bereits untersucht und es konnte eine Leistungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> und eine Bestrahlungsdauer von 30 s etabliert werden.<sup>222-224</sup> Jedoch muss bei dem GelMA nach jedem Schritt ein Aushärtungsschritt erfolgen, da es sonst eine mangelnde Strukturintegrität aufwies. Zur Überprüfung, ob die bisher etablierte Leistungsdichte von

500 mW/cm<sup>2</sup> ausreicht, um alle Schichten vollständig auszuhärten, wurden die Polymerisationszeiten verschiedener Schichtdicken der GelMA/DbPE bestimmt. Hierzu wurde das GelMA-Hydrogel mit 20 % DbPE gemischt und verschiedene Volumina in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und die Aushärtung mit 5 s Schritten bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> überprüft. Mit Hilfe der Fläche und des hinzugegebenen Volumens konnte die Schichtdicke der GelMA/DbPE ermittelt werden. Das Aushärten wurde visuell sowie mit einer Pipettenspitze überprüft.



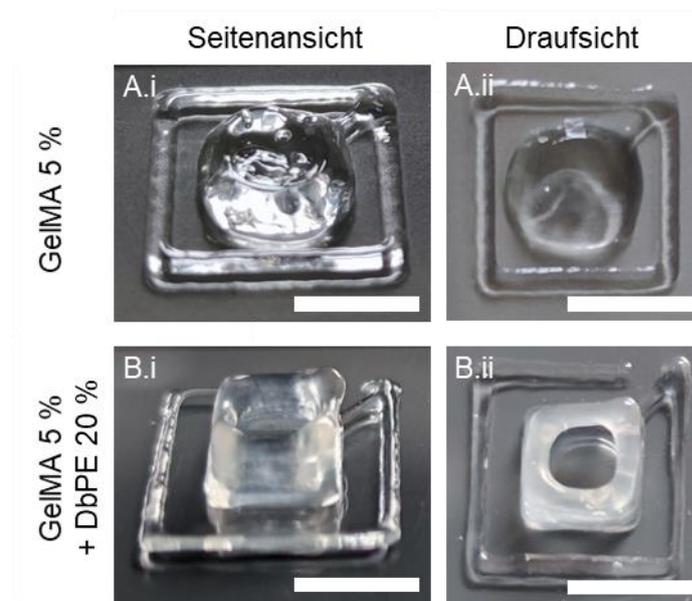
**Abbildung 78: Polymerisationszeiten der Doppelnetzwerk-Hydrogele.** GelMA 5 % wurden mit DbPE 20 % versetzt und verschiedene Volumina in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Polymerisationszeiten in 5 s Schritten bei einer Leistungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> (Omniculture S2000, 320-500 nm) bestimmt. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus n = 3 bestimmt. Die Signifikanzen wurden durch einen Student t-Test bestimmt.

Mit Zunahme der Schichtdicke konnte eine längere Polymerisationszeit beobachtet werden (Abbildung 78). Im Vergleich mit GelMA 5 % ohne den Zusatz von DbPE 20 % wurden vergleichbare Polymerisationszeiten für das Doppelnetzwerk bestimmt. Es ist möglich mit einer Leistungsdichte von 500 mW/cm<sup>2</sup> mehrere Schichten gleichzeitig auszuhärten. Aus diesem Experiment ging hervor, dass keine längeren Bestrahlungszeiten notwendig sind, um mehrere Schichten zu vernetzen und somit ein Druck mehrerer Schichten mit einem letzten Aushärtungsschritt möglich ist.

### 3.3.2.7 3D-Biodruck mehrerer Schichten

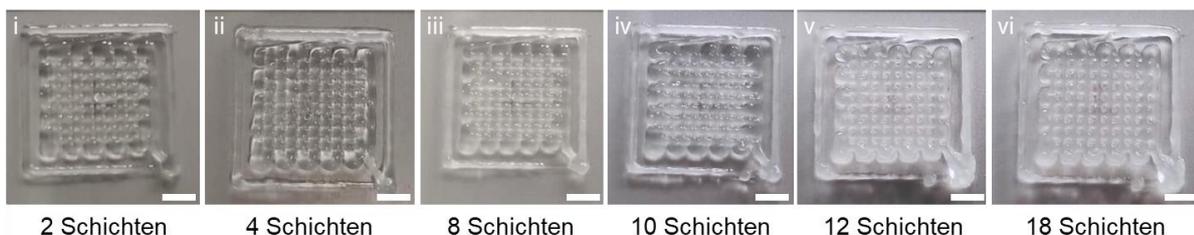
Um die erhöhte Viskosität der Doppelnetzwerk-Hydrogele auszunutzen, wurden mehrere Schichten in einem Schritt gedruckt und die Vernetzung mit einem einzigen Aushärtungsschritt am Ende induziert. Es wurden jeweils GelMA 5 % und GelMA 5 % mit DbPE 20 % gedruckt, ohne die einzelnen Schichten dazwischen auszuhärten. Dies wird bei dem extrusionsbasierten Biodruck als *Layer-by-Layer-Druck* bezeichnet wird, da jede einzelne Schicht ausgehärtet werden muss.<sup>394</sup> Als Struktur wurde ein hohler Würfel gewählt, um ein mögliches Zusammenfallen aufgrund fehlender Strukturintegrität zu untersuchen (Abbildung 79). Das GelMA wurde bei 22 °C und das GelMA/DbPE bei 37 °C gedruckt. Bei dem Vergleich der beiden gedruckten Strukturen in ihrer Seitenansicht und ihrer Draufsicht, zeigte sich, dass

GelMA ohne den Zusatz der DbPE keinen hohlen Würfel bildete und nach 5 Schichten in sich zusammenfiel. Hingegen zeigte das GelMA mit DbPE 20 % die Struktur eines hohlen Würfels. Dabei konnten problemlos 11 Schichten mit dem Doppelnetzwerk-Hydrogel gedruckt werden, ohne, dass dies zu mangelnder Strukturintegrität führte. Außerdem war das Drucken bei einer Temperatur von 37 °C problemlos möglich, welches die Erhöhung der Viskosität durch Zusatz der DbPE bestätigte und den Extrusionsdruck bei 37 °C ermöglichte. Dies spiegelt die physiologische Umgebung von Zellen wider und kann somit die Zellviabilität erhöhen, da eine Temperierung des Materials auf niedrige Temperaturen nicht notwendig ist.



**Abbildung 79: Schichtdruck eines hohlen Würfels mit einem einzigen Aushärtungsschritt am Ende.** Es wurden (A) GelMA 5 % und (B) GelMA 5 % mit DbPE 20 % in der Struktur eines hohlen Würfels mit 11 Schichten gedruckt. Durch die Zugabe von 0,3 % LAP und einem Aushärtungsschritt (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000) am Ende wurden die Hydrogele vernetzt. (i) Seitenansicht; (ii) Draufsicht. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 6 mm.

Gitterstrukturen stellen die Strukturintegrität besser dar, da durch die kleinen Zwischenräume zwischen den einzelnen Gittersträngen schnell bestimmt werden kann, ob die Struktur noch sichtbar ist oder bereits kein Gitter mehr erkennbar ist. Deshalb wurde GelMA 5 % mit DbPE 20 % eingesetzt, um mehrere Schichten einer Gitterstruktur zu drucken (Abbildung 80). Analog zum vorherigen Experiment wurde nur am Ende ein Aushärtungsschritt durchgeführt und bei 37 °C gedruckt. Dabei war es möglich die Gitterstruktur beizubehalten und insgesamt 18 Schichten zu drucken, bevor eine Gitterstruktur nicht mehr erkennbar war und die Strukturintegrität nachließ.



**Abbildung 80: Schichtdruck eines Gitters von GelMA 5 % mit DbPE 20 % der Größe 12 x 12 mm mit einem einzigen Aushärtungsschritt am Ende.** GelMA 5 % mit DbPE 20 % wurde auf 37 °C im Druckkopf temperiert und

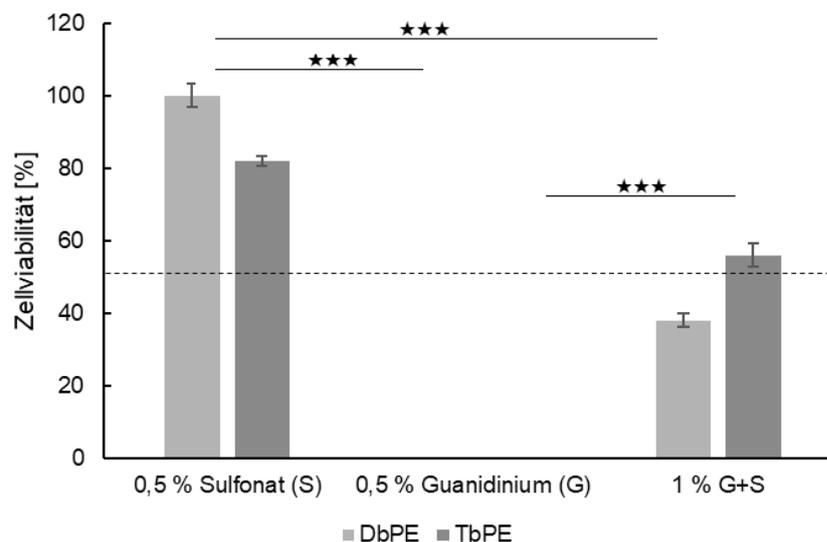
anschließend mehrere Schichten einer Gitterstruktur (12 x 12 mm) gedruckt, bis die Gitterstruktur nicht mehr erkennbar war. Nach (i) 2; (ii) 4; (iii) 8; (iv) 10; (v) 12 und (vi) 18 Schichten wurde die Gitterstruktur visualisiert. Nach einem Druck von 18 Schichten nahm die Strukturintegrität ab und es war keine Gitterstruktur mehr erkennbar. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 4 mm.

### 3.3.3 Biologische Charakterisierung

Neben den chemischen Charakterisierungen der GelMA/bPE-Hydrogele erfolgten biologische Charakterisierungen bezüglich der Zytotoxizität der bPE-Vorläuferlösungen, der Biokompatibilität der GelMA/bPE, sowie dem Einsatz im zellbeladenen 3D-Biodruck.

#### 3.3.3.1 Zytotoxizität der Vorläuferlösungen

Um die Zytotoxizität der DbPE- und TbPE-Vorläuferlösungen zu untersuchen, wurde zunächst ein MTT-Assay durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben. Es wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2, eine humane Leberkarzinomzelllinie, ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Vorläuferlösungen zu den Zellen hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 72 h und eine Bestimmung der Zytotoxizität durch die Zugabe des MTT. Dabei wurden jeweils die Polykation- beziehungsweise die Polyanionlösung einzeln und in Kombination untersucht. Um die Viskosität der Vorläuferlösungen möglichst gering zu halten, wurden geringere Konzentrationen gewählt als die, die beim 3D-Biodruck oder bei der Einbettung von Zellen eingesetzt werden. Es wurde der Einfluss von 0,5 % bPE-Guanidinium und bPE-Sulfonat getestet sowie einer 1 %igen Mischung aus beiden.



**Abbildung 81: Zytotoxizität der Blockcopolyelektrolyt-Vorläuferlösungen auf HepG2-Zellen.**  $1 \cdot 10^4$  HepG2 wurden in DMEM ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen und Zusammensetzungen an Blockcopolyelektrolyt-Vorläuferlösungen behandelt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen anhand eines MTT Assays ausgewertet. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus  $n = 6$  bestimmt. Die Statistik wurde durch einen einfachen ANOVA-Test bestimmt wobei \*\*\* =  $p < 0,001$ .

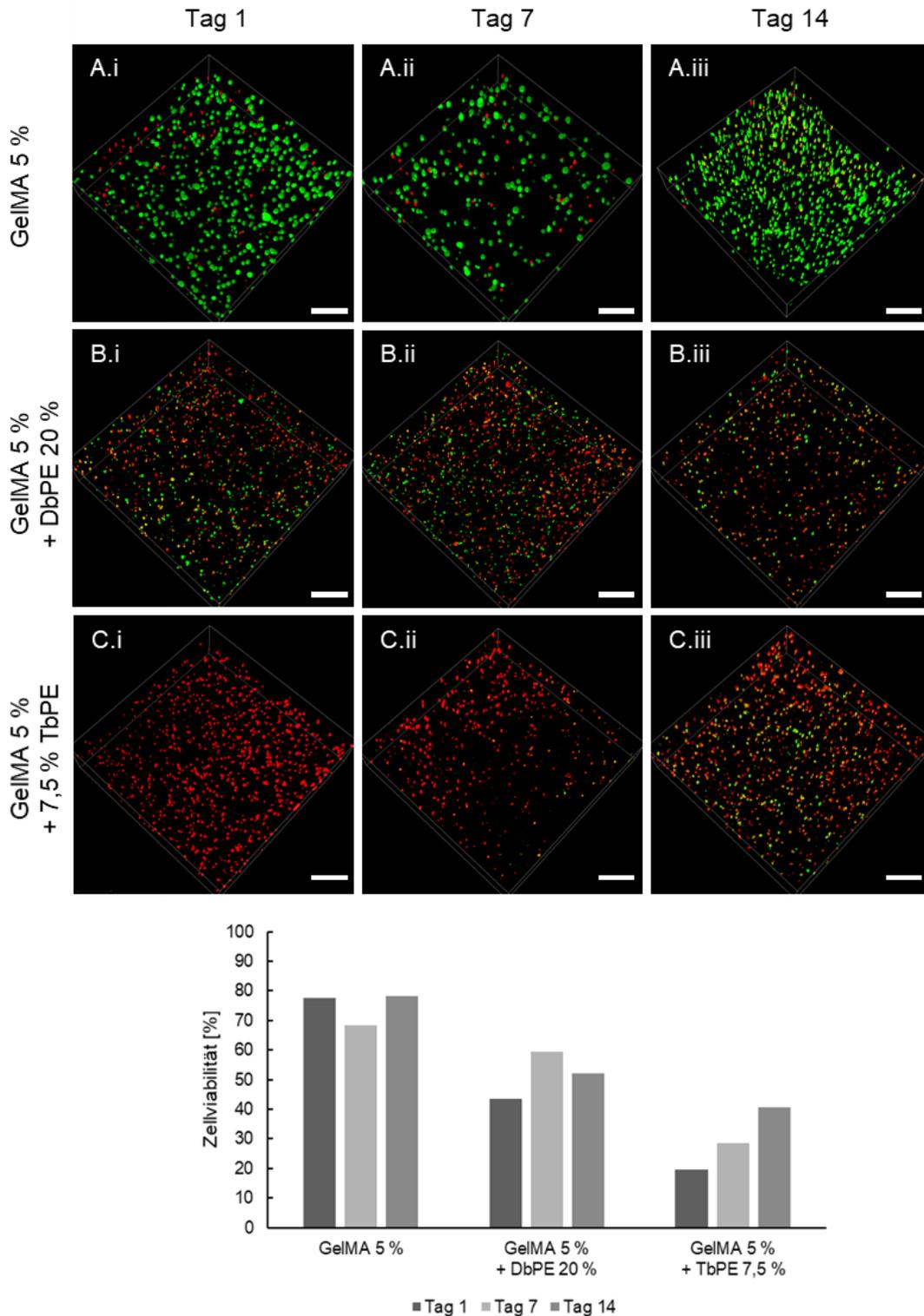
Anhand dieser Zytotoxizitätsuntersuchung (Abbildung 81) konnte festgestellt werden, dass das Blockcopolyelektrolyt bPE-Sulfonat zu keinem Absterben der Zellen führte und eine hohe Zellviabilität von 80-100 % erzielte. Das bPE-Guanidinium erzielte eine Viabilität der Zellen von 0 %. Mit dem Komplexieren der beiden Polyelektrolyte (G+S) konnte eine moderate Zellviabilität festgestellt werden, da die positiven Ladungen des Guanidinium mit den negativen Ladungen des Sulfonats ausgeglichen werden. Es wurden Zellviabilitäten von 40-60 % erzielt. Der absolute Zelltod bei der Inkubation mit den bPE-Guanidinium-Vorläuferlösungen kann auf die positiv geladene Struktur zurückzuführen sein. Hierbei wurde schon häufig in der Literatur darauf verwiesen, dass positiv geladene Gruppen innerhalb von Molekülen einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität ausüben.<sup>395,396</sup>

### 3.3.3.2 3D-Einbettung von Zellen

Um Biokompatibilitätsstudien der Doppelnetzwerk-Hydrogele, bestehend aus den physikalisch vernetzten DbPE oder TbPE (Guanidinium oder Sulfonat) und dem chemisch vernetzten GelMA, durchzuführen, wurden  $2,5 \cdot 10^6$  HepG2/ml innerhalb des Hydrogels eingebettet, vernetzt und deren Viabilität über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt. Hierzu wurden an Tag 1, 7 und 14 jeweils Lebend-/Tot-Färbungen durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog wie in Kapitel 3.1.3.4 beschrieben. Calcein-AM wurde zur Markierung der viablen Zellen und PI zur Markierung der nekrotischen Zellen eingesetzt.

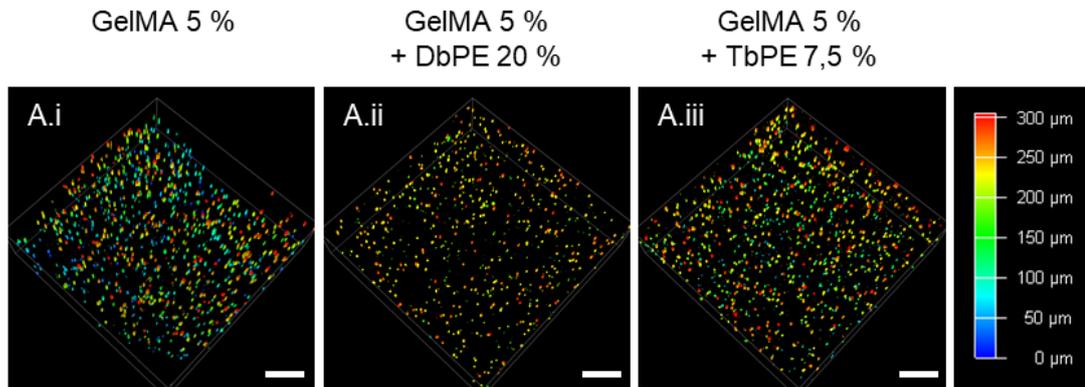
Die Lebend-/Tot-Färbungen wurden mit Hilfe konfokaler Mikroskopie visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 82 dargestellt. In der 3D-Kultivierung der HepG2-Zellen zeigte sich eine geringere Zellviabilität der GelMA/bPE-Hydrogele im Vergleich zum GelMA-Hydrogel. GelMA zeigte Zellviabilitäten von 70-80 % über den gesamten Kultivierungszeitraum. Jedoch ist die Zellviabilität der GelMA/bPE akzeptabel verglichen mit Hydrogelen mit einem ähnlichen PEG-Gehalt. PEG ist zellabweisend und besitzt keine Adhäsionsdomänen für Zellen.<sup>397</sup> Die Gelatinestränge weisen RGD-Domänen auf, die als Integrinrezeptoren dienen, was Zellen eine Anheftung ermöglicht. Eine einheitliche Verteilung der Zellen ist in den GelMA/bPE erkennbar, was darauf schließen lässt, dass im gesamten Hydrogel Adhäsionsdomänen für die Zellen vorhanden waren und somit auch die GelMA-Stränge gleichmäßig verteilt waren. In Hydrogelen mit vergleichbarem PEG-Gehalt kam es häufig zu Sphäroidbildungen von Krebszelllinien, was in den GelMA/bPE-Hydrogelen nicht der Fall ist.<sup>398,399</sup> Es wurde in den ersten Tagen eine hohe Anzahl an toten Zellen detektiert, was auf die erhöhte Netzwerkdichte der GelMA/bPE zurückzuführen ist. Durch die Kombination von zwei Netzwerken ist die Dichte des Netzwerkes, verglichen mit den Netzwerken allein betrachtet, deutlich erhöht. In den GelMA/DbPE-Hydrogel war eine Zellviabilität von 40 % zu Beginn detektierbar, welche über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen auf knapp 60 % anstieg. Wie bereits im Kapitel 3.3.2.4 angesprochen, besteht die Möglichkeit, dass die von den DbPE gebildeten Mizellen aus dem Netzwerk herausdiffundieren, was in einem weniger dichten Netzwerk sowie in einer Verringerung der Interaktionen zwischen den DbPE und den Zellen resultieren kann. Dies kann schlussendlich eine höhere Zellviabilität induziert haben. Mit diesem Ergebnis wird der mögliche Einsatz der DbPE als Opferstrukturen, die anschließend aus der Struktur herausgelöst werden können, bestätigt. Die Überlebensrate der

Zellen in den GelMA/TbPE-Hydrogelen war deutlich geringer. Durch das dichte Netzwerk und die Exposition gegenüber der TbPE waren überwiegend nekrotische Zellen detektierbar. An Tag 14 nahm die Zellviabilität von unter 20 % an Tag 1 zu 40 % an Tag 14 zu, was möglicherweise auf eine Veränderung des Grundgerüsts zurückzuführen ist. Durch die im Kultivierungsmedium enthaltenen Proteasen werden die GelMA-Stränge mit der Zeit abgebaut und die Zellen können somit mehr Platz im weniger dichten Netzwerk gewonnen haben. Zukünftig sollen in das bPE-Netzwerk bioabbaubare Gruppen eingebaut werden, um die gerichtete Freisetzung der bPE zu ermöglichen, wenn die unterstützenden Eigenschaften dieser nicht mehr benötigt werden. Erste Schritte wurden hierbei in einem 3-monatigen Forschungsaufenthalt an der UCLA unternommen und Polymilchsäure (*engl. poly lactic acid, PLA*) in das Rückgrat der bPE eingebaut. Hierzu müssen noch weitere Studien und Experimente erfolgen, weshalb sie hier nicht weiter aufgeführt werden.



**Abbildung 82: Lebend-/Tot-Färbung von HepG2 im GelMA-Hydrogel und unterschiedlichen Zusammensetzungen von GelMA/bPE.** Es wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml in dem Hydrogel mit einem Volumen von 200  $\mu$ l eingekapselt. Durch Zugabe von 0,3 % des Photoinitiators LAP und Bestrahlung mit UV-Licht (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm) konnte eine chemische Vernetzung stattfinden. An Tag 1, 7, 14 und 21 wurde jeweils eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM (Grün, viable Zellen,  $\lambda_{ex}$ : 488 nm,  $\lambda_{em}$ : 500-580 nm) und PI (Rot, nekrotische Zellen,  $\lambda_{ex}$ : 532 nm,  $\lambda_{em}$ : 610-700 nm) durchgeführt. Es wurden Z-Stacks (h= 300  $\mu$ m, Abstand= 5  $\mu$ m) mit Hilfe von inverser Konfokalmikroskopie (Leica Stellaris 5) aufgenommen. (A) GelMA 5 %, (B) GelMA 5 % + DbPE 20 %, (C) GelMA 5 % + TbPE 7,5 %. (i) Tag 1, (ii) Tag 7, (iii) Tag 14. 3D-Projektionen konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. Mit *ImageJ* wurde der prozentuale Anteil an lebendigen Zellen quantifiziert. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 200  $\mu$ m.

In den Tiefenprofilen (Abbildung 83) sind die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen der Höhe von 300  $\mu\text{m}$  dargestellt. Zunächst war es möglich, alle Hydrogele über einen Zeitraum von 14 Tagen zu kultivieren. Die Struktur blieb dabei erhalten. Außerdem zeigten die Zellen eine homogene Verteilung in allen Z-Ebenen der Hydrogele, was das Vorhandensein des chemisch vernetzten GelMAs in allen Z-Ebenen bestätigt, da die Zellen an die RGD-Domänen des GelMAs binden konnten.



**Abbildung 83: Tiefenprofil der HepG2 im GelMA-Hydrogel und unterschiedlichen Zusammensetzungen von GelMA/bPE nach 14 Tagen.** (i) GelMA 5 %, (ii) GelMA 5 % + DbPE 20 %, (iii) GelMA 5 % + TbPE 7,5 %. Anhand der Z-Stacks ( $h = 300 \mu\text{m}$ , Abstand =  $5 \mu\text{m}$ ) der Lebend-/Tot-Färbungen konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit Dr. T. Göckler und Dr. D. Li. Der Maßstab entspricht  $200 \mu\text{m}$ .

### 3.3.3.3 3D-Biodruck

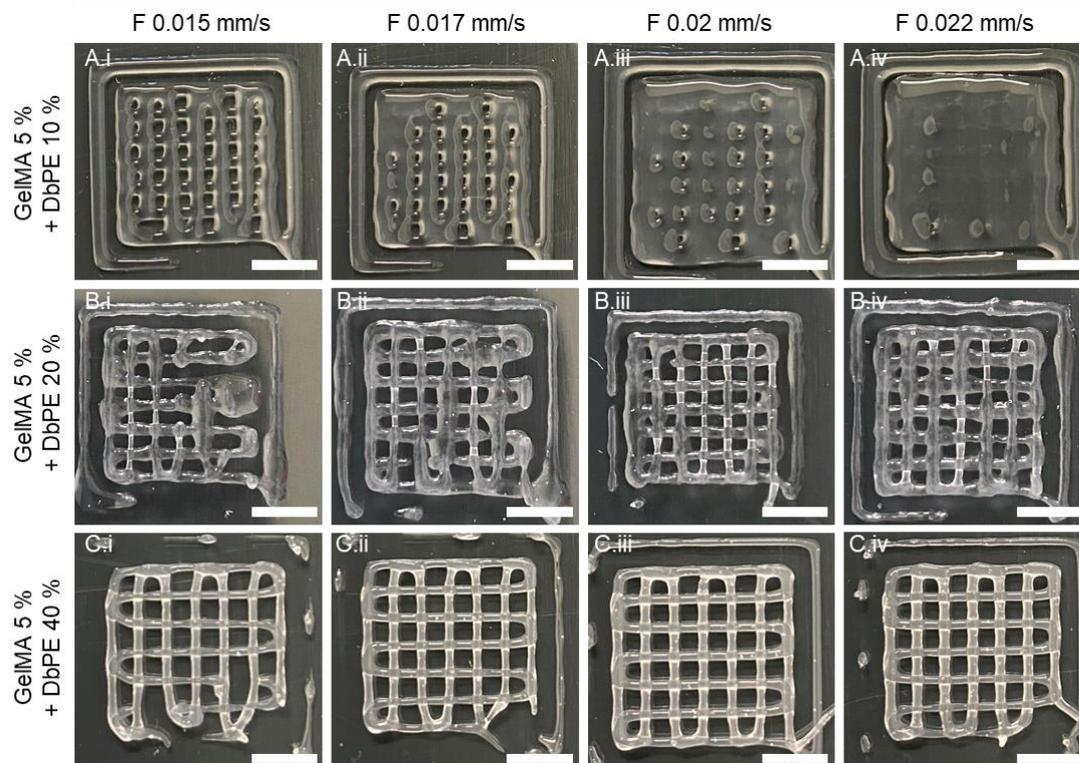
Im nächsten Schritt wurden zunächst durch den Einsatz unterschiedlicher Zusammensetzungen von GelMA/bPE und verschiedener Extrusionsgeschwindigkeiten die Druckbarkeit der Doppelnetzwerk-Hydrogele bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht. Anschließend wurde mit einem zellbeladenen 3D-Biodruck die Fähigkeit der GelMA/DbPE zum Aufbau von makroskopischen Strukturen untersucht.

#### 3.3.3.3.1 Extrusionsbasiertes Druckscreening der GelMA/bPE

Die Inkorporation des zusätzlichen physikalischen Netzwerkes der bPE soll die Viskosität des chemisch vernetzten GelMAs erhöhen, so dass ein extrusionsbasiertes Verdrucken bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ermöglicht wird. Um dies zu untersuchen, wurde das GelMA mit unterschiedlichen Konzentrationen der bPEs versetzt und eine Gitterstruktur ( $12 \times 12 \text{ mm}$ ) gedruckt, damit die Formstabilität überprüft werden konnte. Außerdem wurden unterschiedliche Extrusionsgeschwindigkeiten eingesetzt, um das Verhalten der GelMA/bPE-Biotinten zu charakterisieren.

Zunächst wurde das GelMA mit einer Polymerkonzentration von 5 % mit den unterschiedlichen Konzentrationen an bPE und 0,3 % LAP versetzt und in den Druckkopf eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Temperierung auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 min und das Anbringen einer konischen Nadel (Durchmesser  $0,25 \text{ mm}$ ).

In Abbildung 84 sind die extrudierten Gitterstrukturen des GelMAs mit unterschiedlichen Konzentrationen an DbPEs dargestellt. Mit zunehmender Konzentration an DbPE konnte eine bessere Extrudierbarkeit und Formstabilität nach dem Druck erhalten werden. Dies entsprach den Erwartungen aus den rheologischen Untersuchungen. Außerdem wurde eine verbesserte Struktur mit Erhöhung der Extrusionsgeschwindigkeit erzielt. Dagegen zeigte das GelMA mit 10 % DbPE eine flüssigere Konsistenz und zerfloss noch während des Druckvorganges auf dem Objektträger. Dies entsprach ebenfalls dem zuvor ausgewählten Druckfenster, da diese Zusammensetzung noch unter dem Druckfenster aus der rheologischen Charakterisierung lag. Die beste Auflösung wurde mit GelMA und einer Konzentration von 40 % DbPE erhalten. Jedoch nimmt das Netzwerk mit steigender DbPE-Konzentration an Dichte zu. Die dichte Mizellenkonzentration kann die chemische Vernetzung des GelMAs behindern und somit die Vernetzungsdichte verändern. Deshalb wurde dieses Hydrogel als ungeeignet definiert und GelMA versetzt mit 20 % DbPE für zukünftige Experimente gewählt.

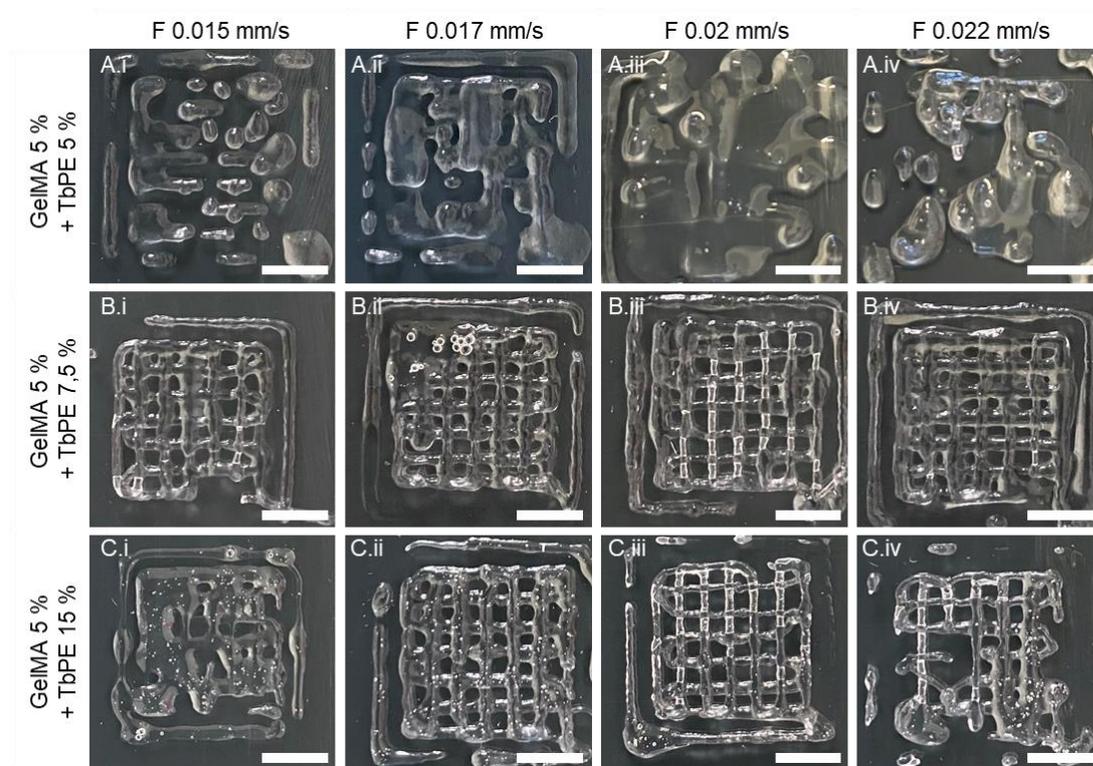


**Abbildung 84: Screening von GelMA/DbPE mit unterschiedlichen Extrusionsgeschwindigkeiten bei 37 °C im extrusionsbasierten 3D-Druck.** Die Hydrogele wurden in einer 3 ml Spritze angesetzt und mit 0,3 % LAP versetzt. Im Druckkopf des BioSpot BPs wurden die Tinten für 30 min auf 37 °C temperiert und anschließend mit einer konischen Nadel (0,25 mm Durchmesser) versehen. Es wurden Gitterstrukturen (12 x 12 mm) gedruckt und unterschiedliche Extrusionsgeschwindigkeiten (F 0.015 mm/s, F 0.017 mm/s, F 0.02 mm/s, F 0.022 mm/s) getestet. In Kollaboration mit Dr. D. Li, Dr. T. Göckler und B. Sc. Felix Mecklenburg. Der Maßstab entspricht 4 mm.

Analog zum Screening der DbPE wurde das GelMA mit unterschiedlichen TbPE-Konzentrationen versetzt und erneut die gleichen Gitterstrukturen gedruckt und dieselben unterschiedlichen Extrusionsgeschwindigkeiten eingesetzt (Abbildung 85). Dabei zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Mit zunehmender Konzentration an TbPE verbesserte sich die Formstabilität und die Extrudierbarkeit analog zu GelMA/DbPE. Außerdem wurden auch bei dem 3D-Druck der TbPE und Erhöhung der Extrusionsgeschwindigkeiten bessere Auflösungen der Strukturen erhalten. Dabei fiel GelMA mit einer Konzentration von 5 % TbPE

nicht in das zuvor bestimmte Druckfenster, was sich in diesem Screening widerspiegelt. Es wies eine flüssige Konsistenz auf und fing bereits während des Ablegens des Filaments an zu verlaufen. GelMA mit 7,5 % oder 15 % TbPE zeigten eine hohe Auflösung der Struktur. Jedoch kam es bei der Extrusion verglichen mit der der DbPE häufiger zum Abreißen des Filaments und dadurch zu Löchern innerhalb der Struktur. Ein Grund hierfür kann in der Schwierigkeit liegen, stark verbundene Netzwerke, wie die TbPE sie ausbilden können, durch die kleine Öffnung der konischen Nadel zu extrudieren. Auch die hohen Konzentrationen der TbPE führen zu einem dichten Netzwerk, welches die Zellviabilität verringern kann.

Aufgrund dieser Druckscreensings wurden für die Druckversuche mit Zellen GelMA mit den Konzentrationen von 20 % an DbPE und 7,5 % an TbPE gewählt. Dies wurde ausgewählt, da diese Formulierungen eine hohe Auflösung nach dem Drucken zeigten, die Netzwerkdichte jedoch so gering wie möglich gehalten werden sollte, damit die Viabilität und die Proliferation der Zellen gewährleistet werden kann.



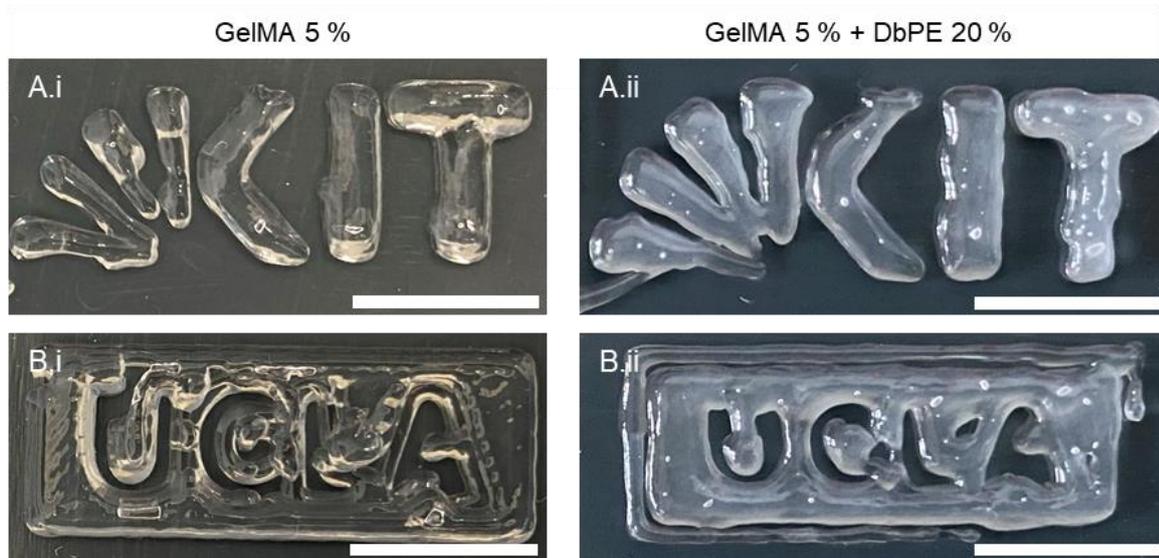
**Abbildung 85: Screening von GelMA/TbPE mit unterschiedlichen Extrusionsgeschwindigkeiten bei 37 °C im extrusionsbasierten 3D-Druck.** Die Hydrogele wurden in einer 3 ml Spritze angesetzt und mit 0,3 % LAP versetzt. Im Druckkopf des BioSpot BPs wurden die Tinten für 30 min auf 37 °C temperiert und anschließend mit einer konischen Nadel (0,25 mm Durchmesser) versehen. Es wurden Gitterstrukturen (12 x 12 mm) gedruckt und unterschiedliche Extrusionsgeschwindigkeiten (F 0.015 mm/s, F 0.017 mm/s, F 0.02 mm/s, F 0.022 mm/s) getestet. In Kollaboration mit Dr. D. Li, Dr. T. Göckler und B. Sc. Felix Mecklenburg. Der Maßstab entspricht 4 mm.

### 3.3.3.3.2 Extrusionsbasierter 3D-Biodruck mit Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Kapitel 3.3.2.7 bereits gezeigt werden, dass ein Aufbau mehrerer Schichten mit Hilfe des extrusionsbasierten Drucks und durch Zugabe der bPEs möglich war. Außerdem wurde die Viskosität des GelMAs durch das zweite elektrostatische Netzwerk so erhöht, dass ein Drucken bei 37 °C ermöglicht wurde. Zwischen den verschiedenen Schichten musste keine Aushärtung erfolgen und im Gegensatz zum GelMA blieb die Struktur erhalten und fiel nicht in sich zusammen. In den vorherigen Experimenten lag der Fokus auf dem Druck in die Höhe. Um die Auflösung bei einem Druck einer größeren, aber flacheren Struktur zu untersuchen, wurden die Logos (KIT, UCLA) der jeweils beteiligten Universitäten mit Zellen gedruckt (Abbildung 86).

Hierfür wurden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml mit dem GelMA/DbPE (5 % GelMA, 20 % DbPE) gemischt, im Druckkopf für 30 min auf 37 °C temperiert und eine konische Nadel mit dem Durchmesser von 0,25 mm angebracht. Wie in Kapitel 3.3.3.2 beschrieben wurden HepG2-Zellen verwendet, um die Ergebnisse vergleichen zu können. GelMA wurde hierbei bei 22 °C und GelMA/DbPE bei 37 °C gedruckt.

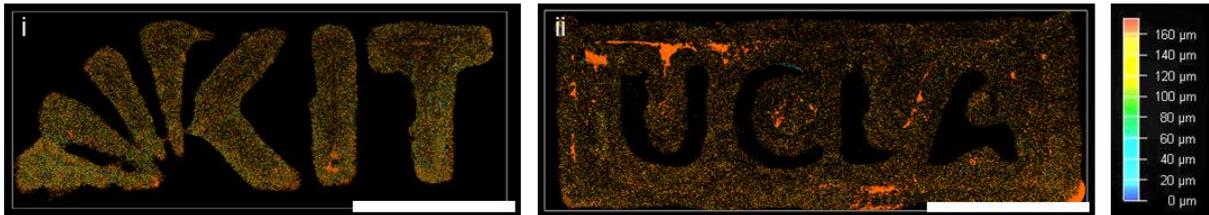
Es zeigte sich, dass sowohl mit der GelMA-Tinte als auch mit der GelMA/DbPE-Tinte einheitliche Logos der Universitäten gedruckt werden konnten. Beide zeigten eine hohe Transparenz, wobei die Zugabe der DbPEs zu einer leichten Trübung führte.



**Abbildung 86: 3D-Biodruck von GelMA 5 % und GelMA 5 % mit DbPE 20 %.** Die Hydrogele wurden in einer 3 ml Spritze angesetzt und mit 0,3 % LAP versetzt. Im Druckkopf des BioSpot BPs wurden die Tinten für 30 min auf 37 °C temperiert und anschließend mit einer konischen Nadel (0,25 mm Durchmesser) versehen. Es wurde je ein KIT-Logo und ein UCLA-Logo (10 x 26 mm) gedruckt. (A) KIT-Logo, (B) UCLA-Logo; (i) GelMA 5 %, (ii) GelMA 5 % + DbPE 20 %. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 10 mm.

Nach einer 7-tägigen Kultivierung in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) wurde eine Färbung der Zellen vorgenommen, damit diese anschließend mit einem inversen Konfokalmikroskop visualisiert werden konnten. Bei der Temperierung des GelMAs besteht häufig das Problem, dass die Zellen mit dem Hydrogel bei einer Temperatur von 37 °C gemischt werden müssen, da das GelMA bei dieser Temperatur flüssig ist. Damit die GelMA-Tinte jedoch druckbar wird, muss eine Temperierung auf 22 °C erfolgen, damit die Viskosität

erhöht wird. Diese Temperierung wird im Druckkopf durchgeführt und erfolgt langsam, weshalb es dazu führen kann, dass die eingebetteten Zellen innerhalb der Tinte absinken und sich am Boden der Spritze ansammeln. Das Absinken der Zellen verhindert eine homogene Verteilung im anschließend gedruckten Konstrukt, was zu unerwünschten Zellakkumulationen führt. Durch Zugabe der DbPE wurde die Viskosität erhöht und eine homogene Verteilung der Zellen im gedruckten Konstrukt gewährleistet, da das Absinken der Zellen während der Temperierung auf 37 °C im Druckkopf verhindert wurde. Eine homogene Verteilung der Zellen über eine Höhe von 160 µm in den gedruckten Logos konnte festgestellt werden, was aus den Tiefenprofilen in Abbildung 87 zu entnehmen ist.



**Abbildung 87: Tiefenprofil des 3D-Biodrucks von zellhaltigen GelMA 5 % mit DbPE 20 %.**  $2,5 \cdot 10^6$  HepG2/ml wurden zusammen mit den Hydrogelen in einer 3 ml Spritze angesetzt und mit 0,3 % LAP versetzt. Im Druckkopf des BioSpot BPs wurden die Tinten für 30 min auf 37 °C temperiert und anschließend mit einer konischen Nadel (0,25 mm Durchmesser) versehen. Es wurde je ein KIT-Logo und ein UCLA-Logo (10 x 26 mm) gedruckt und anschließend mit UV-Licht bestrahlt (30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>, Omnicure S2000, 320-500 nm). Nach 7 Tagen wurde eine Lebend-/Tot-Färbung mit Calcein-AM ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500-550 nm) und PI ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 532 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 550-650 nm) durchgeführt. Anhand der Z-Stacks (h= 160 µm, Abstand= 5 µm) konnten Tiefenprofile erzeugt werden, welche die Verteilungen der Zellen in den verschiedenen Ebenen aufzeigen. 3D-Projektionen und Tiefenprofile konnten mit Hilfe der Leica LasX-Software erstellt werden. In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler. Der Maßstab entspricht 10 mm.

### 3.3.4 Kapitelzusammenfassung

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel ein Doppelnetzwerk-Hydrogel hergestellt werden, welches aus einem physikalisch und einem chemisch vernetzten Netzwerk bestand. Das physikalische Netzwerk wurde durch Tri- oder Diblockcopolyelektrolyte (TbPE oder DbPE) gebildet, die auf der Basis von PAGE<sub>m</sub>-PEG<sub>n</sub>-PAGE<sub>m</sub> für die TbPE oder mPEG<sub>n</sub>-PAGE<sub>m</sub> für die DbPE aufgebaut wurden. Hierbei bildet PEG den neutralen Mittelblock (B) der Tri- (ABA) oder Diblockcopolymeren (AB). Die Endblöcke (B) wurden durch Guanidinium oder Sulfonat funktionalisiert, wodurch den Polymeren eine positive oder negative Ladung verliehen wurde. Die Guanidiniumfunktionalisierung war das Polykation und die Sulfonatfunktionalisierung das Polyanion. Als chemisch vernetztes Netzwerk diente GelMA, welches bereits anhand einer Vielzahl an Publikationen mit einer hohen Biokompatibilität ausgezeichnet wurde. GelMA wird durch Zugabe eines Photoinitiators und anschließender Bestrahlung mit UV-Licht kovalent vernetzt. Diese Doppelnetzwerk-Hydrogele wurden entwickelt, um die Anwendung von niedrigviskosen Hydrogelen im 3D-Biodruck zu verbessern und den 3D-Biodruck von makroskopischen Hohlstrukturen zu ermöglichen. Es wurde eine weitreichende Materialstudie durchgeführt, bei der rheologische Eigenschaften, physiko-mechanische Eigenschaften und unter anderem Quelleigenschaften näher untersucht wurden. Außerdem wurde ein Screening der Druckbarkeit der Biotinten im extrusionsbasierten Biodruck durchgeführt, gefolgt von dem Biodruck mit Zellen und weiteren biologischen Untersuchungen.

Durch ein rheologisches Screening zu Beginn konnten die für den extrusionsbasierten Biodruck notwendige Eigenschaften charakterisiert werden. So war ein scherverdünnendes Verhalten und eine schnelle strukturelle Erholung der GelMA/bPE zu beobachten. Durch Zugversuche konnte herausgefunden werden, dass der Zusatz der bPE die mechanische Belastbarkeit des GelMAs erhöhte. Außerdem wurden den bPE durch das zweite chemische Netzwerk eine kontrollierbare Quellbarkeit verliehen. Durch die Annahme, dass die Viskosität von niedrigviskosen Lösungen, wie zum Beispiel das GelMA bei 37 °C, durch den Zusatz der bPE erhöht werden sollte, wurden mehrere Schichten mit einem letzten Aushärtungsschritt am Ende gedruckt. Es zeigte sich, dass ein 3D-Druck von mehreren Schichten der GelMA/DbPE bei 37 °C problemlos möglich war und die Struktur formstabil blieb. Somit wurde es mit dem Doppelnetzwerk möglich makroskopische Hohlstrukturen zu drucken. Anschließend wurden biologische Untersuchungen mit GelMA 5 % mit DbPE 20 % oder TbPE 7,5 % durchgeführt. Bei der Einbettung von HepG2-Zellen zeichneten sich die GelMA/bPE-Hydrogele durch eine geringere Zellviabilität verglichen mit dem GelMA aus. Durch das dichtere Netzwerk können die Zellen mit weniger Nährstoffen versorgt werden, weshalb keine ausreichende Versorgung der Zellen gewährleistet werden konnte. Die GelMA/DbPE zeigten eine höhere Zellviabilität, da die von den DbPE ausgebildeten Mizellen aus dem Hydrogel diffundieren und somit die Exposition gegenüber der DbPE geringgehalten wird und das Netzwerk aufgelöst wird.

Zukünftig können bioabbaubare Gruppen innerhalb des PEG-PAGE-Rückgrat eingebaut werden, um die bPE gezielt freizusetzen und das Netzwerk zu lockern. Der Zusatz von bPE eignet sich hervorragend für den Einsatz, um niedrigviskosen Flüssigkeiten eine höhere Viskosität zu verleihen, um diese bei Temperaturen die *in vivo* vorherrschen, zu drucken. DbPE können zudem als Opferstrukturen eingesetzt werden, da die vorherrschende Mizellenanordnung es ermöglicht, nach dem Druck herausgelöst zu werden.

### 3.4 Fazit und Abschlussdiskussion

Mit der vorliegenden Arbeit konnte das große Potenzial verschiedener Materialien für den Einsatz im Aufbau von 3D-Gewebemodellen verdeutlicht werden. Hydrogele auf Gelatinebasis wurden als geeignete Materialien für den Aufbau von Herzgewebe etabliert. Ein humanes Herzgewebe mit primären Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, HCM), Herzfibroblasten (HCF) und Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) konnte erfolgreich aufgebaut werden, wobei eine Kokultur zu einer Erhöhung der Zellviabilität und Zellausrichtungen führte. Es konnten erfolgreich humane Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenziert werden und für den Aufbau eines Herzmodells eingesetzt werden. Eine 3D-Kultur der differenzierten Kardiomyozyten in GelMA *medium* erzielte vielversprechende Ergebnisse für den Aufbau eines Herzmuskelmodells. In dieser Arbeit konnten erste Erkenntnisse zur Rekonstruktion eines dreidimensionalen Herzgewebes mit gelatine-basierten Hydrogelen als Stützmatrix erzielt werden. Mit weiteren Optimierungen in der Kokultur, wie beispielsweise mit weiteren herzspezifischen Zellen, können diese Modelle für Transplantationen oder Wirkstoffscreenings eingesetzt werden. Aktuelle Forschungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ute Schepers befassen sich auf Basis der Erkenntnisse dieser Arbeit mit Modellierungen von Herzkrankheiten, wie zum Beispiel der Herzfibrose und Herzrhythmusstörungen, sowie anschließendem Screening von Medikamenten zur Behandlung dieser Krankheiten.

Zur Generierung von makroskopischen Hohlräumen, wie es im Herzen vorkommt, wurde in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Srivastava (UCLA, Los Angeles, USA) erfolgreich ein Hydrogel, welches aus Doppelnetzwerken gebildet wird, hergestellt. Die Doppelnetzwerke wurden von dem elektrostatischen Netzwerk von geladenen Blockcopolyelektrolyten (bPE) und dem chemisch vernetzten Gelatinemethacrylat (GelMA) gebildet. Durch das zusätzliche elektrostatische Netzwerk konnte dem GelMA-Hydrogel eine mechanische Festigkeit verliehen werden. Außerdem war ein 3D-Biodruck bei 37 °C des Doppelnetzwerkes möglich, was den *in vivo* Bedingungen der Zellen entspricht. Durch die Erweiterung des GelMAs mit den bPE wurde die Viskosität des GelMAs für den 3D-Biodruck erhöht, wodurch die Verringerung der Zellviabilität aufgrund von Temperierungen auf niedrigere Temperaturen minimiert wurde. Durch die erhöhte Viskosität des Hydrogels war es zudem möglich, mehrere Schichten mit einem letzten Aushärtungsschritt am Ende zu drucken. Hierdurch wurde der Fabrikationsprozess von makroskopischen Gewebemodellen erleichtert. Durch den Einsatz der beiden Netzwerke konnten die jeweiligen Vorteile der Einzelnetzwerke vereint werden. Der Einsatz dieser Doppelnetzwerk-Hydrogele für einen formstabilen 3D-Biodruck von makroskopischen Konstrukten stellt eine vielversprechende Anwendung dar.<sup>370</sup>



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verwendete Zelllinien

HCM	Humane Herzmuskelzellen ( <i>engl. human cardiac myocytes</i> , PromoCell GmbH), primäre Zelllinie, Passage 3-9
HCF	Humane Herzfibroblasten ( <i>engl. human cardiac fibroblasts</i> , PromoCell GmbH), primäre Zelllinie, Passage 3-9
HD11	Humane induzierte pluripotente Stammzellen ( <i>engl. human induced pluripotent stem cells</i> , hiPSC), bereitgestellt von Prof. Dr. med. Jochen Utikal, DKFZ Heidelberg, Passage 240-275
HepG2	Humane Leberkrebszelllinie, immortalisiert
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen ( <i>engl. human umbilical vein endothelial cells</i> , PromoCell GmbH), primäre Zelllinie, Passage 3-9

#### 4.1.2 Chemikalien und Reagenzien

	Chemikalie/Reagenz	Lieferant
<b>Medien/ Zellkultur</b>	DMEM, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (41966-0299)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DMEM/F12 (11320033)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DPBS <sup>-/-</sup> , <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline<sup>-/-</sup></i> (14190-094)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	DPBS <sup>+/+</sup> , <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline<sup>+/+</sup></i> (14190-094)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	EGM-2, <i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i> (22011)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	FCS, <i>Fetal calf serum</i> (10500064)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	FGM-3, <i>Fibroblast Growth Medium-3</i> (C-23025)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	MGM, <i>Myocyte Growth Medium</i> (C-22070)	PromoCell GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) (15140122)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	StemPro™ Accutase™ Zelldissoziationsreagenz (A1110501)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)

<b>Chemikalien</b>	Trypsin-EDTA 0,25 % (25200-056)	Gibco® life technologies (Carlsbad, USA)
	NCA, 5-Norbonen-2-carboxylsäure, (NO667)	TCI (Toshima, Tokyo, Japan)
	10x RQ1 DNase Puffer (M6101)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	5x Green GoTaq Reaktionspuffer (M7911)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	6x Loading Dye (B7021S)	New England Biolabs® GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	AHCT, N-Acetylhomocysteinethiolacton (A16602-25G)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	AGE, Allylglycidylether (A32608)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Calcein-AM (C3099)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Cas-Block™ (008120)	Thermo Fisher Scientific (Waltheim, USA)
	CDCl <sub>3</sub> , Chloroform-d (570699)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Chloroform (288306)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Corning® Matrigel®, hESC qualified (354277)	Corning Inc. (New York, USA)
	Cysteamin-Hydrochlorid (M6500)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	D <sub>2</sub> O, Deuteriumoxid (435767)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	DMPA, 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (196118)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	DMF, Dimethylformamid (6251.2)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	DMSO, Dimethylsulfoxid (A994.2)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	DNA-Marker 100 bp (N3231S)	New England Biolabs® GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	dNTP Solution Mix (N0447S)	New England Biolabs® GmbH (Frankfurt, Deutschland)
	Doxycyclin-hyclat (D9891-1G)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
EDC-HCl, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (2156.3)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure (8043)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)	

<b>Chemikalien</b>	Ethanol absolut (20821.296)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml (2218.1)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Fluo-4-AM, membrangängig (F14201)	Thermo Fisher Scientific (Waltheim, USA)
	Gelatine, Typ A aus Schweinehaut (G2500-500G)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	GoTaq® qPCR MasterMix (A6001)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	GoTaq® Polymerase (M7845)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Hexan (3907.2)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	HCl, Salzsäure (H1758)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Hoechst33342 Trihydrochlorid (H3570)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Irgacure 2959, 2-Hydroxy-4'-(2- hydroxyethoxyl-2- methylpropiophenon (410896-10G)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Isopropanol (6752.1)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Kalium (244864)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	KCl, Kaliumchlorid (P017.1)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	LAP, Lithium-Phenyl-2,4,6- trimethylbenzoylphosphinat (L0290)	TCI (Toshima, Tokyo Japan)
	MAA, Methacrylsäureanhydrid (276685-500ML)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	MES, 2-( <i>N</i> -Morpholino)- ethansulfonsäure (4256.2)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	mTeSR™ Plus Basalmedium mit 5x Zusätzen (100-0276)	StemCell™ Technologies (Köln, Deutschland)
	MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5- diphenyltetrazoliumbromid (G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	M-MLV Reverse Transkriptase (Nr. M3683)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , Natriumcarbonat (1.06392.0500)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NaHCO <sub>3</sub> , Natriumhydrogencarbonat (6885)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)	
NaOH, Natriumhydroxid (P031.1)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)	

<b>Chemikalien</b>	Naphthalin (147141)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Natrium-3-mercaptopropansulfonat (D8016)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	NHS, N-Hydroxysuccinimid (130672-100G)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Normocin, Antimicrobial Reagent (ant-nr-1)	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
	Nukleasefreies Wasser (P119E)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	PEG, Polyethylenglykol (M=20.000 g/mol, 81300)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	PFA, Paraformaldehyd (818715)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Phalloidin-TRITC, Phalloidin-Tetramethylrhodamin B-Isothiocyanat (P1951)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Presto-Blue™ Reagenz (A13262)	Thermo Fisher Scientific (Waltheim, USA)
	PI, Propidiumiodid (P4170)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	1H-Pyrazol-1-carboxamidin (402516)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	<i>Random Primer</i> (C1181)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	RNase AWAY® (732-2271)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	RQ1 DNase <i>Stop Solution</i> (M6101)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	SDS, Natriumdodecylsulfat (4360)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	<i>Solubilization Solution Stop Mix</i> (G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	STEMdiff™ <i>Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit</i> (05010)	StemCell™ Technologies (Köln, Deutschland)
	STEMdiff™ <i>Cardiomyocyte Dissociation Kit</i> (05025)	StemCell™ Technologies (Köln, Deutschland)
	THF, Tetrahydrofuran (7344.2)	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	TNBSA, 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (P2297-10ML)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Triton X-100 (T-9284)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	
TRIzol (15596018)	Thermo Fisher Scientific (Waltheim, USA)	

<b>Chemikalien</b>	Universalagarose (32-2789P)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Y-27632 Dihydrochlorid (Rock-Inhibitor, 1293823)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)

#### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Lieferant</b>
Cryoröhrchen, 1,8 ml, weißer Verschluss	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Dialyseschläuche (14 kDa, 43 mm)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Einmalküvetten (1 ml)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Hämatocytometer-Deckgläser	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Medienflaschen Nalgene® quadratisch, 250 ml/100 ml	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Messpipetten 5 ml, 10 ml	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Multiwellplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well, 96-Well)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Nadeln, konisch, rot, 0,25 mm, Standard	Vieweg GmbH (Kranzberg, Deutschland)
Objektträger, Q Path Plus 76 x 26 mm	Labonord (Templemars, Frankreich)
Parafilm M, 4 in. X 125 ft. roll	Carl-Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pasteurpipetten	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
PCR-Strips	Brand GmbH
Petrischalen, PS, 10 cm	Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen (0,5-20 µl, 1-200 µl, 100-1000 µl)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
qPCR Platten	Bio-Rad Laboratories GmbH
Reservoir (50 ml)	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäße transparent (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
Reaktionsgefäße braun (1,5 ml)	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)

Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Spritzen, Inkjet, 20 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen, Inkjet, Luer Lock, 3 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen Omnifix 1 ml	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterican® Einmalinjektionskanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilfilter, Aerodisc Syringe Filters	PALL life sciences (New York, USA)
Zählkammer, Neubauer	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
<i>μ-Slide 8 Well high, ibiTreat</i>	Ibidi (Martinsried, Deutschland)

#### 4.1.4 Geräte

	Gerät	Hersteller
<b>Zellkultur</b>	Absaugpumpe Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
	CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
	ENVAIReco® air Werkbank	ENVAIR (Emmingen, Deutschland)
	Mehrkanalpipetten 1-10 µl/20-200 µl	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Pipetten Research Plus 1-10 µl/10-100 µl/100-1000 µl	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
	Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
	Pipettierhilfe accuJET pro	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Stickstofftank Biosafe MD Chronos 100	Messer Industriegase (Bad Solden, Deutschland)
<b>Weitere Geräte</b>	Biospot BP	Biofluidix GmbH (Freiburg, Deutschland)
	CFX Connect Real-Time PCR System	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	Eismaschine	WESSAMAT GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)

	Feinwaage	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Gefriertrocknungsanlage (Lyophilisator) Christ Alpha 1-4	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode, Deutschland)
	Gelelektrophorese	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5	Leica (Wetzlar, Deutschland)
	Kühlsystem für BioSpot BP, Umlaufkühler ULK 602 0	Fryka-Kältetechnik GmbH (Esslingen, Deutschland)
	Magnetrührer mit Heizplatte VWR Advanced	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Microzentrifuge Micro Star 17R	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
	Mikroplatten-Reader SpectraMax® iD3	Molecular Devices
	Mikrowelle	OK. (Ingoldstadt, Deutschland)
	NanoDrop™ Lite, Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	NMR Spektrometer AVANCE 400	Bruker GmbH (Rheinstetten, Deutschland)
	Omniscure® Series 2000	Excelitas Technologies (Waltham, USA)
	pH-Meter	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	Plattenzentrifuge Labofuge 400 R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
	Power Supply Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
	Rheometer MCR 302 Platte-Platte-System	Anton Paar USA Inc. (Torrance, USA)
	SmartSpec 3000	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
	Thermocycler peqSTAR	VWR International (Darmstadt, USA)
	Thermomixer 5436	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
	Wasserbad	VWR International (Darmstadt, USA)
	Vortex-Genie 2	VWR International (Darmstadt, USA)
	Zentrifuge Megafuge 2.0	Heraeus (Hanau, Deutschland)
	Zugprüfmaschine Instron 5542	Instron GmbH (Norwood, USA)

<b>Mikroskope</b>	Inverses Lichtmikroskop DMi1	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Stellaris 5	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Nova 230 NanoSEM, Rasterelektronenmikroskop	FEI company (Hillsboro, USA)
	Weitfeldmikroskop DMiL LED	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)

#### 4.1.5 Zellkulturmedien

HCM	<i>Myocyte Growth Medium</i> (MGM)	500 ml MGM 5 % FCS 0,5 ng/ ml <i>epidermal growth factor</i> 2 ng/ml <i>basic fibroblast growth factor</i> 5 µg/ml Insulin
HCF	<i>Fibroblast Growth Medium-3</i> (FGM-3)	500 ml FGM-3 10 % FCS 1 ng/ml <i>basic fibroblast growth factor</i> 5 µg/ml Insulin
HDII	Kultivierungsmedium hiPSC	400 ml mTeSR™Plus Basalmedium 100 ml mTeSR™Plus 5x Zusätze 1 µg/ml Doxycyclin-hyclat 50 µg/ml Normocin
Differenzierte Kardiomyozyten	Differenzierungsmedien	<u>Differenzierungsmedium A/B/C</u> 90 ml STEMdiff™ <i>Cardiomyocyte</i> <i>Differentiation Basal Medium</i> 10 ml <i>Differentiation Supplement A/B/C</i> <u>Maintenance Medium</u> 490 ml STEMdiff™ <i>Cardiomyocyte</i> <i>Maintenance Basal Medium</i> 10 ml <i>Maintenance Supplement</i>
HepG2	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> <i>Medium</i> (DMEM)	500 ml DMEM 10 % FCS 1 % P/S

HUVEC	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2 (EGM-2)</i>	500 ml EGM-2 2 % FCS 5 ng/ml <i>epidermal growth factor</i> 10 ng/ml <i>basic fibroblast growth factor</i> 20 ng/ml <i>Insulin-like growth factor</i> 0,5 ng/ml <i>vascular endothelial growth factor 165</i> 1 µg/ml Ascorbinsäure 22,5 µg/ml Heparin 0,2 µg/ml Hydrocortison
-------	---	--

#### 4.1.6 Zusammengesetzte Medien und Chemikalien

Einfriermedium	50 % FCS 40 % zellspezifisches Medium 10 % DMSO
Natriumcarbonatpuffer (pH 10)	60 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M) 40 % NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M)
Natriumcarbonatpuffer (pH 8,5)	95 % NaHCO <sub>3</sub> (0,1 M) 5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M)
10x TAE Puffer (pH 8,5)	48,4 g TRIS 37,2 g EDTA 11,4 ml konzentrierte Essigsäure Auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
Trypsininhibitor	90 % DPBS <sup>-/-</sup> 10 % FCS

#### 4.1.7 Antikörper

	Artikel	Artikelnummer, Lieferant
<b>Primäre Antikörper</b>	Anti-Nanog aus der Maus	ab62734, abcam
	Anti-Oct-4 aus dem Hase	ab181557, abcam
	Anti-α-Aktinin ( <i>sarcomeric</i> ) aus der Maus	A7732, Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
	Anti-cardiac-TroponinT aus der Maus	MA5-12960, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>Sekundäre Antikörper</b>	Alexa Fluor® 488 Ziege Anti-Maus	A11001, Invitrogen™ (Carlsbad, USA)
	Alexa Fluor® 647 Huhn Anti-Hase	A21443, Invitrogen™ (Carlsbad, USA)
	Alexa Fluor® 568 Ziege Anti-Maus	A11031, Invitrogen™ (Carlsbad, USA)

#### 4.1.8 *Primer*

---

<b><i>Primer</i></b>	<b><i>Forward</i></b>	<b><i>Reverse</i></b>
TNNI3	TCACTGACCCTCCAAACGCC	TTTTTCTTGGCGTGCGGCTC
Nanog	GCAACCAGACCCAGAACATCC	CCAAGGCAGCCTCCAAGTCAC
Oct-4	AGAAGGGCAAGCGATCAAGC	AGGGACCGAGGAGTACAGTG

---

#### 4.1.9 Software

ChemDraw Professional 20.0

CorelDraw X4

*ImageJ*

Leica LasX 3.5.7

Microsoft Office 365

OriginPro® 2022

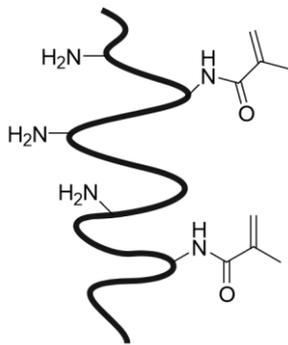
RheoCompass

TopSpin 4.1.1

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Synthesen

#### 4.2.1.1 Synthese von Gelatinemethacrylat (GelMA)



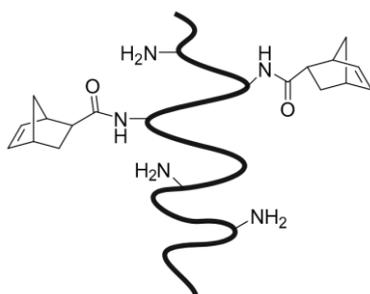
Die Synthese von GelMA wurde nach dem Protokoll von van del Bulcke *et al.* durchgeführt.<sup>37</sup> Für die Herstellung des Photopolymers GelMA wurden 1 g Gelatine in 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> bei 50 °C unter Rühren gelöst. Anschließend wurde Methacrylsäureanhydrid (MAA) langsam, je nach gewünschtem Funktionalisierungsgrad, mit einer Spritze hinzugegeben (siehe Tabelle 1). Die Reaktionsmischung wurde daraufhin für 2 h bei 50 °C gerührt. Währenddessen wurden 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> auf 50 °C erwärmt und nach Ablauf der 2 h zu der Reaktionslösung zugegeben und für weitere 10 min bei 50 °C gerührt. Die Lösung wurde im Anschluss in 14 kDa Dialyseschläuche (Breite 43 mm) überführt. Es wurde für 7 Tage bei 40 °C gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert, wodurch nicht reagierte Substanzen oder Nebenprodukte entfernt wurden. Dabei fand zweimal täglich ein Wasserwechsel statt, bei dem die Dialyseschläuche fünfmal invertiert wurden. Nach dem Ende der Dialyse wurde die Lösung bei -20 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Der entstandene weiße Feststoff wurde bei -20 °C gelagert.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 315 K):  $\delta$ /ppm = 5,8 (Vinyl-H, H<sub>a</sub>), 5,6 (Vinyl-H, H<sub>b</sub>), 3,3 (bs, NH<sub>2</sub>), 2,23 (s, CH<sub>3</sub>).

**Tabelle 1: Erforderliche Zugabe der Volumina an MAA für das Erreichen verschiedener Funktionalisierungsgrade.**

	Funktionalisierungsgrad	MAA [mmol] / Gelatine [g]	MAA [ $\mu$ l] / Gelatine [g]
GelMA	<i>low</i> (1 Äq.)	0,266	39,5
	<i>medium</i> (8 Äq.)	2,128	316
	<i>high</i> (20 Äq.)	7,98	790

#### 4.2.1.2 Synthese von norbornenfunktionalisierter Gelatine (GelN)



Um eine norbornenfunktionalisierte Gelatine als Photopolymer herzustellen, wurden die jeweiligen Mengen an 5-Norbornen-2-carboxylsäure (NCA), EDC-HCl und NHS (*N*-Hydroxysuccinimid) in 10 ml 0,5 M MES-Puffer bei einem pH-Wert von 6 gelöst (siehe Tabelle 2). Die Lösung wurde für 15 min bei 50 °C gerührt. Danach wurde 1 g Gelatine zur Reaktionsmischung hinzugegeben und anschließend mit einer

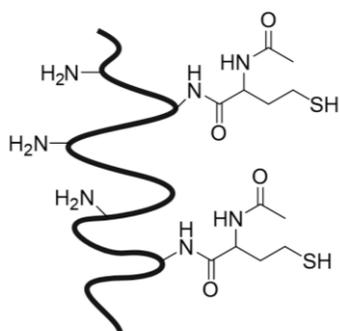
10 M NaOH ein pH-Wert von 7,5-7,8 eingestellt, damit die entsprechenden Reaktionsbedingungen gegeben waren. Die Reaktion rührte über Nacht bei 50 °C und wurde am nächsten Tag in vorbereitete 14 kDa Dialyseschläuche (43 mm Breite) überführt und für 7 Tage bei 40 °C dialysiert. Dabei wurde zweimal täglich ein Wasserwechsel durchgeführt und die einzelnen Schläuche fünfmal invertiert. Nach der Aufreinigung wurden die Lösungen in Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min bei 2000 rpm zentrifugiert, um Reaktionsrückstände (MES, NHS, EDC-HCl) zu entfernen. Das Rohprodukt wurde bei -20 °C eingefroren, für zwei Tage lyophilisiert und der entstandene weiße Feststoff bei -20 °C gelagert.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 315 K):  $\delta/\text{ppm} = 6,44$  ( $\text{H}_a$ ), 6,11 ( $\text{H}_b$ ), 3,20 (bs,  $\text{NH}_2$ ).

**Tabelle 2: Auflistung der drei Funktionalisierungsgrade von GeINB und der für die Synthese notwendigen Chemikalien mit Mengenangaben.**

Funktionalisierungsgrad	NCA (Äq.)	NCA n [mmol]/ Gelatine [g]	NCA V [ $\mu\text{l}$ ]/ Gelatine [g]	EDC-HCl [mg]	NHS [mg]
<i>low</i>	0,3	0,0798	9,768	30,594	9,186
<i>medium</i>	2	0,532	65,10	203,97	61,23
<i>high</i>	10	2,66	325,51	1019,84	306,14

#### 4.2.1.3 Synthese von thiolierter Gelatine (GeIS)



Unter Stickstoff wurde 1 g Gelatine und eine Spatelspitze EDTA zu 10 ml entgastem 0,1 M Natriumcarbonat-Puffer (pH 10) gegeben und die Suspension bei 40 °C unter Rühren gelöst. Anschließend wurde *N*-Acetylhomocysteinthiolacton (AHCT) je nach gewünschtem Funktionalisierungsgrad, welche in Tabelle 3 aufgelistet sind, mit einer Spritze hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h unter Stickstoff bei 40 °C gerührt. Nach den 3 h wurde die Lösung mit 10 ml entgastem  $\text{ddH}_2\text{O}$  verdünnt und in Dialyseschläuche überführt. Es wurde für 24 h gegen  $\text{ddH}_2\text{O}$

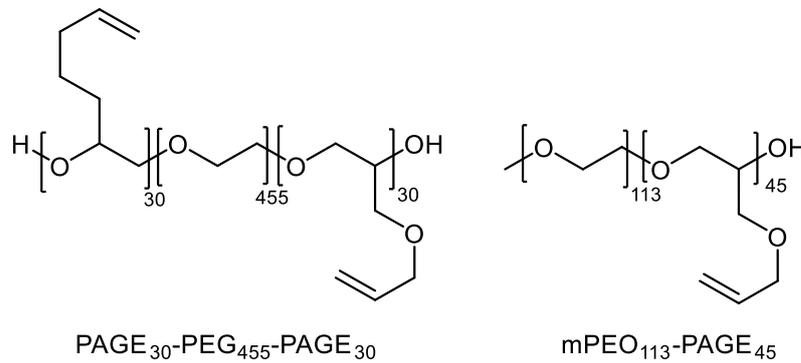
dialysiert, wobei drei bis viermal das Wasser gewechselt und dabei die Schläuche mehrmals invertiert wurden. Das Rohprodukt wurde bei -20 °C eingefroren und danach lyophilisiert. Das Produkt, ein weißer Feststoff, wurde bei -80 °C unter Stickstoff gelagert.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 315 K):  $\delta/\text{ppm} = 3,20$  (bs,  $\text{NH}_2$ ), 2,23 (s,  $\text{CH}_3$ ).

**Tabelle 3: Auflistung der für die GeIS-Synthese notwendigen Chemikalien mit Mengenangaben für das Erreichen unterschiedlicher Funktionalisierungsgrade.**

Chemikalie	Funktionalisierungsgrad	Äq.	n [mmol]	m [mg]
Gelatine	-	-	-	1000
AHCT	<i>low</i>	1	0,266	42,4
	<i>high</i>	5	1,33	211,8
EDTA	-	-	-	Spatelspitze

#### 4.2.1.4 Synthese von PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>454</sub>-PAGE<sub>30</sub>-Triblockcopolymeren und mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>45</sub>-Diblockcopolymeren



Zunächst wurde Allylglycidylether (AGE) über Calciumhydrid über Nacht getrocknet und die AGE-Lösung durch drei Freeze-Pump-Thaw-Zyklen entgast und aufgereinigt über eine Destillation. Polyethylenglykol (PEG) mit einem Molekulargewicht von 20 kDa wurde über Nacht im Vakuum getrocknet. Für die Synthese wurde 10 g PEG in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und mit Kaliumnaphthalid (0,4 M in wasserfreiem THF) titriert, bis die Lösung eine grüne Farbe aufzeigte. Daraufhin wurde AGE der Lösung hinzugefügt und die Reaktion für 48 h bei 45 °C in einer *glove box* gerührt. Mit der Zugabe von entgastem Methanol wurde die Reaktion gestoppt. Durch das Ausfällen des Produktes in Hexan wurde Poly(allylglycidylether)-Poly(ethylenglykol)-Poly(allylglycidylether) (PAGE-PEG-PAGE) erhalten. Anschließend wurde dies filtriert und getrocknet. Die Zusammensetzung der einzelnen Blöcke und das Molekulargewicht konnte über <sup>1</sup>H-NMR bestimmt werden.

Die Diblockcopolymersynthese erfolgte analog zur Triblockcopolymersynthese. Anstatt von PEG wurde mPEG eingesetzt, das anstelle einer endständigen Hydroxylgruppe auf einer Seite eine Methylgruppe besitzt, weshalb nur auf einer Seite die AGE-Kupplung stattfinden konnte.

Es wurden Triblockcopolymere mit der Zusammensetzung PAGE<sub>30</sub>-PEG<sub>454</sub>-PAGE<sub>30</sub> und mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>45</sub> für die Diblockcopolymere erhalten.

#### 4.2.1.5 Modifizierung der Triblockpolymere und Diblockcopolymere mit Guanidinium- oder Sulfonatgruppen

Sowohl die Triblockpolymere als auch die Diblockcopolymere können anhand einer Thiol-En Click-Reaktion mit den jeweiligen thiolhaltigen Reagenzien (Cysteamin-Hydrochlorid für die Aminofunktionalisierung bzw. Natrium-3-mercaptopropansulfonat für die Sulfonatfunktionalisierung, 5 Äq./Alkengruppe im Polymer) funktionalisiert werden. Hierfür wurden die Polymere und die Reagenzien in einem Gemisch aus DMF/H<sub>2</sub>O 1:1 gelöst und anschließend der Photoinitiator 2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon (DMPA, 0,05 Äq./Alkengruppe im Polymer) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde unter inerter Atmosphäre (N<sub>2</sub>) und Bestrahlung mit UV-Licht (365 nm, 8 W) über Nacht gerührt. Das Reaktionsprodukt wurde mit H<sub>2</sub>O verdünnt, in Dialyseschläuche überführt (MWCO: 3,5 kDa) und für 10 Zyklen mit je 8 h

dialysiert. Nach einer Lyophilisation wurden sowohl die Triblockcopolyelektrolyte (TbPE) als auch die Diblockcopolyelektrolyte (DbPE) als weißer styroporartiger Feststoff erhalten.

Um aus den Aminofunktionalisierten Gruppen anschließend Guanidiniumgruppen zu generieren, wurde das Aminofunktionalisierte Polymer in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und 1H-Pyrazol-1-carboxamidin (4 Äq./Alkengruppe im Polymer) hinzugefügt und der pH-Wert mit Zugabe von 10 M NaOH auf 10 eingestellt. Dies wurde für 3 Tage gerührt und der pH-Wert über die gesamte Zeit konstant bei einem Wert von 10 gehalten. Das Produkt wurde mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, in Dialyseschläuche überführt (MWCO: 3,5 kDa) und für 10 Zyklen mit je 8 h dialysiert. Nach anschließender Lyophilisation wurde ein gelblicher bis weißer Feststoff erhalten.

## 4.2.2 Herstellung der Hydrogele

### 4.2.2.1 Photopolymere

Die jeweiligen Photopolymere (GelMA, GelNB, GelS) wurden jeweils mit 10 % (w/v) Stammlösungen in DPBS<sup>-/-</sup> hergestellt und diese im Wasserbad bei 50 °C gelöst. Für GelS konnte nur eine Stammlösung von 5 % (w/v) in DPBS<sup>-/-</sup> aufgrund der Löslichkeit hergestellt werden. Mithilfe von DPBS<sup>-/-</sup> wurden die Stammlösungen auf 5 % (w/v) verdünnt, mit den jeweiligen Konzentrationen an Photoinitiator LAP versetzt und anschließend mit Hilfe von UV-Licht (Omniculture S2000, 320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) die entsprechende Bestrahlungszeit, was Tabelle 4 zu entnehmen ist, vernetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Photopolymere.

Hydrogel	Funktionalisierung	Photopolymer	Photoinitiator	Aushärtung
<b>GelMA</b>	<i>low</i>	GelMA <i>low</i>	0,3 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 20-30 s
	<i>medium</i>	GelMA <i>medium</i>	0,3 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 20-30 s
	<i>high</i>	GelMA <i>high</i>	0,3 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 20-30 s
<b>GelNB/GelS</b>	<i>low</i>	GelNB 0,3 Äq. + GelS 1 Äq. (50:50)	0,03 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 10-15 s
	<i>medium</i>	GelNB 2 Äq. + GelS 5 Äq. (50:50)	0,03 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 10-15 s
	<i>high</i>	GelNB 10 Äq. + GelS 5 Äq. (35:65)	0,03 % LAP	500 mW/cm <sup>2</sup> , 10-15 s

#### 4.2.2.2 Doppelnetzwerk-Hydrogele

Um die Triblockcopolyelektrolyte (TbPE) herzustellen, wurden jeweils Stammlösungen von dem Polyanion und dem Polykation von 20 % (w/v) angesetzt. Für die Diblockcopolyelektrolyte (DbPE) wurden Stammlösungen von 50 % (w/v) der jeweiligen Polymere angesetzt. Von dem Photopolymer GelMA wurde eine Stammlösung von 10 % (w/v) und von dem Photoinitiator LAP eine Stammlösung von 10 % bzw. 1 % (w/v) hergestellt. Alle Stammlösungen wurden in DPBS<sup>-/-</sup> angesetzt. Das Polyanion wurde zunächst mit dem Photopolymer GelMA, dem Photoinitiator LAP und DPBS<sup>-/-</sup> gemischt, und anschließend das Polykation hinzugegeben. Zwischen jedem Schritt wurde für ausreichende Durchmischung gesorgt. In der Lösung mit den Polyelektrolyten wurde GelMA mit einer Polymerlösung von 5 % und 0,3 % LAP eingesetzt. Das Verhältnis von Polyanion zu Polykation wurde auf 1:1 angesetzt. Durch eine Belichtung mit UV-Licht (Omicure S2000, 320-500 nm, 30 s, 500 mW/cm<sup>2</sup>) wurde das Photopolymer GelMA vernetzt und es konnte ein Doppelnetzwerk-Hydrogel (GelMA/TbPE oder GelMA/DbPE) erhalten werden, welches kovalente Netzwerke und physikalische Netzwerke aufwies.

#### 4.2.3 Chemische Charakterisierung der verschiedenen Polymere

##### 4.2.3.1 NMR-Spektroskopie

Die <sup>1</sup>H-NMR Spektren wurden mit einem 400 MHz Spektrometer von Bruker aufgenommen. Hierzu wurden die jeweiligen Produkte in den jeweiligen deuterierten Lösungsmitteln gelöst und in NMR-Röhrchen überführt. Die chemischen Verschiebungen der Protonen werden in *parts per million* (ppm) angegeben. Bei den gelatinebasierten Photopolymeren wurden die Spektren jeweils bei 315 K gemessen, um eine Gelierung im NMR-Röhrchen zu verhindern.

##### 4.2.3.2 TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades der Photopolymere

Zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades der Gelatine und somit der Photopolymere wurde ein TNBSA-Assay durchgeführt. Es wurden Photopolymerlösungen und eine Lösung von reiner Gelatine mit einer Konzentration von 500 µg/ml in 0,1 M Natriumcarbonatpuffer (pH 8,5) hergestellt. Zu 500 µl der Lösungen wurden 250 µl des TNBSA-Reagenz (c= 0,02 % (v/v)) gegeben und für 4 h bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu den Photopolymerlösungen je 125 µl 1 M HCl und 250 µl 10 % SDS (w/v) gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die jeweiligen Blanks wurden vor Beginn der Inkubationszeit mit 125 µl 1 M HCl versetzt, damit keine Reaktion stattfinden konnte. Ansonsten wurden die Blanks analog wie die Photopolymerlösungen behandelt. Abschließend wurde die Absorption bei 335 nm am SmartSpec 3000 gemessen. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten. Der Funktionalisierungsgrad konnte anschließend mit unten stehender Formel (4) bestimmt werden:

$$\text{Funktionalisierungsgrad [\%]} = \left( 1 - \frac{A(\text{funktionalisierte Gelatine})}{A(\text{Gelatine})} \right) \times 100 \quad \text{Formel (4)}$$

#### 4.2.3.3 Rheologische Charakterisierung von Doppelnetzwerk-Hydrogelen

Die Herstellung der Doppelnetzwerk-Hydrogele erfolgte wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben. Alle rheologischen Messungen wurden an einem Anton Paar Rheometer (MCR 302) durchgeführt. Für die unvernetzten Hydrogele wurde eine Kegel-Platten-Geometrie (Durchmesser= 10 mm, Kegelwinkel= 2°) und für photovernetzte Hydrogele eine Parallel-Platten-Geometrie (Durchmesser= 8 mm, Spaltgröße= 0,6 mm) verwendet. 70 µl einer Hydrogelvorläuferlösung wurde in eine PDMS-Form (zylindrisch, Durchmesser= 8 mm, Höhe= 1,5 mm) pipettiert und anschließend mit Hilfe von UV-Licht (302 nm, 8 W) für 5 min vernetzt. Die jeweiligen Proben (unvernetzte/photovernetzte Hydrogele) wurden auf der unteren Platte des Rheometers platziert und überschüssiges Material nach Erreichen des Messspalts abgeschnitten. Um die Verdunstung zu minimieren, wurde eine Lösemittelfalle eingesetzt. Die GelMA-Hydrogele wurden bei 22 °C gemessen und GelMA/DbPE und GelMA/TbPE bei 37 °C. Zur Equilibration wurden alle Hydrogele vorgeschert. Die Amplituden-Sweeps ( $\gamma = 0,01-100 \%$ ) wurden mit einer Kreisfrequenz von  $\omega = 1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$  gemessen. Mit den Frequenz-Sweeps ( $\omega = 0,1-20 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ), die bei einer Dehnung von  $\gamma = 1 \%$  durchgeführt wurden, konnten die Speichermodule  $G'$  und Verlustmodule  $G''$  ermittelt werden. Zyklische Deformations-Sweeps wurden durchgeführt, um die Erholungszeit nach erfolgter Deformation zu bestimmen. Hierfür wurden die Hydrogele für 250 s einer hohen Scherrate von  $\dot{\gamma} = 100 \text{ s}^{-1}$  gefolgt von einer niedrigen Scherrate von  $\dot{\gamma} = 0,01 \text{ s}^{-1}$  für 500 s ausgesetzt.

#### 4.2.3.4 Zugversuche von Doppelnetzwerk-Hydrogelen

Um die Proben der Doppelnetzwerk-Hydrogele für die Zugversuche herzustellen, wurden die Hydrogele, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, gemischt. 120 µl der Vorläuferlösungen von GelMA, GelMA/TbPE oder GelMA/DbPE wurden in eine rechteckige PDMS-Vertiefung (18 mm x 4,5 mm x 1,5 mm) gegeben und anschließend mit Hilfe von UV-Licht (302 nm, 8 W) vernetzt. Die Versuche wurden mit der mechanischen Zugprüfmaschine Instron 5542 durchgeführt. Die vernetzten Hydrogele wurden zwischen doppelseitigem Klebeband im Gerät eingespannt und mit einer Dehngeschwindigkeit von 6 mm/min gedehnt. Es wurde der Zeitpunkt gemessen, an dem das Hydrogel in zwei Hälften zerriss. Zugfestigkeit, Zähigkeit, Elastizitätsmodul und Dehnbarkeit wurde aus dem entstandenen Spannungs-Dehnungs-Diagramm bestimmt.

#### 4.2.3.5 Untersuchung der Freisetzung der Masse von Doppelnetzwerk-Hydrogelen

Um den Massenverlust der Doppelnetzwerk-Hydrogele zu untersuchen, wurden 200 µl der Vorläuferlösung in eine PDMS-Vertiefung (zylindrisch, Durchmesser: 5 mm, Höhe: 3 mm) pipettiert und mit Hilfe von UV-Licht (302 nm, 8 W) vernetzt. Die Trockenmasse der Hydrogele wurde nach der Gefriertrocknung bestimmt und die Proben anschließend in DPBS<sup>-/-</sup> eingelegt und bei 37 °C inkubiert. Die DPBS<sup>-/-</sup>-Lösung wurde alle 2-3 Tage erneuert. An Tag 0, 1, 2, 4, 7, 10 und 14 wurde die Proben aus der Lösung entfernt, anschließend lyophilisiert und daraufhin die Masse bestimmt. Die verbleibende Masse konnte mit Hilfe unten stehender Formel (5) bestimmt werden, wobei  $m_i$  für die Trockenmasse zu Beginn und  $m_t$  für die Trockenmasse nach Zeitpunkt  $t$  steht.

$$\text{Verbleibende Masse [\%]} = \frac{m_t}{m_i} * 100 \% \quad \text{Formel (5)}$$

#### 4.2.3.6 Quellverhältnis von Doppelnetzwerk-Hydrogelen

Um die Quellbarkeit von den Doppelnetzwerk-Hydrogelen zu untersuchen, wurden die Vorläuferlösungen wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben hergestellt. 70 µl der Hydrogelvorläuferlösung wurden in eine PDMS-Vertiefung pipettiert (zylindrisch, Durchmesser= 5 mm, Höhe= 3 mm) und anschließend mit Hilfe von UV-Licht (302 nm, 8 W) vernetzt. Die Hydrogele wurde in DPBS<sup>-/-</sup> eingelegt und bei RT für 24 h gequollen. Anschließend wurde die restliche Flüssigkeit vorsichtig von dem Hydrogel entfernt und dies gewogen. Danach wurden die Hydrogele lyophilisiert und die Trockenmasse dieser bestimmt. Das Quellverhältnis konnte mit unten stehender Formel (6) bestimmt werden. Hierbei ist  $m_q$  die Masse der gequollenen Proben und  $m_t$  die Masse nach der Lyophilisation.

$$\text{Quellverhältnis} = \frac{m_q}{m_t} \quad \text{Formel (6)}$$

#### 4.2.3.7 Rasterelektronenmikroskopie der Doppelnetzwerk-Hydrogele

Zur Herstellung der Proben für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Vorläuferlösungen, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, vorbereitet. 60 µl der Hydrogelvorläuferlösung wurden in eine PDMS-Vertiefung (zylindrisch, Durchmesser= 5 mm, Höhe= 3 mm) pipettiert und mit Hilfe von UV-Licht (302 nm, 8 W) vernetzt. Anschließend wurden die Hydrogele in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einer Rasierklinge zerschnitten, um den Querschnitt der Hydrogele freizulegen. Die gefrorenen, zerschnittenen Hydrogele wurden an einem REM-Stifthalter angebracht und lyophilisiert. Die Probenoberfläche wurde mit Gold gesputtert und anschließend mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (Nova 230 NanoSEM, FEI company) die Porengröße und -morphologie charakterisiert. Die Bilder wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 5-10 kV und einem Sekundärelektronendetektor aufgenommen.

### 4.2.4 Zellkultur

#### 4.2.4.1 Kultivierung von HepG2

Die HepG2-Zelllinie ist eine humane Leberkrebszelllinie. Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), mit 10 % FCS (*fetal calf serum*, Fetales Kälberserum) und 1 % Penicillin/Streptomycin, einem Antibiotika-Mix, bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei hoher Konfluenz wurden die Zellen passagiert, in dem zunächst das überstehende Medium abgenommen und mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen wurde, um Medienrückstände zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) hinzugegeben und für 3 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, um die Zellen abzulösen. Das Ablösen wurde durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium gestoppt. Dabei wurde in einem Verhältnis von 1:10 gesplittet. Das Passagieren erfolgte alle 3 Tage.

#### 4.2.4.2 Kultivierung von HUVEC

HUVEC (*engl. human umbilical vein endothelial cells*) sind humane Nabelschnurvenenendothelzellen, welche in *Endothelial Cell Growth Medium-2* (EGM-2) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert wurden. Bei konfluentem Wachstum wurde passagiert, wobei sich die Passage um 1 erhöhte. Zunächst wurde das überstehende Medium abgesaugt. Danach wurde die Zellschicht zweimal mit je 5 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 0,125 % Trypsin-EDTA abgelöst. Dazu wurde für 3 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Trypsininhibitor gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml EGM-2 gelöst. In einer neuen Zellkulturflasche wurde neues Kulturmedium vorgelegt und die Zellsuspension im Verhältnis 1:3 hinzugegeben. Das Passagieren erfolgte alle 7 Tage.

#### 4.2.4.3 Kultivierung von HCM

Die primäre Zelllinie HCM (*engl. human cardiac myocytes*) sind humane Herzmuskelzellen und wurden in *Myocyte Growth Medium* (MGM) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen passagiert, wobei sich die Passage um 1 erhöhte. Hierzu wurde das überstehende Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-EDTA für 3-5 min inkubiert und von der Oberfläche der Flasche abgelöst. Durch Zugabe von 3 ml Trypsininhibitor wurde die Reaktion gestoppt und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde mit 2 ml MGM nachgespült und dies ebenfalls in das Röhrchen überführt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend  $75 \cdot 10^4$ - $11,25 \cdot 10^5$  Zellen in eine neue Flasche ausgesät oder die Zellen für darauffolgende Experimente verwendet. Die Zellsuspension wurde für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in 1 ml MGM resuspendiert und in eine neue Flasche mit vorgewärmten MGM überführt.

#### 4.2.4.4 Kultivierung von HCF

HCF (*engl. human cardiac fibroblasts*) sind humane Herzfibroblasten und wurden in *Fibroblast Growth Medium-3* (FGM-3) in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Wurde eine Konfluenz von 80-90 % erreicht, wurden die Zellen passagiert, wobei sich die Passage um 1 erhöhte. Hierzu wurde das überstehende Medium abgenommen, die Zellen mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-EDTA für 3-5 min inkubiert und von der Oberfläche der Flasche abgelöst. Durch Zugabe von 3 ml Trypsininhibitor wurde die Reaktion gestoppt und die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und anschließend 22,5·10<sup>4</sup>-75·10<sup>4</sup> Zellen in eine neue Flasche ausgesät oder die Zellen für nachfolgende Experimente verwendet. Die Zellen wurden für 3 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 1 ml FGM-3 resuspendiert und in eine neue Flasche mit vorgewärmten FGM-3 überführt.

#### 4.2.4.5 Kultivierung von hiPSC der Linie HDII

Zur Kultivierung der hiPSC Linie HDII wurden zunächst die verwendeten Kultivierungsmaterialien mit Matrigel hESC in einer Verdünnung von 1:100 in 1 ml DMEM/F12 für 1 h bei RT beschichtet. Das Matrigel wurde zuvor auf Eis aufgetaut und nach der Inkubation wurde zweimal mit 2 ml DMEM/F12 gewaschen. Die Standardkultivierung der hiPSC-Kolonien erfolgte in 6-Well-Platten in mTeSR<sup>TM</sup> Plus, supplementiert mit 1 µg/ml Doxycyclin-hyclat und 50 µg/ml Normocin. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden diese passagiert, wobei sich die Passage um 1 erhöhte. Die Kolonien wurden unter einem Lichtmikroskop mit einer 10 µl Pipettenspitze geteilt, von der Oberfläche abgelöst und mit einer 1000 µl Pipette aufgenommen und in ein neues, bereits beschichtetes 6-Well mit mTeSR<sup>TM</sup> Plus mit Zusätzen überführt. Alle 2 Tage wurden bereits differenzierte Zellen oder Überwucherungen mit Hilfe einer 10 µl Pipettenspitze entfernt und ein Medienwechsel durchgeführt.

#### 4.2.4.6 Differenzierung von Kardiomyozyten aus HDII

Um die hiPSC Linie HDII zu Kardiomyozyten zu differenzieren, mussten die Kolonien zunächst in eine Einzel-Zell-Suspension gebracht werden. Hierfür wurde zunächst ein Well einer 12-Well-Platte mit Matrigel hESC beschichtet, in dem es für 1 h bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurden die Kolonien eines Wells einer 6-Well-Platte mit 1 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 1 ml Accutase für 8-10 min bei 37 °C inkubiert. Mit einer 1000 µl Pipettenspitze wurde anschließend mehrmals auf und ab pipettiert, um die adhärennten Zellkolonien von der Welloberfläche zu lösen und in Suspension zu bringen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 1 ml mTeSR<sup>TM</sup> Plus/Well überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1-2 ml mTeSR<sup>TM</sup> Plus, supplementiert mit 10 µM Y-27632, resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. In das Matrigel beschichtete 12-Well wurde 1 ml

mTeSR™ Plus mit 10 µM Y-27632 vorgelegt und  $3,5\text{-}5\cdot 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, jedoch ohne Y-27632. Die Zellen sollten bereits eine hohe Konfluenz erreicht haben, denn eine Differenzierung sollte nur gestartet werden bei einer Konfluenz von über 95 %.

An Differenzierungstag 0 wurde das Matrigel in einer Verdünnung von 1:100 zum Differenzierungsmedium A hinzugegeben und hiermit der Medienwechsel der Zellen durchgeführt. Das Matrigel wurde zuvor auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte alle zwei Tage ein Medienwechsel, bei denen jeweils 2 ml zu den Zellen hinzugegeben wurde. An verschiedenen Tagen wurden verschiedene Medien den Zellen zugegeben, was Tabelle 5 zu entnehmen ist.

**Tabelle 5: Auflistung der Medien, mit denen an verschiedenen Differenzierungstagen ein Medienwechsel durchgeführt wurde.**

Tag	Medium
2	Differenzierungsmedium B
4	Differenzierungsmedium C
6	Differenzierungsmedium C
8	<i>Maintenance</i> Medium
10	<i>Maintenance</i> Medium
12	<i>Maintenance</i> Medium
14	<i>Maintenance</i> Medium

Nach insgesamt 15 Tagen waren die Kardiomyozyten bereit, um für Experimente eingesetzt zu werden. Ab Tag 8 sollten kontrahierende Bereiche innerhalb des Wells sichtbar sein. Die Kardiomyozyten konnten bis zu einem Monat kultiviert werden, in dem alle 2 Tage ein Medienwechsel mit 2 ml *Maintenance* Medium durchgeführt wurde.

#### 4.2.4.7 Ablösen der differenzierten Kardiomyozyten

Das Ablösen der aus Kapitel 4.2.4.6 differenzierten Kardiomyozyten konnte nach vollendeter Differenzierung ab Tag 15 erfolgen. Dies erfolgte mit dem STEMdiff™ *Cardiomyocyte Dissociation Kit* von StemCell™. Die Volumenangaben beziehen sich jeweils auf ein Well einer 12-Well-Platte. Die differenzierten Kardiomyozyten wurden zwei Mal mit 1 ml DPBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 1 ml *Dissociation* Medium für 10-12 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit abgelöst. Nach der Inkubationszeit wurden 2 ml *Support*-Medium hinzugefügt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vollständig abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml vorgelegtem *Support*-Medium überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1-2 ml *Support*-Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Anschließend konnte das gewünschte Volumen in mit Matrigel hESC-beschichtete Zellkulturmaterialien für die Durchführung von Experimenten ausgesät werden. Für 24 h erfolgte die Kultivierung in *Support*-Medium, was anschließend durch *Maintenance* Medium ersetzt wurde.

#### 4.2.4.8 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um die Zellen einzufrieren, wurden diese zunächst mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Reaktion wurde gestoppt und anschließend die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem entsprechenden Volumen zellspezifischem Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml erhalten wurde. Je 1 ml dieser Suspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und in einen mit Isopropanol gefüllten Behälter (*Mr. Frosty*) gestellt, der anschließend mit  $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt wurde. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte bei  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Zum Auftauen der Zellen wurde das entsprechende Cryoröhrchen aus der Lagerung im Stickstofftank ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) entnommen, unter der Sterilbank geöffnet, um gasförmigen Stickstoff zu entfernen, und anschließend in einem  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt des Cryoröhrchens wurde entweder direkt in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben oder es erfolgte bei sensiblen Zellen ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen. Bei der Zugabe der Zellsuspension direkt in eine Zellkulturflasche musste nach spätestens 16 h ein Medienwechsel erfolgen, um das enthaltene DMSO zu entfernen. Beim Auftauen der hiPSC wurde zusätzlich  $10 \text{ } \mu\text{M}$  Y-27632 hinzugefügt. Allgemein erhöhte sich die Passage nach dem Auftauen um 1.

#### 4.2.5 Einbettung von Zellen in und auf Hydrogelen

##### 4.2.5.1 Ansetzen einer 3D-Kultur in Hydrogelen

Zunächst mussten die Zellen, auf die die Eignung des Hydrogels getestet werden soll, gewaschen und trypsiniert werden. Die Trypsinierung wurde entweder durch Zugabe von Medium oder einem Trypsininhibitor gestoppt und anschließend die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zu den Hydrogellösungen wurden die vorbereiteten Zellen in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, sodass die Zellkonzentration im Gel  $0,5 \cdot 10^6$  ( $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) betrug. Anschließend wurde der Photoinitiator dazugegeben. Es wurden jeweils  $200 \text{ } \mu\text{l}$  in ein Well eines 8 Well ibidi  $\mu$ -Slide gegeben und dies unter dem Omnicure S2000 bei  $500 \text{ mW}/\text{cm}^2$  für die entsprechende Zeit ausgehärtet. Aushärtungszeiten und Zusammensetzungen sind in Kapitel 4.2.2.1 und Kapitel 4.2.2.2 aufgeführt. Anschließend wurden die Gele mit  $200 \text{ } \mu\text{l}$  des entsprechenden Mediums überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei  $5 \text{ } \%$   $\text{CO}_2$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Inkubator. Alle 2-3 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

### 4.2.5.2 Kultivierung von Zellen auf den Hydrogeloberflächen.

Die Photopolymerlösungen wurden, wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurden je 200  $\mu\text{l}$  in ein Well eines ibidi  $\mu\text{-Slide}$  pipettiert und mit dem Omnicure bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  vernetzt. Aushärtungszeiten und Zusammensetzungen sind in Kapitel 4.2.2.1 aufgeführt. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf die Hydrogeloberfläche ausgesät. Dazu wurden die Zellen passagiert und die Zellzahl mit einer Zählkammer bestimmt. Es wurde das gewünschte Volumen an Zellsuspension zentrifugiert, in dem spezifischen Medium resuspendiert und je 200  $\mu\text{l}$  pro Well auf die Hydrogele gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

### 4.2.5.3 Ansetzen von Biotinten

Zum Ansetzen einer Biotinte, welche für den 3D-Biodruck eingesetzt wurde, mussten zunächst die Zellen, welche mit dem Hydrogel verdruckt werden sollten, gewaschen und trypsinisiert werden. Die Trypsinierung wurde entweder durch Zugabe von Medium oder einem Trypsininhibitor gestoppt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Zu den Hydrogellösungen wurden die vorbereiteten Zellen in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben, sodass die Zellkonzentration in der Tinte  $0,5 \cdot 10^6$  ( $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) betrug. Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Hydrogele sind in Kapitel 4.2.2.1 und Kapitel 4.2.2.2 aufgeführt. Die Hydrogel-Zell-Lösung wurde in einer 3 ml Spritze angesetzt und diese luftblasenfrei verschlossen. Die Tinte wurde im Biodrucker (BioSpot BP, Biofluidix) auf die gewünschte Drucktemperatur temperiert (ca. 30 min) und eine konische Nadel mit dem Durchmesser von 0,25 mm angebracht. Anschließend konnte der Druckvorgang gestartet werden. Hierfür musste die Z-Position der Nadel an den Objektträger angepasst und die Viskosität der Tinte überprüft werden. Danach wurde ein G-Code, welcher die Druckanweisungen beinhaltet, zum Drucken der gewünschten Struktur ausgeführt. Nach dem Druck wurde das Konstrukt in eine Petrischale überführt, mit dem Omnicure S2000 bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  vernetzt, mit 500  $\mu\text{l}$  DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und anschließend mit dem zellspezifischen Medium überschichtet.

## 4.2.6 Visualisierung von Zellen und Zellstrukturen

### 4.2.6.1 Fixieren der Zellen

Um die Zellen zu fixieren, wurden diese mit kaltem DPBS<sup>+/+</sup> gewaschen und mit einer 4 % PFA-Lösung für 10 min bei einer 2D-Kultur und für 1 h bei einer 3D-Kultur bei RT inkubiert. Die fixierten Proben wurden zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und konnten bei 4 °C, mit Parafilm umschlossen, bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

#### 4.2.6.2 Permeabilisieren der Zellen

Nach der Fixierung wurde eine Permeabilisierung durchgeführt, in dem die fixierten Zellen mit 0,1 % Triton X-100 für 4 min behandelt wurden. Nach diesem Schritt wurden die permeabilisierten Zellen zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen.

#### 4.2.6.3 Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen mit Cas-Block<sup>TM</sup> für 30 min bei RT inkubiert. Die Proben konnten bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert werden.

#### 4.2.6.4 Immunfluoreszenzmarkierung spezifischer Zellstrukturen

Nach der Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung der Zellen konnte der Primärantikörper in entsprechender Konzentration und entsprechendem Volumen in Cas-Block<sup>TM</sup> verdünnt zu den Zellen hinzugegeben werden. Die verwendeten Antikörper und deren Konzentrationen sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgeführt. Dies wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgenommen, zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und der Sekundärantikörper in Cas-Block<sup>TM</sup> verdünnt in entsprechender Konzentration und entsprechendem Volumen hinzugegeben. Dies wurde erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Vor der Visualisierung mit inverser Konfokalmikroskopie wurde die Antikörperlösung abgenommen und zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen.

**Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Primärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen.**

Primärantikörper	Konzentration
Anti-Nanog aus der Maus	1:1000
Anti-Oct-4 aus dem Hase	1:250
Anti- $\alpha$ -Aktinin ( <i>sarcomeric</i> ) aus der Maus	1:500
Anti-cTnT aus der Maus	1:200

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen.**

Sekundärantikörper	Konzentration	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Ziege anti-Maus	1:1000	488 nm	500-550 nm
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 Huhn anti-Hase	1:500	635 nm	650-700 nm
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 Ziege anti-Maus	4 $\mu$ g/ml	532 nm	600-630 nm

#### 4.2.6.5 Färbung der Zellkerne

Zur Visualisierung der Zellkerne wurde Hoechst33342 verwendet. Dies wurde im Verhältnis 1:5000 in DPBS<sup>-/-</sup> bei fixierten Zellen oder in zellspezifischem Medium bei lebendigen Zellen verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml. Dies wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert und die Zellen anschließend mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Die Zellkerne konnten anschließend mit inverser Konfokalmikroskopie visualisiert werden ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 405 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 415-480 nm).

#### 4.2.6.6 Färbung des Aktinzytoskeletts

Zur Visualisierung des Aktinzytoskeletts der Zellen wurde Phalloidin-TRITC verwendet. Phalloidin-TRITC wurde im Verhältnis von 1:1000 in DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt und für 40 min auf den Zellen bei RT inkubiert. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Anschließend wurde zweimal mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und das Aktinzytoskelett mit inverser Konfokalmikroskopie visualisiert ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 532 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 545-625 nm).

#### 4.2.6.7 Verwendete Volumina

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Volumina während der Visualisierung von Zellstrukturen.**

#### Volumen

	<b>Ibidi <math>\mu</math>-Slide high</b>	<b>12-Well-Platte</b>	<b>6-Well-Platte</b>
<b>Waschschritte</b>	200 $\mu\text{l}$	1 ml	2 ml
<b>Fixieren, Permeabilisieren, Blockieren</b>	200 $\mu\text{l}$	1 ml	2 ml
<b>Färbung der Zellkerne und des Aktinzytoskeletts</b>	200 $\mu\text{l}$	1 ml	2 ml
<b>Immunfluoreszenz- markierung</b>	200 $\mu\text{l}$	1 ml	2 ml

#### 4.2.7 Wachstums- und Viabilitätsuntersuchungen der Materialien

##### 4.2.7.1 Wachstumskurve

Für die Wachstumskurven wurden je Well einer 24-Well-Platte  $1 \cdot 10^5$  Zellen in 1 ml ausgesät. Dafür wurden die Zellen jeweils gewaschen, trypsiniert, abgestoppt und gezählt, das gewünschte Volumen entnommen, zentrifugiert, in 1 ml resuspendiert und in das Well gegeben. Dies wurde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Um das Wachstum zu verfolgen, wurde an Tag 1, 2, 3, 4 und Tag 7 jeweils mit Trypsin-EDTA für 3 min die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

#### 4.2.7.2 Presto-Blue™ Assay zur Bestimmung der Zellproliferation

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens verschiedener Zelllinien in den unterschiedlichen Hydrogelen wurde der Presto-Blue™ Assay durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst in die verschiedenen Hydrogele eingebettet. Die flüssige Photopolymerlösung mit den Zellen wurde hierzu in eine 96-Well-Platte (100 µl pro Well) gegeben. Die Zellkonzentration betrug  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Nach der Vernetzung der Lösungen zum Hydrogel mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) wurden die Gele mit 100 µl Kulturmedium überschichtet. Als Blank diente die entsprechende Photopolymerlösung ohne Zellen. Zum Einstellen der Polymerkonzentration auf 5 % wurde das entsprechende Kulturmedium verwendet. Die Zusammensetzungen und Aushärtungszeiten der Hydrogele sind im Kapitel 4.2.2.1 aufgeführt. Jedes Gel wurde als Triplikat auf vier verschiedene Platten aufgetragen, sodass zu den Zeitpunkten Tag 1, 7, 14 und Tag 21 eine Bestimmung des Proliferationsverhaltens stattfinden konnte. Mit den verschiedenen Blanks wurde analog verfahren. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, sowohl bei den Gelen mit den Zellen als auch bei den Blanks. An Tag 1, 7, 14, und 21 wurden die eingebetteten Zellen mit dem Presto-Blue™ Reagenz behandelt. Dazu wurde das Medium über den Gelen abgenommen und die Gele mit DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Anschließend wurde das Presto-Blue™ Reagenz 1:10 mit Kulturmedium verdünnt und 100 µl der Lösung auf die Proben und die Blanks gegeben. Die Inkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Lebende und metabolisch aktive Zellen können das Resazurin-basierte Reagenz zu dem rot fluoreszenten Farbstoff Resorufin reduzieren. Somit kann das Proliferationsverhalten anhand der Fluoreszenzintensität verfolgt werden. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte die Fluoreszenzmessung mit einem Mikroplattenleser ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ : 560 nm/600 nm, *Integration Time*= 400 ms).

#### 4.2.7.3 MTT-Assay zur Überprüfung der Zytotoxizität

Zur Überprüfung der Zytotoxizität bestimmter Stoffe wurden auf einer 96-Well-Platte  $1 \cdot 10^4$  Zellen/Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen hinzugegeben und für 72 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde zu der Tot-Kontrolle je 5 µl Triton X-100 (20 % in ddH<sub>2</sub>O) gegeben, um diese zu lysieren. In jedes der Wells wurden anschließend 10 µl des gelben MTT-Reagenz gegeben und dies für 3 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl der *Solubilization Solution Stops* hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Es wurde erneut 24 h inkubiert, bevor eine Absorptionmessung bei 595 nm mit dem Mikroplattenleser (SpectraMax iD3) erfolgte. Dies ließ Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen ziehen.

#### 4.2.7.4 Lebend-/Tot-Färbung im Hydrogel

Zur Überprüfung der Viabilität sowie der Zellausrichtung wurde jeweils an Tag 1, 7, 14, 21 eine Lebend-/Tot-Färbung einer 3D-Kultur oder der Zellen auf den Hydrogeloberflächen durchgeführt. Hierzu wurden die beiden Fluorophore Calcein-AM ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 488 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 500-580 nm) und Propidiumiodid (PI,  $\lambda_{\text{ex}}$ : 532 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 610-700 nm) eingesetzt.

Es wurde eine Färbelösung mit 4  $\mu\text{M}$  Calcein-AM (Stammlösung 1 mM) und 0,02 mg/ml PI (Stammlösung 2 mg/ml) im spezifischen Zellmedium angesetzt. Pro Gel wurden 250  $\mu\text{l}$  Färbelösung eingesetzt. Die Färbelösung wurde den Zellen hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung abgenommen und die Gele zwei Mal mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  DPBS<sup>-</sup> gewaschen. Die Auswertung erfolgte durch inverse Fluoreszenzmikroskopie.

**Tabelle 9: Ansatz der Färbelösung für eine Lebend-/Tot-Färbung für 250  $\mu\text{l}$ .**

Ansatz für die Färbelösung für 1 Well	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Zellspezifisches Medium	249
Calcein-AM	1
Propidiumiodid	2,5

#### 4.2.7.5 Calcium Imaging der differenzierten Kardiomyozyten

Um den Calcium-Strom innerhalb der differenzierten Kardiomyozyten zu visualisieren wurden die Kardiomyozyten, wie in Kapitel 4.2.4.6 beschrieben, differenziert und an Tag 17 mit 500  $\mu\text{l}$  einer 10  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM-Lösung für 45 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit in *Maintenance* Medium behandelt. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 500  $\mu\text{l}$  *Maintenance* Medium gewaschen und die Visualisierung erfolgte mit inverser Konfokalmikroskopie ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 494 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 516 nm). Es wurden Videosequenzen (15 min, 89 Bildfolgen) generiert und diese mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach einem Protokoll aus der Literatur.<sup>400</sup> Zunächst wurden die ersten 10 Bilder gestapelt, um die ROI-Einteilung zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Normalisierung der Helligkeit und der Unschärfe sowie eine Hintergrundsubtraktion und Schwellenwertbildung. Diese ROIs wurden für die gesamte Videoaufnahme überlagert und der mittlere Grauwert aufgezeichnet. Durch eine Maximalüberlagerung konnte ein Z-Stack der Änderungen der Fluoreszenzintensitäten erzeugt werden.

## 4.2.8 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.8.1 RNA Isolation

Um die zu untersuchenden Zellen zu lysieren, wurden diese mit 400 µl TRIzol behandelt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen, das TRIzol mehrfach über die Zellen gespült und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Danach wurden 80 µl Chloroform hinzugegeben, für 15 s invertiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin folgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 12000 x g bei 4 °C. Nach diesem Schritt wurden drei Phasen erkennbar: eine klare RNA-enhaltende wässrige Phase, eine Interphase und eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die RNA auszufällen, wurde zu der wässrigen Phase 200 µl Isopropanol hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 4 °C für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert, wobei ein RNA-Pellet erzeugt wurde. Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet in 400 µl 75 % Ethanol resuspendiert und im Anschluss bei 4 °C für 5 min bei 7500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde für 30 min an der Luft getrocknet. Danach erfolgte eine Zugabe von 30 µl nukleasefreiem Wasser und eine Inkubation für 15 min bei 60 °C, um das Pellet zu lösen. Der RNA-Gehalt wurde mit Hilfe einer Nanodrop-Messung ermittelt.

### 4.2.8.2 DNA-Verdau

Um die vorhandene genomische DNA in der isolierten DNA enzymatisch abzubauen, wurden die Reaktionskomponenten (DNase, Reaktionspuffer, RNA, nukleasefreies Wasser), wie in Tabelle 10 aufgelistet, auf Eis zusammen pipettiert. Hierbei wurde ein doppelter Ansatz angesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend daran wurden 2 µl DNase Stop Solution der Mischung beigefügt und erneut für 10 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Anschließend konnten die RNA-Proben für die reverse Transkription eingesetzt werden.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des einfachen Ansatzes für den DNA-Verdau.**

Reaktionskomponenten	Volumen
RNA in nukleasefreiem Wasser	1 µg
RQ1 RNase-freie DNase	1 µl (1 U)
RQ1 RNase-freier DNase 10 x Puffer	1 µl
Nukleasefreies Wasser	Auf 10 µl auffüllen

#### 4.2.8.3 Reverse Transkription

Die Proben konnten nach dem DNA-Verdau weiterverwendet werden für die reverse Transkription der RNA in cDNA. Es wurden zunächst 0,8 µl Random Primer pro Probe auf Eis hinzugefügt und für 5 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der doppelte Ansatz aufgeteilt. Einem Ansatz wurde 10 µl des Mastermixes mit Reverser Transkriptase (RT+) und dem anderen 10 µl des Mastermixes ohne Reverser Transkriptase (RT-) hinzugegeben. Die Zusammensetzung des Mastermixes kann Tabelle 11 entnommen werden.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für den Mastermix RT+ oder RT-.**

Reaktionskomponenten	RT +	RT -
5x Puffer	4 µl	
dNTP (10 mM)	2 µl	
MLRTV (Reverse Transkriptase)	0,5 µl	-
Nukleasefreies Wasser	3,5 µl	4 µl

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte nach der Zugabe des Mastermixes nach folgendem Programm:

10 min bei 25 °C  
 60 min bei 42 °C  
 10 min bei 70 °C  
 ∞ bei 4 °C

Nach Vollendung des Programmes wurden die Proben mit je 100 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt. Danach wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt und die Proben bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.8.4 Kontroll-PCR

Um die erfolgreiche cDNA-Synthese zu verifizieren, wurde zunächst eine Kontroll-PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Komponenten (Puffer, dNTP, Primer, Polymerase, nukleasefreies Wasser, cDNA) auf Eis nach Tabelle 12 zusammen pipettiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die Kontroll-PCR.

Reaktionskomponenten	Volumen
5x GoTaq® Puffer (Grün)	4 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Primer (For+Rev Mix, 10 mM)	1 µl
GoTaq® Polymerase	0,1 µl
Nukleasefreies Wasser	10,25 µl
cDNA	4 µl

Die Kontroll-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

1 min bei 95 °C	1 x
30 s bei 95 °C	
30 s bei 60 °C	35 x
30 s bei 72 °C	
5 min bei 72 °C	1 x
RT	∞

Anschließend wurden die Proben der Kontroll-PCR elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.2.8.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese können Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Es wurde ein 2 %iges Agarosegel (3 g auf 150 ml 1x TAE-Puffer), versetzt mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid, mit den Proben aus Kapitel 4.2.8.4 beladen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein 100 bp DNA-Marker aufgetragen, um die Größe der Fragmente der Proben mit diesem vergleichen zu können. Die Proben wurden für 45-60 min bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe von UV-Licht.

#### 4.2.8.6 RT-qPCR

Um die RT-qPCR durchzuführen, wurden die Reaktionskomponenten (Mastermix, Primer, cDNA, nukleasefreies Wasser) auf Eis nach Tabelle 13 zusammen pipettiert und in die Wells einer 96-Well qPCR-Platte gegeben.

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die Durchführung einer RT-qPCR.**

Reaktionskomponenten	Volumen
GoTaq® qPCR Master Mix	10 µl
Primer (For+Rev, 10 pmol/µl)	1 µl
Nukleasefreies Wasser	5 µl
cDNA	4 µl

Es wurden pro Probe Triplikate angesetzt. Als Referenzgen wurde GAPDH eingesetzt. Die qPCR-Platte wurde mit einer hitzestabilen Folie versiegelt und es erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 2 min. Die RT-qPCR erfolgte nach folgendem Programm:

2 min bei 95 °C	1 x
30 s bei 95 °C	
30 s bei 60°C	40 x
30 s bei 72 °C	
5 min bei 72 °C	1 x

Die erhaltenen Ergebnisse konnten anschließend mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet werden. Dabei konnte auf das Referenzgen GAPDH normiert werden.

#### 4.2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt. Mit Hilfe von Origin Pro® 2022 erfolgte der statistische Vergleich der Mittelwerte zweier Stichproben durch die Anwendung des Student t-Test, sofern gekennzeichnet. Der statistische Signifikanzwert p wurde mit \* für  $p < 0,05$ , mit \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  gekennzeichnet.

## Abkürzungsverzeichnis

$\gamma$	Dehnung
$\Delta$	Differenz
$\delta$	Chemische Verschiebung
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Anregungswellenlänge
$\omega$	Kreisfrequenz
%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	Mikromolar
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
2PA	Zwei-Photonen-Absorption
AGE	Allylglycidylether
ATP	Adenosintriphosphat
AHCT	<i>N</i> -Acetyl-DL-homocysteinethiolacton

AV	Atrioventrikular
Äq.	Äquivalent
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP4	<i>bone morphogenic protein 4</i>
bPE	Blockcopolyelektrolyte
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CAD	computergestütztes Konstruieren ( <i>engl. computer-aided design</i> )
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cTnT	Kardiales Troponin T ( <i>engl. cardiac troponin T</i> )
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid, deuteriertes Wasser
Da	Dalton
DbPE	Diblockcopolyelektrolyte
ddH <sub>2</sub> O	Doppeldestilliertes Wasser
DLW	<i>direct laser writing</i>

---

DM A	Differenzierungsmedium A
DM B	Differenzierungsmedium B
DM C	Differenzierungsmedium C
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMPA	2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>engl. desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DPBS <sup>-/-</sup>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
EB	Embryoidkörperchen ( <i>engl. embryoid bodies</i> )
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	<i>Endothelial Cell Growth Medium-2</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix ( <i>engl. extracellular matrix</i> )
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FDM	<i>Fused deposition modeling</i>
FGM-3	<i>Fibroblast Growth Medium-3</i>
g	Gramm
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GelMA	Gelatinemethacrylat, methacrylierte Gelatine
GelNB	Norbornenfunktionalisierte Gelatine
GelS	Thiolierte Gelatine
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase-3
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HCM	Humane Kardiomyozyten ( <i>engl. human cardiac myocytes</i> )
HCF	Humane Herzfibroblasten ( <i>engl. human cardiac fibroblasts</i> )
HepG2	Humane Epithelzelllinie eines Leberkarzinoms ( <i>engl. human hepatoma cell line</i> )
HUVEC	Humane Nabelschnurendothelzellen ( <i>engl. human umbilical vein endothelial cells</i> )
Hyl	L-Hydroxylysin
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen, ( <i>engl. human induced pluripotent stem cells</i> )
Irgacure D-2959	2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxyl)-2-methylpropiophenon
kDa	Kilodalton
Klf4	<i>kruppel-like factor 4</i>
kV	Kilovolt
l	Liter
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat

---

LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50 %
LIFT	Laser-induzierter Vorwärtstransfer ( <i>engl. laser induced forward transfer</i> )
Lys	L-Lysin
M	Molar
MAA	Methacrylsäureanhydrid
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
MGM	<i>Myocyte Growth Medium</i>
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	<i>Maintenance Medium</i>
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mmol	Millimol
mPEG	Methoxy-Polyethylenglykol
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
n	Anzahl/Stoffmenge
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumbicarbonat

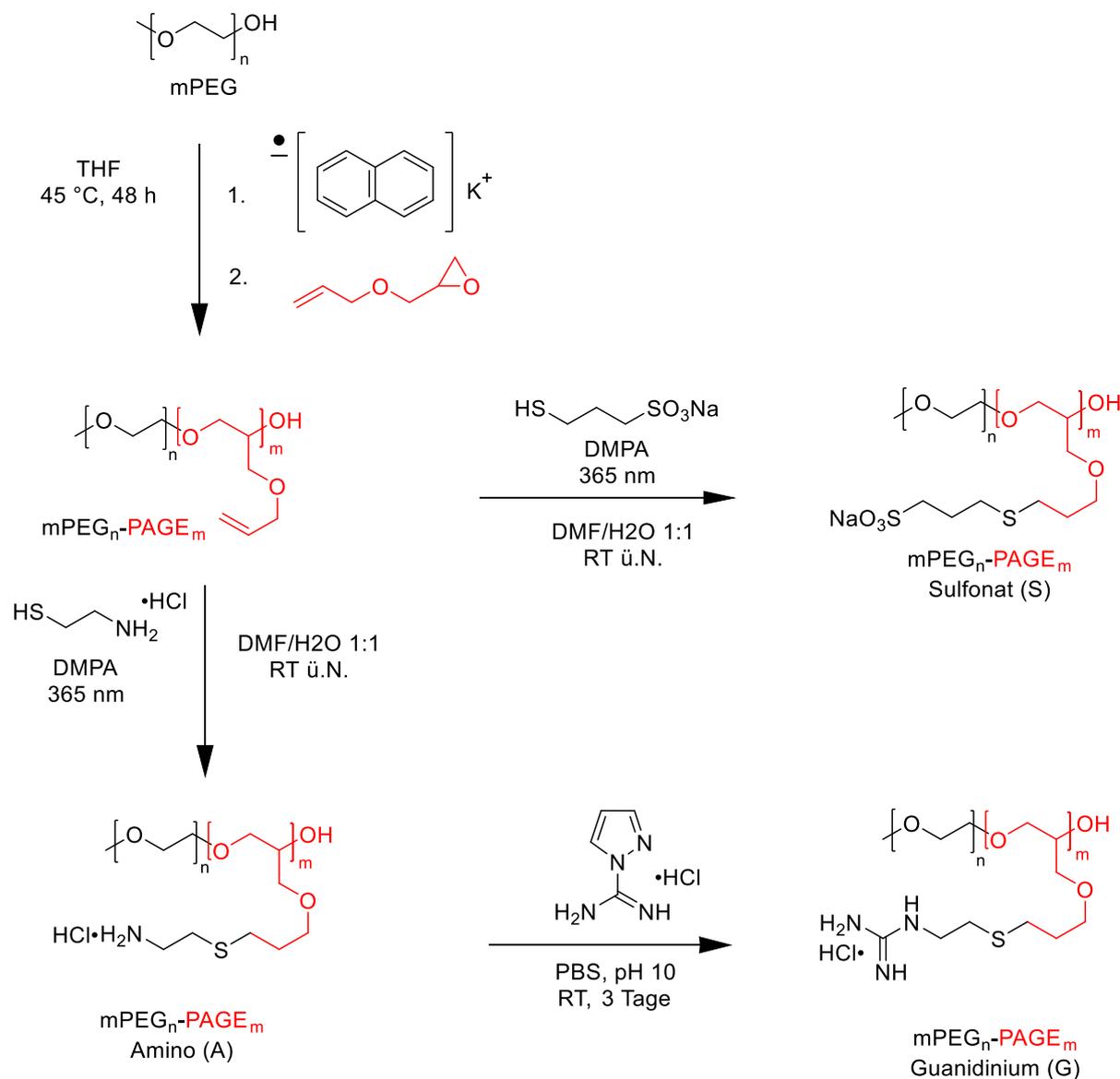
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NCA	5-Norbornen-2-carboxylsäure
NHDF	Humane Hautfibroblasten ( <i>engl. normal human dermal fibroblasts</i> )
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz ( <i>engl. nuclear magnetic resonance</i> )
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Oct-4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pa	Pascal
PAA	Polyacrylsäure ( <i>engl. polyacrylic acid</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. polymerase chain reaction</i> )
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEC	Polyelektrolyt-Komplexe ( <i>engl. polyelectrolyte complexes</i> )
PEG	Polyethylenglykol
PEGA	Polyethylenglykolacrylat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
pH	<i>potentia hydrogenii</i>

---

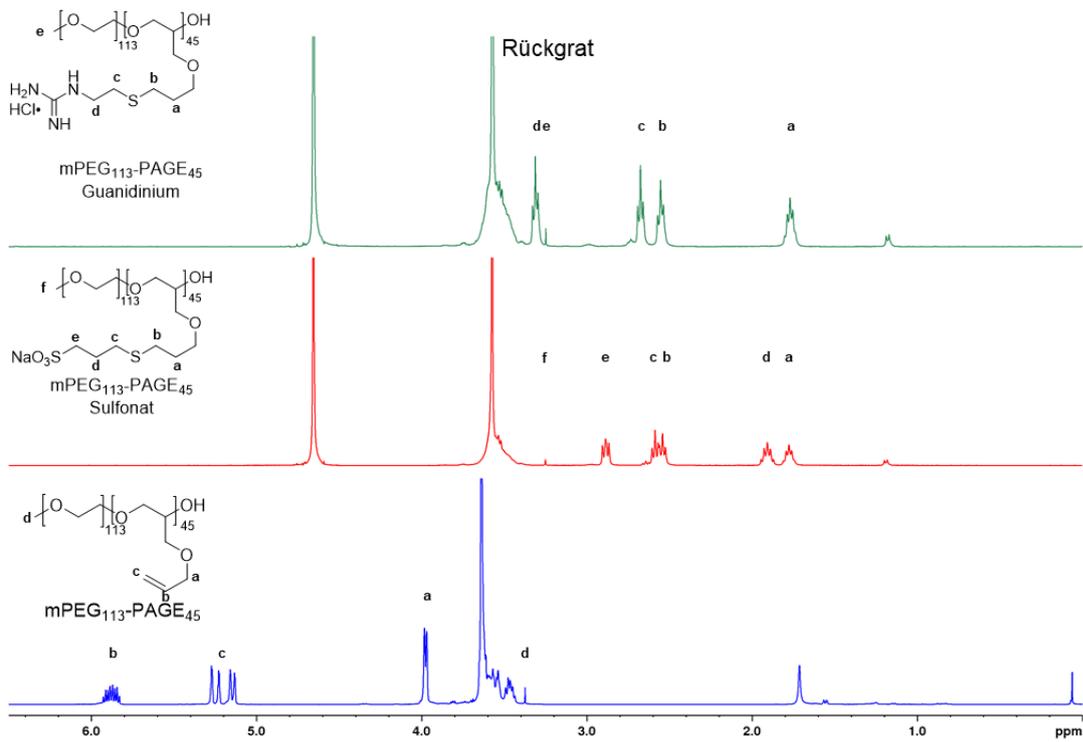
PLA	Polymilchsäure ( <i>engl. poly lactic acid</i> )
PLCL	Poly-L-Milchsäure-co- $\epsilon$ -caprolacton
ppm	<i>parts per million</i>
PSS	Polystyrolsulfonsäure ( <i>engl. polystyrene sulfonic acid</i> )
PVA	Polyvinylalkohol
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion ( <i>engl. quantitative polymerase chain reaction</i> )
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
ROI	<i>region of interest</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>engl. reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
SEM	Rasterelektronenmikroskop ( <i>engl. scanning electron microscopy</i> )
SLA	Stereolitographie
SLS	Selektives Lasersintern
Sox2	<i>sex determining region Y (SRY)-box 2</i>
TbPE	Triblockcopolyelektrolyte
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
THF	Tetrahydrofuran

TNBSA	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TRITC	Tetramethylrhodamin
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen

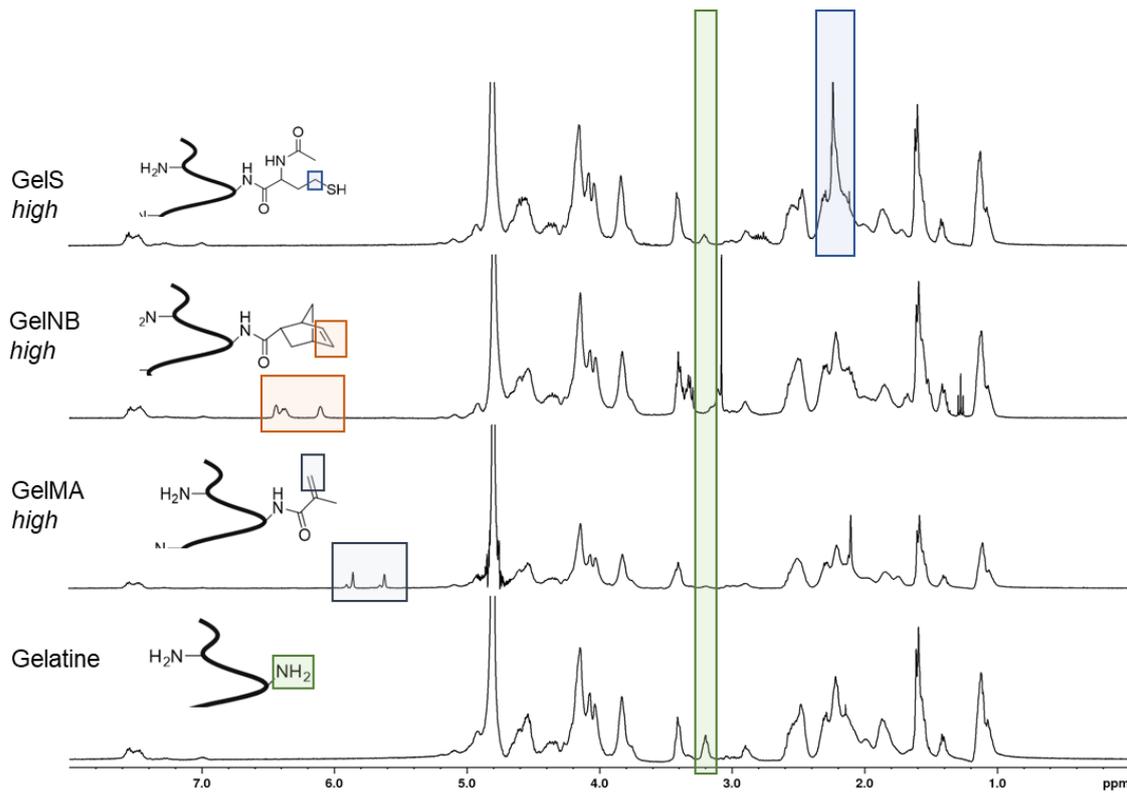
## Anhang



**Schema 12: Synthese der Diblockcopolymeren.** Alle Syntheseschritte wurden in einer *glove box* durchgeführt. PEG ( $M = 20.000 \text{ g/mol}$ ) (**1**) wurde in THF gelöst und mit Kaliumnaphthalid titriert bis eine hellgrüne Farbe erreicht wurde. AGE wurde in dem gewünschten Volumen hinzugegeben und für 48 h bei 45 °C gerührt. Danach wurde entgastetes Methanol hinzugegeben, das Produkt in Hexan ausgefällt, filtriert und getrocknet. Durch Lyophilisation wurde mPEG<sub>113</sub>-PAGE<sub>n</sub> (**2**) erhalten. Durch Zugabe des Thiolreagenzes, DMPA und die Bestrahlung mit 365 nm über Nacht wurden die Funktionalisierungen mit Amino (**4**) oder Sulfonat (**3**) erhalten. Aus der Aminofunktionalisierung konnte eine Guanidiniumfunktionalisierung (**5**) erhalten werden durch Zugabe 1H-Pyrazol-1-carboxamidin in DPBS<sup>-</sup> unter Rühren nach 3 Tagen erhalten werden. Nach einer letzten Lyophilisation wurde ein weißer bis brauner styroporartiger Feststoff erhalten.



**Abbildung 88:  $^1\text{H-NMR}$  Spektren der Diblockcopolymere (400 MHz).** Sulfonat- und Guanidiniumfunktionalisierte (rot und grün) Diblockcopolymere wurden in  $\text{D}_2\text{O}$  aufgenommen und das Ausgangsprodukt  $\text{mPEG}_{113}\text{-PAGE}_{45}$  (blau) in  $\text{CDCl}_3$ . In Kollaboration mit Dr. D. Li und Dr. T. Göckler.



**Abbildung 89:  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der gelatinebasierten semi-synthetischen Hydrogele (400 MHz, 313 K,  $\text{D}_2\text{O}$ ).** In grün markiert (3,2 ppm) sind die freien Aminogruppen, die in der Gelatine enthalten sind. In dunkelblau markiert sind die Methacrylatprotonen des GelMA bei 5,5-6 ppm. Die Protonen der Doppelbindung in der Norbornengruppe des GelNB ist orange markiert bei 6-6,5 ppm. Die Protonen in der Nähe des Thiols des Gels sind in blau bei ungefähr 2,2 ppm markiert.



## Literaturverzeichnis

1. Shieh, S.-J. & Vacanti, J. P. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery* **137**, 1–7; 10.1016/j.surg.2004.04.002 (2005).
2. Jorgensen, A. M. & Atala, A. Chapter 19 - Tissue engineering of organ systems. In *Tissue engineering*, edited by C. A. van Blitterswijk & J. de Boer (Academic Press, Amsterdam, 2023), pp. 661–688.
3. Organ Donation Statistics | organdonor.gov. Available at <https://www.organdonor.gov/learn/organ-donation-statistics> (2023).
4. Organspende. Statistiken zur Organspende für Deutschland und Europa. Available at <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/statistiken/> (2023).
5. Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface* **3**, 589–601; 10.1098/rsif.2006.0124 (2006).
6. Patrick, C. W., Mikos, A. G. & McIntire, L. V. Chapter I - Prospectus of Tissue Engineering. In *Frontiers in tissue engineering*, edited by C. W. Patrick, A. G. Mikos & L. V. MacIntire (Pergamon, Oxford [etc.], 2008), pp. 3–11.
7. Howard, D., Buttery, L. D., Shakesheff, K. M. & Roberts, S. J. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy* **213**, 66–72; 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x (2008).
8. Skalak, R. & Fox, C. F. (eds.). *Tissue engineering. Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988* (Liss, New York, 1988).
9. Lanza, R. P. *Principles of tissue engineering*. 5th ed. (Academic Press, London, 2020).
10. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 920–926; 10.1126/science.8493529 (1993).
11. Vacanti, C. A. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**, 569–576; 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x (2006).
12. Berthiaume, F., Maguire, T. J. & Yarmush, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering* **2**, 403–430; 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257 (2011).
13. Shambloott, M. J. *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13726–13731; 10.1073/pnas.95.23.13726 (1998).
14. Solter, D. & Gearhart, J. Putting stem cells to work. *Science (New York, N.Y.)* **283**, 1468–1470; 10.1126/science.283.5407.1468 (1999).
15. Gage, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)* **287**, 1433–1438; 10.1126/science.287.5457.1433 (2000).

16. Gordon, E. M., Barrett, R. W., Dower, W. J., Fodor, S. P. & Gallop, M. A. Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions. *Journal of medicinal chemistry* **37**, 1385–1401; 10.1021/jm00036a001 (1994).
17. Potyrailo, R. *et al.* Combinatorial and high-throughput screening of materials libraries: review of state of the art. *ACS Combinatorial Science* **13**, 579–633; 10.1021/co200007w (2011).
18. Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology* **162**, 1239–1249; 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x (2011).
19. Ettl, R. A. Toxicologic pathology in the 21st century. *Toxicologic pathology* **41**, 689–708; 10.1177/0192623312466192 (2013).
20. Green, S. B. Can animal data translate to innovations necessary for a new era of patient-centred and individualised healthcare? Bias in preclinical animal research. *BMC medical ethics* **16**, 53; 10.1186/s12910-015-0043-7 (2015).
21. Kamb, A., Wee, S. & Lengauer, C. Why is cancer drug discovery so difficult? *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 115–120; 10.1038/nrd2155 (2007).
22. Pearson, R. M. In-vitro techniques: can they replace animal testing? *Hum Reprod* **1**, 559–560; 10.1093/oxfordjournals.humrep.a136473 (1986).
23. Balls, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Laboratory animals* **28**, 193–211; 10.1258/002367794780681714 (1994).
24. Wobma, H. & Vunjak-Novakovic, G. Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2015: A Year in Review. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **22**, 101–113; 10.1089/ten.TEB.2015.0535 (2016).
25. Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H. & Xu, X. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology letters* **14**, 6999–7010; 10.3892/ol.2017.7134 (2017).
26. Duval, K. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda, Md.)* **32**, 266–277; 10.1152/physiol.00036.2016 (2017).
27. Yang, S., Leong, K. F., Du, Z. & Chua, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering* **7**, 679–689; 10.1089/107632701753337645 (2001).
28. Chen, G., Ushida, T. & Tateishi, T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **2**, 67–77; 10.1002/1616-5195(20020201)2:2<67::AID-MABI67>3.0.CO;2-F (2002).
29. Greek, R. & Menache, A. Systematic reviews of animal models: methodology versus epistemology. *International journal of medical sciences* **10**, 206–221; 10.7150/ijms.5529 (2013).

30. Lin, R.-Z. & Chang, H.-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* **3**, 1172–1184; 10.1002/biot.200700228 (2008).
31. Fennema, E., Rivron, N., Rouwkema, J., van Blitterswijk, C. & Boer, J. de. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* **31**, 108–115; 10.1016/j.tibtech.2012.12.003 (2013).
32. Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer research* **37**, 3639–3643 (1977).
33. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Experimental Biology and Medicine* **4**, 140–143; 10.3181/00379727-4-98 (1906).
34. Worthington, P. *et al.* Beta-hairpin hydrogels as scaffolds for high-throughput drug discovery in three-dimensional cell culture. *Analytical Biochemistry* **535**, 25–34; 10.1016/j.ab.2017.07.024 (2017).
35. Karkampouna, S. *et al.* Patient-derived xenografts and organoids model therapy response in prostate cancer. *Nat Commun* **12**, 1117; 10.1038/s41467-021-21300-6 (2021).
36. Zhao, Z. *et al.* Organoids. *Nat Rev Methods Primers* **2**, 1–21; 10.1038/s43586-022-00174-y (2022).
37. van den Bulcke, A. I. *et al.* Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31–38; 10.1021/bm990017d (2000).
38. Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536–5544; 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010).
39. Khalil, S. & Sun, W. Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. *J Biomech Eng* **131**, 111002; 10.1115/1.3128729 (2009).
40. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* **21**, 3307–3329; 10.1002/adma.200802106 (2009).
41. DeForest, C. A., Sims, E. A. & Anseth, K. S. Peptide-Functionalized Click Hydrogels with Independently Tunable Mechanics and Chemical Functionality for 3D Cell Culture. *Chemistry of Materials* **22**, 4783–4790; 10.1021/cm101391y (2010).
42. Huh, D., Hamilton, G. A. & Ingber, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology* **21**, 745–754; 10.1016/j.tcb.2011.09.005 (2011).
43. Zhang, B., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nat Rev Mater* **3**, 257–278; 10.1038/s41578-018-0034-7 (2018).
44. Pfister, R. S. In vitro Rekonstruktion der neurovaskulären Einheit auf dem Chip, 2021.
45. Lind, J. U. *et al.* Instrumented cardiac microphysiological devices via multimaterial three-dimensional printing. *Nature materials* **16**, 303–308; 10.1038/nmat4782 (2017).
46. Arslan-Yildiz, A. *et al.* Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 14103; 10.1088/1758-5090/8/1/014103 (2016).

47. Hull, C.W. and UVP, Inc. (1986) Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography. US Pat 4575330. - References - Scientific Research Publishing. Available at [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1859747](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1859747) (2023).
48. A. Savini & G. Savini. A short history of 3D printing, a technological revolution just started. *2015 ICOHTEC/IEEE International History of High-Technologies and their Socio-Cultural Contexts Conference (HISTELCON)* (2015).
49. Horn, T. J. & Harrysson, O. L. A. Overview of current additive manufacturing technologies and selected applications. *Science progress* **95**, 255–282; 10.3184/003685012X13420984463047 (2012).
50. Seol, Y.-J., Kang, T.-Y. & Cho, D.-W. Solid freeform fabrication technology applied to tissue engineering with various biomaterials. *Soft matter* **8**, 1730–1735; 10.1039/C1SM06863F (2012).
51. Mironov, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* **1**, 22001; 10.1088/1758-5082/1/2/022001 (2009).
52. Nakamura, M., Iwanaga, S., Henmi, C., Arai, K. & Nishiyama, Y. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. *Biofabrication* **2**, 14110; 10.1088/1758-5082/2/1/014110 (2010).
53. Gao, G., Kim, B. S., Jang, J. & Cho, D.-W. Recent Strategies in Extrusion-Based Three-Dimensional Cell Printing toward Organ Biofabrication. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **5**, 1150–1169; 10.1021/acsbiomaterials.8b00691 (2019).
54. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol* **32**, 773–785; 10.1038/nbt.2958 (2014).
55. Levato, R. *et al.* From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting. *Advanced Materials* **32**, e1906423; 10.1002/adma.201906423 (2020).
56. Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J. J. J. & Boland, T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* **26**, 93–99; 10.1016/j.biomaterials.2004.04.011 (2005).
57. Xu, T. *et al.* Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials* **34**, 130–139; 10.1016/j.biomaterials.2012.09.035 (2013).
58. Cui, X., Boland, T., D'Lima, D. D. & Lotz, M. K. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. *Recent patents on drug delivery & formulation* **6**, 149–155; 10.2174/187221112800672949 (2012).
59. Klebe, R. J. Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Experimental Cell Research* **179**, 362–373; 10.1016/0014-4827(88)90275-3 (1988).

60. Goldmann, T. & Gonzalez, J. S. DNA-printing: utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. *Journal of biochemical and biophysical methods* **42**, 105–110; 10.1016/s0165-022x(99)00049-4 (2000).
61. Okamoto, T., Suzuki, T. & Yamamoto, N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nature biotechnology* **18**, 438–441; 10.1038/74507 (2000).
62. Tekin, E., Smith, P. J. & Schubert, U. S. Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles. *Soft matter* **4**, 703–713; 10.1039/b711984d (2008).
63. Calvert, P. Materials science. Printing cells. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 208–209; 10.1126/science.1144212 (2007).
64. Sekitani, T., Noguchi, Y., Zschieschang, U., Klauk, H. & Someya, T. Organic transistors manufactured using inkjet technology with subfemtoliter accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4976–4980; 10.1073/pnas.0708340105 (2008).
65. Kim, J. D., Choi, J. S., Kim, B. S., Chan Choi, Y. & Cho, Y. W. Piezoelectric inkjet printing of polymers: Stem cell patterning on polymer substrates. *Polymer* **51**, 2147–2154; 10.1016/j.polymer.2010.03.038 (2010).
66. Skardal, A. *et al.* Bioprinted amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem cells translational medicine* **1**, 792–802; 10.5966/sctm.2012-0088 (2012).
67. Cui, X., Breitenkamp, K., Finn, M. G., Lotz, M. & D'Lima, D. D. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue engineering. Part A* **18**, 1304–1312; 10.1089/ten.TEA.2011.0543 (2012).
68. Bohandy, J., Kim, B. F. & Adrian, F. J. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *J. Appl. Phys.* **60**, 1538–1539; 10.1063/1.337287 (1986).
69. Barron, J. A., Ringeisen, B. R., Kim, H., Spargo, B. J. & Chrisey, D. B. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films* **453-454**, 383–387; 10.1016/j.tsf.2003.11.161 (2004).
70. Barron, J. A., Wu, P., Ladouceur, H. D. & Ringeisen, B. R. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomedical microdevices* **6**, 139–147; 10.1023/b:bmmd.0000031751.67267.9f (2004).
71. Guillemot, F. *et al.* High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta biomaterialia* **6**, 2494–2500; 10.1016/j.actbio.2009.09.029 (2010).
72. *Laser Technology in Biomimetics* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013).
73. Engelhardt, S. Direct Laser Writing. In *Laser Technology in Biomimetics* (Springer, Berlin, Heidelberg 2013), pp. 13–65.
74. Hopp, B. *et al.* Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. *Tissue engineering* **11**, 1817–1823; 10.1089/ten.2005.11.1817 (2005).

75. Gruene, M. *et al.* Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 79–87; 10.1089/ten.TEC.2010.0359 (2011).
76. Iwami, K. *et al.* Bio rapid prototyping by extruding/aspirating/refilling thermoreversible hydrogel. *Biofabrication* **2**, 14108; 10.1088/1758-5082/2/1/014108 (2010).
77. Selimis, A., Mironov, V. & Farsari, M. Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing. *Microelectronic Engineering* **132**, 83–89; 10.1016/j.mee.2014.10.001 (2015).
78. Chang, R., Nam, J. & Sun, W. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue engineering. Part A* **14**, 41–48; 10.1089/ten.a.2007.0004 (2008).
79. Chang, C. C., Boland, E. D., Williams, S. K. & Hoying, J. B. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **98**, 160–170; 10.1002/jbm.b.31831 (2011).
80. Jakab, K., Damon, B., Neagu, A., Kachurin, A. & Forgacs, G. Three-dimensional tissue constructs built by bioprinting. *Biorheology* **43**, 509–513 (2006).
81. Marga, F. *et al.* Organ Printing: A Novel Tissue Engineering Paradigm. In *5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering* (Springer, Berlin, Heidelberg 2011), pp. 27–30.
82. Nair, K. *et al.* Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnology Journal* **4**, 1168–1177; 10.1002/biot.200900004 (2009).
83. Ozbolat, I. T. & Yu, Y. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. *IEEE transactions on bio-medical engineering* **60**, 691–699; 10.1109/TBME.2013.2243912 (2013).
84. Coppi, P. de *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature biotechnology* **25**, 100–106; 10.1038/nbt1274 (2007).
85. Duan, B., Hockaday, L. A., Kang, K. H. & Butcher, J. T. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *Journal of biomedical materials research. Part A* **101**, 1255–1264; 10.1002/jbm.a.34420 (2013).
86. Norotte, C., Marga, F. S., Niklason, L. E. & Forgacs, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials* **30**, 5910–5917; 10.1016/j.biomaterials.2009.06.034 (2009).
87. Fulden, U.-K. 3D Bioprinting in Medicine. *Glob J Biotechnol Biomater Sci*, 1–5; 10.17352/gjbbs.000015 (2021).
88. Zhang, D. *et al.* A 3D-printing method of fabrication for metals, ceramics, and multi-materials using a universal self-curable technique for robocasting. *Mater. Horiz.* **7**, 1083–1090; 10.1039/C9MH01690B (2020).

89. Malda, J. *et al.* 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials* **25**, 5011–5028; 10.1002/adma.201302042 (2013).
90. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953; 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023 (2008).
91. West, J. L. & Hubbell, J. A. Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. *Argonne National Lab. (ANL), Argonne, IL (United States). Advanced Photon Source (APS)* **32**, 241–244; 10.1021/ma981296k (1999).
92. Weber, L. M., Hayda, K. N. & Anseth, K. S. Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue engineering. Part A* **14**, 1959–1968; 10.1089/ten.tea.2007.0238 (2008).
93. Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* **21**, 2529–2543; 10.1016/s0142-9612(00)00121-6 (2000).
94. Ananthanarayanan, A., Narmada, B. C., Mo, X., McMillian, M. & Yu, H. Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends in biotechnology* **29**, 110–118; 10.1016/j.tibtech.2010.10.006 (2011).
95. Kesharwani, P., Bisht, A., Alexander, A., Dave, V. & Sharma, S. Biomedical applications of hydrogels in drug delivery system: An update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **66**, 102914; 10.1016/j.jddst.2021.102914 (2021).
96. Lodhi, B. A. *et al.* Polysaccharide-Based Superporous, Superabsorbent, and Stimuli Responsive Hydrogel from Sweet Basil: A Novel Material for Sustained Drug Release. *Advances in Polymer Technology* **2019**, 1–11; 10.1155/2019/9583516 (2019).
97. Kyle, R. A., Steensma, D. P. & Shampo, M. A. Otto Wichterle--Inventor of the First Soft Contact Lenses. *Mayo Clinic proceedings* **91**, e45-6; 10.1016/j.mayocp.2016.01.016 (2016).
98. Das, S., Kumar, V., Tiwari, R., Singh, L. & Singh, S. RECENT ADVANCES IN HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. *Asian J Pharm Clin Res* **11**, 62; 10.22159/ajpcr.2018.v11i11.27921 (2018).
99. El-Sherbiny, I. M. & Yacoub, M. H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice* **2013**, 316–342; 10.5339/gcsp.2013.38 (2013).
100. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices* **8**, 607–626; 10.1586/erd.11.27 (2011).
101. Jong, S. J. de *et al.* Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran. *Journal of Controlled Release* **72**, 47–56; 10.1016/S0168-3659(01)00261-9 (2001).
102. Schulze, J., Hendrikx, S., Schulz-Siegmund, M. & Aigner, A. Microparticulate poly(vinyl alcohol) hydrogel formulations for embedding and controlled release of polyethylenimine (PEI)-based nanoparticles. *Acta biomaterialia* **45**, 210–222; 10.1016/j.actbio.2016.08.056 (2016).

103. Wang, R. *et al.* Kinetically stable metal ligand charge transfer complexes as crosslinks in nanogels/hydrogels: Physical properties and cytotoxicity. *Acta biomaterialia* **26**, 136–144; 10.1016/j.actbio.2015.08.019 (2015).
104. Lin, K. *et al.* Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Adv Funct Materials* **29**, 1804943; 10.1002/adfm.201804943 (2019).
105. Grassl, E. D., Oegema, T. R. & Tranquillo, R. T. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 607–612; 10.1002/jbm.10107 (2002).
106. Sajkiewicz, P. & Kołbuk, D. Electrospinning of gelatin for tissue engineering--molecular conformation as one of the overlooked problems. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **25**, 2009–2022; 10.1080/09205063.2014.975392 (2014).
107. Brandl, F., Sommer, F. & Goepferich, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials* **28**, 134–146; 10.1016/j.biomaterials.2006.09.017 (2007).
108. Lin, C.-C. & Metters, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1379–1408; 10.1016/j.addr.2006.09.004 (2006).
109. Madduma-Bandarage, U. S. K. & Madihally, S. V. Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications. *Journal of Applied Polymer Science* **138**, 50376; 10.1002/app.50376 (2021).
110. Madolia, H. PREPARATION AND EVALUATION OF STOMACH SPECIFIC IPN HYDROGELS FOR ORAL DRUG DELIVERY: A REVIEW. *1* **3**; 10.22270/jddt.v3i2.400 (2013).
111. Chatterjee, S., Hui, P. C. & Kan, C. Thermoresponsive Hydrogels and Their Biomedical Applications: Special Insight into Their Applications in Textile Based Transdermal Therapy. *Polymers* **10**, 480; 10.3390/polym10050480 (2018).
112. Soleimani, K., Derakhshankhah, H., Jaymand, M. & Samadian, H. Stimuli-responsive natural gums-based drug delivery systems for cancer treatment. *Carbohydrate polymers* **254**, 117422; 10.1016/j.carbpol.2020.117422 (2021).
113. Taubenberger, A. V., Woodruff, M. A., Bai, H., Muller, D. J. & Hutmacher, D. W. The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. *Biomaterials* **31**, 2827–2835; 10.1016/j.biomaterials.2009.12.051 (2010).
114. Davis, G. E. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites. *Biochemical and biophysical research communications* **182**, 1025–1031; 10.1016/0006-291x(92)91834-d (1992).
115. Ahearne, M. Introduction to cell-hydrogel mechanosensing. *Interface focus* **4**, 20130038; 10.1098/rsfs.2013.0038 (2014).

116. Bhattarai, N., Gunn, J. & Zhang, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 83–99; 10.1016/j.addr.2009.07.019 (2010).
117. Burdick, J. A. & Prestwich, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* **23**, H41-56; 10.1002/adma.201003963 (2011).
118. Almany, L. & Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **26**, 2467–2477; 10.1016/j.biomaterials.2004.06.047 (2005).
119. Ying, G., Jiang, N., Yu, C. & Zhang, Y. S. Three-dimensional bioprinting of gelatin methacryloyl (GelMA). *Bio-des. Manuf.* **1**, 215–224; 10.1007/s42242-018-0028-8 (2018).
120. Rutz, A. L., Hyland, K. E., Jakus, A. E., Burghardt, W. R. & Shah, R. N. A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. *Advanced Materials* **27**, 1607–1614; 10.1002/adma.201405076 (2015).
121. Ouyang, L., Highley, C. B., Sun, W. & Burdick, J. A. A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks. *Advanced Materials* **29**; 10.1002/adma.201604983 (2017).
122. GhavamiNejad, A., Ashammakhi, N., Wu, X. Y. & Khademhosseini, A. Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small* **16**, e2002931; 10.1002/smll.202002931 (2020).
123. Nguyen, K. T. & West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307–4314; 10.1016/S0142-9612(02)00175-8 (2002).
124. Zhu, W. *et al.* Direct 3D bioprinting of prevascularized tissue constructs with complex microarchitecture. *Biomaterials* **124**, 106–115; 10.1016/j.biomaterials.2017.01.042 (2017).
125. Fairbanks, B. D., Schwartz, M. P., Bowman, C. N. & Anseth, K. S. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials* **30**, 6702–6707; 10.1016/j.biomaterials.2009.08.055 (2009).
126. Wang, T., Turhan, M. & Gunasekaran, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International* **53**, 911–918; 10.1002/pi.1461 (2004).
127. Liu, M. *et al.* Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone Res* **5**, 17014; 10.1038/boneres.2017.14 (2017).
128. Hennink, W. E. & van Nostrum, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**, 223–236; 10.1016/j.addr.2012.09.009 (2012).
129. Bruchet, M. & Melman, A. Fabrication of patterned calcium cross-linked alginate hydrogel films and coatings through reductive cation exchange. *Carbohydrate polymers* **131**, 57–64; 10.1016/j.carbpol.2015.05.021 (2015).

130. Du, L., GhavamiNejad, A., Yan, Z.-C., Biswas, C. S. & Stadler, F. J. Effect of a functional polymer on the rheology and microstructure of sodium alginate. *Carbohydrate polymers* **199**, 58–67; 10.1016/j.carbpol.2018.07.001 (2018).
131. Muthukumar, T., Song, J. E. & Khang, G. Biological Role of Gellan Gum in Improving Scaffold Drug Delivery, Cell Adhesion Properties for Tissue Engineering Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)* **24**; 10.3390/molecules24244514 (2019).
132. Chimene, D. *et al.* Nanoengineered Ionic-Covalent Entanglement (NICE) Bioinks for 3D Bioprinting. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 9957–9968; 10.1021/acsami.7b19808 (2018).
133. Sun, J.-Y. *et al.* Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* **489**, 133–136; 10.1038/nature11409 (2012).
134. WHO. Cardiovascular diseases. Available at [https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1) (2023).
135. Curtis, M. W. & Russell, B. Cardiac tissue engineering. *The Journal of cardiovascular nursing* **24**, 87–92; 10.1097/01.JCN.0000343562.06614.49 (2009).
136. Zhang, Y. S. *et al.* Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials* **110**, 45–59; 10.1016/j.biomaterials.2016.09.003 (2016).
137. Goldfracht, I. *et al.* Engineered heart tissue models from hiPSC-derived cardiomyocytes and cardiac ECM for disease modeling and drug testing applications. *Acta biomaterialia* **92**, 145–159; 10.1016/j.actbio.2019.05.016 (2019).
138. Cleveland Clinic. Heart: Anatomy and Function. Available at <https://my.clevelandclinic.org/health/body/21704-heart> (2023).
139. Veeraraghavan, R., Gourdie, R. G. & Poelzing, S. Mechanisms of cardiac conduction: a history of revisions. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **306**, H619-27; 10.1152/ajpheart.00760.2013 (2014).
140. National Heart, Lung, and Blood Institute. The Heart- How the heart works. Available at <https://www.nhlbi.nih.gov/health/heart> (2023).
141. The Texas Heart Institute. Heart Anatomy. Available at <https://www.texasheart.org/heart-health/heart-information-center/topics/heart-anatomy/> (2022).
142. Transplantation verstehen. Funktion und Aufbau des Herzens. Available at <https://www.transplantation-verstehen.de/organe/herz/aufbau-und-funktion> (2023).
143. ROWLATT, U. Comparative anatomy of the heart of mammals. *Zool J Linn Soc* **98**, 73–110; 10.1111/j.1096-3642.1990.tb01220.x (1990).
144. Schiebler, T. H. & Arnold, G. (eds.). *Lehrbuch der gesamten Anatomie des Menschen. Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs*. 4th ed. (Springer, Berlin, Heidelberg, 1987).

145. Andreae, S., Hayek, D. von & Weniger, J. *Krankheitslehre. 71 Tabellen ; [inklusive DVD mit 37 Filmen]*. 2nd ed. (Thieme, Stuttgart, New York, 2006).
146. Kindermann, W. *Sportkardiologie. Körperliche Aktivität bei Herzerkrankungen*. 2nd ed. (Steinkopff, Darmstadt, 2007).
147. Steffel, J. & Luescher, T. *Herz-Kreislauf*. 2nd ed. (Springer Medizin, Berlin, Heidelberg, 2014).
148. Zenneck, H.-U. (ed.). *Altenpflege, Geriatrie*. 4th ed. (Büchner; Handwerk und Technik, Hamburg, 2002).
149. Iuzzo, P. A. *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices*. 2nd ed. (Springer, New York, NY, 2009).
150. Karin Hammer. *High Resolution 3D-Imaging of the Physiology and Morphology of Isolated Adult Cardiac Myocytes from Rat and Mice* (2010).
151. via medici: leichter lernen - mehr verstehen. Herzzyklus: Phasen der Herzaktion - via medici. Available at <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/541075/537682/herzzyklus+phasen+der+herzaktion> (2023).
152. Huber, P. Systole/Diastole. In *Goethe Handbuch* (J.B. Metzler, Stuttgart 1998), pp. 1034–1035.
153. Deutsche Herzstiftung. Systolischer und diastolischer Blutdruck | Herzstiftung. Available at <https://herzstiftung.de/ihre-herzgesundheit/gesundbleiben/bluthochdruck/systolischer-und-diastolischer-blutdruck> (2023).
154. *Goethe Handbuch* (J.B. Metzler, Stuttgart, 1998).
155. Gesenberg, S. & Voigt, I. *Pflegewissen Kardiologie* (Springer Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg, 2017).
156. Kugler, P. *Der menschliche Körper. Anatomie Physiologie Pathologie*. 4th ed. (Urban & Fischer in Elsevier, München, 2021).
157. Zimmer, P. & Appell, H.-J. *Funktionelle Anatomie. Grundlagen sportlicher Leistung und Bewegung*. 5th ed. (Springer Berlin Heidelberg; Springer, Berlin, Heidelberg, 2021).
158. Rheinländer, A. Herzwand: Endokard, Myokard und Perikard | Kenhub. Available at <https://www.kenhub.com/de/library/anatomie/herzwand> (2023).
159. Frömke, J. Aufbau und Funktion des Herzens. In *Standardoperationen in der Herzchirurgie* (Steinkopff, Heidelberg 2003), pp. 1–10.
160. Gray, G. A., Toor, I. S., Castellan, R., Crisan, M. & Meloni, M. Resident cells of the myocardium: more than spectators in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Physiology* **1**, 46–51; 10.1016/j.cophys.2017.08.001 (2018).
161. Weinhaus, A. J. & Roberts, K. P. Anatomy of the Human Heart. In *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, edited by P. A. Iuzzo (Humana Press Inc, [New York], 2005), pp. 51–79.

162. Veldhuizen, J., Migrino, R. Q. & Nikkhah, M. Three-dimensional microengineered models of human cardiac diseases. *Journal of Biological Engineering* **13**, 29; 10.1186/s13036-019-0155-6 (2019).
163. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)* **324**, 98–102; 10.1126/science.1164680 (2009).
164. Litviňuková, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* **588**, 466–472; 10.1038/s41586-020-2797-4 (2020).
165. Atwell, D., Mishra, A., Hall, C. N., O'Farrell, F. M. & Dalkara, T. What is a pericyte? *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **36**, 451–455; 10.1177/0271678X15610340 (2016).
166. Frangogiannis, N. G. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circulation research* **125**, 117–146; 10.1161/CIRCRESAHA.119.311148 (2019).
167. Fan, D., Takawale, A., Lee, J. & Kassiri, Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis & tissue repair* **5**, 15; 10.1186/1755-1536-5-15 (2012).
168. Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D. & Long, C. S. The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology* **45**, 657–687; 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095802 (2005).
169. Camelliti, P., Borg, T. K. & Kohl, P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **65**, 40–51; 10.1016/j.cardiores.2004.08.020 (2005).
170. Lockhart, M., Wirrig, E., Phelps, A. & Wessels, A. Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* **91**, 535–550; 10.1002/bdra.20810 (2011).
171. Raffetto, J. D. & Khalil, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* **75**, 346–359; 10.1016/j.bcp.2007.07.004 (2008).
172. Jourdan-Lesaux, C., Zhang, J. & Lindsey, M. L. Extracellular matrix roles during cardiac repair. *Life Sciences* **87**, 391–400; 10.1016/j.lfs.2010.07.010 (2010).
173. Lothar, A. & Kohl, P. The heterocellular heart: identities, interactions, and implications for cardiology. *Basic Res Cardiol* **118**, 30; 10.1007/s00395-023-01000-6 (2023).
174. Sheikh, F., Ross, R. S. & Chen, J. Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends in cardiovascular medicine* **19**, 182–190; 10.1016/j.tcm.2009.12.001 (2009).
175. Howard, C. M. & Baudino, T. A. Dynamic cell-cell and cell-ECM interactions in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **70**, 19–26; 10.1016/j.yjmcc.2013.10.006 (2014).
176. Später, D., Hansson, E. M., Zangi, L. & Chien, K. R. How to make a cardiomyocyte. *Development* **141**, 4418–4431; 10.1242/dev.091538 (2014).

177. Lippert, H., Herbold, D. & Lippert-Burmester, W. *Anatomie. Text und Atlas : deutsche und lateinische Bezeichnungen*. 10th ed. (Elsevier, München, 2017).
178. Clauss, W. & Clauss, C. *Humanbiologie kompakt*. 2nd ed. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018).
179. Rohr, S. Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* **62**, 309–322; 10.1016/j.cardiores.2003.11.035 (2004).
180. Söhl, G. & Willecke, K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* **62**, 228–232; 10.1016/j.cardiores.2003.11.013 (2004).
181. Delmar, M. The intercalated disk as a single functional unit. *Heart rhythm* **1**, 12–13; 10.1016/j.hrthm.2004.02.003 (2004).
182. Bass-Zubek, A. E., Godsel, L. M., Delmar, M. & Green, K. J. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Current opinion in cell biology* **21**, 708–716; 10.1016/j.ceb.2009.07.002 (2009).
183. Green, K. J. & Simpson, C. L. Desmosomes: new perspectives on a classic. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 2499–2515; 10.1038/sj.jid.5701015 (2007).
184. Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. & Peifer, M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**, 91–100; 10.1038/35040042 (2000).
185. Niessen, C. M. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 2525–2532; 10.1038/sj.jid.5700865 (2007).
186. Rampazzo, A., Calore, M., van Hengel, J. & van Roy, F. Intercalated discs and arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circulation. Cardiovascular genetics* **7**, 930–940; 10.1161/CIRCGENETICS.114.000645 (2014).
187. Gregorio, C. C. & Antin, P. B. To the heart of myofibril assembly. *Trends in Cell Biology* **10**, 355–362; 10.1016/S0962-8924(00)01793-1 (2000).
188. Squire, J. M. Architecture and function in the muscle sarcomere. *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 247–257; 10.1016/S0959-440X(97)80033-4 (1997).
189. Pappano, A. J. & Wier, W. G. *Cardiovascular Physiology - E-Book. Cardiovascular Physiology - E-Book*. 11th ed. (Elsevier, 2013).
190. Müller, W. A., Frings, S. & Möhrlein, F. Muskelmotoren, EKG und elektrische Organe. In *Tier- und Humanphysiologie* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg 2019), pp. 411–448.
191. Crocini, C. & Gotthardt, M. Cardiac sarcomere mechanics in health and disease. *Biophysical Reviews* **13**, 637–652; 10.1007/s12551-021-00840-7 (2021).
192. *Tier- und Humanphysiologie* (Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2019).
193. Kobirumaki-Shimozawa, F. et al. Sarcomere imaging by quantum dots for the study of cardiac muscle physiology. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 313814; 10.1155/2012/313814 (2012).

194. Katz, A. M. & Lorell, B. H. Regulation of Cardiac Contraction and Relaxation. *Circulation* **102**; 10.1161/circ.102.suppl\_4.IV-69 (2000).
195. Huxley, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science (New York, N.Y.)* **164**, 1356–1365; 10.1126/science.164.3886.1356 (1969).
196. HUXLEY, H. & HANSON, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973–976; 10.1038/173973a0 (1954).
197. *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (Springer, Cham, 2017).
198. Solaro, R. J. & Rarick, H. M. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circulation research* **83**, 471–480; 10.1161/01.res.83.5.471 (1998).
199. Behrmann, E. *et al.* Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex. *Cell* **150**, 327–338; 10.1016/j.cell.2012.05.037 (2012).
200. Pollard, T. D. & Weihing, R. R. Actin and myosin and cell movement. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* **2**, 1–65; 10.3109/10409237409105443 (1974).
201. Squire, J. M., Paul, D. M. & Morris, E. P. Myosin and Actin Filaments in Muscle: Structures and Interactions. In *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* (Springer, Cham2017), pp. 319–371.
202. Piquereau, J. *et al.* Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? *Front. Physiol.* **4**, 102; 10.3389/fphys.2013.00102 (2013).
203. Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V. & Joubert, F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1360–1372; 10.1016/j.bbamcr.2010.09.006 (2011).
204. Internetredaktion, R. B. L. Herz-Kreislauf-Erkrankungen - DLR Gesundheitsforschung. Available at <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/herz-kreislauf-erkrankungen-6297.php> (2023).
205. Grill, N., Fellner, L., Tisch, M. & Edenhofer, F. iPS-abgeleitete Kardiomyozyten als therapeutische Hoffnungsträger. *Biospektrum* **27**, 362–364; 10.1007/s12268-021-1609-1 (2021).
206. Tanai, E. & Frantz, S. *Comprehensive physiology*. 1st ed. (Published for the American Physiological Society by Wiley Blackwell, [Bethesda, Md.], 2011-).
207. Sun, R., Liu, M., Lu, L., Zheng, Y. & Zhang, P. Congenital Heart Disease: Causes, Diagnosis, Symptoms, and Treatments. *Cell Biochem Biophys* **72**, 857–860; 10.1007/s12013-015-0551-6 (2015).
208. Lu, L., Liu, M., Sun, R., Zheng, Y. & Zhang, P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys* **72**, 865–867; 10.1007/s12013-015-0553-4 (2015).

209. Awad, M. M., Calkins, H. & Judge, D. P. Mechanisms of disease: molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* **5**, 258–267; 10.1038/ncpcardio1182 (2008).
210. Marler, J., Upton, J., Langer, R. & Vacanti, J. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* **33**, 165–182; 10.1016/s0169-409x(98)00025-8 (1998).
211. Zimmermann, W.-H. & Eschenhagen, T. Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev* **8**, 259–269; 10.1023/A:1024725818835 (2003).
212. Passier, R., van Laake, L. W. & Mummery, C. L. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* **453**, 322–329; 10.1038/nature07040 (2008).
213. Laflamme, M. A. & Murry, C. E. Regenerating the heart. *Nature biotechnology* **23**, 845–856; 10.1038/nbt1117 (2005).
214. Kidane, A. G. *et al.* Current developments and future prospects for heart valve replacement therapy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **88**, 290–303; 10.1002/jbm.b.31151 (2009).
215. Zhu, W. *et al.* 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* **40**, 103–112; 10.1016/j.copbio.2016.03.014 (2016).
216. Hassanzadeh, P., Atyabi, F. & Dinarvand, R. Tissue engineering: Still facing a long way ahead. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **279**, 181–197; 10.1016/j.jconrel.2018.04.024 (2018).
217. Ahmed, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* **6**, 105–121; 10.1016/j.jare.2013.07.006 (2015).
218. Cao, H., Duan, L., Zhang, Y., Cao, J. & Zhang, K. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **6**, 426; 10.1038/s41392-021-00830-x (2021).
219. da Silva, L. P., Reis, R. L., Correlo, V. M. & Marques, A. P. Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds. *Annual review of biomedical engineering* **21**, 145–169; 10.1146/annurev-bioeng-060418-052422 (2019).
220. Kang, J. I. & Park, K. M. Advances in gelatin-based hydrogels for wound management. *J. Mater. Chem. B* **9**, 1503–1520; 10.1039/D0TB02582H (2021).
221. Schuurman, W. *et al.* Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromolecular bioscience* **13**, 551–561; 10.1002/mabi.201200471 (2013).
222. Haase, S. K. *Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Biodruck* (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2021).
223. Göckler, T. *Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering* (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2021).

224. Kempter, X. *Gelatine-basierte Hydrogele für den 3D Biodruck von Gewebemodellen* (Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2022).
225. Göckler, T. *et al.* Tuning Superfast Curing Thiol-Norbornene-Functionalized Gelatin Hydrogels for 3D Bioprinting. *Advanced Healthcare Materials* **10**, e2100206; 10.1002/adhm.202100206 (2021).
226. Habeeb, A. F. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* **14**, 328–336; 10.1016/0003-2697(66)90275-2 (1966).
227. Rodríguez-Pombo, L. *et al.* Simultaneous fabrication of multiple tablets within seconds using tomographic volumetric 3D printing. *International Journal of Pharmaceutics: X* **5**, 100166; 10.1016/j.ijpx.2023.100166 (2023).
228. Lin, H., Cheng, A. W.-M., Alexander, P. G., Beck, A. M. & Tuan, R. S. Cartilage tissue engineering application of injectable gelatin hydrogel with in situ visible-light-activated gelation capability in both air and aqueous solution. *Tissue engineering. Part A* **20**, 2402–2411; 10.1089/ten.TEA.2013.0642 (2014).
229. Pahoff, S. *et al.* Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *J. Mater. Chem. B* **7**, 1761–1772; 10.1039/C8TB02607F (2019).
230. Henrikson, K. J. *et al.* Nucleous Pulposus Tissue Engineering Using a Novel Photopolymerizable Hydrogel and Minimally Invasive Delivery. *The Spine Journal* **14**, S173; 10.1016/j.spinee.2014.08.416 (2014).
231. Huber, B., Borchers, K., Tovar, G. E. & Kluger, P. J. Methacrylated gelatin and mature adipocytes are promising components for adipose tissue engineering. *Journal of biomaterials applications* **30**, 699–710; 10.1177/0885328215587450 (2016).
232. Moeller, M. & Matyjaszewski, K. (eds.). *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (Elsevier Science, Amsterdam, 2012).
233. Moad, G. 3.04 - Radical Polymerization. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, edited by M. Moeller & K. Matyjaszewski (Elsevier Science, Amsterdam, 2012), pp. 59–118.
234. Rouillard, A. D. *et al.* Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 173–179; 10.1089/ten.TEC.2009.0582 (2011).
235. C. N. Salinas & K. Anseth. Mixed Mode Thiol–Acrylate Photopolymerizations for the Synthesis of PEG–Peptide Hydrogels. *Macromolecules* (2008).
236. Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol-ene click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1540–1573; 10.1002/anie.200903924 (2010).
237. Sinha, A. K. & Equbal, D. Thiol–Ene Reaction: Synthetic Aspects and Mechanistic Studies of an Anti-Markovnikov-Selective Hydrothiolation of Olefins. *Asian J Org Chem* **8**, 32–47; 10.1002/ajoc.201800639 (2019).

238. Machado, T. O., Sayer, C. & Araujo, P. H. Thiol-ene polymerisation: A promising technique to obtain novel biomaterials. *European Polymer Journal* **86**, 200–215; 10.1016/j.eurpolymj.2016.02.025 (2017).
239. Cramer, N. B., Reddy, S. K., O'Brien, A. K. & Bowman, C. N. Thiol-Ene Photopolymerization Mechanism and Rate Limiting Step Changes for Various Vinyl Functional Group Chemistries. *Macromolecules* **36**, 7964–7969; 10.1021/ma034667s (2003).
240. Morgan, C. R., Magnotta, F. & Ketley, A. D. Thiol/ene photocurable polymers. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **15**, 627–645; 10.1002/pol.1977.170150311 (1977).
241. Chapekar, M. S. Tissue engineering: Challenges and opportunities. *J. Biomed. Mater. Res.* **53**, 617–620; 10.1002/1097-4636(2000)53:6<617::AID-JBM1>3.0.CO;2-C (2000).
242. Jawad, H. *et al.* Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **1**, 327–342; 10.1002/term.46 (2007).
243. Zhang, W. *et al.* Necrotic myocardial cells release damage-associated molecular patterns that provoke fibroblast activation in vitro and trigger myocardial inflammation and fibrosis in vivo. *Journal of the American Heart Association* **4**, e001993; 10.1161/JAHA.115.001993 (2015).
244. Fotakis, G. & Timbrell, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters* **160**, 171–177; 10.1016/j.toxlet.2005.07.001 (2006).
245. Wang, S., Yu, H. & Wickliffe, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**, 2147–2151; 10.1016/j.tiv.2011.07.007 (2011).
246. Mallet, J. D. & Rochette, P. J. Ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in rabbit eyes. *Photochemistry and Photobiology* **87**, 1363–1368; 10.1111/j.1751-1097.2011.00977.x (2011).
247. Pustisek, N. & Situm, M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Collegium antropologicum* **35 Suppl 2**, 339–341 (2011).
248. Sonnaert, M., Papantoniou, I., Luyten, F. P. & Schrooten, J. I. Quantitative Validation of the Presto Blue Metabolic Assay for Online Monitoring of Cell Proliferation in a 3D Perfusion Bioreactor System. *Tissue engineering. Part C, Methods* **21**, 519–529; 10.1089/ten.TEC.2014.0255 (2015).
249. Annabi, N. *et al.* Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **16**, 371–383; 10.1089/ten.TEB.2009.0639 (2010).
250. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 697–715; 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697 (1996).

251. Julie A. Benton, Benjamin D. Fairbanks & Kristi S. Anseth. Characterization of valvular interstitial cell function in three dimensional matrix metalloproteinase degradable PEG hydrogels. *Biomaterials* **30**, 6593–6603 (2009).
252. Lutolf, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5413–5418; 10.1073/pnas.0737381100 (2003).
253. Richard W. Horobin & John A. Kiernan. *Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine* (2002).
254. Bratosin, D., Mitrofan, L., Palii, C., Estaquier, J. & Montreuil, J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **66**, 78–84; 10.1002/cyto.a.20152 (2005).
255. Stoddart, M. J. Cell viability assays: introduction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **740**, 1–6; 10.1007/978-1-61779-108-6\_1 (2011).
256. Alina Möltgen. Aufbau einer Co-Kultur von humanen Herzfibroblasten und Herzmuskelzellen in einem geeigneten gelatinebasierten Hydrogel für die Rekonstruktion eines 3D-Gewebemodells des Herzmuskels. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie, 11/2022.
257. Kai, D., Prabhakaran, M. P., Jin, G. & Ramakrishna, S. Biocompatibility evaluation of electrically conductive nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **1**, 2305–2314; 10.1039/C3TB00151B (2013).
258. Reynolds, N. H., McEvoy, E., Panadero Pérez, J. A., Coleman, R. J. & McGarry, J. P. Influence of multi-axial dynamic constraint on cell alignment and contractility in engineered tissues. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **112**, 104024; 10.1016/j.jmbbm.2020.104024 (2020).
259. Vunjak Novakovic, G., Eschenhagen, T. & Mummery, C. Myocardial tissue engineering: in vitro models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **4**; 10.1101/cshperspect.a014076 (2014).
260. Clara Hüll. Charakterisierung von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) auf gelatinebasierten Hydrogelen für die Etablierung eines 3D-Gewebemodells des Herzens. Bachelorarbeit. Karlsruher Institut für Technologie, 2022.
261. Zhao, L. & Eghbali-Webb, M. Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* **1538**, 273–282; 10.1016/S0167-4889(01)00078-7 (2001).
262. Chen, X. *et al.* Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature. *Tissue engineering. Part A* **15**, 1363–1371; 10.1089/ten.tea.2008.0314 (2009).

263. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671–674; 10.1038/386671a0 (1997).
264. Promocell. Endothelial Cell Growth Medium-2 Manual.
265. Twardowski, R. L. & Black, L. D. Cardiac fibroblasts support endothelial cell proliferation and sprout formation but not the development of multicellular sprouts in a fibrin gel co-culture model. *Ann Biomed Eng* **42**, 1074–1084; 10.1007/s10439-014-0971-2 (2014).
266. Promocell. Myocyte Growth Medium Manual.
267. Sekine, H. *et al.* Endothelial cell coculture within tissue-engineered cardiomyocyte sheets enhances neovascularization and improves cardiac function of ischemic hearts. *Circulation* **118**, S145-52; 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757286 (2008).
268. Porter, K. E. & Turner, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & Therapeutics* **123**, 255–278; 10.1016/j.pharmthera.2009.05.002 (2009).
269. Brutsaert, D. L. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiological reviews* **83**, 59–115; 10.1152/physrev.00017.2002 (2003).
270. Sjöblom, B., Salmazo, A. & Djinović-Carugo, K. Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2688–2701; 10.1007/s00018-008-8080-8 (2008).
271. Shah, S. B. & Lieber, R. L. Simultaneous imaging and functional assessment of cytoskeletal protein connections in passively loaded single muscle cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **51**, 19–29; 10.1177/002215540305100104 (2003).
272. Lu, M. H. *et al.* The vinculin/sarcomeric-alpha-actinin/alpha-actin nexus in cultured cardiac myocytes. *J Cell Biol* **117**, 1007–1022; 10.1083/jcb.117.5.1007 (1992).
273. Tilling, T. *et al.* Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res* **310**, 19–29; 10.1007/s00441-002-0604-1 (2002).
274. Samarel, A. M. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **289**, H2291-301; 10.1152/ajpheart.00749.2005 (2005).
275. Saini, H., Navaei, A., van Putten, A. & Nikkhah, M. 3D cardiac microtissues encapsulated with the co-culture of cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. *Advanced Healthcare Materials* **4**, 1961–1971; 10.1002/adhm.201500331 (2015).
276. Lesman, A. *et al.* Transplantation of a tissue-engineered human vascularized cardiac muscle. *Tissue engineering. Part A* **16**, 115–125; 10.1089/ten.TEA.2009.0130 (2010).
277. Ravenscroft, S. M., Pointon, A., Williams, A. W., Cross, M. J. & Sidaway, J. E. Cardiac Non-myocyte Cells Show Enhanced Pharmacological Function Suggestive of Contractile

- Maturity in Stem Cell Derived Cardiomyocyte Microtissues. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **152**, 99–112; 10.1093/toxsci/kfw069 (2016).
278. Jones, E. A., Giannoudis, P. V. & Kouroupis, D. Bone repair with skeletal stem cells: rationale, progress to date and clinical application. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* **8**, 57–71; 10.1177/1759720X16642372 (2016).
279. Ribeiro, J. S. *et al.* Injectable MMP-Responsive Nanotube-Modified Gelatin Hydrogel for Dental Infection Ablation. *ACS Applied Materials & Interfaces* **12**, 16006–16017; 10.1021/acsami.9b22964 (2020).
280. Daly, A. C., Davidson, M. D. & Burdick, J. A. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nat Commun* **12**, 753; 10.1038/s41467-021-21029-2 (2021).
281. Anil Kumar, S. *et al.* A Visible Light-Cross-Linkable, Fibrin-Gelatin-Based Bioprinted Construct with Human Cardiomyocytes and Fibroblasts. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **5**, 4551–4563; 10.1021/acsbiomaterials.9b00505 (2019).
282. Pan, C., Kumar, C., Bohl, S., Klingmueller, U. & Mann, M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**, 443–450; 10.1074/mcp.M800258-MCP200 (2009).
283. Kartsogiannis, V. & Ng, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* **228**, 79–102; 10.1016/j.mce.2003.06.002 (2004).
284. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872; 10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
285. Pesce, M. & Schler, H. R. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 452–457; 10.1002/(SICI)1098-2795(200004)55:4<452::AID-MRD14>3.0.CO;2-S (2000).
286. Schöler, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K. & Gruss, P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**, 435–439; 10.1038/344435a0 (1990).
287. Avilion, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126–140; 10.1101/gad.224503 (2003).
288. Kaczynski, J., Cook, T. & Urrutia, R. Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology* **4**, 206; 10.1186/gb-2003-4-2-206 (2003).
289. Sabò, A. *et al.* Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature* **511**, 488–492; 10.1038/nature13537 (2014).
290. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**, 635–646; 10.1242/dev.02787 (2007).

291. Rony, I. K. *et al.* Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Proliferation* **48**, 140–156; 10.1111/cpr.12162 (2015).
292. Chapekar, M. S. Tissue engineering: Challenges and opportunities. *J. Biomed. Mater. Res.* **53**, 617–620; 10.1002/1097-4636(2000)53:6<617::aid-jbm1>3.0.co;2-c (2000).
293. Fuchs, J. R., Nasser, B. A. & Vacanti, J. P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of thoracic surgery* **72**, 577–591; 10.1016/s0003-4975(01)02820-x (2001).
294. Yamanaka, S. & Blau, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* **465**, 704–712; 10.1038/nature09229 (2010).
295. Sheridan, S. D., Surampudi, V. & Rao, R. R. Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells International* **2012**, 738910; 10.1155/2012/738910 (2012).
296. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology* **15**, 378–386; 10.1016/j.semcancer.2005.05.004 (2005).
297. Kleinman, H. K. *et al.* Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**, 6188–6193; 10.1021/bi00267a025 (1982).
298. Orkin, R. W. *et al.* A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* **145**, 204–220; 10.1084/jem.145.1.204 (1977).
299. Vukicevic, S. *et al.* Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental Cell Research* **202**, 1–8; 10.1016/0014-4827(92)90397-Q (1992).
300. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372–376; 10.1038/74199 (2000).
301. Saunders, A., Faiola, F. & Wang, J. Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells* **31**, 1227–1236; 10.1002/stem.1384 (2013).
302. Crowley, L. C., Marfell, B. J. & Waterhouse, N. J. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**, pdb.prot087205; 10.1101/pdb.prot087205 (2016).
303. Joutsijoki, H., Haponen, M., Rasku, J., Aalto-Setälä, K. & Juhola, M. Machine Learning Approach to Automated Quality Identification of Human Induced Pluripotent Stem Cell Colony Images. *Computational and Mathematical Methods in Medicine* **2016**, 3091039; 10.1155/2016/3091039 (2016).

304. Neubauer\*, J. C., Bur\*, S., Meiser\*, I., Kurtz, A. & Zimmermann, H. Naturwissenschaftliche Grundlagen im Kontext einer klinischen Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen. In *Die klinische Anwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen* (Springer, Berlin, Heidelberg 2020), pp. 19–127.
305. He, J.-Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A. & Kamp, T. J. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circulation research* **93**, 32–39; 10.1161/01.RES.0000080317.92718.99 (2003).
306. Kehat, I. *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **108**, 407–414; 10.1172/JCI12131 (2001).
307. Xu, C., Police, S., Rao, N. & Carpenter, M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation research* **91**, 501–508; 10.1161/01.res.0000035254.80718.91 (2002).
308. Laflamme, M. A. *et al.* Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* **25**, 1015–1024; 10.1038/nbt1327 (2007).
309. Paige, S. L. *et al.* Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PloS one* **5**, e11134; 10.1371/journal.pone.0011134 (2010).
310. Marvin, M. J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S. M. & Lassar, A. B. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes & Development* **15**, 316–327; 10.1101/gad.855501 (2001).
311. Mima, T., Ueno, H., Fischman, D. A., Williams, L. T. & Mikawa, T. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 467–471; 10.1073/pnas.92.2.467 (1995).
312. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. & Hogan, B. L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Development* **9**, 2105–2116; 10.1101/gad.9.17.2105 (1995).
313. Le, M. N. T., Takahi, M. & Ohnuma, K. Auto/paracrine factors and early Wnt inhibition promote cardiomyocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells at initial low cell density. *Sci Rep* **11**, 21426; 10.1038/s41598-021-00763-z (2021).
314. Yassa, M. E., Mansour, I. A., Sewelam, N. I., Hamza, H. & Gaafar, T. The impact of growth factors on human induced pluripotent stem cells differentiation into cardiomyocytes. *Life Sciences* **196**, 38–47; 10.1016/j.lfs.2018.01.009 (2018).
315. Jeziorowska, D., Korniat, A., Salem, J.-E., Fish, K. & Hulot, J.-S. Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy* **15**, 1399–1409; 10.1517/14712598.2015.1064109 (2015).

316. Karakikes, I. *et al.* Small molecule-mediated directed differentiation of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. *Stem cells translational medicine* **3**, 18–31; 10.5966/sctm.2013-0110 (2014).
317. Lian, X. *et al.* Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E1848-57; 10.1073/pnas.1200250109 (2012).
318. Ren, Y. *et al.* Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* **51**, 280–287; 10.1016/j.yjmcc.2011.04.012 (2011).
319. Shiba, Y. *et al.* Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* **538**, 388–391; 10.1038/nature19815 (2016).
320. Sung, T.-C. *et al.* Efficient differentiation of human ES and iPS cells into cardiomyocytes on biomaterials under xeno-free conditions. *Biomater. Sci.* **7**, 5467–5481; 10.1039/C9BM00817A (2019).
321. Donnelly, R. & Hillis, W. S. Cardiac troponin T. *The Lancet* **341**, 410–411; 10.1016/0140-6736(93)92996-7 (1993).
322. Mair, J., Dienstl, F. & Puschendorf, B. Cardiac troponin T in the diagnosis of myocardial injury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **29**, 31–57; 10.3109/10408369209105245 (1992).
323. Sehnert, A. J. *et al.* Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* **31**, 106–110; 10.1038/ng875 (2002).
324. Tucker, J. F. *et al.* Early diagnostic efficiency of cardiac troponin I and Troponin T for acute myocardial infarction. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine* **4**, 13–21; 10.1111/j.1553-2712.1997.tb03637.x (1997).
325. Becker, R., Leone, M. & Engel, F. B. Microtubule Organization in Striated Muscle Cells. *Cells* **9**, 1395; 10.3390/cells9061395 (2020).
326. Bhavsar, P. K., Brand, N. J., Yacoub, M. H. & Barton, P. J. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics* **35**, 11–23; 10.1006/geno.1996.0317 (1996).
327. Sheng, J.-J. & Jin, J.-P. TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure-function relationships. *Gene* **576**, 385–394; 10.1016/j.gene.2015.10.052 (2016).
328. Lam, C. K. *et al.* Identifying the Transcriptome Signatures of Calcium Channel Blockers in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circulation research* **125**, 212–222; 10.1161/CIRCRESAHA.118.314202 (2019).
329. Sarikhani, M. *et al.* Sustained Activation of AMPK Enhances Differentiation of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes via Sirtuin Activation. *Stem Cell Reports* **15**, 498–514; 10.1016/j.stemcr.2020.06.012 (2020).

330. Góes, M. E. A. Kinin B2-Receptor in human iPSC differentiation into cardiomyocytes. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; Universidade de São Paulo, 2018.
331. Gee, K. R. *et al.* Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell calcium* **27**, 97–106; 10.1054/ceca.1999.0095 (2000).
332. Martin, V. V., Beierlein, M., Morgan, J. L., Rothe, A. & Gee, K. R. Novel fluo-4 analogs for fluorescent calcium measurements. *Cell calcium* **36**, 509–514; 10.1016/j.ceca.2004.05.002 (2004).
333. Paredes, R. M., Etzler, J. C., Watts, L. T., Zheng, W. & Lechleiter, J. D. Chemical calcium indicators. *Methods (San Diego, Calif.)* **46**, 143–151; 10.1016/j.ymeth.2008.09.025 (2008).
334. Guatimosim, S., Guatimosim, C. & Song, L.-S. Imaging calcium sparks in cardiac myocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **689**, 205–214; 10.1007/978-1-60761-950-5\_12 (2011).
335. Tomal, W. & Ortyl, J. Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers* **12**, 1073; 10.3390/polym12051073 (2020).
336. Basara, G., Bahcecioglu, G., Ren, X. & Zorlutuna, P. An Experimental and Numerical Investigation of Cardiac Tissue-Patch Interrelation. *J Biomech Eng* **145**; 10.1115/1.4062736 (2023).
337. Zhang, F. *et al.* Design and fabrication of an integrated heart-on-a-chip platform for construction of cardiac tissue from human iPSC-derived cardiomyocytes and in situ evaluation of physiological function. *Biosensors & bioelectronics* **179**, 113080; 10.1016/j.bios.2021.113080 (2021).
338. Bracco Gartner, Thomas C. L. *et al.* Pirfenidone Has Anti-fibrotic Effects in a Tissue-Engineered Model of Human Cardiac Fibrosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 854314; 10.3389/fcvm.2022.854314 (2022).
339. Dunn, K. K. *et al.* Coculture of Endothelial Cells with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Reveals a Differentiation Stage-Specific Enhancement of Cardiomyocyte Maturation. *Biotechnology Journal* **14**, e1800725; 10.1002/biot.201800725 (2019).
340. Stevens, K. R. *et al.* Physiological function and transplantation of scaffold-free and vascularized human cardiac muscle tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 16568–16573; 10.1073/pnas.0908381106 (2009).
341. Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S. & Wang, J. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater. Sci.* **7**, 843–855; 10.1039/C8BM01246F (2019).
342. Akhtar, M. F., Hanif, M. & Ranjha, N. M. Methods of synthesis of hydrogels ... A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* **24**, 554–559; 10.1016/j.jsps.2015.03.022 (2016).

343. Morteza Bahram, Naimeh Mohseni & Mehdi Moghtader. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In *introductory Chapter. An Overview of Hydrogels*, edited by S. B. Majee (IntechOpen, [s.l.], 2016).
344. Wang, H. & Heilshorn, S. C. Adaptable hydrogel networks with reversible linkages for tissue engineering. *Advanced Materials* **27**, 3717–3736; 10.1002/adma.201501558 (2015).
345. Lee, J. H. Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res* **22**, 27; 10.1186/s40824-018-0138-6 (2018).
346. Liang, K., Bae, K. H. & Kurisawa, M. Recent advances in the design of injectable hydrogels for stem cell-based therapy. *J. Mater. Chem. B* **7**, 3775–3791; 10.1039/C9TB00485H (2019).
347. Chen, Q., Chen, H., Zhu, L. & Zheng, J. Fundamentals of double network hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **3**, 3654–3676; 10.1039/C5TB00123D (2015).
348. Gu, Z. *et al.* Double network hydrogel for tissue engineering. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **10**, e1520; 10.1002/wnan.1520 (2018).
349. Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. & Osada, Y. Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* **15**, 1155–1158; 10.1002/adma.200304907 (2003).
350. Haque, M. A., Kurokawa, T. & Gong, J. P. Super tough double network hydrogels and their application as biomaterials. *Polymer* **53**, 1805–1822; 10.1016/j.polymer.2012.03.013 (2012).
351. Nonoyama, T. & Gong, J. P. Double-network hydrogel and its potential biomedical application: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* **229**, 853–863; 10.1177/0954411915606935 (2015).
352. Dragan, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chemical Engineering Journal* **243**, 572–590; 10.1016/j.cej.2014.01.065 (2014).
353. Mortimer, D. A. Synthetic polyelectrolytes—A review. *Polym. Int.* **25**, 29–41; 10.1002/pi.4990250107 (1991).
354. Hunt, J. N. *et al.* Tunable, high modulus hydrogels driven by ionic coacervation. *Advanced Materials* **23**, 2327–2331; 10.1002/adma.201004230 (2011).
355. Ueki, T., Onoda, M., Tamate, R., Shibayama, M. & Yoshida, R. Self-oscillating AB diblock copolymer developed by post modification strategy. *Chaos* **25**, 64605; 10.1063/1.4921687 (2015).
356. Hunt, J. N. *et al.* Tunable, high modulus hydrogels driven by ionic coacervation. *Advanced Materials* **23**, 2327–2331; 10.1002/adma.201004230 (2011).
357. Krogstad, D. V. *et al.* Effects of Polymer and Salt Concentration on the Structure and Properties of Triblock Copolymer Coacervate Hydrogels. *Macromolecules* **46**, 1512–1518; 10.1021/ma302299r (2013).

358. Krogstad, D. V. *et al.* Structural Evolution of Polyelectrolyte Complex Core Micelles and Ordered-Phase Bulk Materials. *Argonne National Lab. (ANL), Argonne, IL (United States). Advanced Photon Source (APS)* **47**, 8026–8032; 10.1021/ma5017852 (2014).
359. Srivastava, S. *et al.* Gel phase formation in dilute triblock copolyelectrolyte complexes. *Nature Communications* **8**, 14131; 10.1038/ncomms14131 (2017).
360. Li, D., Göckler, T., Schepers, U. & Srivastava, S. Polyelectrolyte Complex-Covalent Interpenetrating Polymer Network Hydrogels. *Argonne National Lab. (ANL), Argonne, IL (United States). Advanced Photon Source (APS)* **55**, 4481–4491; 10.1021/acs.macromol.2c00590 (2022).
361. Kourti, D. *et al.* Photolithographically Patterned Cell-Repellent PEG-b-PTHPMA Diblock Copolymer for Guided Cell Adhesion and Growth. *Macromolecular bioscience* **23**, e2200301; 10.1002/mabi.202200301 (2023).
362. Bharti, S. K. & Roy, R. Quantitative <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **35**, 5–26; 10.1016/j.trac.2012.02.007 (2012).
363. Pauli, G. F., Gödecke, T., Jaki, B. U. & Lankin, D. C. Quantitative <sup>1</sup>H NMR. Development and potential of an analytical method: an update. *Journal of Natural Products* **75**, 834–851; 10.1021/np200993k (2012).
364. Yue, K. *et al.* Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials* **73**, 254–271; 10.1016/j.biomaterials.2015.08.045 (2015).
365. 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* **5**, 55; 10.3390/bioengineering5030055 (2018).
366. Tigner, T. J., Rajput, S., Gaharwar, A. K. & Alge, D. L. Comparison of Photo Cross Linkable Gelatin Derivatives and Initiators for Three-Dimensional Extrusion Bioprinting. *Biomacromolecules* **21**, 454–463; 10.1021/acs.biomac.9b01204 (2020).
367. Wu, T. *et al.* Three-dimensional bioprinting of artificial ovaries by an extrusion-based method using gelatin-methacryloyl bioink. *Climacteric* **25**, 170–178; 10.1080/13697137.2021.1921726 (2022).
368. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology* **12**, 697–715; 10.1146/annurev.cellbio.12.1.697 (1996).
369. Yang, F. *et al.* The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **26**, 5991–5998; 10.1016/j.biomaterials.2005.03.018 (2005).
370. Gockler, T. *et al.* *Polyelectrolyte Complex Hydrogel Scaffoldings Enable Extrusion-based 3D Bioprinting of Low-Viscosity Bioinks* (2023).
371. Paxton, N. *et al.* Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication* **9**, 44107; 10.1088/1758-5090/aa8dd8 (2017).

372. Schwab, A. *et al.* Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chemical reviews* **120**, 11028–11055; 10.1021/acs.chemrev.0c00084 (2020).
373. Chen, M. H. *et al.* Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **3**, 3146–3160; 10.1021/acsbiomaterials.7b00734 (2017).
374. Cooke, M. E. & Rosenzweig, D. H. The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL Bioeng.* **5**, 11502; 10.1063/5.0031475 (2021).
375. Hölzl, K. *et al.* Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 32002; 10.1088/1758-5090/8/3/032002 (2016).
376. Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536–5544; 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010).
377. van Vlierberghe, S., Dubruel, P. & Schacht, E. Effect of Cryogenic Treatment on the Rheological Properties of Gelatin Hydrogels. *JOURNAL OF BIOACTIVE AND COMPATIBLE POLYMERS* **25**, 498–512; 10.1177/0883911510377254 (2010).
378. Varchanis, S. *et al.* Transition between solid and liquid state of yield-stress fluids under purely extensional deformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 12611–12617; 10.1073/pnas.1922242117 (2020).
379. Guvendiren, M., Lu, H. D. & Burdick, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 260–272; 10.1039/C1SM06513K (2012).
380. Habib, M. A. & Khoda, B. Rheological Analysis of Bio-ink for 3D Bio-printing Processes. *Journal of Manufacturing Processes* **76**, 708–718; 10.1016/j.jmapro.2022.02.048 (2022).
381. Townsend, J. M., Beck, E. C., Gehrke, S. H., Berkland, C. J. & Detamore, M. S. Flow Behavior Prior to Crosslinking: The Need for Precursor Rheology for Placement of Hydrogels in Medical Applications and for 3D Bioprinting. *Progress in polymer science* **91**, 126–140; 10.1016/j.progpolymsci.2019.01.003 (2019).
382. Liu, W. *et al.* Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Advanced Healthcare Materials* **6**; 10.1002/adhm.201601451 (2017).
383. Robinson, S. & Durand-Smet, P. Combining tensile testing and microscopy to address a diverse range of questions. *Journal of Microscopy* **278**, 145–153; 10.1111/jmi.12863 (2020).
384. Li, J., Chen, M., Fan, X. & Zhou, H. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. *J Transl Med* **14**, 271; 10.1186/s12967-016-1028-0 (2016).
385. Cui, H., Nowicki, M., Fisher, J. P. & Zhang, L. G. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. *Advanced Healthcare Materials* **6**, 1601118; 10.1002/adhm.201601118 (2017).
386. Mota, C., Camarero-Espinosa, S., Baker, M. B., Wieringa, P. & Moroni, L. Bioprinting: From Tissue and Organ Development to in Vitro Models. *Chemical reviews* **120**, 10547–10607; 10.1021/acs.chemrev.9b00789 (2020).

387. Montazerian, H. *et al.* Stretchable and Bioadhesive Gelatin Methacryloyl-Based Hydrogels Enabled by in Situ Dopamine Polymerization. *ACS Applied Materials & Interfaces* **13**, 40290–40301; 10.1021/acsmi.1c10048 (2021).
388. Cazaux, J. Recent developments and new strategies in scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy* **217**, 16–35; 10.1111/j.0022-2720.2005.01414.x (2005).
389. Hoshino, K.-I., 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* **14**, 9693–9701; 10.1039/c8sm01854e (2018).
390. Lee, S., Tong, X. & Yang, F. Effects of the poly(ethylene glycol) hydrogel crosslinking mechanism on protein release. *Biomater. Sci.* **4**, 405–411; 10.1039/c5bm00256g (2016).
391. Begam, T., Nagpal, A. K. & Singhal, R. A comparative study of swelling properties of hydrogels based on poly(acrylamide-co-methyl methacrylate) containing physical and chemical crosslinks. *Journal of Applied Polymer Science* **89**, 779–786; 10.1002/app.12270 (2003).
392. Stucchi, S. *et al.* Squarate Cross-Linked Gelatin Hydrogels as Three-Dimensional Scaffolds for Biomedical Applications. *Langmuir* **37**, 14050–14058; 10.1021/acs.langmuir.1c02080 (2021).
393. Lou, X. & Chirila, T. V. Swelling behavior and mechanical properties of chemically cross-linked gelatin gels for biomedical use. *Journal of biomaterials applications* **14**, 184–191; 10.1177/088532829901400204 (1999).
394. 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* **14**, e0216776; 10.1371/journal.pone.0216776 (2019).
395. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. & Gräslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of biophysics (Hindawi Publishing Corporation : Online)* **2011**, 414729; 10.1155/2011/414729 (2011).
396. Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M. & Lima, M. C. P. de. Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* **3**, 961–993; 10.3390/ph3040961 (2010).
397. Jung, J. *et al.* A cell-repellent sulfonated PEG comb-like polymer for highly resolved cell micropatterns. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **19**, 161–173; 10.1163/156856208783432507 (2008).
398. Cui, X., Hartanto, Y. & Zhang, H. Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society, Interface* **14**; 10.1098/rsif.2016.0877 (2017).
399. Moriyama, K., Naito, S., Wakabayashi, R., Goto, M. & Kamiya, N. Enzymatically prepared redox-responsive hydrogels as potent matrices for hepatocellular carcinoma cell spheroid formation. *Biotechnology Journal* **11**, 1452–1460; 10.1002/biot.201600087 (2016).

400. Kozielski, K. L. *et al.* Nonresonant powering of injectable nanoelectrodes enables wireless deep brain stimulation in freely moving mice. *Science advances* **7**; 10.1126/sciadv.abc4189 (2021)