

# **Additive Fertigung von artifiziellen vaskulären Gewebemodellen mit Hilfe von 3D-Biodruckverfahren**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer  
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Sonja Leopold

aus

Freudenstadt

1. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers
2. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2023



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

Diese Arbeit wurde durch die Carl-Zeiss-Stiftung gefördert.

Prof. Dr. Andrea Hartwig danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche 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



*Meiner Familie*



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Tissue Engineering.....	2
1.1.1 Von der 2D-Zellkultur zum 3D-Gewebemodell .....	2
1.1.2 <i>Organ-on-a-chip</i> Systeme.....	3
1.1.3 Hydrogele als artifizielle extrazelluläre Matrix.....	4
1.2 3D-Biodruck.....	8
1.2.1 Extrusionsdruck .....	10
1.2.2 Xolographie .....	11
1.2.3 <i>Digital Light Processing</i> .....	12
1.3 Vaskularisierung .....	13
1.3.1 Vaskulogenese und Angiogenese .....	14
1.3.2 Vaskularisierung im <i>Tissue Engineering</i> .....	15
1.4 Pathologische Angiogenese .....	16
1.4.1 Tumorinduzierte Angiogenese .....	16
1.4.2 Angiogenese-Inhibitoren.....	17
2 Zielsetzung.....	19
3 Ergebnisse und Diskussion .....	21
3.1 Synthese und Charakterisierung der Hydrogelpolymere .....	21
3.1.1 GelMA .....	22
3.1.2 GelNB .....	24
3.1.3 Gels .....	26
3.1.4 Zusammensetzung und Polymerisation der Hydrogele .....	27
3.1.5 Gelatinebasierte Hydrogele in der Zellkultur .....	28
3.1.6 Gelatine-basierte Hydrogele als Biotinten .....	32
3.1.7 Kapitelzusammenfassung: Synthese und Charakterisierung der Hydrogelpolymere .....	42
3.2 Fabrikation der Hydrogelchips .....	43
3.2.1 Extrusionsbasierte Gefäßsysteme .....	43
3.2.2 Xolographie Chips.....	51
3.2.3 Kapitelzusammenfassung: Fabrikation der Hydrogelchips .....	53
3.3 Angiogenese der Endothelzellen.....	54
3.3.1 Angiogenese in der Sphäroidkultur.....	54
3.3.2 Sprouting in der 3D-Zellkultur .....	65
3.3.3 Sprouting in der 2,5D-Zellkultur.....	66

3.3.4	Gradientengele .....	69
3.3.5	Kapitelzusammenfassung: Angiogenese der Endothelzellen .....	70
3.4	Angiogenese im Chipsystem.....	71
3.4.1	Induktion der Angiogenese mit VEGF .....	71
3.4.2	Co-Kultur mit NHDF im Chip .....	76
3.4.3	Kapitelzusammenfassung: Angiogenese im Chipsystem .....	78
3.5	Tumormodell.....	79
3.5.1	Tumorsphäroide .....	79
3.5.2	Induktion der Angiogenese durch Tumorsphäroide .....	82
3.5.3	3D-Tumormodell im Hydrogelchip .....	86
3.5.4	Multikomponentendruck eines vaskulären Tumormodells.....	90
3.5.5	Kapitelzusammenfassung: Tumormodell .....	93
3.6	Wirkstoffscreening .....	94
3.6.1	Toxizität des Angiogenese-Inhibitors.....	94
3.6.2	<i>Sproutingassay</i> mit Angiogenese-Inhibitor.....	95
3.6.3	Wirkstoffscreening am Hydrogelchip .....	97
3.6.4	Kapitelzusammenfassung: Wirkstoffscreening.....	99
4	Fazit und Ausblick.....	101
5	Material und Methoden .....	103
5.1	Material .....	103
5.1.1	Zellen .....	103
5.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	103
5.1.3	Zusammengesetzte Medien und Puffer.....	105
5.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	106
5.1.5	Geräte .....	108
5.1.6	Software.....	109
5.2	Methoden.....	109
5.2.1	Synthesen der Hydrogelpolymere .....	109
5.2.2	Charakterisierung der Photopolymere .....	111
5.2.3	Hydrogele.....	111
5.2.4	3D-Druck .....	112
5.2.5	Fabrikation der hydrogelbasierten Chipsysteme .....	113
5.2.6	Allgemeine Zellkultur .....	115
5.2.7	Gewebemodelle.....	119
5.2.8	Besiedeln der Chips.....	121
5.2.9	Tumormodelle .....	124
5.2.10	Wirkstoffscreening.....	125

6	Abkürzungsverzeichnis.....	127
7	Literaturverzeichnis.....	129
8	Anhang .....	155



## Zusammenfassung

Die Terminologie *personalisierte Medizin* beschreibt einen immer populärer werdenden Therapieansatz. Erstmals 1999 erwähnt, beschreibt das Konzept, dass aufgrund der genetischen und epigenetischen Disposition des Patienten und der damit verbundenen unterschiedlichen Expression von Genfunktionen nicht jeder Wirkstoff in jedem Patienten die gleiche Dosis-Wirkungsbeziehung zeigt. Aus diesem Grund sollen bei der Diagnose weitere Faktoren berücksichtigt werden, wie das Lebensumfeld, die Krankheitsgeschichte und die Genetik des Patienten. Dadurch können individuellere Therapieansätze erstellt werden, welche nicht nur die Heilungschancen verbessern, sondern auch Nebenwirkungen einschränken. Zu Evaluierung der effektivsten Therapie können artifizielle Gewebe- und Organmodelle zum Einsatz kommen. Dabei werden patientenspezifische Zellen entnommen und in einer geeigneten Stützmatrix zu einem Gewebemodell differenziert. Mit der Rekonstruktion solcher Gewebemodelle befasst sich das Forschungsfeld des *Tissue Engineerings*. Insbesondere die Entwicklung geeigneter Materialien für diese Gewebemodelle steht dabei im Vordergrund, da sie für die Kultivierung der Zellen zum einen biokompatibel sein und zum anderen als Stützmatrix entsprechende physikalische Eigenschaften besitzen müssen.

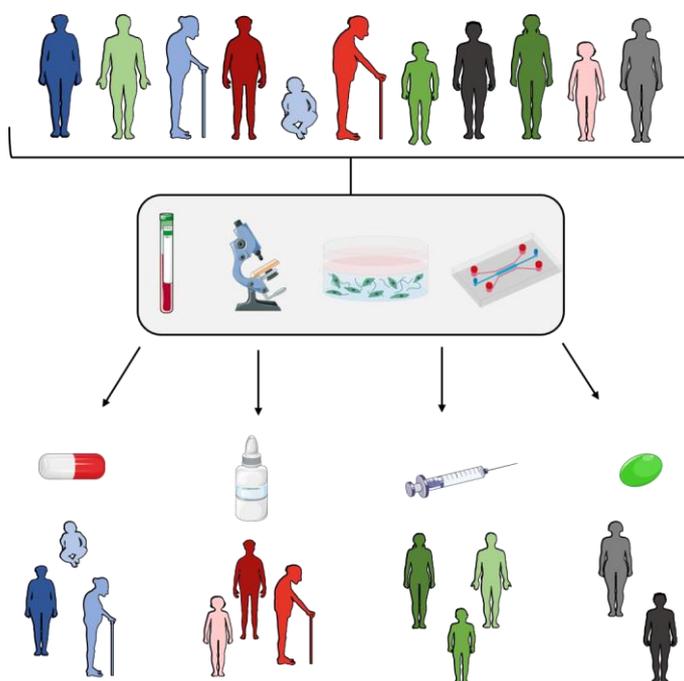
Im Arbeitskreis Schepers (IFG, KIT) wurden gelatinebasierte Hydrogele entwickelt, welche durch chemische Modifikation dazu in der Lage sind, kovalente Netzwerke auszubilden. Durch ihre viskoelastischen Eigenschaften und ihr scherverdünnendes Verhalten eignen sich die Hydrogele zudem für additive Fertigungsverfahren. So können komplexere strukturelle Einheiten in den Gewebemodellen gefertigt werden, wie hohle Kanalstrukturen, die als artifizielle Blutgefäße fungieren. Basierend auf den modifizierten Hydrogelpolymeren wurde ein solches *Organ-on-a-chip* System durch den Einsatz von extrusionsbasiertem und volumetrischem 3D-Biodruck entwickelt. Mittels der Besiedlung der Kanalstrukturen mit humanen Nabelschnurendothelzellen (engl.: *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) konnte zudem das Endothel nachgebildet werden, welches *in-vivo* das Innere der Blutgefäße auskleidet. Durch die Herstellung von einfachen und verzweigten Kanalstrukturen wurde das Diffusionsverhalten in den Gewebemodellen untersucht, wobei dieses sich in verzweigten Strukturen als effizienter erwies. Das entspricht den Gegebenheiten *in-vivo*, wo ein weit gefächertes Kapillarsystem für die Nährstoffverteilung verantwortlich ist. Aufgrund der limitierten Druckauflösung der verwendeten 3D-Biodruckverfahren konnten diese Mikrostrukturen jedoch nicht additiv gefertigt werden. Im lebenden Organismus verzweigen sich Blutgefäße über den Prozess der Angiogenese, welche die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden beschreibt. Mit Hilfe des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl.: *vascular endothelial growth factor*, VEGF) und des Fibroblastenwachstumsfaktors (engl.: *fibroblast growth factor*, FGF) konnte die Angiogenese erfolgreich in den Chipmodellen etabliert werden. Um die Anwendungsmöglichkeiten zu demonstrieren, wurde das Chipmodell zu einem Krankheitsmodell erweitert. Dabei konnte durch den Einsatz von Tumoroiden die pathologische Angiogenese in Zusammenhang mit Krebserkrankungen dargestellt werden.

Im Zuge dieser Arbeit wurde erfolgreich die additive Fertigung eines *Organ-on-a-Chip* Systems auf Basis von Hydrogelen etabliert. Dieses innovative System ermöglichte die Nachbildung der vaskulären Feinstruktur durch die Angiogenese der integrierten Endothelzellen. Darüber hinaus wurde das Potenzial dieses Modells für die Entwicklung eines Krankheitsmodells erforscht und es ergaben sich vielversprechende Möglichkeiten für den Einsatz in der personalisierten Medizin.



# 1 Einleitung

1999 wurde im *The Wallstreet Journal* ein Artikel veröffentlicht, welcher zum ersten Mal die Terminologie *personalisierte Medizin* verwendete.<sup>1,2</sup> Beschrieben wird dabei ein Behandlungsansatz, der nicht eine allgemeine Therapie für eine bestimmte Krankheit vorschlägt, sondern der sich vielmehr an den individuellen Gegebenheiten des Patienten orientiert. Dabei kann unter Berücksichtigung von zusätzlichen Informationen über die Krankenvorgeschichte, das Lebensumfeld oder auch die Genetik des Patienten ein Therapieansatz gewählt werden, welcher individuell abgestimmt ist.<sup>3</sup> Somit soll die Behandlung gezielter erfolgen, die Heilungschancen verbessert und Nebenwirkungen verringert werden.<sup>4</sup> Die Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Idee der personalisierten Medizin.



**Abbildung 1: Prinzip der personalisierten Medizin.** Durch personenbezogene Diagnostik können personalisierte Therapieansätze entworfen werden. Dadurch kann die Behandlung der Patienten gezielt erfolgen, wodurch die Heilungschancen erhöht und Nebenwirkungen verringert werden. Modifiziert nach dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ).<sup>5</sup> Zu Teilen erstellt mit smart.servier.com

Mit dem stetigen Fortschritt in der Biotechnologie und der regenerativen Medizin werden immer mehr Methoden und Techniken für eine personalisierte Diagnostik und Therapie entwickelt. Zu diesen zählen beispielsweise individuelle Gewebemodelle, welche zur Evaluierung der effizientesten Therapie eingesetzt werden können. Dazu werden dem Patienten Gewebeproben entnommen, welche *in-vitro* in geeigneten, dreidimensionalen Gerüststrukturen zu Gewebe kultiviert werden.<sup>6</sup> Besonders gut eignen sich dafür Stammzellen, insbesondere sogenannte *induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs). iPSCs sind Zellen, die zum Beispiel aus der Haut entnommen und so reprogrammiert werden können, dass sie sich in einem pluripotenten Zustand befinden, um sich erneut zu differenzieren.<sup>7,8</sup> Dieses Prinzip erlaubt die Herstellung von personalisierten Gewebemodelle, in denen anschließend Krankheitsbilder dargestellt und Wirkstoffe evaluiert werden können.<sup>9</sup>

Die dreidimensionale Kultivierung von iPSCs eignet sich auch für die Herstellung von artifiziellen, transplantierbaren Organen. Diese Methode bringt den entscheidenden Vorteil mit sich, dass durch die Verwendung der patienteneigenen Zellen die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion durch den Empfänger minimiert wird, da durch die Transplantation der körpereigenen Zellen die Immunantwort ausbleibt.<sup>10,11</sup> Obendrein bietet sich so eine Lösung für die immer größer werdende Organknappheit an.<sup>12,13</sup> Mit der Entwicklung und Herstellung solcher Modelle und artifizieller Organe beschäftigt sich der Bereich des *Tissue Engineerings*.<sup>14</sup>

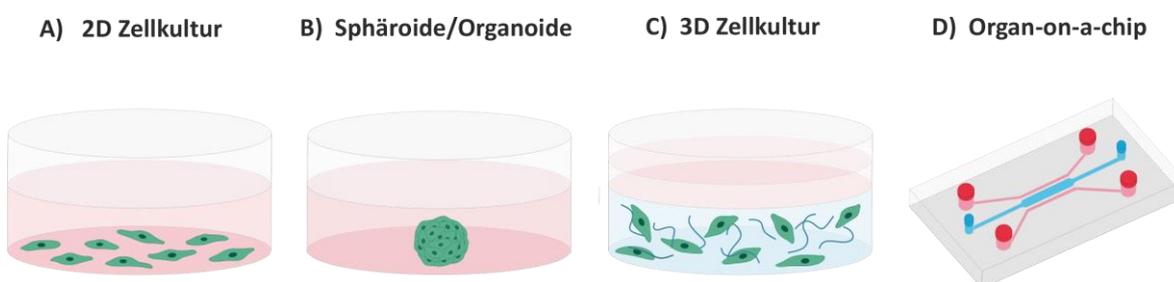
### 1.1 Tissue Engineering

Das *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet aus den Bereichen der Zellbiologie sowie den Material- und Ingenieurwissenschaften. Im Vordergrund steht dabei die Entwicklung geeigneter Kultivierungsmethoden und Materialien für die Herstellung artifizieller Gewebe.<sup>15</sup> Die grundlegende Idee des Tissue Engineerings besteht darin, Zellen auf oder in biokompatiblen Gerüststrukturen anzusiedeln, um die *in-vivo* gegebene Dreidimensionalität der Gewebe nachzustellen.<sup>16</sup>

#### 1.1.1 Von der 2D-Zellkultur zum 3D-Gewebemodell

Die zweidimensionale (2D) Zellkultur wurde Anfang der 1900er-Jahre von Ross Harrison entwickelt, um das Wachstum und die Entwicklung von Nervenfasern zu untersuchen.<sup>17-19</sup> Aufgrund ihrer einfachen Handhabung, Kosteneffizienz, hohen Reproduzierbarkeit und der Kompatibilität der Methode mit einer Vielzahl von Zellarten war diese lange Zeit Standard in der Forschung und Wirkstoffentwicklung.<sup>19</sup> Da die Zellen in der 2D-Zellkultur planar als Zellschicht kultiviert werden, fehlen ihnen jedoch die Einflüsse der dreidimensionalen (3D) Umgebung, in der sie *in-vivo* eigentlich wachsen (Abbildung 2 A).<sup>20</sup> Durch die gegebene Planarität sind die Zellen nicht in der Lage zur Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation, welche wiederum essenziell für ihre Differenzierung, Migration und Proliferation sind.<sup>21,22</sup> Auch wachsen die meisten 2D-Zellkulturen auf Plastik- oder Glasmaterialien, die durch ihre Steifigkeit ebenfalls die mechanischen Eigenschaften solcher Zellkulturen beeinflussen. Viele dieser Faktoren limitieren daher auch die Erstellung von Co-Kulturen mit verschiedenen Zellen sowie die Kultivierung von vielen Primärzellen. Daher steigen seit einigen Jahren die Forschungsaktivitäten im Bereich der dreidimensionalen Zellkulturen zunehmend an.<sup>20</sup> Dreidimensionale Zellkulturmodelle erlauben durch ihren Gewebecharakter und die dreidimensionale Mikroumgebung viele dieser Faktoren und Eigenschaften zu adressieren.<sup>19,23,24</sup> Dabei werden verschiedene Arten von 3D-Zellkulturen unterschieden: die gerüstfreien und die matrixgestützten 3D-Zellkulturen.<sup>20</sup> Zu den gerüstfreien Kulturen zählen zum Beispiel 3D-Zellaggregate, sogenannte Sphäroide und Organoide, welche wichtige extrazelluläre Matrixproteine selbstständig herstellen und daher keine Gerüststruktur benötigen (Abbildung 2 B).<sup>25-28</sup> Für die Generierung solcher Sphäroide und Organoide werden nicht-adhäsive Oberflächen verwendet, welche die Aggregation von Zellen zu Sphäroiden fördern.<sup>29-32</sup> Sphäroide und Organoide eignen sich insbesondere für die *in-vitro* Modellierung von Tumoren, da sie deren wichtigste Eigenschaften abbilden. Dazu gehören die zelluläre Heterogenität, Zell-Zell-Kommunikation, interne Struktur, Zell-Matrix-Interaktionen, Wachstumskinetik sowie Genexpression und Medikamentenresistenzen.<sup>20</sup> Matrixgestützte 3D-Zellkulturen verwenden hingegen biologisch kompatible Materialien, welche die natürliche extrazelluläre Matrix (EZM) imitieren (Abbildung 2 C). Sie ermöglichen die Zellproliferation und Migration sowie Zell-Matrix-

Interaktionen, wodurch sich auch *in-vitro* gewebeähnliche Strukturen ausbilden können.<sup>33</sup> Diese Komplexität wird nur von sogenannten *Organ-on-a-chip* Systemen übertroffen (Abbildung 2 D). Dabei handelt es sich um mikrofluidische Plattformen, welche die Mikroumgebung der Gewebe nachbilden sowie die Strukturierung und mechanische Kontrolle der Zellen ermöglichen.<sup>34</sup>



**Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Kultivierungsmethoden mit zunehmender Komplexität.** **A)** Zweidimensionale Kultivierung von Zellen auf planaren, zelladhäsiven Oberflächen. **B)** Sphäroid-/Organoidkultivierung für komplexere Zellstrukturen. **C)** Matrixgestützte 3D-Zellkultur in einer biokompatiblen Gerüststruktur. **D)** Vaskuläres *Organ-on-a-chip* System für komplexere *in-vitro* Versuche.

### 1.1.2 *Organ-on-a-chip* Systeme

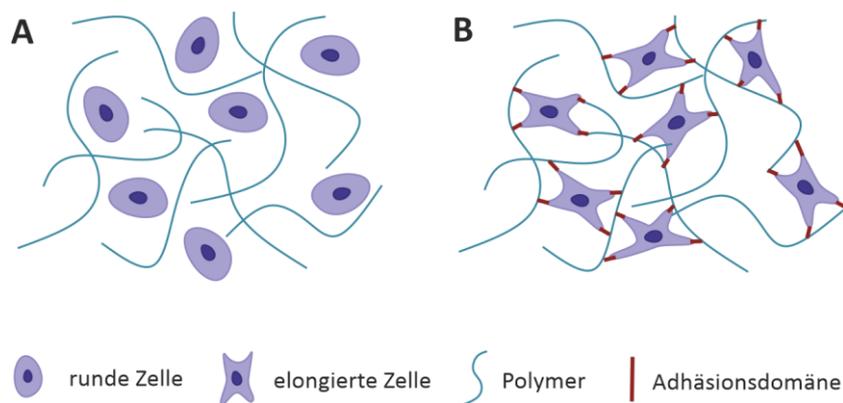
*Organ-on-a-chip* Plattformen sind dynamische, mikrofluidische Systeme, welche kleine funktionale Organ- oder Gewebeeinheiten nachbilden.<sup>35</sup> Unter anderem sind sie dazu in der Lage, Grenzflächen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie räumlich und zeitlich variierende biochemische Faktoren wie Gradienten abzubilden.<sup>36,37</sup> Die *Organ-on-a-chip* Plattformen bestehen dabei aus zwei unterschiedlichen Kompartimenten: einer 3D-Zellkultur und einem mikrofluidischen System, meist in Form von Kanalstrukturen.<sup>38,39</sup> Häufig sind das Kompartiment für die 3D-Geweberekonstruktion und die Kanalstruktur durch eine poröse Membran räumlich voneinander getrennt.<sup>40</sup> Über den mikrofluidischen Kanal werden die Zellen im Gewebe mit Nährstoffen und Gasen versorgt. Durch den Anschluss an ein mikrofluidisches Pumpensystem kann zudem ein artifizierender Blutfluss angelegt werden, über welchen beispielsweise auch Wirkstoffe in das 3D-Gewebemodell transportiert werden können.<sup>41–43</sup> Aus diesem Grund finden *Organ-on-a-chip* Systeme immer häufiger Anwendung in der Wirkstoffentwicklung und besitzen dort das Potenzial sich langfristig als Alternative zu Tierversuchen durchzusetzen.<sup>36,37,44</sup> Durch die Vaskularisierung können außerdem auch größere Gewebestrukturen ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden.<sup>45</sup> Beispielsweise konnten mit Hilfe der *Organ-on-a-chip* Technologie bereits erfolgreich Modelle der Lunge, Haut, Niere, dem Herz sowie der Blut-Hirn-Schranke etabliert werden.<sup>46–55</sup> Zudem bieten solche mikrofluidischen Systeme die Flexibilität, die Modelle zu erweitern, beispielsweise durch den Zusammenschluss mehrerer Organeinheiten an eine gemeinsame Fluidik. Dadurch können die Abhängigkeiten der Organe voneinander untersucht werden oder welche Nebenwirkungen bestimmte Wirkstoffe im umliegenden Gewebe verursachen.<sup>56,57</sup> Das macht sie wiederum besonders interessant für die personalisierte Medizin. Ein Krankheitsmodell des Patienten wird *in-vitro* auf dem Chip dargestellt und dazu verwendet, eine effiziente und gezielte Therapie zu entwickeln.<sup>58</sup>

Einer der limitierenden Faktoren bei der Chipherstellung ist zum derzeitigen Standpunkt der Forschung die Entwicklung von geeigneten Materialien.<sup>59</sup> Eine Vielzahl der fluidischen Chips sind aus steifen Kunststoffmaterialien aufgebaut und verwenden poröse Hartmaterialien für die mikrofluidischen Kanäle.<sup>60–63</sup> Viele Gewebe benötigen jedoch eine weichere Umgebung. Gerade Blutgefäße besitzen *in-vivo* eine gewisse Flexibilität, um sich beispielsweise an

Blutdruckschwankungen anpassen zu können.<sup>64,65</sup> Daher werden biokompatible Materialien benötigt, welche sich an die Eigenschaften von unterschiedlichen Geweben adaptieren können.

### 1.1.3 Hydrogele als artifizielle extrazelluläre Matrix

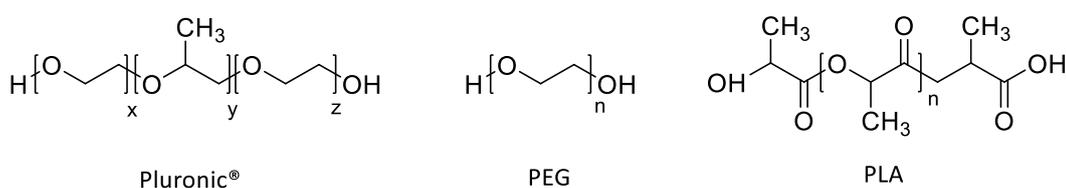
Zellen sekretieren in ihrer natürlichen Umgebung eine Vielzahl an Proteinen und Proteoglykanen, aus denen eine einzigartige und organ- beziehungsweise gewebespezifische Umgebung, die EZM, gebildet wird.<sup>66,67</sup> Die native EZM ist *in-vivo* für eine Vielzahl von Aufgaben verantwortlich. Zum einen stellt sie die dreidimensionale Matrix für die Strukturierung der Zellen dar, zum anderen ist sie an biochemischen Signalwegen beteiligt und kontrolliert die Gewebefunktionen.<sup>68</sup> Durch ihre Stützfunktion ermöglicht sie den Zellen die Aufhängung im dreidimensionalen Raum über sogenannte Adhäsionsdomänen. Zudem steuert sie auch die Differenzierung sowie Migration der Zellen und somit auch die Plastizität der Organe und Gewebe. Weitergehend bestimmt die genaue Zusammensetzung der EZM ihre mechanischen Eigenschaften.<sup>69–73</sup> Sowohl für die Herstellung der matrixgestützten 3D-Zellkulturen, als auch für die *Organ-on-a-chip* Systeme werden daher Materialien benötigt, welche die EZM in ihren Eigenschaften möglichst naturgetreu nachbilden können. Zunächst bedeutet das für die artifizielle Matrix, dass sie bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften besitzen muss, um ihrer Aufgabe als Stützmatrix gerecht zu werden.<sup>74</sup> Zeitgleich müssen die 3D-Gerüste biologisch abbaubar sein, da sich die EZM im ständigen Umbau befindet, wodurch auch die Zellmigration ermöglicht wird.<sup>75</sup> Insbesondere müssen die Materialien und auch ihre Neben- sowie Abbauprodukte biokompatibel sein, um die Zell-Zell-Interaktion, Proliferation und Differenzierung der Zellen zu gewährleisten.<sup>76,77</sup> Damit die Zellen überhaupt in der Matrix anwachsen, benötigen die Materialien biologisch aktive Bindungssequenzen wie Adhäsionsdomänen (Abbildung 3). Ohne diese Adhäsionspunkte können die Zellen nicht ihre natürliche Morphologie erreichen, wodurch sie viele ihrer Funktionen verlieren.<sup>78</sup> Für die Nährstoff- und Gasversorgung des artifiziellen Gewebes eignen sich außerdem Materialien, die große Mengen an Flüssigkeiten aufnehmen und über einen längeren Zeitraum speichern können.<sup>79,80</sup>



**Abbildung 3: Zelladhäsion in Hydrogelen ohne und mit biologischen Motiven. A:** Zellen in Hydrogelen ohne Adhäsionsdomänen weisen eine runde Morphologie auf. **B:** Zellen in Hydrogelen mit Adhäsionsdomänen zeigen eine elongierte Morphologie.

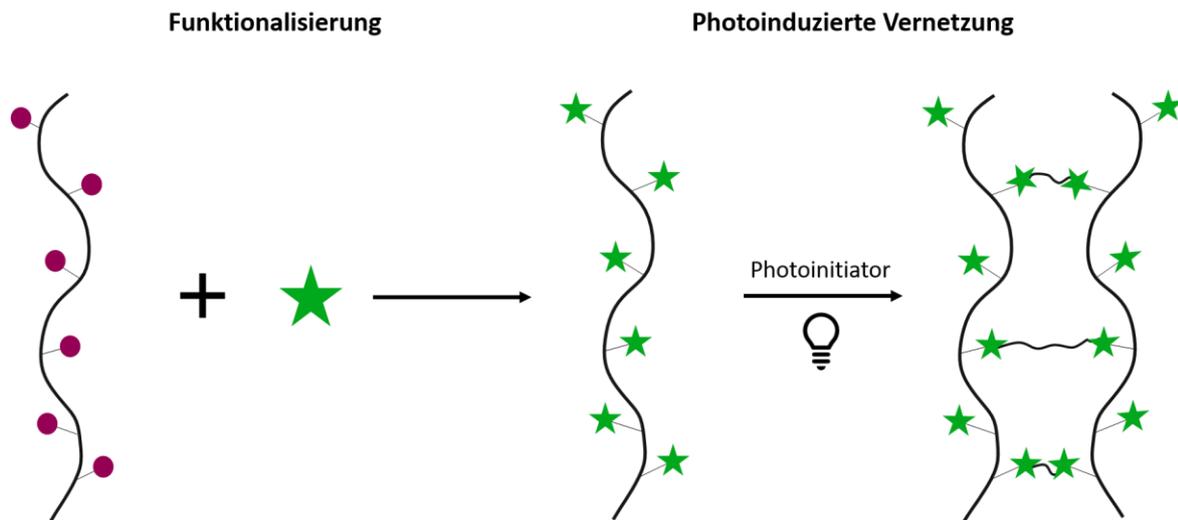
In den letzten Jahren wurden viele Materialien als EZM-Ersatz für die Rekonstruktion von 3D-Geweben untersucht. Eine bestimmte Klasse von Polymeren erfüllt viele dieser Eigenschaften. Hydrogele sind wasserunlösliche Polymere, welche nach ihrer Vernetzung poröse, dreidimensionale Netzwerke ausbilden, die ein Vielfaches ihres Eigengewichts an Flüssigkeit speichern können. Sie sind permeabel für Nährstoffe, Gase und wasserlösliche Metabolite.<sup>81–85</sup> In

der Medizin und Biotechnologie werden Hydrogele aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität bereits für Wundauflagen, Kontaktlinsen und Biosensoren verwendet.<sup>86-92</sup> Grundsätzlich werden drei Arten von Hydrogelen unterschieden: natürliche, synthetische und semi-synthetische.<sup>93-95</sup> Zu den natürlichen Hydrogelen zählen Polysaccharide wie Hyaluronsäure oder Alginat, Proteine wie Kollagen oder Gelatine sowie dezellularisierte EZM. Alle diese Substanzen sind biologisch kompatibel, abbaubar, besitzen eine Vielzahl von biologisch aktiven Sequenzen und ermöglichen die Proliferation, Interaktion und Migration der Zellen in 3D. Jedoch verfügen sie häufig über eine geringe mechanische Stabilität.<sup>96-100</sup> Synthetische Hydrogele hingegen, wie Pluronic®, Polyethylenglykol (PEG) oder Poly-Milchsäure (PLA) verfügen über die physikalischen Eigenschaften, um die benötigte mechanische Stabilität zu gewährleisten (Abbildung 4).<sup>93</sup> Allerdings besitzen sie keinerlei biologische Motive, wodurch sie über keine oder nur eine geringe Biokompatibilität verfügen. Des Weiteren sind viele ihrer Abbauprodukte zytotoxisch.<sup>79</sup>



**Abbildung 4: Synthetische Hydrogelpolymere.** Von links nach rechts sind die Strukturformeln der synthetischen Hydrogelpolymere Pluronic, Polyethylenglykol (PEG) und Poly-Milchsäure (PLA) abgebildet.

Somit besitzen biologische und synthetische Hydrogele komplementäre Eigenschaften. Aus diesem Grundgedanken heraus entstanden die semi-synthetischen Hydrogele, die beide Eigenschaften, nämlich eine chemische Monodispersität und eine biologische Funktion, miteinander vereinen.<sup>94,95,101</sup> Ihr Grundgerüst besteht aus einem biologischen Polymer, wodurch sie meist biokompatibel sind, da sie verschiedene zellbindende Sequenzen aufweisen. Als solche Grundgerüste haben sich bereits Polymere wie Kollagen oder Gelatine etabliert.<sup>101</sup> Um die mechanischen Eigenschaften der biologischen Polymere zu verbessern, können sie mit funktionellen Gruppen modifiziert werden.<sup>102,103</sup> Funktionalisierungen von natürlichen Polymeren können entweder dazu führen, dass die physikalischen Eigenschaften der Polymere zur Selbstassemblierung verstärkt werden oder sie über diese Modifikationen kovalent vernetzt werden können.<sup>89-92</sup> Letzteres führt zur Ausbildung stabilerer Strukturen. Eine Gruppe von funktionellen Modifikationen hat sich in den letzten Jahren als besonders geeignet für die Verwendung im Tissue Engineering erwiesen: die photosensitiven, beziehungsweise photoresponsiven Gruppen.<sup>93-95</sup> Über diese können natürliche Polymere über photochemische Reaktionen miteinander vernetzt werden.<sup>104-107</sup> Der Vorgang der Funktionalisierung bis hin zur kovalenten Vernetzung der Polymere ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.



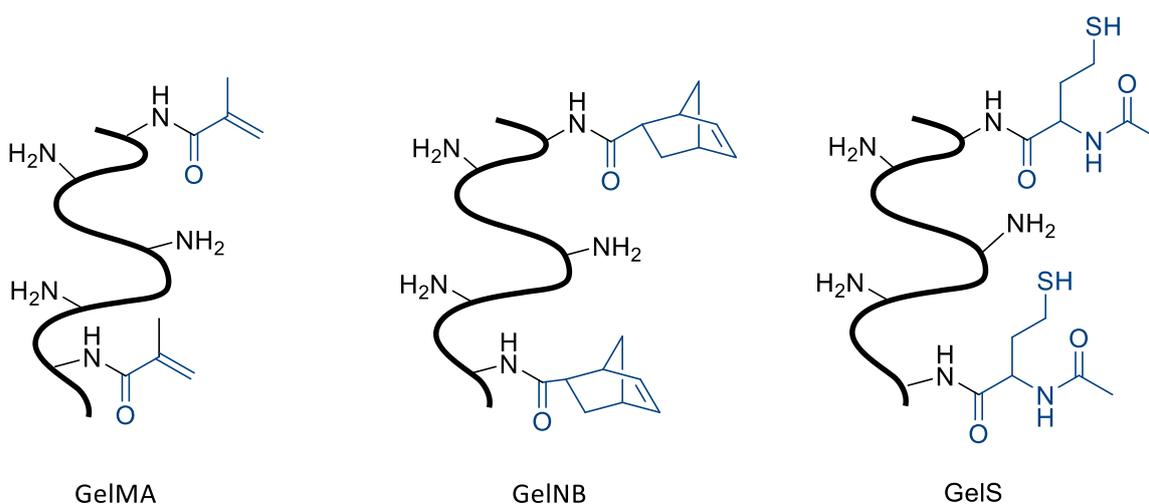
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionalisierung und der photoinduzierten Vernetzung von Hydrogelen.** Zunächst werden biologische Polymere mit photoreaktiven Gruppen modifiziert, bevor sie in Anwesenheit eines Photoinitiators durch die Anregung mit einer geeigneten Wellenlänge vernetzt werden.

Bei der Funktionalisierung der biologischen Polymere kann dabei über die Anzahl der funktionellen Gruppen reguliert werden, wie viele Bindungen nach der Vernetzung zwischen den Polymeren entstehen. Bei einer niedrigeren Anzahl funktioneller Gruppen an den Polymeren entstehen weichere Hydrogelnetzwerke mit größeren Poren, wohingegen eine höhere Funktionalisierung die Poren verkleinert und die Gele stabilisiert. Dies erlaubt das Design von gewebespezifischen Hydrogelen.<sup>108,109</sup> Da zum Beispiel Leber- und Nierengewebe deutlich weicher als Knochen sind, wird eine solche Anpassungsfähigkeit der extrazellulären Matrix benötigt, um die Funktionalität der Gewebe zu gewährleisten.<sup>110,111</sup>

### 1.1.3.1 Gelatinebasierte Hydrogele

Wie bereits oben erwähnt, ist die Gelatine ein weitläufig genutztes Biopolymer im Bereich des *Tissue Engineerings*. Gelatine wird durch die partielle Hydrolyse aus Kollagen gewonnen, welches vorwiegend im Bindegewebe vorkommt.<sup>112,113</sup> Sie ist wasserlöslich und kann das Fünf- bis Zehnfache ihres Gewichts an Wasser speichern.<sup>114</sup> Durch proteaseaktive Schnittstellen in ihrer Proteinstruktur ist sie zudem biologisch abbaubar und erzeugt dabei keine zytotoxischen Abbauprodukte. Für die Anwendung in der Biologie oder im medizinischen Bereich wird die Gelatine häufig aus der Haut oder den Knochen von Rindern oder Schweinen gewonnen, da sich ihre Polypeptidstrukturen kaum von denen der humanen Gelatine unterscheiden.<sup>115,116</sup> Je nach Hydrolyseverfahren wird sie zudem in Typ A (saure Hydrolyse) oder Typ B (basische Hydrolyse) eingeteilt.<sup>117</sup> Eine besondere Eigenschaft der Gelatine, die sie für den Bereich des *Tissue Engineerings* interessant macht, ist ihr Gelierverhalten. Bei unter 24 °C bilden sich durch die Tertiärstruktur der Gelatine partielle Tripelhelices aus, wodurch es zur Erstarrung des Materials (Gelieren) kommt.<sup>118</sup> Da diese Tertiärstruktur bei 37 °C jedoch nicht aufrechterhalten werden kann, ist die reine Gelatine für 3D-Zellkulturen ungeeignet, deren Kultivierung bei dieser physiologischen Temperatur erfolgt. Um die thermische Stabilität zu verbessern, kann Gelatine wie zuvor beschrieben mit funktionellen Gruppen modifiziert werden, die eine photochemische Vernetzung der Polymere ermöglichen.<sup>118</sup> Als Goldstandard unter den gelatinebasierten, semi-synthetischen Hydrogelen hat sich dabei GelMA etabliert (Abbildung 6).<sup>119</sup> Durch die Methacrylierung der Gelatine an den endständigen Aminogruppen der Lysinseitenketten entsteht ein Polymer, welches unter

Anwesenheit eines Photoinitiators über eine radikalische Kettenreaktion vernetzt werden kann.<sup>109</sup> Dabei gewinnt Gelatine abhängig vom Vernetzungsgrad an mechanischer und thermischer Stabilität und behält aufgrund des Gelatinerückgrats seine Biokompatibilität. Während der Vernetzung durch die radikalische Kettenreaktion entstehen jedoch frei Radikale, welche sich negativ auf die Zellen auswirken können. Aus diesem Grund suchten Göckler et al. nach einer alternativen Vernetzungsreaktion, wofür die Gelatine mit Norbornengruppen zu GelNB modifiziert wurde (Abbildung 6).<sup>120</sup> Über diese ist die Gelatine in der Lage, nach Zugabe eines Photoinitiators und einem Thiol, sich mit diesem über eine Thiol-en Reaktion zu vernetzen. Thiol-en Reaktionen sind stufenweise Radikalpolymerisationen, welche zwischen einem Thiol und Alken beziehungsweise Alkin (Thiol-in) ablaufen. Diese Reaktionen gehören zur Klasse der bioorthogonalen Click-Reaktionen, welche breite Anwendung im Bereich der Wirkstoff- und Materialentwicklung sowie Biokonjugation finden.<sup>121–128</sup> Unter den Click-Reaktionen nehmen die Thiol-en und Thiol-in Reaktionen aufgrund ihrer Bioorthogonalität und Biokompatibilität eine besondere Stellung ein.<sup>129</sup> Zudem kommt es durch die stufenweise Radikalpolymerisation zu einer geringeren Radikalbildung, wodurch sich die Biokompatibilität der Reaktion noch erhöht.<sup>120,130,131</sup> Als Äquivalent zu GelNB existiert das GelS, ein thioliertes Hydrogelpolymer (Abbildung 6). Durch die Funktionalisierung der endständigen Aminogruppen der Gelatine mit einem Thiolacton entsteht ein Photopolymer, welches ebenfalls über eine Thiol-en oder auch eine Thiol-in Reaktion polymerisiert werden kann.<sup>103</sup>



**Abbildung 6: Semi-synthetische gelatinebasierte Hydrogele.** Von links nach rechts sind die Strukturformeln der semi-synthetischen Hydrogele GelMA, GelNB und GelS abgebildet. Die funktionellen Gruppen Methacrylat, Norbornen und Thiolacton sind jeweils in Blau dargestellt.

Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und der Tatsache, dass Thiol-en/Thiol-in Reaktionen auch in wässriger Umgebung durchgeführt werden können, finden sie auch immer häufiger Anwendung bei der Herstellung von Zellkultur-Matrices.<sup>132–136</sup> Azagarsamy et al. beispielsweise vernetzten vier-armiges Norbornen-funktionalisiertes Polyethylenglykol mit abbaubaren Dicysteinpeptiden.<sup>137</sup> Auch Tetrazin-Norbornen oder Thiol-Acrylat funktionalisierte Hydrogele wurden bereits in der Zellkultur eingesetzt.<sup>138,139</sup> Letztere wurde zudem schon erfolgreich als Biotinte für additive Fertigungsverfahren verwendet, bei welchem durch die schichtweise Überlagerung des zellbeladenen Materials hierarchische, dreidimensionale Strukturen entstehen.<sup>140</sup>

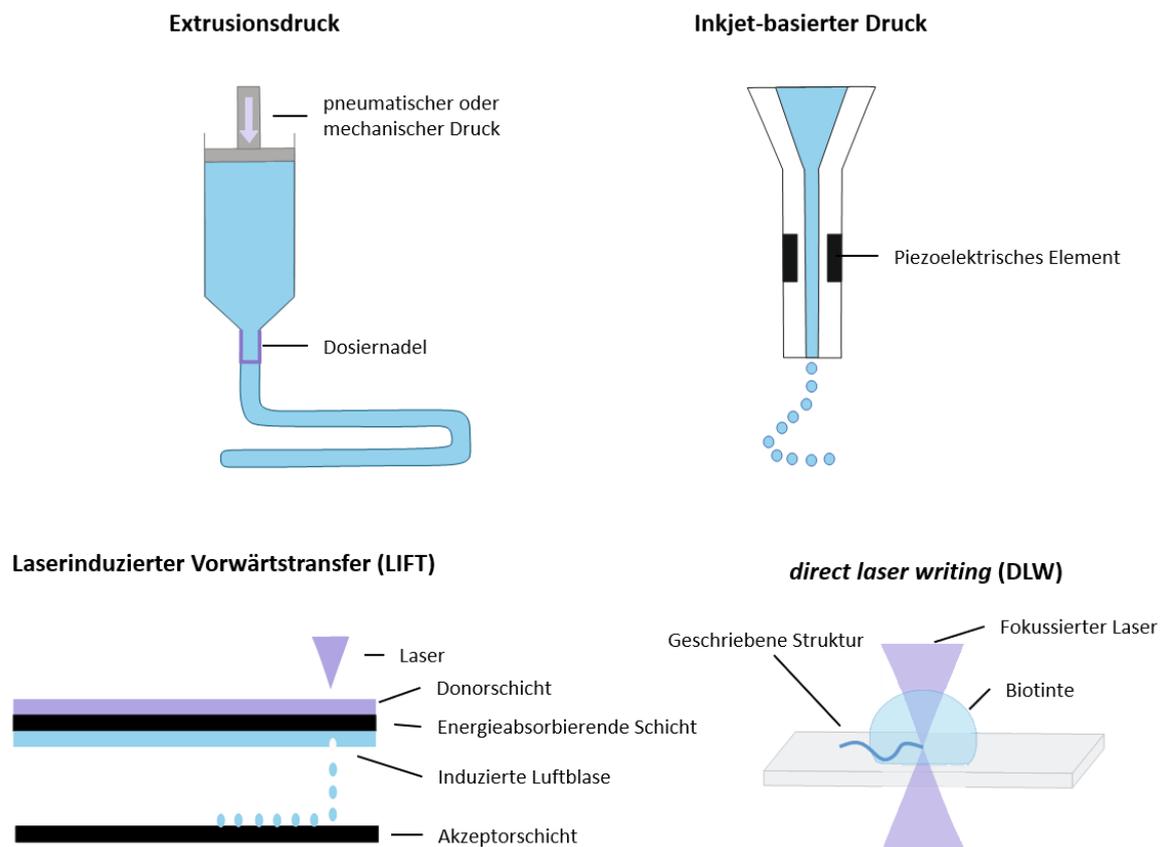
## 1.2 3D-Biodruck

Additive Fertigungsverfahren, auch bekannt unter der Bezeichnung 3D-Druck, beschreiben im Allgemeinen den schichtweisen Aufbau von 3D-Objekten.<sup>141</sup> Zu den gängigsten Druckmethoden zählen vor allem das *Fused Deposition Modeling* (FDM), die Stereolithographie (SLA) und das selektive Lasersintern (SLS). Sie legten in den 1980er-Jahren den Grundstein für den heutigen 3D-Druck.<sup>142,143</sup> Einen besonderen Bereich im 3D-Druck stellen 3D-Biodruckmethoden dar.<sup>143</sup> Dabei werden zellbeladene Biomaterialien, auch Biotinten genannt, schichtweise in definierter Anordnung verarbeitet, wodurch dreidimensionale Strukturen entstehen. Durch die Kultivierung der Zellen in den 3D-gedruckten Strukturen entstehen Gewebemodelle. Die Strukturierungsmöglichkeiten sind dabei abhängig von der gewählten Druckmethode und ihrer jeweiligen Druckauflösung sowie der Stabilität der Materialien.<sup>144,145</sup>

Der 3D-Biodruck kann allgemein in insgesamt vier Schritte eingeteilt werden: das Design der Struktur, die Herstellung der Biotinte, der eigentliche Druckprozess und die Nachbearbeitung.<sup>146</sup> Für das Design der Strukturen stehen verschiedenste computergestützte Konstruktionssoftwares (engl.: *computer-aided design*, CAD) zur Verfügung, wie PTC Creo oder Blender. Bei der Rekonstruktion von naturgetreuen Strukturen können für die Erstellung der Strukturen beispielsweise auch Daten von computertomografischen oder magnetresonanz-spektroskopischen Untersuchungen verwendet werden.<sup>147</sup> Anschließend erfolgt die Vorbereitung der Biotinten. Als Biotinten werden Materialien wie Hydrogele eingesetzt, welche wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, biologisch kompatibel sind und als Stützstruktur zur Kultivierung der 3D-gedruckten Gewebe verwendet werden können. Zudem müssen sie kompatible Eigenschaften zu den Druckverfahren besitzen.<sup>146,148</sup> Dann erfolgt der eigentliche Druck der Gewebemodelle. Anfänglich wurden dafür vorwiegend drei Methoden verwendet: der Extrusionsdruck, das Inkjet Verfahren sowie laserbasierte Fertigungsverfahren.

Der Extrusionsdruck ist unter den hier genannten das häufigste Verfahren, welches auch im privaten Bereich zum Einsatz kommt.<sup>141</sup> Dabei werden die Druckmaterialien durch pneumatischen oder mechanischen Druck über eine Dosiernadel extrudiert. Diese Druckmaterialien werden im 3D-Biodruck durch Biotinten repräsentiert. Die extrusionsgenerierten Filamente werden durch präzise Schicht-für-Schicht Platzierung übereinander zu einer 3D-Struktur angeordnet.<sup>149</sup> Im nachfolgenden Kapitel 1.2.1 wird der Extrusionsdruck noch detaillierter beschrieben. Weit verbreitet ist auch das Inkjet Verfahren, bei dem die Biotinte in eine Kartusche gefüllt wird, an deren Ende sich ein piezoelektrischer Kristall befindet.<sup>150</sup> Beim Anlegen einer elektrischen Spannung beginnt der Kristall zu vibrieren und gibt dabei die Biotinte tropfenweise und kontaktlos ab.<sup>151</sup> Durch die exakte Platzierung der kleinen Tropfen (1-100 Pikoliter) ergeben sich zwei- und dreidimensionale Strukturen.<sup>152,153</sup> Allerdings müssen die Biotinten für diese Anwendung eine niedrige Viskosität aufweisen, weshalb sich der Einsatz von viskosen Materialien, wie gelatinebasierte Hydrogele, bei dieser Methode schwierig gestaltet.<sup>154,155</sup> Zu den laserbasierten Druckmethoden gehört beispielsweise der Laserinduzierte-Vorwärtstransfer (engl.: *laser induced forward transfer*, LIFT).<sup>144</sup> Dabei werden die Biotinten auf ein Donorsubstrat aufgebracht. Mit einem fokussierten Laserimpuls wird das Material dann tropfenweise auf ein Akzeptorsubstrat übertragen. Durch die punktgenaue Platzierung der Tropfen können besonders hochaufgelöste Strukturen im Mikrometerbereich gedruckt werden<sup>156</sup>. Mit diesem Druckbereich ist die Methode jedoch eher ungeeignet, um größere Gewebe- und Organmodelle herzustellen.<sup>157,158</sup> Ein weiterer laserbasierter Druckprozess, der in den letzten Jahren aufgrund seiner extrem hohen Druckauflösung im unteren 100 nm Bereich immer

mehr an Aufmerksamkeit gewinnt, ist das *direct laser writing* (DLW).<sup>159,160</sup> Beim DLW wird mit einem fokussierten Laser in einem Tropfen des Materials gedruckt. Neben dieser kleinen Fokusebene ist die hohe Auflösung auf die Verwendung einer Zwei-Photonen-Absorption zurückzuführen.<sup>161,162</sup> Allgemein handelt es sich bei den laserbasierten Druckverfahren um präzise Techniken, mit denen auch viskose Materialien problemlos gedruckt werden können.<sup>163</sup> Auf der anderen Seite gehören sie zu den langsameren und teureren Verfahren, weshalb sie gerade im *Tissue Engineering* für den Druck von größeren Gewebemodellen tendenziell ungeeignet sind. Ein Vergleich der vorgestellten Methoden ist in Abbildung 7 aufgeführt.



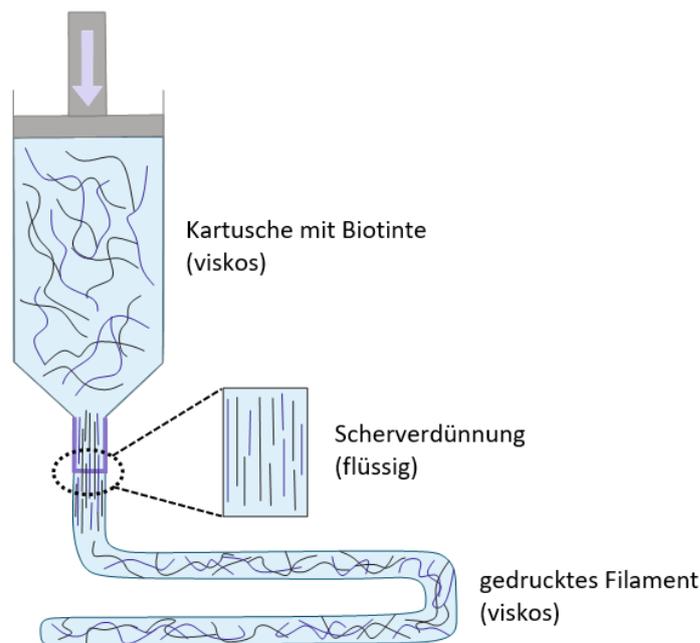
**Abbildung 7: Vergleich der gängigsten 3D-Biodruckmethoden.** Beim extrusionsbasierten Druck wird die Biotinte durch pneumatische oder mechanische Krafteinwirkung in Form eines Filaments extrudiert. Der Inkjet-basierte Druck verwendet ein piezoelektrisches Element, welches durch Vibration die Tinte in kleinen Tropfen abgibt. LIFT und DLW gehören zu den laserbasierten Methoden. Durch einen Laserimpuls wird bei LIFT ein Tropfen der Tinte vom Donor- auf das Akzeptorsubstrat übertragen, während beim DLW in der Tinte mit einem fokussierten Laser geschrieben wird.

In den letzten Jahren haben sich durch den stetigen Fortschritt der Technologien weitere 3D-Druckverfahren entwickelt, die sich ebenfalls für den Druck von viskosen Materialien eignen, aber mit kürzeren Druckzeiten arbeiten. Zum Beispiel wurde im Jahr 2020 zum ersten Mal das Prinzip der Xolographie vorgestellt. Es handelt sich um ein volumetrisches, Lichtschnitt-basiertes Verfahren, bei dem die Strukturen frei im flüssigen Polymer gedruckt werden. Dabei verwendet die Xolographie zwei verschiedene Wellenlängen für die Aushärtung der Photopolymere.<sup>141,164</sup> Auch bei der digitalen Lichtprozessierung (engl.: *Digital Light Processing*, DLP) werden die Strukturen in einem Volumen erzeugt, jedoch nicht frei in der Lösung, sondern unter Adhäsion auf einer Oberfläche. Mit Hilfe einer Projektionstechnik und digitalen Photomasken werden die Objekte

Schicht-für-Schicht in der Lösung aufgebaut.<sup>133</sup> In den nachfolgenden Kapiteln werden diese Druckverfahren neben dem Extrusionsdruck genauer beschrieben.

### 1.2.1 Extrusionsdruck

Der biologische Extrusionsdruck basiert auf dem Prinzip des FDM bei dem Plastikpolymere oder Metall geschmolzen und durch Extrusion in eine neue Form gebracht werden.<sup>165</sup> Für den biologischen Druck mussetn unter anderem die Temperaturen angepasst werden, da für das Schmelzen der Plastikpolymere wesentlich höhere Temperaturen benötigt werden, bei welchen die Zellen nicht überlebensfähig sind. Der 3D-Extrusionsbiodruck ist eines der am häufigsten verwendeten Verfahren für die Verarbeitung von zellbeladenen Biotinten.<sup>166</sup> Diese werden in einen Druckkopf oder eine Kartusche gegeben und durch eine Dosiernadel als Filament extrudiert. Der Druck für die Extrusion kann auf zwei verschiedenen Wegen erzeugt werden, entweder pneumatisch oder mechanisch.<sup>165,167</sup> Die mechanische Extrusion gilt dabei als die präzisere, da es bei der pneumatischen durch den Luftvorschub oft zu einer verzögerten Extrusion kommt.<sup>168–170</sup> Als Tinten für den extrusionsbasierten Druck eignen sich viskoelastische Materialien mit scherverdünnenden Eigenschaften. Die Scherviskosität beschreibt die Änderung der Viskosität eines Materials in Abhängigkeit von einwirkenden Scherkräften. Genauer gesagt nimmt dabei die Viskosität bei zunehmender Scherrate ab.<sup>171,172</sup> Beim Extrusionsdruck kommt es in der Kartusche durch physikalische Wechselwirkungen der Polymere zur Ausbildung eines temporären Netzwerks, wodurch die Biotinte viskos wird.<sup>173</sup> Wird die Tinte durch die schmale Öffnung der Dosiernadel extrudiert, treten Scherkräfte auf, welche das temporäre Netzwerk zerstören. Dadurch richten sich die Polymerstränge entlang der Scherkraft aus und verflüssigen sich. Die genaue Kraft, die dafür aufgewendet werden muss, wird als Fließgrenze bezeichnet.<sup>174,175</sup> Sobald die Biotinte verflüssigt die Engstelle passiert hat, bildet sich unmittelbar das physikalische Netzwerk wieder aus und das Filament gewinnt durch die Viskosität an Formstabilität.<sup>176,177</sup>



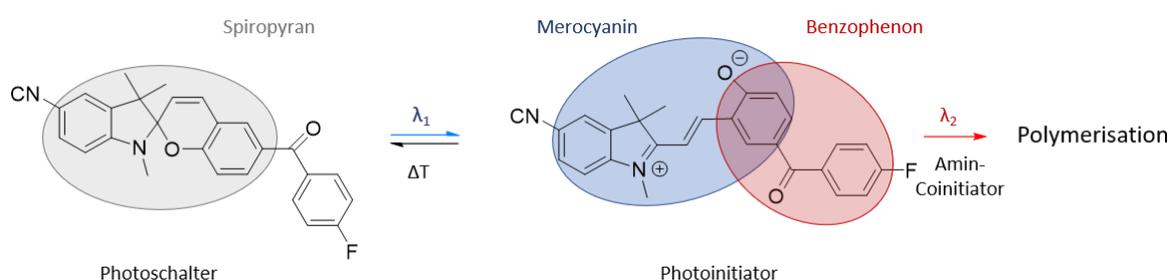
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Scherverdünnung der Biotinte.** Während der Extrusion kommt es an der schmalen Stelle in der Dosiernadel zur Scherverdünnung der Biotinte. Das zuvor hochviskose Material verflüssigt sich, um die schmale Öffnung passieren zu können. Anschließend verfestigt sich das Material wieder, sodass die gedruckte Struktur formstabil wird. Modifiziert nach Malda et al.<sup>168</sup>

Gelatinebasierte Hydrogele besitzen diese Fähigkeit der Scherverdünnung.<sup>120</sup> In der Kartusche liegen sie viskos in geliert Form vor, verflüssigen sich durch die Scherkräfte beim Passieren der Dosiernadel und verfestigen dann umgehend das extrudierte Filament.<sup>130</sup>

Im Allgemeinen handelt es sich beim Extrusionsdruck um eine schnelle Druckmethode, die jedoch nur eine Auflösung von 100-200  $\mu\text{m}$  besitzt.<sup>171</sup> Daher eignet sich der Extrusionsdruck vor allem für die Herstellung von Strukturen im Zentimeterbereich.<sup>178-180</sup>

### 1.2.2 Xolographie

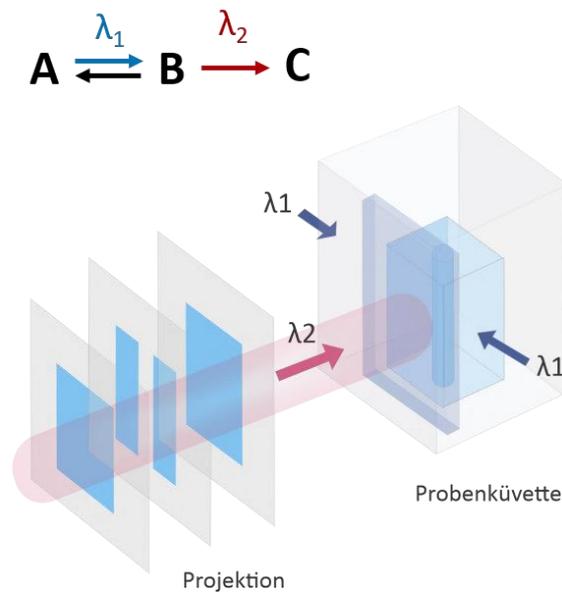
Bei einer optischen Auflösung von 14  $\mu\text{m}$  in x- und y-Richtung lassen sich mit dem Xube (xolo GmbH) deutlich kleinere Strukturen drucken.<sup>141</sup> Die dafür verwendete Drucktechnologie ist die Xolographie, welche erst 2020 vorgestellt wurde.<sup>164</sup> Es handelt sich um ein volumetrisches Verfahren, bei dem das Objekt frei von Stützstrukturen oder adhäsiven Oberflächen in der Polymerlösung erzeugt wird. Zu diesen volumetrischen Verfahren zählt auch das zuvor beschriebene DLW, da dort frei im Volumen des Tropfens gedruckt wird.<sup>181</sup> Im Xube werden jedoch größere Volumina verwendet, wobei die optisch transparente Polymerlösung in einer Küvette verdrückt wird. Verwendet wird dabei auch keine Zwei-Photonen Absorption wie beim DLW, sondern ein sogenannter Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator. Dieser muss von zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden, um die Polymerisation zu induzieren. Dafür werden die Zwei-Wellenlängen-Initiatoren aus einer photoinitiierenden und einer photoschaltbaren Einheit aufgebaut. Als Photoinitiator können beispielsweise Benzophenone verwendet werden, welche in einen Spiropyran/Merocyanin-Photoschalter integriert werden. Dieses Beispiel ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Spiropyran wird durch eine erste Wellenlänge  $\lambda_1$  (375 nm) in Merocyanin überführt. Dieses wiederum kann Licht im sichtbaren Bereich absorbieren. Durch die Bestrahlung mit  $\lambda_2$  (500-650 nm) bildet der Photoinitiator Benzophenon unter Anwesenheit eines Amin-Coinitiators eine radikale Spezies aus, welche eine Polymerisierung startet.<sup>182</sup> Nach dem Ausbleiben der UV-Strahlung ist der erste Reaktionsschritt unter thermischer Relaxation reversibel, wodurch es zu einer weich auslaufenden Druckzone in z-Richtung kommt.<sup>141</sup>



**Abbildung 9: Funktionsweise des Zwei-Wellenlängen-Photoinitiators.** Die photoschaltbare Einheit Spiropyran wird durch UV-Licht (375 nm) in Merocyanin umgewandelt, welches sichtbares Licht absorbieren kann. Bei der Einstrahlung einer Wellenlänge von 500-650 nm kann das Benzophenon als photoinitiierende Einheit unter Anwesenheit eines Amin-Coinitiators eine radikale Spezies ausbilden, welche eine Polymerisation startet. Modifiziert nach Regehly.<sup>141</sup>

Im Drucksystem wird dieses Prinzip umgesetzt, indem in der Küvette eine dünne Schicht des Polymers vertikal mit der ersten Wellenlänge  $\lambda_1$  bestrahlt wird. Bei Absorption versetzt diese den inaktiven Photoinitiator A in einen aktiven Zustand B. Dieser Vorgang findet räumlich begrenzt in der bestrahlten Schicht statt. Anschließend wird orthogonal dazu Schicht-für-Schicht in einem Schwarz-Weiß-Film das gewünschte Objekt in das Polymer projiziert. Diese zweite Wellenlänge  $\lambda_2$

versetzt den aktiven Photoinitiator B in einen reaktiven Zustand C, in dem er in der Lage ist eine Polymerisationsreaktion zu induzieren.<sup>141,164</sup> Dieser beschriebene Druckvorgang ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt.



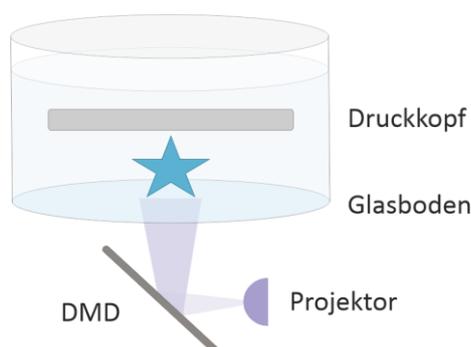
**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Xolographie.** Durch eine erste Wellenlänge von 375 nm ( $\lambda_1$ , blau) wird vertikal eine Schicht des Polymers bestrahlt, wodurch der Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator A in einen aktiven Zustand B angeregt wird. Anschließend wird orthogonal in diesen aktiven Druckbereich das Modell mit sichtbarem Licht ( $\lambda_2$ , rot) Schicht-für-Schicht projiziert. Daraufhin findet lokal begrenzt an der Stelle, an der  $\lambda_1$  und  $\lambda_2$  aufeinandertreffen die Polymerisationsreaktion statt, da der aktive Photoinitiator B das sichtbare Licht absorbiert und in den reaktiven Zustand C versetzt wird. Modifiziert nach Regehly und Hecht.<sup>141</sup>

Eine Aushärtung des Materials findet somit nur lokal begrenzt an der Stelle statt, an der beide Wellenlängen sich im Polymer kreuzen und der Photoinitiator alle Zustände durchlaufen konnte. Die Materialanforderungen sind neben dem spezifischen Photoinitiatorsystem für diese Druckmethode überschaubar. Für die optische Aushärtung werden transparente Materialien benötigt. Zudem müssen diese eine hohe Viskosität aufweisen, um die Struktur zu stabilisieren und ein Absinken zu vermeiden. Das wiederum bedeutet, dass die Druckauflösung auch abhängig von der Viskosität ist.<sup>141,164</sup>

### 1.2.3 Digital Light Processing

Das *Digital Light Processing* (DLP) ist eine lichtbasierte 3D-Druckmethode. Mit einer Auflösung von bis zu 6  $\mu\text{m}$ , welche abhängig vom Material ist, besitzt sie die höchste Auflösung der hier im Detail vorgestellten Druckmethoden.<sup>183</sup> Sie wurde in den 1980er-Jahren von der Firma Texas Instruments entwickelt.<sup>184</sup> Es handelt sich um eine lichtbasierte Druckmethode, welche für die Projektion der gewünschten Struktur ein *Digital Micromirror Device* (DMD) verwendet. Die DMD-Einheit besteht aus ein bis zwei Millionen mikrometergroßen Spiegeln, welche einzeln angesteuert werden können.<sup>185</sup> Während des Druckprozesses werden die Spiegel so variiert, dass sich digitale Photomasken ausbilden. Die Spiegel leiten den einfallenden Laser nur an den Stellen weiter, an denen das Polymer ausgehärtet werden soll. Dabei fährt der Druckkopf Schritt für Schritt nach oben, um den schichtweisen Aufbau der Strukturen zu ermöglichen. Der Druck findet in der Polymerlösung in einer *Well* Platte mit Glasboden statt. Durch eine Oberflächenmodifizierung

besitzt der Glasboden adhäsive Eigenschaften, wodurch die Struktur während des Druckvorgangs fixiert ist.<sup>186</sup> Die Druckmethode ist schematisch in Abbildung 11 zu abgebildet.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des DLP.** Mit Hilfe einer DMD-Einheit wird das Druckobjekt Schicht-für-Schicht in das Polymer projiziert. Die einzeln ansteuerbaren Spiegel der DMD-Einheit bilden digitale Photomasken, wodurch der einfallende 405 nm Laser nur die belichteten Stellen im Polymer aushärtet. Für den schichtweisen Aufbau fährt der Druckkopf schrittweise nach oben. Modifiziert nach cellink.<sup>186</sup>

Dadurch, dass beim DLP-Druckprozess weder Scherstress noch hohe Temperaturen verwendet werden, eignet er sich sehr gut für den Druck von Zellen. Die hohe Druckgeschwindigkeit ist hierbei ebenfalls förderlich für die Zellen.<sup>184,185</sup> Da in flüssigem Polymer gedruckt wird, können die Zellen mit der Zeit sedimentieren, was durch eine kurze Druckzeit verhindert wird. Da für die Aushärtung ein 405 nm Laser verwendet wird, ist die Druckmethode zudem kompatibel mit den gelatinebasierten Hydrogelen. Des Weiteren konnte die DLP-Methode bereits erfolgreich für die additive Fertigung von verschiedenen organspezifischen Geweben verwendet werden, wie Leber, Lunge oder Herz.<sup>187–190</sup> Auch der Druck von vaskulären *Organ-on-a-chip* Systemen für Wirkstofftests wurde schon mit dem DLP realisiert.<sup>191</sup>

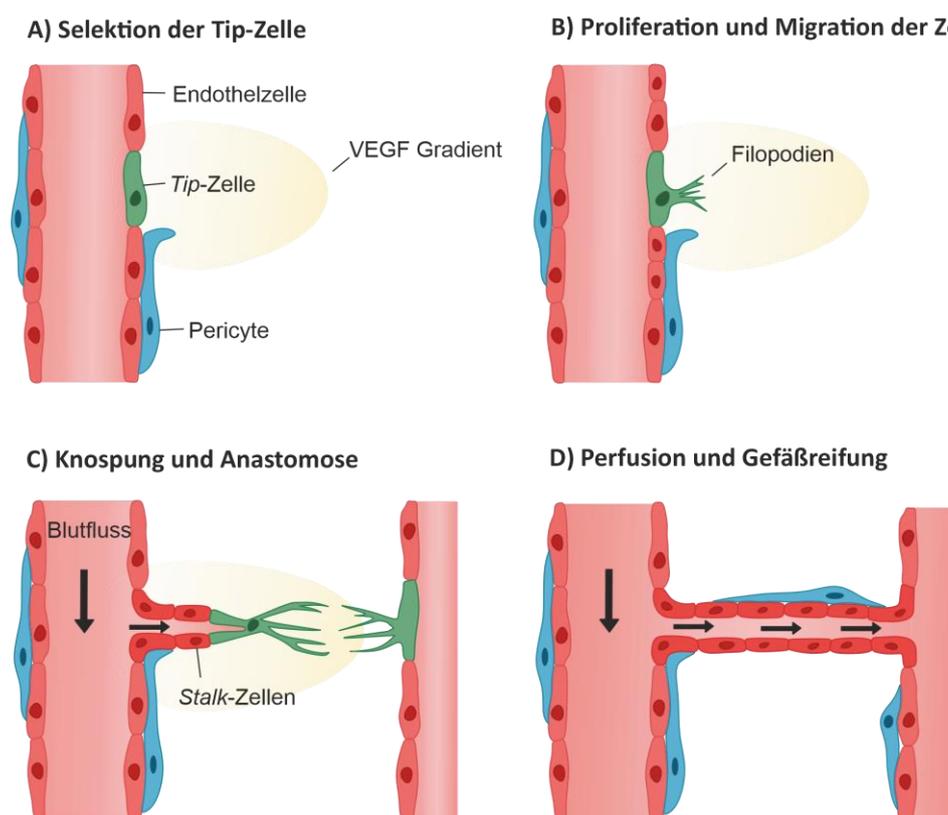
### 1.3 Vaskularisierung

Mittels der vorgestellten Drucksysteme ist es in absehbarer Zukunft denkbar, dass größere Gewebe- und Organeinheiten additiv gefertigt werden können. Bis zu diesem Zeitpunkt existieren dennoch diverse Herausforderungen, die bewältigt werden müssen. Beispielsweise ist die Versorgung der Zellen in größeren Strukturen mangelhaft, da es keine umfassende Durchblutung gibt. Da sich das Diffusionslimit von Sauerstoff in Gewebe zwischen 100 und 200  $\mu\text{m}$  befindet, kann die Versorgung nicht alleine durch Diffusion gewährleistet werden.<sup>192</sup> In höheren Organismen wird die Versorgung der Zellen über ein hierarchisch angeordnetes Blutgefäßsystem gesteuert.<sup>193,194</sup> Sauerstoffreiches Blut wird vom Herzen aus durch die Arterien zu den Arteriolen geleitet, über welche es in den Kapillaren verteilt wird.<sup>195,196</sup> Dort findet der größte Teil des Nährstoff- und Sauerstoffaustauschs mit dem Gewebe statt.<sup>197</sup> Anschließend wird das sauerstoffarme Blut über die Venolen und Venen zum Herzen zurücktransportiert.<sup>195,196</sup> Aufgebaut sind alle Blutgefäße aus drei Schichten, der *tunica intima*, der *tunica media* und der *tunica adventitia*. Abhängig von ihren Aufgaben variiert der Anteil der jeweiligen Schichten in den unterschiedlichen Gefäßtypen.<sup>195,198</sup> Eine Gemeinsamkeit ist allerdings die innerste Gewebeschicht, welche aus einer planaren Endothelzellschicht aufgebaut ist und in direktem Kontakt mit dem Blut steht.<sup>197</sup> Aufgrund seiner überlebenswichtigen Aufgabe ist *in-vivo* das kardiovaskuläre System, das erste funktionelle Organsystem, das sich im Embryo entwickelt, da die Versorgung der neu gebildeten Gewebe essenziell für das Wachstum des Embryos ist.<sup>199,200</sup>

### 1.3.1 Vaskulogenese und Angiogenese

Zwei große Hauptprozesse sind an der Ausbildung des Blutgefäßsystems beteiligt, die Vaskulogenese und die Angiogenese.<sup>201</sup> Als Vaskulogenese wird die *de novo* Bildung von Blutgefäßen während der Embryogenese bezeichnet. Dabei differenzieren sich angiogene Vorläuferzellen, die Angioblasten, zu Endothelzellen aus. Diese wiederum setzen sich zu einem Blutgefäßsystem zusammen und kleiden dort das Lumen in Form einer planaren Zellschicht aus.<sup>202,203</sup> Spezifische Wachstumsfaktoren bestimmen dabei, ob sich die Gefäße zu arteriellen oder venösen Blutbahnen ausbilden.<sup>204</sup> Die Weiterverzweigung dieser ausgebildeten Blutgefäße wird durch den zweiten großen Prozess, die Angiogenese, reguliert.<sup>202</sup> Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zellen spielen eine Rolle in der Regulation der Angiogenese.<sup>205,206</sup> Einer der wohl wichtigsten regulierenden Faktoren ist der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), aber auch Angiopoietin-2 (ANG-2) und der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) sind an der Blutgefäßverzweigung beteiligt. Die Angiogenese beginnt, wenn eine ausreichend große Konzentration an VEGF im umliegenden Gewebe der Endothelzellen vorhanden ist und an den *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGF-R) bindet.<sup>207</sup> Durch ANG-2 und unterschiedlichen Metalloproteasen kommt es zur teilweisen Degradation der Endothel-umgebenden EZM (Basalmembran) und zum Ablösen der Perizyten (Abbildung 12, A).<sup>208</sup> Die Perizyten stabilisieren im Ruhezustand die Gefäßstruktur, indem sie sich außen an der Basalmembran anlagern.<sup>202,209</sup> Die frei liegenden Endothelzellen können nun auf den Wachstumsgradienten aus VEGF reagieren, indem die nächstgelegene Endothelzelle zu einer sogenannten *Tip-Zelle* differenziert.<sup>210</sup> Diese bilden feine Ausläufer aus, sogenannte Filopodien, welche die Wachstumsrichtung entlang des Gradienten steuern.<sup>206,211,212</sup> Um das Wachstum des Blutgefäßes zu beschleunigen, erhöhen die benachbarten Endothelzellen obendrein ihre Proliferation (Abbildung 12, B). Diese Zellen werden *Stalk-Zellen* genannt.<sup>213</sup> Die Proliferation der *Stalk-Zellen* treibt das Wachstum des neuen Blutgefäßes solange voran, bis die Ausknospung auf eine weitere trifft (Abbildung 12, C). Durch Anastomose fusionieren die beiden Sprossungen, wobei sich ein neues Lumen ausbildet. Dies führt zur Perfusion des neuen Gefäßes.<sup>202,206</sup> Ein weiterer proangiogener Wachstumsfaktor, der *Platelet-Derived Growth Factor B* (PDGF-B) rekrutiert Perizyten, die sich an die Endothelzellen anlagern und das neu gebildete Gefäß stabilisieren (Abbildung 12, D).<sup>206</sup> Der bereits zuvor erwähnte Wachstumsfaktor FGF, insbesondere seine Isoform FGF-2, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Angiogeneseprozess. Durch die Bindung von FGF-2 an den *Fibroblast Growth Factor Receptor* (FGFR) wird eine Reihe von Signalkaskaden ausgelöst, welche die Proliferation, Migration und Angiogenese der Endothelzellen regulieren.<sup>214–</sup>

217



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Stadien der Angiogenese.** **A)** Durch einen Gradienten des Wachstumsfaktors VEGF (gelb) degradiert die EZM um die Endothelzellen (rot) herum und die Perizyten (blau) lösen sich vom Endothel. **B)** Daraufhin bildet sich eine endotheliale *Tip-Zelle* (grün) aus und die umliegenden Endothelzellen steigern ihre Proliferation. **C)** Durch die weitere Proliferation der Endothelzellen und der Migration der *Tip-Zelle* entlang des Wachstumsfaktorgradienten können die Gefäße so lange weiter wachsen, bis sie auf eine andere Ausknospung treffen. **D)** Die endothelialen Vakuolen fusionieren und bilden ein neues Lumen aus. Um das Gefäß herum bildet sich eine neue Basalmembran aus und es werden Perizyten zur Stabilisierung der neuen Gefäße rekrutiert. Modifiziert nach Treps et al.<sup>207</sup>

### 1.3.2 Vaskularisierung im *Tissue Engineering*

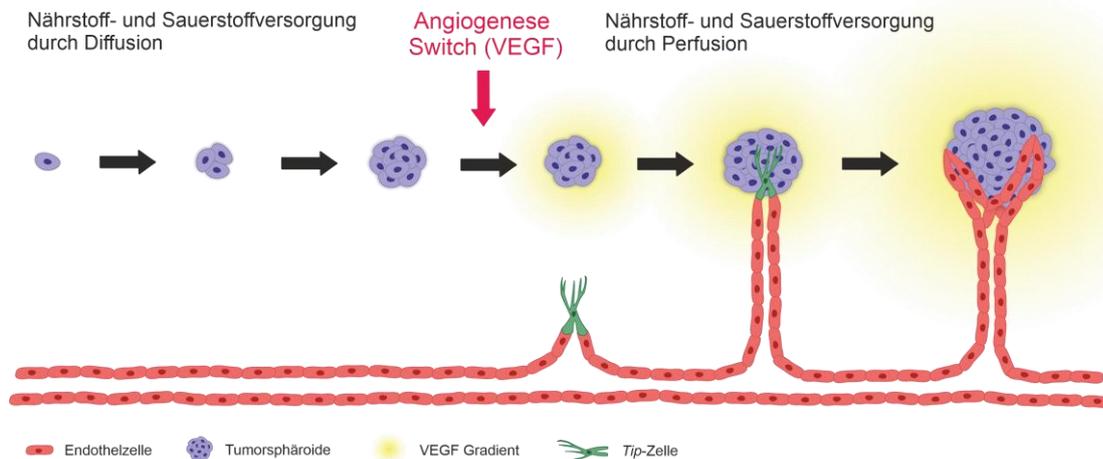
Es gibt bereits eine Vielzahl von Untersuchungen, die sich damit befassen das Prinzip der Angiogenese auf 3D-Modelle zu übertragen, um die Feinstruktur des Blutgefäßsystems nachzubilden.<sup>218</sup> Dabei setzen viele Experimente auf die spontane Organisation der Endothelzellen zu vaskulären Netzwerken, beispielsweise auf geeigneten Gerüststrukturen, eingekapselt in artifiziellen extrazellulären Matrices oder in Zellaggregaten.<sup>219–225</sup> Durch die Sublimierung des Wachstumsfaktors VEGF konnten zudem auch in *Organ-on-a-chip* Systemen erfolgreich Angiogeneseprozesse abgebildet und untersucht werden.<sup>226</sup> Van Duinen et al. konnten dabei ein Gradientensystem etablieren, indem sie eine Plattform mit drei Kanälen designten. Der erste Kanal wurde mit Endothelzellen besiedelt, der zweite mit einem Kollagenhydrogel befüllt und der letzte Kanal enthielt den Wachstumsfaktor. Durch die Membranen, welche die Kanäle voneinander trennten, perfundierte das VEGF in das Kollagen Hydrogel, wodurch ein Gradient entstand. Dadurch konnte erfolgreich die Angiogenese der Endothelzellen induziert werden, die ebenfalls in das Hydrogel hineinwuchsen.<sup>227</sup> Solche Systeme können einen relevanten Beitrag zur Untersuchung von angiogenen Vorgängen liefern, welche auch in Zusammenhang mit pathologischen Vorgängen entstehen können.<sup>228</sup>

## 1.4 Pathologische Angiogenese

Im adulten Organismus proliferieren die Endothelzellen in den meisten Fällen nicht mehr. Nur während der Schwangerschaft oder beim weiblichen Menstruationszyklus kommt die Angiogenese in regelmäßigen Abständen zum Einsatz. Endothelzellen behalten des Weiteren ihre Fähigkeit, auf äußere Stimuli zu reagieren, beispielsweise bei entzündlichen Vorgängen und bei Wundheilungsprozessen. Doch auch manche Krankheiten können pathologische Formen der Angiogenese auslösen und sie unreguliert ablaufen lassen. Dazu zählen beispielsweise verschiedene Autoimmunerkrankungen, Asthma, Multiple Sklerose sowie Krebserkrankungen.<sup>228</sup>

### 1.4.1 Tumorinduzierte Angiogenese

Die tumorinduzierte Angiogenese ist ein häufig auftretendes Symptom bei Krebserkrankungen. Das fortschreitende Wachstum der Tumore resultiert ab etwa 2 mm Tumordurchmesser in einer Unterversorgung der inneren Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen.<sup>229</sup> Es kommt zur sogenannten Hypoxie.<sup>230,231</sup> Die Hypoxie von Gewebe gilt als eine der Schlüsselmechanismen für die Anregung der VEGF-Produktion. Dasselbe geschieht im Tumor. Durch die Hypoxie kommt es zum sogenannten Angiogenese *Switch*, der die Produktion von VEGF im Tumor auslöst.<sup>232,233</sup> Dadurch entsteht, ausgehend vom Tumor, ein Wachstumsfaktorgradient, welcher die Angiogenese der nächstliegenden Endothelzellen induzieren kann. Entlang des Gradienten wachsen die Endothelzellen in Richtung des Tumors.<sup>207,234</sup> Dort infiltrieren sie diesen, wodurch die Versorgung der Tumorzellen ab diesem Zeitpunkt über Perfusion stattfindet.<sup>207</sup> Eine schematische Darstellung der tumorinduzierten Angiogenese ist in Abbildung 13 zu sehen.



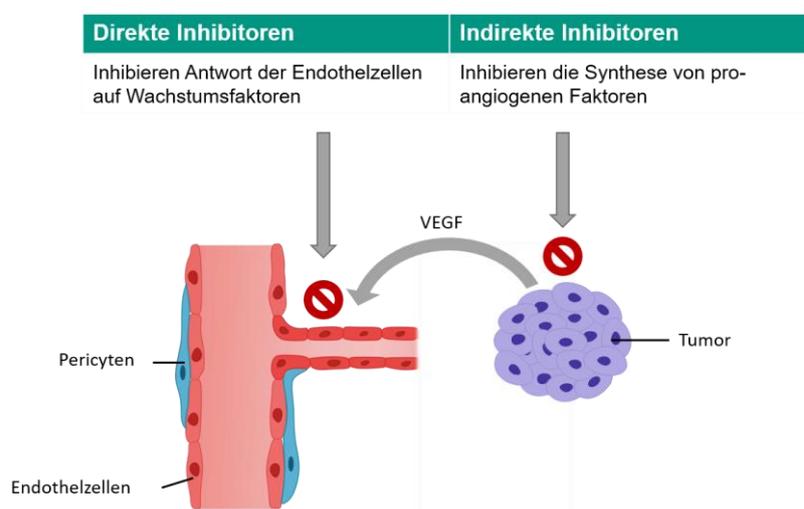
**Abbildung 13: Mechanismus der tumorinduzierten Angiogenese.** Durch den zunehmenden Umfang des Tumors werden die Zellen im Kern nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Es kommt zur Hypoxie. Diese löst den sogenannten Angiogenese *Switch* aus, wodurch der Tumor beginnt, VEGF zu produzieren. Der so entstehende VEGF-Gradient regt die nächstgelegene Endothelzelle zur Angiogenese an, um die Blutgefäße in Richtung des Tumors wachsen zu lassen. Dieser wird schließlich von Blutgefäßen durchwachsen, was ihm eine ausreichende Nährstoffversorgung garantiert.

Durch die Vaskularisierung verschafft sich der Tumor direkten Zugang zur Nährstoffversorgung, was in einem gesteigerten Wachstum resultiert. Durch den Anschluss an das Blutgefäßsystem kann sich der Tumor zudem über Metastasierung im gesamten Körper verteilen.<sup>235</sup> Dazu lösen sich Zellen aus dem Tumorverbund und werden von dem Blutgefäßsystem an einen anderen Ort im Körper

transportiert. Dort verlassen die Zellen das Gefäß wieder und können einen neuen Tumor ausbilden.<sup>236,237</sup>

### 1.4.2 Angiogenese-Inhibitoren

Durch die Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen und der Angiogenese ergab sich die Idee für eine alternative Behandlungsstrategie der Tumore. Mit Hilfe von Angiogenese-Inhibitoren soll eine Vaskularisierung und somit auch das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren, unterbunden werden. In der Wirkstoffklasse der Angiogenese-Inhibitoren werden zwei verschiedene Wirkungsweisen unterschieden: die direkte und die indirekte Inhibierung. Direkte Inhibitoren wie das Protein Endostatin verhindern eine Antwort der Endothelzellen auf proangiogene Faktoren, indem sie beispielsweise an den Rezeptor VEGF-R binden. Indirekte Inhibitoren hingegen wie Iressa oder der Antikörper Bevacizumab verhindern die Expression oder blockieren die Aktivität von angiogenen Proteinen und verhindern so die angiogeneseauslösenden Signalkaskaden.<sup>238–240</sup>



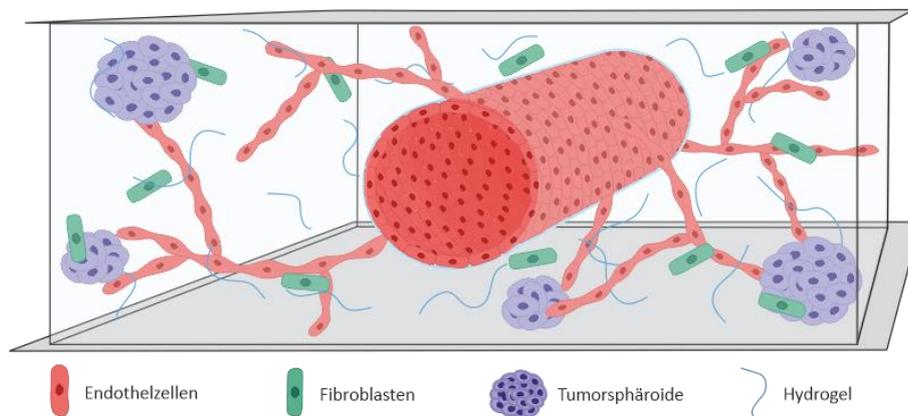
**Abbildung 14: Schematische Darstellung der direkten und der indirekten Angiogeneseinhibition.** Direkte Inhibitoren blockieren Bindungsstellen der Wachstumsfaktoren auf den Endothelzellen, während indirekte Inhibitoren die Synthese der Faktoren in den Tumoren unterdrücken.

Gegenüber herkömmlichen Chemotherapien besitzen Angiogenese-Inhibitoren zwei Vorteile. Zum einen sind sie weniger toxisch und zum anderen lösen sie mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit Resistenzen aus. Das macht sie auf längere Sicht, zum Beispiel bei Behandlungen über Jahre hinweg, zur sichersten Therapiemöglichkeit.<sup>241</sup> Da es sich um eine recht neue Klasse von Wirkstoffen handelt, welche noch in der Entwicklung stecken, bedarf es noch weiteren *in-vitro* Untersuchungen der Wirksamkeit und Nebenwirkungen. Für solche Wirkstoffuntersuchungen können beispielsweise 3D-Gewebemodell verwendet werden, wie sie bereits in Kapitel 1.1 vorgestellt wurden.



## 2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein hydrogelbasiertes, vaskularisiertes Chipsystem zu entwickeln, welches als Wirkstoffscreeningmodell etabliert werden kann. Dabei sollten unter anderem verschiedene 3D-Biodruckmethoden hinsichtlich ihrer Eignung zur additiven Fertigung von vaskulären Strukturen in gelatinebasierten Hydrogelen untersucht werden. Diese additiv gefertigten Blutgefäße sollten im nächsten Schritt mit Endothelzellen besiedelt werden, um die innere Endothelzellschicht der Blutgefäße nachzubilden. Die Endothelzellen können durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder dem *Fibroblast Growth Factor* (FGF) zur Angiogenese angeregt werden. Diese ist als die Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden definiert. Im Modell sollten mit Hilfe der Angiogenese Mikrogefäße des Blutgefäßsystems nachgebildet werden, welche *in-vivo* hauptverantwortlich für den Nährstoff- und Gasaustausch sind. Diese können aufgrund der limitierten Auflösung der hier vorgestellten Druckmethoden allerdings nicht additiv gefertigt werden. Zudem sollte die Anpassungsfähigkeit der entworfenen Modelle demonstriert werden, indem in das Hydrogelkompartiment zum Beispiel Tumoroide und Fibroblasten eingebracht werden, sodass ein Krankheitsmodell entsteht. Ein solches Modell ist schematisch in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung eines hydrogelbasierten Chipsystems mit pathologischer Angiogenese.** Die additiv gefertigte Kanalstruktur ist mit Endothelzellen ausgekleidet, welche durch Angiogenese in das umgebende Kompartiment einwachsen. Durch die Tumoroide und Hautfibroblasten im Hydrogelkompartiment entsteht ein Krankheitsmodell zur Modellierung von vaskularisierten Tumoren.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

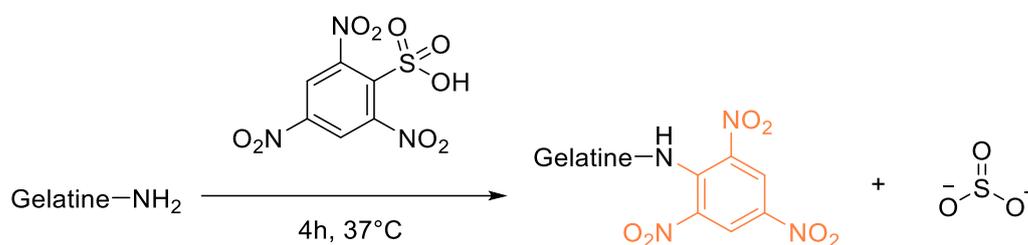
Die Entwicklung von geeigneten Materialien für die Rekonstruktion von 3D-Gewebemodellen stellt eine der Hauptforschungsfragen im Bereich des *Tissue Engineerings* dar. Um den Aufbau und die Funktion der natürlichen Gewebe möglichst detailgetreu nachstellen zu können, werden geeignete Stützmatrices für die 3D-Zellkulturen benötigt. *In-vivo* sind die Zellen von der extrazellulären Matrix (EZM) umgeben, die neben ihrer Stützfunktion auch für die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen verantwortlich ist. Zudem ermöglicht sie durch Zelladhäsionsdomänen die dreidimensionale Ausrichtung der Zellen sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen.<sup>76,77</sup> Aus diesem Grund werden für die Geweberekonstruktion Materialien mit ähnlichem Charakter benötigt. Hydrogele erfüllen viele dieser Anforderungen. Als besonders vielversprechend haben sich dabei gelatinebasierte, semi-synthetische Hydrogele erwiesen.<sup>101</sup> Da Gelatine durch Hydrolyse aus Kollagen, einem Bestandteil der EZM, gewonnen wird, besitzt sie diverse biologische Motive wie Adhäsionsdomänen oder auch proteaseaktive Schnittstellen. Diese sind verantwortlich für die Adhäsion der Zellen und den biologischen Abbau des Hydrogels.<sup>242</sup> Durch ihre Tertiärstruktur kann die Gelatine zudem Tripelhelices ausbilden, wodurch es zur Gelierung kommt. Diese Gelstruktur kann bei Temperaturen über 24 °C nicht aufrechterhalten werden und es kommt zur Denaturierung der Tertiärstruktur.<sup>118</sup> Da für die Kultivierung der 3D-Zellkulturen jedoch Temperaturen von 37 °C benötigt werden, ist die reine Gelatine ungeeignet für den Einsatz als artifizielle EZM. Durch die Modifizierung der Gelatine zu einem semi-synthetischen Hydrogel kann ihre Temperaturstabilität verbessert werden.<sup>118</sup> Dazu können die endständigen NH<sub>2</sub> Gruppen der Lysinseitenketten der Gelatine mit funktionellen Gruppen chemisch modifiziert werden.<sup>109</sup> Über diese wird die Ausbildung eines kovalenten Netzwerks ermöglicht. Häufig kommen dabei photoreaktive Gruppen zum Einsatz, über welche eine photoinduzierte Vernetzung der gelatinebasierten Hydrogele stattfinden kann. Zu den bekanntesten gelatinebasierten Hydrogelen gehören zum Beispiel das Norbornen-funktionalisierte GelNB, das thiolierte GelS sowie die methacrylierte Gelatine GelMA, welche unter den semi-synthetischen Hydrogelen als Goldstandard gilt.<sup>103,120,243</sup> In dieser Arbeit wurden alle drei Hydrogelpolymere synthetisiert und als Stützmaterial für die 3D-Zellkultur, sowie als Biotinte für verschiedene additive Verfahren verwendet.

#### 3.1 Synthese und Charakterisierung der Hydrogelpolymere

Für die Synthesen der Polymere wurde Gelatine Typ A aus der Schweinehaut mit einer Bloom-Zahl von 300 verwendet. Typ A bedeutet, dass die Gelatine durch saure und nicht wie Typ B durch basische Hydrolyse aus dem Kollagen gewonnen wurde.<sup>244</sup> Des Weiteren gibt die Bloom-Zahl die Gelierkraft der Gelatine an, welche durch die vorherrschende Temperatur bei der Extraktion der Gelatine beeinflusst wird.<sup>245</sup> Die Gelierkraft wiederum ist ein wichtiger Faktor beim 3D-Druckprozess der Hydrogelpolymere, da sie die Viskosität der Biotinten bestimmt.<sup>246</sup> Gelatine mit 300 Bloom erwies sich bereits in vorangegangenen Arbeiten als geeignet für den Einsatz bei verschiedenen Druckverfahren, weshalb diese auch hier zum Einsatz kam.<sup>120,131</sup> Die Stabilität der Hydrogele ist dabei nicht alleine abhängig von der Gelierkraft der Gelatine, sondern kann auch bei der chemischen Modifikation der Gelatine beeinflusst werden. Über den Grad der Funktionalisierung, also darüber, wie viele freie NH<sub>2</sub>-Gruppen mit chemischen Gruppen modifiziert werden, kann die Festigkeit der Hydrogele variiert werden. Bei einer höheren Funktionalisierung

können sich mehr kovalente Bindungen zwischen den Gelatinesträngen ausbilden, wodurch dichtere, feste Netzwerke entstehen. Durch eine niedrigere Funktionalisierung hingegen entstehen bei der Vernetzung großporigere, weichere Hydrogele. So können über die Variation des Funktionalisierungsgrades Hydrogele mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften hergestellt werden. Der große Vorteil von diesem Prinzip ist, dass die Hydrogele so individuell an das gewünschte Gewebe angepasst werden können. Beispielsweise besitzt Knorpel in der Regel eine höhere mechanische Festigkeit als Lungengewebe.<sup>110,111</sup>

Um den Funktionalisierungsgrad während der Synthese beeinflussen zu können, musste zunächst bestimmt werden, wie viele freie NH<sub>2</sub>-Gruppen die Gelatine durchschnittlich besitzt. Diese Bestimmung wurde bereits von Göckler et al. durchgeführt, auf welcher auch die Synthesen in dieser Arbeit aufbauen.<sup>120</sup> Für die Bestimmung der freien NH<sub>2</sub>-Gruppen wurde ein sogenannter TNBSA-Assay verwendet. Dieser beruht auf dem Prinzip, dass Trinitrobenzolsulfonsäure (engl.: *Trinitrobenzenesulfonic acid*, TNBSA) mit den primären Aminogruppen der Aminosäuren L-Lysin und L-Hydroxylysin in der Gelatine zu einem gelben Derivat reagiert (Schema 1). Die Absorption der Derivate kann anschließend mit einem Spektrometer bei 335 nm gemessen werden.<sup>247</sup>



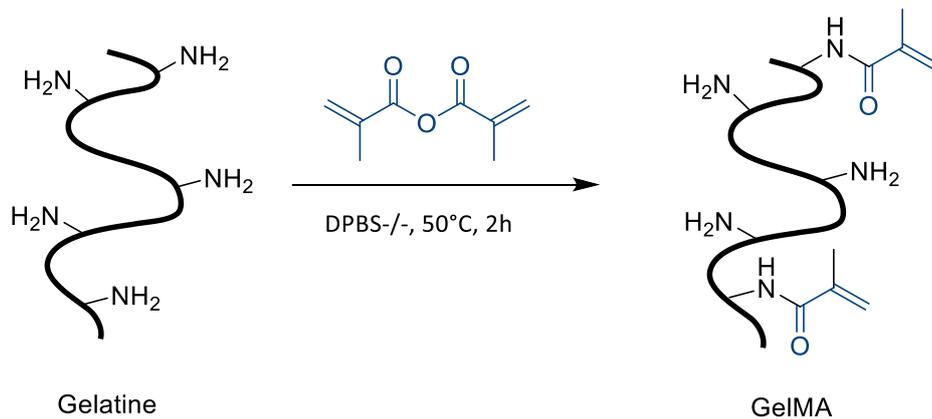
**Schema 1: TNBSA-Assay zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades.** Die Reaktion der freien Aminogruppen der Gelatine mit dem TNBSA-Reagenz zu einem gelben Derivat. Assay nach Kale et al.<sup>247</sup>

Über die Erstellung einer Standardkurve aus verschiedenen verdünnten Glycinlösungen (2-12 µm/ml) konnte anhand der Absorptionwerte der Gelatine eine durchschnittliche Menge freier Aminogruppen von 0,266 ± 0,04 mmol/g bestimmt werden.<sup>120</sup> Anhand dieses Wertes können während der Synthese die Funktionalisierungsgrade der Hydrogele variiert werden, indem die funktionellen Gruppen stöchiometrisch zu der Gelatine hinzugegeben werden. In dieser Arbeit wurden von allen Hydrogelen verschieden funktionalisierte Varianten hergestellt.

### 3.1.1 GelMA

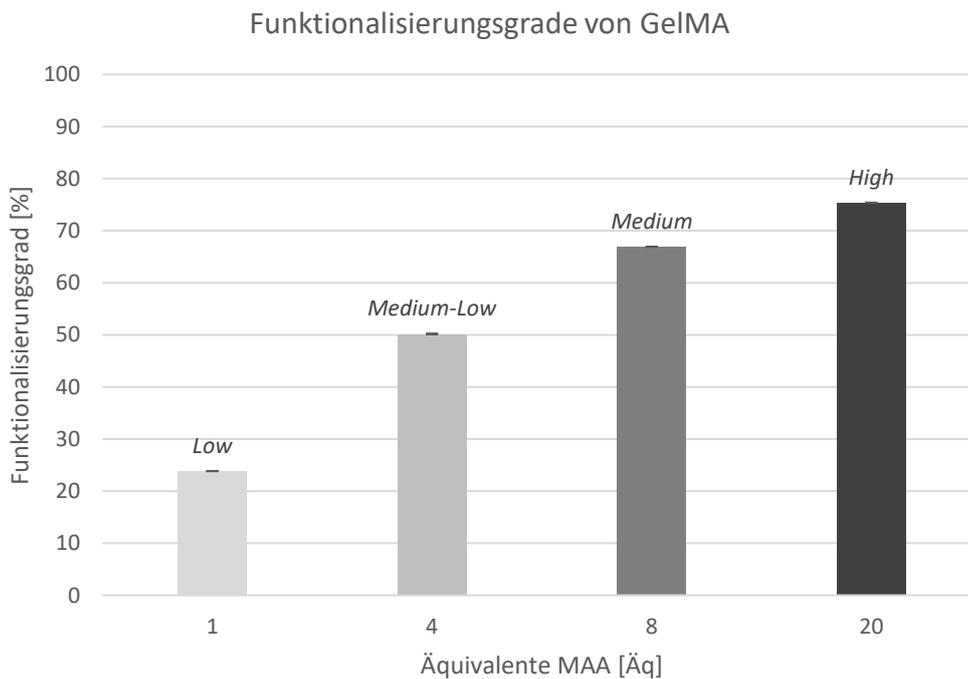
Die Synthese der methacrylierten Gelatine erfolgte nach dem Protokoll von Van Den Bulcke et al.<sup>101</sup> Die eingesetzte Menge der Methacrylsäure (MAA) wurde aus anderen Arbeiten (Sonja Haase, Tobias Göckler und Xenia Kempter, alle IFG, KIT) übernommen.<sup>130,131,248</sup> Dabei wurden vier verschiedene Varianten des GelMA hergestellt, wofür die Äquivalente (Äq) an zugegebenem MAA variiert wurden: GelMA *High* (20 Äq), GelMA *Medium* (8 Äq), GelMA *Medium-Low* (4 Äq) und GelMA *Low* (1 Äq). Die Reaktion der primären Aminogruppen der Gelatine mit der Methacrylsäure über eine nukleophile Acylsubstitution zu GelMA ist dem Schema 2 zu entnehmen.

1 g Gelatine wurde bei 50 °C in 10 ml DBPS<sup>-/-</sup> gelöst und die dem gewünschten Funktionalisierungsgrad entsprechende Menge MAA langsam zugetropft. Die Reaktion erfolgte für 2 h bei 50 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde das Reaktionsprodukt verdünnt und 7 Tage gegen ddH<sub>2</sub>O in einem Celluloseschlauch dialysiert. Das gereinigte GelMA wurde lyophilisiert und der weiße Feststoff bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.



**Schema 2: Synthese von GelMA.** In wässriger Umgebung reagieren die primären Aminogruppen der Gelatine über eine nukleophile Acylsubstitution zum Hydrogelpolymer GelMA.

Der Erfolg der Synthese konnte über einen TNBSA-Assay bestätigt werden. Dazu wurden die Proben wie zuvor beschrieben mit dem Reagenz TNBSA versetzt, welches an die freien Aminogruppen bindet. Das bedeutet, dass mit Zunahme der Funktionalisierung weniger gelbe Derivate ausgebildet wurden, da weniger freie  $\text{NH}_2$ -Gruppen vorhanden waren. Anhand einer Gelatinereferenz konnten über die Formel in Kapitel 5.2.2 die Funktionalisierungsgrade der synthetisierten Hydrogele berechnet werden. Das Ergebnis des TNBSA-Assays von GelMA ist der Abbildung 16 zu entnehmen.



**Abbildung 16: Funktionalisierungsgrade des synthetisierten GelMA.** Ergebnisse des TNBSA-Assays zur Bestimmung der Funktionalisierung der Gelatine mit MAA anhand der freien primären Aminogruppen. Getestet wurden die GelMA Varianten *Low* (24 %), *Medium-Low* (50 %), *Medium* (67 %) und *High* (75 %). Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und die Standardabweichung mit  $n-1$ .

Anhand der gemessenen Absorptionen wurde für GelMA *Low* ein Funktionalisierungsgrad von 24 %, für GelMA *Medium-Low* von 50 %, für GelMA *Medium* von 67 % und für GelMA *High* von 75 % berechnet. Zur Evaluierung der Synthese wurden die Funktionalisierungen mit Literaturwerten

verglichen. Der Vergleich der in dieser Arbeit berechneten Funktionalisierungsgrade mit den Literaturwerten sowie die daraus resultierenden Abweichungen sind in Tabelle 1 festgehalten.

Tabelle 1: Vergleich der errechneten Funktionalisierungsgrade des GelMA zu den angestrebten Werten aus der Literatur.<sup>130</sup>

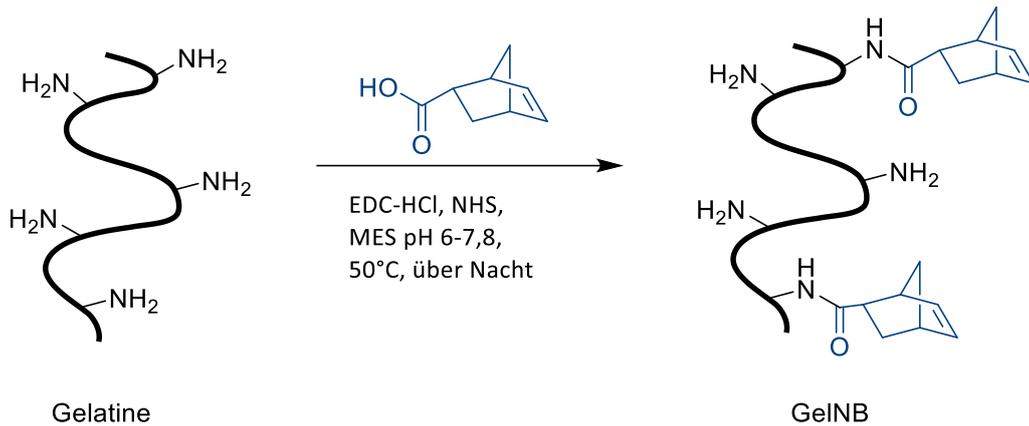
Äquivalente	Berechnete Funktionalisierung [%]	Literaturwerte [%]	Abweichung [%]
1.0 ( <i>Low</i> )	24	36	-12
4.0 ( <i>Medium-Low</i> )	50	48	+2
8.0 ( <i>Medium</i> )	67	59	+8
20.0 ( <i>High</i> )	75	71	+4

Zwischen den Werten sind Abweichungen von +8 % bis -12 % zu erkennen. Auch wenn das Syntheseprotokoll genau befolgt wurde, war eine geringfügige Abweichung nicht auszuschließen, da es sich bei der verwendeten Gelatine um ein Naturprodukt handelt. Aus diesem Grund variiert die Menge der in Gelatine enthaltenen Aminosäure L-Lysin und damit auch die Anzahl der freien funktionalisierbaren NH<sub>2</sub> Gruppen zwischen 3-5 %. Bei der Auswahl der geeigneten Hydrogelvarianten wurde vor allem darauf geachtet, dass der Unterschied der Funktionalisierungsgrade zwischen den Varianten groß genug war, um einen Einfluss auf die Festigkeit des Hydrogels zu haben.<sup>130</sup> Da sich die berechneten Funktionalisierungsgrade an die publizierten annähern, wurden für diese Arbeit die Polymere GelMA *High*, *Medium* und *Medium-Low* gewählt. Aus den Publikationen geht zudem eine schnelle Degradation und niedrige Festigkeit für GelMA *Low* hervor, weshalb dieses Polymer nicht für die 3D-Zellkultur verwendet wurde.<sup>249</sup>

### 3.1.2 GelNB

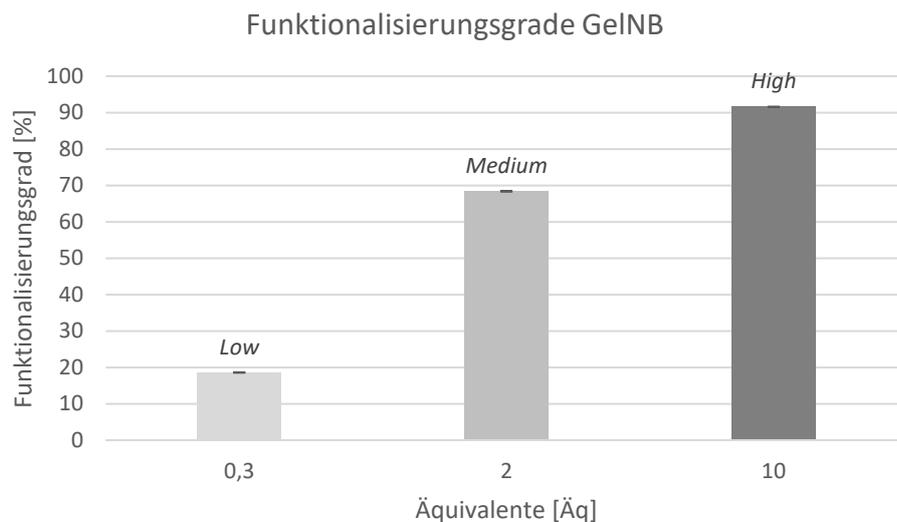
Bei GelNB handelt es sich um ein Hydrogelpolymer, welches mit Norbornencarboxylsäure funktionalisiert wird. In Anwesenheit eines thiolhaltigen Crosslinkers oder Hydrogels kann es über eine lichtinduzierte Thiol-En Reaktion polymerisiert werden. Aufgrund der hohen Effizienz und Geschwindigkeit dieser Reaktionen wird im Vergleich zur radikalischen Kettenfortpflanzung deutlich weniger Photoinitiator benötigt, was die Anzahl freier, toxischer Radikale deutlich verringert.<sup>250,251</sup> Für die Synthese unterschiedlich funktionalisierter GelNB Polymere wurde die Menge an eingesetzter Norbornencarboxylsäure variiert. Diese Mengen wurden ebenfalls anhand der 0,266 mmol primärer Aminogruppen pro Gramm Gelatine berechnet und orientieren sich an den Angaben von Göckler et al.<sup>120</sup> Dabei entstanden die GelNB-Polymere GelNB *High* (10 Äq), GelNB *Medium* (2 Äq) und GelNB *Low* (0,3 Äq). Das Reaktionsschema der GelNB Synthese ist in Schema 3 abgebildet.

Die Norbornencarboxylsäure wurde in 10 ml MES-Puffer (pH 6) gelöst. Anschließend wurden nacheinander EDC-HCl und NHS hinzugegeben und das Gemisch auf 50 °C erhitzt. Nach 15 min Rühren bei 50 °C wurde die Gelatine langsam hinzugegeben und der pH-Wert mit NaOH auf 7,5-7,8 eingestellt. Die Reaktion erfolgte über Nacht, danach wurde das GelNB zur Aufreinigung in Dialyseschläuche gefüllt und für 7 Tage gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert. Nach der Lyophilisation wurde der weiße Feststoff bei -20 °C gelagert. Die Reaktion der Norbornencarboxylsäure mit der Gelatine ist in Schema 3 dargestellt.



**Schema 3: Synthese von GelNB.** Mit Hilfe von EDC-HCl und NHS wird die Norbornencarboxylsäure zunächst aktiviert und reagiert dann über Nacht bei 50 °C mit den primären Aminen der Gelatine zu dem Hydrogelpolymer GelNB.

Zur Überprüfung der Funktionalisierungsgrade wurde das synthetisierte GelNB ebenfalls einem TNBSA-Assay unterzogen. Anhand der gemessenen Absorptionswerte nach der Reaktion konnten die in Abbildung 17 aufgetragenen Funktionalisierungen über die Formel in Kapitel 5.2.2.1 bestimmt werden.



**Abbildung 17: Funktionalisierungsgrade des synthetisierten GelNB.** Ergebnisse des TNBSA-Assays zur Bestimmung der Funktionalisierung der Gelatine mit Norbornencarboxylsäure anhand der freien primären Aminogruppen. Getestet wurden die GelMA Varianten *Low* (19 %), *Medium* (68 %) und *High* (92 %). Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit n=3 und die Standardabweichung mit n-1.

Aus dem TNBSA-Assay resultierten Funktionalisierungen von 19 % für GelNB *Low*, von 68 % für GelNB *Medium* und von 92 % für GelNB *High*. In der nachfolgenden Tabelle 2 werden die berechneten Funktionalisierungsgrade mit den Literaturwerten verglichen.

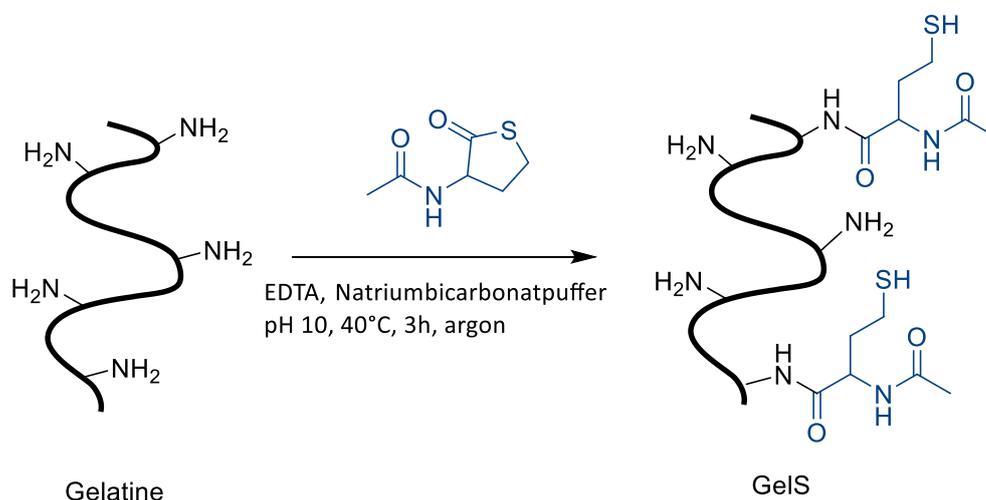
Tabelle 2: Vergleich der errechneten Funktionalisierungsgrade des GelNB zu den angestrebten Werten aus der Literatur.<sup>120,130</sup>

Äquivalente	Berechnete Funktionalisierung [%]	Literaturwerte [%]	Abweichung [%]
0,3 ( <i>Low</i> )	19	21,0	-2
2 ( <i>Medium</i> )	68	53,0	+15
10 ( <i>High</i> )	92	97,0	-5

Auch bei dieser Synthese ergaben sich Abweichungen zwischen -2 bis +15 %. Jedoch wurde der Unterschied zwischen den Funktionalisierungsgraden der synthetisierten Polymere als groß genug befunden, um durch die Polymerisation unterschiedliche physikalische Eigenschaften zu erzielen. Wie auch schon zuvor bei GelMA wurde bei der Auswahl der GelNB Polymere ebenfalls die *Low* Variante nicht berücksichtigt, da sie sich aufgrund der geringen mechanischen Stabilität nicht als Grundgerüst für hydrogelbasierte 3D-Zellkulturen eignet.<sup>249</sup> Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit nur mit GelNB *High* und GelNB *Medium* gearbeitet.

### 3.1.3 Gels

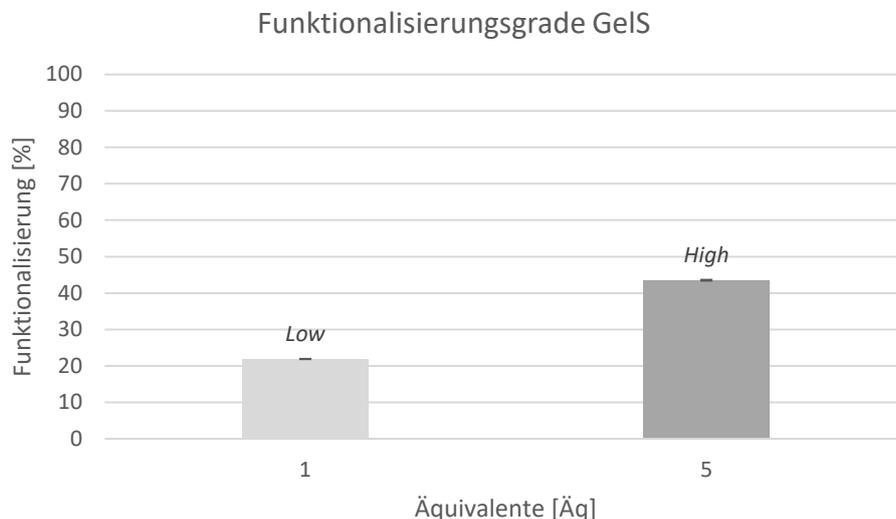
Bei GelS handelt es sich um ein thioliertes Hydrogelpolymer. Über seine Thiolgruppen kann das semi-synthetische Polymer eine Thiol-en oder Thiol-in Reaktion eingehen. In dieser Arbeit wurden zwei Varianten hergestellt, GelS *High* (5 Äq) und GelS *Low* (1 Äq). Für Funktionalisierung von GelS wird *N*-Acetyl-DL-homocysteinethiolacton in wässriger Umgebung durch eine nucleophile Acylsubstitution unter Ringöffnung an die freien Aminogruppen der Gelatine gekuppelt, was in Schema 4 dargestellt ist.



**Schema 4: Synthese von GelS.** In wässriger Umgebung reagiert das Thiolacton unter Ringöffnung über eine nucleophile Acylsubstitution mit den primären Aminen der Gelatine, wodurch das Polymer GelS gewonnen wird.

Für die Synthese von GelS nach van Vlierberghe et al. wurden 1 g Gelatine zusammen mit einer Spatelspitze EDTA in einem Schlenkcolben entgast und mit Stickstoff geflutet.<sup>103</sup> 10 ml Natriumbicarbonatpuffer wurden ebenfalls entgast und zu der Gelatine in den Kolben gegeben. Bei 40 °C wurde die Gelatine so lange in dem Puffer gerührt, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde die entsprechende Menge *N*-Acetyl-DL-homocysteinethiolacton je nach gewünschtem

Funktionalisierungsgrad hinzugegeben. Die Reaktion fand für 3 h bei 40 °C statt. Danach wurde das Gels für 24 h gegen entgastes ddH<sub>2</sub>O dialysiert, lyophilisiert und bis zur Verwendung unter Stickstoff bei -80 °C gelagert. Von den fertigen Produkten wurde zur Bestimmung der Funktionalisierung ein TNBSA-Assay gemacht, dessen Ergebnisse in Abbildung 18 zu sehen sind.



**Abbildung 18: Funktionalisierungsgrade des synthetisierten Gels.** Ergebnisse des TNBSA-Assays zur Bestimmung der Funktionalisierung der Gelatine mit Acetylhomocysteinthiolacton anhand der freien primären Aminogruppen. Getestet wurden die Gels Varianten *Low* (22 %) und *High* (44 %).

Für die Gels Polymere *Low* und *High* konnten Funktionalisierungsgrade von 22 % und 44 % erreicht werden. Anhand der Tabelle 3 wurden die erzielten Ergebnisse mit den in der Literatur veröffentlichten Werten verglichen. Beide Polymere zeigen eine nur geringfügige Abweichung der Funktionalisierungsgrade von den Literaturwerten.

Tabelle 3: Vergleich der errechneten Funktionalisierungsgrade des Gels zu den angestrebten Werten aus der Literatur.<sup>120,130</sup>

Äquivalente	Berechnete Funktionalisierung [%]	Literaturwerte [%]	Abweichung [%]
1 ( <i>Low</i> )	22	20,0	+2
5 ( <i>High</i> )	44	50,0	-6

Da das Gels in dieser Arbeit ausschließlich mit GelNB vernetzt werden sollte, wurde nicht nur GelNB *Low* ausgeschlossen, sondern auch Gels *Low*, da diese beiden Polymere zusammen das Hydrogel GelNB/Gels *Low* bilden. Durch Degradationsversuche konnte Alisa Grimm (IFG, KIT) in ihrer Arbeit zeigen, dass GelNB/Gels *Low* Hydrogele im Vergleich zu den anderen Varianten nur eine geringe enzymatische Stabilität besitzen und innerhalb von 7 Tagen vollständig abgebaut wurden.<sup>249</sup> Aus diesem Grund wurde nur das stabilere Gels *High* für die Hydrogelchips verwendet.

### 3.1.4 Zusammensetzung und Polymerisation der Hydrogele

Nach der Synthese und Auswahl geeigneter Hydrogele konnten diese in der 3D-Zellkultur und für die Fabrikation der Hydrogelchips verwendet werden. Dazu wurden von den Feststoffen zunächst Stammlösungen in DPBS<sup>-/-</sup> bei 50 °C gelöst. Um die Photopolymerisation der Hydrogele zu

ermöglichen, wurden diese mit dem Photoinitiator Lithiumphenyltrimethylbenzoylphosphinat (LAP) vermengt. Dieser absorbiert bei einer Wellenlänge von etwa 375 nm im UV-Bereich und kann dadurch Radikalpolymerisationen induzieren.<sup>252</sup> Anschließend wurden die Stammlösungen der Hydrogele mit einer Zellsuspension auf eine Endkonzentration von 5 % verdünnt. Diese Polymerkonzentration sowie die optimale Konzentration des Photoinitiators LAP konnten bereits in der Vergangenheit in der Gruppe etabliert werden.<sup>130</sup> Bei der Polymerkonzentration war dabei entscheidend, dass die Steifigkeit des entstehenden Netzwerks an die mechanischen Eigenschaften der natürlichen Gewebe angepasst werden kann. Dennoch sollte eine Porengröße erhalten bleiben, die Zell-Zell-Kontakte und Migration begünstigt. Bei einer Polymerkonzentration von 5 % konnte sowohl eine gute Zellviabilität, als auch die Migration und Proliferation gewährleistet werden. Die Wahl des Photoinitiators fiel auf LAP, da er eine gute Wasserlöslichkeit besitzt und bei 375 nm Polymerisationsreaktionen induzieren kann. Dabei musste zum einen eine Konzentration gewählt werden, bei der die Hydrogele möglichst schnell aushärten um eine unnötig lange Bestrahlung der Zellen im UV-Spektrum zu vermeiden, zum anderen durfte sie nicht zu hoch gewählt werden, da LAP selber eine Zytotoxizität aufweist.<sup>130</sup> Nach ausgiebigen Aushärtungs- und Bestrahlungsversuchen sowie Toxizitätstests wurde für GelMA eine LAP Konzentration von 0,3 % (w/v) und für GelNB/GelS Hydrogele von 0,03 % bestimmt.<sup>130,131</sup> Die Herstellung und Zusammensetzung der Polymerlösungen sowie die Aushärtungsbedingungen sind im Detail in Kapitel 5.2.3 beschrieben.

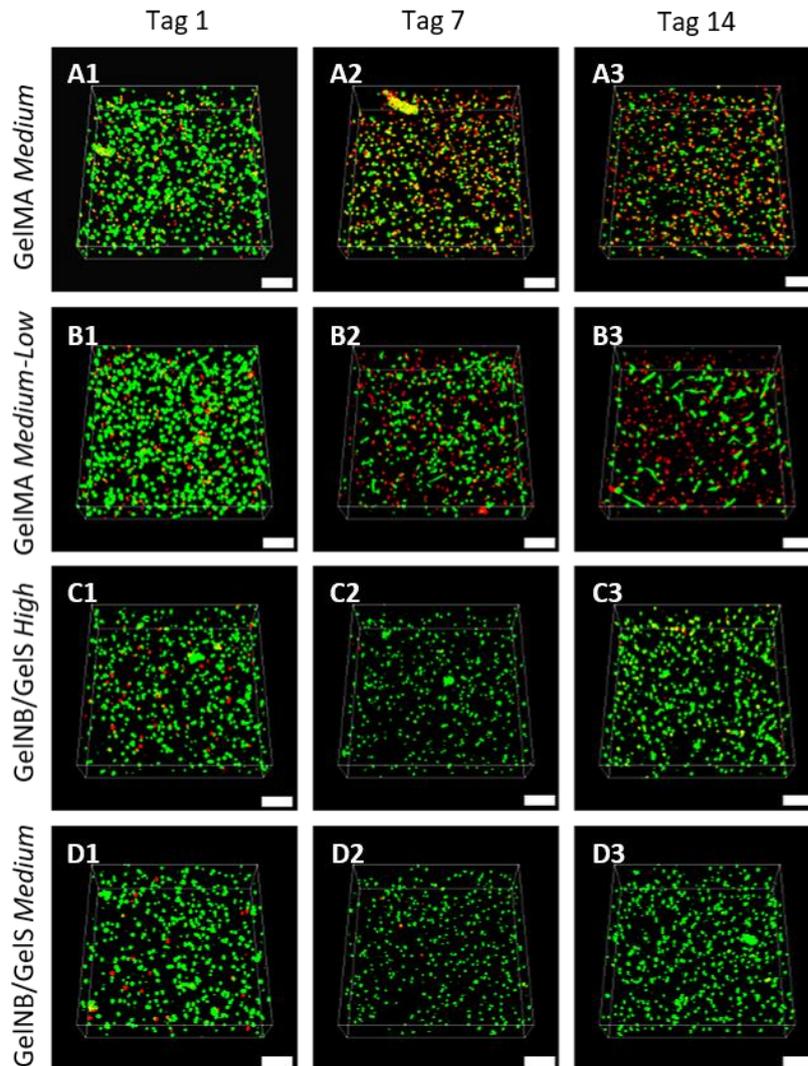
### 3.1.5 Gelatinebasierte Hydrogele in der Zellkultur

Für die Verwendung der Hydrogele in der Zellkultur ist vor allem eine gute Biokompatibilität entscheidend, damit sie ihre Aufgabe als artifizielle EZM zuverlässig erfüllen können. Neben den zuvor beschriebenen toxischen Eigenschaften der Hydrogele spielen dabei auch ihre Adhäsionseigenschaften eine große Rolle. Das Fehlen dieser kann sich negativ auf die Zellproliferation, Migration und die Viabilität auswirken. Zur Untersuchung der Biokompatibilität können 3D- und 2,5D-Zellkulturen verwendet werden, anhand welcher die Adhäsion und Viabilität der Zellen ermittelt werden können. Diese dreidimensionale Evaluierung wurde für die hier vorgestellten Hydrogele bereits mit verschiedenen Zellarten durchgeführt, jedoch nicht mit HUVEC-GFP Zellen.<sup>130</sup> Die HUVEC-GFP wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Rekonstruktion der Blutgefäße der Chip-Systeme verwendet, da es sich um humane Endothelzellen aus der Nabelschnur handelt. Zudem wurden die HUVEC-GFP genetisch so verändert, dass sie das grün fluoreszierende Protein GFP exprimieren können. Um die Kompatibilität der Hydrogele auch mit diesem Zelltyp zu evaluieren, sollte Viabilität und Adhäsion der HUVEC-GFP in und auf den Hydrogelen untersucht werden.

#### 3.1.5.1 3D-Zellkultur

Dazu wurden die HUVEC-GFP zunächst dreidimensional in die Hydrogele eingebettet. Wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben, wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml unter die Hydrogelvorläufer gemischt und je 200  $\mu$ l Gel in den *Wells* eines 8-Well ibidi *Slides* ausgehärtet. Die Kultivierung der dreidimensionalen Zellkulturen erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei jeweils ein Gel für die Inkubationsdauer von 1, 7 und 14 Tagen angesetzt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung der eingebetteten HUVEC-GFP. Dazu wurden die Gele mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid (PI) in EGM-GFP für 20 min behandelt. Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert, aber in der Regel nicht membrangängig ist. Daher färbt PI

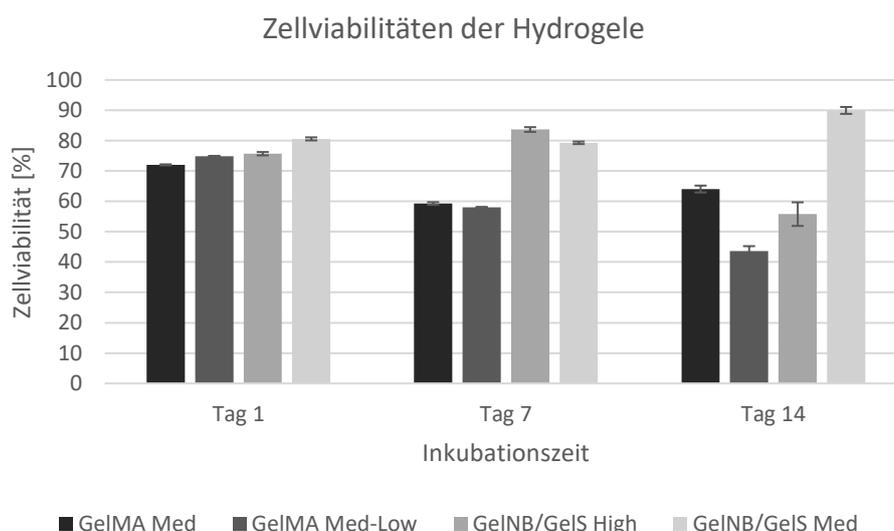
lediglich die frei zugängliche DNA nekrotischer Zellen, wodurch nach der Anregung mit einer Wellenlänge von 532 nm nur die toten Zellen rot fluoreszieren.<sup>253</sup> Die lebenden, metabolisch aktiven Zellen hingegen exprimieren weiterhin GFP (engl.: *green fluorescent protein*) und können in der Lebend-Tot-Färbung grün dargestellt werden. Das Ergebnis der in den Hydrogelen eingebetteten, mit PI gefärbten HUVEC-GFP ist in Abbildung 19 zu sehen.



**Abbildung 19: Lebend-Tot-Färbung der in GelMA und GelNB/GelS eingebetteten HUVEC-GFP.** Zur Evaluierung der Biokompatibilität der unterschiedlich funktionalisierten Hydrogele (GelMA *Medium* **A1-A3**; GelMA *Medium-Low* **B1-B3**, GelNB/GelS *High* **C1-C3**, GelNB/GelS *Medium* **D1-D3**) wurden  $5 \cdot 10^5$  HUVEC-GFP pro ml mit dem Hydrogel gemischt. Jeweils 200  $\mu$ l Hydrogel-Zellsuspension (5 % Gelkonzentration w/v) wurden in dem *Well* eines 8-*Well* ibidi *Slides* mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet. Die Herstellung der Gele erfolgte in Triplikaten. Nach der Kultivierung der 3D-Zellkulturen über die Zeiträume von 1, 7 und 14 Tagen wurden die toten Zellen mit 0,02 mg/ml des Farbstoffes Propidiumiodid markiert. Die Visualisierung der toten (PI, rot,  $\lambda_{\text{ex}}=532$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=550-650$  nm) und der lebenden Zellen (GFP, grün,  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm) erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 (10x Dry, Zoom: 1,0) und die Aufnahme von *Z-Stacks* (Höhe:300  $\mu$ m, Schrittgröße: 5  $\mu$ m). Die Zusammenstellung der *Z-Stacks* erfolgte mit der Leica LASX 3D-Software. Maßstab: 200  $\mu$ m.

Die dreidimensionale Kultivierung der HUVEC-GFP über einen Zeitraum von 14 Tagen zeigte unterschiedliche Ergebnisse in den GelMA und GelNB/GelS Hydrogele. Während an Tag 1 in allen Hydrogelen überwiegend lebende Zellen zu erkennen waren, nahm die Zellviabilität in den GelMA

Hydrogelen im Laufe der Zeit stark ab. Vor allem bei den *GelMA Medium* Gelen stieg die Zahl an toten Zellen (rot). Bei den *GelMA Medium-Low* Gelen ist ein ähnliches Ergebnis zu erkennen, jedoch zeigten diese an Tag 14 immerhin morphologische Änderungen der Zellen, was für die Ausbildung von Adhäsionskontakten zum Hydrogel spricht. Die Zellviabilität in den *GelNB/GelS* Hydrogelen hingegen blieb während der 14 Tage konstant hoch. Jedoch waren hier keine morphologischen Änderungen zu erkennen. Dieselben Beobachtungen sind auch in der Literatur zu finden. Hier konnte über den Zeitraum von 21 Tagen keine Zellausrichtung detektiert werden.<sup>130</sup> Zum genaueren quantitativen Vergleich der einzelnen Hydrogelarten und Varianten wurde die Anzahl lebender (grüner) und toter (roter) Zellen anhand der *Z-Stacks* mit Hilfe der Software ImageJ bestimmt und in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 20).



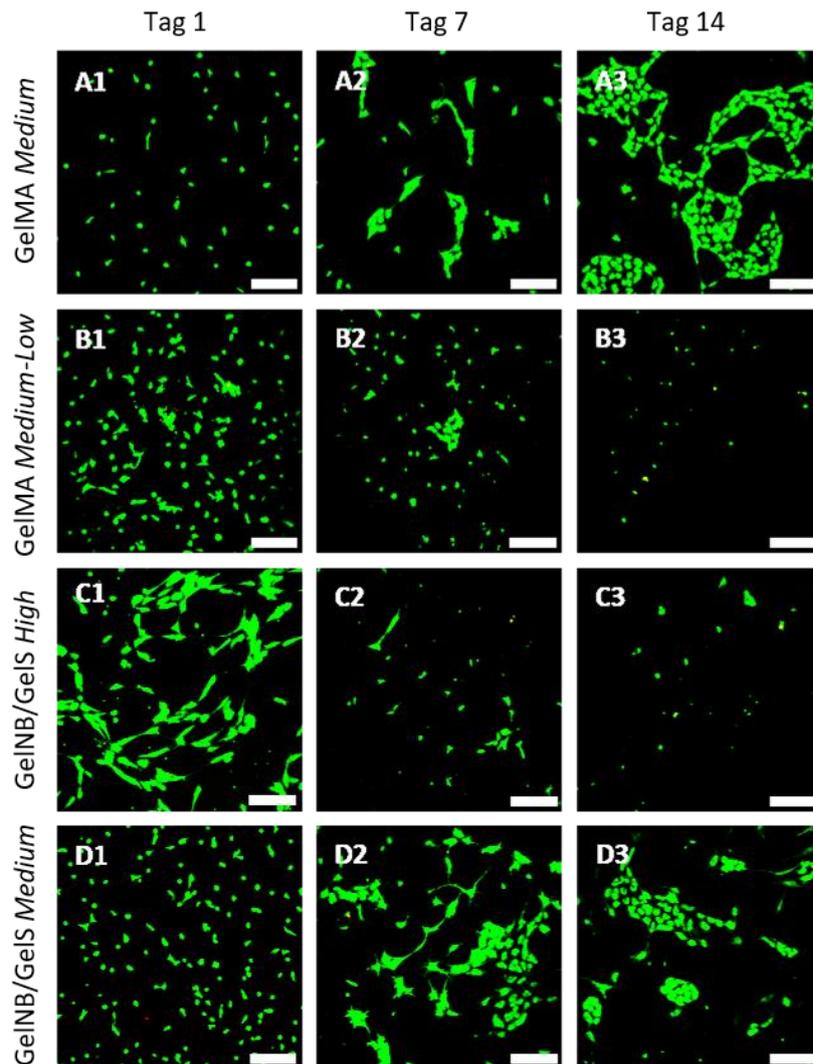
**Abbildung 20: Viabilitäten der in den Hydrogelen eingebetteten HUVEC-GFP.** Die Auswertung der Zellviabilitäten in den Hydrogelen *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low*, *GelNB/GelS High* und *GelNB/GelS Medium* erfolgte über einen Kultivierungszeitraum von 14 Tagen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und die Standardabweichung mit  $n-1$ .

Aus der Auswertung der 3D-Aufnahmen der eingekapselten HUVEC-GFP ergaben sich vor allem an Tag 1 hohe Viabilitäten zwischen 70 und 80 % für alle Hydrogele. Während die Zellviabilität in den *GelNB/GelS Medium* Gelen hoch blieb und an Tag 14 auf beinahe 90 % anstieg, konnte in den anderen Hydrogelen ein Verlust der lebenden Zellen festgestellt werden. Ähnliche Werte und zeitliche Veränderungen konnte auch Sonja Haase (IFG, KIT) anhand ihrer Untersuchungen der in den Hydrogelen eingekapselten HUVEC gewinnen. Auch hier wurde eine bessere Biokompatibilität der *GelNB/GelS* Hydrogele vor allem über einen längeren Zeitraum nachgewiesen.<sup>130</sup> Göckler et al. fanden durch verschiedene toxikologische Untersuchungen mehrere Erklärungen für die höhere Toxizität der *GelMA* Hydrogele. Zum einen spielt die höhere Photoinitiatorkonzentration in den *GelMA* Gelen eine Rolle. Durch die lichtinduzierte Reaktion entstehen zellschädliche Radikale, von denen durch die geringere LAP-Konzentration in *GelNB/GelS* weniger gebildet werden. Zum anderen entstehen während des Abbauprozesses der Gele toxische Nebenprodukte, wodurch die Zunahme des Zelltodes über die 14 Tage erklärt werden kann.<sup>120</sup>

### 3.1.5.2 2,5D-Zellkultur

Durch die Lebend-Tot-Färbungen der 3D-Zellkulturen wurde den Zellen in den Hydrogelen bereits eine gute Viabilität nachgewiesen. Neben der toxikologischen Charakterisierung sollten auch, wie  
30

bereits erwähnt die Adhäsionseigenschaften der Hydrogeloberfläche untersucht werden. Dazu wurden, wie in Kapitel 5.2.7 beschrieben, 200  $\mu\text{l}$  der Hydrogele (5 % w/v) in einem ibidi *Slide* ausgehärtet (320-500 nm, 500  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) und mit 200  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension von  $5 \cdot 10^4$  HUVEC/ml beschichtet. Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , gesättigte Luftfeuchtigkeit) erfolgte die erste Evaluation der Zelladhäsion auf den Hydrogelen. Dazu wurden die Gele erneut einer Lebend-Tot-Färbung mit Propidiumiodid (0,02 mg/ml) unterzogen und mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 ausgewertet. Nach 7 und 14 Tagen erfolgte die gleiche Auswertung noch einmal. Die Fluoreszenzaufnahmen der Gele an Tag 1, 7 und 14 sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abbildung 21: Adhäsionsassay von HUVEC-GFP Endothelzellen auf den Hydrogeloberflächen.** Die Adhäsionseigenschaften der Hydrogele *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low*, *GelNB/GelS High* und *GelNB/GelS Medium* wurden getestet indem 200  $\mu\text{l}$  der Hydrogellösungen (5 % Gelkonzentration w/v) in je einem *Well* eines ibidi 8-*Well Slides* unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) polymerisiert wurden. Auf den ausgehärteten Hydrogelen wurden anschließend  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml ausgesät, welche nach einer Inkubationszeit von 1, 7 und 14 Tagen mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid gefärbt wurden. Die Visualisierung der toten (PI, rot,  $\lambda_{\text{ex}}=532$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=550-650$  nm) und der lebenden Zellen (GFP, grün,  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm) erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Konfokalmikroskop (Leica Stellaris 5, 10x Dry, Zoom: 1,0). Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

Da die Zellen in diesem Experiment nicht in den Gelen eingeschlossen waren, sondern planar auf der Oberfläche ausgesät wurden, konnten sich abgestorbene Zellen von den Gelen lösen und durch den regelmäßigen Wechsel des Zellkulturmediums mit abgenommen werden. Daher wurden bei diesem Experiment nur die lebenden, auf den Gelen angewachsenen HUVEC-GFP beobachtet. Am Tag 1 zeigte sich auf allen Gelen eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC-GFP, wobei es auf den GelNB/GelS Gelen erste Veränderungen der Zellmorphologie gab. Dies spricht für die Ausbildung von Adhäsionskontakten zwischen den Zellen und den Hydrogelpolymeren. Nach 7 Tagen hatte die Zelldichte auf den Gelen GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *High* deutlich abgenommen. Auf dem GelMA *Medium* und dem GelNB/GelS *Medium* Gel hingegen haben die HUVEC sich zusammengelagert und kleinere Zellverbände gebildet und auch die Zellmorphologie auf diesen Gelen spricht für Adhäsionskontakte. Ähnlich verhielt sich das Wachstum am Tag 14, wobei die Zelldichte bei GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *High* weiter abgenommen hat und die Zellverbände auf GelMA *Medium* und GelNB/GelS *Medium* größer wurden. Auf keinem der Gele konnte jedoch innerhalb der 14 Tage eine konfluente Endothelzellschicht etabliert werden oder eine für Endothelzellen typische vaskuläre Vernetzung erzeugt werden. Für solche Netzwerke werden in der Regel allerdings höhere HUVEC-GFP Konzentration verwendet. Monteiro et al. beispielsweise konnten eine stabile Netzwerkbildung in ihren GelMA Gelen erst bei Konzentrationen von  $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml erreichen.<sup>254</sup>

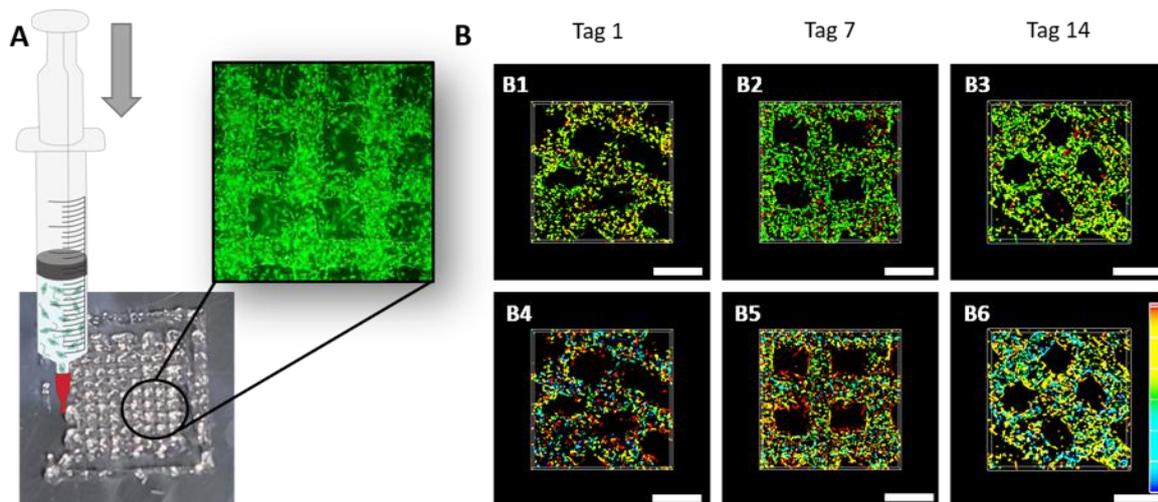
### 3.1.6 Gelatine-basierte Hydrogele als Biotinten

Neben ihrer hohen Biokompatibilität und den Adhäsionsmotiven besitzen gelatinebasierte Hydrogelpolymere temperaturabhängige, viskoelastische Eigenschaften, wodurch sie sich als Biotinten für verschiedene 3D-Druckmethoden eignen.<sup>116</sup> Zwischen 20 und 30 °C beginnen Hydrogelpolymere zu gelieren, wodurch innerhalb dieses Temperaturbereichs die Viskosität der Polymere variiert werden kann.<sup>255</sup>

#### 3.1.6.1 Extrusionsdruck

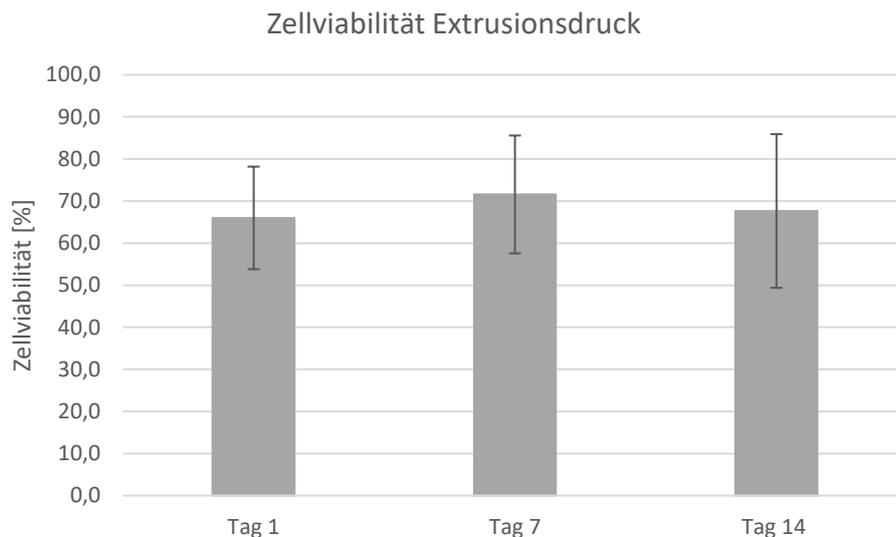
Besonders gut eignen sich die Hydrogelpolymere daher für den extrusionsbasierten Druck. Bei diesem Verfahren werden Biotinten in eine Kartusche oder einen Druckkopf gefüllt und durch eine Kanüle extrudiert. So formen sich Filamente, welche Schicht-für-Schicht übereinander gedruckt werden können, sodass dreidimensionale Objekte entstehen.<sup>256</sup> Durch die Verwendung eines Bioextrusionsdruckers wie dem BioSpot BP (Biofluidix) wird der Einsatz von Hydrogelpolymeren als Biotinten möglich. Dafür müssen die Hydrogele allerdings ein scherverdünnendes Verhalten aufzeigen. Das bedeutet, dass die gelierten Hydrogele durch den zunehmenden Scherstress bei der Extrusion in einen flüssigen Zustand übergehen, aber anschließend sofort wieder gelieren. So können die Hydrogele durch die Dosiernadeln extrudiert werden und behalten trotzdem eine Formstabilität. Im Falle der hier vorgestellten funktionalisierten Hydrogelpolymere werden diese nach jeder gedruckten Schicht über eine photoinduzierte Polymerisation zuerst vernetzt, bevor eine weitere Schicht gedruckt wird. So kann die Stabilität des Druckobjekts erhöht werden. Durch diese Druckbedingungen entstehen allerdings auch einige Nachteile für den extrusionsbasierten Druck von zellbeladenen Materialien. Beispielsweise entsteht ein Scherstress für die Zellen, wenn diese durch die Kanüle gepresst werden, welcher sich negativ auf die Zellviabilität auswirken kann.<sup>144</sup> Dieser Scherstress ist abhängig von dem verwendeten Druck und auch von dem Durchmesser der Dosiernadel beziehungsweise von der Dosiernadelform. Sonja Haase (Institut für funktionelle Grenzflächen, KIT), Xenia Kempter (Institut für funktionelle Grenzflächen, KIT) und

Bruna Regina Maciel (Institut für Mechanische Verfahrenstechnik, KIT) haben sich bereits eingehend mit dem Verhalten der Zellen auf den Scherstress durch den Extrusionsdruck in GelMA und GelNB/GelS auseinander gesetzt. Untersucht wurde neben dem optimalen Durchmesser der Dosiernadeln auch die Form der Kanülen und der dazu passende Extrusionsdruck. Die besten Ergebnisse mit der höchsten Druckauflösung und maximaler Zellviabilität konnten mit einer konischen Dosiernadel mit einem Durchmesser von 250  $\mu\text{m}$  und einem Extrusionsdruck von 0,1 MPa erreicht werden.<sup>130,131</sup> Da im Zuge dieser Experimente sehr hohe Zellviabilitäten nach dem Extrusionsdruck in den Hydrogelen GelMA *Medium*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* bereits ermittelt werden konnten, wurde im Zuge dieser Arbeit auf die erneute Evaluierung dieser Hydrogele verzichtet.<sup>130</sup> Für GelMA *Medium-Low* wurden diese Versuche noch nicht gemacht, weshalb diese nachgezogen wurden, um den Datensatz für alle hier untersuchten Biotinten zu komplettieren. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen wurden die Biotinten mit humanen Hautfibroblasten (eng.: *normal human dermal fibroblasts*, NHDF) beladen. Als Biotinte wurde GelMA *Medium-Low* (5 % w/v in DMEM) mit dem Photoinitiator LAP (0,3 % w/v) und  $2,5 \cdot 10^6$  NHDF/ml vermischt und in eine Kartusche mit konischer Dosiernadel gefüllt. Anschließend wurde die vorbereitete Tinte im BioSpot vor dem Druck auf 21 °C temperiert. Diese Temperatur war für GelMA *Medium-Low* optimal, da so ein durchgängiges Filament extrudiert werden konnte und das Material gleichzeitig fest genug war, um die gedruckte Struktur beizubehalten. Zusätzlich wurde das Druckbett auf 19 °C gekühlt, um die Struktur zusätzlich zu festigen. Für den Druckversuch wurde eine Gitterstruktur (1 cm x 1 cm) gewählt, welche aus vier Schichten aufgebaut ist. Abwechselnd wurden die Schichten im Zick-Zack Muster in X- und Y-Richtung aufeinander gedruckt, wodurch eine dreidimensionale Struktur erhalten wurde. Jede Schicht wurde nach dem Druck einzeln unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet, was dem Druck in die Höhe Stabilität verlieh. Die gedruckten Strukturen wurden anschließend mit 5 ml DPBS<sup>-</sup> gewaschen, mit DMEM bedeckt und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. An den Tagen 1, 7 und 14 wurde je eine Struktur mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid und 4  $\mu\text{M}$  Calcein AM einer Lebend-Tot-Färbung unterzogen. Das nicht fluoreszierende Calcein AM wird dabei von lebenden Zellen zu fluoreszierendem Calcein verstoffwechselt. Die Auswertung dieser Färbung erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Die entstanden Aufnahmen sind in Abbildung 22 zu sehen.



**Abbildung 22: Extrusionsdruck von zellbeladenem GelMA *Medium-Low*.** **A:** Unter 5%iges GelMA *Medium-Low* (0,3 % LAP) wurden  $2,5 \times 10^6$  NHDF/ml gemischt und in eine Spritze mit konischer Dosiernadel gegeben. Mit dem BioSpot BP von Biofluidix wurde die Biotinte auf 21 °C gekühlt, um die optimale Viskosität für den Extrusionsdruck einzustellen. Nach Erreichen der Temperatur wurde mit der zellbeladenen Tinte eine Gitterstruktur gedruckt, indem zunächst eine Schicht in X-Richtung gedruckt und dann ausgehärtet wurde. Danach wurde eine weitere Schicht in Y-Richtung gedruckt und auch ausgehärtet. Nach diesem Prinzip wurden vier Schichten übereinander gedruckt, sodass die dreidimensionale Gitterstruktur entstand. **B:** Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde die Zellviabilität in den Strukturen evaluiert, indem die Zellen mit Calcein AM (4  $\mu$ M, grün,  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500-550$  nm) und Propidiumiodid (0,02 mg/ml, rot,  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 550-650$  nm) markiert wurden. Die Abbildungen **B1-B3** zeigen Z-Stack Aufnahmen dieser Lebend-Tot-Färbungen (Größe: 300  $\mu$ m, Schrittgröße: 5  $\mu$ m) und **B4-B6** sind Tiefenfarbungen dieser Bilder. Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 gemacht. Die Z-Stack Aufnahmen wurden mit der 3D-Software Leica LASX bearbeitet. Maßstab: 1 mm.

Die Auswertung des 3D-Biodrucks von NHDF beladenem GelMA *Medium-Low* zeigte neben einer sehr gleichförmigen Gitterstruktur auch eine gleichmäßige, dreidimensionale Verteilung der Zellen in den Gelen. Zudem konnte bereits an Tag 1 eine Ausrichtung der NHDF beobachtet werden, was für die Ausbildung von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten spricht. Über den Verlauf der zwei Wochen nahmen diese Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte weiter zu. Des Weiteren konnte für alle Tage eine hohe Anzahl lebender Zellen detektiert werden, was eine gute Zellviabilität nach dem Druckprozess bestätigt. Um dies noch besser beurteilen zu können, wurden mit Hilfe von ImageJ die Anzahlen der lebenden und toten Zellen und daraus die Viabilität der NHDF bestimmt. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abbildung 23 zu sehen.



**Abbildung 23: Zellviabilität in extrusionsgedruckten GelMA *Medium-Low* Strukturen.** Auswertung der Viabilitäten der NHDF in den GelMA *Medium-Low* Strukturen an Tag 1, 7 und 14 nach dem Extrusionsdruck. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und die Standardabweichung mit  $n-1$ .

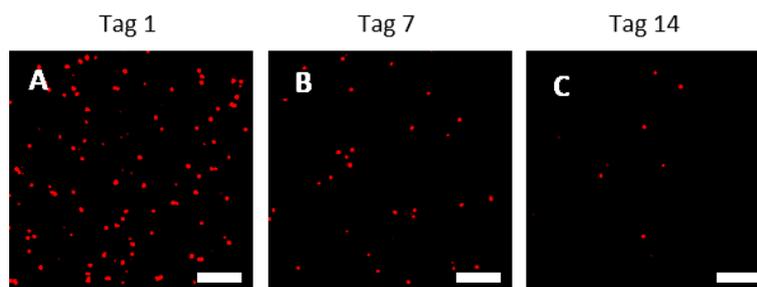
Für die in GelMA *Medium-Low* gedruckten NHDF ergab sich über den Zeitraum von 14 Tagen eine gleichbleibende Viabilität von 65-71 %. Im Vergleich zu den Viabilitätsuntersuchungen, welche mit den dreidimensional eingebetteten HUVEC-GFP durchgeführt wurden, ergaben sich vergleichbare Werte. Das wiederum ließ darauf schließen, dass durch die kritischen Faktoren beim Extrusionsdruck wie dem Scherstress oder den niedrigen Temperaturen keine Beeinträchtigungen der Zellviabilität entstehen. Ähnliche Ergebnisse beschreiben auch Göckler et al.<sup>120</sup> Im Detail konnte für GelMA *Medium* eine Viabilität von 65 % und für GelMA *Low* von 83 % bestimmt werden. Allgemein wurde in den GelNB/GelS Hydrogelen eine höhere Viabilität nachgewiesen als in den GelMA Gelen, welche mit zunehmendem Funktionalisierungsgrad toxischere Eigenschaften aufwiesen. Dies lässt sich vor allem durch die freien, reaktiven Methacrylatgruppen des GelMA erklären. Diese können bei physischem Kontakt mit Zellen Reaktionen mit diesen eingehen und sie in ihrer Funktion stören. Zudem wird für die GelMA Gele mehr Photoinitiator benötigt, was zu mehr freien Radikalen führt, die ebenfalls zelltoxische Eigenschaften besitzen.<sup>120</sup>

### 3.1.6.2 Xolographie

Neben dem extrusionsbasierten Verfahren wurde eine weitere Druckmethode für die Herstellung der Hydrogelchips getestet. Bei dieser Methode handelt es sich um die Xolographie, ein volumetrisches Druckverfahren. Volumetrisch bedeutet, dass der Druck innerhalb des Volumens einer Polymerlösung stattfindet. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zum extrusionsbasierten Druck liegt hier vor allem bei der Auflösung. Während diese beim Extrusionsdruck abhängig vom Durchmesser der Dosiernadel sowie von der Viskosität des Materials ist, können mit dem volumetrischen Druck komplexe Strukturen bis zu einer Auflösung von 14  $\mu\text{m}$  hergestellt werden.<sup>141</sup> In dieser Arbeit wurde mit dem volumetrischen Drucker Xube der Firma xolo GmbH gearbeitet. Dabei handelt es sich um einen Prototypen des Druckers, welcher bis dato kaum für den 3D-Biodruck eingesetzt wurde. Aus diesem Grund stellte der erste Schritt die Entwicklung einer geeigneten Biotinte dar. Im Vordergrund stand dabei, dass die gedruckten Strukturen eine gewisse Stabilität besitzen müssen, um sie nach dem Druck aus der Küvette herausholen zu können. Daher wurde als Hauptkomponente der Xube Biotinte GelMA *High* (10 % w/v) gewählt. Diesen Hydrogelen

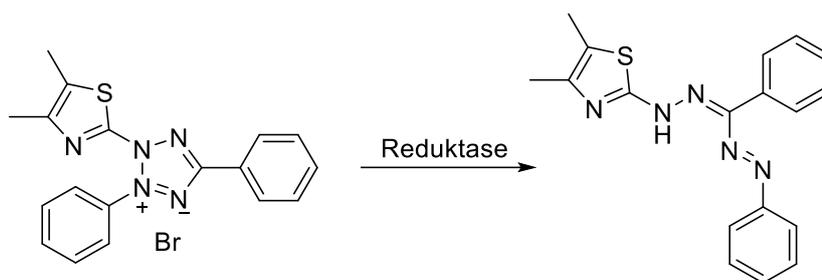
konnten in rheologischen Untersuchungen hohe Festigkeiten nachgewiesen werden.<sup>130,131</sup> Für eine zusätzliche Stabilität und eine bessere Auflösung wurden zudem 10 % Polyethylenglykoldiacrylat (PEGDA) unter das Gel gemischt. Dieses besitzt ebenso wie GelMA endständige Acrylatgruppen, welche durch eine lichtinduzierte Radikalreaktion als Crosslinker mit den GelMA Polymeren reagieren können. Diese GelMA/PEGDA Hydrogele sind auch bereits literaturbekannt, wobei ihnen in 2,5D-Zellkulturen eine gute Biokompatibilität nachgewiesen werden konnte.<sup>257</sup> Als Photoinitiator wurde ein sogenannter Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator in dem GelMA/PEGDA Gemisch gelöst (0,001 % XC577 w/v). Dieser wird benötigt, da bei der Xolographie zwei Wellenlängen im Druckprozess verwendet werden. Zunächst wird eine Schicht des Polymers in der Küvette mit einer ersten Wellenlänge  $\lambda_1$  (375 nm) bestrahlt, wodurch der Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator durch Absorption von  $\lambda_1$  aus einem inaktiven Ausgangszustand (A) in einen aktiven Zustand (B) versetzt wird. Daraufhin wird ein Schwarz-Weiß Film des Druckobjekts mit sichtbarem Licht ( $\lambda_2$ ) in die Polymerlösung projiziert, wodurch das Objekt Schicht-für-Schicht in der Küvette abgebildet wird. In dem, durch  $\lambda_1$  definierten Druckbereich, kann der aktivierte Photoinitiator (B) das sichtbare Licht absorbieren, in den reaktiven Zustand (C) übergehen und eine Polymerisationsreaktion induzieren. So wird das Polymer nur an den Stellen vernetzt, an denen sich die beiden Wellenlängen kreuzen.<sup>164</sup> Der hier verwendete Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator XC577 wurde freundlicherweise von Yves Garmshausen (xolo GmbH, Berlin) gestellt. Um die Polymerisationsreaktion zu starten wird zusätzlich zu dem Photoinitiator ein aminhaltiger Co-Initiator benötigt. In der hier entwickelten Formulierung wurde 7,5 % (w/v) Triethanolamin (TEA) eingesetzt. TEA wurde schon häufiger in Zusammenhang mit Photoinitiatorsystemen für die Zellbiologie in der Literatur erwähnt, beispielsweise konnte es in Kombination mit Riboflavin erfolgreich eingesetzt werden.<sup>258,259</sup> Ein weiterer wichtiger Punkt beim Design der Xube Biotinten war neben der Wahl des Photoinitiators eine hohe Viskosität des GelMA *High*/PEGDA Gemischs zu erreichen. Da die gedruckten Strukturen in der Lösung an Dichte gewinnen, können sie während des Druckvorgangs in der Küvette absinken, wodurch sich die Struktur des Objekts verzerrt. In einem hochviskosen Material kann dieser Absinkvorgang unterbunden werden. Aus diesem Grund wurde das GelMA *High*/PEGDA/TEA Gemisch nach dem Abfüllen in der Küvetten bei 4 °C geliert. So konnten die Strukturen ohne Probleme volumetrisch gedruckt werden.

Nachdem die Zusammensetzung der Biotinte bestimmt wurde, sollte die Biokompatibilität und Druckbarkeit der Tinte untersucht werden. Dazu wurde GelMA *High*/PEGDA mit  $5 \cdot 10^5$  NHDF Zellen gemischt und in einer Küvette bei 4 °C geliert. Als Probestruktur wurde ein Quader mit den Maßen 8 mm x 8 mm x 3 mm gewählt. Die Struktur wurde mit Blender (Blender Foundation) erstellt und konnte im Xube direkt für den Druck geslicet werden. Bei 2 mm/s Druckgeschwindigkeit und 6 mW/mm<sup>2</sup> Strahlungsintensität war der Druck in unter einer Minute abgeschlossen und die Zellen im Quader eingekapselt. Zur Evaluierung der Biokompatibilität der GelMA *High*/PEGDA Biotinte wurden die HepG2 über zwei Wochen hinweg im Abstand von 7 Tagen jeweils für 30 min mit 4  $\mu$ M Calcein AM und 0,02 mg/ml Propidiumiodid behandelt und die Anzahl der lebenden und toten Zellen mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica Stellaris 5 visualisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 zusammengefasst.



**Abbildung 24: Lebend-Tot-Färbung der in GelMA *High*/PEGDA Hydrogelen eingekapselten Zellen.** Zur Evaluierung der zelltoxischen Eigenschaften der für die Xolographie verwendeten GelMA *High*/PEGDA Hydrogele wurden  $5 \cdot 10^5$  NHDF/ml vor dem Druck unter das Gel gemischt. Jeweils 2 ml Hydrogel-Zellsuspension wurden in eine Küvette gegeben und bei  $4^\circ\text{C}$  geliert. In Xube wurden Platten der Größe  $8\text{ mm} \times 8\text{ mm} \times 3\text{ mm}$  gedruckt. Die gedruckten Strukturen wurden in einer 24-Well Platte mit DMEM überschichtet. Nach der Kultivierung der 3D-Zellkulturen über die Zeiträume von 1, 7 und 14 Tagen wurden die Zellen mit  $0,02\text{ mg/ml}$  des Farbstoffes Propidiumiodid und mit  $4\text{ }\mu\text{M}$  Calcein AM markiert. Die Visualisierung der toten (PI, rot,  $\lambda_{\text{ex}}=532\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=550\text{-}650\text{ nm}$ ) und der lebenden Zellen (Calcein AM, grün,  $\lambda_{\text{ex}}=488\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500\text{-}550\text{ nm}$ ) erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 (10x Dry, Zoom: 1,0). Maßstab:  $200\text{ }\mu\text{m}$ .

Auf den Aufnahmen ist zu erkennen, dass die GelMA *High*/PEGDA Hydrogele eine hohe Zytotoxizität besitzen, da über 14 Tage hinweg keine grünen, lebenden Zellen beobachtet werden konnte. Die Zellzahl nimmt im Verlauf des Versuchs zusätzlich stark ab, was daran liegt, dass die toten Zellen deutlich kleiner sind und deshalb aus den Hydrogelen herausgewaschen werden können. Es galt nun herauszufinden, wodurch die Zytotoxizität hervorgerufen wurde. Es gibt verschiedene Faktoren im Druckverfahren, welche ein toxisches Milieu erzeugen können. Einige konnten durch Ergebnisse aus anderen Arbeiten ausgeschlossen werden.<sup>120</sup> Zum einen die UV-Strahlung, welcher die Zellen während des Druckvorgangs ausgesetzt sind. Dazu wurden schon verschiedenen Toxizitätsassays durchgeführt, sowohl mit primären Zellen als auch Krebszellen. Bei keinem der Versuche konnte eine so starke Toxizität nachgewiesen werden. Zum anderen können auch die niedrigen Temperaturen bei der Gelierung negative Auswirkungen auf die Zellen haben. Da mit den Biotinten für den Extrusionsdruck aber nach demselben Prinzip verfahren wird und sich dort keine Nachteile erkennen lassen, wurde auch diese Möglichkeit ausgeschlossen. Daher musste angenommen werden, dass eine der neuen Komponenten im Hydrogel für die hohe Toxizität verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden alle Komponenten in einem MTT-Test auf ihre toxischen Eigenschaften untersucht. Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der Verstoffwechslung des gelben Tetrazoniumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch lebende Zellen zu violetten Formazankristallen (Schema 5). Die Menge an produziertem Formazan ist daher direkt proportional zur Anzahl lebendiger, metabolisch aktiver Zellen und kann durch die Messung der Absorption bei  $595\text{ nm}$  bestimmt werden.<sup>260</sup>



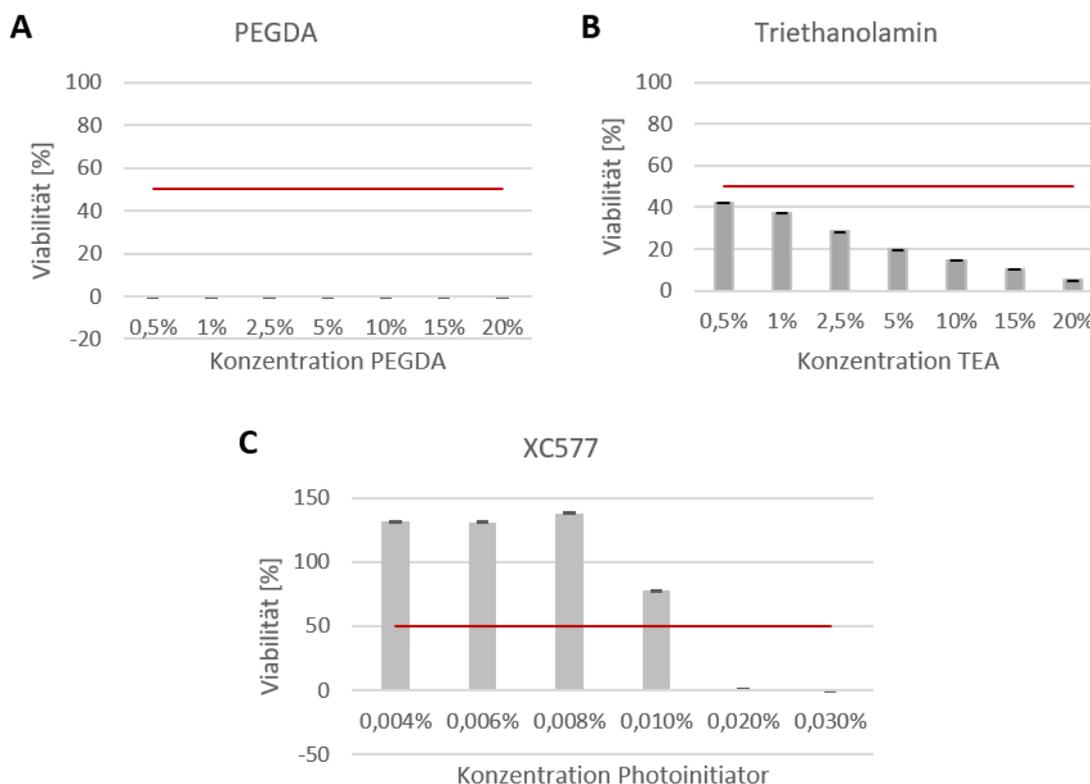
**Schema 5: Reaktionsschema des MTT-Assays.** Reduktion des gelben MTT-Reagenzes (links) durch as Enzym Reduktase in metabolisch aktiven Zellen zu violetterm Formazan.

Für die MTT-Tests von PEGDA, TEA und dem Photoinitiator XC577 wurden pro *Well* einer 96-*Well* Platte  $1 \cdot 10^4$  Zellen/ml HeLa ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Bei HeLa Zellen handelt es sich um eine Krebszelllinie aus einem Zervixkarzinom, welche zu einer der etabliertesten Zelllinien zählt. Sie werden häufig für Toxizitätsassays verwendet, wie auch in dieser Arbeit, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die angewachsenen Zellen wurden nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen behandelt (siehe Kapitel 5.2.8.2). Die entsprechenden Konzentrationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Getestete Konzentrationen der Hydrogelkomponenten PEGDA, TEA und XC577 im MTT-Assay.

Substanz	Konzentrationen [%]
PEGDA	0,5
	1,0
	2,5
	5,0
	10,0
	15,0
	20,0
TEA	0,5
	1,0
	2,5
	5,0
	10,0
	15,0
	20,0
XC577	0,004
	0,006
	0,008
	0,01
	0,02
	0,03

Die Zellen wurden zusammen mit den Substanzen für 72 h unter Standardbedingungen kultiviert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 15  $\mu$ l MTT pro *Well* für 3 h behandelt. Anschließend wurden die metabolisierten Formazankristalle über Nacht mit einer Solubilisierungslösung aufgelöst. Am nächsten Tag konnte die Absorption bei 595 nm mit einem SpectraMax iD3 Mikroplattenleser gemessen werden. Anhand einer unbehandelten Lebendkontrolle und einer Totkontrolle konnten die Zellviabilitäten für die Substanzen berechnet werden. Die Ergebnisse der Assays sind in Abbildung 25 zusammengefasst.



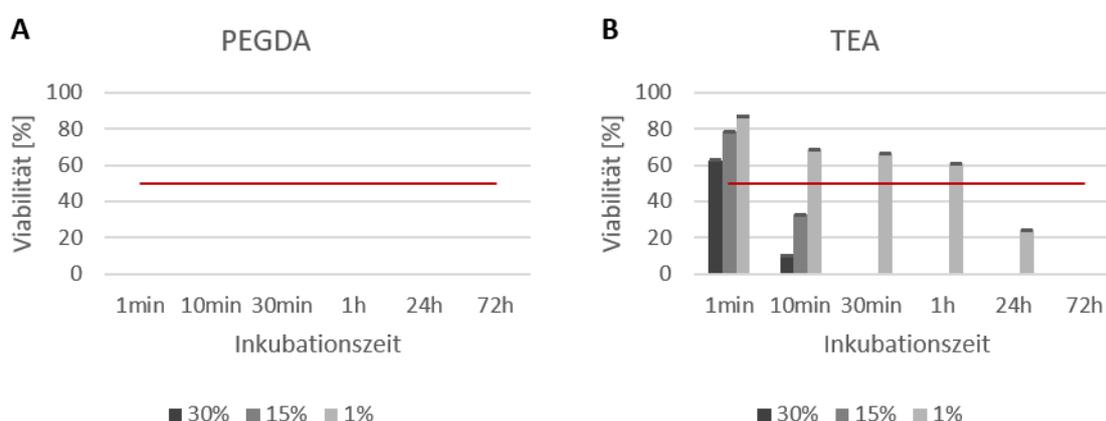
**Abbildung 25: Ergebnisse der MTT-Assays von PEGDA, Triethanolamin und dem Photoinitiator XC577.** Darstellung der Viabilitäten nach der Behandlung der HeLa Zellen mit **A:** PEGDA (0,5-20 %), **B:** Triethanolamin (0,5-20 %) und **C:** XC577 (0,004-0,03 %). Die Auswertung der Zellviabilität wurde anhand des test-over-control gegenüber einer unbehandelten Lebendkontrolle durchgeführt. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Aus den Ergebnissen des MTT-Tests von PEGDA geht eine eindeutige toxische Wirkung aller Konzentrationen auf die Zellen hervor. Dabei zeigen alle getesteten Konzentrationen keine metabolische Zellaktivität. Doch auch der MTT-Test von TEA weist keine hohen Zellviabilitäten auf. 0,5 % TEA schränken die Viabilität bereits auf knapp 40 % ein und mit steigender Konzentration TEA sinkt die Zahl lebendiger Zellen weiter. Für den Photoinitiator XC577 hingegen ergaben sich vor allem für die niedrigen Konzentrationen sehr hohe Viabilitäten bis etwa 0,008 %. Danach lässt sich auch für XC577 eine zytotoxische Wirkung nachweisen, welche mit steigender Konzentration schlagartig zunimmt. Ab einer Konzentration von 0,02 % konnte keine metabolische Zellaktivität mehr nachgewiesen werden. Für alle drei getesteten Substanzen wurde zudem der  $LD_{50}$ -Wert bestimmt. Dieser Wert gibt die mittlere letale Dosis beziehungsweise die Konzentration an, bei der 50 % der Zellen oder der Versuchspopulation tot sind.<sup>261</sup> Die berechneten Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Durch den MTT-Assay ermittelte LD<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen.

Substanz	LD <sub>50</sub> -Wert
PEGDA	< 0,5 %
Triethanolamin	< 0,5 %
XC577	0,015 %

Für den Photoinitiator XC577 konnte eine mittlere letale Dosis von 0,015 % bestimmt werden. Da für den Druck mit dem Xube nur eine sehr geringe Photoinitiatorkonzentration von 0,001 % verwendet wird, ist davon auszugehen, dass dieser keinen Einfluss auf die Zellviabilität in den gedruckten Strukturen hat. Für PEGDA und TEA liegen die LD<sub>50</sub> Werte in dem getesteten Konzentrationsbereich unterhalb von 0,5 %, was der geringsten getesteten Konzentration entspricht. Allerdings gelten diese Werte nur für die 72-stündige Behandlung der Zellen mit den Substanzen. Da die toxischen Acrylatgruppen des PEGDA allerdings nach dem Druckprozess nicht mehr frei liegen und TEA aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit mit der Zeit aus den Gelstrukturen herausgewaschen wird, werden die Zellen den Substanzen deutlich kürzer ausgesetzt als 72 h. Aus diesem Grund wurde der MTT-Test nochmals wiederholt, dieses Mal mit unterschiedlichen Inkubationszeiten. Wieder wurden in einer 96-Well Platte über Nacht pro Well 1\*10<sup>4</sup> Zellen/ml HeLa unter Standardbedingungen kultiviert und mit 1 %, 15 % und 30 % PEGDA, beziehungsweise 1 %, 15 % und 30 % TEA behandelt. Nach 1 min, 10 min, 30 min, 1 h, 24 h und 72 h wurden die Substanzen abgenommen und die Zellen mit frischem Nährmedium bedeckt. Nach insgesamt 72 h wurden alle Bedingungen für 3 h mit MTT behandelt und die gebildeten Formazankristalle mit einem *Solubilization/Stopsolution* Mix in Lösung gebracht. Nach Messung der Absorption konnten die Viabilitäten in Abhängigkeit der Lebend- und Totkontrollen berechnet werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Ergebnisse der zeitabhängigen MTT-Assays von PEGDA und Triethanolamin.** Darstellung der Viabilitäten nach der Behandlung der HeLa Zellen mit **A:** PEGDA (1-30 %) und **B:** Triethanolamin (1-30 %). Die Zellen wurden unterschiedlich lange mit den Substanzen behandelt. Dabei wurden die folgenden Inkubationszeiten gewählt: 1 min, 10 min, 30 min, 1 h, 24 h und 72 h. Die Auswertung der Zellviabilität wurde anhand des test-over-control gegenüber einer unbehandelten Lebendkontrolle durchgeführt. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit n=3 und der Standardabweichung mit n-1.

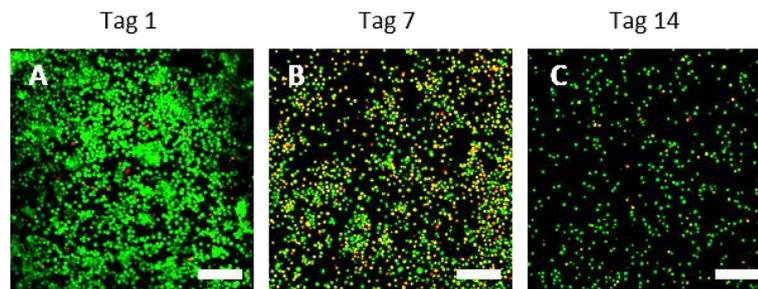
Die Auswertung der zeitabhängigen MTT-Tests zeigte für die Toxizität von PEGDA keine Veränderung im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen. Alle verwendeten Konzentrationen wiesen schon nach nur 1 min keine Zellviabilität mehr auf. Für TEA hingegen konnte gezeigt werden, dass die Inkubationszeit einen deutlichen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Nach 1 min wurden für alle drei Konzentrationen Werte von über 60 % berechnet. Mit zunehmender Inkubationszeit jedoch nimmt die Viabilität bei allen Konzentrationen deutlich ab. Anhand dieser Ergebnisse wurden die LD<sub>50</sub> Werte bestimmt und in der nachfolgenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Durch den zeitabhängigen MTT-Assay ermittelte LD<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen.

Inkubationszeit	PEGDA	TEA
1 min	< 1 %	> 30 %
10 min	< 1 %	2,4 %
30 min	< 1 %	2,8 %
1 h	< 1 %	3,0 %
24 h	< 1 %	< 1 %
72 h	< 1 %	< 1 %

Auch durch den zeitabhängigen Assay konnte im getesteten Konzentrationsbereich kein genauer LD<sub>50</sub> Wert für PEGDA bestimmt werden. Für TEA hingegen konnte für die verschiedenen Inkubationszeiten verschiedene LD<sub>50</sub> Werte definiert werden. Bei 1 min Inkubation lag der Wert über 30 %, für 10 min bereits nur noch bei 2,4 %. Für 30 min und 1 h ergaben sich ähnliche Konzentrationen von 2,8 und 3,0 %. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass sich die GelMA *High*/PEGDA Gele aufgrund der hohen Toxizität der Komponenten nicht für den zellbeladenen 3D-Druck eignet. Abgesehen von der hohen Toxizität von PEGDA zeigt auch TEA keine vielversprechenden Ergebnisse, da für den Druck 7,5 % TEA benötigt werden und nach 10 min Inkubation der LD<sub>50</sub> Wert bei 2,4 % liegt. 10 min ist dabei der Zeitraum in dem die Zellen in der unpolymerisierten Lösung sind, während die Küvetten für den Druck vorbereitet werden. Aus diesem Grund kann ein zellbeladener Druck mit der zuvor beschriebenen Biotinte nicht realisiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Aushärtung des Hydrogels trotz der erhöhten optischen Dichte des Materials durch die Zellen mit dem Xube möglich ist.

Wie schon zuvor beim Extrusionsdruck sollten in einem weiteren Experiment die Adhäsionseigenschaften der GelMA/PEGDA Hydrogele untersucht werden. Dazu wurden mit dem Xube Hydrogelplatten (8 mm x 8 mm x 3 mm) ohne Zellen gedruckt und über Nacht in Zellmedium gewaschen, um überschüssiges TEA zu entfernen. Nach 24 h wurden die Strukturen mit  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml besiedelt. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde die Zelladhäsion mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 beobachtet. An den Tagen 1, 7 und 14 nach der Besiedlung der Strukturen wurden die HUVEC mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid versetzt, um die toten Zellen zu markieren. Die Bilder dieser Lebend-Tot-Färbungen sind in Abbildung 27 zusammengestellt.



**Abbildung 27: Adhäsionsassay von HUVEC-GFP Endothelzellen auf gedruckten GelMA High/PEGDA Hydrogelen.** Die Adhäsionseigenschaften der GelMA High /PEGDA Hydrogele wurden getestet, indem 2 ml der Polymerlösung (10 % Gelkonzentration w/v) in einer Küvette bei 4 °C geliert wurden und mit dem Xube Hydrogelplatten (8 mm x 8 mm x 3 mm) gedruckt wurden. Auf den ausgehärteten Hydrogelen wurden anschließend  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml ausgesät, welche nach einer Inkubationszeit von 1, 7 und 14 Tagen mit 0,02 mg/ml Propidiumiodid gefärbt wurden. Die Visualisierung der toten (PI, rot,  $\lambda_{\text{ex}}=532$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=550-650$  nm) und der lebenden Zellen (GFP, grün,  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm) erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 (10x Dry, Zoom: 0,75). Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 27 zeigt eine gute Adhärenz und Viabilität auf den Hydrogelen. Mit der Zunahme der Kultivierungszeit nimmt die Zahl an adhärennten Zellen jedoch ab. Zum einen lösen sich tote Zellen von den Hydrogeloberflächen ab, zum anderen besitzt das GelMA als einzige Komponente Zelladhäsionsdomänen. PEGDA hingegen besitzt zellabweisende Eigenschaften, was durch die Ergebnisse von Ma et al. bestätigt werden konnte. In ihrer Publikation konnten sie zeigen, dass die Zelladhäsion mit zunehmender PEGDA Konzentration im Gel abnimmt, die Biokompatibilität jedoch gut ist.<sup>262</sup> In Zusammenhang mit den MTT-Ergebnissen kann daraus geschlossen werden, dass das vernetzte PEGDA mindestens deutlich geringere toxische Eigenschaften besitzt als das unvernetzte. Daher können die GelMA High/PEGDA Hydrogele vorerst als Gerüststrukturen zum Einsatz kommen, indem sie zunächst in einer bestimmten Form gedruckt und anschließend mit Zellen besiedelt werden. Für den zellbeladenen Druck hingegen wird weitere Etablierungsarbeit benötigt, um eine zellkompatible Biotinte zu entwickeln.

### 3.1.7 Kapitelzusammenfassung: Synthese und Charakterisierung der Hydrogelpolymere

In diesem Kapitel konnte die erfolgreiche Funktionalisierung der Gelatine mit drei unterschiedlichen chemischen Gruppen sowie deren Verwendung als Hydrogele gezeigt werden. Dabei wurden die Polymere hinsichtlich ihrer Toxizität und Adhäsionsfähigkeit in 3D- und 2,5D-Zellkulturen untersucht. Im Besonderen wurde ein Augenmerk auf die Eignung der Hydrogelpolymere als Biotinten gelegt. Bei der Verwendung im Extrusionsdruck konnte den Hydrogelen eine gute Druckbarkeit sowie eine hohe Biokompatibilität nachgewiesen werden. Für den Druck im Xube wurde das Hydrogel GelMA High mit dem Crosslinker PEGDA gemischt, was zu guten Druckergebnissen und einer hohen Stabilität der Strukturen führte. Allerdings konnte den GelMA High/PEGDA Gelen in der dreidimensionalen Zellkultur eine starke Toxizität nachgewiesen werden, wodurch sie sich für den zellbeladenen Druck nicht eignen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Adhäsion von HUVEC-GFP auf den GelMA High/PEGDA Gelen möglich ist, wodurch sie durchaus bei der Herstellung von 2,5D-Zellkulturen eingesetzt werden können.

## 3.2 Fabrikation der Hydrogelchips

Nachdem die gelatine-basierten Hydrogele synthetisiert und charakterisiert wurden sowie ihre Eignung für den 3D-Druck validiert wurde, konnte mit dem Design des vaskulären *Organ-on-a-chip* Modells begonnen werden. *Organ-on-a-chip* Systeme sind Zellkulturplattformen, auf denen *in-vitro* Gewebe und Organeinheiten nachgebildet werden können.<sup>36</sup> Beispielsweise werden in solchen Modellen auch Krankheitsbilder und pathologische Veränderungen nachgestellt, welche unter anderem bei der Wirkstoffentwicklung zum Einsatz kommen.<sup>37</sup> In den letzten Jahren wurden bereits erfolgreich einzelne Organeinheiten beispielsweise der Leber oder der Niere in solchen Systemen dargestellt.<sup>264</sup> Die meisten Modelle verfügen über artifizielle Blutgefäße, welche an mikrofluidische Systeme angeschlossen werden können, um einen künstlichen Blutfluss zu erzeugen. Ein Beispiel hierfür ist der am KIT in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schepers (IFG) entwickelte vasQchip, welcher über zwei Kompartimente verfügt, die durch einen halbrunden, porösen Polycarbonatkanal getrennt werden. Im oberen Kompartiment kann der Kanal mit Endothelzellen ausgekleidet werden, um das Blutgefäß nachzubilden. Im unteren Kompartiment können organspezifische Zellen eingebracht werden, welche das umgebende Gewebe nachbilden.<sup>265</sup> Neben Polycarbonat kommen häufig auch Polydimethylsiloxan (PDMS) oder Hydrogele zum Einsatz, um die Blutgefäße in den Chipsystemen zu formen.<sup>266,267</sup> PDMS wird dabei über sogenannte *Soft Lithography* Verfahren strukturiert.<sup>268,269</sup> Additive Verfahren wie Extrusionsdruck oder Inkjet eignen sich ebenfalls für die Herstellung mikrofluidischer Systeme.<sup>270,271</sup> Da in den letzten Jahren die Entwicklung von 3D-gedruckten Materialien deutlich größere Freiheitsgrade in der Chipgestaltung, den mechanischen Eigenschaften und der Anordnung verschiedener Gewebe lieferte, kommen die kunststoffbasierten Chips immer mehr aus der Mode.

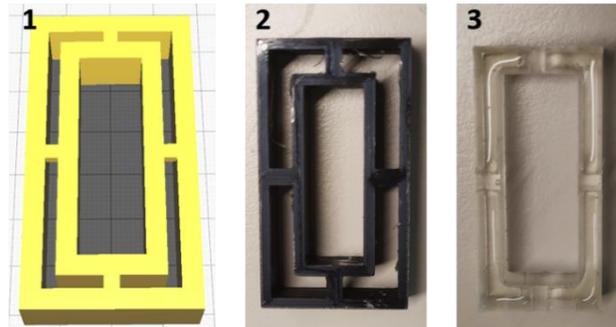
### 3.2.1 Extrusionsbasierte Gefäßsysteme

Um einen komplett hydrogelbasierten Chip mit Hilfe verschiedener 3D-Druckverfahren herstellen zu können, werden Techniken zur Generierung der Kanalstrukturen benötigt. Mit Hilfe von sogenannten Opferstrukturen können Hohlstrukturen in die Chips eingebracht werden. Die Opferstrukturen fungieren während des Druckvorgangs als Lückenfüller und können nach dem Aushärten der Hydrogele aus den Chips entfernt werden. So bleibt nur die hohle Kanalstruktur im Hydrogel zurück. Mögliche Opfermaterialien sind zum Beispiel Kanülen, welche mechanisch aus den Gelen gezogen werden, oder Polymere wie Pulronic F127, welches bei Raumtemperatur fest ist und sich bei 4 °C verflüssigt.<sup>272,273</sup> Da Pluronic F127 selbst eine gewisse Zytotoxizität besitzt, wurde in dieser Arbeit Gelatine als alternatives Opfermaterial gewählt. Diese konnte gelöst in Wasser (5 % w/v) in geliertem Zustand bei 21 °C mit dem BioSpot BP in Form der gewünschten Kanalstruktur verdrückt und nach dem Aushärten der Gele bei 37 °C wieder verflüssigt werden. Die flüssige Gelatine wurde dann aus dem Chip gespült, wodurch eine hohle Kanalstruktur im Hydrogel entstand. Dieses Prinzip wurde bereits von Xenia Kempter (IFG, KIT) und Michael Grün (Fakultät für Maschinenbau und Mechatronik, Hochschule Karlsruhe) verwendet, um Kanäle im MX-System zu erzeugen.<sup>131</sup> Die Kanalgröße bei dieser Methode ist dabei abhängig vom Durchmesser der verwendeten Dosiernadel sowie dem für die Extrusion verwendete Druck.

#### 3.2.1.1 Fertigung der Chips

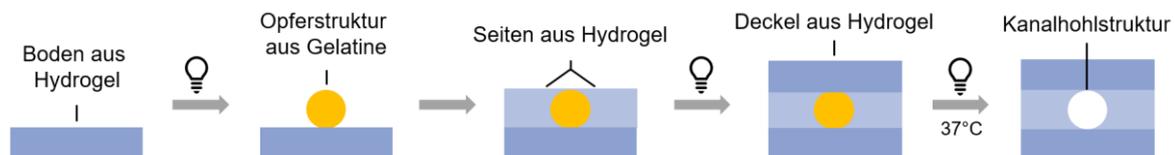
Um den Kanal später ausspülen und befüllen zu können, sollten Anschlüsse in Form von Kanülen am Chip angebracht werden. Für eine gezielte Platzierung und Stabilisierung wurde eine

Rahmenstruktur benötigt, da die Hydrogele alleine zu instabil waren. Als Rahmenmaterial wurde PDMS gewählt, da es leicht zu handhaben, chemisch inert, optisch transparent und durchlässig für Gase ist.<sup>274</sup> Für die Strukturierung des Rahmens wurde eine Gussform mit Hilfe des CAD Programmes Creo konstruiert, welche mit dem 3D-Drucker Ultimaker 3 Extended aus Polylactid (PLA) gedruckt wurde. Anschließend wurde das PDMS im Verhältnis 9:1 aus den Elastosil Komponenten A und B angemischt und in die Gussform gefüllt. Über Nacht wurde das PDMS bei 40 °C ausgehärtet, bevor es aus der Form herausgelöst werden konnte. Der Prozess der Rahmenherstellung ist in Abbildung 28 dargestellt. Die genauen Maße der Rahmen können der technischen Zeichnung im Anhang entnommen werden (Kapitel 8, Abbildung 88).



**Abbildung 28: Fabrikation des PDMS-Rahmens.** 1: Zunächst wurde mit Hilfe des CAD Programmes Creo ein Computermodell der Gussform für den PDMS-Rahmen erstellt und dieses in eine STL-Datei umgewandelt. 2: Mit dem Ultimaker 3 Extended wurde die Gussform anschließend aus PLA gedruckt. 3: Die Gussform wurde mit PDMS befüllt, welches über Nacht bei 40 °C ausgehärtet wurde, bevor es aus der Form gelöst werden konnte.

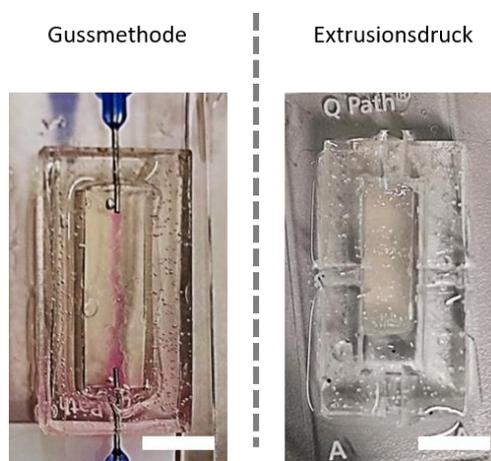
Vor der Fabrikation des eigentlichen Hydrogelchips wurden die PDMS-Rahmen über Nacht unter dem UV-Licht der biologischen Sicherheitswerkbank sterilisiert. Anschließend wurde der PDMS-Rahmen auf einem PDMS-beschichteten Objektträger platziert, um ein Auslaufen der Hydrogellösung aus dem Rahmen zu verhindern. Als Hydrogellösungen wurden sowohl GelMA *Medium* und *Medium-Low*, als auch GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* verwendet und wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben für die Fertigung der Chips vorbereitet. Die Abbildung 29 zeigt schematisch den Fabrikationsprozess der Hydrogelchips.



**Abbildung 29: Fabrikationsschema der Hydrogelchips.** In einer PDMS-Form wird zunächst eine Schicht Hydrogel ausgehärtet. Auf diese Schicht wird mit Hilfe des BioSpot BP eine Kanalstruktur aus Gelatine gedruckt. Anschließend werden die Lücken zwischen PDMS-Form und Kanal mit Hydrogel aufgefüllt und ausgehärtet. Als letztes wird eine weitere Schicht Hydrogel auf den Seiten und dem Kanal vernetzt. Nach dem Verflüssigen der Gelatine kann diese aus dem Kanal herausgepült werden, wodurch eine Hohlstruktur zurückbleibt.

1 ml der jeweiligen Hydrogellösung wurde in den PDMS-Rahmen als Bodenlayer gefüllt und mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet. Auf diese Schicht wurde dann mit dem BioSpot die Opferstruktur aus Gelatine gedruckt. Dazu wurde die Gelatinelösung (5 % w/v) im BioSpot auf 21 °C temperiert. Bei der Temperatúrauswahl wurde darauf geachtet, dass die Gelatine viskos genug war, um die gedruckte Struktur beibehalten zu können, aber auch weich genug, um

glatte und gleichmäßige Filamente zu erhalten. Mit der temperierten Gelatine wurden anschließend die Kanalstrukturen auf den Bodenlayer gedruckt. Über einen sogenannten G-Code wurden dem Extrusionsdrucker die Koordinaten für die Erzeugung der Struktur übermittelt. Für die Extrusion wurde eine Dosiernadel mit einem Durchmesser von 0,41 mm verwendet, wodurch Kanalstrukturen mit einem mittleren Durchmesser von 0,5 mm erhalten wurden. Die Kanalfilamente wurden an den Seiten durch Hydrogel fixiert, damit sich der Kanal beim Gießen des Deckenlayers nicht vom Boden ablösen konnte. Der PDMS-Rahmen wurde bis zum Rand mit dem restlichen Hydrogel befüllt und dieses wieder mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet. Die fertigen Chips wurden anschließend für mindestens 3 h bei 37 °C gelagert, um die Gelatine zu verflüssigen. Durch den Rahmen hindurch wurden Kanülen (Durchmesser 0,41 mm) in die Kanäle gestochen, über welche die flüssige Gelatine mit vorgewärmtem Medium aus dem Chip gespült werden konnte. Neben dieser beschriebenen Gussmethode wurde zudem ein Verfahren entwickelt, bei welchem der Hydrogelchip vollständig mit dem BioSpot gedruckt wurde. Der grundlegende Aufbau des Chips blieb dabei derselbe. Zuerst wurde mit dem Extruder 1 (Hydrogel) der Boden der Plattform Schicht-für-Schicht in den PDMS-Rahmen gedruckt, wozu fünf Schichten Hydrogel benötigt wurden. Die Druckrichtung wechselte dabei mit jeder Schicht immer zwischen X und Y, um einen ebenmäßigen, homogenen Boden zu fertigen. Jede dieser Schichten wurde sofort nach dem Druck ausgehärtet, bevor die nächste gedruckt werden konnte. Anschließend folgten der Druck des Gelatinekanals und der Chipseiten. Für den Druck der Gelatine wurde dabei der Extruder 2 des BioSpot verwendet, sodass ein nahtloser Druckprozess gewährleistet werden konnte. Zuletzt wurde die Decke ebenfalls in fünf Schichten mit variierender X/Y Druckrichtung über den Kanal gedruckt. Ein Vergleich der Gussmethode mit dem vollständig druckbasierten Chip ist in Abbildung 30 dargestellt.



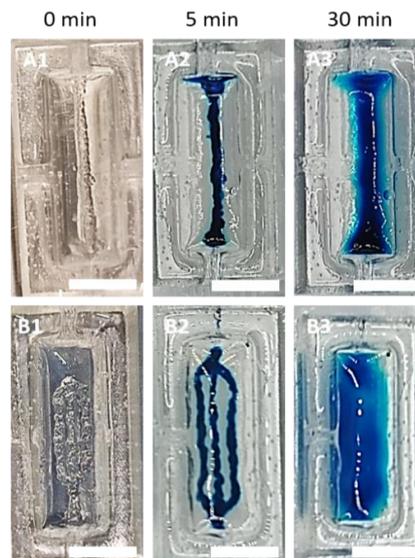
**Abbildung 30: Vergleich zwischen dem gegossenen und dem vollständig extrusionsbasierten Hydrogelchip.** Bei der Gussmethode (links) wurden der Boden sowie der Deckenlayer mit flüssigem Hydrogel gegossen, während der extrusionsbasierte Chip vollständig mit dem BioSpot gedruckt wurde. Maßstab 1,3 cm.

Mit Hilfe der Gussmethode konnten sehr gleichmäßige, optisch voll transparente Hydrogelchips hergestellt werden, welche zudem durchgängige Kanalstrukturen besaßen. Die voll extrusionsbasierten Chips hingegen haben sich während des Druckprozesses zusammengezogen und von der Rahmenstruktur gelöst. Dadurch gingen die Kanalstrukturen verloren und die Chips konnten nicht mit HUVEC-GFP Zellen besiedelt werden. Dies konnte unter anderem dem langen Druckprozess zugeschrieben werden, welcher durchschnittlich 20 min in Anspruch nahm. In dieser Zeit begannen die gedruckten Strukturen auszutrocknen und zu schrumpfen. Durch anschließende

Rehydrierung in Zellkulturmedium konnte die ursprüngliche Form jedoch nicht wiederhergestellt werden. Durch das schichtweise Drucken und die verschiedenen Druckrichtungen haben die vollständig extrudierten Chips zudem an optischer Transparenz verloren. Diese war allerdings noch ausreichend, um mikroskopische Auswertungen an dem System durchführen zu können. Dennoch wurde für diese Arbeit das Gussverfahren gewählt, da es eine einfachere sowie zuverlässigere Replikation der Kanalstrukturen garantiert. Zudem ist das Gussverfahren im Herstellungsprozess weniger zeitintensiv, wodurch es nicht zum Austrocknen der Chips kam.

### 3.2.1.2 Kanalstrukturen

Um das Chipmodell besser an die *in-vivo* Gegebenheiten anzupassen, sollten nicht nur einfache, sondern auch verzweigte Kanäle gedruckt werden. In lebenden Organismen versorgen die Blutgefäße das umliegende Gewebe über Diffusion mit Metaboliten und Sauerstoff. Da vor allem Sauerstoff nur etwa 100-200  $\mu\text{m}$  weit in Gewebe diffundieren kann, besteht das Blutgefäßsystem aus vielen Verzweigungen, um möglichst große Flächen abdecken zu können.<sup>275,276</sup> Um diese Flächenabdeckung auch im Chip realisieren zu können, sollten verzweigte Kanalstrukturen etabliert werden. Die Fabrikation dieser Chips erfolgte dabei wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass eine beidseitig verzweigte Kanalstruktur aus Gelatine gedruckt wurde. Um zu untersuchen, ob durch die Verzweigung des Kanals die Diffusion und Nährstoffverteilung im Chip verbessert werden konnten, wurde ein Diffusionsexperiment durchgeführt. Dazu wurden Chips mit einfachen und verzweigten Kanälen aus allen vier Hydrogelen hergestellt. Die Kanalstrukturen wurden mit einer wässrigen 1 mM Methylenblaulösung befüllt und die Diffusion der Lösung in das Hydrogel alle 5 min mit einer Kamera festgehalten. Zwischen den einzelnen Aufnahmen wurden die Chips bei 37 °C gelagert. Die Abbildung 31 zeigt die Diffusion der Methylenblaulösung in einem einfachen und einem verzweigten Kanal nach 5 min und 30 min. Eine detaillierte Zusammenstellung aller Bilder des Diffusionsexperiments ist im Anhang in Abbildung 89 und Abbildung 90 dargestellt.

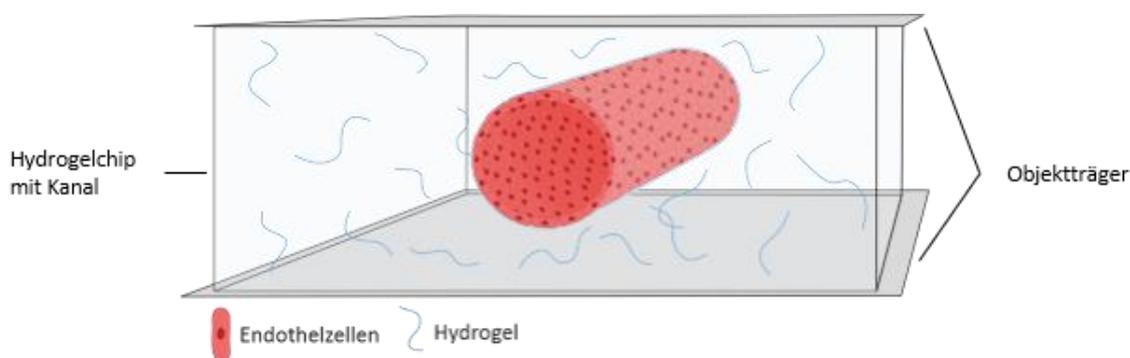


**Abbildung 31: Kanalstrukturen mit dem BioSpot BP.** Mit Hilfe des extrusionsbasierten Druckers wurden zwei verschiedene Kanalstrukturen gedruckt. **A1:** Einfache Kanalstruktur aus Gelatine. **A2:** Einfacher Kanal mit Methylenblaulösung nach 5 min Diffusion. **A3:** Einfacher Kanal mit Methylenblaulösung nach 30 min Diffusion. **B1:** Verzweigte Kanalstruktur aus Gelatine. **B2:** Verzweigter Kanal mit Methylenblaulösung nach 5 min Diffusion. **B3:** Verzweigte Kanalstruktur mit Methylenblaulösung nach 30 min Diffusion. Maßstab: 1,3 cm.

Beim Vergleich des Diffusionsverhaltens in den Chipmodellen ist zu erkennen, dass nach 30 min in beiden Chips eine Diffusion des Methylenblaus stattgefunden hatte. Jedoch ist in dem Chip mit einfachem Kanal der Farbstoff nicht ganz bis zum Rand des Hydrogelkompartiments vorgedrungen und stärker im Kanal konzentriert. Im MX-System konnte zum Vergleich ein ähnliches Ergebnis nach 30 min Diffusion dokumentiert werden. Erst nach 60 min war der komplette Chip gefärbt.<sup>131</sup> Im verzweigten Modell hingegen ist die Kanalstruktur aufgrund der gleichmäßigen Verteilung des Farbstoffes kaum noch zu erkennen. Zudem konnte innerhalb der 30 min der gesamte Chip gefärbt werden. Durch die verhältnismäßig größere Kanalfläche im verzweigten Chip konnten somit die Diffusionseigenschaften verbessert werden. Dies ist besonders interessant, da Organe *in-vivo* unterschiedlich dichte Blutgefäße besitzen. Nieren beispielsweise haben eine sehr hohe Gefäßdichte gegenüber vielen anderen Organen.<sup>277</sup> Durch die flexible Anpassung der Kanalstrukturen im Chip können so die Gegebenheiten *in-vivo* detaillierter wiedergespiegelt werden.

### 3.2.1.3 Besiedlung des Chips

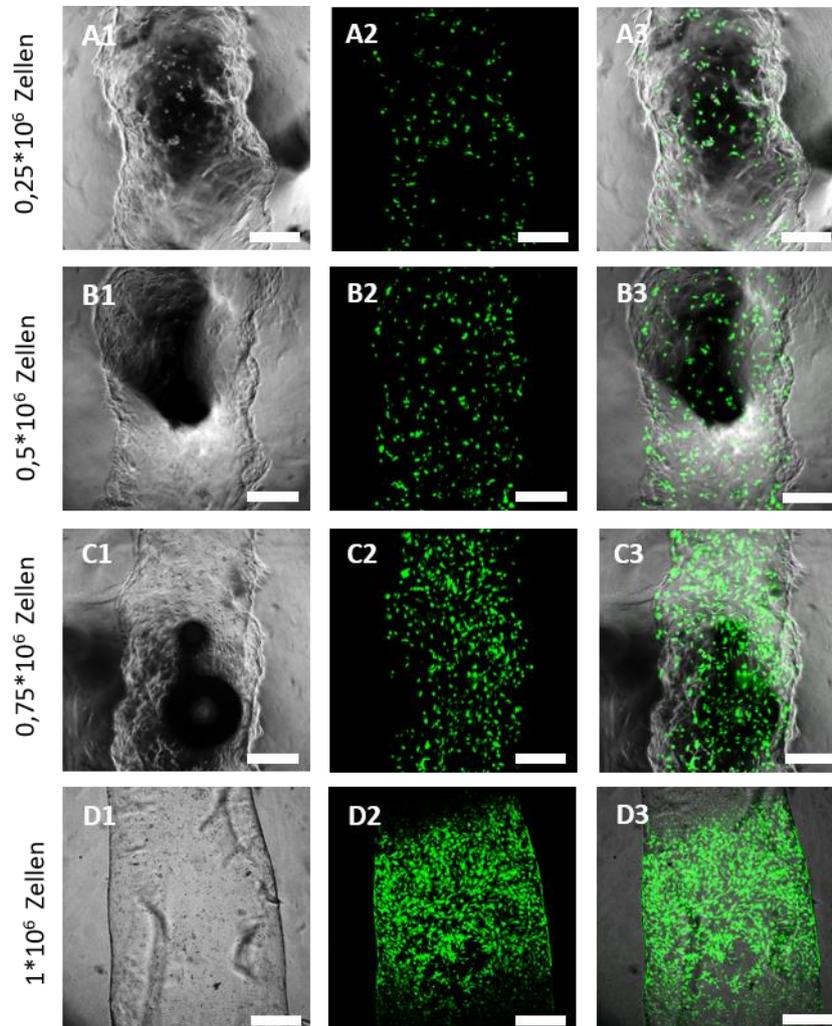
Nach der Überprüfung der Diffusionseigenschaften erfolgte die Einbringung eines Endothels in den artifiziellen Gefäßen. Das Endothel besteht *in-vivo* aus einer planaren Endothelzellschicht und kleidet das Innere der Blutgefäße aus. Neben seiner Barrierefunktion ist es auch an der Ausbildung neuer Blutgefäße zum Beispiel bei der Wundheilung beteiligt.<sup>278,279</sup> Um das Endothel im Chip nachzubilden, wurden die Kanalstrukturen mit Endothelzellen ausgekleidet. In diesem Fall mit humanen Endothelzellen, die aus der Nabelschnur gewonnen und genetisch modifiziert wurden, sodass sie das grün fluoreszierende Protein GFP exprimieren, kurz HUVEC-GFP. Dabei sollte die verwendete Zellzahl so angepasst werden, dass die HUVEC auf der Kanaloberfläche eine konfluente, planare Zellschicht ausbilden. Die Abbildung 32 zeigt schematisch den Aufbau des Endothels im Hydrogelchip.



**Abbildung 32: Schematische Darstellung eines mit HUVEC-GFP besiedelten Hydrogelchips.** Abgebildet ist der Hydrogelchip zwischen zwei Objektträgern, dessen Kanalstruktur mit Endothelzellen ausgekleidet (rot) ist.

Da im Zuge des 2,5D-Adhäsionsassays in Kapitel 3.1.5.2 bereits festgestellt werden konnte, dass eine hohe Zellzahl von HUVEC-GFP benötigt wird, um eine kontinuierliche Schicht zu erzeugen, sollten zunächst unterschiedliche Zellkonzentrationen getestet werden. Dazu wurden die Chips wie zuvor in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, mit der Gussmethode hergestellt und die verflüssigte Gelatine mit Medium aus den Kanälen gespült. Die HUVEC-GFP wurden abgelöst und Zellzahlen von  $0,125 \cdot 10^6$  Zellen,  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen,  $0,375 \cdot 10^6$  Zellen und  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen in je  $100 \mu\text{l}$  zellspezifischem EGM-GFP (*Endothelial Growth Medium* – GFP Kit) Medium über die Kanülen in die Kanalstrukturen inokuliert. Um den Hydrogelchip vor dem Austrocknen zu schützen, wurde 1 ml Medium auf den Chip gegeben und die Oberseite mit einem weiteren PDMS-beschichteten Objektträger abgedeckt.

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Chips um 180° gedreht und mit den gleichen Zellzahlen auf der anderen Seite besiedelt. So ergaben sich Gesamtzellzahlen in den Kanälen von  $0,25 \cdot 10^6$ ,  $0,5 \cdot 10^6$ ,  $0,75 \cdot 10^6$  und  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP. Nach erneuter Inkubation über Nacht wurden die Zelldichten am nächsten Tag mit dem Fluoreszenzmikroskop Leica Stellaris 5 evaluiert (Abbildung 33).

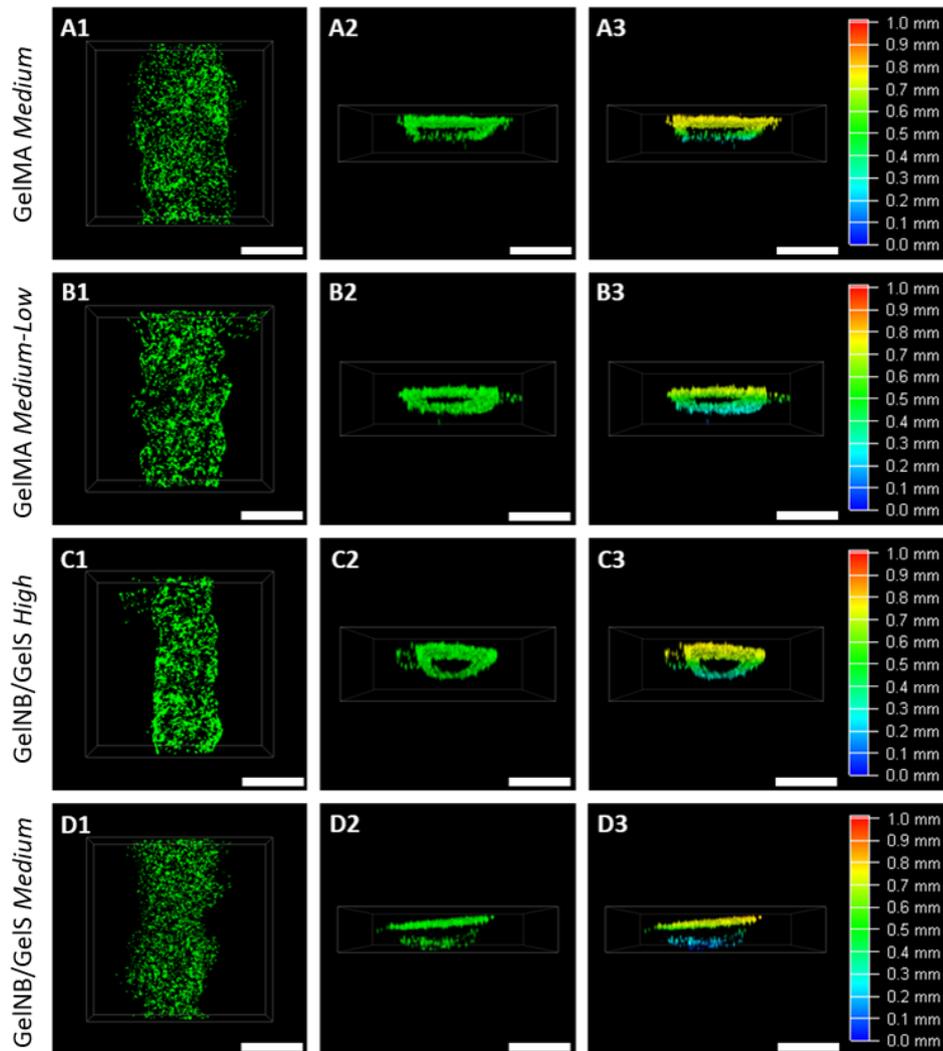


**Abbildung 33: Bestimmung der Zellzahl im Kanal für ein dichtes Endothel.** Die Gelatine wurde mit angewärmtem Medium aus den Chips gespült und je 100  $\mu$ l Zellsuspension wurden in die Kanäle gegeben. Nach 24 h Inkubation wurden die Chips um 180° gedreht und der Vorgang wiederholt. Es wurden Gesamtzellzahlen im Kanal von  $0,25 \cdot 10^6$  Zellen,  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen,  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen und  $1 \cdot 10^6$  Zellen getestet. Zur Auswertung wurden sowohl Hellfeldaufnahmen der Kanäle (A1, B1, C1, D1) als auch Fluoreszenzbilder (GFP,  $\lambda_{\text{ex}} = 482$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500-550$  nm) (A2, B2, C2, D2) mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 aufgenommen. A3, B3, C3 und D3 zeigen die Überlagerung dieser Aufnahmen. Maßstab: 200  $\mu$ m.

Für einen Kanal mit einer berechneten Oberfläche von  $0,46 \text{ cm}^2$  wurden  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP benötigt, um ein gleichmäßig besiedeltes Endothel zu erhalten. Auf den Aufnahmen der anderen Zellkonzentrationen ist zu erkennen, dass niedrigere Zellzahlen die Kanäle nicht vollständig auskleiden konnten. Vor allem bei  $0,25 \cdot 10^6$  Zellen und  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen blieben große Teile des Kanals unbesiedelt. Daher wurde eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP im Kanal als optimal bestimmt.

Zur Visualisierung der 3D-Struktur und der Besiedlung des Kanallumens wurden dreidimensionale Z-Stacks der Kanäle mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 aufgenommen. Dazu wurde eine Höhe der Stacks von 1 mm definiert sowie eine Schrittgröße von 25  $\mu$ m. Das bedeutet, dass über

eine Länge von 1 mm alle 25  $\mu\text{m}$  in Z-Richtung eine Aufnahme gemacht wurde. So wurden 40 Aufnahmen pro Kanalstruktur erhalten, welche mit Hilfe der Leica LasX Software zu einer 3D-Ansicht zusammengefügt und bearbeitet werden konnten. Die so generierten dreidimensionalen *Z-Stacks* der besiedelten Kanäle sind in Abbildung 34 dargestellt.

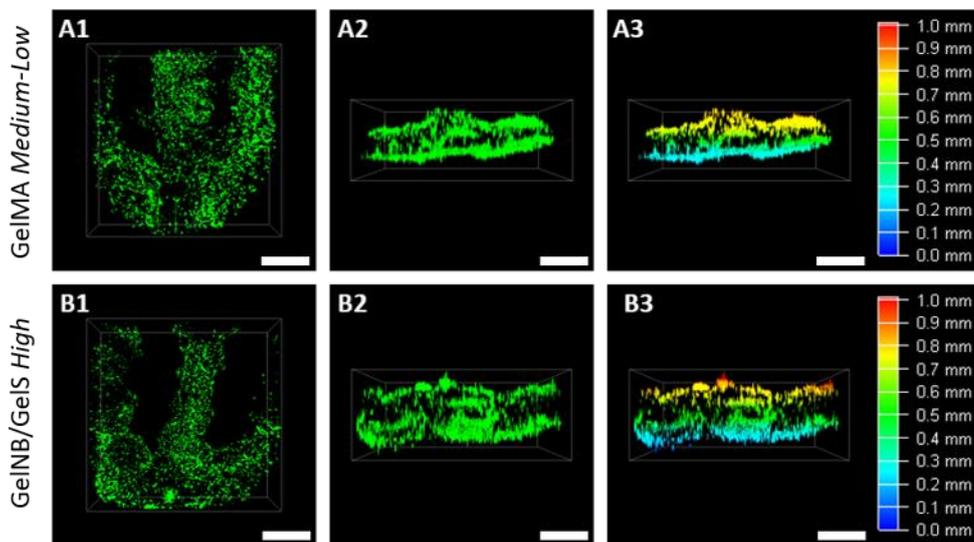


**Abbildung 34: Besiedlung der einfachen Kanäle in den Hydrogelchips.** Es wurden vier verschiedene Chips aus den Hydrogelen *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low*, *GeINB/GeIS High* und *GeINB/GeIS Medium* hergestellt. Die Kanalstrukturen wurden mit warmem *Medium* gespült, um die Gelatine zu entfernen. Pro Chip wurden in 100  $\mu\text{l}$  *Medium*  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP in den Kanälen ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurden die Chips um 180° gedreht und die andere Seite nach demselben Prinzip besiedelt. Weitere 24 h später wurden die Kanäle mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica Stellaris 5 ausgewertet (GFP,  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4x Dry, Zoom:0,75). Um die Besiedlungsdichte im Kanal zu evaluieren, wurden *Z-Stack* Aufnahmen der Kanäle gemacht (Schrittgröße: 25  $\mu\text{m}$ ). **A1, B1, C1, D1** zeigen die Kanalstrukturen von oben, **A2, B2, C2, D2** die hohlen Kanäle von der Seite und **A3, B3, C3, D3** eine Tiefenfärbung der Seitenansicht. Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ .

Die *Z-Stacks* der Hydrogelchips bestätigen, dass mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP pro Kanal eine dreidimensionale Endothelschicht in allen vier Hydrogelvarianten implementiert werden konnte. Vor allem die Ansichten von oben bilden die gleichmäßige Besiedlung der Chips ab. Die Seitenansichten zeigen die Durchgängigkeit des Kanals und dass die Endothelzellen nur an der inneren Wand der Kanalstrukturen angewachsen sind. Die Tiefenfärbungen der Seitenansicht verdeutlichten nochmals die dreidimensionale Verteilung der Zellen und die räumliche Struktur der

Kanäle. Dabei konnten strukturelle Unterschiede der Kanäle erkannt werden, welche vor allem durch die Viskosität der Gelatine zu erklären sind. Da diese stark temperaturabhängig ist, konnten durch Schwankungen der Umgebungstemperatur strukturelle Veränderungen der Kanalstrukturen beobachtet werden. Durch die Verwendung eines anderen Opfermaterials wie zum Beispiel Pluronic F127, könnten temperaturstabilere Strukturen gedruckt werden. Da Pluronic bei Raumtemperatur fest und erst bei 4 °C flüssig ist, ist es weniger anfällig für Temperaturschwankungen wie die Gelatine.<sup>272</sup>

Neben den einfachen Kanalstrukturen wurden auch die verzweigten Kanäle mit den Endothelzellen besiedelt. Dazu wurden die Chips wie zuvor beschrieben erst von der einen Seite mit  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  und nach 24 h von der anderen Seite mit derselben Zellzahl besiedelt. Die Ergebnisse der dreidimensionalen Fluoreszenzmikroskopie der verzweigten Kanäle sind in Abbildung 35 zusammengefasst.



**Abbildung 35: Besiedlung der verzweigten Kanäle in den Hydrogelchips.** Es wurden vier verschiedene Chips aus den Hydrogelen GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium hergestellt. Die Kanalstrukturen wurden mit warmem Medium durchgespült, um die Gelatine zu entfernen. Pro Chip wurden in 100  $\mu\text{l}$  Medium  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP im Kanal ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurden die Chips um 180 °gedreht und die andere Seite nach demselben Prinzip besiedelt. Weitere 24 h später wurden die Kanäle mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica Stellaris 5 ausgewertet (GFP,  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4x Dry, Zoom:0,75). Um die Besiedlungsdichte im Kanal zu evaluieren, wurden Z-Stack Aufnahmen der Kanäle gemacht (Schrittgröße: 25  $\mu\text{m}$ ). **A1, B1** zeigen die Kanalstrukturen von oben, **A2, B2** die hohlen Kanäle von der Seite und **A3, B3** eine Tiefenfärbung der Seitenansicht. Maßstab: 500  $\mu\text{m}$ .

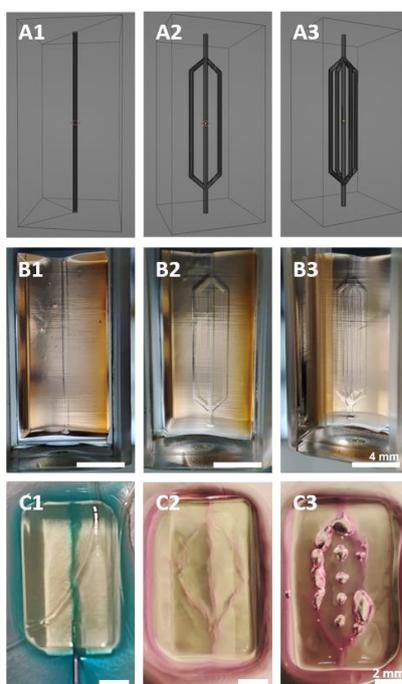
Die Z-Stack Aufnahmen zeichnen klar die verzweigte Kanalstruktur der Hydrogelchips ab. Auch in den gespaltenen Kanälen konnte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen erzielt werden, welche das gesamte Innere der Kanäle auskleiden. Die Seitenansicht zeigt zudem eine Durchlässigkeit in allen Abzweigungen des Kanalsystems und die Tiefenfärbung eine gleichmäßige dreidimensionale Adhäsion der Endothelzellen. Zusammengefasst konnten mit dem Extrusionsdrucker also auch komplexere, dreidimensionale Kanalstrukturen erzeugt und mit einem konfluenten Endothel besiedelt werden. Jedoch ist die Komplexität des Drucks mit der Extrusionsmethode limitiert. Für den dreidimensionalen Aufbau der Kanalstrukturen entlang der Z-Ebene würden beim Extrusionsdruck mechanisch sehr stabile Materialien benötigt werden, um in die Höhe zu drucken.

### 3.2.2 Xolographie Chips

Im Vergleich zum Extrusionsdruck können mit dem Xolographie-basierten Xube ohne großen Aufwand komplexere Strukturen gedruckt werden. Durch den volumetrischen Druck werden keinerlei Stützstrukturen oder ähnliches für den Druck von Überhängen benötigt, da das umgebende, unvernetzte Polymer die Struktur selber stützt.<sup>141</sup>

#### 3.2.2.1 Fertigung der Chips

Auch dreidimensionale Kanalstrukturen im Hydrogel ließen sich leicht realisieren. Dazu wurden mit dem Programm Blender 3D-Modelle der Chips mit den gewünschten Kanalstrukturen erstellt. Die Kanäle werden dabei als Hohlstrukturen eingegeben. Als Kanäle wurden eine einfache, eine doppelte und eine vierfach verzweigte Struktur gewählt. Anhand dieser Modelle lassen sich die Druckmöglichkeiten mit dem Xube in alle drei Achsenrichtungen evaluieren. Die aus Blender exportierten Modelle sind in Abbildung 36 zu sehen, ebenso wie der allgemeine Konstruktionsprozess der GelMA *High*/PEGDA Chips.



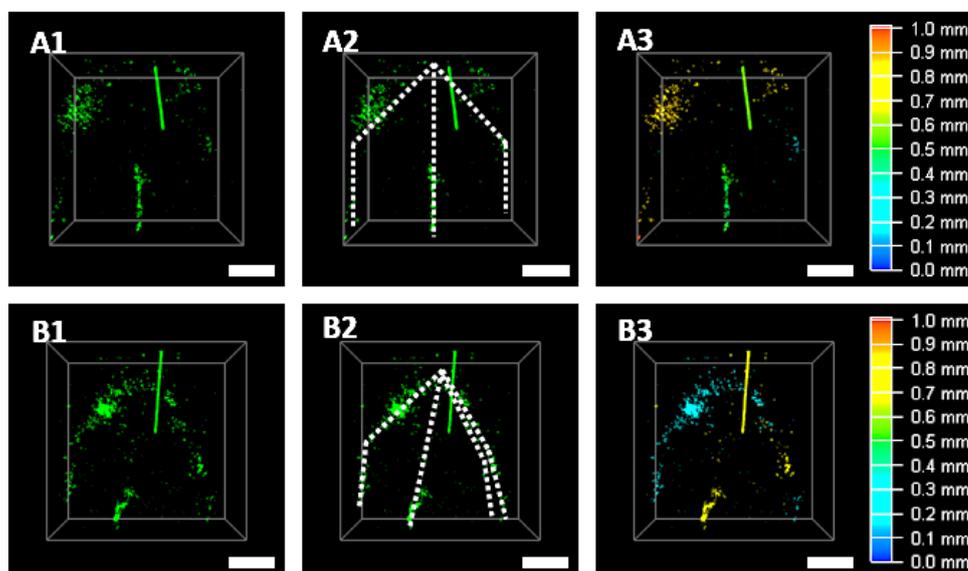
**Abbildung 36: Fabrikation der Xube Chips.** A1-A3: Zunächst wurden die Hydrogelchips mit den gewünschten Kanalstrukturen in Blender designt und als STL-Datei für den Druck exportiert. B1-B3: Die Kanalstrukturen wurden mit dem Urethanharz (nach der Formulierung von Xolo<sup>164</sup>) Probe gedruckt. Maßstab: 4 mm. C1-C3: Im letzten Schritt wurden die Hydrogelchips mit dem Xube in GelMA *High*/PEGDA Hydrogel gedruckt und die Hohlstrukturen mit Wasser gespült, um unpolymersiertes GelMA zu entfernen. Maßstab: 2 mm.

Die mit Blender erstellten Strukturen wurden zunächst zu Evaluierungszwecken in dem bereits für den Xube etablierten Urethanharzpolymer gedruckt. Anhand dieses Harzes konnte der Optimierungsprozess der erstellten Strukturen erleichtert werden, da der Druck mit dem Harz zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse liefert. Als erstes wurden die optimalen Kanaldurchmesser bestimmt. Dazu wurde der Druck von Kanaldurchmessern im Bereich von 0,4 mm bis 1 mm getestet. Da die Druckauflösung bei den schmälere Kanälen teilweise zu gering war, konnten keine vollständig durchlässigen Kanäle erzeugt werden. Ab einem Durchmesser von 0,75 mm konnten in allen Achsenrichtungen durchlässige Kanäle erzielt werden, weshalb dieser auch für die Hydrogelchips verwendet wurde. Dabei liegt der Kanaldurchmesser noch deutlich über dem mittels

Extrusionsdruck erzielten Kanal (0,41 mm). Für den Druck der GelMA *High*/PEGDA Gele wurde die Biotinte wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben angesetzt und bei 4 °C vor dem Druck geliert. Alle drei Strukturen konnten erfolgreich gedruckt werden. Allerdings stellte sich heraus, dass die GelMA *High*/PEGDA Biotinte ein anderes Druckverhalten als das Polyurethan zeigte. Unter anderem war die Druckauflösung in den wasserbasierten Tinten deutlich schlechter als die in dem organischen Urethanharz. Im Falle der Hydrogelchips wurde der Verlust der Auflösung an den Kanälen deutlich, deren Durchmesser unter 0,75 mm lag. Zudem zeigten die Hydrogele ein viel ausgeprägteres Quellverhalten, wodurch die Kanäle zusätzlich verengt wurden. Dennoch waren die Strukturen wie auf der Abbildung zu erkennen ist durchlässig. Für die gedruckten Chips wurden ebenfalls PDMS-Rahmen verwendet, um die Kanülen anzuschließen. Dazu wurde das in Kapitel 3.2.2.1 vorgestellte CAD Modell an die Maße des Hydrogelchips angepasst. Die Maße des Chips sowie des Rahmens sind den technischen Zeichnungen im Anhang zu entnehmen (Kapitel 8, Abbildung 91). Zudem wurden die Chips zum Schutz vor dem Austrocknen zwischen zwei Objektträgern gelagert.

### 3.2.2.2 Besiedelung der Chips

Im nächsten Schritt sollten die durchlässigen Kanalstrukturen ebenfalls mit HUVEC-GFP besiedelt werden, um ein konfluentes Endothel zu erzeugen. Dazu wurden  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP in 50  $\mu$ l EGM-GFP resuspendiert und die Zellsuspension über die Kanülen in die Chips gegeben. Nach der Inkubation über Nacht unter Standardbedingungen wurden die Chips um 180° gedreht und von der anderen Seite nochmals mit  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Nach weiteren 24 h Inkubation konnte das Ergebnis der Besiedelung anhand der GFP Fluoreszenzen der HUVEC unter dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 visualisiert werden. Die dabei entstandenen Bilder der zweifach und vierfach verzweigten Kanalstrukturen sind in Abbildung 37 aufgeführt.



**Abbildung 37: Besiedelung der verzweigten Kanalstrukturen.** Die mehrfach verzweigten Kanalstrukturen (A zweifach gespalten, B vierfach gespalten) wurden nach dem Druck mit vorgewärmtem Medium gespült, um unpolymersiertes Hydrogel zu entfernen. Anschließend wurden in jeden Chip 50  $\mu$ l mit  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP gegeben. 24 h später wurden die Chips um 180° gedreht und nochmal mit derselben Zellzahl besiedelt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Auswertung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (GFP; grün,  $\lambda_{ex}=482$  nm,  $\lambda_{em}=500-550$  nm, 4xDry, Zoom 0,75). A1, B1 zeigen die HUVEC-GFP in den Kanälen, in A2, B2 wurden die Kanalstrukturen zusätzlich visualisiert und A3, B3 zeigen Tiefenfärbungen, um die dreidimensionale Kanalverteilung zu analysieren. Z-Stack: Höhe 1 mm, Schrittgröße 25  $\mu$ m. Maßstab: 1 mm.

Zu erkennen ist, dass in den Kanälen kaum Zelladhäsion stattgefunden hatte. Verglichen mit den verzweigten Kanälen, welche mit dem BioSpot hergestellt wurde, lassen sich die Kanalstrukturen im Xube Chip nur sehr schwer anhand der Zellverteilung detektieren. Die vorhandene Verteilung jedoch ist dreidimensional, was darauf hinweist, dass sich die HUVEC-GFP in allen Verzweigungen angelagert haben. Die verminderte Zelladhäsion lässt sich durch mehrere Faktoren erklären. Zum einen zeigten bereits der Viabilitäts- und der Adhäsionsassay in Kapitel 3.1.6.2 eine allgemein geringe Biokompatibilität der GelMA *High*/PEGDA Hydrogele, da PEGDA zellabweisende Eigenschaften besitzt. Zum anderen kam es durch die materialabhängige Druckauflösung zu einer Verengung der Kanäle. Durch die Hydrophilie der Hydrogele sind die Materialien zudem im Zellmedium aufgequollen, wodurch sich die Kanalstrukturen weiter verengt haben. Dennoch konnte durch den Druck der mehrfach gespaltenen Kanalstrukturen das große Potenzial der Xolographie aufgezeigt werden. Um dieses völlig ausschöpfen zu können, bedarf es der Weiterentwicklung der Materialien hin zur Etablierung der Hydrogele für dieses Druckverfahren.

### **3.2.3 Kapitelzusammenfassung: Fabrikation der Hydrogelchips**

In diesem Kapitel konnte erfolgreich ein reproduzierbarer Herstellungsprozess für einen extrusionsbasierten Hydrogelchip etabliert werden, bei welchem die Kanalstrukturen durch ein Opfermaterial erzeugt werden. Von diesem Chipsystem wurden zwei Varianten hergestellt – mit einfachem und mit verzweigtem Kanal. Beide Strukturen wurden hinsichtlich ihrer Diffusionseigenschaften untersucht und konnten erfolgreich konfluent mit HUVEC-GFP besiedelt werden. Zudem konnten mit dem Xube im Urethanharz noch komplexere Kanalstrukturen erzeugt werden, welche eingeschränkt im GelMA *High*/PEGDA Hydrogel realisiert werden konnten.

### 3.3 Angiogenese der Endothelzellen

Wie in den letzten Kapiteln beschrieben, konnte mit additiven Fertigungsverfahren ein Chipmodell mit einer vaskulären Einheit hergestellt werden. Diese artifiziellen Blutgefäße besaßen durchschnittlich einen Durchmesser von 0,41 mm in den extrusionsbasierten Modellen und 0,75 mm in den Xube Chips. Damit lagen sie größentechnisch unter dem Durchschnitt von Makrogefäßen (10 mm) wie den Arterien und Venen sowie über den Mikrogefäßen (0,02 mm) wie Arteriolen und Kapillaren.<sup>280</sup> Mit den beiden Druckverfahren können demnach nur die Makrogefäße gedruckt werden, da die Mikrogefäße deutlich unter der möglichen Druckauflösung liegen. *In-vivo* bildet sich das Gefäßsystem bereits im Embryo über Vaskulogenese und Angiogenese aus. Die Vaskulogenese bezeichnet dabei das Entstehen neuer primärer Blutgefäße durch die Differenzierung von Angioblasten und findet nur im Embryonalstadium statt.<sup>281</sup> Die Angiogenese hingegen ist die Formation neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden.<sup>282</sup> Sie tritt neben dem Embryonalstadium auch in adulten Organismen vor allem bei der Wundheilung oder bei pathologischen Vorgängen auf.<sup>283</sup> Induziert wird die Angiogenese durch einer Reihe von Wachstumsfaktoren, wobei VEGF der wohl bedeutsamste ist.<sup>284</sup> Diese Form der Vaskularisierung sollte in dem in Kapitel 3.2.1 entwickelten Chipsystem angewendet werden, um die Feinstruktur der Blutgefäße nachzubilden. Dazu sollten die Endothelzellen im Kanal mit dem Wachstumsfaktor VEGF zur Angiogenese angeregt werden. Da der Kanal in direktem Kontakt zum umgebenden Kompartiment stand, hatten die Endothelzellen so die Möglichkeit, Ausläufer ins Hydrogel hinein auszubilden. Bevor die Angiogenese jedoch auf das Chipsystem übertragen werden konnte, sollten die optimalen Bedingungen wie die VEGF Konzentration oder die Co-Kultivierung verschiedener Zellarten an 3D-Zellkulturen getestet werden.

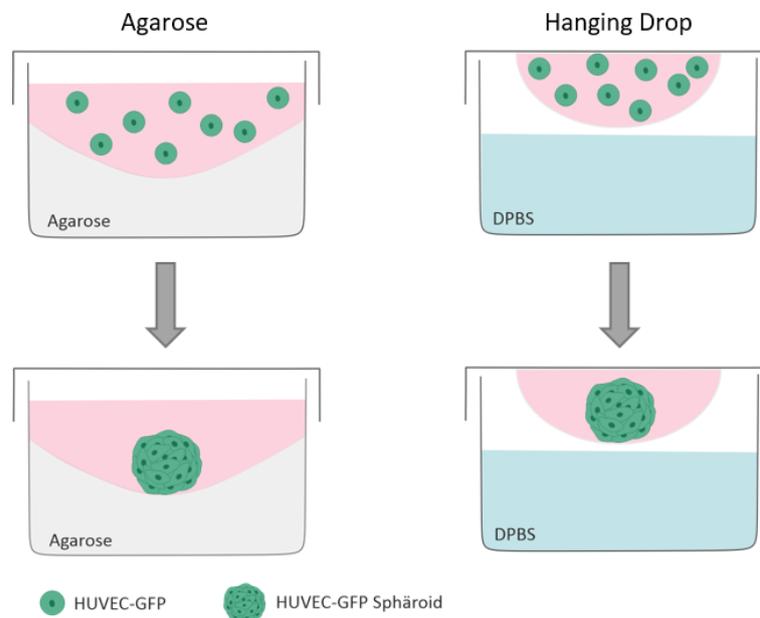
#### 3.3.1 Angiogenese in der Sphäroidkultur

1999 entwickelten Thomas Korff und Hellmut G. Augustin einen dreidimensionalen, reproduzierbaren *in-vitro* Assay zur Untersuchung des Sproutingverhaltens, also der Wachstumsfaktor-gesteuerten, angiogenen Sprossung, von Endothelzellen. Dazu wurden Sphäroide aus humanen Endothelzellen verwendet.<sup>285</sup> Sphäroide sind kugelförmige Zellaggregate und zählen zu den 3D-Zellkultursystemen. Durch ihre dreidimensionale Struktur sind sie in der Lage, unter anderem Zell-Zell-Antworten und Interaktionen nachzustellen.<sup>286</sup> Für den *Sproutingassay* nach Korff und Augustin werden Endothelzellsphäroide einer bestimmten Größe in Kollagengele eingebettet und den zu testenden Bedingungen ausgesetzt. Zur Analyse der Angiogenese wird die kumulative Länge der Ausläufer pro Sphäroid berechnet. Das bedeutet, die Längen der einzelnen Ausläufer werden bestimmt und zu einer Gesamtlänge aufsummiert.<sup>285</sup> In dieser Arbeit wurde der *Sproutingassay* von Korff und Augustin so angepasst, dass die Sphäroide nicht in Kollagen eingebettet wurden, sondern in den gelatinebasierten Hydrogelen, um ihr Verhalten in dieser Umgebung untersuchen zu können.

##### 3.3.1.1 Generierung von HUVEC-GFP-Sphäroiden

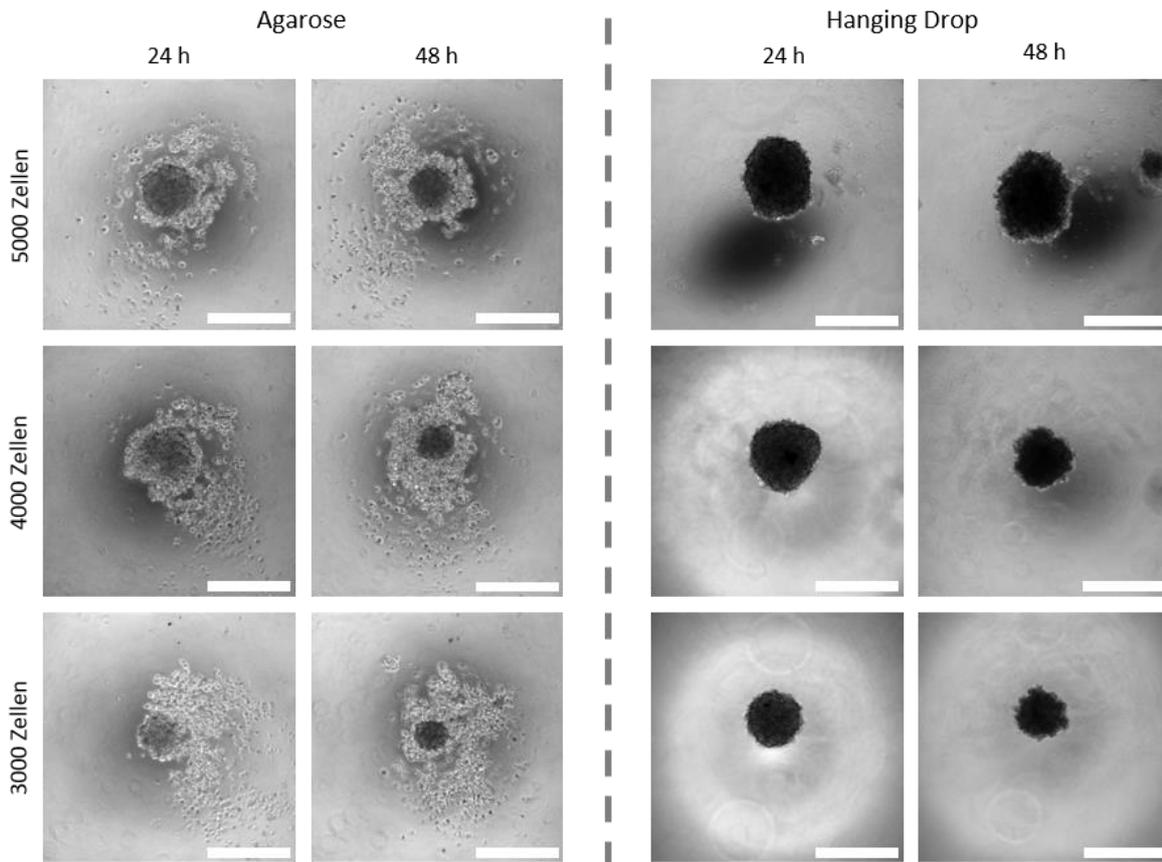
Zuerst wurden die HUVEC-GFP-Sphäroide für den *Sproutingassay* generiert. Es gibt verschiedene Herangehensweisen, um Sphäroide zu gewinnen. Zwei davon wurden für die HUVEC-GFP-Sphäroidherstellung getestet. Bei der ersten Methode wurden die Endothelzellen auf Agaroseplatten ausgesät, auf denen sich die Zellen aufgrund der konischen Oberfläche über Nacht zu Aggregaten zusammengelagerten. Dazu wurde 1,5 % Agarose in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst und je 40 µl der

Lösung in ein *Well* einer 96-*Well* Platte gefüllt. Die Agarose wurde 15 min abgekühlt, bis sie fest war. Anschließend wurden die Endothelzellen in 40  $\mu$ l Medium und Konzentrationen von 5000 Zellen, 4000 Zellen und 3000 Zellen pro *Well* auf die Platte gegeben und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert.<sup>287</sup> Durch die zellabweisenden Eigenschaften der Agarose und der entstandenen Kavität in der Agaroseoberfläche konnten sich die Zellen nicht an der Oberfläche adhären, sondern bildeten ausschließlich Zell-Zell-Kontakte und somit Sphäroide aus. Für die zweite Methode, dem *Hanging Drop* Verfahren wurden die Zellen in einem Gemisch aus Methylcellulosemedium und EGM-GFP (Verhältnis 1:4) resuspendiert und in 12  $\mu$ l Tropfen auf den Deckel einer 96-*Well* Platte pipettiert.<sup>282,288</sup> Dabei wurden ebenfalls Konzentrationen von 5000, 4000 und 3000 Zellen pro Tropfen getestet. Der Deckel mit den Zellsuspensionstropfen wurde auf die 96-*Well* Platte gesetzt, welche mit DPBS<sup>-/-</sup> befüllt wurde, um ein Austrocknen der Tropfen zu verhindern. Durch die Gravitation sammelten sich die Zellen in der Spitze des Mediumtropfens und konnten dort Sphäroide formen. Abbildung 38 zeigt schematisch den Herstellungsprozess der Sphäroide mit den zwei verschiedenen Methoden.



**Abbildung 38: Vergleich der Agarose und *Hanging Drop* Methode zur Gewinnung von HUVEC-GFP-Sphäroiden.** Links zu sehen ist eine Darstellung der Agarosemethode, bei der sich die HUVEC-GFP aufgrund der zellabweisenden Eigenschaften der Agarose zu Sphäroiden zusammenlagern. Auf der rechten Seite ist schematisch die Sphäroidgewinnung über das *Hanging Drop* Verfahren abgebildet. Die Zellen in dem Mediumtropfen sinken durch die Gravitation in die untere Mitte des Tropfens, wo sie sich zu Sphäroiden clustern. Ein DPBS<sup>-/-</sup> Reservoir verhindert das Austrocknen der Tropfen.

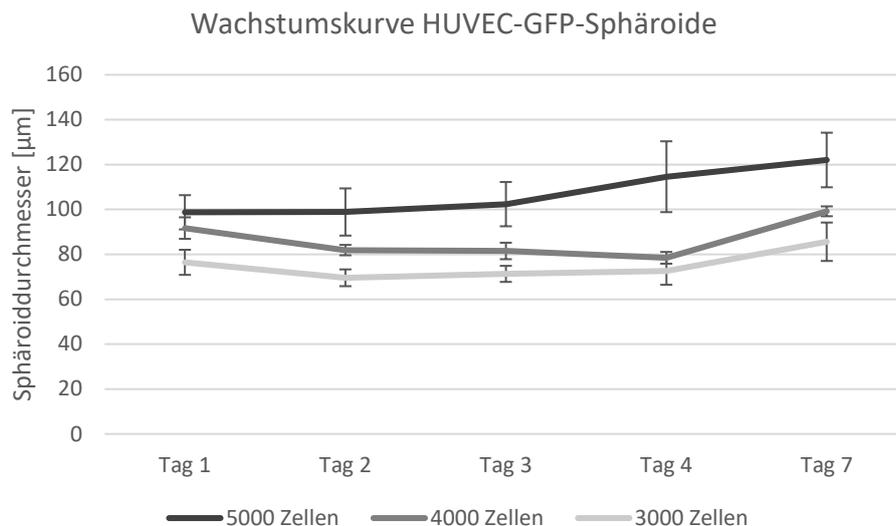
Die Bildung der Sphäroide mit Hilfe dieser beiden Methoden wurde nach den ersten 24 h sowie 48 h mit dem inversen Lichtmikroskop Leica DMI LED beobachtet (Abbildung 39). Auf den Agaroseplatten waren nach 24 h Zellaggregate bei allen Konzentrationen zu erkennen. Jedoch wurden nicht alle Zellen in die Sphäroide eingegliedert. Auf der *Hanging Drop* Platte hingegen konnte dies nicht beobachtet werden. Bei allen drei Konzentrationen hatten sich gleichförmige Sphäroide mit definiertem Rand ausgebildet. Zusätzlich hatten die Sphäroide auch nach 48 h noch ihre ursprüngliche Form beibehalten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die *Hanging Drop* Methode für die Sphäroidgewinnung in allen weiteren Versuchen verwendet.



**Abbildung 39: Vergleich von HUVEC-GFP-Sphäroiden gewonnen durch die Agarose und *Hanging Drop* Methoden.** Links: HUVEC-GFP-Sphäroide unterschiedlicher Größen nach 24 h und 48 h auf der Agaroseplatte. Rechts: HUVEC-GFP-Sphäroide unterschiedlicher Größe nach 24 h und 48 h hergestellt mit dem *Hanging Drop* Verfahren. Hellfeldaufnahmen mit dem inversen Leica LED DMI Mikroskop (10x Dry, Zoom: 1,0). Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.1.2 Wachstum der Sphäroide

Zur Charakterisierung der Sphäroide, welche mit der *Hanging Drop* Methode generiert wurden, wurden sowohl deren durchschnittlichen Größen als auch ihr Wachstumsverhalten ermittelt. Von besonderem Interesse dabei war, ob ein Einfluss der verwendeten Zellkonzentrationen auf das Wachstum beobachtet werden konnte. Zur Evaluierung wurde über den Verlauf von einer Woche eine Wachstumskurve der Sphäroide erstellt. Für die Wachstumskurve wurden Sphäroide in Triplikaten mit Zellzahlen von 5000 Zellen, 4000 Zellen und 3000 Zellen pro Sphäroid angesetzt. Dazu wurde die nötige Anzahl der Zellen in dem Methylcellulose/EGM-GFP Medium suspendiert und in 12  $\mu\text{l}$  Tropfen auf den Deckel einer 96-Well Platte pipettiert. Über den Verlauf einer Woche wurden an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 die Durchmesser von jeweils drei Sphäroiden pro Zellzahl gemessen und gemittelt. Dazu wurde die Platte um 180° auf den Deckel gedreht und mit dem inversen Lichtmikroskop Leica DMI LED mikroskopiert. Die erhaltenen Werte wurden in einer Wachstumskurve aufgetragen, welche in Abbildung 40 dargestellt ist.



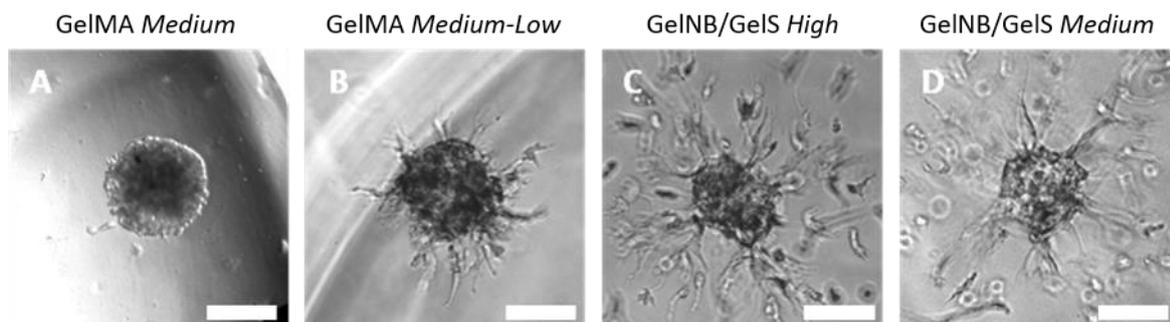
**Abbildung 40: Wachstumskurve der *Hanging Drop* HUVEC-GFP-Sphäroide.** Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde der Durchmesser der angesetzten HUVEC-GFP-Sphäroide bestimmt. Verglichen wurden mit dem *Hanging Drop* Verfahren erzeugte Sphäroide in drei verschiedenen Größen (5000 Zellen, 4000 Zellen und 3000 Zellen/Sphäroid). Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Innerhalb der ersten Tage konnte eine geringe Abnahme beziehungsweise Stagnierung der Sphäroiddurchmesser aufgrund der anhaltenden Kompaktierung der Zellen beobachtet werden. Sobald die Sphäroide vollständig aggregiert waren, konnte zu Tag 7 hin eine durchschnittliche Zunahme des Durchmessers der 5000er Sphäroide von  $23,3 \mu\text{m} \pm 14,7$  und der 3000er Sphäroide von  $5,6 \mu\text{m} \pm 13,7$  ermittelt werden. Für die 4000er Sphäroide hingegen wurde eine Stagnierung des Durchmessers beobachtet. Da die Durchmesser der 4000er Sphäroide die größte Konstanz aufwiesen, wurden diese, soweit nicht anders beschrieben für alle weiteren Experimente verwendet.

### 3.3.1.3 *Sproutingassay*

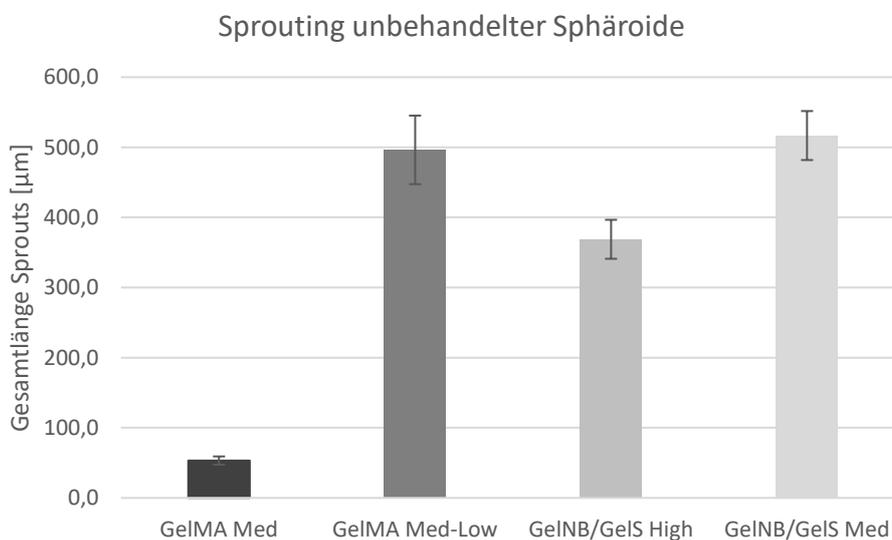
Um die Fähigkeit der 4000er Sphäroide zur Ausbildung von Ausläufern zu untersuchen, wurden diese nach Vorlage des *Sproutingassays* von Korff et al. in den Hydrogelen eingebettet.<sup>288</sup> Wie in verschiedenen Publikationen gezeigt werden konnte, bilden eingebettete HUVEC-Sphäroide auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren sogenannte Sprouts beziehungsweise Zellausläufer aus, welche zusammen kapillarähnliche Strukturen formen können.<sup>285,289,290</sup> Aus diesem Grund wurden die Sphäroide zunächst zur Kontrolle ohne Wachstumsfaktoren in die Hydrogele eingebettet und sowohl die kumulative Länge als auch die Anzahl der HUVEC-GFP Sprouts bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden 4000er HUVEC-GFP-Sphäroide mit der *Hanging Drop* Methode hergestellt und nach 24 h in je  $100 \mu\text{l}$  GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* gesetzt. Nach der Aushärtung der Sphäroidgele mit dem Omnicure S2000 ( $30 \text{ s}$ ,  $320\text{-}500 \text{ nm}$ ,  $500 \text{ mW/cm}^2$ ) wurden diese mit je  $100 \mu\text{l}$  EGM-GFP überschichtet und für weitere 24 h unter Standardbedingungen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5 \text{ \% CO}_2$  sowie gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach diesen 24 h wurden die Sphäroide mit einem inversen Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Abbildung 41 zeigt beispielhaft das Sprouting je eines Sphäroids in GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium*.



**Abbildung 41: Sproutingassay der HUVEC-GFP-Sphäroide eingebettet in GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium.** Sphäroide der Größe 4000 Zellen/Sphäroid wurden in je 100  $\mu\text{l}$  Hydrogel eingebettet und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 h wurden die Längen der Ausläufer mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet und die Gesamtlänge pro Sphäroid bestimmt. Die Hellfeldaufnahmen zeigen das Sprouting der Sphäroide nach 24 h und wurden mit dem inversen Leica DMI LED Mikroskop aufgenommen (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ .

Die Sphäroide zeigten in allen vier Hydrogelvarianten ein eigeninduziertes Sprouting. Während in GelMA Medium mehrere nur sehr kurze, feine Ausläufer zu erkennen waren, haben sich in GelMA Medium-Low deutlich dickere Sprouts gebildet, welche teilweise auch kapillarähnliche Strukturen aufwiesen. In den GelNB/GelS Gelen waren jeweils einige längere Sprouts zu erkennen. Um die Unterschiede des Sproutingverhaltens in den unterschiedlichen Hydrogelarten besser evaluieren zu können, wurden sowohl die Längen als auch die Anzahl der Sprouts mit der Software ImageJ bestimmt. Die daraus berechneten Gesamtlängen der Ausläufer sind in Abbildung 42 und die Anzahl der Sprouts in Tabelle 7 zusammengefasst.



**Abbildung 42: Auswertung des Sproutingassays von unbehandelten HUVEC-GFP-Sphäroiden in GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium.** Die Gesamtlängen der Sprouts wurden nach 24 h mit der Software ImageJ ausgemessen und zum besseren Vergleich in einem Graphen aufgetragen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

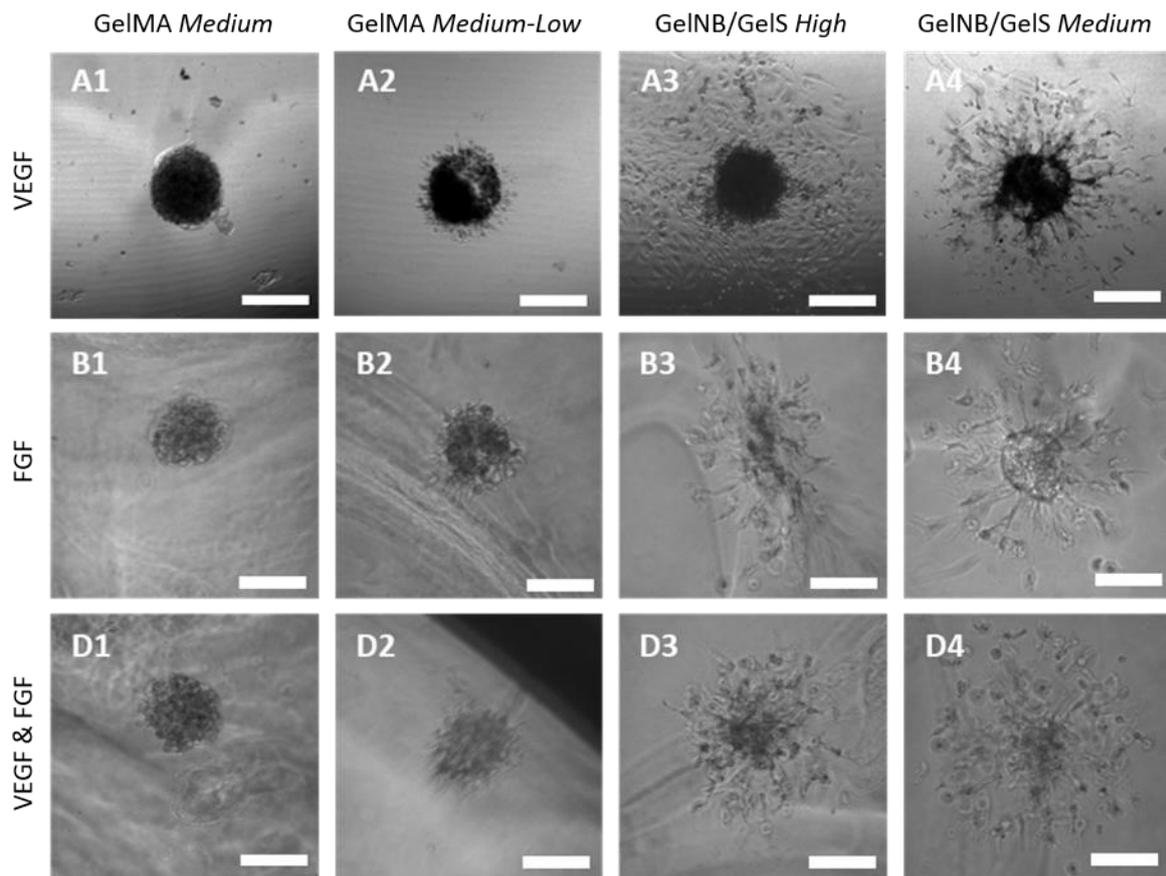
Tabelle 7: Anzahl der Sprouts in den unterschiedlichen Hydrogelen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Hydrogel	Anzahl Sprouts
GelMA <i>Medium</i>	4,3 $\pm$ 0,5
GelMA <i>Medium-Low</i>	8,3 $\pm$ 0,5
GelNB/GelS <i>High</i>	8,0 $\pm$ 0
GelNB/GelS <i>Medium</i>	5,0 $\pm$ 0

Anhand der Anzahl von Sprouts in Kombination mit der kumulativen Länge war zu erkennen, dass sich in den GelNB/GelS Hydrogelen deutlich längere Ausläufer gebildet haben als in den GelMA Gelen. In GelNB/GelS *Medium* zum Beispiel hatten fünf Ausläufer zusammen eine Länge von etwas über 500  $\mu\text{m}$ , während 4,3 Ausläufer in GelMA *Medium* 53  $\mu\text{m}$  ausgebildet haben. GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *High* hingegen hatten bei fast gleicher Sproutzahl eine ähnliche Gesamtlänge, was anhand der Bilder nicht ersichtlich gewesen ist. Es gilt allerdings zu beachten, dass die HUVEC-Sphäroide in alle Richtungen sprouten können, jedoch nur die Ausläufer gemessen wurden, die in der Fokusebene der Sphäroidmitte lagen. Trotz allem konnte festgehalten werden, dass das Sprouting in GelMA *Medium* auffallend gering war im Vergleich zu den anderen Hydrogelen. Ein Grund hierfür kann die Steifheit von GelMA *Medium* sein. In anderen Arbeiten wurde anhand von rheologischen Untersuchungen der viskoelastischen Eigenschaften dem GelMA *Medium* eine höhere Festigkeit gegenüber seinem geringer funktionalisierten Äquivalent und den GelNB/GelS Gelen nachgewiesen.<sup>120,130</sup> Diese höhere Festigkeit kann die Migration der Zellen im Gel erschweren, wodurch sich weniger und kürzere Sprouts ausbilden können. Durchschnittlich, mit Ausnahme von GelMA *Medium*, haben die in den Kontrollen eingebetteten Sphäroide Ausläufer mit einer Gesamtlänge von 460  $\mu\text{m}$  gebildet. Dies wiederum entspricht etwa der von Korff und Augustin berechneten Länge ihrer Kontrollen in Kollagengelen.<sup>285</sup>

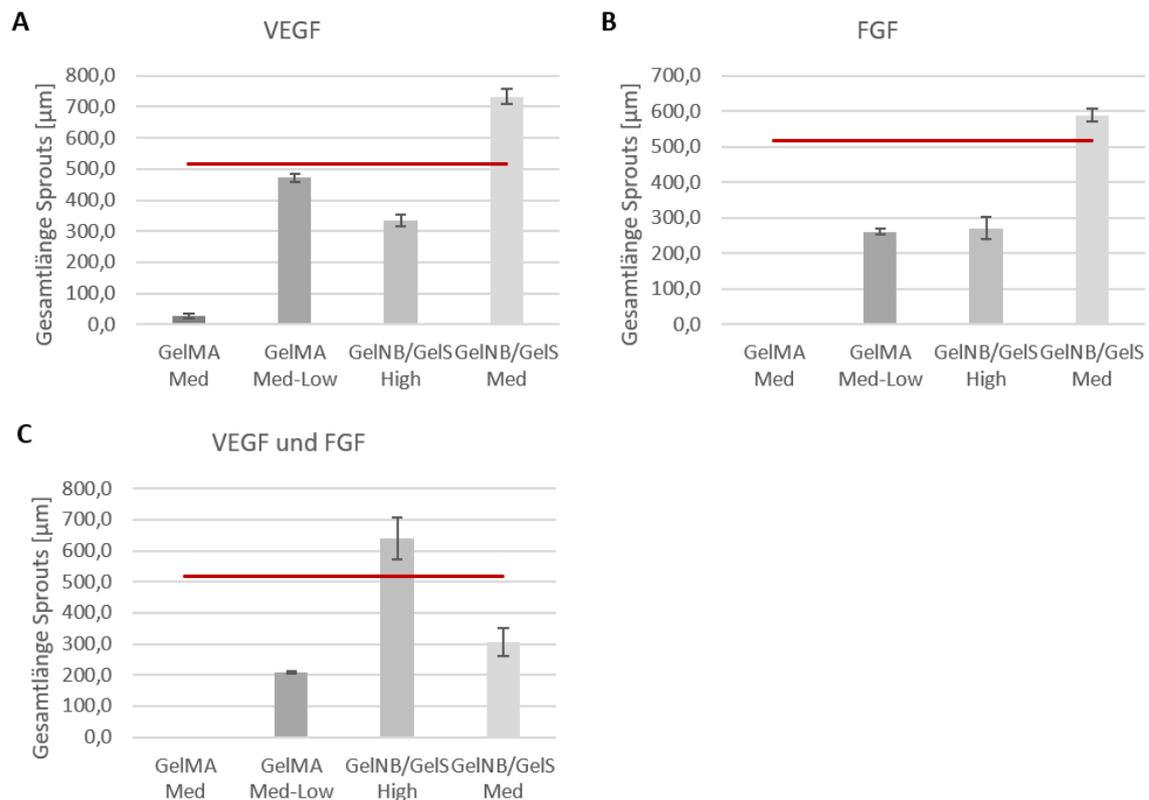
#### 3.3.1.4 Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF und FGF

Basierend auf eben diesem von Korff und Augustin entwickelten *Assay* sowie den Anpassungen von Heiss et al. wurden die Sphäroide in den Hydrogelen mit 50 ng/ml VEGF und 25 ng/ml FGF behandelt.<sup>285,289</sup> Ebenso wurde getestet, welchen Einfluss die simultane Gabe beider Faktoren auf das Sprouting der Endothelzellen ausübt. Beide Faktoren sind dafür bekannt, positive Regulatoren im Prozess der Angiogenese zu sein.<sup>291</sup> VEGF, vor allem der Vertreter VEGF-A, ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Angiogenese-Induktion. Er wird von Zellen in der näheren Umgebung von Endothelzellen gebildet und durch seine Sekretion kann die Blutgefäßbildung reguliert werden.<sup>292–294</sup> FGF, insbesondere FGF2, kann die Migration, Proliferation und auch die Gefäßformation von Endothelzellen steigern und ist somit ebenfalls an der Angiogenese beteiligt.<sup>295–297</sup> Zur Behandlung mit den beiden Wachstumsfaktoren wurden die HUVEC-Sphäroide wieder in 100  $\mu\text{l}$  der Hydrogele eingebettet. Dieses Mal wurden sie zusätzlich mit 50 ng/ml VEGF oder FGF, sowie mit beiden Faktoren gleichzeitig versetzt. Diese wurden jeweils über das *Medium* zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit wurden die Sphäroide unter dem inversen Lichtmikroskop DMI LED von Leica ausgewertet. Ein Ausschnitt der Ergebnisse nach der Behandlung der Sphäroide mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren ist in Abbildung 43 zu sehen.



**Abbildung 43: Sproutingassay der mit VEGF und FGF behandelten HUVEC-GFP-Sphäroide eingebettet in GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium.** Sphäroide der Größe 4000 Zellen/Sphäroid wurden in je 100  $\mu$ l Hydrogel eingebettet, mit 50 ng/ml VEGF, 25 ng/ml FGF oder beidem behandelt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde die Länge der Ausläufer mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet und die Gesamtlänge pro Sphäroid bestimmt. Die Hellfeldaufnahmen **A1-A4** zeigen das Sprouting der Sphäroide mit VEGF, **B1-B4** mit FGF und **C1-C4** die, die mit beiden Wachstumsfaktoren behandelt wurden. Für die Aufnahmen wurde ein inverses Leica DMI LED Mikroskop verwendet (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 100  $\mu$ m.

Die qualitative Betrachtung ergab zunächst keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Analyse des Sproutings in unbehandelten Gelen. Zur genaueren Auswertung des *Sproutingassays* wurden wieder die kumulativen Längen der HUVEC-Ausläufer mit ImageJ gemessen und ein Vergleich aller Bedingungen in Abbildung 44 zusammengestellt. Zudem wurde die maximal erreichte kumulative Länge der Kontrolle für einen besseren Vergleich in Rot dargestellt.



**Abbildung 44: Vergleich der Einflüsse von VEGF und FGF auf das Sproutingverhalten von HUVEC-GFP-Sphäroiden in der 3D-Zellkultur.** Die Graphen zeigen die gemessenen Gesamtlängen der Ausläufer von Sphäroiden, die mit **A:** 50 ng/ml VEGF, **B** 25 ng/ml FGF und **C** 50 ng/ml VEGF und 25 ng/ml FGF behandelt wurden. In Rot ist jeweils die maximale Gesamtlänge der Sprouts der Kontrolle markiert. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Bei den mit 50 ng/ml VEGF behandelten HUVEC-Sphäroiden war die Verteilung der Längen ähnlich wie bei der Kontrolle. Lediglich das Sprouting in GelNB/GelS *Medium* konnte durch die Zugabe von VEGF zusätzlich angeregt werden, wodurch sich die Gesamtlänge um etwa 200 µm gegenüber der Kontrolle erhöhte. Die in 25 ng/ml FGF kultivierten HUVEC-GFP-Sphäroide wiesen hingegen verringerte Längen auf. Während für GelMA *Medium* kein Sprouting mehr beobachtet wurde, nahm die Gesamtlänge auch in GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *High* im Vergleich zur Kontrolle und den VEGF behandelten Zellen ab. Die Länge in GelNB/GelS *Medium* lag als einziges wieder minimal über der Kontrolle. Bei der Behandlung mit beiden Faktoren veränderte sich die Längenverteilung. Das Sprouting in GelNB/GelS hatte mit einer Gesamtlänge von über 600 µm deutlich zugenommen. Die Gesamtlängen der Sprouts in GelMA *Medium* und GelNB/GelS *Medium* hingegen haben sich im Vergleich zur Kontrolle in etwa halbiert. Neben der kumulativen Länge der Ausläufer sollte das Sproutingverhalten in Abhängigkeit der Anzahl beurteilt werden. Die dafür berechneten Werte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Anzahl der Sprouts in den unterschiedlichen Hydrogelen nach der Behandlung der Sphäroide mit VEGF, FGF und VEGF+FGF. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

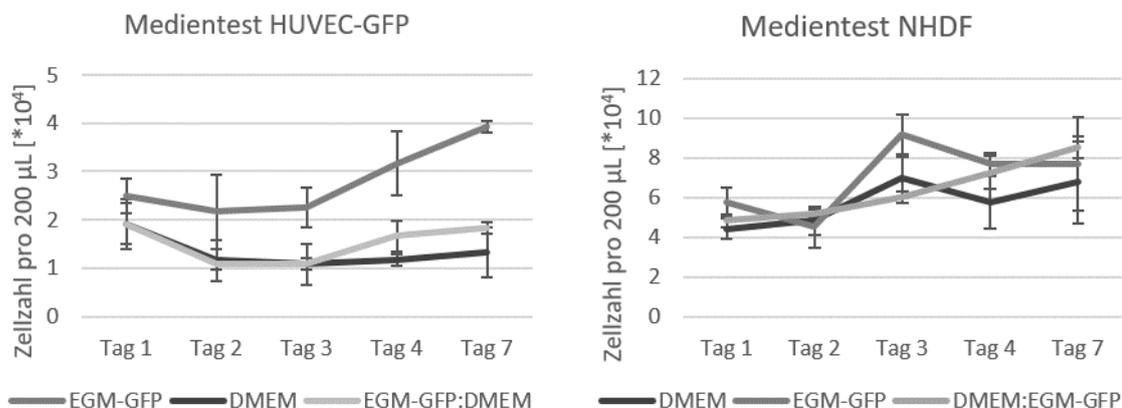
Hydrogel	Anzahl Sprouts VEGF	Anzahl Sprouts FGF	Anzahl Sprouts VEGF+FGF
GelMA <i>Medium</i>	6,0 $\pm$ 0,8	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
GelMA <i>Medium-Low</i>	36,0 $\pm$ 0,8	11,7 $\pm$ 0,5	9,7 $\pm$ 1,2
GelNB/GelS <i>High</i>	7,3 $\pm$ 0,47	7,7 $\pm$ 0,5	10,7 $\pm$ 0,5
GelNB/GelS <i>Medium</i>	21,0 $\pm$ 1,4	9,7 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,5

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Anzahl der Ausläufer durch die Zugabe von VEGF im Vergleich zur Kontrolle in allen Hydrogelen außer in GelNB/GelS *High* stieg. Für GelMA *Medium* insbesondere bedeutete es auch, dass die Sprouts deutlich kürzer als in der Kontrolle waren, da sich bei gleichbleibender kumulativer Länge die Anzahl der Sprouts mehr als vervierfacht hatte. Für GelNB/GelS *Medium* hingegen hatte sich neben der Anzahl der Sprouts auch die Gesamtlänge erhöht. Durch die Zugabe von FGF konnte für GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *Medium* ein Rückgang der Sprouts beobachtet werden, während bei GelNB/GelS *High* die Anzahl vergleichbar blieb. Darüber hinaus konnte ein Anstieg bei den GelNB/GelS Gelen beobachtet werden, die mit beiden Faktoren behandelt wurden. Für alle anderen Hydrogelarten wurden unter dieser Bedingung hingegen die geringste Sproutanzahl verzeichnet. Heiss et al. konnten durch die Zugabe von nur 25 ng/ml VEGF nach 24 h ähnliche Ergebnisse in Kollagenhydrogelen erzielen, welche in dieser Arbeit für die GelNB/GelS *Medium* Hydrogele ermittelt wurden.<sup>289</sup> Korff und Augustin hingegen erzielten durch die Zugabe von 50 ng/ml VEGF deutlich höhere Werte, ebenso durch die Zugabe von 30 ng/ml FGF2. Jedoch sind diese Ergebnisse nur begrenzt vergleichbar, da die Messung erst nach 3 Tagen durchgeführt wurde.<sup>285</sup> Zusammenfassend schien vor allem VEGF einen positiven Einfluss auf das Sproutingverhalten der Endothelzellen gehabt zu haben. FGF hingegen konnte nur in GelNB/GelS *Medium* für eine höhere Gesamtlänge im Vergleich zur Kontrolle sorgen.

### 3.3.1.5 Co-Kultur mit NHDF

*In-vivo* werden die an der Angiogenese beteiligten Wachstumsfaktoren nicht supplementiert, sondern von Zellen in der Umgebung sekretiert. So produzieren beispielsweise Fibroblasten im Bindegewebe, welches das Endothel umgibt, Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF und eine Reihe anderer an der Angiogenese beteiligte Faktoren.<sup>298–300</sup> Sie sind daher ein wichtiger Akteur im Angiogenese-Prozess und werden häufig in angiogene Zellkulturen eingebracht.<sup>301</sup> Aus diesen Gründen sollte auch in dieser Arbeit eine Co-Kultur der HUVEC-GFP mit normalen humanen dermalen Fibroblasten, kurz NHDF in den gelatinebasierten Hydrogelen etabliert werden. Da die Kultivierung der NHDF normalerweise in DMEM stattfindet und die der Endothelzellen in EGM-GFP, musste zunächst bestimmt werden in welchem der Medien die Co-Kultur angesetzt werden sollte. Dazu wurden pro *Well* einer 96-*Well* Platte  $1 \cdot 10^4$  NHDF ausgesät und auf einer anderen Platte die Endothelzellen. In Triplikaten wurden die Zellen jeweils in reinem EGM-GFP, in reinem DMEM und in einem 1:1 Gemisch aus EGM-GFP und DMEM unter Standardbedingungen kultiviert. Von jeder Bedingung wurden jeweils fünf Triplicate angesetzt, je eins, um die Zellzahlen an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 bestimmen zu können. Dazu wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Trypsin pro *Well* bei 37 °C abgelöst, mit 100  $\mu$ l DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

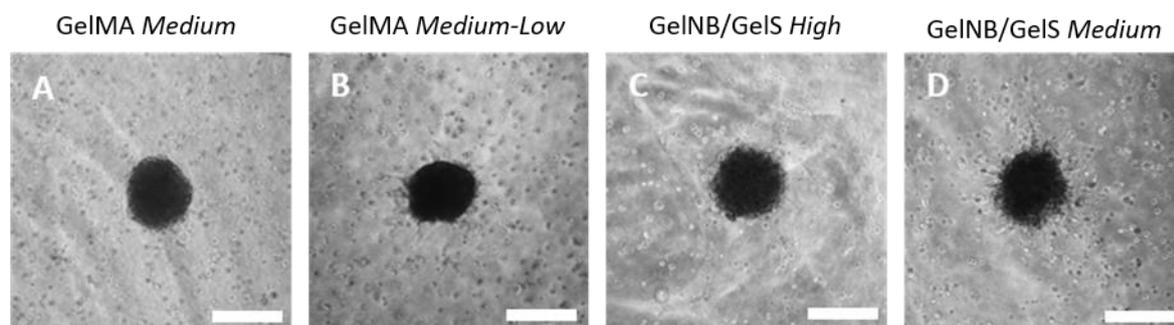
Die Zellzahlen der Endothelzellen und der Fibroblasten in 200  $\mu\text{L}$  wurden dann in je einer Wachstumskurve aufgetragen, welche in Abbildung 45 dargestellt sind.



**Abbildung 45: Evaluierung des optimalen Kultivierungsmediums für die Co-Kultur von NHDF und HUVEC-GFP.**  $1 \cdot 10^4$  Zellen der HUVEC-GFP beziehungsweise NHDF wurden pro Well einer 96-Well Platte ausgesät und über den Zeitraum von einer Woche in unterschiedlichen Medien kultiviert. Getestet wurden die Medien DMEM, EGM-GFP und eine Mischung der beiden im Verhältnis 1:1. An den Tagen 1,2,3,4 und 7 wurden die Zellzahlen in Triplikaten bestimmt und das Ergebnis in Form einer Wachstumskurve aufgetragen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

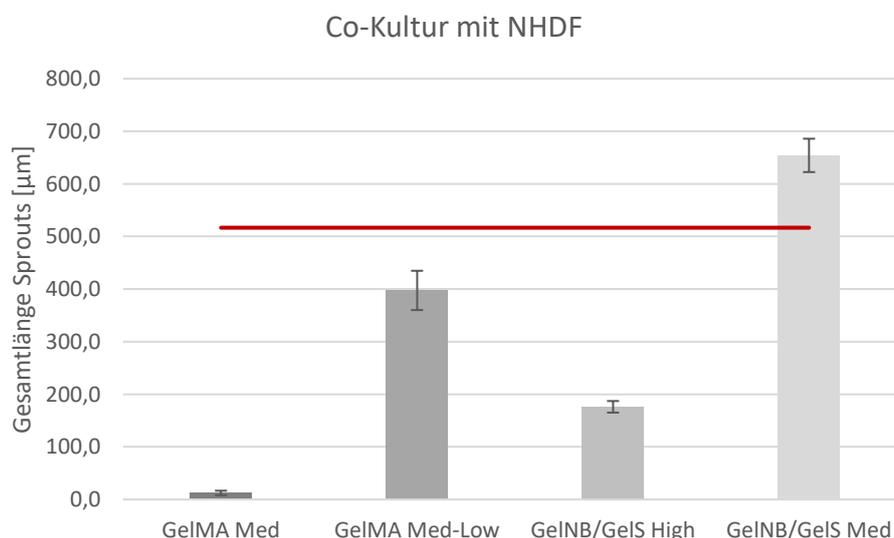
Die HUVEC-GFP Zellen zeigten ab Tag 1 das beste Wachstum in reinem EGM-GFP im Vergleich zu den anderen Medien. Bis Tag 3 stagnierte das Wachstum in EGM-GFP zwar, stieg anschließend aber bis Tag 7 auf  $4 \cdot 10^4$  Zellen/200  $\mu\text{L}$ . In DMEM und dem Gemisch hingegen konnte nur eine Stagnierung des Wachstums beobachtet werden. Demnach konnte für die HUVEC-GFP nur in EGM-GFP ein deutliches Wachstum bestimmt werden. Die NHDF hingegen zeigten ein konstantes Wachstum in allen drei Zellmedien, bei dem sich die Zellzahl innerhalb der sieben Tage fast verdoppelte. Die in dem Mischmedium kultivierten NHDF zeigten dabei ein minimal stärkeres Wachstum, gefolgt von reinem EGM-GFP und die geringste Zellzahl in DMEM. Da der Unterschied im Wachstumsverhalten der NHDF nur minimal unterschiedlich war und die HUVEC-GFP deutlich schneller in EGM-GFP wachsen, wurde dieses Medium für die Co-Kultur gewählt.

Um diese Co-Kultur herzustellen, wurden  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml unter die Hydrogellösungen gemischt. 100  $\mu\text{L}$  der Hydrogel-Zellsuspension wurden in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert, in welches anschließend ein 4000er HUVEC-GFP-Sphäroid gesetzt wurde. Die Hydrogele wurden dann mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet. Überschichtet wurden die Gele mit 100  $\mu\text{L}$  EGM-GFP, welches außerdem mit 50 ng/ml VEGF versetzt wurde. Da die NHDF neben bFGF noch weitere proangiogene Faktoren sekretieren, sollte untersucht werden, wie sie das Sproutingverhalten der Endothelzellen beeinflussen können und ob ein Unterschied zu den supplementierten Hydrogelen zu erkennen ist.<sup>302,303</sup> Dazu wurden die HUVEC-GFP-Sphäroide nach 24 h unter dem inversen DMI LED Mikroskop von Leica untersucht. Die Abbildung 46 zeigt eine Zusammenfassung der Mikroskopieergebnisse.



**Abbildung 46: Sproutingassay der HUVEC-GFP-Sphäroide eingebettet in GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium in Co-Kultur mit NHDF.** Sphäroide der Größe 4000 Zellen/Sphäroid wurden zusammen mit  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml in je 100  $\mu$ l Hydrogel eingebettet, mit 50 ng/ml VEGF behandelt und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde die Länge der HUVEC-GFP-Ausläufer mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet und die Gesamtlänge pro Sphäroid bestimmt. Für die Aufnahmen wurde ein inverses Leica DMI LED Mikroskop verwendet (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 100  $\mu$ m.

Die Hellfeldaufnahmen zeigten neben den HUVEC-GFP-Sphäroiden auch die eingebetteten Hautfibroblasten. Im Vergleich zu den mit synthetischem FGF behandelten Zellen war in den GelMA Gelen kein großer Unterschied zu erkennen, während in den GelNB/GelS Hydrogelen die Ausläufer deutlich kürzer waren. Dies kann damit zusammenhängen, dass die ebenfalls im Hydrogel eingebetteten Fibroblasten zu viel Raum beanspruchten oder die viskoelastischen Eigenschaften der Gele veränderten, weshalb die Endothelzellen nicht in das Hydrogel hineinwachsen konnten. Um beurteilen zu können, ob nur die Länge der Sprouts sich verändert hatte, oder auch die kumulative Länge, wurden die Ausläufer ausgemessen und summiert. In Abbildung 47 ist das Ergebnis der Berechnungen zu sehen.



**Abbildung 47: Auswertung der Co-Kultur von HUVEC-Sphäroiden und NHDF.** 4000er HUVEC-GFP-Sphäroide wurden in NHDF beladenen Hydrogelen eingebettet und nach der Kultivierung über Nacht wurde die Gesamtlänge der HUVEC-Ausläufer bestimmt. Die Co-Kultur wurde zusätzlich mit 50 ng/ml VEGF behandelt. In Rot ist die maximale Gesamtlänge der Sprouts aus der Kontrolle markiert. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Die berechneten kumulativen Längen waren den Ergebnissen der ausschließlich mit 50 ng/ml VEGF behandelten Sphäroide sehr ähnlich. Neben der Verteilung glichen sich die Ergebnisse auch in den Summen der Sproutlängen, wobei die Gesamtlängen in den NHDF Gelen etwa um 100 µm kürzer waren. Bei Betrachtung der Sproutanzahlen in Tabelle 9 fiel ebenfalls eine Vergleichbarkeit der Werte mit den VEGF Gelen auf. Die Sphäroide hatten in den NHDF Gelen nur geringfügig weniger Sprouts ausgebildet.

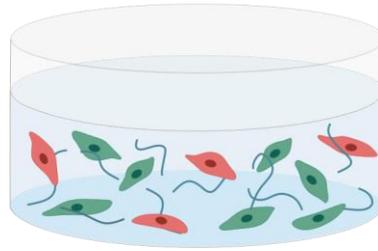
Tabelle 9: Anzahl der Sprouts in den unterschiedlichen Hydrogelen in der Co-Kultur mit NHDF. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Hydrogel	Anzahl Sprouts
GelMA <i>Medium</i>	1,7 ±0,5
GelMA <i>Medium-Low</i>	21,0 ±0,8
GelNB/GelS <i>High</i>	5,0 ±0
GelNB/GelS <i>Medium</i>	20,7 ±0,5

Anhand der kumulativen Längen konnte nicht konkret beurteilt werden, ob die NHDF einen Einfluss auf die HUVEC hatten oder nur das supplementierte VEGF. Lediglich die Längen der einzelnen Sprouts in den GelNB/GelS Gelen waren im Vergleich zu den VEGF Gelen verkürzt. Um den Einfluss der NHDF zu bestimmen, kann das Experiment ohne die Supplementierung von VEGF wiederholt werden. Zudem ist von FGF zwar bekannt, dass es eine Rolle in der adulten Blutgefäßformation spielt, jedoch ist nicht genau geklärt, ob FGF von intakten Zellen überhaupt sekretiert wird oder nur von verletzten beziehungsweise sterbenden Zellen.<sup>294,304,305</sup> Um zu ermitteln, ob und welche Proteine die Fibroblasten ausbilden, kann beispielsweise ein ELISA-Assay zur Bestimmung und Quantifizierung verwendet werden. Es besteht zudem die Möglichkeit, dass die NHDF aufgrund fehlender metabolischer Aktivität keine Faktoren ausgebildet haben. Bei Betrachtung der Mikroskopiebilder (Abbildung 45) ist zu erkennen, dass sich die Fibroblasten in den Hydrogelen nicht ausgestreckt und keine Zell-Zell-Kontakte ausgebildet hatten. Dies kann ein entscheidender Faktor sein. Zumindest konnte bereits in selbst assemblierten Co-Kultivierungssystemen erfolgreich die Angiogenese von Endothelzellen auf einer dreidimensionalen NHDF-Schicht etabliert werden, in denen den Fibroblasten eine Ausschüttung von 0,03 ng/1,5 ml FGF nachgewiesen werden konnte.<sup>306</sup>

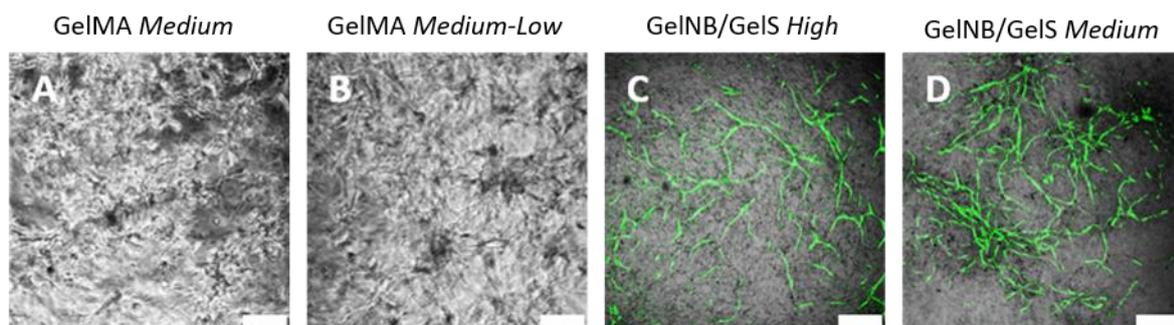
### 3.3.2 Sprouting in der 3D-Zellkultur

Nachdem anhand der 3D-Sphäroidkulturen der Einfluss der oben beschriebenen Parameter untersucht wurde, sollte getestet werden, ob die Angiogenese ebenso in einzeln eingekapselten Endothelzellen ausgelöst werden kann. Solche Modelle sind vor allem interessant, da eine der größten Herausforderungen im *Tissue Engineering* darin besteht, vaskuläre Gewebemodelle herzustellen. Vor allem in größeren Strukturen ist diese Vaskularisierung notwendig, um die Zellen während des Gewebewachstums bis zur möglichen Implantation mit Nährstoffen zu versorgen.<sup>222</sup> Dabei gibt es bereits Erfolge zum Beispiel in Matrigel oder Kollagen.<sup>307,308</sup> Für die Vaskularisierung der Hydrogele GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* sollten sowohl HUVEC-GFP als auch NHDF in die Gele eingebettet und mit VEGF behandelt werden. Dieses 3D-Modell ist schematisch in Abbildung 48 dargestellt.



**Abbildung 48: Schematische Darstellung der 3D-Co-Kultur.** HUVEC-GFP (rot) und NHDF (grün) werden in Hydrogelen kultiviert und mit VEGF behandelt, um dreidimensionale Endothelnetzwerke durch Angiogenese auszubilden.

$5 \cdot 10^5$  HUVEC und  $10 \cdot 10^5$  NHDF wurden pro Milliliter in den Hydrogelen eingebettet. Dazu wurden beide Zellarten in den Hydrogelvorläufern resuspendiert und je  $200 \mu\text{l}$  wurden in das *Well* eines 8-Well ibidi *Slides* gegeben. Nach der Aushärtung mit dem Omnicure wurden die Gele mit EGM-GFP und  $50 \text{ g/ml}$  VEGF überschichtet. Die Kultivierung der 3D-Gele erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%$   $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchtigkeit für sieben Tage, wobei die Vaskularisierung täglich mit dem inversen LED Mikroskop von Leica verfolgt wurde. Die Abbildung 49 zeigt die Vaskularisierung der Gele nach sieben Tagen.

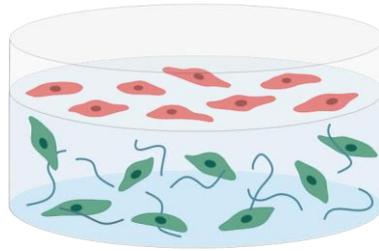


**Abbildung 49: Dreidimensionale Co-Kultur von HUVEC-GFP und NHDF.**  $5 \cdot 10^5$  HUVEC-GFP und  $10 \cdot 10^5$  NHDF wurden in einem Milliliter Hydrogel ausgesät. Nach siebentägiger Kultivierung mit  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF wurde das Sproutingverhalten der HUVEC-GFP mit dem inversen Lichtmikroskop Leica DMI LED untersucht. **A** und **B** zeigen Hellfeldaufnahmen der Angiogenese in GelMA, **C** und **D** wurden zur besseren Visualisierung der Angiogenese in GelNB/GelS zusätzlich mit den GFP-Floreszenzen überlagert ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500\text{-}550 \text{ nm}$ , 4xDry, Zoom:1,0). Maßstab:  $400 \mu\text{m}$ .

Nach einer Woche Inkubation konnte in allen vier Hydrogeltypen die Ausbildung von vaskulären Netzwerken aus HUVEC-GFP beobachtet werden. Während sich die HUVEC in den GelMA Hydrogelen zunächst zu sphäroidähnlichen Strukturen aggregiert und anschließend Ausläufer gebildet hatten, sind die HUVEC in den GelNB/GelS Gelen unter Ausbildung eines Netzwerks zusammengewachsen. Auffällig war bei allen Gelarten, dass die Vaskularisierung nur planar in einer Ebene im Hydrogel stattgefunden hatte. Es konnte keine dreidimensionale Vaskularisierung festgestellt werden. Daher sollte in einem nächsten Schritt versucht werden, planar auf dem Hydrogel ausgesäte Endothelzellen in das Hydrogel einwachsen zu lassen.

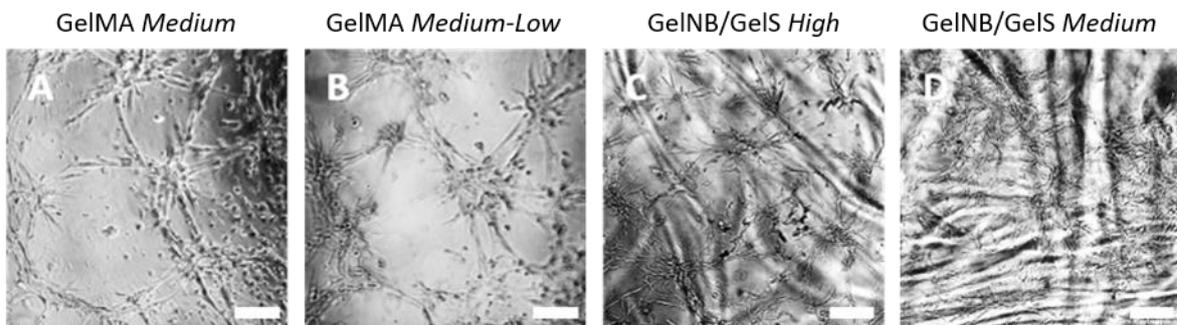
### 3.3.3 Sprouting in der 2,5D-Zellkultur

Der Aufbau dieses 2,5-dimensionalen Modells ist den späteren Gegebenheiten im Chip angenähert, bei dem die Endothelzellen planar im Kanal des Hydrogelchips ausgesät werden und anschließend in das umgebende Hydrogel einwachsen sollen. Die Abbildung 50 zeigt ein Schema dieses 2,5D-Modells.



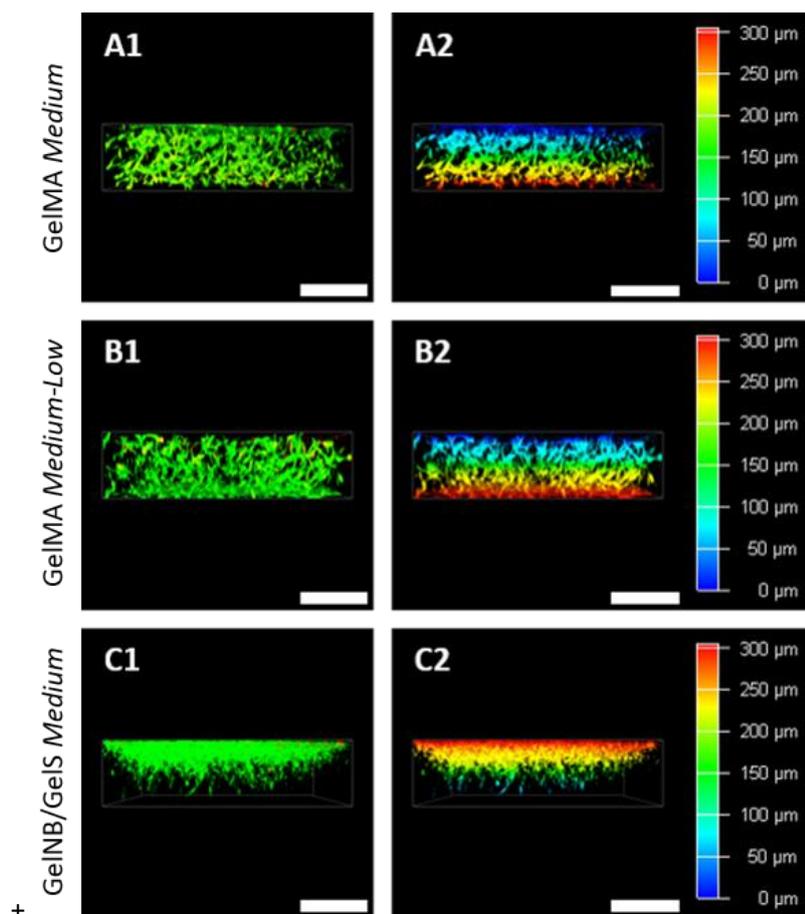
**Abbildung 50: Schematische Darstellung der 2,5D-Zellkultur.** Bei der 2,5D-Zellkultur werden die HUVEC-GFP (rot) planar auf der Hydrogeloberfläche ausgesät, während die NHDF (grün) im Gel eingebettet sind.

Im unteren Hydrogelkompartiment werden die Fibroblasten eingebettet. Die Endothelzellen werden planar (2D) auf der Geloberfläche ausgesät und durch die Zugabe von VEGF zur Angiogenese angeregt. Im Experiment wurde dieses Schema umgesetzt, indem  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml im Hydrogel eingebettet wurden. Nach der Aushärtung der Gele in einem 8-Well ibidi Slide wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml zusammen mit 50 ng/ml VEGF auf den Hydrogeloberflächen ausgesät. Die Evaluierung der Angiogenese erfolgte mit dem Leica DMI LED über einen Zeitraum von einer Woche. Die Ergebnisse an Tag 7 sind in Abbildung 51 zu sehen.



**Abbildung 51: 2,5D-Co-Kultur von HUVEC-GFP und NHDF.**  $10 \cdot 10^5$  NHDF wurden in 1 ml Hydrogel eingebettet. Nach der Polymerisation wurden die Gele mit  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml und 50 ng/ml VEGF überschichtet. An Tag 7 wurde das Sprouting anhand von Hellfeldaufnahmen mit dem inversen Leica DMI LED Mikroskop festgehalten (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 200  $\mu$ m.

Auf allen Hydrogeloberflächen hatten sich die HUVEC-GFP, wie bereits bei Experimenten zuvor beobachtet, zu sphäroidartigen Aggregaten zusammengelagert, zwischen denen die Endothelzellausläufer gebildet wurden. Auf Gelen, auf denen die HUVEC-GFP keine Aggregate ausgebildet hatten, konnte hingegen auch kein Sprouting festgestellt werden. Lediglich die Ausbildung von Adhäsionskontakten anhand zellmorphologischer Veränderungen wurde beobachtet. Dieses Experiment zeigte erneut die Wichtigkeit der Zelldichte bei der Angiogenese, welche auch von Monteiro et al. beschrieben wurde.<sup>254</sup> In den 3D-Gelen konnte diese entweder durch die Aggregation oder die Migration der Zellen in eine Ebene erreicht werden. Ebenso in der 2,5D-Kultur, in der durch die Aggregation Zell-Zell-Kontakte ermöglicht wurden, welche wiederum ein Sprouting der Zellen auslösten. Jedoch konnte in diesen Gelen kein Einwachsen der Endothelzellen in das Hydrogel beobachtet werden. In Kooperation mit Anna Steinbach (IFG, KIT) wurde eine Langzeitkultivierung der Gele über 21 Tage durchgeführt.<sup>309</sup> Dabei wurden die Gele alle sieben Tage mit Hilfe von Z-Stacks auf Ausläufer im Hydrogel untersucht. Bereits nach 14 Tagen konnten erste Sprouts beobachtet werden, welche in die Hydrogele *GelMA Medium*, *GelMA-Medium-Low* und *GelNB/GelS Medium* hineinwuchsen. Nach 21 Tagen hatten sich diese Sprouts noch weiter verdichtet und verlängert. Die Z-Stack Aufnahmen der HUVEC-GFP Sprouts sind in Abbildung 52 zu sehen.



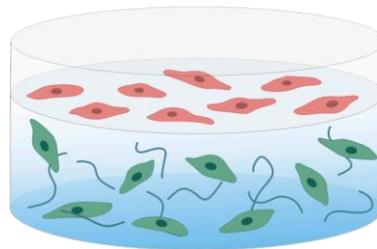
**Abbildung 52: Sprouting der HUVEC-GFP in die Hydrogele hinein.** Nach 21 Tagen Inkubation konnte bei den 2,5D-Co-Kulturen ein Wachstum der HUVEC-GFP-Ausläufer in die darunter liegende Gelschicht beobachtet werden. **A** zeigt das Sprouting in *GelMA Medium*, **B** in *GelMA Medium-Low* und **C** in *GelNB/GelS Medium*. Die *Z-Stacks A1, B1, C1* wurden mit dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop Leica Stellaris 5 aufgenommen ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500\text{-}550 \text{ nm}$ ) und **A2, B2, C2** zeigen Tiefenfarbungen dieser Bilder. Größe *Z-Stacks*:  $300 \mu\text{m}$ , Schrittgröße:  $5 \mu\text{m}$ . Maßstab:  $400 \mu\text{m}$ . In Kooperation mit Anna Steinbach (IFG, KIT).<sup>309</sup>

Auf den *Z-Stack* Aufnahmen war in den Hydrogelen *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low* und *GelNB/GelS Medium* eine gleichmäßige Verteilung der HUVEC Sprouts zu beobachten. In den *GelMA* Gelen waren die Ausläufer dabei noch stärker ausgeprägt als in dem *GelNB/GelS* Gel. Anhand der Tiefenfarbungen war zu erkennen, dass sich die Ausläufer in *GelMA* über eine Länge von  $300 \mu\text{m}$  erstrecken, während die Sprouts in *GelNB/GelS* nur etwa  $200 \mu\text{m}$  weit in die Gele gewachsen sind. Zudem besaßen sie eine deutlich feinere Struktur. Ähnliche strukturelle Unterschiede konnten auch schon auf den Bildern nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen beobachtet werden (Abbildung 50). Dort haben die HUVEC in *GelMA* ebenfalls deutlich dickere Sprouts entwickelt als die Zellen auf den *GelNB/GelS* Gelen. Je nach Anwendung könnte so beispielsweise auch die Dicke der Blutgefäße über den Einsatz von verschiedenen Gelen variiert werden. Das gleiche Langzeitexperiment wurde auch mit den 3D-Zellkulturen durchgeführt, jedoch haben sich die Sprouts auch nach der längeren Kultivierung nicht dreidimensional ausgebreitet. Ein Unterschied der Zellkulturen lag bei der Lokalisierung des Wachstumsfaktors VEGF. Dieser wurde über das Medium zugeführt und von den Hydrogelen aufgenommen. Während die Zellen in der 3D-Kultur von VEGF-haltigem Hydrogel umgeben sind, liegen die Zellen in der 2,5D-Kultur auf den Gelen auf. Die Angiogenese ist grundsätzlich ein gerichteter Prozess, welcher entlang des zunehmenden Gradienten eines Wachstumsfaktors verläuft.<sup>310</sup> Während die eingekapselten

HUVEC von allen Seiten mit VEGF umgeben sind, entsteht für die Zellen der 2,5D-Kultur eine Art Gradient, da der Wachstumsfaktor in dem darunter liegenden Hydrogel aufkonzentriert ist.

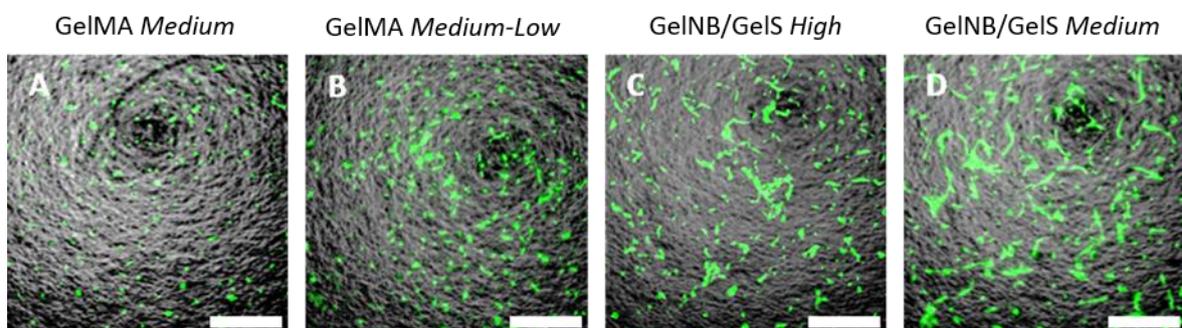
### 3.3.4 Gradientengele

Um die Wichtigkeit eines VEGF Gradienten für das Sprouting zu testen, sollte über einen künstlich erzeugten Gradienten versucht werden, das Sprouting vor allem in den GelNB/GelS Gelen zu verbessern. Dazu sollten mehrere Hydrogelschichten mit unterschiedlichen VEGF Konzentrationen übereinander ausgehärtet werden, wobei die NHDF weiterhin dreidimensional eingekapselt und die HUVEC planar auf der Oberfläche ausgesät werden. Dieses Gradientenmodell ist schematisch in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53: Schematische Darstellung der Gradientengele.** Die humanen Hautfibroblasten (grün) werden in einem Hydrogel eingebettet, welches aus drei Schichten mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen zusammengesetzt ist. So entsteht im Gel ein Gradient des Wachstumsfaktors. Die HUVEC-GFP (rot) werden planar auf der obersten Schicht mit der niedrigsten Konzentration ausgesät.

Zunächst wurden Hydrogele mit drei verschiedenen Konzentrationen (50 ng/ml, 25 ng/ml und 12,5 ng/ml) VEGF versetzt. Unter jedes dieser Hydrogele wurden außerdem  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml gemischt. Beginnend mit dem 50 ng/ml Hydrogel wurde die erste Schicht in einem 8-Well ibidi Slide mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm,  $500 \text{ mW/cm}^2$ ) ausgehärtet. Anschließend erfolgte die Aushärtung der nächsten Schicht mit 25 ng/ml VEGF und zuletzt die der Schicht mit 12,5 ng/ml. Auf diesem Gradientengel wurden zum Schluss  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP in EGM-GFP ausgesät. Nach sieben-tägiger Kultivierung unter Standardbedingungen erfolgte die Auswertung der Gele am Leica DMI LED Mikroskop. Die Überlagerungen der dabei entstandenen Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 54 zusammengestellt.



**Abbildung 54: Sprouting der HUVEC-GFP auf den Gradientengelen.**  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml wurden auf drei Hydrogellösungen mit unterschiedlichen VEGF Konzentrationen aufgeteilt. Darauf folgend wurden  $100 \mu\text{l}$  der Hydrogellösung mit 50 ng/ml VEGF in einem Well eines ibidi Slides ausgehärtet. Darüber folgten eine Schicht mit 25 ng/ml und eine mit 12,5 ng/ml VEGF. Auf der letzten Schicht wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP/ml in  $200 \mu\text{l}$  EGM-GFP ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach sieben Tagen erfolgte die Auswertung des HUVEC-GFP Sproutings mit dem Leica DMI LED. Dargestellt sind Überlagerungen der entstanden Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500-550 \text{ nm}$ , 10x Dry, Zoom: 1,0). Maßstab:  $100 \mu\text{m}$ .

Durch das Einbringen eines VEGF Gradienten in das Hydrogel konnte die Angiogenese in den Hydrogelvarianten nur sehr gering bis gar nicht induziert werden. Dabei konnte ausschließlich in den GelNB/GelS Gelen der Beginn des Sproutings erkannt werden sowie eine Adhäsion der Zellen auf dem GelMA *Medium-Low* Gel. Für GelMA *Medium* hingegen konnte lediglich eine geringe Zelladhäsion festgestellt werden. In keinem der Gele konnte ein Sprouting der planaren Endothelzellen in das darunter liegende Hydrogel beobachtet werden. Im direkten Vergleich mit den 2,5D-Gele konnte demnach durch den künstlichen Gradienten keine verbesserte Angiogeneseaktivität erreicht werden. Bei längerer Kultivierung der Zellen konnte außerdem die zunehmende Ablösung der Zellen von den Hydrogeloberflächen verzeichnet werden. Die geringe Zelldichte auf der Geloberfläche sowie die verringerte Konzentration von 12,5 ng/ml VEGF scheinen für die Induktion der Angiogenese nicht zu genügen. Diese Annahme wird durch Werte in der Literatur bestätigt. Demnach sinkt die Proliferation der Endothelzellen bei VEGF-Konzentrationen niedriger als 25 ng/ml, wodurch sich auch die geringe Zelldichte nach sieben Tagen erklären lässt.<sup>311</sup> Eine Erhöhung der Konzentrationen in den einzelnen Schichten kann die Proliferation und die Angiogenese der HUVEC-GFP fördern. Da jedoch bei den zuvor vorgestellten 2,5D-Gele vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde das VEGF in allen weiteren Versuchen ebenfalls über das Medium zugegeben.

### **3.3.5 Kapitelzusammenfassung: Angiogenese der Endothelzellen**

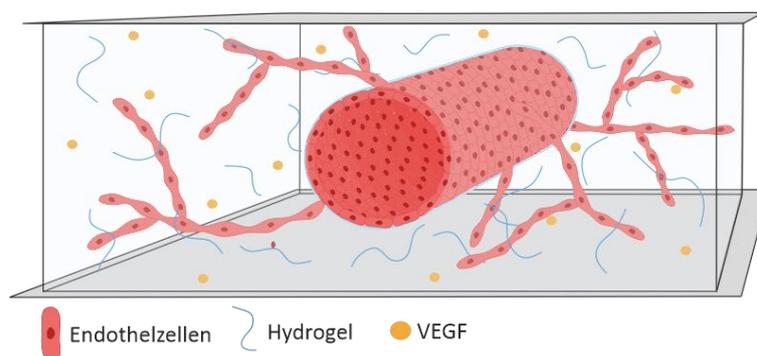
In diesem Kapitel wurde neben der geeigneten Methode zur Generierung von HUVEC-Sphäroiden evaluiert, unter welchen Bedingungen HUVEC-GFP das stärkste Sproutingverhalten zeigen. Anhand der *Sproutingassays* der HUVEC-Sphäroide in den Hydrogelen konnte bestimmt werden, dass die Zugabe von 50 ng/ml VEGF den größten Effekt auf die Endothelzellen hat. In 3D- und 2,5D-Kulturen wurden die gewonnen Erkenntnisse eingesetzt, um dreidimensionale Netzwerke zu erzeugen. Dies konnte vor allem in den 2,5D-Zellkulturen erfolgreich umgesetzt werden. Das Einfügen eines Gradienten in das System, um ein zielgerichtetes Sprouting auszulösen, hatte hingegen keinen positiven Einfluss auf die 2,5D-Kultur.

### 3.4 Angiogenese im Chipsystem

In Kapitel 3.3 konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine dreidimensionale Vaskularisierung in den Hydrogelen *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low*, *GelNB/GelS High* und *GelNB/GelS Medium* möglich ist. Im nächsten Schritt sollten die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Versuchen auf das zuvor etablierte Hydrogelchipsystem übertragen werden. Durch das Sprouting der Endothelzellen aus den Kanälen heraus sollte das umgebende Hydrogelkompartiment vaskularisiert werden, um auch Mikroblutgefäße in den Chips abbilden zu können. Es existieren bereits verschiedenste *vessel-on-a-chip* Systeme, welche mit dem gleichen Ansatz arbeiten.<sup>312</sup> Van Duinen et al. beispielsweise verwendeten ein Drei-Kanalsystem mit durchlässigen Kanalwänden. Im obersten Kanal wurde ein konfluentes Endothel ausgesät, während der Wachstumsfaktor in den untersten injiziert wurde. Der mittlere Kanal, der die beiden anderen trennt, wurde mit einem Kollagenhydrogel befüllt. Durch die Perfusion des Wachstumsfaktors in das Hydrogel hinein entstand ein natürlicher VEGF-Gradient welcher wiederum die Endothelzellen zum Sprouting in das Kollagen hinein anregte.<sup>227</sup> Ähnliche Systeme verwendeten auch Fibrinmatrices oder PDMS.<sup>313–315</sup> Ein reines Hydrogelsystem hingegen haben Ouyang et al. entwickelt. Durch den parallelen Druck von zwei verschiedenen Biotinten, GelMA als Gerüststruktur und mit HUVEC beladene Gelatine als Opferstruktur, konnten zellbesiedelte Hohlstrukturen gewonnen werden. Zwar konnte in dieser Arbeit die strukturelle Vielfalt aufgezeigt werden, welche auf Grundlage des Extrusionsdrucks möglich ist, jedoch konnte kein Sprouting der Endothelzellen in das GelMA beobachtet werden.<sup>316</sup>

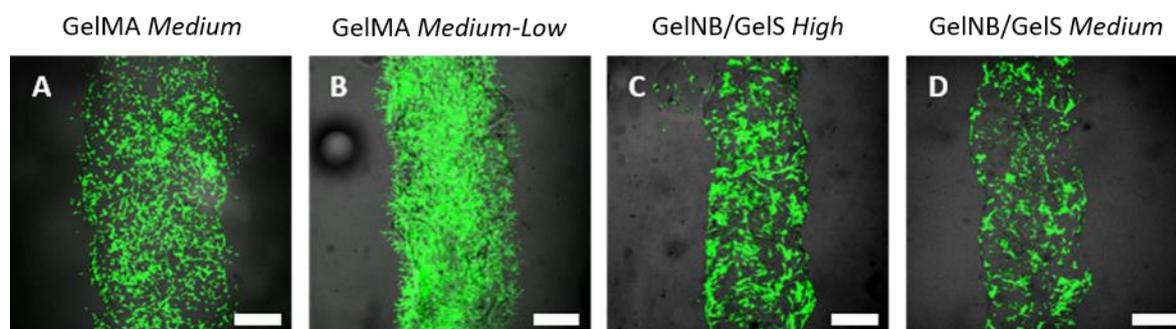
#### 3.4.1 Induktion der Angiogenese mit VEGF

Um das Sprouting der Endothelzellen in dem in dieser Arbeit vorgestellten Hydrogelsystem zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse, welche in Kapitel 3.3 gewonnen wurden, auf den Chip übertragen. Dazu sollten die Extrusionschips wie in Kapitel 3.2 beschrieben, hergestellt und mit den Endothelzellen besiedelt werden. Die Hydrogelchips sollten dann mit VEGF-haltigem Medium überschichtet werden, was wiederum die Angiogenese der HUVEC-GFP induzieren sollte. Die Abbildung 55 zeigt den grundlegenden Aufbau dieses angiogenen Modells.



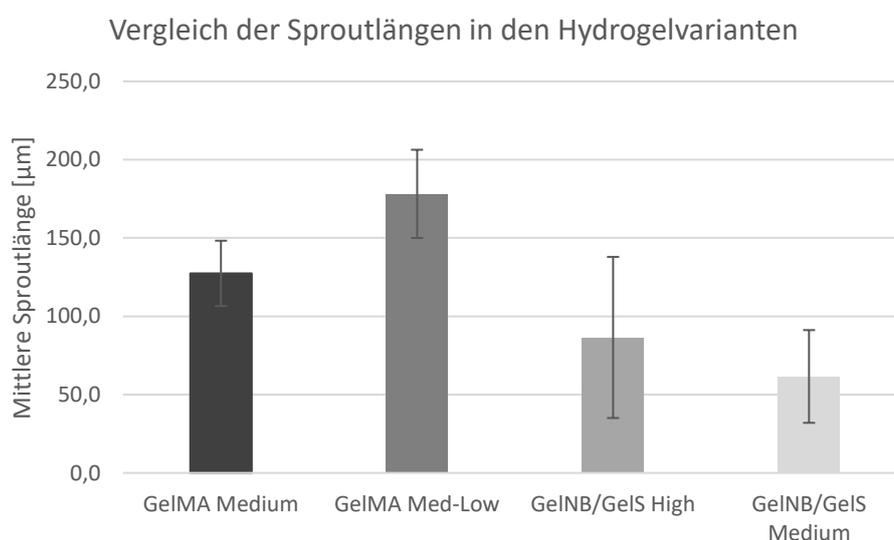
**Abbildung 55: Schematische Darstellung der Angiogenese im Chipmodell.** Die Endothelzellen (rot) im Kanal werden durch VEGF (gelb) zur Angiogenese angeregt und wachsen in das umgebende Hydrogel.

Die Hydrogelchips wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben mit der Opferstrukturmethode hergestellt. Die Kanäle wurden von beiden Seiten mit je  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP jeweils über Nacht besiedelt und mit 1 ml EGM-GFP und 50 ng/ml VEGF überschichtet. Nach der Inkubation über Nacht konnte das Sprouting der Zellen unter dem Leica Stellaris 5 beobachtet werden. Das Sprouting in den verschiedenen Hydrogelvarianten wird in Abbildung 56 verglichen.



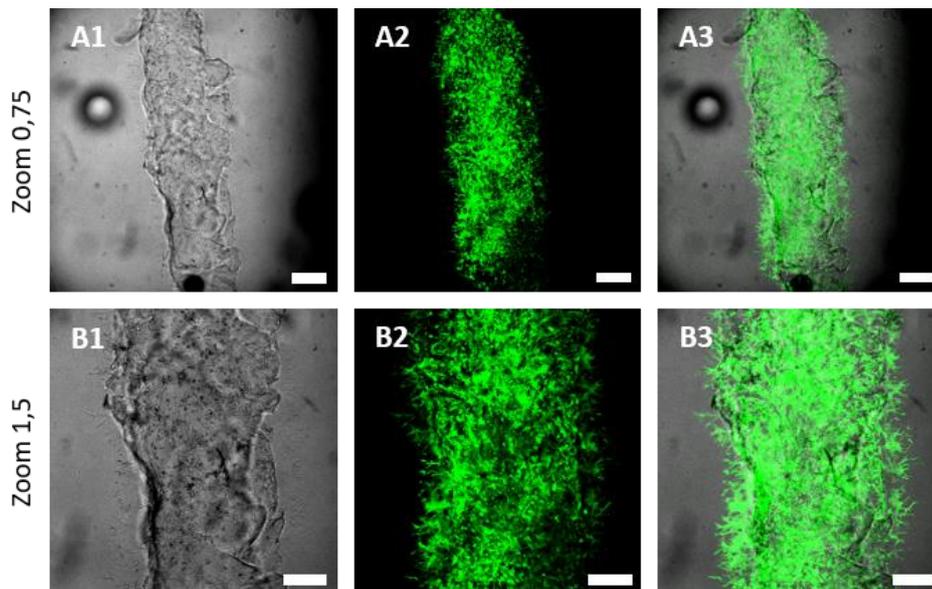
**Abbildung 56: Vergleich des Sprouting der Endothelzellen in den verschiedenen Hydrogelchips.** Extrusionsbasierte Chips wurden aus *GelMA Medium*, *GelMA Medium-Low*, *GelNB/GelS High* und *GelNB/GelS Medium* hergestellt und die Kanalstrukturen von beiden Seiten mit  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Anschließend wurden die Chips mit Nährmedium und 50 ng/ml VEGF überschichtet. Nach der Inkubation über Nacht unter Standardbedingungen wurde das Sprouting der HUVEC-GFP mit dem Leica Stellaris 5 ( $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4xDry) aufgenommen. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$ .

Auf den Überlagerungen der Hellfeld- und Fluoreszenzbilder war das Sprouting der Endothelzellen vorwiegend in den GelMA Hydrogelen zu beobachten. Sowohl in *GelMA Medium* als auch in *GelMA Medium-Low* waren entlang der gesamten Kanalstrukturen Ausläufer zu erkennen, die aus den Kanälen in die Hydrogele hineingewachsen sind. Dennoch gab es einen deutlichen Unterschied zwischen dem *Medium* und dem *Medium-Low* Gel. Im *Medium-Low* Chip waren die Zelldichte und die Dichte der Sprouts deutlich höher. In den GelNB/GelS Hydrogelen dagegen war die Angiogenese deutlich schwächer. In *GelNB/GelS High* konnten lediglich fünf Sprouts gezählt werden und in der *Medium* Variante lediglich drei. Zudem waren große Lücken in den Endothelen der beiden Chips zu erkennen, was darauf hindeutete, dass die HUVEC in diesen Chips schlechter angewachsen sind. Zum besseren Vergleich des Sproutings in den Hydrogelvarianten wurden die mittleren Längen der Ausläufer berechnet und graphisch in Abbildung 57 aufgetragen.



**Abbildung 57: Mittlere Länge der Sprouts in den unterschiedlichen Hydrogelen.** Die Länge der zehn längsten Sprouts in den verschiedenen Hydrogelvarianten wurde mit ImageJ gemessen und gemittelt. Die Mittelwerte wurden bestimmt über  $n=10$  für *GelMA Medium* und *GelMA Medium-Low*, sowie  $n=5$  für *GelNB/GelS* und  $n=3$  für *GelNB/GelS Medium*. Die Bestimmung der Standardabweichung erfolgte mit  $n-1$ .

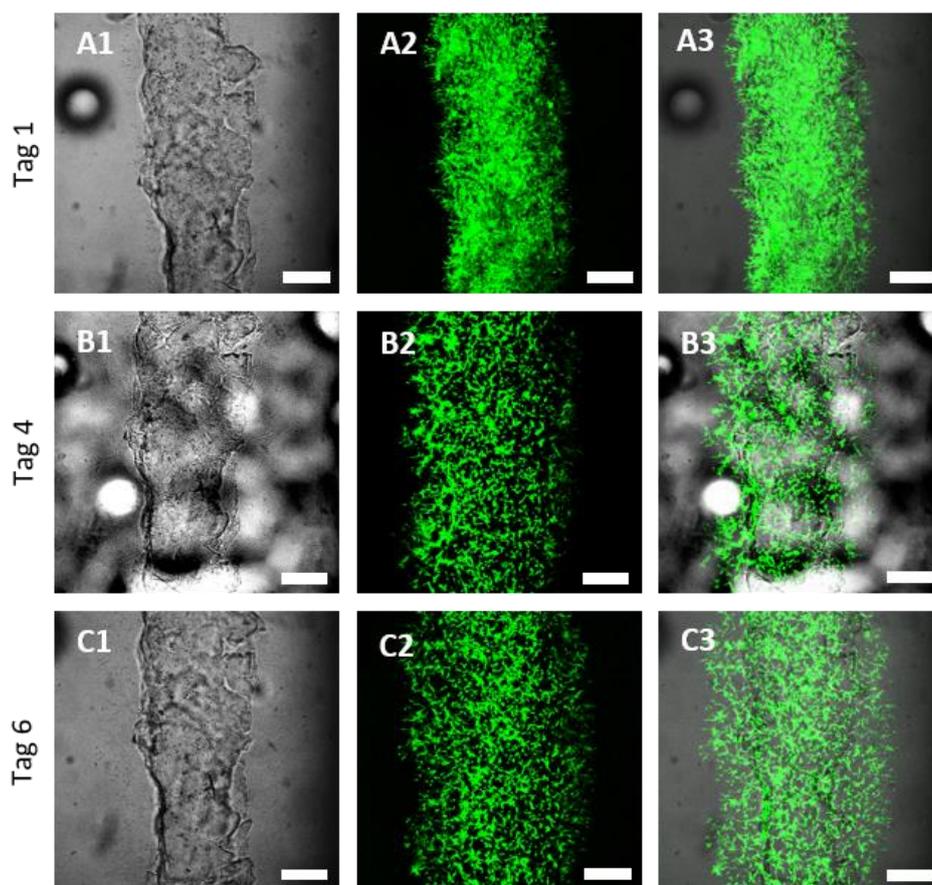
Für die GelMA Hydrogele konnte der Mittelwert aus jeweils zehn der längsten Sprouts gebildet werden und bei den GelNB/GelS Hydrogelen aus den gezählten fünf beziehungsweise drei Sprouts. Der Graph zeigt, dass sich in GelMA *Medium-Low* die längsten Ausläufer gebildet hatten, was anhand der Mikroskopiebilder schon vermutet werden konnte. Das zweitbeste Ergebnis lieferte das GelMA *Medium* Hydrogel und die kürzesten Sprouts konnten in GelNB/GelS *Medium* gefunden werden. Anhand der Ergebnisse aus Kapitel 3.3 wäre das nicht zu erwarten gewesen, da dort durch die Zugabe von VEGF der höchste Wert für die kumulative Länge der Ausläufer in GelNB/GelS *Medium* bestimmt werden konnte. Im Allgemeinen scheinen die HUVEC in den GelMA Hydrogelen besser angewachsen zu sein, wodurch sich ein dichtes Endothel im Kanal bilden konnte. Da eben auch die Zelldichte eine große Rolle im Sproutingverhalten der HUVEC spielt, war dieses dementsprechend in GelNB/GelS deutlich geringer.<sup>254</sup> Zur besseren Zelladhäsion können die Kanäle mit Kollagen beschichtet werden, um anschließend evaluieren zu können, ob eine erhöhte Zelldichte im Kanal tatsächlich zum vermehrten Sprouting führt. Anhand der vorangegangenen positiven Viabilitäts- und 3D-*Sproutingassays* konnte zumindest ausgeschlossen werden, dass das Material für das verminderte Sprouting verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Vorversuche zu Kultivierungs- und Behandlungsbedingungen in dieser Arbeit weiterhin mit allen Hydrogelen durchgeführt. In den Chipsystemen selbst wurde jedoch ausschließlich GelMA *Medium-Low* verwendet, da es das dichteste Zellwachstum und Sprouting aufweisen konnte. In Abbildung 58 sind noch zwei weitere Ansichten des GelMA *Medium-Low* Kanals abgebildet, welche die Eignung des Materials bestätigen.



**Abbildung 58: Sprouting der HUVEC-GFP im Chipsystem.** Aus GelMA *Medium-Low* wurde ein Hydrogelchip mit einfachem Kanal hergestellt. Der Kanal wurde oben und unten mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP beschichtet und mit 50 ng/ml VEGF behandelt. Nach 24 h Behandlung konnte ein Sprouting der Endothelzellen aus dem Kanal heraus in das umliegende Gewebe beobachtet werden. Mit dem Leica Stellaris 5 wurden sowohl Hellfeldaufnahmen vom Kanal (**A1**, **B1**) als auch Fluoreszenzbilder ( $\lambda_{ex}=482$  nm,  $\lambda_{em}=500-550$  nm, 4xDry) der HUVEC-GFP (**A2**, **B2**) mit unterschiedlichem Zoom (**A**: 0,75, **B**: 1,5) aufgenommen. **A3** und **B3** zeigen Überlagerungen dieser Bilder. Maßstab: 400  $\mu$ m.

Der kleinere Zoom (0,75-fach) zeigt einen größeren Ausschnitt des Kanals und bestätigt, dass die Endothelzellen sich auch weiter oben und unten entlang des Kanals gleichmäßig verteilt hatten. Die Nahaufnahme des Kanals zeigt wie dicht das Endothel und wie gleichmäßig das Sprouting auf beiden Seiten des Kanals war. Innerhalb von 24 h konnte so also ein vaskularisiertes Hydrogel

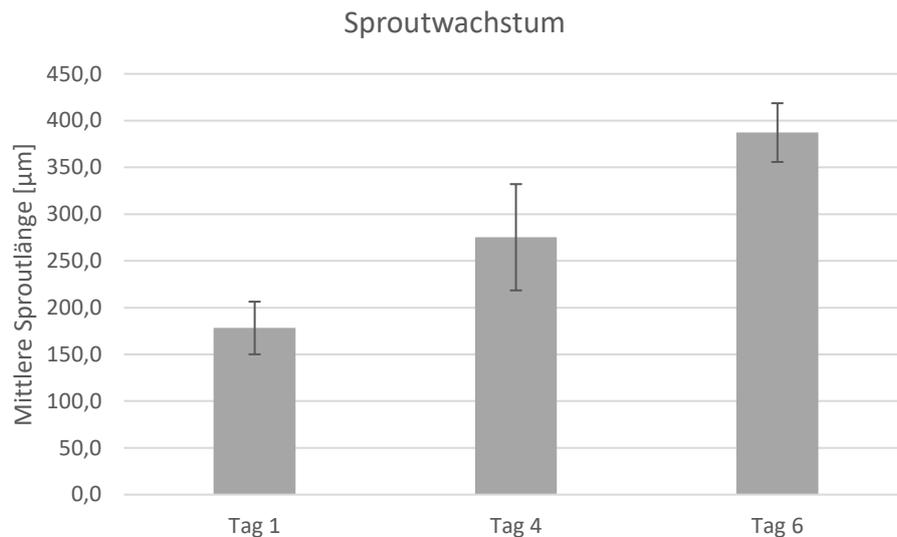
hergestellt werden. Allerdings konnte innerhalb dieser Zeitspanne nur die nahe Umgebung des Kanals vaskularisiert werden, da die durchschnittliche Länge der Sprouts nur etwa 180  $\mu\text{m}$  betrug. Daher sollte die Kultivierungszeit verlängert werden, um zu untersuchen, ob die Sprouts noch weiter in die Gele einwachsen. Dazu wurden die zu zuvor hergestellten Hydrogelchips für weitere sechs Tage unter Standardbedingungen kultiviert und jeden zweiten Tag mit frischem Medium und VEGF versorgt. Während der Kultivierung wurden die Chips täglich mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 evaluiert. Ein Ausschnitt der Ergebnisse der sechstägigen Kultivierung des GelMA *Medium-Low* Chips ist in Abbildung 59 zu sehen. Dabei ist auf allen Bildern der gleiche Kanalabschnitt dargestellt, um einen direkten Vergleich der Ausläufer zu ermöglichen.



**Abbildung 59: Kultivierung der Chips über einen Zeitraum von sieben Tagen.** Aus GelMA *Medium-Low* wurde ein Hydrogelchip mit einfachem Kanal hergestellt. Der Kanal wurde oben und unten mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP beschichtet und mit 50 ng/ml VEGF behandelt. Über den Verlauf einer Woche wurden das Sprouting der HUVEC-GFP mit dem Leica Stellaris 5 verfolgt. An den Tagen 1, 4 und 6 wurden jeweils Hellfeld- (A1, B1, C1) und auch Fluoreszenzaufnahmen (A2, B2, C2) gemacht ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500-550 \text{ nm}$ , 4xDry). A3, B3 und C3 zeigen Überlagerungen dieser Bilder. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$ .

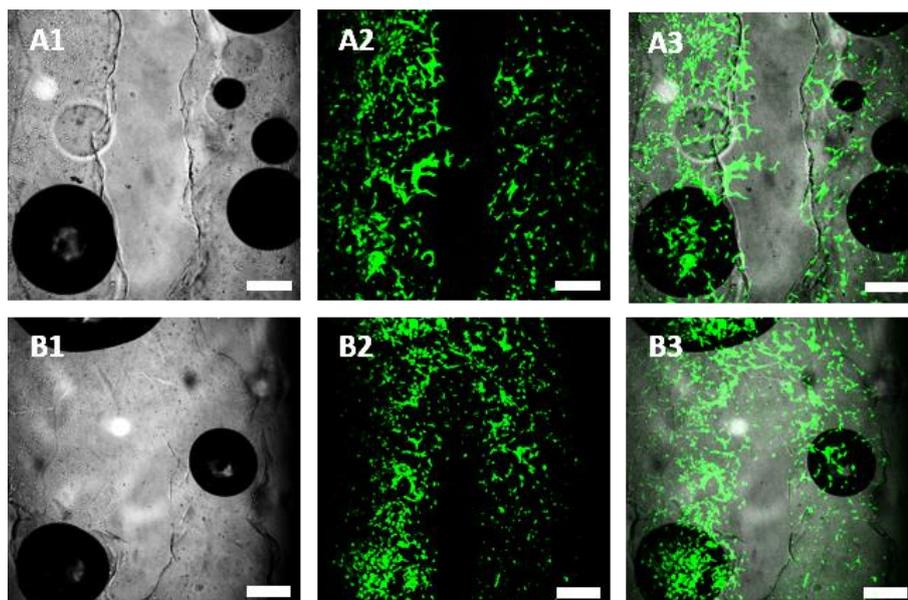
Über den Kultivierungszeitraum von sechs Tagen hinweg war eine deutliche Ausweitung der vaskulären Strukturen zu erkennen. Bereits an Tag 4 hatten die HUVEC-GFP Sprouts deutlich an Länge gewonnen und nahmen dadurch mehr extrazellulären Raum ein. An Tag 6 war nochmals eine Steigerung der Fläche zu beobachten, welche durch HUVEC-Ausläufer eingenommen wurde. Neben der Zunahme der Sproutlängen verloren die Endothele an Zelldichte. Entweder sind die Endothelzellen in den Kanälen weiter auseinander migriert, oder einige Zellen hatten sich mit der Zeit von der Hydrogeloberfläche abgelöst. Ähnliches konnte auch in den GelMA *Medium* und GelNB/GelS Hydrogelen festgestellt werden. Während der längeren Kultivierung hatten sich immer

mehr Zellen abgelöst, sodass nach einer Woche keine Zellen mehr in den Kanälen waren. Interessant wäre die Beobachtung des Zellverhaltens über einen noch längeren Zeitraum. Als eine der größten Herausforderungen bei der Handhabung der Hydrogelchips stellte sich jedoch der Erhalt der Sterilität heraus. Trotz der Zusammensetzung und Lagerung der Chips in steriler Umgebung boten die offenen Systeme einen Nährboden für Kontaminationen. Daher war eine Langzeitkultivierung über mehrere Wochen nicht möglich. Trotzdem konnten bereits über den Zeitraum von einer Woche hinweg erfolgreich Veränderungen der Sprouts und des Endothels dokumentiert werden. Um das Wachstum der Sprouts genauer beurteilen zu können, wurde die mittlere Länge an den Tagen 1, 4 und 7 bestimmt (Abbildung 60).



**Abbildung 60: Vergleich der mittleren Länge der Sprouts über den Zeitraum von einer Woche.** Die Länge der zehn längsten Sprouts wurde an den Tagen 1, 4 und 6 im GelMA *Medium-Low* Chip mit ImageJ gemessen und gemittelt. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=10$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Innerhalb einer Woche Kultivierungszeit hatte sich die durchschnittliche Länge der HUVEC-GFP Sprouts im Hydrogel verdoppelt. An Tag 1 wurde eine mittlere Länge der Sprouts von knapp 180 µm gemessen, welche innerhalb von drei Tagen bereits auf 275 µm anstieg. An Tag 6 erreichten die Sprouts eine durchschnittliche Länge von 390 µm. Diese mittleren Sproutlängen konnten durch Literaturwerte bestätigt werden; HUVEC-RFP (RFP, engl.: *red fluorescent protein*) erreichten in einer Biotinte bestehend aus natürlicher extrazellulärer Matrix und Kollagen vergleichbare Längen.<sup>317</sup> Bei einer durchschnittlichen Breite des Hydrogelchips und einem mittleren Durchmesser der Kanalstrukturen von 0,5 cm verblieben auf jeder Seite noch 0,5 cm welche vaskularisiert werden sollten. Bei einer mittleren Sproutlänge von 0,4 mm konnte somit nur ein geringer Teil des Hydrogels durch die Sprouts abgedeckt. Zum Zweck der großflächigeren Vaskularisierung wurde zuvor das Chipmodell mit der verzweigten Kanalstruktur vorgestellt. Dieses vaskularisiert schon im Voraus einen Großteil des Hydrogels. Durch das Sprouting der Endothelzellen sollten auch noch die freien Räume zwischen den Kanälen abgedeckt werden. Zu diesem Zweck wurden GelMA *Medium-Low* Chips mit verzweigten Kanalstrukturen wie in Kapitel 3.2 beschrieben hergestellt. Über zwei Tage hinweg wurden die durch die Gelatine-Opferstruktur gewonnenen Gefäße von beiden Seiten mit je  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Abbildung 61 zeigt Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen der verzweigten Kanäle und der darin kultivierten HUVEC-GFP.

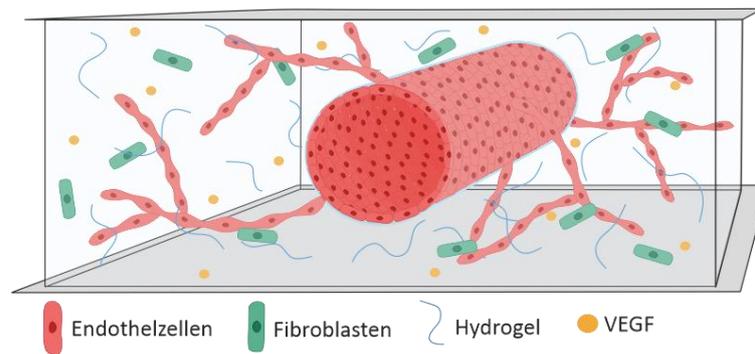


**Abbildung 61: Sprouting der HUVEC-GFP im verzweigten Chipsystem.** Aus GelMA *Medium-Low* wurde ein Hydrogelchip mit gespaltenem Kanal hergestellt. Der Kanal wurde oben und unten mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP beschichtet und mit 50 ng/ml VEGF behandelt. Nach 24 h Behandlung konnte ein Sprouting der Endothelzellen in das Gewebe zwischen den Kanälen beobachtet werden. Mit dem Leica Stellaris 5 wurden sowohl Hellfeldaufnahmen vom Kanal (**A1**, **B1**) als auch Fluoreszenzbilder ( $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4xDry, Zoom: 1,0) der HUVEC-GFP (**A2**, **B2**, **C2**) aufgenommen. **A3** und **B3** zeigen Überlagerungen dieser Bilder. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$ .

Bereits nach 24 h konnte die Ausbildung von Sprouts zwischen den Kanälen beobachtet werden. Teilweise sind die Sprouts so weit in das Gel vorgedrungen, dass sie sich mit den Sprouts der gegenüberliegenden Kanäle verbunden hatten. Das Sprouting konnte allerdings nicht gleichmäßig entlang der Kanalstrukturen beobachtet werden, sondern nur lokal. Durch eine längere Kultivierung der Hydrogelchips konnte außerdem keine weitere Steigerung der Vaskularisierung beobachtet werden. Zudem war die Zelldichte in den verzweigten Kanälen niedriger als in den einfachen, wodurch das Sproutingverhalten eingeschränkt war. Mit einer Erhöhung der Zelldichte der Endothelzellen in den verzweigten Kanälen kann das Sprouting verbessert werden. Anhand der Ergebnisse konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass eine vollständige Vaskularisierung der Hydrogele durch die Ausbildung von Endothelzellnetzwerken zwischen den Kanälen grundsätzlich möglich ist.

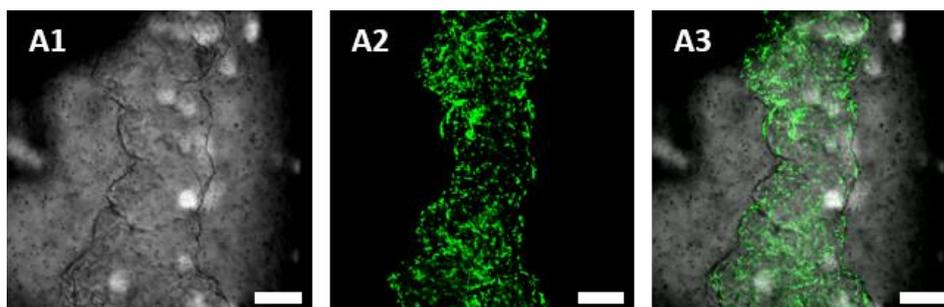
### 3.4.2 Co-Kultur mit NHDF im Chip

Um das *Organ-on-a-chip* Modell weiter an die *in-vivo* Gegebenheiten anzupassen, sollten in das umgebende Hydrogelkompartiment Fibroblasten eingebettet werden. Dadurch sollte ein artifizielles Bindegewebe um die Blutgefäße herum konstruiert werden. Wie bereits zuvor beschrieben, sind die Fibroblasten ebenfalls an dem Angiogeneseprozess beteiligt, indem sie verschiedene Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF sekretieren.<sup>298-300</sup> Zwar konnte in den vorangegangenen *Sproutingassays* kein starker Einfluss auf die Angiogenese der Endothelzellen beobachtet werden, dennoch sollte das Chipmodell durch das Einbringen von NHDF erweitert werden. In Abbildung 62 ist das angestrebte Co-Kulturmodell schematisch dargestellt.



**Abbildung 62: Schematische Darstellung der Erweiterung des Chipmodells.** Neben den Endothelzellen (rot) im Kanal des Hydrogelchips werden in das umgebende Kompartiment Hautfibroblasten (grün) eingebracht welche ein Bindegewebe simulieren sollen.

Für die Co-Kultur im Hydrogelchip wurden die NHDF ( $10 \cdot 10^5$  Zellen/ml) vor der Chipfabrikation mit dem Hydrogel gemischt. So konnten die Fibroblasten während des Herstellungsprozesses in den Chips eingebettet werden. Die Kanalstrukturen wurden anschließend von beiden Seiten mit jeweils  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP in je  $100 \mu\text{l}$  EGM-GFP besiedelt. Zur Auswertung der Chips wurde das Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 verwendet und Hellfeld- sowie Fluoreszenzaufnahmen der Kanäle gemacht. Die Kultivierung der Chips erfolgte über eine Woche. In Abbildung 63 ist der Ausschnitt eines Kanals in einem Co-Kultur Chip zu sehen.



**Abbildung 63: Co-Kultur von HUVEC-GFP und NHDF im Chipsystem.** In einen GelMA *Medium-Low* Hydrogelchip wurden  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml im Gewebekompartiment eingebettet. Der einfache Kanal wurde oben und unten mit je  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt und mit  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF behandelt. Nach sieben Tagen wurde das Sproutingverhalten der Endothelzellen mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 untersucht. **A1** zeigt eine Hellfeldaufnahme des Kanals, **A2** die Fluoreszenz der HUVEC-GFP und **A3** die Überlagerung der Bilder ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500-550 \text{ nm}$ , 4xDry, Zoom: 1,0). Maßstab:  $400 \mu\text{m}$ .

Die Aufnahmen zeigen, dass nach sieben Tagen noch kein Sprouting der Endothelzellen stattgefunden hatte. Der Kanal war vollständig mit HUVEC-GFP ausgekleidet, dennoch sind diese nicht in das Hydrogelkompartiment eingewachsen. In den Vorversuchen konnte bereits festgestellt werden, dass das Sprouting in den Co-Kulturen nur eingeschränkt induziert werden kann, was anhand dieses Experiments bestätigt werden konnte. Wie schon zuvor angenommen, konnte das fehlende Sproutingverhalten an einer zu geringen Produktion der Wachstumsfaktoren durch die NHDF gelegen haben. Da im Chipsystem weniger Fibroblasten im Verhältnis zu den Endothelzellen eingebettet werden, kann das erklären, warum im Chip keine Sprouts gebildet wurden, während die Ausbildung in den Vorversuchen nur eingeschränkt war. Friis et al. beispielsweise verwendeten in ihrer Co-Kultur 1 % HUVEC auf einer konfluenten NHDF-Schicht mit  $10^5$  Zellen. Zudem fanden sie heraus, dass ein physischer Kontakt der NHDF zu den HUVEC nötig war, um die Angiogenese der Endothelzellen zu induzieren.<sup>318</sup> Dieser war aufgrund der räumlichen Trennung der Endothelzellen

im Kanal und den NHDF im Kompartiment nur bedingt gegeben. Um diesen physischen Kontakt herzustellen, können die Kanalwände beispielsweise zunächst mit einer Schicht NHDF und anschließend mit HUVEC-GFP besiedelt werden. Alternativ kann auch die Zellzahl im Kompartiment erhöht werden, um einen Überschuss an NHDF zu erhalten.

### **3.4.3 Kapitelzusammenfassung: Angiogenese im Chipsystem**

Zusammenfassend konnte mit Erfolg das Sprouting der Endothelzellen im Kanal durch die Zugabe von VEGF induziert werden. Dabei stellte sich GelMA *Medium-Low* als das vielversprechendste Chipmaterial heraus, da in diesem Gel die längsten und meisten Ausläufer gebildet wurden. Über den Zeitraum von einer Woche konnten so 400  $\mu\text{m}$  auf beiden Seiten des Kanals vaskularisiert werden. Auch in den verzweigten Kanalstrukturen konnte ein Sprouting der HUVEC zwischen den Kanälen beobachtet werden, sodass einzelne Sprouts aus gegenüberliegenden Kanälen begannen, ein Netzwerk zu bilden. Die Erweiterung des Modells durch Fibroblasten konnte keine erhöhte Angiogeneseaktivität der Endothelzellen hervorrufen, da die NHDF Zellzahl im Verhältnis zu den HUVEC zu gering war.<sup>318</sup>

### 3.5 Tumormodell

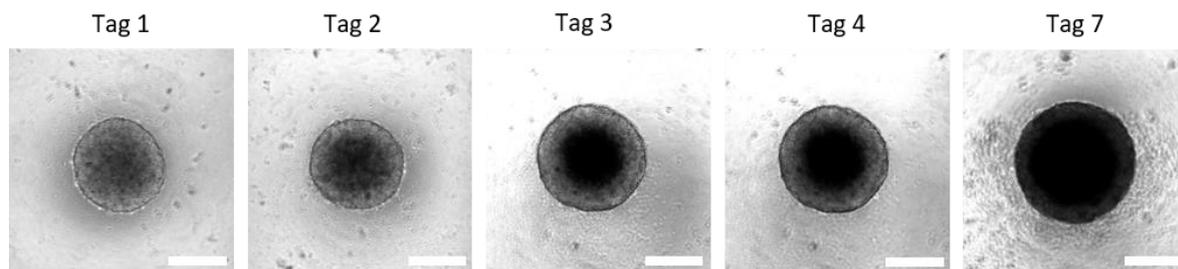
Der Prozess der Angiogenese spielt neben der Vaskulogenese vor allem bei der Formation der Blutgefäße in Embryonen eine große Rolle.<sup>281,321</sup> In adulten Organismen hingegen ist die Angiogenese bei der Wundheilung, der Reproduktion oder auch während der Schwangerschaft an der Gefäßbildung beteiligt.<sup>321-323</sup> Vor allem tritt sie bei der Pathogenese unterschiedlichster Krankheiten auf. Dazu zählen beispielweise die Retinopathie, Rheumatoide Arthritis oder Krebserkrankungen.<sup>283,324,325</sup> Das erste Mal wurde die Angiogenese in Zusammenhang mit Krebserkrankungen 1971 von Judah Folkman erwähnt.<sup>26</sup> Er postulierte, dass Tumorzellen in der Lage sind, Endothelzellen zur Ausformung neuer Blutgefäße zu stimulieren.<sup>326</sup> Tatsächlich ist es so, dass die Angiogenese bedeutenden Anteil am Tumorwachstum sowie an der Metastasierung hat.<sup>327</sup> Ab einer Größe von 2 mm benötigen Tumore einen direkten Anschluss an das Blutgefäßsystem, da die Diffusion alleine nicht mehr ausreichend ist, um sie mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen.<sup>326,328</sup> Um Endothelzellen in ihre Nähe zu dirigieren, sind sie in der Lage, den Wachstumsfaktor VEGF zu produzieren und sekretieren, welcher daraufhin die Angiogenese einleitet.<sup>232,329,330</sup> Durch den Anschluss der Tumore an den Blutkreislauf ergibt sich zudem die Möglichkeit der Metastasierung. Teile der Tumore können über die Blutbahnen durch den Körper wandern und sich an einer neuen Stelle ansiedeln.<sup>331,332</sup> Die Metastasierung der Tumore zählt zu den lebensgefährlichsten Prozessen, denen Krebspatienten ausgesetzt sein können, da ab diesem Punkt die Behandlung deutlich erschwert wird.<sup>327,333</sup> Aus diesem Grund werden immer häufiger Angiogenese-Inhibitoren als Krebstherapeutika eingesetzt, auch da sie häufig weniger Nebenwirkungen haben als herkömmliche Chemotherapeutika.<sup>239,334</sup> Um diese neuen Angiogenese-Inhibitoren zu testen, werden *in-vitro* Modellsysteme benötigt, die es erlauben, Krankheitsmodelle nachzubilden. Diese können zum Beispiel auch organ- oder patientenspezifisch hergestellt werden, um die genauen Auswirkungen dieser neuen Wirkstoffklasse zu untersuchen.<sup>335</sup> Um eine Anwendung für den in dieser Arbeit etablierten Hydrogelchip zu demonstrieren, sollte ein solches Krankheitsmodell innerhalb des Systems implementiert werden, welches zum Wirkstoffscreening verwendet werden kann. Dazu sollten Sphäroide aus Leberkrebszellen als artifizielle Tumore eingesetzt werden und die Endothelzellen zur pathologischen Angiogenese anregen.

#### 3.5.1 Tumorsphäroide

Tumoroide zählen zu den gerüstlosen 3D-Zellkulturen und gelten als eines der genauesten *in-vitro* Tumormodelle. Sie sind in der Lage, wichtige *in-vivo* Eigenschaften von Tumoren abzubilden, wie zelluläre Heterogenität, Zell-Zell-Interaktionen, die interne Struktur, Genexpression und Wirkstoffresistenzen. Zudem können sie meist sehr kostengünstig und in größerer Stückzahl hergestellt werden.<sup>19,20,27</sup> Für das Krankheitsmodell im Hydrogelchip wurden HepG2, humane Krebszellen aus einem Leberzellkarzinom, zur Herstellung der artifiziellen Tumore gewählt. Nachweislich sind sie in der Lage, in der 3D-Kultur VEGF zu produzieren.<sup>336-339</sup> Bevor sie jedoch in das Chipmodell eingebunden werden konnten, wurden sie zunächst hinsichtlich ihres Wachstums- und Proliferationsverhaltens sowie ihrer Fähigkeit zur Angiogenese-Induktion der HUVEC-GFP-Zellen untersucht.

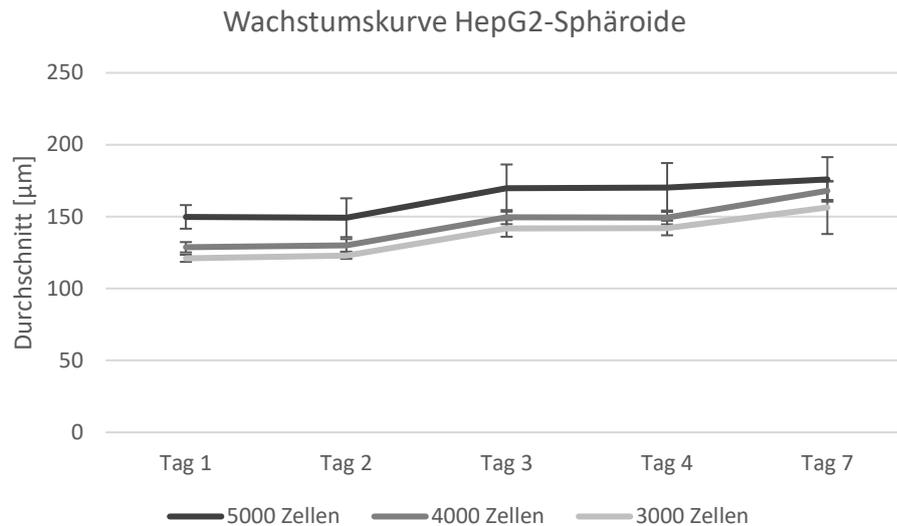
### 3.5.1.1 Wachstumskurve

Die Generierung der HepG2-Sphäroide erfolgte mittels non-adhärenter Agaroseplatten. Die Verwendung dieser Platten zur Sphäroidherstellung wurde bereits eingehend in Kapitel 3.3.1.1 beschrieben. Zunächst wurden 40 µl einer 1,5%igen Agaroselösung pro *Well* in eine 96-*Well* Platte gegeben. Nach der Aushärtung der Agarose konnten die unterschiedlich konzentrierten Zellsuspensionen in die *Wells* pipettiert werden. Dabei wurden die Zellkonzentrationen so gewählt, dass pro *Well* 5000 Zellen, 4000 Zellen oder 3000 Zellen der HepG2 ausgesät wurden. Die Sphäroide wurden dann für eine Woche bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit in DMEM kultiviert.<sup>340</sup> Die Formation und das Wachstum wurden in dieser Woche mit dem Mikroskop Leica DMI LED verfolgt und in Bildern festgehalten (Abbildung 64).



**Abbildung 64: Wachstum der HepG2-Sphäroide auf Agaroseplatten.** HepG2-Zellen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (5000 Zellen, 4000 Zellen und 3000 Zellen/*Well*) auf einer Agaroseplatte ausgesät und die Bildung und das Wachstum der Sphäroide wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen dokumentiert. Die Hellfeldaufnahmen wurden mit einem inversen Leica DMI LED Mikroskop gemacht (10x Dry, Zoom 1,0). Maßstab: 100 µm.

Auf den Bildern ist neben der Zunahme des Sphäroidumfangs das Wachstum des nekrotischen Kerns zu erkennen. Dieser bildet sich in der Mitte der Sphäroide mit zunehmendem Durchmesser, da es zu einer Hypoxie aufgrund der Sauerstoffunterversorgung der inneren Zellen kommt. Während der hypoxische Kern an Tag 1 noch nicht ausgebildet ist, beginnt die Nekrose an Tag 2 und weitet sich bis Tag 7 auf nahezu das gesamte Sphäroid aus. Da die Nekrose mit der Bildung von VEGF zusammenhängt, sollten die Sphäroide erst in die Hydrogele eingesetzt werden, wenn sie bereits an einer Unterversorgung leiden. Daher wurden die Sphäroide in allen Versuchen nach 72 h Wachstum in die Modelle überführt. Zuvor wurde dennoch das Wachstum anhand einer Wachstumskurve dokumentiert, welche in Abbildung 64 zu sehen ist.

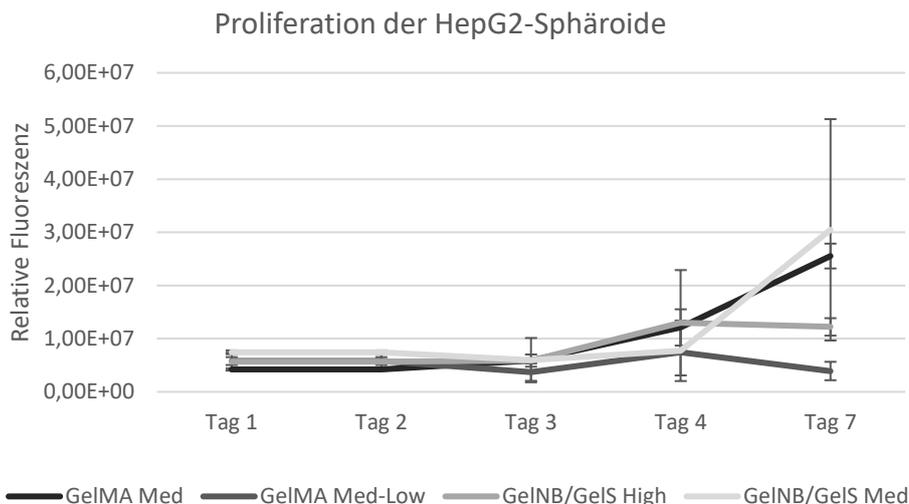


**Abbildung 65: 2D Wachstumskurve der HepG2-Sphäroide.** Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde täglich der Durchmesser der HepG2-Sphäroide gemessen und in Form einer Wachstumskurve aufgetragen. Untersucht wurden Sphäroide aus 5000 Zellen, 4000 Zellen und 3000 Zellen auf Agaroseplatten. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

Für die HepG2-Sphäroide aller drei Größen konnte ein geringes, aber konstantes Wachstum nachgewiesen werden. Innerhalb der sieben Tage haben die 5000er Sphäroide ihren Durchmesser um etwa 26  $\mu\text{m}$ , die 4000er um 39  $\mu\text{m}$  und die 3000er um 35  $\mu\text{m}$  erhöht. Insgesamt ergab sich ein durchschnittlicher Zuwachs von etwa 6,5  $\mu\text{m}$  pro Tag. Verglichen werden konnten die Ergebnisse mit den Werten von Vanessa Kappings (Institut für Toxikologie und Genetik, KIT). Sie konnte in ihrer Arbeit ebenfalls ein konstantes Wachstum der HepG2-Sphäroide auf der Agaroseplatte beobachten, allerdings mit einem Zuwachs von etwa 21,8  $\mu\text{m}$  am Tag. Allgemein wiesen die Sphäroide von Tag 3 an einen deutlich größeren Durchmesser auf. Die 5000er Sphäroide hatten zu diesem Zeitpunkt beispielsweise einen Durchmesser von 450  $\mu\text{m}$ .<sup>340</sup> Andere Literaturwerte von beispielsweise 230,41  $\mu\text{m}$  Durchmesser bei einer Zellzahl von 6000 Zellen/Sphäroid stimmen deutlich besser mit den gewonnenen Werten überein.<sup>341</sup> Zudem können durch Unterschiede der Kompaktierung der Zellen bei der Aggregation Schwankungen der Durchmesser auftreten. Da das Wachstum der 4000er Sphäroide als am stärksten ermittelt wurde, wurde diese Größe, wenn nicht anders beschrieben in den weiteren Experimenten verwendet.

### 3.5.1.2 Proliferation

An Tag 3 der Sphäroidgenerierung auf der Agaroseplatte konnten die Sphäroide zur 3D-Kultivierung in die Hydrogele eingebettet werden. Zur Untersuchung des Einflusses der dreidimensionalen Kultivierung sollte das Proliferationsverhalten der HepG2-Sphäroide bestimmt werden. Dieses ist von besonderem Interesse, da die HepG2 nur bei einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung das benötigte VEGF produzieren und eine zeitlich zunehmende Proliferationsrate würde demnach gegen eine Hypoxie in den Zellen sprechen. Der Proliferationsassay wurde wie in Kapitel 5.2.6.6 mit dem Reagenz *PrestoBlue* durchgeführt. Dieses blaue Reagenz wird durch das in proliferierenden Zellen gebildete NADH zu einem rosa Farbstoff reduziert, dessen Bildung somit direkt proportional zur Anzahl metabolisierender Zellen ist. Für den *PrestoBlue Assay* wurden die HepG2-Sphäroide in Triplikaten in je 100  $\mu\text{l}$  der vier Hydrogelvarianten eingebettet. An den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 wurden die Zellen mit einer Lösung aus *PrestoBlue* in DMEM (1:9) für 3 h behandelt.



**Abbildung 66: Proliferation der eingebetteten HepG2-Sphäroide.** 4000er HepG2-Sphäroide wurden in je 100  $\mu$ l GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* eingebettet und die Proliferation der Zellen über eine Woche bestimmt. Dazu wurden täglich drei Sphäroide von jeder Bedingung mit einer Lösung aus *PrestoBlue* in Zellmedium (Verhältnis 1:9) behandelt. Nach dreistündiger Inkubation wurden die Floreszenzen mit einem SpectraMax iD3 Mikroplattenleser bestimmt ( $\lambda_{ex}=560$  nm,  $\lambda_{em}=600$  nm). Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

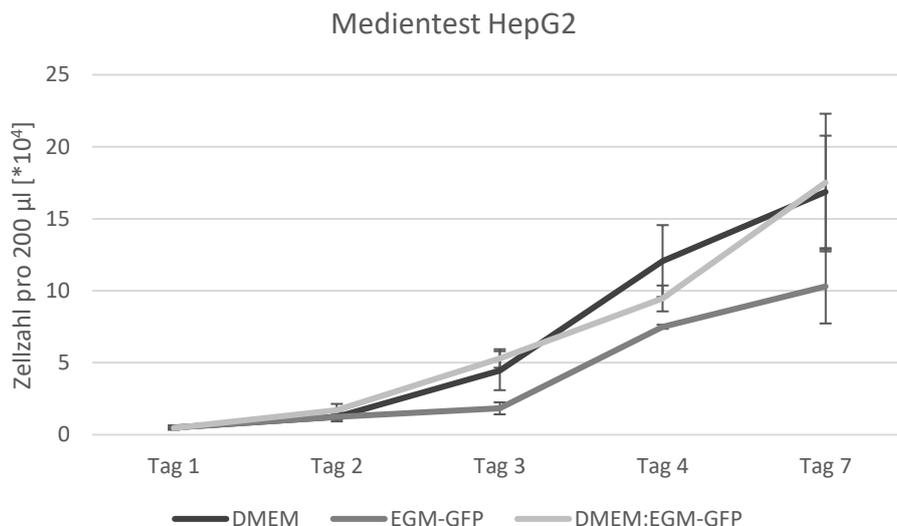
Die Abbildung 66 zeigt das Ergebnis der spektrometrischen Bestimmung der Fluoreszenz mit dem SpectraMax iD3 Mikroplattenleser bei 560 nm in Abhängigkeit der Zeit. Bis Tag 3 konnte eine stagnierende Proliferation der HepG2-Sphäroide in den Hydrogelen beobachtet werden. Anschließend stieg die Proliferation leicht in allen Hydrogelen, bevor sie in GelMA *Medium-Low* an Tag 7 unter den Anfangswert fiel. In GelNB/GelS *High* stagnierte die Fluoreszenz ab Tag 4, während sie in GelMA *Medium* und GelNB/GelS *Medium* deutlich anstieg. Anhand des Proliferationsassays erscheint GelMA *Medium-Low* erneut am vielversprechendsten, da aufgrund der geringen Änderung der relativen Fluoreszenz die Zellproliferation am geringsten war.

### 3.5.2 Induktion der Angiogenese durch Tumorsphäroide

In der Literatur finden sich verschiedene erfolgreiche Ansätze, Endothelzellen durch die Co-Kultur mit HepG2 zur Angiogenese anzuregen. Dazu zählen die Kultivierung der HUVEC auf HepG2-Zelllayern, die Behandlung der Endothelzellen mit dem Medienüberstand der Krebszellen oder auch multizelluläre Sphäroide.<sup>342–345</sup> In dieser Arbeit sollten die Endothelzellen mit HepG2-Sphäroiden co-kultiviert werden, um sie später als artifizielle Tumore in die Hydrogelchips integrieren zu können.

#### 3.5.2.1 *Sproutingassay*

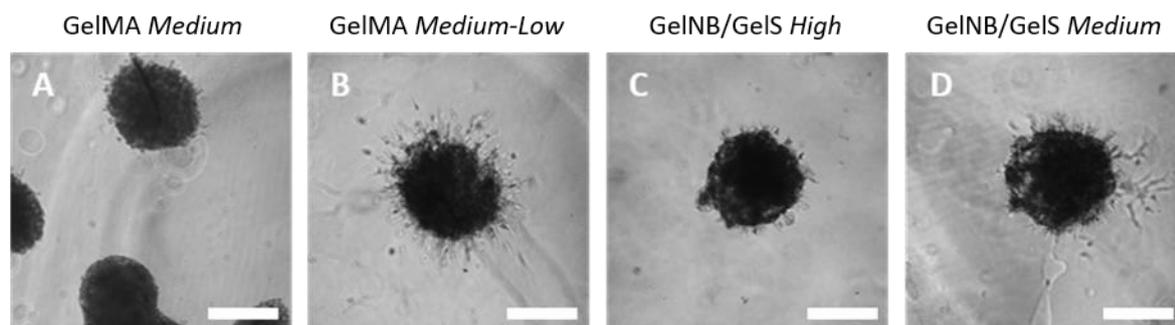
Zunächst wurde jedoch die Fähigkeit der HepG2-Sphäroide, die Angiogenese der HUVEC-GFP in einer Co-Kultur zu induzieren, getestet. Dazu wurde für die Etablierung der Co-Kultur als erstes eine Wachstumskurve der HepG2 in verschiedenen Medien aufgenommen. Als Kultivierungsmedium für HepG2-Zellen wird DMEM empfohlen, aber für die HUVEC-GFP wurde in Kapitel 3.3.1.6 bereits das beste Wachstum in EGM-GFP bestimmt. Daher sollte untersucht werden ob die HepG2 ebenfalls in diesem Nährmedium wachsen.



**Abbildung 67: Bestimmung des Kultivierungsmediums für die Co-Kultur von HepG2 und HUVEC-GFP anhand einer Wachstumskurve.**  $1 \cdot 10^4$  HepG2 wurden pro Well einer 96-Well Platte ausgesät und über den Zeitraum von einer Woche in unterschiedlichen Zellmedien kultiviert. Getestet wurden die Medien DMEM, EGM-GFP und eine Mischung der beiden Medien im Verhältnis 1:1. An den Tagen 1,2,3,4 und 7 wurden die Zellzahlen in Triplikaten bestimmt und das Ergebnis in Form einer Wachstumskurve aufgetragen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=3$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

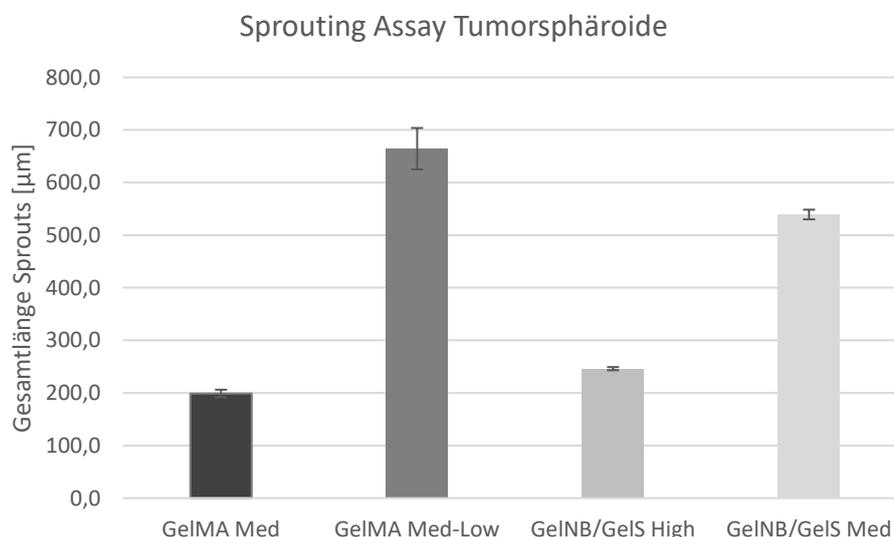
Für die Wachstumskurve wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2-Zellen pro Well einer 96-Well Platte ausgesät. In Triplikaten wurden die HepG2 in DMEM, EGM-GFP sowie einer 1:1 Mischung aus DMEM und EGM-GFP über den Verlauf von einer Woche kultiviert. Von diesen Platten wurden insgesamt fünf Stück angesetzt, je eine für Tag 1, 2, 3, 4 und 7. An diesen Tagen wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l Trypsin von den Platten gelöst und die Zellzahlen mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In Abbildung 67 sind die ermittelten Zellzahlen graphisch aufgetragen und zeigen ein kontinuierliches Wachstum der HepG2 in allen getesteten Medien. Vor allem in DMEM und der Medien-Mischung war ein starkes, fast identisches Zellwachstum zu beobachten. Nach sieben Tagen hatten sich die Zellzahlen von  $0,5 \cdot 10^4$  Zellen auf  $17 \cdot 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l erhöht. Im Vergleich dazu war das Wachstum in EGM-GFP geringer, wodurch an Tag 7 nur  $10 \cdot 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l gezählt wurden. Für die geplanten Versuche wurde dennoch entschieden, für die Co-Kultur EGM-GFP zu verwenden, da der Fokus der Untersuchungen auf den HUVEC-GFP und deren angiogenen Fähigkeiten lag. Daher sollte ein optimales Wachstum der HUVEC-GFP gewährleistet werden.

Im nächsten Schritt sollte anhand eines Sproutingassays die Induktion der Angiogenese in einer HUVEC-GFP-Sphäroid- und HepG2-Sphäroid Co-Kultur gezeigt und evaluiert werden. 4000er *Hanging Drop* HUVEC-GFP-Sphäroide wurden zusammen mit 4000er HepG2-Sphäroiden in 100  $\mu$ l der Hydrogelvarianten GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* eingebettet. Die Sphäroidkulturen wurden mit keinerlei Wachstumsfaktoren behandelt und nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurden sie mit dem Leica DMI LED Mikroskop ausgewertet. Ein Beispiel pro Hydrogelvariante ist in Abbildung 68 zu sehen.



**Abbildung 68: Sproutingassay der HUVEC-GFP-Sphäroide eingebettet in GelMA Medium, GelMA Medium-Low, GelNB/GelS High und GelNB/GelS Medium in Co-Kultur mit HepG2-Sphäroiden.** Sphäroide der Größe 4000 Zellen/Sphäroid wurden zusammen mit HepG2-Sphäroiden (24 Sphäroide/ml, Größe: 4000 Zellen/Sphäroid) in je 100  $\mu$ l Hydrogel eingebettet und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde die Länge der HUVEC-GFP-Ausläufer mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet und die Gesamtlänge der Sprouts pro Sphäroid bestimmt. Für die Aufnahmen wurde ein inverses Leica DMI LED Mikroskop verwendet (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 100  $\mu$ m.

Die mikroskopische Auswertung der Co-Kultur von HUVEC- und HepG2-Sphäroiden ergab, dass in allen Hydrogelvarianten ein Sprouting stattgefunden hat. In GelMA Medium und GelNB/GelS High allerdings waren die Ausläufer um einiges kürzer als in den Gelen GelMA Medium-Low und GelNB/GelS Medium. Um diese Aussage zu validieren, wurde die kumulative Länge der Sphäroide in den jeweiligen Hydrogelen bestimmt, indem die einzelnen Sprouts mit Hilfe von ImageJ vermessen und die Längen summiert wurden. Dabei wurden nur die Sprouts berücksichtigt, die in der Fokusebene der Mikroskopieaufnahmen lagen. Die daraus resultierenden Gesamtlängen sind in dem nachfolgenden Graphen aufgetragen (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Sproutingassay der Co-Kultur von HUVEC-GFP- und HepG2-Sphäroiden.** 4000er HUVEC-GFP- und 4000er HepG2-Sphäroide wurden in je 100  $\mu$ l Hydrogel eingebettet. Nach 24 h wurde die Gesamtlänge der HUVEC-GFP-Ausläufer bestimmt. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit n=3 und der Standardabweichung mit n-1.

Anhand der kumulativen Längen konnte beurteilt werden, dass das Sprouting der Endothelzellen durch die Tumoroide ausgelöst werden konnte. Die höchsten Werte wurden für GelMA Medium-Low und GelNB/GelS Medium berechnet. Die Gesamtlängen in GelMA Medium und GelNB/GelS High hingegen entsprachen einem Drittel der Ausläufer in GelMA Medium-Low. Im Vergleich mit

dem VEGF-*Sproutingassay* aus Kapitel 3.3.1.5 ergaben sich für die Tumor-Co-Kultur ähnliche Werte. Zwar hatte in diesem *Assay* GelNB/GelS *Medium* die höchste kumulative Länge, jedoch befindet sich das maximal induzierte Sprouting durch VEGF ebenfalls bei knapp 700  $\mu\text{m}$ .

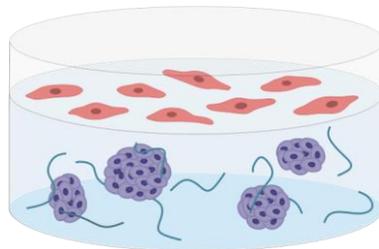
Tabelle 10: Anzahl der Sprouts in den unterschiedlichen Hydrogelen nach 24 h Co-Kultivierung mit HepG2-Sphäroiden.

Hydrogel	Anzahl Sprouts
GelMA <i>Medium</i>	12,7
GelMA <i>Medium-Low</i>	21,3
GelNB/GelS <i>High</i>	15
GelNB/GelS <i>Medium</i>	18

Die Tabelle 10 zeigt die Sproutanzahl in den verschiedenen Hydrogelen. Anhand der großen Unterschiede zwischen den Gesamtlängen und unter Berücksichtigung der Sproutanzahl kann festgestellt werden, dass die einzelnen Sprouts in GelMA *Medium-Low* und GelNB/GelS *Medium* deutlich länger waren als in GelMA *Medium* und GelNB/GelS *High*.

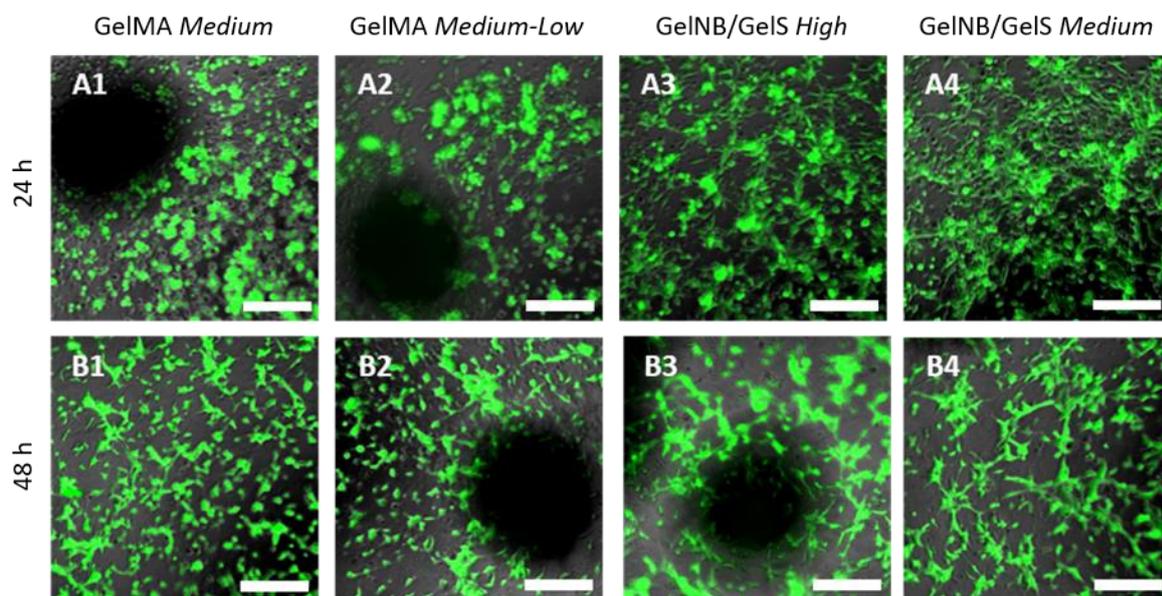
### 3.5.2.2 Sprouting in der 2,5D-Zellkultur

Im nächsten Schritt sollte die Co-Kultur in ein 2,5D-Modell übertragen werden. Dieses ähnelt aufgrund der Planarität der HUVEC-GFP eher dem späteren Chipmodell als die Co-Kultur der Sphäroide, die Endothelzellen in den Kanalstrukturen der Chips als Monolayer ausgesät werden. Zunächst sollten ausschließlich HepG2-Sphäroide in das Hydrogel eingebettet und die Geloberfläche mit HUVEC-GFP besiedelt werden. Eine schematische Darstellung des Modells zeigt die Abbildung 70.



**Abbildung 70: Schematische Darstellung eines 2,5D-Modells der pathologischen Angiogenese.** Im Hydrogel eingebettet sind HepG2-Sphäroide (lila) als artifizielle Tumore, welche die planar auf dem Hydrogel ausgesäten Endothelzellen (rot) zur Angiogenese anregen sollen.

Für die Herstellung der 2,5D-Modelle wurden 24 HepG2-Sphäroide/ml zusammen mit LAP unter die Hydrogellösungen gemischt und mit dem Omnicure S2000 (30 s, 320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) in 8-Well ibidi *Slides* ausgehärtet. Anschließend wurden  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP in EGM-GFP auf den Gelen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Mit dem inversen Leica DMI LED Mikroskop konnte das Wachstum und das Sprouting der Zellen verfolgt werden. In Abbildung 71 sind die Co-Kulturen jeweils nach 24 und 48 h abgebildet, um die Entwicklung der Angiogenese zu verdeutlichen.



**Abbildung 71: Tumorsphäroidinduziertes Sprouting von HUVEC-GFP.** Je drei HepG2-Sphäroide wurden in je 100 µl Hydrogel eingebettet und mit  $5 \cdot 10^4$  HUVEC-GFP überschichtet. Nach 24 und 48 h Inkubation wurde das Sproutingverhalten der HUVEC-GFP (grün) mit einem inversen Leica DMI LED Mikroskop festgehalten (10x Dry, Zoom 1,0). Dargestellt sind Überlagerungen der Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen ( $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm). Maßstab: 100 µm.

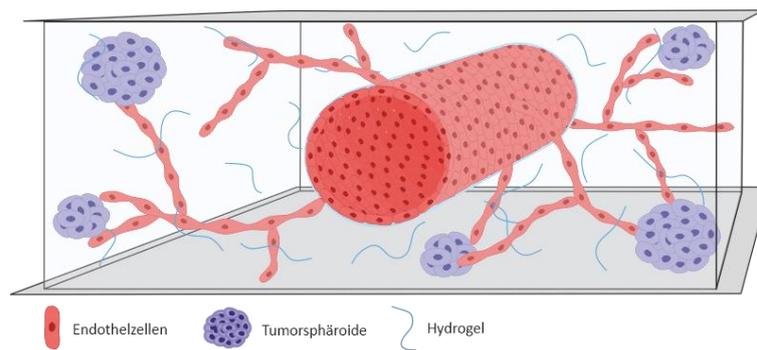
Nach 24 h Inkubation konnte zunächst nur auf den GelNB/GelS Gelen eine Ausrichtung und das beginnende Sprouting der Endothelzellen beobachtet werden. Auf den GelMA Gelen war zwar eine Adhäsion der Zellen zu sehen, aber keine morphologische Veränderung. Nach 48 h jedoch konnte auch auf diesen Gelen der Beginn der Angiogenese festgestellt werden. Die Gele wurden noch bis Tag 7 weiterkultiviert, aber ab diesem Zeitpunkt begannen die Endothelzellen sich von den Gelen abzulösen. Eine Migration der Zellen in das Gel hinein hatte bis zu diesem Zeitpunkt nicht stattgefunden. Eine mögliche Erklärung kann der 3D-Proliferationsassay liefern. Dieser zeigte für die HepG2-Sphäroide bis Tag 3 fast keine Proliferation, welche ab Tag 4 jedoch deutlich zunahm. Dieses gesteigerte Proliferationsverhalten kann darauf hindeuten, dass die HepG2-Sphäroide mit genügend Nährstoffen versorgt wurden und daher auch kein VEGF produzierten. Mit Hilfe eines ELISA Assays oder *Western Blots* kann die Menge an VEGF quantifiziert werden, die über den Verlauf der Woche durch die Tumorsphäroide produziert wird. So kann auch abgeschätzt werden, ob das geringe Sprouting mit der VEGF-Konzentration im Gel zusammenhängt.<sup>346</sup> Des Weiteren kann auch die Zellzahl erhöht werden, welche auf den Gelen ausgesät wird, um einen konfluenten Zelllayer zu erzeugen. Dieser kann ebenfalls unterstützend auf die Angiogenese wirken.<sup>254</sup>

### 3.5.3 3D-Tumormodell im Hydrogelchip

Um den bereits erfolgreich etablierten Hydrogelchip für die Wirkstoffentwicklung einsetzen zu können, sollte das in den letzten Kapiteln entwickelte Tumormodell auf den Chip übertragen werden.

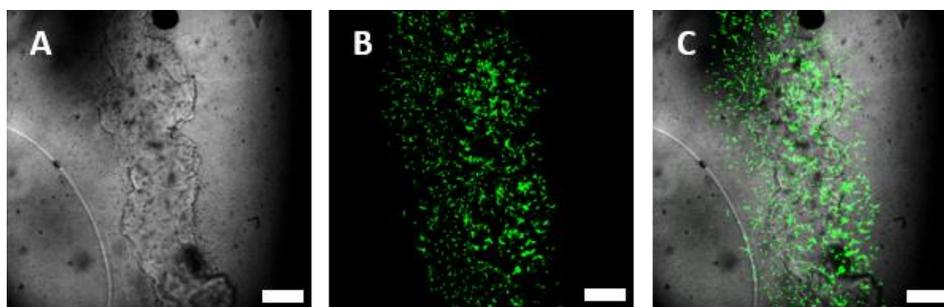
#### 3.5.3.1 Tumorinduziertes Sprouting im Hydrogelchip

Dazu sollten zunächst die Tumorsphäroide in das Hydrogelkompartiment eingebettet werden um von dort aus die Angiogenese der HUVEC-GFP aus dem Kanal heraus zu steuern. Dies ist schematisch in Abbildung 72 dargestellt.



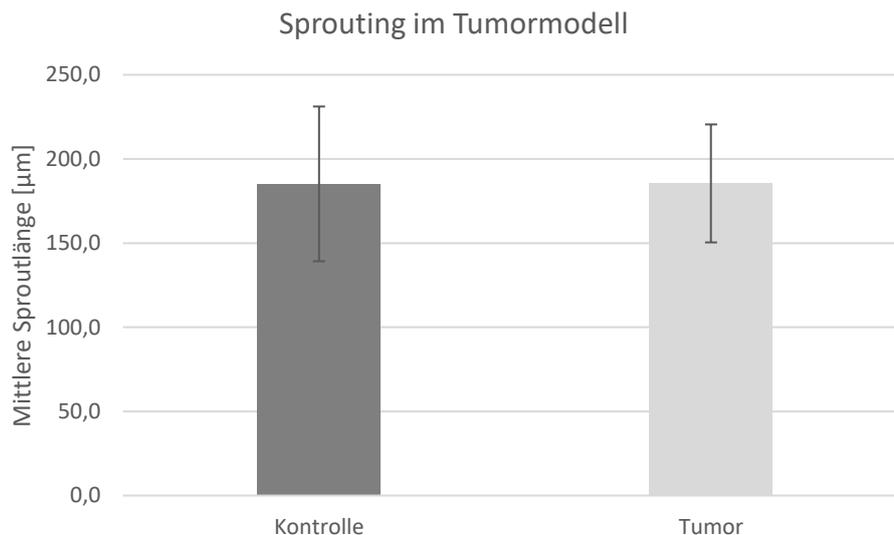
**Abbildung 72: Schematische Darstellung des Modells der pathologischen Angiogenese im Hydrogelchip.** Im Hydrogelkompartiment sind Tumorsphäroide (lila) eingebettet, welche die Angiogenese der Endothelzellen (rot) im Kanal induzieren.

Die Herstellung der extrusionsbasierten Chips erfolgte, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, nach dem Gussverfahren. Dabei wurden 24 HepG2-Sphäroide/ml unter das Hydrogel gemischt, bevor es in den PDMS-Rahmen gegossen wurde. Als Chipbasis wurde erneut GelMA *Medium-Low* verwendet, da es in dem zuvor beschriebenen *Sproutingassay* und der 2,5D-Zellkultur gute Ergebnisse lieferte. Danach wurde die Opferstruktur für den Kanal auf den Bodenlayer gedruckt und mit einer weiteren Schicht Hydrogel-Sphäroidsuspension bedeckt. Nachdem die Gelatine bei 37 °C im Inkubator verflüssigt und anschließend aus dem Kanal gespült wurde, konnten die Kanalstrukturen sowohl unten als auch oben mit je  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP/ml besiedelt werden. Aus der mikroskopischen Auswertung mit dem Leica Stellaris 5 nach 24 h ergab sich die Abbildung 73.



**Abbildung 73: Tumorinduzierte Angiogenese der HUVEC-GFP im Kanal.** In einem GelMA *Medium-Low* Hydrogelchip wurden 24 HepG2-Sphäroide/ml eingebettet und die Kanalstruktur mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Nach 24 h erfolgte die Auswertung des Chips mit dem Leica Stellaris 5 ( $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4xDry, Zoom: 1,0). **A** zeigt eine Hellfeldaufnahme der Kanalstruktur sowie der Tumorsphäroide, **B** die Fluoreszenz der HUVEC-GFP und **C** eine Überlagerung der beiden Bilder. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$ .

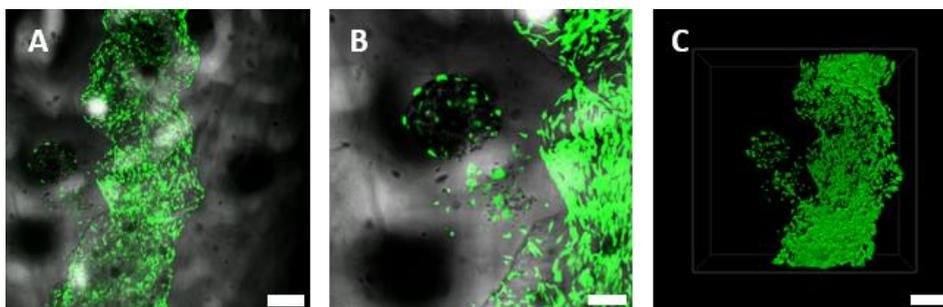
Nach 24 h Inkubation der Endothelzellen im Tumormodell konnte bereits ein Sprouting in das Hydrogelkompartiment dokumentiert werden. Im dargestellten Ausschnitt konnte ein gleichmäßiges Sprouten entlang beider Seiten des Kanals beobachtet werden. Im Vergleich zu den mit VEGF behandelten Chips aus Kapitel 3.4.1 war das Endothel im Tumormodell weniger dicht, aber die gebildeten Sprouts besaßen vergleichbare Längen. Für einen genaueren Vergleich wurde im Tumormodell ebenfalls die mittlere Sproutlänge anhand der zehn längsten Ausläufer bestimmt und in Abbildung 74 graphisch dargestellt.



**Abbildung 74: Vergleich der mittleren Länge der Sprouts in der Kontrolle und im Tumormodell.** Die mittlere Länge der zehn längsten Sprouts wurde nach 24 h Inkubation im Tumormodell mit ImageJ gemessen und gemittelt. Zum Vergleich wurde zudem die gemittelte Länge der Sprouts im Kontrollchip aufgetragen. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=10$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

In Kapitel 3.4.1 konnte für die Sprouts in GelMA *Medium-Low* nach 24 h eine mittlere Sproutlänge von  $178,2 \mu\text{m}$  ermittelt werden, welche hier nochmals als Kontrolle aufgetragen ist. Aus der Berechnung für das Tumormodell ergab sich für die Sprouts ein vergleichbarer Wert von  $185,5 \mu\text{m}$ . In Kombination mit dem *Sproutingassay*, bei dem bereits eine Korrelation zwischen den VEGF behandelten Sphäroiden und denen in Co-Kultur mit HepG2 erkannt wurde, konnte nach der Übertragung auf das Chipsystem festgehalten werden, dass die Tumorsphäroide denselben Effekt auf die Angiogenese ausübten, wie  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF.

Während in den Chips überwiegend eine gleichmäßig über den Kanal verteilte Angiogenese beobachtet wurde, zeigte ein Chip ein zielgerichtetes Sproutingverhalten. In Abbildung 75 ist zu sehen, wie die Endothelzellen aus dem Kanal heraus auf einen HepG2-Tumorsphäroid zuwachsen und diesen mit Sprouts durchziehen.



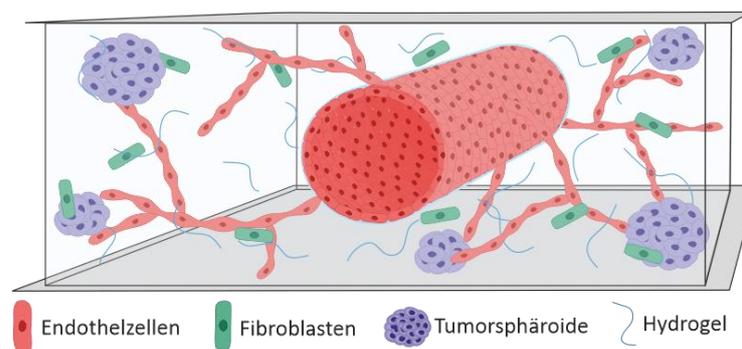
**Abbildung 75: Tumorsphäroid durchwachsen von HUVEC-GFP.** In einem GelMA *Medium-Low* Hydrogelchip wurden  $24 \text{ HepG2-Sphäroide/ml}$  eingebettet und die Kanalstruktur mit  $1 \cdot 10^6 \text{ HUVEC-GFP}$  besiedelt. Nach 24 h erfolgte die Auswertung des Chips mit dem Leica Stellaris 5 ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500-550 \text{ nm}$ , 4xDry, Zoom: 1,0 (A,C) 2,0 (B)). A und B sind die Überlagerungen der Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen, wobei für B ein größerer Zoom gewählt wurde. C zeigt eine 3D-Aufnahme des Kanals (Z-Stack Schrittgröße:  $20 \mu\text{m}$ ). Maßstab: (A und C)  $400 \mu\text{m}$ , (B)  $200 \mu\text{m}$ .

Dieses Sprouting entspricht durchaus dem Verhalten der Endothelzellen *in-vivo*, da die Tumore das Wachstum der Endothelzellen durch einen Gradienten aus proangiogenen Wachstumsfaktoren

zielgerichtet zu sich lenken können. Dabei bildet sich die Endothelzelle, die dem Gradienten am nächsten ist, zu einer sogenannten *Tip-Zelle* aus, welche gefolgt von den stark proliferierenden *Stalk-Zellen* die Richtung des neuen Sprouts bestimmt.<sup>347</sup> Allerdings waren die Sprouts in diesem Chip nicht stabil genug, wodurch sie ihre Form verloren und die Wuchsrichtung nur anhand einzelner Endothelzellen ausgemacht werden konnte. Kwak und Lee konnten mit ihrem vaskulären Tumormodell vergleichbare Ergebnisse gewinnen. Um das Sprouting zu fördern und stabilere Ausläufer auszubilden, vermischten sie die Tumorsphäroide schon vor dem Einbetten in den Chip mit Endothelzellen. Dadurch konnte die Vaskularisierung der Tumorsphäroide deutlich verbessert werden. Dieser Prozess benötigte jedoch sechs Tage, was einem deutlich längeren Zeitraum entspricht, als im Hydrogelchip benötigt wurde.<sup>348</sup> Zur Stabilisierung der Sprouts kann dennoch ein ähnlicher Ansatz untersucht werden. Trotz allem stellt sich die Frage, warum ein solches natürlicheres Sprouting nicht in allen *Tumor-on-a-chip* Systemen beobachtet werden konnte. Denkbar ist, dass es aufgrund der räumlichen Nähe des Sphäroids zum artifiziellem Blutgefäß zu solch einer Ausrichtung kam, da so gezielter Zellen mit den Wachstumsfaktoren angeregt werden konnten. Im restlichen Chip war eine andere Sphäroidverteilung gegeben, bei der die Wachstumsfaktoren zunächst gleichmäßig im Hydrogel verteilt wurden, wodurch Endothelzellen keinen entsprechend starken Gradienten verspürt haben.

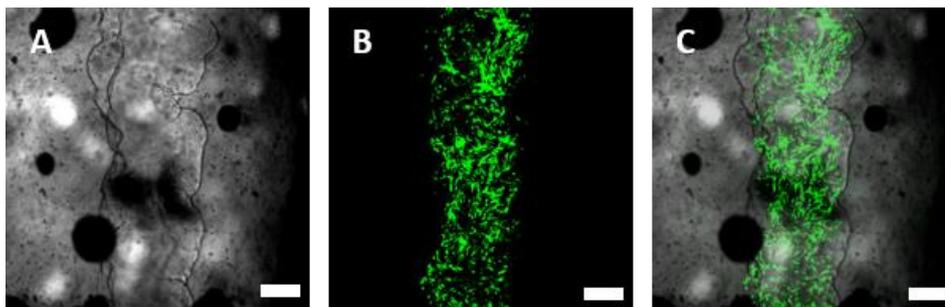
### 3.5.3.2 Co-Kultur mit NHDF

Abschließend sollten zur Vervollständigung des Modells neben den Tumorsphäroiden noch Fibroblasten in den Chip eingebracht werden, welche nicht nur das Bindegewebe in der Umgebung der Blutgefäße nachbilden, sondern auch zusammen mit dem Hydrogel den extrazellulären Raum um die artifiziellem Tumore herum darstellen. Fibroblasten in der Mikroumgebung von Tumoren sind dafür bekannt, durch die Sekretion von Faktoren wie FGF deren Wachstum zu fördern sowie die pathologische Angiogenese zu stimulieren.<sup>302,303</sup> Das Schema in Abbildung 76 zeigt den angestrebten Aufbau des Modells.



**Abbildung 76: Schematische Darstellung des Modells der pathologischen Angiogenese im Hydrogelchip mit NHDF.** Im Hydrogelkompartiment sind Tumorsphäroide (lila) und Hautfibroblasten (grün) eingebettet, welche die Angiogenese der Endothelzellen (rot) im Kanal induzieren.

Die Herstellung der Chips mit der Einbettung der Tumorsphäroide erfolgte wie zuvor beschrieben mit dem Unterschied, dass zusätzlich  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml unter das Gel gemischt wurden. Die Chips wurden nicht zusätzlich mit Wachstumsfaktoren behandelt und bei  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  sowie gesättigter Luftfeuchtigkeit für 24 h kultiviert. Die Auswertung in Abbildung 77 erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5.



**Abbildung 77: Chipmodell mit Tumorsphäroiden und NHDF.** In einem GelMA *Medium-Low* Hydrogelchip wurden 24 HepG2-Sphäroide/ml sowie  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml eingebettet und die Kanalstruktur mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Nach 24 h Inkubation erfolgte die Auswertung des Chips mit dem Leica Stellaris 5 ( $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, 4xDry, Zoom: 1,0). **A** zeigt eine Hellfeldaufnahme der Kanalstruktur sowie der Tumorsphäroide und NHDF, **B** die Fluoreszenz der HUVEC-GFP und **C** eine Überlagerung der beiden Bilder. Maßstab: 400  $\mu\text{m}$ .

Wie zuvor in den anderen Modellen beobachtet werden konnte, fand in den mit Fibroblasten erweiterten Chips keine Angiogenese statt. Im Kanal selbst war zwar die Adhäsion und Ausrichtung der Endothelzellen zu erkennen, jedoch sprouteten sie nicht in das umgebende Hydrogel. Im Kapitel zuvor wurde bereits erörtert, dass Untersuchungen zufolge die Fibroblasten einen physischen Kontakt zu den Endothelzellen benötigen, um ihren Einfluss auf die Angiogenese zu maximieren.<sup>320</sup> Da in den Tumormodellen ohne NHDF das Sprouting zuverlässig durch die Tumorsphäroide ausgelöst werden konnte, ist eher davon auszugehen, dass die Fibroblasten eine inhibierende Wirkung im System haben. In einigen Studien konnte festgestellt werden, dass Fibroblasten neben ihren Angiogenese-induzierenden Eigenschaften auch Krebs-regulierende Mechanismen besitzen. Beispielsweise können sie Tumor-suppressive EZM produzieren.<sup>349–351</sup>

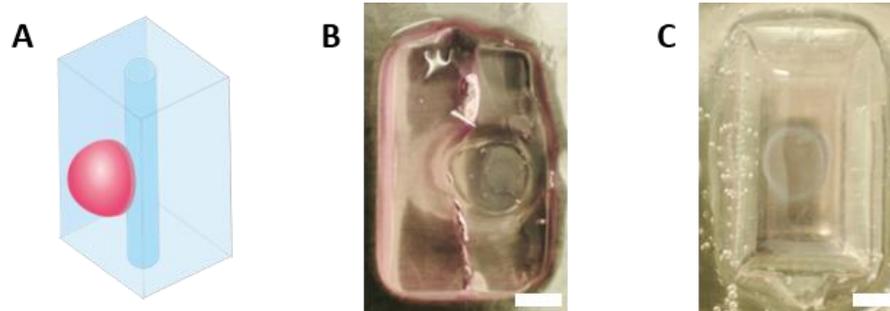
### 3.5.4 Multikomponentendruck eines vaskulären Tumormodells

In Kooperation mit Eric Pohl (IFG, KIT) und Larissa Laske (IFG, KIT) wurde eine alternative Herstellungsmethode für vaskularisierte Tumormodelle entwickelt. Die Idee dahinter war, dass durch einen Multikomponentendruck physiologisch unterschiedliche Gewebetypen in einem einzigen Modell gedruckt werden können. Tumore beispielsweise wachsen bevorzugt in einer festeren EZM, da diese ihr Wachstum fördern. Die Verhärtung findet jedoch nur in der näheren Umgebung des Tumors statt, während das gesunde Gewebe weicher ist.<sup>352,353</sup> Mit Hilfe eines Multikomponentendrucks können das Tumorgewebe sowie das gesunde Gewebe aus unterschiedlichen Materialien hergestellt werden und über 3D-Druckverfahren dennoch in einem einzigen Modell verdruckt werden.

In dieser Arbeit wurden sowohl zwei verschiedene Hydrogele für das Modell verwendet als auch zwei verschiedene Druckmethoden- die Xolographie, welche zuvor schon eingehend beschrieben wurde, und DLP. Beim DLP handelt es sich um ein lithographisches Druckverfahren, welches mit Hilfe eines Mikrospiegels und UV-Licht, Strukturen Schicht-für-Schicht aus flüssigem Hydrogel aufbauen kann.<sup>354,355</sup> Larissa Laske (IFG, KIT) konnte in ihrer Bachelorarbeit bereits erfolgreich den Druck von zellbeladenen GelNB/GelS Hydrogelen in dem DLP-Drucker BIONOVA X von CELLINK implementieren. Dabei wurden neben der Hydrogelzusammensetzung auch die Druckparameter variiert, um eine möglichst hohe Druckauflösung zu erzielen. 5 % GelNB/GelS mit 0,03 % LAP ergaben bei einer Strahlungsintensität von  $8,8 \text{ mW/cm}^2$  die höchsten Auflösungen. Ebenso wurde

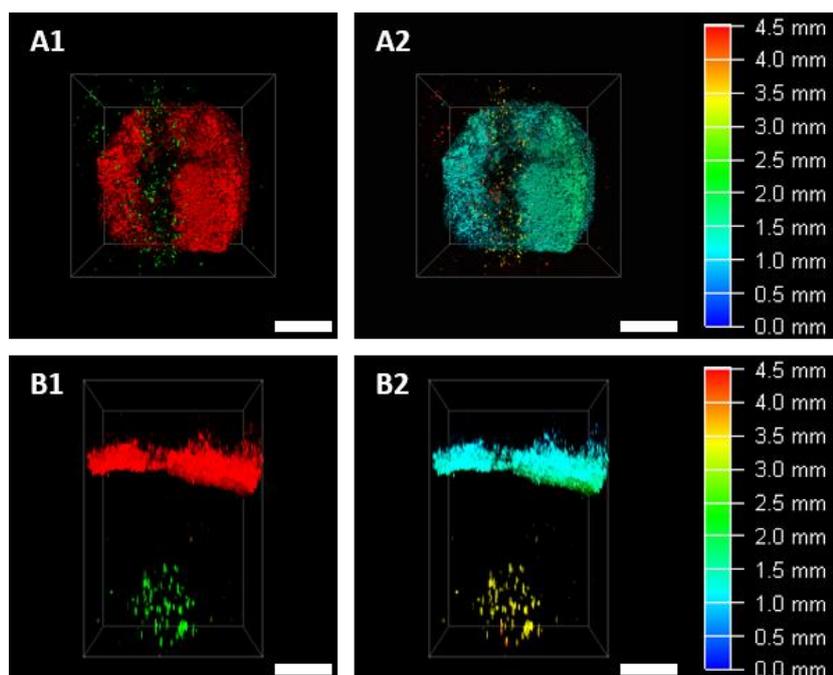
die Zellviabilität in den gedruckten Strukturen über eine Woche hinweg evaluiert, welche mit einer durchschnittlichen Viabilität von 85 % sehr gut war.<sup>356</sup>

Diese Grundlagen wurden verwendet, um ein Tumorgewebe aus HepG2 in einer kuppelartigen Anordnung zu drucken. Dazu wurden  $6 \cdot 10^6$  HepG2 zusammen mit 0,03 % LAP in 1 ml GelNB/GelS *High* gemischt und in eine spezielle BIONOVA X 24-Well Platte gegeben. Der Zelldruck erfolgte bei 37 °C mit einem 405 nm Laser. Die gedruckte Kuppelstruktur wurde dann an eine vaskuläre Chipplattform gedruckt. Als Chipbasis wurde das in Kapitel 3.2.2 beschriebene Xube-Modell mit der einfachen Kanalstruktur gewählt. Der Druck der Tumorstruktur an den Chip erfolgte mit dem Xube. Die 10%ige GelMA *High*/PEGDA Tinte wurde, wie in Kapitel 5.2.4.2 beschrieben, angesetzt und in eine Küvette gefüllt. Dann wurde die Küvette zur Gelierung in den Kühlschrank gestellt. Sobald die Tinte etwas an Viskosität gewann, wurde die Kuppelstruktur an der Seite der Küvette in die GelMA-Lösung gesetzt. Nachdem das GelMA vollständig geliert war, konnte die Küvette zum Druck in den Xube gesetzt werden. Der Druck der Kanalstruktur erfolgte nach dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Protokoll. Die Abbildung 78 zeigt neben einer schematischen Darstellung des Multikomponenten-Systems auch das fertige Ergebnis.



**Abbildung 78: Multikomponentendruck des Tumormodells.** A ist eine schematische Darstellung des Modells, wobei in Rot der mit dem DLP gedruckte, artifizielle Tumor abgebildet ist und in Blau die Hydrogelchip-Basis mit der Kanalstruktur. Ein gedruckter Chip mit durchgängigem Kanal ist in B zu sehen und das fertige Chipmodell im PDMS-Rahmen zeigt C. Maßstab: 2 mm.

Auf den Bildern ist zu sehen, dass die beiden Strukturen aus den unterschiedlichen Materialien erfolgreich zu einem Modell verdruckt werden konnten. Die leichte Änderung der optischen Dichte durch die Tumorkuppel hatte beim Druck mit dem Xube, im direkten Vergleich mit vorherigen Ergebnissen keinen merklichen Einfluss auf die Druckauflösung (Kapitel 3.2.2). Wie in Abbildung 78 zu sehen ist, konnte eine durchlässige Kanalstruktur gedruckt werden. Diese wurde anschließend an den Druck mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt und nach 24 h Inkubation wurde das Ergebnis mit dem Leica Stellaris 5 anhand von Z-Stack Aufnahmen festgehalten (Abbildung 79).



**Abbildung 79: 3D-Aufnahmen des Multikomponentenmodells.** Für den Druck des künstlichen Tumors wurden  $6 \cdot 10^6$  HepG2/ml in GelNB/GelS *High* resuspendiert und mit dem DLP in Kuppelform gedruckt. Die fertige Kuppelstruktur wurde mit 2 ml der flüssigen GelMA/PEGDA Biotinte in einer Küvette eingefroren. Mit dem Xube wurde die Chipbasis mit der Kanalstruktur in das GelMA gedruckt. Der Kanal wurde mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Nach 24 h wurden *Z-Stacks* mit dem Leica Stellaris 5 aufgenommen (Schrittgröße: 50  $\mu\text{m}$ , GFP:  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm, CellTracker™Red:  $\lambda_{\text{ex}}=577$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=602$  nm, 4xDry). **A1** zeigt die Ansicht von unten auf das Modell, wobei die HepG2 im künstlichen Tumor mit CellTracker™Red markiert sind (rot) und die HUVEC-GFP in grün dargestellt sind. **B1** ist die Ansicht von der Seite auf das Modell mit dem Tumor (rot) oben und dem besiedelten Kanal (grün) unten. **A2** und **B2** sind jeweils Tiefenfärbungen der beiden *Z-Stacks*. Maßstab: 1 mm.

Zur einfacheren Visualisierung wurden die HepG2-Zellen bereits nach dem Ablösen und vor dem Druck mit 10  $\mu\text{M}$  CellTracker Red gefärbt. Demnach wurden die HepG2-Zellen auf der linken Seite (A1, B1) der Abbildung rot dargestellt und die HUVEC-GFP grün. Aufgrund der hohen Zelldichte und damit auch optischen Dichte in der Kuppel konnte diese nicht vollständig auf den *Z-Stacks* erfasst werden. Allerdings war die runde Form und der gerade Boden der Kuppel zu erkennen sowie die hohe Zelldichte. Auch die HUVEC-GFP im Kanal konnten visualisiert werden. Diese hatten zwar den Kanal nicht gleichmäßig ausgekleidet, aber ihre Anordnung im Chip ließ den Verlauf des Kanals erkennen. Auf der rechten Seite von Abbildung 79 ist eine Tiefenfärbung der Zellen zu sehen, welche den Abstand von 2 mm zwischen Kanal und künstlichem Tumor verdeutlicht. Aufgrund der schlechten Adhäsion der Endothelzellen konnte keine Angiogenese in dem Chip beobachtet werden. Zudem war die Zelldichte im künstlichen Tumor zwar hoch, jedoch konnte noch kein nekrotischer Kern erkannt werden, was die VEGF-Produktion durch die HepG2 mindert. Die Ergebnisse sind im Rahmen einer neuen Fertigungsmethode entstanden und benötigen noch einiges an Etablierungsarbeit. Jedoch konnte bereits jetzt der Grundgedanke umgesetzt werden. Im Allgemeinen sind Multikomponentensysteme eine Neuheit im Bereich des *Tissue Engineerings*, welche die Möglichkeit bieten, Einfluss auf die Zellanordnung in Geweben zu nehmen oder an die Bedürfnisse verschiedener Gewebe in einem Modell angepasst werden zu können. Aus diesen Gründen stellen sie ein interessantes Werkzeug in der additiven Fertigung von künstlichen Mikroumgebungen dar, weshalb eine Weiterentwicklung der hier gezeigten Methode von großem Interesse ist.<sup>357,358</sup>

### 3.5.5 Kapitelzusammenfassung: Tumormodell

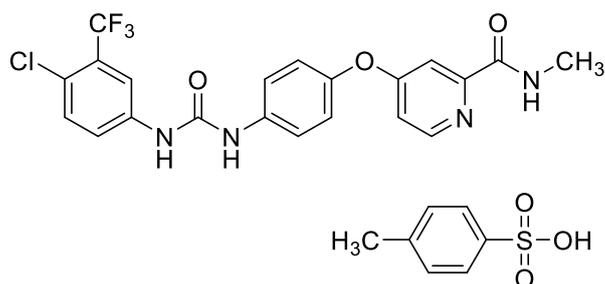
In diesem Kapitel konnte die erfolgreiche Induktion der Angiogenese durch artifizielle Tumorsphäroide aus Leberkrebszellen nachgewiesen werden. Neben dem *Sproutingassay* der HUVEC-GFP-Sphäroide, oder der 2,5D-Zellkultur konnte die pathologische Angiogenese auch im GelMA *Medium-Low* Hydrogelchip etabliert werden. Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse wie bei den mit 50 ng/ml VEGF behandelten Chips erzielt. Die zusätzlich eingebrachten NHDF hingegen zeigten erneut eine inhibierende Wirkung auf das Sprouting der Endothelzellen. Zum Schluss wurde eine alternative Herstellungsmethode der Tumormodelle vorgestellt, bei der durch einen Multikomponentendruck mit verschiedenen Druckern und Materialien den unterschiedlichen Gewebearten, wie Tumoren und Bindegewebe, individuelle Eigenschaften verliehen werden können.

### 3.6 Wirkstoffscreening

Durch wichtige Erkenntnisse in der Krebsforschung sowie der Entdeckung der Rolle der Angiogenese bei dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren gewann die Entwicklung von Angiogenese-Inhibitoren immer mehr an Bedeutung.<sup>239,334</sup> Unterschieden werden hierbei direkte und indirekte antiangiogene Wirkstoffe. Direkte Wirkstoffe interagieren mit den Endothelzellen und verhindern deren Antwort auf angiogene Faktoren. Indirekte Wirkstoffe hingegen inhibieren die Synthese von proangiogenen Stoffen durch die Tumorzellen.<sup>359,360</sup> Ein großer Vorteil der Angiogenese-Inhibitoren, vor allem der direkten ist, dass sie die genetisch sehr stabilen Endothelzellen angreifen, wodurch weniger schnell Resistenzen aufgebaut werden können.<sup>240,334</sup>

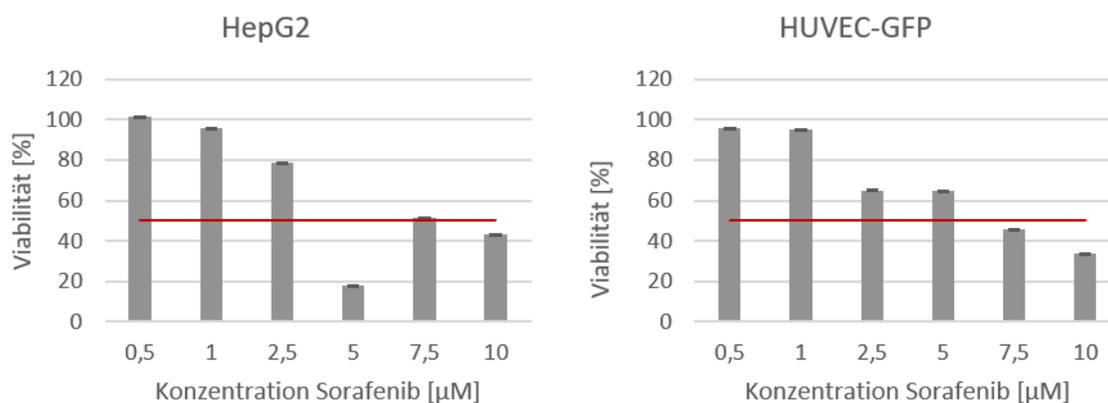
#### 3.6.1 Toxizität des Angiogenese-Inhibitors

In dieser Arbeit wurde mit dem Wirkstoff Sorafenib-Tosylat gearbeitet, um die Eignung des vaskularisierten *Tumor-on-a-chip* Systems für Wirkstoffscreenings zu validieren. Sorafenib gehört zur Klasse der Tyrosinkinaseinhibitoren und bindet mit hoher Affinität an VEGFR-2, aber auch an VEGFR-3 und PDGFR.<sup>361–363</sup> Es handelt sich um ein oral aufgenommenes Medikament, das in erster Linie gegen Nierenkrebs, aber auch gegen Melanome, Leber- und Lungenkrebs zum Einsatz kommt.<sup>364</sup> Die Strukturformel des Angiogenese-Inhibitors ist in Schema 6 dargestellt.



**Schema 6: Strukturformel von Sorafenib-Tosylat.** Sorafenib ist ein direkter Angiogenese-Inhibitor, welcher vorwiegend an VEGFR-2 bindet. Er wird als Krebstherapeutikum gegen verschiedene Tumorarten eingesetzt.

In klinischen Studien wurde Sorafenib zwar eine gute Verträglichkeit nachgewiesen, jedoch vorwiegend bei einer Konzentration von 400 mg/m<sup>2</sup>.<sup>364</sup> Bevor der Effekt des Inhibitors auf die Angiogenese im Chipmodell getestet werden konnte, musste zunächst überprüft werden, ob Sorafenib eine allgemeine Zelltoxizität besitzt. So kann im Vorhinein beurteilt werden, ob mögliche Auswirkungen durch die Inhibition der Angiogenese oder Zelltoxizität auftreten. Dazu wurde ein MTT-Test mit Sorafenib an HepG2 und auch HUVEC-GFP durchgeführt. Das genaue Prinzip des MTT-Tests wurde bereits in Kapitel 3.1.6.2 detailliert beschrieben. Für diesen Assay wurden sowohl 1\*10<sup>4</sup> HepG2 als auch 1\*10<sup>4</sup> HUVEC-GFP auf zwei verschiedenen 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen in Triplikaten mit Sorafenib-Konzentrationen zwischen 0,5-10 µM behandelt. Nach 72 h wurden 15 µl MTT-Reagenz auf die Zellen gegeben und für 3 h inkubiert. Eine Solubilization/Stop Lösung brachte die gebildeten Formazankristalle innerhalb von 24 h in Lösung, sodass die Absorption bei 595 nm mit einem SpectraMax iD3 Mikroplattenleser gemessen werden konnte. Anhand einer Positiv- und einer Negativkontrolle konnte die Zellviabilität für die einzelnen Konzentrationen berechnet und in Abbildung 80 graphisch dargestellt werden.



**Abbildung 80: Ergebnis des MTT-Tests von Sorafenib-Tosylat.** Links: Viabilitäten der mit Sorafenib (0,5-10 µM) behandelten HepG2. Rechts: Viabilitäten der mit Sorafenib (0,5-10 µM) behandelten HUVEC-GFP. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit n=3 und der Standardabweichung mit n-1.

Der MTT-Test von Sorafenib auf HepG2 und HUVEC-GFP zeigt für beide Zellarten einen Zusammenhang der zunehmenden Konzentration und der Zellviabilität. Mit steigender Wirkstoffkonzentration sinkt die Viabilität der Zellen. Dabei konnten anhand der ermittelten Viabilitätswerte die LD<sub>50</sub> Konzentrationen bestimmt werden (Tabelle 11).

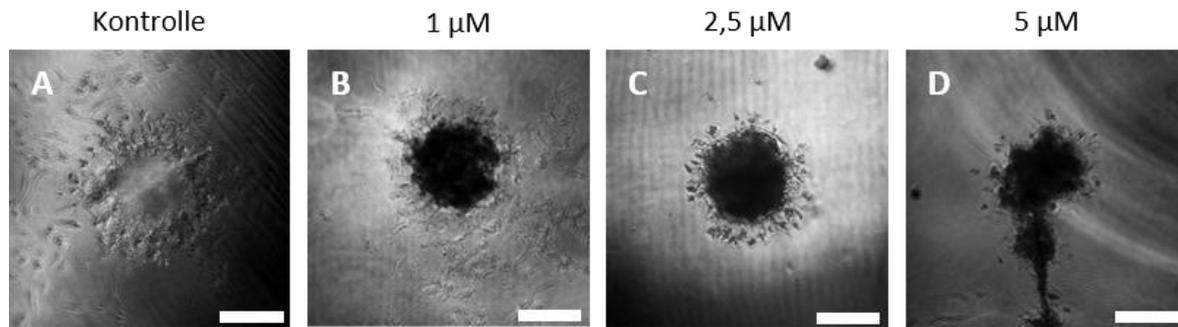
Tabelle 11: Ermittelte LD<sub>50</sub> Konzentrationen von Sorafenib-Tosylat.

Zellart	LD <sub>50</sub> -Wert
HepG2	4,57 µM
HUVEC-GFP	4,77 µM

Für die HepG2 und HUVEC-GFP ergaben sich vergleichbare mittlere letale Dosen für Sorafenib von 4,57 und 4,77 µM. Daher wurden für den darauffolgenden *Sproutingassay* nur Konzentrationen geringer oder gleich 5 µM gewählt.

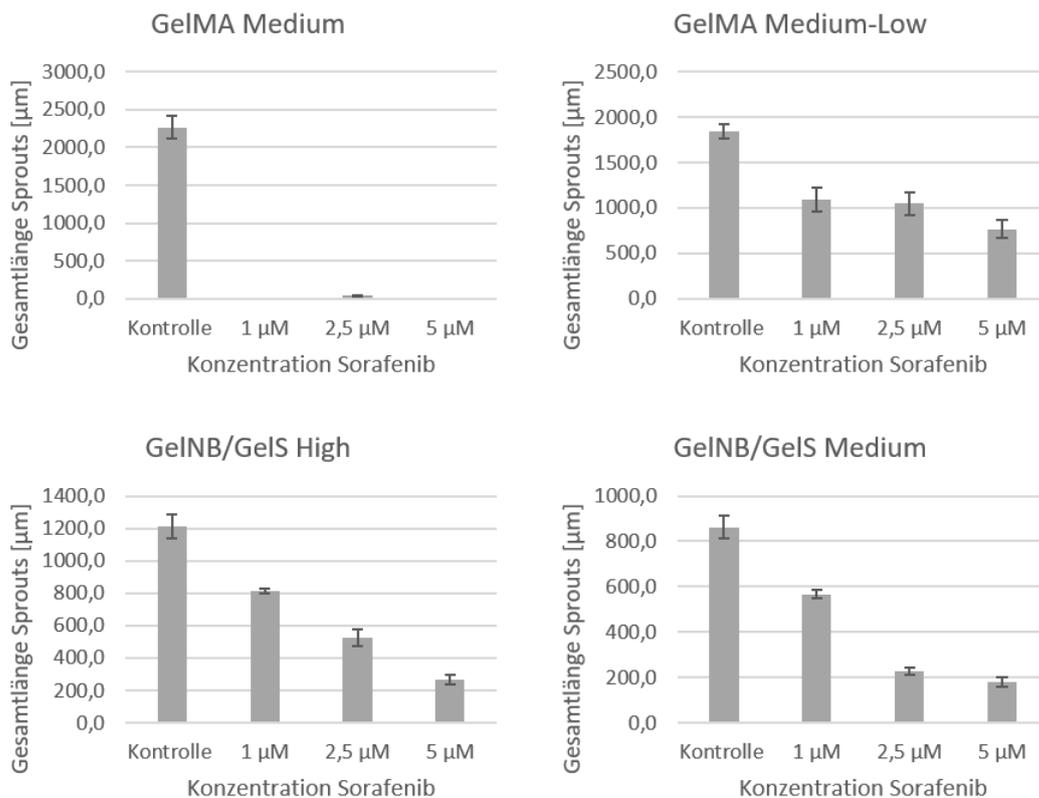
### 3.6.2 *Sproutingassay* mit Angiogenese-Inhibitor

Um zu evaluieren, ob der Wirkstoff in den nicht toxischen Konzentrationen einen Einfluss auf das *Sprouting*verhalten der Endothelzellen hat und welche Konzentration sich am besten eignet, wurde ein *Sproutingassay* mit HUVEC-GFP-Sphäroiden durchgeführt. 4000er HUVEC-GFP-Sphäroide wurden in 100 µl der Hydrogelvarianten eingebettet und mit 50 ng/ml VEGF in EGM-GFP überschichtet. In Triplikaten wurden die Sphäroide mit Sorafenib-Tosylat in Konzentrationen von 1 µM, 2,5 µM und 5 µM behandelt. Zusätzlich verblieb ein Triplikat als Kontrolle unbehandelt. Über eine Woche hinweg wurden die HUVEC-GFP-Sphäroide jeden zweiten Tag mit neuem Wirkstoff sowie VEGF und Medium versorgt. Nach einer Woche wurde das *Sprouting* der Endothelzellen mit dem Leica DMI LED festgehalten (Abbildung 81).



**Abbildung 81: Wirkung von Sorafenib am Beispiel von HUVEC-GFP-Sphäroiden eingebettet in GelNB/GelS High.** 4000er HUVEC-GFP-Sphäroide wurden in jeweils 100 µl GelNB/GelS High eingebettet und mit unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib (1 µM, 2,5 µM und 5 µM) behandelt. Zudem wurden sowohl zur unbehandelten Kontrolle als auch zu den behandelten Sphäroiden 50 ng/ml VEGF zugegeben. Nach sieben Tagen wurde das Wachstum der Sprouts evaluiert. Dazu wurde ein Leica DMI LED Mikroskop verwendet (10x Dry, Zoom:1,0). Maßstab: 200 µm.

An dem hier dargestellten Beispiel der Sphäroide in GelNB/GelS High war mit zunehmender Sorafenib-Konzentration eine Inhibierung der Angiogenese zu beobachten. Dieser Effekt konnte nicht nur in GelNB/GelS High, sondern auch in den anderen drei Hydrogelvarianten nachgewiesen werden. Zum genaueren Vergleich zwischen den Gelen und Konzentrationen wurde die kumulative Länge der Sprouts bestimmt und pro Gel in einem Graphen aufgetragen (Abbildung 82).

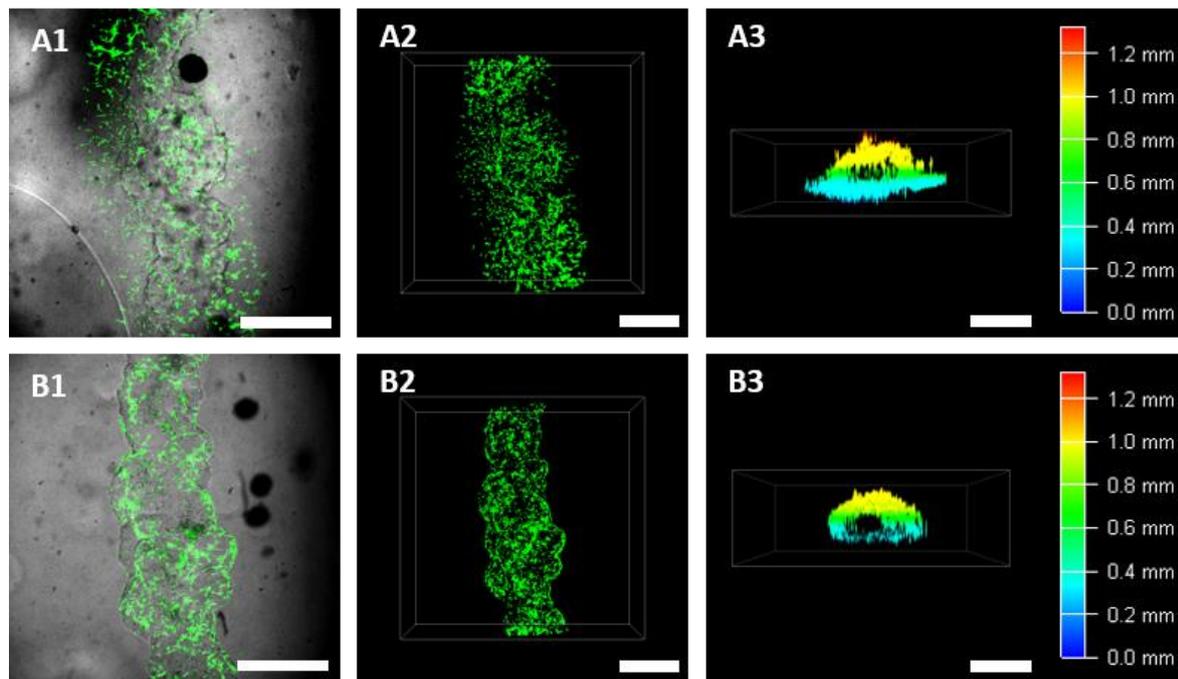


**Abbildung 82: Einfluss von Sorafenib auf das Sproutingverhalten von HUVEC-GFP-Sphäroiden.** 4000er HUVEC-GFP-Sphäroide wurden in je 100 µl Hydrogel eingebettet und mit verschiedenen Konzentrationen (1, 2,5 und 5 µM) Sorafenib über einen Zeitraum von sieben Tagen behandelt. Nach einer Woche erfolgte die Auswertung des Sproutingassays, indem die Gesamtlänge aller Sprouts pro Sphäroid ermittelt wurde. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit n=3 und der Standardabweichung mit n-1.

In allen Gelen zeigte bereits 1  $\mu\text{M}$  Sorafenib eine Inhibierung des Sprouting, welche mit zunehmender Wirkstoffkonzentration immer stärker wurde. In GelMA *Medium* konnte ab 1  $\mu\text{M}$  eine Abnahme des Sprouting von 100 % beobachtet werden. Abgesehen davon konnten in den Gelen mit 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib die besten Ergebnisse erzielt werden. Bei dieser Konzentration wurde eine durchschnittliche Reduktion der Gesamtlänge um 71,7 %  $\pm$ 9,7 nachgewiesen. Diese Beobachtung kann durch die Ergebnisse von Kim et al. belegt werden, die ebenfalls durch die Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  ein deutlich eingeschränktes Sprouting in den HUVEC-Sphäroiden gegenüber der Kontrolle nachweisen konnten.<sup>365</sup> Da mit dem MTT-Test eine maximale Dosis von 5  $\mu\text{M}$  aufgrund der Toxizität als zulässig bestimmt wurde und mit dieser Konzentration die besten Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde diese letztendlich im Chip verwendet.

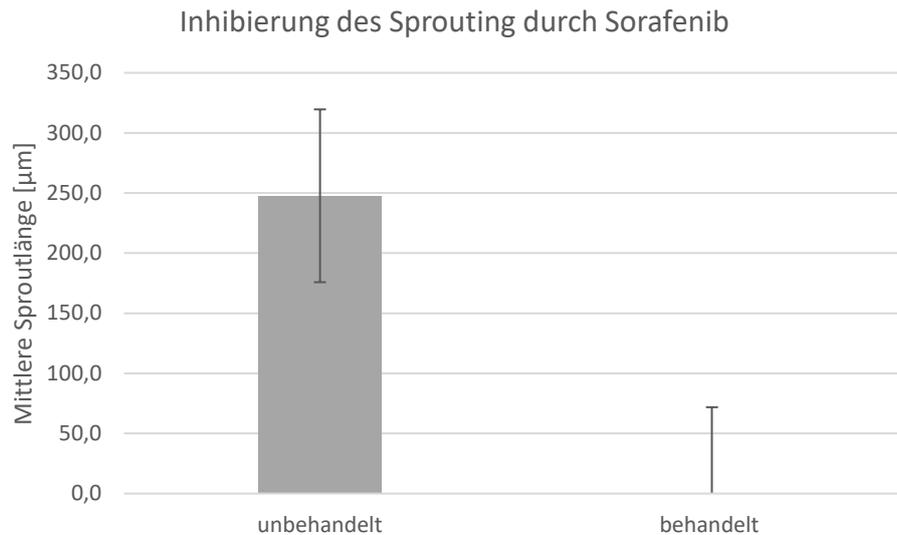
### 3.6.3 Wirkstoffscreening am Hydrogelchip

Goncalves et al. beschrieben in ihrem Review Anfang 2022 verschiedenste sogenannte *Tumor-on-a-chip* Systeme, darunter auch solche, die sich speziell mit der pathologischen Angiogenese beschäftigten.<sup>366</sup> Einige dieser Systeme konnten bereits vielversprechende Ergebnisse auch in Bezug auf die Behandlung der Systeme mit Wirkstoffen liefern.<sup>367–371</sup> Um das in dieser Arbeit entwickelte Krankheitsmodell der pathologischen Angiogenese ebenfalls für die Untersuchung von Wirkstoffen zu etablieren, sollte die Wirkung von Sorafenib zudem im Chip getestet werden. Dazu wurden zwei mit 24 Sphäroiden/ml beladene Hydrogelchips hergestellt. Die Kanäle dieser Chips wurden von beiden Seiten mit  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Ein Chip diente zur Kontrolle, dessen Medium ausschließlich mit 50 ng/ml VEGF versetzt wurde. Bei dem anderen Chip erfolgte über eine Woche hinweg jeden zweiten Tag zusätzlich die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  Sorafenib über das Medium. Nach sieben Tagen konnte die Wirkung des Angiogenese-Inhibitors evaluiert werden. Dazu wurden neben Hellfeldaufnahmen auch dreidimensionale *Z-Stacks* mit dem Leica Stellaris 5 aufgenommen. Zum Vergleich sind in Abbildung 83 Aufnahmen des unbehandelten (**A**) und des behandelten Chip (**B**) zusammengestellt.



**Abbildung 83: Wirkstoffscreening des Angiogenese-Inhibitors Sorafenib im Hydrogelchip.** 24 HepG2-Sphäroide wurden pro Milliliter Hydrogel in GelMA *Medium-Low* Chips eingebettet. Die Kanalstrukturen wurden mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP besiedelt. Nach 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurde beim Kontrollchip (oben) ein Medienwechsel durchgeführt und der Probenchip (unten) wurde mit  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib behandelt. Nach einer einwöchigen Behandlung wurden die Chips mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 evaluiert. **A1** und **B1** zeigen Überlagerungen von Hellfeldaufnahmen der Kanäle und von Fluoreszenzbildern der HUVEC-GFP-Ausläufer ( $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500-550 \text{ nm}$ , 4xDry, Zoom: 1,0). **A2** und **B2** sind Z-Stacks der Kanäle von oben und **A3** sowie **B3** sind Tiefenfärbungen der Seitenansichten der 3D-Bilder (Schrittgröße:  $20 \mu\text{m}$ ). Maßstab: 1 mm.

Während der unbehandelte Chip ein gleichmäßiges Sprouten über den gesamten Kanal hinweg zeigte, waren in dem mit Sorafenib behandelten Chip keine Ausläufer zu erkennen. Das spricht zusammen mit den Ergebnissen des *Sproutingassays* für eine inhibitorische Wirkung von Sorafenib auf das etablierte vaskuläre *Tumor-on-a-chip* System. Pauty et al. konnten in ihrem vaskulären, kollagenbasierten Chip denselben Effekt von nur  $1 \mu\text{M}$  Sorafenib feststellen. In Abbildung 83 ist zudem der graphische Vergleich zwischen dem unbehandelten und dem behandelten Chip dargestellt. Während die Kontrolle nach sieben Tagen eine mittlere Sproutlänge von  $250 \mu\text{m}$  aufwies, konnte für den mit Sorafenib behandelten Chip keine Sprouts vermessen werden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich das im Hydrogelchip etablierte Tumormodell auch für die Untersuchung von Wirkstoffen eignet. Um dies zu bestätigen, sollten jedoch noch weitere Wirkstoffe mit bekannten Eigenschaften getestet werden, um das Verhalten des Systems validieren zu können.



**Abbildung 84: Vergleich der mittleren Längen der Sprouts über den Zeitraum von einer Woche.** Die Längen der zehn längsten Sprouts wurden an den Tagen 1, 4 und 7 im GelMA *Medium-Low* Chip mit ImageJ gemessen und gemittelt. Die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte mit  $n=10$  und der Standardabweichung mit  $n-1$ .

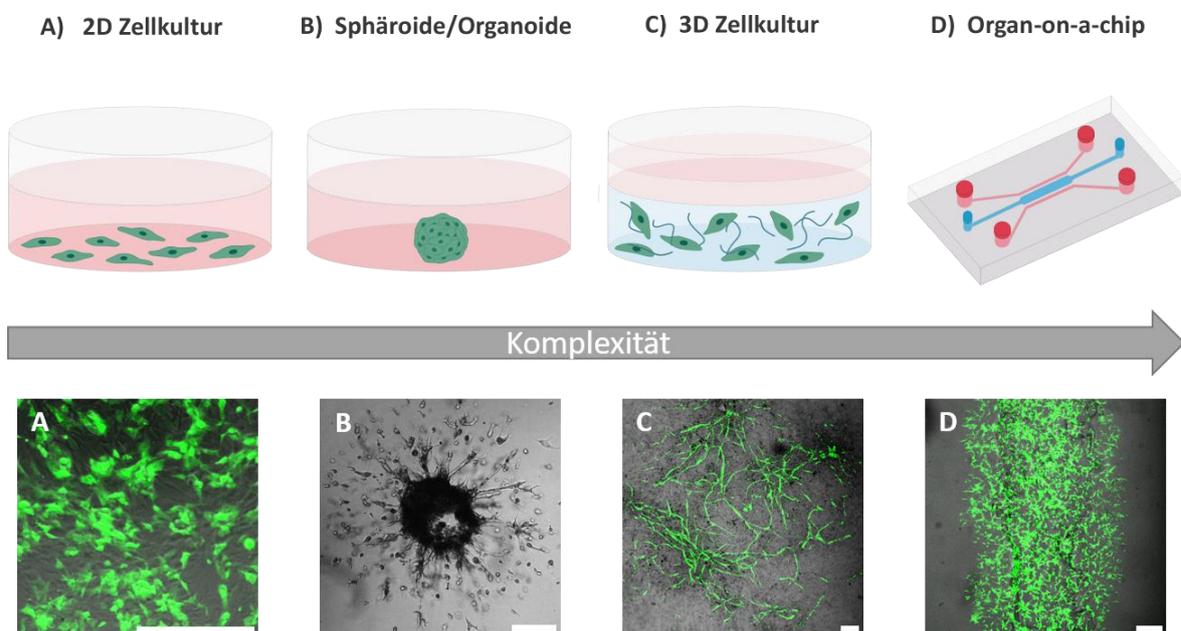
### 3.6.4 Kapitelzusammenfassung: Wirkstoffscreening

Um zu demonstrieren, dass sich das entwickelte *Tumor-on-a-chip* Modell für den Einsatz bei der Wirkstoffentwicklung eignet, wurde der Angiogenese-Inhibitor Sorafenib am Chipsystem getestet. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines MTT-Tests die höchst zulässige Konzentration des Inhibitors bestimmt, bevor über einen *Sproutingassay* die wirksamste Konzentration ermittelt wurde.  $5 \mu\text{M}$  erzielten dabei die beste Wirkung und wurden über den Verlauf von einer Woche am Hydrogelchip getestet. Tatsächlich konnte der Wirkstoff im Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle die Angiogenese der HUVEC-GFP erfolgreich inhibieren.



## 4 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, welches Potenzial durch die Kombination von additiven Fertigungsverfahren und Methoden aus dem *Tissue Engineering* entsteht. Durch den Einsatz von 3D-Bioprintingverfahren und 3D-Zellkulturmethoden war es möglich, ein funktionales, vaskularisiertes *Organ-on-a-chip* Modell zu entwerfen und herzustellen. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines extrusionsbasierten 3D-Bioprinters und einem xolographischen Drucker die vaskuläre Chipbasis aus den zuvor synthetisierten sowie charakterisierten gelatinebasierten Hydrogelen hergestellt. Im Falle des Extrusionsdruckers wurde eine Opferstruktur aus Gelatine verwendet, um die Kanäle im Chip zu erzeugen. Diese additiven Strukturen bildeten die Makrogefäße des Blutgefäßsystems ab, indem sie mit HUVEC-GFP besiedelt wurden, welche das natürliche Endothel nachbildeten. Um die feineren Verzweigungen der Blutgefäße zu erzeugen, waren die Druckauflösungen der Bioprinter nicht ausreichend, weshalb Methoden aus der 3D-Zellkultur verwendet wurden, um die Angiogenese der Endothelzellen zu induzieren. Dabei wurde ein wachstumsfaktorinduziertes Sprouting dazu verwendet, das umliegende Hydrogelkompartiment zu vaskularisieren. Anhand von HUVEC-GFP-Sproutingassays sowie 3D- und 2,5D-Zellkulturen konnten die optimalen Parameter für die Angiogenese bestimmt werden, bevor mit 50 ng/ml VEGF das Sprouting der Endothelzellen im Chipsystem induziert wurde. Die stufenweise Entwicklung dieses Chipssystems, beginnend bei der 2D Zellkultur und der zunehmenden Komplexität der Modelle bis hin zum *Vasculature-on-a-chip* System, ist in Abbildung 85 anhand von Beispielen exemplarisch dargestellt.



**Abbildung 85: Von der 2D Kultur zum vaskularisierten *Organ-on-a-Chip* Modell.** Durch die schrittweise Erweiterung des vaskulären Modells konnte ein dreidimensionales Krankheitsmodell zum Wirkstoffscreening aufgebaut werden.

Aufbauend auf diesem *Vasculature-on-a-chip* System konnte im nächsten Schritt erfolgreich ein Krankheitsmodell entwickelt werden. Durch die Implementierung von artifiziellen Leberkrebstumoren in Form von Hepg2-Sphäroiden konnte die pathologische Angiogenese im Zusammenhang mit Krebserkrankungen abgebildet werden. Um die Funktionalität des

Krankheitsmodells unter Beweis zu stellen, wurde abschließend die Inhibierung der Angiogenese durch den Wirkstoff Sorafenib im Chip untersucht, welche erfolgreich beobachtet werden konnte.

Auch wenn in dieser Arbeit ein voll funktionsfähiges *Organ-on-a-chip* Modell etabliert werden konnte, ist dessen Entwicklung noch nicht abgeschlossen. Um es noch genauer an die *in-vivo* Bedingungen anzupassen, sollte der Chip als nächstes an ein mikrofluidisches System angeschlossen werden. Dieses System dient dazu, den natürlichen Blutfluss in den artifiziellen Blutgefäßen zu simulieren. Dieser Fluss wiederum kann sich positiv auf die Endothelzellen auswirken, da diese *in-vivo* in der Lage sind, die dadurch entstehenden mechanischen Reize in intrazelluläre und biochemische Signale umzuwandeln.<sup>336–338</sup> Des Weiteren können über den künstlichen Blutfluss auch Krankheitsmodelle detaillierter dargestellt werden. Beispielsweise die Metastasierung der Tumoren. Da die *Organ-on-a-chip* Modelle flexibel erweiterbar sind, können Chips mit gesundem Gewebe in Reihe geschaltet werden mit pathologischen Modellen, um die Migration der Tumorzellen über die Blutgefäße zu rekonstruieren.<sup>47,50,339–341</sup> Diese Krankheitsmodelle können eingesetzt werden, um die zellulären und biochemischen Vorgänge besser zu verstehen und basierend auf diesen Erkenntnissen gezieltere personalisierte Therapeutika zu entwickeln.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Zellen

HUVEC-GFP	GFP exprimierende, humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (cAP-0001GFP, Angio-Proteomie) Passagen 4-16
NHDF	Humane Hautfibroblasten (cc-2511, Lonza Ltd) Passagen 5-12
HepG2	Humane Leberkrebszelllinie
HeLa	Humane Gebärmutterhalskrebszelllinie (aus Henrietta Lacks)

#### 5.1.2 Chemikalien und Reagenzien

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Lieferant</b>
<b>Zellkultur</b>	Collagen Typ I Rat Tail (Nr. ALX-522-435-0100)	Enzo Life Science GmbH (Lörrach, Deutschland)
	DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nr. 41966-029)	Gibco® life technologies (Carlsbad USA)
	DPBS <sup>-/-</sup> , Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Nr. 14190-094)	Gibco® life technologies (Carlsbad USA)
	Endothelial Cell Growth Medium Kit classic (GFP/RFP) (Nr. PB-MH-100-2190-GFP)	PELOBiotech GmbH (Planegg, Deutschland)
	FBS, Fetal Bovin Serum (Nr. 10500064)	Gibco® life technologies (Carlsbad USA)
	Pen/Strep, Penicillin/Streptomycin (Nr. 15140122)	Gibco® life technologies (Carlsbad USA)
	TritonX-100 für Molekularbiologie (Nr. T8787)	Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland)
	Trypsin-EDTA, 0,25% (Nr. 25200056)	Gibco® life technologies (Carlsbad USA)
	Human Recombinant VEGF-165 (Nr. 78073)	Stemcell Technologies (Vancouver, Kanada)
<b>Chemikalien</b>	Aceton (Nr. 5025.5)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Aerosil200	Evonik Industries AG (Essen, Deutschland)
	Agarose (Nr. 32-2789P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

	Calcein-AM (Nr. C3099)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	CTFA Genomer*1117	Rahn GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
	DL-N- Acetylhomocysteinthiolacton (Nr.A16602-25G)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	DMSO, Dimethylsulfoxid (Nr. A984.2)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	EDTA (Nr. 8043.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	ELASTOSIL®RT 601 A/B (Nr. 978490)	Wacker Chemie (München, Deutschland)
	Ethanol (Nr. 20821.330P)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Gelatine Typ A (Nr. G1890)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	GelMA	IFG-CB, AK Schepers (KIT Karlsruhe, Deutschland)
	GelN	IFG-CB, AK Schepers (KIT Karlsruhe, Deutschland)
	GelS	IFG-CB, AK Schepers (KIT Karlsruhe, Deutschland)
	HCl, Salzsäure (Nr. H1758)	Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland)
	Isopropanol (Nr. 9866.8)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	LAP, Lithium Phenyl(2,4,6- trimethylbenzoyl)phosphinat (Nr. L0290)	TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland)
	MES (Nr. 4256.3)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Methacrylsäure (Nr. 276685-500ML)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Methylcel® MC (Nr. 64625-100G-F)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Methyldiethanolamin (Nr. 471828-250ML)	Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland)
	MTT-Assay (Nr. G4100)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
	Natriumcarbonat, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Nr.P028.2)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Natriumhydrogencarbonat, NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

	(Nr.6885.3)	
	Natriumhydroxid Plätzchen, NaOH (Nr. 6771.1)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Polyethylenglykoldiacrylat 575 (Nr. 437441-500ML)	Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen, Deutschland)
	PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Nr. A12362)	Molecular Probes®, Life Technologies GmbH (Carlsbad, USA)
	Propidiumiodid (Nr. 40016)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Sorafenib Tosylat (Nr. 16554504)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	TNBSA (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) (Nr. P2297)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Triethanolamin (Nr. ACRO421630010)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Urethanmethacrylat (Genomer*4297)	Rahn GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland)
	XC471 (Photoinitiator)	Xolo GmbH (Berlin, Deutschland)
	XC577 (Photoinitiator wasserlöslich)	Xolo GmbH (Berlin, Deutschland)

### 5.1.3 Zusammengesetzte Medien und Puffer

	Bezeichnung	Zusammensetzung
<b>Zellkultur</b>	HUVEC-GFP Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EBM Medium 500 ml (PELOBio)</li> </ul>
	EGM-GFP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zusätze GFP Kit (PELOBio)</li> </ul>
	DMEM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM 500 ML</li> <li>• 10 % FCS</li> <li>• 1 % P/S</li> </ul>
	Einfriermedium HUVEC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 % FCS</li> <li>• 40 % HUVEC-GFP Medium</li> <li>• 10 % DMSO</li> </ul>
	Einfriermedium NHDF/HepG2/HeLa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 % FCS</li> <li>• 40 % DMEM</li> <li>• 10 % DMSO</li> </ul>
	Trypsininhibitor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 90 % DPBS<sup>-/-</sup></li> <li>• 10 % FCS</li> </ul>
<b>Synthese</b>	Natriumcarbonatpuffer für TNBSA-Assay	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 % 0,1 M NaHCO<sub>3</sub></li> <li>• 5 % 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> </ul>

Natriumcarbonatpuffer für Gels Synthese	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 60 % 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> <li>• 40 % 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> </ul>
--	--

#### 5.1.4 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Hersteller
	μ-Slide, 8 Well (Nr. 80826)	Ibidi GmbH (Martinsried, Deutschland)
	Adhäsionsobjektträger Q-Path (R) Plus 76x26 mm (Nr. LBQP10048101)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Cyroröhrchen, 2 ml (Nr. 479-1262)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Dialyseschläuche 14 kDa (Nr. D92527-100FT)	Merck (Steinheim, Deutschland)
	Dosiernadel konisch rot (Nr. 501610)	VIEWEG GmbH (Kranzberg, Deutschland)
	Dosiernadel Standard ¼ Zoll (Nr.505300)	VIEWEG GmbH (Kranzberg, Deutschland)
	Einwegküvetten UVette 220-1600 nm (Nr. 30106318)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Erlenmeyerkolben 250 ml (Nr. 214-1132)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Falcon-Röhrchen 15/50 ml (Nr. 188271/227261)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
	Kanülen Sterican, 21 G, 120 mm (Nr.4665643)	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
	Küvetten, 4 optische Fenster, makro, 2,5 ml (Nr. 759030)	Brand GmbH+Co KG (Wertheim, Deutschland)
	Manuelle Pipettenspitzen, 0,1-10 µl (Nr. 613-2140)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Manuelle Pipettenspitzen, 1-200 µl (Nr. 613-0732)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Manuelle Pipettenspitzen, 100-1250 µl (Nr. 613-0738)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Messpipetten, AR-Glas 10 ml	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
	Mr. Frosty™ Freezing Container (Nr. 5100-0001)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
	Parafilm M, 4in.*125 ft. Roll	Merck

	(Nr. P7793)	(Steinheim, Deutschland)
	Pasteurpipetten, Natron-Kalk-Glas (Nr. 612-1702)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Petrischale, PS (Nr. 391-0598)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Reaktionsgefäß, SafeLock, 1,5 ml (Nr. 30120086)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Reaktionsgefäß, SafeLock, 2 ml (Nr. 30120094)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Reaktionsgefäß, SafeLock, 1,5 ml, amber (Nr. 30120191)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Reservoir, 50 ml (Nr.613-1183)	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	Spritzen Omnifix 1 ml (Nr. 1617100V)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
	Sterilfilter, Rotilabo®, Porengröße 0,22 µm (Nr. P668))	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
	Ultrafuse PLA Filament schwarz/blau, 2,85 mm, 750 g (Nr. 1417271-62)	BASF (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland)
	Zählkammer, Neubauer (Nr.631-0926)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Zellkulturflasche CellStar, Filterschraubverschluss, 175 cm <sup>2</sup> (Nr. 660175)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
	Zellkulturflasche CellStar, Filterschraubverschluss, 75 cm <sup>2</sup> (Nr. 658175)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
	Zellkulturflasche CellStar, Filterschraubverschluss, 25 cm <sup>2</sup> (Nr. 660175)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
	Zellkultur Multiwellplatte 48 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 392-0062)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Zellkultur Multiwellplatte 96 Well, PS, F-Boden, Transparent CellstarR (Nr. 391-3325)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	24-Well Plate for BIONOVA X (Nr. D16110025299)	Cellink (Göteborg, Schweden)
	24-Well Plate Printing Probes	Cellink

	(Nr. D16110025293)	(Göteborg, Schweden)
--	--------------------	----------------------

### 5.1.5 Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
<b>Zellkultur</b>	Absaugpumpe Integra Vacusafe	NTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal, Deutschland)
	CO2-Inkubator, C170	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
	ENVAIReco® Werkbank	ENVAIR (Heywood, Vereinigtes Königreich)
	Mehrkanalpipetten 1-10µl/20-200µl	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Pipetten Eppendorf Research Plus 1-10µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
	Stickstofftank Biosafe MD Chronos 100	Messer Industriegase (Bad Soden, Deutschland)
	Wärmeschrank UN55	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
<b>Mikroskope</b>	Inverses Lichtmikroskop Leica DMI1 LED	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
	Weitfeldmikroskop Leica DMIL LED	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland)
<b>Sonstige</b>	Absorptionsspektrometer SmartSpec3000	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
	BIONOVA X	Cellink (Göteborg, Schweden)
	BioSpot BP	Biofluidix GmbH (Freiburg, Deutschland)
	Christ Alpha 3-4 LSCbasic	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
	Feinwaage LAG214i	Molecular Devices LLC (San Jose, USA)
	Kühlsystem für 3D-Discovery, Umwälzkühler Huber Pilot One	Peter Huber, Kältemaschinen AG (Offenburg, Deutschland)
	Magnetrührer mit Heizplatte VMS C7	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	pH/mV/°C-Messgerät pH110	VWR part of Avantor (Bruchsal, Deutschland)
	pH-Messgerät pH20	VWR part of Avantor

		(Bruchsal, Deutschland)
	Punktstrahler Omnicure S2000	Excelitas Technologies (Waltham, USA)
	SpectraMax iD3 Mikroplattenleser	Molecular Devices LLC (San Jose, USA)
	SpeedMixer	Hauschild SpeedMixer (Hamm, Deutschland)
	Ultimaker 3 Extended	Ultimaker (Utrecht, Niederlande)
	Umlaufkühler ULK 602 0, Kühlsystem für BioSpot BP	Fryka-Kältetechnik GmbH (Esslingen, Deutschland)
	Wasserbad	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
	Xube	Xolo GmbH (Berlin, Deutschland)
	Zentrifuge Megafuge 2.0R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
	Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

### 5.1.6 Software

- blender
- ChemDRAW Professional 16.0
- Citavi 6
- CorelDRAW 2021
- Fiji Image J
- GraphPad Prism 10.0.2.232
- Leica Application Suite X (LAS X)
- Microsoft Office 365
- PTC Creo 3.0
- Ultimaker Cura 4.13.1
- VideoCreator\_Jetson

## 5.2 Methoden

### 5.2.1 Synthesen der Hydrogelpolymere

Für die Herstellung der Hydrogelpolymere wurden die Lysingruppen der Gelatine Typ A (Schweinehaut, 300 Bloom) mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen modifiziert.

#### 5.2.1.1 GelMA

1 g Gelatine wurde bei 50 °C in 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> für etwa 30-60 min gelöst. Anschließend wurde die benötigte Menge Methacrylsäureanhydrid (Tabelle 12) zugetropft und die Reaktionslösung für 2 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktion wurde mit 10 ml erwärmtem DPBS<sup>-/-</sup> gestoppt. Nach weiteren

10 min Rühren wurde das Produkt zur Aufreinigung in Dialyseschläuche überführt (Cellulose, 12-14 kDa). Die Dialyse erfolgte bei 40 °C für sieben Tage gegen entsalztes H<sub>2</sub>O, wobei zwei Mal täglich das Wasser gewechselt wurde. Das aufgereinigte Produkt wurde bis zur Lyophilisation bei -20 °C gelagert, ebenso der gefriergetrocknete weiße Feststoff.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ/ppm = 7,46-7,22 (H<sub>ar</sub>, Gelatine), 5,73 (1H, Vinyl-H, H<sub>a</sub>), 5,48 (1H, Vinyl-H, H<sub>b</sub>), 5,08-0,83 (Gelatine), 3,04 (br, 2H, NH<sub>2</sub>, H<sub>c</sub>), 1,95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>, H<sub>d</sub>).

Tabelle 12: Eingesetzte Mengen MAA pro 1 g Gelatine zur Funktionalisierung von 0,266 mmol NH<sub>2</sub> Gruppen.

Funktionalisierung	MAA [mmol]/Gelatine [g]	MAA [μl]/Gelatine [g]
<i>Low</i> (1 Äq.)	0,266	39,5
<i>Medium-Low</i> (4 Äq.)	1,07	158
<i>Medium</i> (8 Äq)	2,13	316
<i>High</i> (30 Äq)	7,98	1185

### 5.2.1.2 GelNB

Für die Synthese von GelNB nach Göckler et al.<sup>110</sup> wurden die entsprechenden Mengen 5-Norbornen-2-carboxylsäure (Tabelle 13) in 10 ml MES-Puffer (0,5 M, pH 6) gelöst. Dann wurden 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (EDC-HCl) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 50 °C erwärmt und anschließend für 15 min gerührt. 1 g Gelatine wurde langsam untergerührt und der pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,5-7,8 eingestellt. Nach der Reaktion bei 50 °C über Nacht wurde das Rohprodukt in Dialyseschläuche (Cellulose, 12-14 kDa) überführt. Dabei wurde für sieben Tage bei 40 °C gegen entsalztes H<sub>2</sub>O dialysiert. Das Wasser wurde dabei zwei Mal am Tag gewechselt. Das Dialyseprodukt wurde bei -20 °C eingefroren und nach der anschließenden Lyophilisation als weißer Feststoff bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ/ppm = 7,6-7,4 (Haromat Gelatine), 6,44 (H<sub>a</sub>, endo), 6,39 (H<sub>a</sub>', exo), 6,37 (H<sub>b</sub>', exo), 6,11 (H<sub>b</sub>, endo), 5,24-0,99 (Gelatine), 3,20 (bs, NH<sub>2</sub>)

Tabelle 13: Eingesetzte Mengen NCS pro 1 g Gelatine zur Funktionalisierung von 0,266 mmol NH<sub>2</sub> Gruppen

Funktionalisierung	Äquivalente (NCS/NH <sub>2</sub> )	n (NCS) [mmol]	V (NCS) [μl]	m (EDC) [mg]	m (NHS) [mg]
<i>Low</i>	1	0,266	32,6	102,0	30,6
<i>Medium</i>	2	0,532	65,1	204,0	61,2
<i>High</i>	10	2,66	325,5	1019,8	306,1

### 5.2.1.3 GelS

Die Synthese von GelS erfolgte nach Van Vlierberghe et al.<sup>88</sup> unter einer Stickstoffschutzatmosphäre. In einem Schlenk Kolben wurden 1 g Gelatine und eine Spatelspitze EDTA in 10 ml entgastem Bicarbonatpuffer (0,1 M, pH 10) bei 40 °C vollständig gelöst. Parallel wurde die gewünschte Menge *N*-Acetylhomocysteinthiolacton (Tabelle 14) in 2 ml Bicarbonatpuffer gelöst und dann mit Hilfe einer Spritze über das Septum zur Reaktionslösung hinzugegossen. Die Reaktion erfolgte bei 40 °C für 3 h. Nach der Reaktionszeit wurde das Rohprodukt

mit 10 ml entgastem H<sub>2</sub>O verdünnt und zur Dialyse in Celluloseschläuche (12-14 kDa) gefüllt. Die Dialyse erfolgte unter Stickstoff für 24 h. Währenddessen wurde das Wasser 3-4 Mal gewechselt, wobei bei den ersten beiden Malen je eine Spatelspitze EDTA hinzugegeben wurde. Für die Gefriertrocknung wurde das aufgereinigte GeIS bei -20 °C eingefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Tabelle 14: Eingesetzte Mengen N-Acetylhomocysteinthiolacton pro 1 g Gelatine zur Funktionalisierung von 0,266 mmol NH<sub>2</sub>Gruppen.

Funktionalisierung	n [mmol]	m [mg]
Low (1 Äq.)	0,266	42,4
High (5 Äq.)	1,33	211,8

## 5.2.2 Charakterisierung der Photopolymere

### 5.2.2.1 TNBSA-Assay

Zur Charakterisierung der Photopolymere wurde der jeweilige Funktionalisierungsgrad mit Hilfe eines TNBSA-Assays (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) bestimmt. Dazu wurden in Duplikaten Stammlösungen der Photopolymere und der Gelatine mit einer Konzentration von 500 µg/ml in Natriumbicarbonatpuffer (pH 8,5) angesetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden jeweils in Duplikaten 500 µl entnommen und diese mit 250 µl 0,02 % TNBSA in Natriumbicarbonatpuffer versetzt. Zu jeder Probe wurde ein jeweiliger Blank erstellt, indem 500 µl Stammlösung zunächst mit 125 µl HCl (1 M) gemischt wurden, bevor die Zugabe von TNBSA erfolgte. Die Reaktionslösungen wurden anschließend für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden zu den Proben ebenfalls 125 µl HCl (1 M) zugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Nachdem alle Proben und Blanks mit 250 µl SDS (10 % in H<sub>2</sub>O) verdünnt wurden, erfolgte die Messung der Absorption mit einem SmartSpec3000 bei einer Wellenlänge von 535 nm. Anhand der Referenzwerte der unfunktionalisierten Gelatine ( $A_{\text{Gelatine}}$ ) und der Absorptionswerte der Photopolymere ( $A_{\text{Photopolymer}}$ ) konnte der Funktionalisierungsgrad über die folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Funktionalisierungsgrad [\%]} = \left(1 - \frac{A_{\text{Photopolymer}}}{A_{\text{Gelatine}}}\right) * 100 \%$$

## 5.2.3 Hydrogele

### 5.2.3.1 GelMA Hydrogele

Für die Verwendung von GelMA in der 3D-Zellkultur oder für den Bio-Extrusionsdruck wurden zunächst jeweils 10%-ige Stammlösungen (w/v) der Polymere hergestellt. Dazu wurden diese bei 50 °C in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst. Um sie zu Hydrogelen auspolymerisieren zu können, wurden die Polymere anschließend mit 0,3 % des Photoinitiators LAP (Stammlösung 10 % w/v) versetzt und mit DPBS<sup>-/-</sup> auf eine Konzentration von 5 % verdünnt. Die genaue Zusammensetzung für 1 ml GelMA-Lösung ist der nachfolgenden Tabelle 15 zu entnehmen. Diese gilt für alle GelMA-Polymere unabhängig von der Funktionalisierung.

Tabelle 15: Zusammensetzung von 1 ml GelMA Hydrogellösung.

Komponente	Konzentration im Gel [%]	Volumen [ $\mu$ l]
GelMA (10 %)	5	500
LAP (10 %)	0,3	30
DPBS <sup>-/-</sup>		470

Die Polymerlösungen wurden anschließend mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) für etwa 30 s ausgehärtet.

### 5.2.3.2 GelNB/GelS

Die synthetisierten GelNB- und GelS-Polymere wurden ebenfalls zunächst bei 50 °C in DPBS<sup>-/-</sup> gelöst, wobei GelNB mit einer Konzentration von 10 % (w/v) und GelS von 5 % (w/v) angesetzt wurden. Beide Polymere wurden in der Hydrogellösung so mit 0,03 % LAP (Stammlösung 1 % w/v) und DPBS verdünnt, sodass sie eine Endkonzentration im Gel von jeweils 2,5 % aufwiesen. Abhängig von dem gewünschten Festigkeiten der GelNB/GelS Gele wurden die unterschiedlich funktionalisierten Polymere gemischt und unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) ausgehärtet. Die jeweiligen Zusammensetzungen für 1 ml sind in der Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung von 1 ml GelNB/GelS Hydrogellösung.

Hydrogel	Komponenten	Konzentration im Gel [%]	Volumen [ $\mu$ l]
<b>Low</b>	GelNB <i>Low</i> (10 %)	2,5	250
	GelS <i>Low</i> (10 %)	2,5	500
	LAP (1 %)	0,03	30
	DPBS <sup>-/-</sup>		220
<b>Medium</b>	GelNB <i>Medium</i> (10 %)	2,5	250
	GelS <i>High</i> (10 %)	2,5	500
	LAP (1 %)	0,03	30
	DPBS <sup>-/-</sup>		220
<b>High</b>	GelNB <i>High</i> (10 %)	2,5	250
	GelS <i>High</i> (10 %)	2,5	500
	LAP (1 %)	0,03	30
	DPBS <sup>-/-</sup>		220

## 5.2.4 3D-Druck

### 5.2.4.1 Extrusionsdruck mit dem BioSpot BP (Biofluidix)

Zum Extrusionsdruck der Hydrogele wurden die Polymere wie im vorangegangenen Kapitel 5.2.3 beschrieben angesetzt und in 3 ml Inkjet Spritzen mit konischen Dosiernadeln ( $\varnothing$  0,25 mm) gefüllt. Um die passende Viskosität der Lösungen zu erreichen, wurden diese vor Beginn des Druckvorgangs für etwa 30 min temperiert. Als optimale Drucktemperatur für GelMA wurden dabei 23 °C ( $\pm$ 1 °C) und für GelNB/GelS 21 °C ( $\pm$ 1 °C) gewählt, bei einer Extrusionsgeschwindigkeit von 0,02 mm/s. Zu

Beginn des Druckvorgangs wurde der Druckkopf referenziert, wobei  $X=0$  und  $Y=0$  auf die Mitte des Druckbetts gelegt und  $Z=0$  optisch bestimmt wurden. Die für den BioSpot BP benötigten Druckvorlagen wurden in Form eines selbst geschriebenen G-Codes in das System eingegeben. Da es sich bei dem Extrusionsdruck um ein Schicht-für-Schicht Verfahren handelt, wurde die Struktur nach jeder Schicht mit dem Omnicure S2000 (320-500 nm,  $500 \text{ mW/cm}^2$ ) ausgehärtet, bevor die nächste gedruckt werden konnte. Der Druck erfolgte auf einem mit PDMS beschichteten Objektträger. Nach derselben Methode wurde ebenfalls bei zellbeladenen Hydrogelen vorgegangen.

#### 5.2.4.2 Volumetrischer Druck mit dem Xube

Aufgrund der Polymerisation mit einem Zwei-Wellenlängen-Photoinitiator wurde für den Druck von GelMA im Xube 7,5 % Triethanolamin (TEA) als Co-Initiator benötigt, sowie zur erhöhten Stabilität der Struktur 10 % Polyethylenglykoldiacrylat (PEGDA). Für einen Ansatz von 10 ml Drucklösung wurden 0,001 % XC577 in 1,0 g PEGDA gelöst. Anschließend wurden 0,75 g TEA untergemischt und 10 ml der 10%igen GelMA *High* Hydrogellösung hinzugegeben. Kleinere Partikel und ungelöster Photoinitiator wurden durch Filtration mit einem Spritzenfilter entfernt, um die optische Dichte zu verbessern. Jeweils 2 ml der Lösung wurden in Küvetten überführt und für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden die Hydrogelpolymere in den Küvetten bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  geliert. Die gewünschten Druckmodelle wurden mit Hilfe von Blender konstruiert und in Form einer stl-Datei in den Drucker eingegeben. Über einen im Xube integrierten Slicer konnten die Modelle systemintern für den Druck vorbereitet werden. Der Druck erfolgte mit einer Druckgeschwindigkeit von  $2 \text{ mm/min}$  und einer Strahlungsintensität von  $6 \text{ mW/mm}^2$ .

Dieselben Druckparameter wurden auch für den Druck der Modelle aus Urethanharz verwendet. Für das Harz wurde zunächst eine Stocklösung aus 335 mg Initiator XC471 in 0,5 ml CTFA und 59,2 g UDMA hergestellt. Zudem wurden 5,0 g Aerosil200 in 95 g UDMA dispergiert. Dann wurden 490 g UDMA mit 80 g der Nanopartikelstocklösung, 12 g der Photoinitiatorstocklösung und 24 g MDEA im SpeedMixer bei 2500 rpm für 3 min gemixt. Jeweils 2 ml des Gemischs wurden in Küvetten überführt und bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert, um die Luftblasen zu entfernen. Danach waren die Küvetten druckbereit.<sup>131</sup>

#### 5.2.4.3 DLP-Druck mit dem BIONOVA X

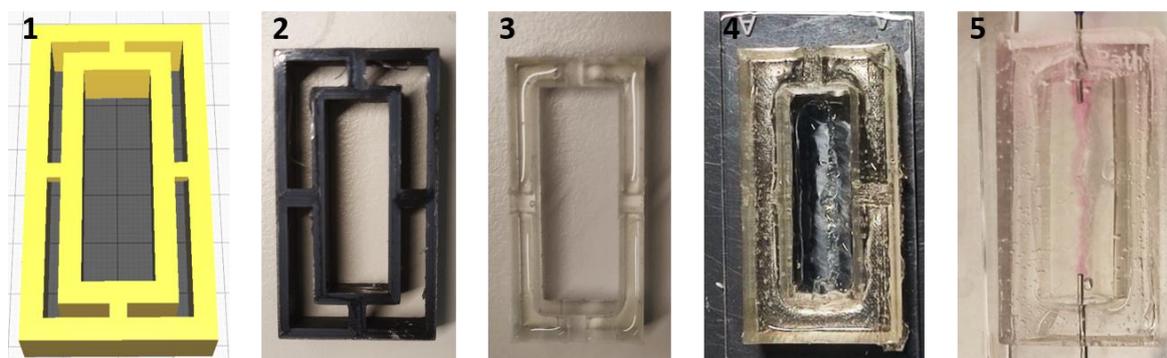
Für den Druck des Tumormodells wurde der DLP-Drucker BIONOVA X verwendet, um den zellbeladenen Tumor aus GelNB/GelS *High* zu drucken. Dazu wurde die GelNB/GelS-Lösung wie in Kapitel 5.2.3.2 beschrieben angesetzt. Ein Milliliter der Zelltinte wurde in ein *Well* einer adhäsiven 24-*Well* Platte gegeben und der passende Druckkopf in den Drucker eingesetzt. Über den integrierten Slicer konnte das Kuppelmodell für den Druck vorbereitet werden, wobei 50 Schnitte für das Modell gewählt wurden. Der Druck erfolgte bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , einer Intensität von  $8,8 \text{ mm/cm}^2$  und einer Druckgeschwindigkeit von  $0,05 \text{ mm/s}$ .

### 5.2.5 Fabrikation der hydrogelbasierten Chipsysteme

#### 5.2.5.1 Kanalstruktur durch Opfermaterial

Für die Fabrikation des hydrogelbasierten Chips mit Opferstruktur wurde zunächst mit CAD ein Modell für die Rahmengussform konstruiert. Mit Hilfe des Ultimaker 3 Extended wurde die Gussform aus PLA mit einem Infill von 50 % gedruckt. Etwa 3 g der PDMS-Komponenten Elastosil A

und B im Verhältnis 9:1 wurden in eine Gussform gefüllt, nachdem sie mit dem Hauschild SpeedMixer homogenisiert wurden. Die Aushärtung des PDMS erfolgte über Nacht bei 40 °C. Am nächsten Tag wurden die PDMS-Rahmen aus den Formen gelöst und gegebenenfalls für die Verwendung in der Zellkultur über Nacht mit UV-Licht sterilisiert. Um ein schnelles Austrocknen der Chips zu verhindern, wurden zudem Objektträger mit PDMS beschichtet und ebenfalls über Nacht ausgehärtet und anschließend sterilisiert. Pro Chip wurden 2 ml der Hydrogellösungen benötigt, welche jeweils wie in Kapitel 5.2.3 angesetzt wurden. Zunächst wurde 1 ml der Lösung in die PDMS-Form gegeben und unter dem Omnicure S2000 bei 500 mW/cm<sup>2</sup> für 30 s ausgehärtet. Ein Auslaufen der Polymerlösungen vor dem Aushärten wurde dabei durch einen PDMS-beschichteten Objektträger verhindert, welcher unter den Chip gelegt wurde. Anschließend wurde mit Hilfe des BioSpot BP die Kanalopferstruktur aus Gelatine gedruckt. Dazu wurde eine 5%ige Gelatinelösung in DPBS<sup>-/-</sup> bei 40 °C angesetzt, welche in eine 2,5 ml Inkjetspritze gefüllt und geliert wurde. Die Gelatine wurde vor dem Druck im BioSpot auf 25 °C temperiert und die Z-Höhe auf den Chip referenziert (Kapitel 5.2.4.1). Nach dem Druck der Kanäle auf die erste Hydrogelschicht wurden die Lücken neben und zwischen den Kanalstrukturen mit Polymerlösung aufgefüllt und ausgehärtet, um diese zu fixieren. Mit dem restlichen Hydrogel wurden die Chips bis zum Rand gefüllt und ebenfalls ausgehärtet. Um die Opferstruktur zu lösen, wurden die Chips für mindestens 2 h oder über Nacht im Inkubator bei 37 °C gelagert. Die flüssige Gelatine wurde über je eine Kanüle auf jeder Seite des Kanals mit Medium ausgespült und so der Chip für die Besiedelung mit den Endothelzellen vorbereitet. Die Herstellung der verzweigten Chips erfolgte analog. Die einzelnen Fabrikationsschritte der Chips sind in Abbildung 86 dargestellt.



**Abbildung 86:** Fabrikation des hydrogelbasierten Chips, dessen Kanal durch die Verwendung von Gelatine als Opferstruktur erzeugt wird. Von links nach rechts: 1) Das mit CAD erstellte Modell der Gussform; 2) aus PLA mit dem Ultimaker gedruckte Gussform; 3) PDMS-Rahmen aus der Gussform gelöst; 4) PDMS-Rahmen mit der ersten Hydrogelschicht und einem einfachen Gelatinekanal; 5) fertiger Chip mit zweiter Hydrogelschicht und durchgängigem Kanal.

Um den gesamten Chip extrusionsbasiert herzustellen, wurden beide Extruder des BioSpot BP verwendet. In den Extruder 1 wurde die jeweilige Hydrogellösung (3 ml Inkjet Spritze) eingesetzt, in Extruder 2 die Gelatine (2,5 ml Inkjetspritze). Nacheinander wurden fünf Schichten Hydrogellösung für das Fundament in den PDMS-Rahmen gedruckt und ausgehärtet. Dann wurde mit dem Extruder 2 der Gelatinekanal extrudiert, welcher durch den Druck der Seiten mit Extruder 1 anschließend fixiert wurde. Danach erfolgte der Druck des Chipdeckels, welcher ebenfalls aus fünf Schichten bestand. Das Herauslösen des Kanals erfolgte wie schon oben beschrieben.

Sowohl die gegossenen als auch die extrudierten Chips wurden zur Lagerung mit etwa 1 ml Medium bedeckt, mit einem weiteren PDMS-beschichteten Objektträger abgedeckt und in einer Petrischale gelagert.

#### 5.2.5.2 Diffusionsexperimente

Um die Diffusionseigenschaften der einzelnen und verzweigten Kanalstrukturen zu untersuchen, wurden die Chips nach dem in Kapitel 5.2.5.3 beschriebenen Gussverfahren hergestellt. Nach Freilegung der Kanäle wurden diese mit einer Lösung aus 1 M Methylenblau in H<sub>2</sub>O befüllt und bei 37 °C inkubiert. Alle 5 min wurde mit Hilfe von Bildern die Diffusion des Farbstoffs aus den Kanälen heraus in die Hydrogelkompartimente hinein dokumentiert.

#### 5.2.5.3 Xube Chips

Zunächst wurden die Maße der Gussform an die volumetrisch gedruckten Hydrogelchips angepasst und die PDMS-Rahmen wie im vorherigen Abschnitt beschrieben hergestellt. Die unterschiedlichen Kanalstrukturen der Chips wurden mit Blender konstruiert und die erhaltenen stl-Dateien mit dem Xube gesliced. Die GelMA-Tinte wurde nach Kapitel 5.2.4.2 angesetzt und in den Küvetten gefüllt. Nach dem Druck der Chips wurde das unpolymerisierte GelMA erwärmt, sodass die Chipstrukturen aus den Küvetten herausgeholt werden konnten. Anschließend wurden die Kanäle mit Medium durchgespült und die Chips in die PDMS-Rahmen gelegt. Ebenso wie die Chips mit Opferstruktur wurden die volumetrischen Chips zwischen zwei PDMS-beschichteten Objektträgern in einer Petrischale gelagert.

### 5.2.6 Allgemeine Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei unter Standardbedingungen: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und gesättigte Luftfeuchtigkeit.

#### 5.2.6.1 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Sowohl die primären als auch die Krebszellen wurden bis zu ihrer Konfluenz in ihren zellspezifischen Medien unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend zur langfristigen Lagerung bei -196 °C in Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden die konfluenten Zellen mit 10 ml DPBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA unter Standardbedingungen von den Zellkulturflaschen abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkonzentration der erhaltenen Suspension wurde mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde das Medium über dem Zellpellet abgenommen und die Zellen so in Einfriermedium resuspendiert, dass eine Zellkonzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml erhalten wurde. Je 1 ml der Suspension wurde in ein Kryovial überführt und für mindestens 90 min in einer MisterFrosty® Kryobox bei -80 °C eingefroren, bevor die Zellen im Stickstofftank eingelagert werden konnten. Zum Auftauen der Zellen wurden in eine frische Zellkulturflasche 10 ml des zellspezifischen Mediums vorgelegt und das eingefrorene Vial steril unter der Sicherheitswerkbank geöffnet, um möglichen eingedrungenen Stickstoff abdampfen zu lassen. Anschließend wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Fibroblasten und Krebszellen konnten anschließend in die Falsche mit frischem Medium überführt werden, wobei nach 24 h ein Medienwechsel durchgeführt wurde, um das

restliche DMSO zu entfernen. Die Endothelzellen hingegen wurden zunächst zentrifugiert (1200 rpm, 3 min), in Medium resuspendiert und dann in eine frische Flasche gegeben.

### 5.2.6.2 Kultivierung der Zellen

#### HUVEC-GFP

Die HUVEC-GFP wurden in beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Zellflaschen kultiviert. Für die Beschichtung wurden 100 µl Kollagen I (Rat Tail) in 4,9 ml DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt und in die Flasche gegeben. Die Beschichtung erfolgte für mindestens 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Beschichtungslösung abgenommen und bis zur nächsten Beschichtung bei 4 °C gelagert. Zudem konnten die fertig beschichteten Flaschen mit DPBS<sup>-/-</sup> ebenfalls bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert werden (maximal zwei Wochen). Bei Auftauen der HUVEC-GFP wurde wie oben beschrieben vorgegangen. Die Kultivierung erfolgte in EGM-GFP unter Standardbedingungen, wobei an jedem zweiten Tag das Medium bis zur Konfluenz gewechselt wurde. Die konfluenten Zellen wurden mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und für eine Minute bei Raumtemperatur mit 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA abgelöst. Mit 4 ml Trypsininhibitor (10 % FCS in DPBS<sup>-/-</sup>) wurde die Reaktion gestoppt und die Suspension mit 5 ml Zellmedium verdünnt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben, für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauerzählkammer konnte die Zellkonzentration bestimmt und die gewünschte Zellzahl für die Experimente entnommen werden. Die restlichen Zellen (min. 0,5\*10<sup>6</sup>) wurden zur Weiterkultivierung mit 10 ml Medium in eine beschichtete Flasche gegeben. Mit jedem Ablösen der Zellen von den Flaschen erhöhte sich die Passage der HUVEC-GFP um eine.

#### NHDF

Die Hautfibroblasten wurden unter Standardbedingungen in 175 cm<sup>2</sup> Flaschen in DMEM kultiviert. Bei erreichter Konfluenz der Zellen wurden diese mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 2 ml 0,25 % Trypsin-EDTA für 3 min im Inkubator trypsinisiert. Die Reaktion wurde mit 8 ml DMEM abgestoppt und die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Die nicht verwendeten Zellen wurden in 20 ml Medium bis zur erneuten Konfluenz kultiviert, wobei das Medium nach Bedarf ausgetauscht wurde. Auch bei den NHDF wurde die Passage nach dem erneuten Aussäen um eine erhöht.

#### HepG2/HeLa

Zur Kultivierung der Leberkrebs- und Gebärmutterhalskrebszellen wurden 75 cm<sup>2</sup> Flaschen verwendet. Zudem erfolgte die Kultivierung unter Standardbedingungen in DMEM, wobei die Zellen etwa zwei Mal pro Woche passagiert wurden. Dazu wurden die Zellen wie bereits oben beschrieben mit 10 ml DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen, mit 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA bei 37 °C abgelöst und die Reaktion mit 9 ml DMEM gestoppt. 1 ml der Suspension wurde zusammen mit 10 ml Medium in eine Flasche zur weiteren Kultivierung gegeben. Überschüssige Zellen wurden entsorgt.

### 5.2.6.3 Wachstumskurve Zellkulturmedium

Um ein geeignetes Medium für die Co-Kultivierung der unterschiedlichen Zellkulturen zu bestimmen, wurden Wachstumskurven der drei Zellarten in verschiedenen Medien aufgenommen. Dazu wurden die Zellen jeweils wie oben beschrieben von Flaschen abgelöst, die Zellzahl bestimmt und pro *Well* einer 96-*Well* Platte wurden 1\*10<sup>4</sup> Zellen ausgesät. In Triplikaten wurden die Zellen

jeweils in DMEM, in EGM-GFP und in einer 1:1 Mischung der beiden Medien über einen Zeitraum von sieben Tagen kultiviert. Dabei wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Um das Wachstumsverhalten der Zellen in den unterschiedlichen Medien zu verfolgen, wurde jedes der Triplikate fünf Mal angesetzt- je ein Triplikat für Tag 1, 2, 3, 4 und 7. An diesen Tagen wurde von jeder Bedingung ein Triplikat mit 100 µl DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit 100 µl 0,25 % Trypsin-EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit weiteren 100 µl DPBS<sup>-/-</sup> verdünnt und die Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. So wurde die Zellzahl an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 nach Aussäen der Zellen für je 200 µl bestimmt und das Ergebnis auf 1 ml hochgerechnet. Die Zellkonzentrationen wurden anschließend in einem Diagramm aufgetragen, um das Wachstumsverhalten in unterschiedlichen Medien vergleichen zu können.

#### 5.2.6.4 Sphäroide

Zur Generierung der HepG2- und HUVEC-Sphäroide wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, Agaroseplatten und das *Hanging Drop* Verfahren. Die HepG2-Sphäroide wurden dabei ausschließlich mit Agaroseplatten hergestellt, während für die HUVEC-Sphäroide beide Methoden getestet wurden.

##### Agarose

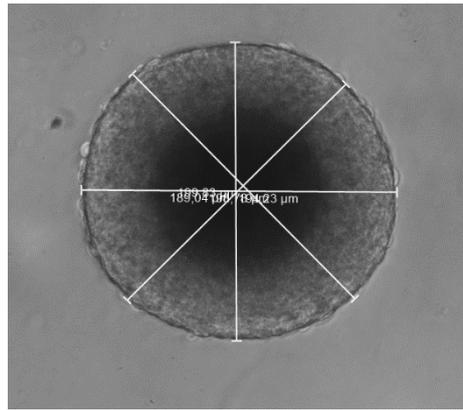
Für die Herstellung der Agaroseplatten wurde eine 1,5%ige Lösung hergestellt, indem 1,5 g Agarose in 100 ml DPBS<sup>-/-</sup> in der Mikrowelle erhitzt wurden, bis sich diese vollständig aufgelöst hatte. In die *Wells* einer 96-*Well* Platte wurden 40 µl der warmen Agaroselösung gegeben und für mindestens 15 min bis zur Aushärtung abgekühlt. Die Platten konnten bedeckt mit DPBS<sup>-/-</sup> bis zu zwei Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Zur Generierung der Sphäroide wurden die entsprechenden Zellen abgelöst (Kapitel 5.2.6.2), die Zellzahl bestimmt und die Suspension nach gewünschter Sphäroidgröße verdünnt. Es wurden Sphäroide mit 5000, 4000 und 3000 Zellen hergestellt. Je 40 µl der Zellsuspensionen wurden in ein *Well* gegeben und in der Platte über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag konnten die Sphäroide geerntet werden.

##### *Hanging Drop*

Die HUVEC-Sphäroide wurden zusätzlich mit dem *Hanging Drop* Verfahren erzeugt, wofür zunächst ein methylcellulosehaltiges Medium hergestellt wurde.<sup>248</sup> 3,0 g Methylcellulose wurden autoklaviert und in 125 ml warmem EGM-GFP (60 °C) für 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung wurden weitere 125 ml Medium gegeben und über Nacht bei 4 °C gerührt. Die Lösung wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine frische Flasche gefüllt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Sphäroide wurden die HUVEC-GFP wie oben beschrieben abgelöst, die Zellzahl bestimmt und in einem Gemisch aus EGM-GFP und dem Methylcellulosemedium (4:1) verdünnt. 12 µl Tropfen wurden pro *Well* auf den Deckel einer 96-*Well* Platte gegeben und die untere Hälfte mit DPBS<sup>-/-</sup> befüllt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre konnten die HUVEC-Sphäroide geerntet werden.

#### 5.2.6.5 Wachstumskurve der Sphäroide

Das Wachstumsverhalten der HepG2- und HUVEC-Sphäroide wurde untersucht, indem von den Sphäroiden an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 Bilder mit dem Mikroskop aufgenommen und ihre Durchmesser bestimmt wurden. Die Durchmesser wurden dabei an 4 verschiedenen Stellen gemessen und die Werte anschließend gemittelt. Dies ist in Abbildung 87 zu sehen.



**Abbildung 87: Bestimmung des Durchmessers am Beispiel eines HepG2-Sphäroids an Tag 1.** Es wurden vier Durchmesser an verschiedenen Stellen bestimmt und die Werte am Ende gemittelt.

Die Ergebnisse wurden schließlich als Wachstumskurve in einem Diagramm aufgetragen. Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens wurden die Sphäroide zudem in den Hydrogelen eingebettet. Dazu wurden die Hydrogellösungen wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben hergestellt. 100  $\mu\text{l}$  der Lösungen wurden in die *Wells* einer 96-Well Platte pipettiert. Die Sphäroide wurden mit einer Pipette aufgenommen, wobei die Pipettenspitze abgeschnitten wurde, um die Sphäroide nicht zu zerstören. Je ein Sphäroid wurde pro *Well* in die Hydrogellösung gegeben und für 30 s unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) ausgehärtet. Wie schon oben beschrieben wurden die Durchmesser auch für diese Sphäroide bestimmt und in einer Wachstumskurve aufgetragen. Bei allen Wachstumskurven wurde der Durchmesser zudem in Triplikaten bestimmt.

#### 5.2.6.6 PrestoBlue-Assay der Sphäroide

Neben dem Wachstumsverhalten der im Hydrogel eingebetteten Sphäroide wurde zudem das Proliferationsverhalten in 3D mit Hilfe eines PrestoBlue-Assays untersucht. Pro Hydrogel und Tag (1, 2, 3, 4 und 7) wurden die Sphäroide wie oben beschrieben in Triplikaten eingebettet und jeweils eine Kontrolle ohne Sphäroid gemacht. Es erfolgte jeden zweiten Tag ein Medienwechsel. An den Tagen 1, 2, 3, 4 und 7 wurde das PrestoBlue-Reagenz 1:9 in dem zellspezifischen Medium verdünnt und auf jede Probe wurden 100  $\mu\text{l}$  der Mischung gegeben. Die Zellen wurden für 3 h mit dem PrestoBlue-Reagenz unter Standardbedingungen inkubiert, bevor die Auswertung mit dem Mikroplattenleser SpectraMax iD3 (Ex/Em.: 560 nm/600 nm) erfolgte.

#### 5.2.6.7 Sproutingassay der HUVEC-GFP-Sphäroide

Durch die Zugabe von VEGF und FGF wurde das Sproutingverhalten der HUVEC-Sphäroide in einer dreidimensionalen Umgebung untersucht. Dazu wurden die HUVEC-Sphäroide nach dem *Hanging Drop* Protokoll (Kapitel 5.2.6.4) angesetzt und nach 24 h in die Hydrogele eingebettet. Die Komponenten der Hydrogele sind Kapitel 5.2.3 zu entnehmen. 100  $\mu\text{l}$  der unpolymerisierten Hydrogele wurden in die *Wells* einer 96-Well Platte gegeben und je ein Sphäroid in die Gele gesetzt. Die Aushärtung erfolgte für 30 s unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ). Pro Hydrogelart wurde je eine unbehandelte Kontrolle angesetzt sowie Sphäroide, die nur mit 50 ng/ml VEGF, nur mit 25 ng/ml FGF und mit beiden Wachstumsfaktoren (50 ng/ml VEGF und 25 ng/ml FGF) behandelt wurden. Das Sproutingverhalten wurde mit dem Lichtmikroskop festgehalten. Zur Auswertung des Versuchs wurde die Anzahl der Sprouts wie auch die kumulative Länge der Ausläufer von je drei Sphäroiden bestimmt, um die unterschiedlichen Bedingungen vergleichen zu können.

### 5.2.6.8 Sproutingassay mit NHDF

HUVEC-GFP-Sphäroide wurden anhand des *Hanging Drop* Protokolls (Kapitel 5.2.6.4) angesetzt und nach 24 h geerntet. Dazu wurden sie in eine Suspension aus Hydrogel (Kapitel 5.2.3) mit  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml gesetzt und bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  für 30 s ausgehärtet. Jede Hydrogelvariante wurde in Triplikaten angesetzt. Die Gele wurden mit  $200 \mu\text{l}$  EGM-GFP und  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF überschichtet. Die Auswertung der kumulativen Länge erfolgte ebenfalls über eine mikroskopische Auswertung.

## 5.2.7 Gewebemodelle

Um die passenden Kultivierungsbedingungen für die Induktion der Angiogenese der Endothelzellen zu ermitteln wurden verschiedene 3D-Kultivierungsmethoden verwendet. Nachführend wird die Herstellung und die genauen Bedingungen dieser Kulturen erläutert.

### 5.2.7.1 2,5D- und 3D-HUVEC-GFP-Gele

Um das Verhalten der HUVEC-GFP in und auf den Hydrogelen zu untersuchen, wurden die HUVEC dreidimensional in die Gele eingebettet oder bei den 2,5D-Gele auf den Oberflächen ausgesät. Dazu wurden die Hydrogele wie in Kapitel 5.2.3 angesetzt und die HUVEC-GFP-Zellsuspension wie in Kapitel 5.2.6.2 vorbereitet. Zur dreidimensionalen Einbettung der Zellen wurde beim Ansetzen der Hydrogellösungen das Medium durch die Zellsuspension ausgetauscht. Bei den 2,5D-Gelen hingegen wurde die Zellsuspension nach dem Aushärten auf die Gele gegeben. Die Kultivierung der Gele erfolgte in 8-Well ibidi Slides, wobei in jedem Well  $200 \mu\text{l}$  der Gellösung ausgehärtet wurden. Die Gele wurden mit nochmals  $200 \mu\text{l}$  Medium/Zellsuspension überschichtet. Die verwendeten Zellzahlen sind der nachfolgenden Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 17: Die für 3D- und 2,5D-HUVEC-GFP Hydrogele verwendeten Zellzahlen.

Gel	Zellzahl
3D	$5 \cdot 10^5$ Zellen/ml
2,5D	$5 \cdot 10^4$ Zellen/ml

### Lebend-Tot-Färbung

Zur Überprüfung der Zellviabilität in und auf den Gelen wurde eine Lebend-Tot-Färbung der Zellen durchgeführt. Dabei wurde die Viabilität über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Für Tag 1, 7 und 14 wurde je ein Gel angesetzt und die Färbung an dem jeweiligen Tag durchgeführt. Bei den Endothelzellen konnte durch die GFP-Expression der HUVEC auf einen Farbstoff für die lebenden Zellen verzichtet werden. Lediglich die toten Zellen wurden mit Propidiumiodid (PI) markiert.  $2,5 \mu\text{l}$  PI ( $0,02 \text{ mg/ml}$ ) wurden pro Gel mit  $250 \mu\text{l}$  Medium gemischt und die Gele mit dem Farbstoff für 30 min inkubiert. Die NHDF- und HepG2-Zellen wurden zusätzlich mit  $4 \mu\text{M}$  Calcein AM ( $1 \mu\text{l}$  auf  $250 \mu\text{l}$  Medium) markiert. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auswertung der Färbung am Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5. (GFP:  $\lambda_{\text{ex}} = 482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ , PI:  $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}650 \text{ nm}$ ; Calcein AM:  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$ )

### 5.2.7.2 Angiogenese in 3D- und 2,5D-Gelen

NHDF sekretieren den Wachstumsfaktor FGF, welcher ebenfalls eine Rolle bei der Angiogenese spielt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von NHDF in dem Gewebemodell getestet. Dazu wurden sowohl in das 3D- als auch in das 2,5D-HUVEC-Modell jeweils  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml eingebettet.

Die Herstellung der Gele erfolgte wie oben beschrieben (Kapitel 5.2.7.1), nur, dass beim Ansetzen der Gellösungen zum Medium  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml dazugegeben wurden. Die Zellzahlen der verwendeten HUVEC sind der Tabelle 17 zu entnehmen. Die Gele wurden mit 200  $\mu$ l EGM-GFP überschichtet und mit 50 ng/ml VEGF behandelt. Die Gele wurden für 21 Tage kultiviert, wobei jeden zweiten Tag ein Medienwechsel durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 (GFP:  $\lambda_{\text{ex}}$ = 482 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =500-550 nm).

### 5.2.7.3 Gradientengele

Da die Angiogenese *in-vivo* entlang eines VEGF-Gradienten erfolgt, sollte dieser im Gel nachgeahmt werden. Dazu wurde das Hydrogel aus drei verschiedenen Schichten gegossen, jede Schicht mit einer geringer werdenden VEGF-Konzentration. Um den Gradienten zu erzeugen, wurde das VEGF zudem nicht mit dem Medium auf das Gel gegeben, sondern unter die einzelnen Hydrogelschichten gemischt. Zudem wurden  $10 \cdot 10^5$  NHDF/ml in jeder Schicht ausgehärtet. Dadurch ergaben sich die folgenden Hydrogelzusammensetzungen (Tabelle 18):

Tabelle 18: Zusammensetzung und Konzentrationen der einzelnen Schichten der Gradientengele.

Schicht	VEGF Konzentration	Zusammensetzung Gel
<b>1. Schicht GelMA</b>	50 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelMA (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (10 %)</li> <li>• 10 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 37 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>
<b>1. Schicht GelNB/GelS</b>	50 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelS (5 %)</li> <li>• 25 <math>\mu</math>l GelN (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (1 %)</li> <li>• 10 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 12 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>
<b>2. Schicht GelMA</b>	25 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelMA (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (10 %)</li> <li>• 5 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 42 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>
<b>2. Schicht GelNB/GelS</b>	25 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelS (5 %)</li> <li>• 25 <math>\mu</math>l GelN (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (1 %)</li> <li>• 5 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 17 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>
<b>3. Schicht GelMA</b>	12,5 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelMA (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (10 %)</li> <li>• 2,5 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 44,5 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>
<b>3. Schicht GelNB/GelS</b>	12,5 ng/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu</math>l GelS (5 %)</li> <li>• 25 <math>\mu</math>l GelN (10 %)</li> <li>• 3 <math>\mu</math>l LAP (1 %)</li> <li>• 2,5 <math>\mu</math>l VEGF (500 ng/ml)</li> <li>• 19,5 <math>\mu</math>l EGM-GFP/NHDF Suspension</li> </ul>

Pro Schicht wurden 100  $\mu\text{l}$  Gellösung in ein *Well* eines 8-*Well* ibidi *Slides* gegeben und unter dem Omnicure S2000 (320-500 nm, 500 mW/cm<sup>2</sup>) für 30 s ausgehärtet. Begonnen wurde mit der 50 ng/ml Schicht, um einen ansteigenden Gradienten zu erhalten. Auf die letzte ausgehärtete Schicht wurden 200  $\mu\text{l}$  HUVEC-GFP-Zellsuspension gegeben mit einer Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml.

Für die Gele mit dreidimensional eingebetteten Hautfibroblasten wurde jeweils das Medium in der Gelzusammensetzung durch eine NHDF-Zellsuspension mit  $1 \cdot 10^4$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  ersetzt.

### 5.2.8 Besiedeln der Chips

Nach der erfolgreichen Etablierung der Chipfertigung wurden die Kanalstrukturen mit HUVEC besiedelt um das Endothel abzubilden. Das nachfolgende Kapitel befasst sich mit den Kultivierungsmethoden der Zellen in den Chipvarianten.

#### 5.2.8.1 Extrusionsbasierter Chip

Nachdem die Chips wie in Kapitel 5.2.4.1 angesetzt waren, wurde die Gelatine mit EGM-GFP aus den Kanälen gespült, um eine Kanalstruktur zu erzeugen, welche dann mit HUVEC-GFP besiedelt wurde. Dazu wurden die HUVEC-GFP abgelöst, die Zellzahl bestimmt und  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Kanal aus der Zelllösung entnommen. Die Zellen wurden in einem Falcontube zentrifugiert, der Medienüberstand abgenommen und die halbe Millionen Zellen wurden in 100  $\mu\text{l}$  EGM-GFP resuspendiert. Über zwei Kanülen wurde die Zellsuspension in die Kanalstrukturen gespritzt und über Nacht unter Standardbedingungen im Chip kultiviert. Nachdem die Zellen auf der einen Seite des Kanals angewachsen waren, wurden die Chips am nächsten Tag umgedreht und weitere 100  $\mu\text{l}$  mit einer halben Million HUVEC-GFP in den Kanal gegeben. Die Chips wurden wieder über Nacht inkubiert, damit die Zellen auch auf der anderen Seite des Kanals anwachsen konnten. Die Besiedelung der Kanäle wurde mit Hilfe von *Z-Stacks* (800  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$  Schritte) mit dem Leica Stellaris 5 bestätigt (GFP:  $\lambda_{\text{ex}} = 482$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500-550$  nm). Um ein Austrocknen der Chips zu verhindern, wurden sie zwischen zwei mit PDMS beschichteten Objektträgern gelagert und mit 1 ml EGM-GFP überschichtet. Die Kultivierung der Chips erfolgte für bis zu zehn Tagen, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde.

#### Behandlung mit VEGF

Um das Sprouting der HUVEC-GFP im Chip zu induzieren, wurden die Zellen mit VEGF behandelt. Dazu wurden in das Medium, mit welchem die Chips überschichtet wurden, 50 ng/ml VEGF zugegeben. Hierdurch entstand durch die Diffusion des Mediums in das Hydrogel hinein ein natürlicher Gradient im Chip. Bei den Medienwechseln alle zwei Tage wurde jeweils frisches VEGF hinzugegeben. Ein Sprouting konnte ab Tag 1 unter dem Mikroskop beobachtet werden.

#### Chips mit NHDF durch Gussverfahren

Die Fabrikation der Chips mit NHDF im Kompartiment erfolgte nach demselben Protokoll. Lediglich das Medium in der Biotintenzusammensetzung wurde auch hier wieder durch eine NHDF-Zellsuspension ersetzt. Dazu wurden die abgelösten Fibroblasten in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml Hydrogellösung unter das jeweilige Volumen EGM-GFP gemischt. Die fertigen Chips wurden ebenfalls alle zwei Tage mit VEGF-Medium behandelt und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet.

### Extrusionsdruck der NHDF

Für den Druck der NHDF mit dem BioSpot BP wurde die Biotinten wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben angesetzt und mit  $2,5 \cdot 10^6$  NHDF/ml gemischt. Die Tinte wurde in eine Druckerkartusche gefüllt und bei 4 °C geliert. Anschließend wurde die Tinte im BioSpot BP auf 21 °C temperiert, woraufhin der Druck einer Gitterstruktur gestartet werden konnte. Die Gitterstruktur wurde mit Hilfe von vier Schichten gedruckt, welche einzeln nach dem Druck für 30 s bei  $500 \text{ mW/cm}^2$  ausgehärtet wurden. Die ausgehärteten Strukturen wurden in DMEM eingelegt und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach einem, sieben und 14 Tagen wurden die Strukturen einer Lebend-Tot-Färbung mit 0,02 mg/ml PI und 4  $\mu\text{M}$  Calcein AM unterzogen. Die Auswertung erfolgte am Leica Stellaris 5 (PI: ,  $\lambda_{\text{ex}}=532 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=550\text{-}650 \text{ nm}$ ; Calcein AM: ,  $\lambda_{\text{ex}}= 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500\text{-}550 \text{ nm}$ ).

### 5.2.8.2 Xolographie: Charakterisierung der GelMA High/PEGDA-Tinte

#### MTT-Assay

Um die Eignung der GelMA High/PEGDA-Hydrogele als Biotinte für den volumetrischen Druck zu validieren, wurden zunächst alle Komponenten einem Toxizitätsassay mit MTT unterzogen. Getestet wurden der Photoinitiator XC577, der Co-Initiator TEA und PEGDA in den unten aufgeführten Konzentrationen(Tabelle 19).

Tabelle 19: Getestete Konzentrationen von XC577, TEA und PEGDA.

Substanz	Konzentrationen
Photoinitiator XC577	0,01 %
	0,015 %
	0,025 %
	0,05 %
	0,075 %
	0,1 %
TEA/ PEGDA	0,5 %
	1,0 %
	2,5 %
	5,0 %
	10,0 %
	15,0 %
	20,0 %

Für die MTT-Tests wurden HeLa-Zellen abgelöst, gezählt und mit DMEM auf eine Konzentration von  $10 \cdot 10^4$  Zellen/ml verdünnt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zelllösung wurden pro *Well* in eine 96-*Well* Platte pipettiert, sodass pro *Well*  $1 \cdot 10^4$  Zellen ausgesät wurden. Die Platten wurden über Nacht bis zur Adhäsion der Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen. Für die Verdünnung der Substanzen wurde DMEM verwendet und pro *Well* wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  der Lösungen behandelt. Alle Substanzen wurden in Triplikaten getestet und auf jeder Platte wurden je drei Lebend- und Totkontrollen gemacht, bei denen am Tag der Behandlung lediglich das Medium gewechselt wurde. Nach 72 h wurden die Substanzen abgesaugt, die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  DPBS<sup>-/-</sup> gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Dann wurden die Totkontrollen mit 5  $\mu\text{l}$  TritonX 100 (20 % in H<sub>2</sub>O) abgetötet. Anschließend wurden in

jedes *Well* 15 µl von dem Reagenz MTT gegeben und die Platten für weitere 4 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100 µl/*Well Stop Solution* gestoppt und die Zellen wurden für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Absorptionsmessungen der MTT-Assays mit dem Mikroplattenleser SpectraMax iD3 bei 595 nm durchgeführt werden.

Für den zeitabhängigen MTT-Assay von PEGDA und TEA wurden die nachfolgenden Konzentrationen und Behandlungsdauern gewählt:

Tabelle 20: Getestete Konzentrationen und Behandlungsdauern von TEA und PEGDA im zeitabhängigen MTT-Assay.

Substanz	Konzentrationen	Behandlungszeiten
PEGDA	1 %, 15 %, 30 %	1 min, 10 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h
TEA	1 %, 15 %, 30 %	1 min, 10 min, 30 min, 1 h, 24 h, 72 h

Der Test wurde wie zuvor beschrieben angesetzt nur, dass nach Ablauf der Behandlungszeiten die Substanzen abgenommen und die Zellen mit frischem Medium versetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt 72 h wurden die Zellen mit 15 µl MTT behandelt und für 4 h inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion und dem Auflösen der Formazankristalle wurde die Absorption mit dem Mikroplattenleser SpectraMax iD3 bei 595 nm gemessen.

### Adhäsionsassay

In einem weiteren Experiment wurden die Adhäsionseigenschaften der GelMA *High*/PEGDA-Hydrogele untersucht. Dazu wurden mit dem Xube rechteckige Platten (8 mm x 8 mm x 3 mm) gedruckt. Dafür wurde das Protokoll aus Kapitel 5.2.4.2 verwendet. Nach dem Druck wurden die Strukturen aus den Küvetten entnommen und in eine 12-*Well* Platte überführt. Anschließend wurde je 1 ml von einer Zelllösung aus  $1 \cdot 10^6$  HUVEC-GFP/ml zu den Strukturen gegeben. Die Hydrogelstrukturen wurden für eine Woche unter Standardbedingungen kultiviert und die Zelladhäsion mit dem Mikroskop Leica DMI LED verfolgt.

### Druck mit Zellen

Hinsichtlich der additiven Fertigung von komplexeren Kanalstrukturen wurde zudem getestet, ob sich die Hydrogelzusammensetzung aus GelMA *High* und PEGDA auch dazu eignet, zusammen mit Zellen gedruckt zu werden. Dazu wurden verschiedene Zellkonzentrationen ( $0,25 \cdot 10^6$ ,  $0,5 \cdot 10^6$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml) nach der Filtration unter die Gele gemischt und auf die Zentrifugation verzichtet. Ebenso wurde die Zeit bei 4 °C bis zur Gelierung möglichst kurzgehalten. Der Druck erfolgte bei

einer Druckgeschwindigkeit von 2 mm/min und einer Strahlungsintensität von 6 mW/mm<sup>2</sup>. Zur Auswertung wurden die Zellen nach 24 h mit 4 µM Calcein AM und 0,02 mg/ml Propidiumiodid für eine Lebend-Tot-Färbung behandelt (PI: ,  $\lambda_{\text{ex}}=532$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=550-650$  nm; Calcein AM: ,  $\lambda_{\text{ex}}=488$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm).

### 5.2.8.3 Besiedlung der Xube Chips

Mit Hilfe des Xube konnten drei unterschiedliche Kanalstrukturen in den GelMA *High*/PEGDA-Hydrogelchips gedruckt werden. Nach dem Druck wurde die unpolymersierte Hydrogellösung mit EGM-GFP aus den Kanälen gespült, bevor diese mit HUVEC-GFP besiedelt werden konnten. Die Chips wurden in die PDMS-Rahmen gelegt und die HUVEC-Zelllösung mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml vorbereitet. Über zwei Kanülen wurden etwa 50 µl der Suspension in die Kanäle gespritzt. Die Chips wurden ebenfalls mit Medium überschichtet und zwischen zwei mit PDMS beschichteten Objektträgern in einer Petrischale gelagert. Nach der Inkubation über Nacht wurde die Zelladhäsion in den unterschiedlichen Kanalstrukturen mit dem Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 ausgewertet (GFP:  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm).

## 5.2.9 Tumormodelle

Nachfolgend werden die Methoden zur Etablierung eines Tumor-Angiogenese-Modells, sowie der Multikomponentendruck eingehend beschrieben.

### 5.2.9.1 Sproutingassay

Zur Untersuchung der Angiogenese-induktiven Eigenschaften der HepG2-Sphäroide wurden diese zusammen mit HUVEC-Sphäroiden in den Hydrogelen eingebettet. Die Herstellung sowohl der Hydrogellösungen als auch der beiden Sphäroidarten erfolgte nach den zuvor beschriebenen Protokollen (Kapitel 5.2.3 und Kapitel 5.2.5.4). Dann wurde je ein HUVEC-Sphäroid mit drei HepG2-Sphäroiden in 100 µl Hydrogel eingebettet. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde das Sprouting der HUVEC-Sphäroide unter dem Mikroskop beobachtet, wobei an jedem zweiten Tag das Medium gewechselt wurde. Die Kultivierung erfolgte in EGM-GFP unter den Standardbedingungen. Zur Auswertung des Versuchs wurde in Triplikaten die kumulative Länge der Sphäroidausläufer bestimmt.

### 5.2.9.2 Tumormodell im Chip

Das Tumormodell im Chip basierte auf dem extrusionsbasierten Chip mit Gelatineopferstruktur. Während der Fabrikation des Chips wurden pro Milliliter Hydrogel 24 HepG2-Sphäroide untergemischt. Die restliche Vorgehensweise entsprach dem Protokoll aus Kapitel 5.2.4.1. Nachdem die Opferstruktur aus Gelatine über Nacht im Inkubator verflüssigt wurde, konnte diese mit EGM-GFP ausgewaschen und der Kanal zunächst von einer Seite mit  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen ausgekleidet werden. Am nächsten Tag wurde der Chip um 180° gedreht und mit derselben Zellzahl auf der anderen Seite besiedelt. Dasselbe Modell wurde zudem auch mit NHDF und Tumoroide hergestellt. Dazu wurden unter das Hydrogel zu den Sphäroiden auch noch  $5 \cdot 10^5$  NHDF/ml gemischt. Ein Medienwechsel wurde alle zwei Tage gemacht und die Änderungen im Chip mit dem Leica Stellaris 5 festgehalten (GFP:  $\lambda_{\text{ex}}=482$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=500-550$  nm).

### 5.2.9.3 Multikomponentenchip

Für den Multikomponentenchip wurden zunächst  $6 \cdot 10^6$  HepG2 mit  $10 \mu\text{M}$  CellTracker Red behandelt und dann für den Druck mit dem DLP unter  $1 \text{ ml}$   $5\%$ -iges GelNB/GelS *High* gemischt (Kapitel 5.2.3). In einer adhäsiven *24-Well* Zellkulturplatte mit Glasboden erfolgte der Druck der Kuppelstruktur mit dem BIONOVA X bei  $37^\circ\text{C}$ , einer Intensität von  $8,8 \text{ mm/cm}^2$  und einer Druckgeschwindigkeit von  $0,05 \text{ mm/cm}^2$ . Parallel wurde die GelMA *High*/PEGDA Biotinte für den Xube angesetzt (Kapitel 5.2.4.2) und bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt, bis sich die Viskosität der Tinte erhöht hatte. Anschließend wurde die HepG2-Kuppel in das Hydrogel reingesetzt und die Tinte bei  $4^\circ\text{C}$  vollständig geliert. Dann erfolgte der Druck der Chipplattform im Xube mit einer Druckgeschwindigkeit von  $2 \text{ mm/min}$  und einer Strahlungsintensität von  $6 \text{ mW/mm}^2$ . Der Kanal des gedruckten Chips wurde mit EGM-GFP durchflutet und mit  $1 \cdot 10^6$  HUVEC über Nacht besiedelt. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung der Chips mit dem Leica Stellaris 5 (GFP:  $\lambda_{\text{ex}}=482 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=500\text{-}550 \text{ nm}$ , CellTracker™Red:  $\lambda_{\text{ex}}=577 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=602 \text{ nm}$ ).

### 5.2.10 Wirkstoffscreening

Sorafenib ist ein Angiogeneseinhibitor, welcher auch als Krebstherapeutikum eingesetzt wird. Die Methoden zur Untersuchung seiner Wirksamkeit anhand des etablierten Tumormodells werden in diesem Kapitel beschrieben.

#### 5.2.10.1 MTT-Assay Sorafenib Tosylat

Um toxische Nebenwirkungen des Angiogenese-Inhibitors Sorafenib auszuschließen, wurde sowohl mit den HepG2-Zellen als auch mit den HUVEC-GFP ein MTT-Test durchgeführt. Pro *Well* einer *96-Well* Platte wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2, beziehungsweise HUVEC-GFP ausgesät. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Zellen mit verschiedenen Sorafenib-Konzentrationen ( $0,5$ ,  $1$ ,  $2,5$ ,  $5$ ,  $7,5$ , und  $10 \mu\text{M}$ ) behandelt. Bei den Lebend- und Totkontrollen wurde ein Medienwechsel gemacht. Alle Proben wurden in Triplikaten behandelt. Nach  $72 \text{ h}$  Inkubationszeit unter Standardbedingungen wurden die Zellen mit  $15 \mu\text{l}$  des MTT-Reagenzes versetzt, für  $4 \text{ h}$  inkubiert und die Reaktion schließlich mit  $100 \mu\text{l}$  *Stop Solution* abgestoppt. Die Absorption wurde am nächsten Tag mit dem Mikroplattenleser SpectraMax iD3 bei  $595 \text{ nm}$  gemessen.

#### 5.2.10.2 Wirkstoffscreening Sorafenib Tosylat

Zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentration des Angiogenese-Inhibitors wurden HUVEC-Sphäroide mit der *Hanging Drop* Methode angesetzt, geerntet und in je  $100 \mu\text{l}$  Hydrogel eingebettet (Kapitel 5.2.3). Als Kontrolle dienten Sphäroide welche nur mit  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF versetzt wurden, die Proben selber wurden sofort nach dem Einbetten mit  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF und drei unterschiedlichen Konzentrationen Sorafenib behandelt. Verwendet wurden die Konzentrationen  $1$ ,  $2,5$  und  $5 \mu\text{M}$  Sorafenib Tosylat in DMSO/EGM-GFP. Die Auswertung der Behandlung erfolgte an Tag 7 der Kultivierung, indem in Triplikaten die kumulativen Längen der Ausläufer bestimmt wurden. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen und mit einem Medienwechsel alle zwei Tage.

#### 5.2.10.3 Wirkstoffscreening im Chip

Das Wirkstoffscreening von Sorafenib erfolgte im Tumormodell-Chip, welcher anhand des Protokolls aus Kapitel 5.2.9.2 hergestellt wurde. Nach der beidseitigen Besiedelung der Kanäle mit je  $0,5 \cdot 10^6$  HUVEC wurden die Chips mit jeweils  $1 \text{ ml}$  Medium überschichtet. Während das Medium des Kontrollchips  $50 \text{ ng/ml}$  VEGF enthielt, wurde das Medium des anderen Chips sowohl mit

50 ng/ml VEGF als auch 5  $\mu$ M Sorafenib versetzt. Während der Kultivierung der Tumormodelle wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt, wobei jedes Mal auch frisches VEGF und Sorafenib zugegeben wurde. Nach einer Woche Inkubationszeit wurde die Angiogenese in den Tumormodellen mikroskopisch mit dem Leica Stellaris 5 verglichen (GFP:  $\lambda_{\text{ex}}$ = 482 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ =500-550 nm).

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
AK	Arbeitskreis
Äq	Äquivalente
B. Sc.	Bachelor of Science
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTFA	
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
Dr.	Doktorgrad
EBM	Endothelial Basal Medium
EDC-HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Engl.: Epidermal Growth Factor; epidermaler Wachstumsfaktor
Em.	Eng.: Emission; Emissionswellenlänge
Engl.	Englisch
Ex.	Engl.: Excitation; Anregungswellenlänge
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Engl.: Fibroblast Growth Factor; Fibroblasten Wachstumsfaktor
g	Gramm
GelMA	Methacrylat-funktionalisierte Gelatine
GelN	Norbornen-funktionalisierte Gelatine
GelS	Thiol-funktionalisierte Gelatine
GFP	Engl.: Green Fluorescent Protein; Grün fluoreszierendes Protein
HepG2	Immortalisierte Zelllinie aus einem hepatozellulärem Karzinom
HUVEC	Engl.: Human umbilical vein endothelial cells; Endothelzellen aus der Nabelschnur
HUVEC-GFP	GFP exprimierende Nabelschnurendothelzellen
kDa	Kilodalton

KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50 %
M. Sc.	Master of Science
max.	maximal
MES	2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure
min	Minute
min.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
mW	Milliwatt
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid
NHDF	Engl.: Normal Human Dermal Fibroblast; humane Hautfibroblasten
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P/S	Penicillin/Streptomycin
PEGDA	Polyethylenglykoldiacrylat
pH	Potenzial des Wasserstoffs
PI	Propidiumiodid
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
rpm	Engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
UV	Ultraviolett
VEGF	Engl.: Vascular Endothelial Growth Factor; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-R	VEGF Rezeptor
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewichtsanteil

## 7 Literaturverzeichnis

1. Langreth, R. & Waldholz, M. New era of personalized medicine: targeting drugs for each unique genetic profile. *The oncologist* **4**, 426–427 (1999).
2. Jørgensen, J. T. Twenty Years with Personalized Medicine: Past, Present, and Future of Individualized Pharmacotherapy. *The oncologist* **24**, e432-e440; 10.1634/theoncologist.2019-0054 (2019).
3. Pickett, B. W., Faulkner, L. C. & Voss, J. L. Effect of season on some characteristics of stallion semen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 25–28 (1975).
4. Abrahams, E. & Silver, M. The case for personalized medicine. *Journal of diabetes science and technology* **3**, 680–684; 10.1177/193229680900300411 (2009).
5. dkfz. Deutsches Krebsforschungszentrum. Personalisierte Medizin bei Krebs. Präzisionsonkologie: Wer, wann und wo? (2022).
6. Shi, R., Huang, Y., Ma, C., Wu, C. & Tian, W. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. *Frontiers of medicine* **13**, 160–188; 10.1007/s11684-018-0629-9 (2019).
7. Current Applications of Tissue Engineering in Biomedicine. *J Biochip Tissue chip* **s2**; 10.4172/2153-0777.S2-004 (2015).
8. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 1917–1920; 10.1126/science.1151526 (2007).
9. Osaki, T., Sivathanu, V. & Kamm, R. D. Vascularized microfluidic organ-chips for drug screening, disease models and tissue engineering. *Current opinion in biotechnology* **52**, 116–123; 10.1016/j.copbio.2018.03.011 (2018).
10. Macchiarini, P. *et al.* Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet (London, England)* **372**, 2023–2030; 10.1016/S0140-6736(08)61598-6 (2008).
11. Griffith, L. G. & Naughton, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science (New York, N.Y.)* **295**, 1009–1014; 10.1126/science.1069210 (2002).
12. Lewis, A. *et al.* Organ donation in the US and Europe: The supply vs demand imbalance. *Transplantation reviews (Orlando, Fla.)* **35**, 100585; 10.1016/j.trre.2020.100585 (2021).
13. Parihar, A. *et al.* 3D Printing: Advancement in Biogenerative Engineering to Combat Shortage of Organs and Bioapplicable Materials. *Regenerative engineering and translational medicine* **8**, 173–199; 10.1007/s40883-021-00219-w (2022).
14. Hasan, A. *Tissue engineering for artificial organs. Regenerative medicine, smart diagnostics and personalized medicine* (Wiley-VCH, Weinheim, 2017).
15. 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).
16. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 920–926; 10.1126/science.8493529 (1993).

17. Ferreira, L. P., Gaspar, V. M. & Mano, J. F. Design of spherically structured 3D in vitro tumor models -Advances and prospects. *Acta biomaterialia* **75**, 11–34; 10.1016/j.actbio.2018.05.034 (2018).
18. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Experimental Biology and Medicine* **4**, 140–143; 10.3181/00379727-4-98 (1906).
19. Breslin, S. & O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug discovery today* **18**, 240–249; 10.1016/j.drudis.2012.10.003 (2013).
20. Costa, E. C. *et al.* 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnology advances* **34**, 1427–1441; 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002 (2016).
21. Bissell, M. J., Rizki, A. & Mian, I. S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current opinion in cell biology* **15**, 753–762; 10.1016/j.ceb.2003.10.016 (2003).
22. Weaver, V. M. *et al.* Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *The Journal of cell biology* **137**, 231–245; 10.1083/jcb.137.1.231 (1997).
23. 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).
24. Zimmermann, M., Box, C. & Eccles, S. A. Two-dimensional vs. three-dimensional in vitro tumor migration and invasion assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **986**, 227–252; 10.1007/978-1-62703-311-4\_15 (2013).
25. Chan, H. F. *et al.* Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Scientific reports* **3**, 3462; 10.1038/srep03462 (2013).
26. Correa de Sampaio, P. *et al.* A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis. *PloS one* **7**, e30753; 10.1371/journal.pone.0030753 (2012).
27. Ricci, C., Moroni, L. & Danti, S. Cancer tissue engineering new perspectives in understanding the biology of solid tumours a critical review. *OA Tissue Engineering* **1**; 10.13172/2052-9643-1-1-607 (2013).
28. Yeon, S.-E. *et al.* Application of concave microwells to pancreatic tumor spheroids enabling anticancer drug evaluation in a clinically relevant drug resistance model. *PloS one* **8**, e73345; 10.1371/journal.pone.0073345 (2013).
29. Shah, S. B. & Singh, A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta biomaterialia* **53**, 29–45; 10.1016/j.actbio.2017.01.075 (2017).
30. Pereira, J. F. S. *et al.* The third dimension: new developments in cell culture models for colorectal research. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **73**, 3971–3989; 10.1007/s00018-016-2258-2 (2016).

31. Amaral, R. L. F., Miranda, M., Marcato, P. D. & Swiech, K. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. *Frontiers in physiology* **8**, 605; 10.3389/fphys.2017.00605 (2017).
32. Abbott, A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* **424**, 870–872; 10.1038/424870a (2003).
33. 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).
34. El-Ali, J., Sorger, P. K. & Jensen, K. F. Cells on chips. *Nature* **442**, 403–411; 10.1038/nature05063 (2006).
35. Bhatia, S. N. & Ingber, D. E. Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology* **32**, 760–772; 10.1038/nbt.2989 (2014).
36. Azizipour, N., Avazpour, R., Rosenzweig, D. H., Sawan, M. & Ajji, A. Evolution of Biochip Technology: A Review from Lab-on-a-Chip to Organ-on-a-Chip. *Micromachines* **11**; 10.3390/mi11060599 (2020).
37. Wu, Q. *et al.* Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomedical engineering online* **19**, 9; 10.1186/s12938-020-0752-0 (2020).
38. Esch, E. W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery* **14**, 248–260; 10.1038/nrd4539 (2015).
39. Yum, K., Hong, S. G., Healy, K. E. & Lee, L. P. Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnology journal* **9**, 16–27; 10.1002/biot.201300187 (2014).
40. Huh, D., Torisawa, Y., Hamilton, G. A., Kim, H. J. & Ingber, D. E. Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a chip* **12**, 2156–2164; 10.1039/C2LC40089H (2012).
41. Pasqualini, F. S., Emmert, M. Y., Parker, K. K. & Hoerstrup, S. P. Organ Chips: Quality Assurance Systems in Regenerative Medicine. *Clinical pharmacology and therapeutics* **101**, 31–34; 10.1002/cpt.527 (2017).
42. Fernandez, C. E. *et al.* Human Vascular Microphysiological System for in vitro Drug Screening. *Scientific reports* **6**, 21579; 10.1038/srep21579 (2016).
43. Frame, M. D., Chapman, G. B., Makino, Y. & Sarelius, I. H. Shear stress gradient over endothelial cells in a curved microchannel system. *Biorheology* **35**, 245–261; 10.1016/S0006-355X(99)80009-2 (1998).
44. 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).
45. Abaci, H. E. & Shuler, M. L. Human-on-a-chip design strategies and principles for physiologically based pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **7**, 383–391; 10.1039/c4ib00292j (2015).
46. Huh, D. D. A human breathing lung-on-a-chip. *Annals of the American Thoracic Society* **12** **Suppl 1**, S42-4; 10.1513/AnnalsATS.201410-442MG (2015).

47. Konar, D., Devarasetty, M., Yildiz, D. V., Atala, A. & Murphy, S. V. Lung-On-A-Chip Technologies for Disease Modeling and Drug Development. *Biomedical engineering and computational biology* **7**, 17–27; 10.4137/BECB.S34252 (2016).
48. Da Yoon No, Lee, K.-H., Lee, J. & Lee, S.-H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab on a chip* **15**, 3822–3837; 10.1039/c5lc00611b (2015).
49. Mori, N., Morimoto, Y. & Takeuchi, S. Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip. *Biomaterials* **116**, 48–56; 10.1016/j.biomaterials.2016.11.031 (2017).
50. Nieskens, T. T. G. & Wilmer, M. J. Kidney-on-a-chip technology for renal proximal tubule tissue reconstruction. *European journal of pharmacology* **790**, 46–56; 10.1016/j.ejphar.2016.07.018 (2016).
51. Ugolini, G. S., Visone, R., Cruz-Moreira, D., Redaelli, A. & Rasponi, M. Tailoring cardiac environment in microphysiological systems: an outlook on current and perspective heart-on-chip platforms. *Future science OA* **3**, FSO191; 10.4155/fsoa-2017-0024 (2017).
52. Ribas, J. *et al.* Cardiovascular Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Discovery and Development. *Applied in vitro toxicology* **2**, 82–96; 10.1089/aivt.2016.0002 (2016).
53. Phan, D. T. *et al.* Blood-brain barrier-on-a-chip: Microphysiological systems that capture the complexity of the blood-central nervous system interface. *Experimental Biology and Medicine* **242**, 1669–1678; 10.1177/1535370217694100 (2017).
54. Brown, J. A. *et al.* Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *Journal of neuroinflammation* **13**, 306; 10.1186/s12974-016-0760-y (2016).
55. Wang, Y. I., Abaci, H. E. & Shuler, M. L. Microfluidic blood-brain barrier model provides in vivo-like barrier properties for drug permeability screening. *Biotechnology and bioengineering* **114**, 184–194; 10.1002/bit.26045 (2017).
56. Skardal, A., Devarasetty, M., Forsythe, S., Atala, A. & Soker, S. A reductionist metastasis-on-a-chip platform for in vitro tumor progression modeling and drug screening. *Biotechnology and bioengineering* **113**, 2020–2032; 10.1002/bit.25950 (2016).
57. Skardal, A. *et al.* Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Scientific reports* **7**, 8837; 10.1038/s41598-017-08879-x (2017).
58. Ingber, D. E. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nature reviews. Genetics* **23**, 467–491; 10.1038/s41576-022-00466-9 (2022).
59. Huh, D. *et al.* Microfabrication of human organs-on-chips. *Nature protocols* **8**, 2135–2157; 10.1038/nprot.2013.137 (2013).
60. Sato, K., Sasaki, N., Svahn, H. A. & Sato, K. Microfluidics for nano-pathophysiology. *Advanced drug delivery reviews* **74**, 115–121; 10.1016/j.addr.2013.08.009 (2014).
61. Harink, B., Le Gac, S., Truckenmüller, R., van Blitterswijk, C. & Habibovic, P. Regeneration-on-a-chip? The perspectives on use of microfluidics in regenerative medicine. *Lab on a chip* **13**, 3512–3528; 10.1039/c3lc50293g (2013).

62. Ren, K., Zhou, J. & Wu, H. Materials for microfluidic chip fabrication. *Accounts of chemical research* **46**, 2396–2406; 10.1021/ar300314s (2013).
63. Berthier, E., Young, E. W. K. & Beebe, D. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab on a chip* **12**, 1224–1237; 10.1039/c2lc20982a (2012).
64. Matsumoto, T. & Nagayama, K. Tensile properties of vascular smooth muscle cells: bridging vascular and cellular biomechanics. *Journal of biomechanics* **45**, 745–755; 10.1016/j.jbiomech.2011.11.014 (2012).
65. Hahn, C. & Schwartz, M. A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 53–62; 10.1038/nrm2596 (2009).
66. Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews* **97**, 4–27; 10.1016/j.addr.2015.11.001 (2016).
67. Theocharis, A., Gialeli, C., Hascall, V. & Karamanos, N. K. 1.1 Extracellular matrix: a functional scaffold. In *Extracellular Matrix: Pathobiology and Signaling*, edited by N. Karamanos (DE GRUYTER2012), pp. 3–20.
68. Deutzmann, R. & Bruckner, P. Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion. In *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, edited by P. C. Heinrich, M. Müller & L. Graeve (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2014), pp. 931–951.
69. Murphy-Ullrich, J. E. & Sage, E. H. Revisiting the matricellular concept. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **37**, 1–14; 10.1016/j.matbio.2014.07.005 (2014).
70. Murphy-Ullrich, J. E. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The Journal of clinical investigation* **107**, 785–790; 10.1172/JCI12609 (2001).
71. Bornstein, P. & Sage, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology* **14**, 608–616; 10.1016/S0955-0674(02)00361-7 (2002).
72. Bornstein, P., Agah, A. & Kyriakides, T. R. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *The international journal of biochemistry & cell biology* **36**, 1115–1125; 10.1016/j.biocel.2004.01.012 (2004).
73. Bornstein, P. Matricellular proteins: an overview. *Journal of cell communication and signaling* **3**, 163–165; 10.1007/s12079-009-0069-z (2009).
74. Lee, H. J. *et al.* A New Approach for Fabricating Collagen/ECM-Based Bioinks Using Preosteoblasts and Human Adipose Stem Cells. *Advanced healthcare materials* **4**, 1359–1368; 10.1002/adhm.201500193 (2015).
75. Novosel, E. C., Kleinans, C. & Kluger, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews* **63**, 300–311; 10.1016/j.addr.2011.03.004 (2011).
76. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* **29**, 2941–2953; 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023 (2008).

77. Kharkar, P. M., Kiick, K. L. & Kloxin, A. M. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chemical Society reviews* **42**, 7335–7372; 10.1039/c3cs60040h (2013).
78. Gasperini, L., Mano, J. F. & Reis, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society, Interface* **11**, 20140817; 10.1098/rsif.2014.0817 (2014).
79. 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).
80. Thomas, B. H., Craig Fryman, J., Liu, K. & Mason, J. Hydrophilic-hydrophobic hydrogels for cartilage replacement. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **2**, 588–595; 10.1016/j.jmbbm.2008.08.001 (2009).
81. Brannon-Peppas, L. & Peppas, N. A. Equilibrium swelling behavior of dilute ionic hydrogels in electrolytic solutions. *Journal of Controlled Release* **16**, 319–329; 10.1016/0168-3659(91)90009-3 (1991).
82. Dehbari, N., Tavakoli, J., Singh Khatrao, S. & Tang, Y. In situ polymerized hyperbranched polymer reinforced poly(acrylic acid) hydrogels. *Mater. Chem. Front.* **1**, 1995–2004; 10.1039/C7QM00028F (2017).
83. Jabbari, E., Tavakoli, J. & Sarvestani, A. S. Swelling characteristics of acrylic acid polyelectrolyte hydrogel in a dc electric field. *Smart Mater. Struct.* **16**, 1614–1620; 10.1088/0964-1726/16/5/015 (2007).
84. Lin, Z. *et al.* A comparative study of thermo-sensitive hydrogels with water-insoluble paclitaxel in molecule, nanocrystal and microcrystal dispersions. *Nanoscale* **7**, 14838–14847; 10.1039/C5NR03623B (2015).
85. Nguyen, K. T. & West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307–4314; 10.1016/S0142-9612(02)00175-8 (2002).
86. Hamed, I., Özogul, F. & Regenstein, J. M. Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* **48**, 40–50; 10.1016/j.tifs.2015.11.007 (2016).
87. Han, L. *et al.* A Mussel-Inspired Conductive, Self-Adhesive, and Self-Healable Tough Hydrogel as Cell Stimulators and Implantable Bioelectronics. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **13**; 10.1002/smll.201601916 (2017).
88. Huglin, M. R. Hydrogels in medicine and pharmacy Edited by N. A. Peppas, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986 (Vol. I), 1987 (Vols 2 and 3). Vol. 1 Fundamentals, pp. vii + 180, £72.00, ISBN 0-8493-5546-X; Vol. 2 Polymers, pp. vii + 171, £72.00, ISBN 0-8493-5547-8; Vol. 3 Properties and Applications, pp. vii + 195, £8000, ISBN 0-8493-5548-6. *Brit. Poly. J.* **21**, 184; 10.1002/pi.4980210223 (1989).
89. Nie, S., Hsiao, W. L. W., Pan, W. & Yang, Z. Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies. *International journal of nanomedicine* **6**, 151–166; 10.2147/IJN.S15057 (2011).

90. Peng, R., Yu, Y., Chen, S., Yang, Y. & Tang, Y. Conductive nanocomposite hydrogels with self-healing property. *RSC Adv* **4**, 35149–35155; 10.1039/C4RA05381H (2014).
91. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. & Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **50**, 27–46; 10.1016/s0939-6411(00)00090-4 (2000).
92. White, C. J., McBride, M. K., Pate, K. M., Tieppo, A. & Byrne, M. E. Extended release of *High* molecular weight hydroxypropyl methylcellulose from molecularly imprinted, extended wear silicone hydrogel contact lenses. *Biomaterials* **32**, 5698–5705; 10.1016/j.biomaterials.2011.04.044 (2011).
93. Smith, C. M. *et al.* Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue engineering* **10**, 1566–1576; 10.1089/ten.2004.10.1566 (2004).
94. Anjum, F., Carroll, A., Young, S. A., Flynn, L. E. & Amsden, B. G. Tough, Semisynthetic Hydrogels for Adipose Derived Stem Cell Delivery for Chondral Defect Repair. *Macromolecular bioscience* **17**; 10.1002/mabi.201600373 (2017).
95. Berkovitch, Y. & Seliktar, D. Semi-synthetic hydrogel composition and stiffness regulate neuronal morphogenesis. *International journal of pharmaceutics* **523**, 545–555; 10.1016/j.ijpharm.2016.11.032 (2017).
96. Chaudhuri, O. Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture. *Biomaterials science* **5**, 1480–1490; 10.1039/c7bm00261k (2017).
97. Guvendiren, M. & Burdick, J. A. Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cells. *Current opinion in biotechnology* **24**, 841–846; 10.1016/j.copbio.2013.03.009 (2013).
98. Liaw, C.-Y., Ji, S. & Guvendiren, M. Engineering 3D Hydrogels for Personalized In Vitro Human Tissue Models. *Advanced healthcare materials* **7**; 10.1002/adhm.201701165 (2018).
99. Rozario, T. & DeSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Developmental biology* **341**, 126–140; 10.1016/j.ydbio.2009.10.026 (2010).
100. Vanacker, J. & Amorim, C. A. Alginate: A Versatile Biomaterial to Encapsulate Isolated Ovarian Follicles. *Annals of biomedical engineering* **45**, 1633–1649; 10.1007/s10439-017-1816-6 (2017).
101. van den Bulcke, A. I. *et al.* Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **1**, 31–38; 10.1021/bm990017d (2000).
102. Muñoz, Z., Shih, H. & Lin, C.-C. Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol-norbornene photochemistry for cell encapsulation. *Biomaterials science* **2**, 1063–1072; 10.1039/c4bm00070f (2014).
103. van Vlierberghe, S., Schacht, E. & Dubruel, P. Reversible gelatin-based hydrogels: Finetuning of material properties. *European Polymer Journal* **47**, 1039–1047; 10.1016/j.eurpolymj.2011.02.015 (2011).

104. DeLong, S. A., Gobin, A. S. & West, J. L. Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. *Journal of Controlled Release* **109**, 139–148; 10.1016/j.jconrel.2005.09.020 (2005).
105. Jongpaiboonkit, L. *et al.* An adaptable hydrogel array format for 3-dimensional cell culture and analysis. *Biomaterials* **29**, 3346–3356; 10.1016/j.biomaterials.2008.04.040 (2008).
106. Leach, J. B., Bivens, K. A., Collins, C. N. & Schmidt, C. E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *Journal of biomedical materials research. Part A* **70**, 74–82; 10.1002/jbm.a.30063 (2004).
107. Ye, Q., Wang, Y., Williams, K. & Spencer, P. Characterization of photopolymerization of dentin adhesives as a function of light source and irradiance. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **80**, 440–446; 10.1002/jbm.b.30615 (2007).
108. Bigi, A., Panzavolta, S. & Rubini, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* **25**, 5675–5680; 10.1016/j.biomaterials.2004.01.033 (2004).
109. Nichol, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials* **31**, 5536–5544; 10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010).
110. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351; 10.1016/s0142-9612(03)00340-5 (2003).
111. Kashte, S., Jaiswal, A. K. & Kadam, S. Artificial Bone via Bone Tissue Engineering: Current Scenario and Challenges. *Tissue engineering and regenerative medicine* **14**, 1–14; 10.1007/s13770-016-0001-6 (2017).
112. Kumosa, L. S., Zetterberg, V. & Schouenborg, J. Gelatin promotes rapid restoration of the blood brain barrier after acute brain injury. *Acta biomaterialia* **65**, 137–149; 10.1016/j.actbio.2017.10.020 (2018).
113. Hulmes, D. J. S. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of structural biology* **137**, 2–10; 10.1006/jsbi.2002.4450 (2002).
114. Babin, H. & Dickinson, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids* **15**, 271–276; 10.1016/S0268-005X(01)00025-X (2001).
115. Foox, M. & Zilberman, M. Drug delivery from gelatin-based systems. *Expert opinion on drug delivery* **12**, 1547–1563; 10.1517/17425247.2015.1037272 (2015).
116. Wang, X. *et al.* Gelatin-Based Hydrogels for Organ 3D Bioprinting. *Polymers* **9**; 10.3390/polym9090401 (2017).
117. Karim, A. A. & Bhat, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* **23**, 563–576; 10.1016/j.foodhyd.2008.07.002 (2009).
118. Kozlov, P. V. & Burdygina, G. I. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. *Polymer* **24**, 651–666; 10.1016/0032-3861(83)90001-0 (1983).

119. 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).
120. 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).
121. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: 1,2,3-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of organic chemistry* **67**, 3057–3064; 10.1021/jo011148j (2002).
122. Srinivasan, R., Li, J., Ng, S. L., Kalesh, K. A. & Yao, S. Q. Methods of using click chemistry in the discovery of enzyme inhibitors. *Nature protocols* **2**, 2655–2664; 10.1038/nprot.2007.323 (2007).
123. Polizzotti, B. D., Fairbanks, B. D. & Anseth, K. S. Three-dimensional biochemical patterning of click-based composite hydrogels via thiolene photopolymerization. *Biomacromolecules* **9**, 1084–1087; 10.1021/bm7012636 (2008).
124. Moses, J. E. & Moorhouse, A. D. The growing applications of click chemistry. *Chemical Society reviews* **36**, 1249–1262; 10.1039/B613014N (2007).
125. Malkoch, M. *et al.* Synthesis of well-defined hydrogel networks using click chemistry. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 2774–2776; 10.1039/B603438A (2006).
126. Franke, R., Doll, C. & Eichler, J. Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron Letters* **46**, 4479–4482; 10.1016/j.tetlet.2005.04.107 (2005).
127. Franc, G. & Kakkar, A. Dendrimer design using Cu(I)-catalyzed alkyne-azide "click-chemistry". *Chemical communications (Cambridge, England)*, 5267–5276; 10.1039/B809870K (2008).
128. Evans, M. J., Saghatelian, A., Sorensen, E. J. & Cravatt, B. F. Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling. *Nature biotechnology* **23**, 1303–1307; 10.1038/nbt1149 (2005).
129. Hoyle, C. E., Lee, T. Y. & Roper, T. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **42**, 5301–5338; 10.1002/pola.20366 (2004).
130. Haase, S. Ultra-schnell aushärtende Hydrogele als Biotinten für den 3D-Druck, 2021.
131. Kempster, X. Gelatine-basierte Hydrogele für den 3D Biodruck von Gewebemodellen. Doktorarbeit, 2022.
132. Nimmo, C. M. & Shoichet, M. S. Regenerative biomaterials that "click": simple, aqueous-based protocols for hydrogel synthesis, surface immobilization, and 3D patterning. *Bioconjugate chemistry* **22**, 2199–2209; 10.1021/bc200281k (2011).
133. Nimmo, C. M., Owen, S. C. & Shoichet, M. S. Diels-Alder Click cross-linked hyaluronic acid hydrogels for tissue engineering. *Biomacromolecules* **12**, 824–830; 10.1021/bm101446k (2011).
134. Lowe, A. B., Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol-yne click chemistry: A powerful and versatile methodology for materials synthesis. *J. Mater. Chem.* **20**, 4745; 10.1039/B917102A (2010).

135. Dondoni, A. The emergence of thiol-ene coupling as a click process for materials and bioorganic chemistry. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **47**, 8995–8997; 10.1002/anie.200802516 (2008).
136. DeForest, C. A., Polizzotti, B. D. & Anseth, K. S. Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments. *Nature materials* **8**, 659–664; 10.1038/nmat2473 (2009).
137. Azagarsamy, M. A. & Anseth, K. S. Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. *ACS macro letters* **2**, 5–9; 10.1021/mz300585q (2013).
138. Alge, D. L., Azagarsamy, M. A., Donohue, D. F. & Anseth, K. S. Synthetically tractable click hydrogels for three-dimensional cell culture formed using tetrazine-norbornene chemistry. *Biomacromolecules* **14**, 949–953; 10.1021/bm4000508 (2013).
139. Rydholm, A. E., Bowman, C. N. & Anseth, K. S. Degradable thiol-acrylate photopolymers: polymerization and degradation behavior of an in situ forming biomaterial. *Biomaterials* **26**, 4495–4506; 10.1016/j.biomaterials.2004.11.046 (2005).
140. Bertlein, S. *et al.* Thiol-Ene Clickable Gelatin: A Platform Bioink for Multiple 3D Biofabrication Technologies. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **29**; 10.1002/adma.201703404 (2017).
141. Regehly, M. & Hecht, S. Auf dem Weg zum Replikator. *Physik in unserer Zeit* **53**, 125–131; 10.1002/piuz.202201637 (2022).
142. Ashley, S. Rapid prototyping systems, 1991.
143. Wong, K. V. & Hernandez, A. A Review of Additive Manufacturing. *ISRN Mechanical Engineering* **2012**, 1–10; 10.5402/2012/208760 (2012).
144. Dababneh, A. B. & Ozbolat, I. T. Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review. *Journal of Manufacturing Science and Engineering* **136**; 10.1115/1.4028512 (2014).
145. Mironov, V. *et al.* Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication* **1**, 22001; 10.1088/1758-5082/1/2/022001 (2009).
146. Mironov, V., Reis, N. & Derby, B. Review: bioprinting: a beginning. *Tissue engineering* **12**, 631–634; 10.1089/ten.2006.12.631 (2006).
147. Murphy, S. V. & Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* **32**, 773–785; 10.1038/nbt.2958 (2014).
148. Yoo, S.-S. 3D-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity. *Expert opinion on therapeutic patents* **25**, 507–511; 10.1517/13543776.2015.1019466 (2015).
149. 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).
150. Boland, T., Xu, T., Damon, B. & Cui, X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnology journal* **1**, 910–917; 10.1002/biot.200600081 (2006).

151. Jong, J. de *et al.* Air entrapment in piezo-driven inkjet printheads. *The Journal of the Acoustical Society of America* **120**, 1257–1265; 10.1121/1.2216560 (2006).
152. Calvert, P. Materials science. Printing cells. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 208–209; 10.1126/science.1144212 (2007).
153. 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).
154. Calvert, P. Inkjet Printing for Materials and Devices. *Chem. Mater.* **13**, 3299–3305; 10.1021/cm0101632 (2001).
155. Moon, S. *et al.* Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. *Tissue engineering. Part C, Methods* **16**, 157–166; 10.1089/ten.TEC.2009.0179 (2010).
156. Guillotin, B. *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with *High* cell density and microscale organization. *Biomaterials* **31**, 7250–7256; 10.1016/j.biomaterials.2010.05.055 (2010).
157. Guillotin, B. & Guillemot, F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends in biotechnology* **29**, 183–190; 10.1016/j.tibtech.2010.12.008 (2011).
158. Koch, L., Gruene, M., Unger, C. & Chichkov, B. Laser assisted cell printing. *Current pharmaceutical biotechnology* **14**, 91–97 (2013).
159. Ovsianikov, A., Mironov, V., Stampf, J. & Liska, R. Engineering 3D cell-culture matrices: multiphoton processing technologies for biological and tissue engineering applications. *Expert review of medical devices* **9**, 613–633; 10.1586/erd.12.48 (2012).
160. Malinauskas, M., Farsari, M., Piskarskas, A. & Juodkasis, S. Ultrafast laser nanostructuring of photopolymers: A decade of advances. *Physics Reports* **533**, 1–31; 10.1016/j.physrep.2013.07.005 (2013).
161. Paz, V. F. *et al.* Development of functional sub-100 nm structures with 3D two-photon polymerization technique and optical methods for characterization. *Journal of Laser Applications* **24**; 10.2351/1.4712151 (2012).
162. Yang, L. *et al.* Parallel direct laser writing of micro-optical and photonic structures using spatial light modulator. *Optics and Lasers in Engineering* **70**, 26–32; 10.1016/j.optlaseng.2015.02.006 (2015).
163. LaFratta, C. N., Simoska, O., Pelse, I., Weng, S. & Ingram, M. A convenient direct laser writing system for the creation of microfluidic masters. *Microfluid Nanofluid* **19**, 419–426; 10.1007/s10404-015-1574-4 (2015).
164. Regehly, M. *et al.* Xolography for linear volumetric 3D printing. *Nature* **588**, 620–624; 10.1038/s41586-020-3029-7 (2020).
165. Papaioannou, T. G. *et al.* 3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication. *Acta Cardiologica Sinica* **35**, 284–289; 10.6515/ACS.201905\_35(3).20181115A (2019).

166. Gillispie, G. *et al.* Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication* **12**, 22003; 10.1088/1758-5090/ab6f0d (2020).
167. Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. & Markwald, R. R. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in biotechnology* **21**, 157–161; 10.1016/S0167-7799(03)00033-7 (2003).
168. Malda, J. *et al.* 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **25**, 5011–5028; 10.1002/adma.201302042 (2013).
169. Hölzl, K. *et al.* Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication* **8**, 32002; 10.1088/1758-5090/8/3/032002 (2016).
170. Nicodemus, G. D. & Bryant, S. J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **14**, 149–165; 10.1089/ten.teb.2007.0332 (2008).
171. Donderwinkel, I., van Hest, J. C. M. & Cameron, N. R. Bio-inks for 3D bioprinting: recent advances and future prospects. *Polym. Chem.* **8**, 4451–4471; 10.1039/C7PY00826K (2017).
172. Yue, Z., Liu, X., Coates, P. T. & Wallace, G. G. Advances in printing biomaterials and living cells: implications for islet cell transplantation. *Current opinion in organ transplantation* **21**, 467–475; 10.1097/MOT.0000000000000346 (2016).
173. Chaparian, E., Izbassarov, D., Vita, F. de, Brandt, L. & Tammissola, O. Yield-stress fluids in porous media: a comparison of viscoplastic and elastoviscoplastic flows. *Meccanica* **55**, 331–342; 10.1007/s11012-019-01010-6 (2020).
174. 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/acsbomaterials.7b00734 (2017).
175. Guvendiren, M., Lu, H. D. & Burdick, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter* **8**, 260–272; 10.1039/C1SM06513K (2012).
176. Jalalvandi, E. & Shavandi, A. Shear thinning/self-healing hydrogel based on natural polymers with secondary photocrosslinking for biomedical applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **90**, 191–201; 10.1016/j.jmbbm.2018.10.009 (2019).
177. Rezende, R. A., Bártolo, P. J., Mendes, A. & Filho, R. M. Rheological behavior of alginate solutions for biomanufacturing. *J of Applied Polymer Sci* **113**, 3866–3871; 10.1002/app.30170 (2009).
178. Derby, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. *Science (New York, N.Y.)* **338**, 921–926; 10.1126/science.1226340 (2012).
179. Ferris, C. J., Gilmore, K. G., Wallace, G. G. & het Panhuis, M. in. Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells. *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 4243–4258; 10.1007/s00253-013-4853-6 (2013).
180. You, F., Eames, B. F. & Chen, X. Application of Extrusion-Based Hydrogel Bioprinting for Cartilage Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences* **18**; 10.3390/ijms18071597 (2017).

181. Baldacchini, T. (ed.). *Three-dimensional microfabrication using two-photon polymerization. Fundamentals, technology and applications* (Elsevier; William Andrew, Amsterdam, Boston, Paris, C 2016).
182. Zhou, X., Hou, Y. & Lin, J. A review on the processing accuracy of two-photon polymerization. *AIP Advances* **5**; 10.1063/1.4916886 (2015).
183. Zhang, J., Hu, Q., Wang, S., Tao, J. & Gou, M. Digital Light Processing Based Three-dimensional Printing for Medical Applications. *International journal of bioprinting* **6**, 242; 10.18063/ijb.v6i1.242 (2020).
184. Lu, Y., Mapili, G., Suhali, G., Chen, S. & Roy, K. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part A* **77**, 396–405; 10.1002/jbm.a.30601 (2006).
185. Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. & Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering* **143**, 172–196; 10.1016/j.compositesb.2018.02.012 (2018).
186. cellink (ed.). *Beiheft Bionova X* (2023).
187. Ma, X. *et al.* Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 2206–2211; 10.1073/pnas.1524510113 (2016).
188. 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).
189. Horváth, L. *et al.* Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting. *Scientific reports* **5**, 7974; 10.1038/srep07974 (2015).
190. Liu, J. *et al.* Rapid 3D bioprinting of in vitro cardiac tissue models using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Bioprinting (Amsterdam, Netherlands)* **13**; 10.1016/j.bprint.2019.e00040 (2019).
191. Mateen, R., Ali, M. M. & Hoare, T. A printable hydrogel microarray for drug screening avoids false positives associated with promiscuous aggregating inhibitors. *Nature communications* **9**, 602; 10.1038/s41467-018-02956-z (2018).
192. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257; 10.1038/35025220 (2000).
193. Eble, J. A. & Niland, S. The extracellular matrix of blood vessels. *Current pharmaceutical design* **15**, 1385–1400; 10.2174/138161209787846757 (2009).
194. Red-Horse, K. & Siekmann, A. F. Veins and Arteries Build Hierarchical Branching Patterns Differently: Bottom-Up versus Top-Down. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **41**, e1800198; 10.1002/bies.201800198 (2019).
195. Pugsley, M. K. & Tabrizchi, R. The vascular system. An overview of structure and function. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **44**, 333–340; 10.1016/S1056-8719(00)00125-8 (2000).
196. Adams, R. H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 464–478; 10.1038/nrm2183 (2007).

197. Tucker, W. D., Arora, Y. & Mahajan, K. *Anatomy, Bloos Vessels*, 2023.
198. Borysenko, M. & Beringer, T. *Functional histology*. 2nd ed. (Little, Brown, Boston, 1984).
199. Adair, T. H. *Angiogenesis* (Morgan & Claypool Life Sciences, [San Rafael, CA], 2011).
200. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 73–91; 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445 (1995).
201. Carmeliet, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine* **255**, 538–561; 10.1111/j.1365-2796.2003.01297.x (2004).
202. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307; 10.1038/nature10144 (2011).
203. Sinapius, D. ber das Endothel der Venen. *Z. Zellforsch.* **47**, 560–630; 10.1007/BF00319098 (1958).
204. Swift, M. R. & Weinstein, B. M. Arterial-venous specification during development. *Circulation research* **104**, 576–588; 10.1161/CIRCRESAHA.108.188805 (2009).
205. Drake, C. J. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* **69**, 73–82; 10.1002/bdrc.10003 (2003).
206. Herbert, S. P. & Stainier, D. Y. R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 551–564; 10.1038/nrm3176 (2011).
207. Treps, L. & Gavard, J. L'angiogenèse tumorale - Quand l'arbre de vie tourne mal. *Medecine sciences : M/S* **31**, 989–995; 10.1051/medsci/20153111013 (2015).
208. Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine* **9**, 267–285; 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x (2005).
209. Sims, D. E. The pericyte--a review. *Tissue & cell* **18**, 153–174; 10.1016/0040-8166(86)90026-1 (1986).
210. Kubis, N. & Levy, B. I. Vasculogenesis and angiogenesis: molecular and cellular controls. Part 1: growth factors. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences* **9**, 227–237; 10.1177/159101990300900301 (2003).
211. Kretschmer, M., Rüdiger, D. & Zahler, S. Mechanical Aspects of Angiogenesis. *Cancers* **13**; 10.3390/cancers13194987 (2021).
212. Xue, N., Bertulli, C., Sadok, A. & Huang, Y. Y. S. Dynamics of filopodium-like protrusion and endothelial cellular motility on one-dimensional extracellular matrix fibrils. *Interface focus* **4**, 20130060; 10.1098/rsfs.2013.0060 (2014).
213. Blanco, R. & Gerhardt, H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3**, a006569; 10.1101/cshperspect.a006569 (2013).
214. Jouanneau, J., Moens, G., Montesano, R. & Thiery, J. P. FGF-1 but not FGF-4 secreted by carcinoma cells promotes in vitro and in vivo angiogenesis and rapid tumor proliferation. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **12**, 37–47; 10.3109/08977199509003212 (1995).

215. Javerzat, S., Auguste, P. & Bikfalvi, A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends in molecular medicine* **8**, 483–489; 10.1016/S1471-4914(02)02394-8 (2002).
216. Dell'Era, P. *et al.* Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene* **20**, 2655–2663; 10.1038/sj.onc.1204368 (2001).
217. Akl, M. R. *et al.* Molecular and clinical significance of fibroblast growth factor 2 (FGF2 /bFGF) in malignancies of solid and hematological cancers for personalized therapies. *Oncotarget* **7**, 44735–44762; 10.18632/oncotarget.8203 (2016).
218. Rouwkema, J. & Khademhosseini, A. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends in biotechnology* **34**, 733–745; 10.1016/j.tibtech.2016.03.002 (2016).
219. Santos, M. I. *et al.* Response of micro- and macrovascular endothelial cells to starch-based fiber meshes for bone tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 240–248; 10.1016/j.biomaterials.2006.08.006 (2007).
220. Unger, R. E., Dohle, E. & Kirkpatrick, C. J. Improving vascularization of engineered bone through the generation of pro-angiogenic effects in co-culture systems. *Advanced drug delivery reviews* **94**, 116–125; 10.1016/j.addr.2015.03.012 (2015).
221. Unger, R. E. *et al.* Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials* **28**, 3965–3976; 10.1016/j.biomaterials.2007.05.032 (2007).
222. Levenberg, S. *et al.* Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature biotechnology* **23**, 879–884; 10.1038/nbt1109 (2005).
223. Chen, Y.-C. *et al.* Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels. *Advanced functional materials* **22**, 2027–2039; 10.1002/adfm.201101662 (2012).
224. Fuchs, S., Hofmann, A. & Kirkpatrick, C. J. Microvessel-like structures from outgrowth endothelial cells from human peripheral blood in 2-dimensional and 3-dimensional co-cultures with osteoblastic lineage cells. *Tissue engineering* **13**, 2577–2588; 10.1089/ten.2007.0022 (2007).
225. Rouwkema, J., Westerweel, P. E., Boer, J. de, Verhaar, M. C. & van Blitterswijk, C. A. The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering. *Tissue engineering. Part A* **15**, 2015–2027; 10.1089/ten.tea.2008.0318 (2009).
226. Baker, B. M., Trappmann, B., Stapleton, S. C., Toro, E. & Chen, C. S. Microfluidics embedded within extracellular matrix to define vascular architectures and pattern diffusive gradients. *Lab on a chip* **13**, 3246–3252; 10.1039/c3lc50493j (2013).
227. van Duinen, V. *et al.* Perfused 3D angiogenic sprouting in a *High*-throughput in vitro platform. *Angiogenesis* **22**, 157–165; 10.1007/s10456-018-9647-0 (2019).
228. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936; 10.1038/nature04478 (2005).

229. Folkman, J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Annals of internal medicine* **82**, 96–100; 10.7326/0003-4819-82-1-96 (1975).
230. Liao, D. & Johnson, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews* **26**, 281–290; 10.1007/s10555-007-9066-y (2007).
231. Oladipupo, S. *et al.* VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 13264–13269; 10.1073/pnas.1101321108 (2011).
232. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364; 10.1016/S0092-8674(00)80108-7 (1996).
233. Loizzi, V. *et al.* Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer. *International journal of molecular sciences* **18**; 10.3390/ijms18091967 (2017).
234. Ribatti, D. & Crivellato, E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology* **372**, 157–165; 10.1016/j.ydbio.2012.09.018 (2012).
235. Gimbrone, M. A., Leapman, S. B., Cotran, R. S. & Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *The Journal of experimental medicine* **136**, 261–276; 10.1084/jem.136.2.261 (1972).
236. Na, T.-Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M. & Gumbiner, B. M. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 5931–5937; 10.1073/pnas.1918167117 (2020).
237. Tsai, J. H. & Yang, J. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development* **27**, 2192–2206; 10.1101/gad.225334.113 (2013).
238. Kim, K. J. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841–844; 10.1038/362841a0 (1993).
239. Cook, K. M. & Figg, W. D. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA: a cancer journal for clinicians* **60**, 222–243; 10.3322/caac.20075 (2010).
240. Kerbel, R. & Folkman, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature reviews. Cancer* **2**, 727–739; 10.1038/nrc905 (2002).
241. Folkman, J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **112**, 496–507; 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0809.x (2004).
242. Babel, W. Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer. *Chem. Unserer Zeit* **30**, 86–95; 10.1002/ciuz.19960300205 (1996).
243. Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J. & Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends in biotechnology* **34**, 394–407; 10.1016/j.tibtech.2016.01.002 (2016).
244. GMIA. Gelatin Handbook, 2019.

245. Graf, E. Lexikon der Pharmazie. Hrsg. von S. Ebel und H. J. Roth, G. Thieme-Verlag Stuttgart 1987, X, 704 S., 2177 Formeln und Abb., geb. DM 128,-. *Pharmazie in unserer Zeit* **16**, 131; 10.1002/pauz.19870160407 (1987).
246. Kempka, A. P., Souza, S. M. A. G. U. de, Ulson de Souza, A. A., Prestes, R. C. & Ogliari, D. Influence of bloom number and plastifiers on gelatin matrices produced for enzyme immobilization. *Braz. J. Chem. Eng.* **31**, 95–108; 10.1590/S0104-66322014000100010 (2014).
247. Kale, R. & an Bajaj. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. *Journal of young pharmacists : JYP* **2**, 90–94; 10.4103/0975-1483.62223 (2010).
248. Göckler, T. Chemisch-biologisches Design von Biomaterialien und Biotinten für lichtbasierte Biofabrikationsprozesse im Tissue Engineering, 2021.
249. Grimm, A. Synthese und Charakterisierung gelatinebasierter Hydrogele. Institut für funktionelle Grenzflächen, 2020.
250. Cramer, N. B., Davies, T., O'Brien, A. K. & Bowman, C. N. Mechanism and Modeling of a Thiol–Ene Photopolymerization. *Macromolecules* **36**, 4631–4636; 10.1021/ma034072x (2003).
251. Northrop, B. H. & Coffey, R. N. Thiol-ene click chemistry: computational and kinetic analysis of the influence of alkene functionality. *Journal of the American Chemical Society* **134**, 13804–13817; 10.1021/ja305441d (2012).
252. 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).
253. invitrogen. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, 2006.
254. Monteiro, N., He, W., Franca, C. M., Athirasala, A. & Bertassoni, L. E. Engineering Microvascular Networks in LED Light-Cured Cell-Laden Hydrogels. *ACS biomaterials science & engineering* **4**, 2563–2570; 10.1021/acsbiomaterials.8b00502 (2018).
255. Wang, X. *et al.* Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue engineering* **12**, 83–90; 10.1089/ten.2006.12.83 (2006).
256. Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J. & Kinsella, J. M. Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication. *Applied Physics Reviews* **6**; 10.1063/1.5059393 (2019).
257. Wang, Y. *et al.* Development of a Photo-Crosslinking, Biodegradable GelMA/PEGDA Hydrogel for Guided Bone Regeneration Materials. *Materials (Basel, Switzerland)* **11**; 10.3390/ma11081345 (2018).
258. Nguyen, A. K. *et al.* Two-photon polymerization of polyethylene glycol diacrylate scaffolds with riboflavin and triethanolamine used as a water-soluble photoinitiator. *Regenerative medicine* **8**, 725–738; 10.2217/rme.13.60 (2013).

259. Bertolotti, S. G., Previtali, C. M., Rufs, A. M. & Encinas, M. V. Riboflavin/Triethanolamine as Photoinitiator System of Vinyl Polymerization. A Mechanistic Study by Laser Flash Photolysis. *Macromolecules* **32**, 2920–2924; 10.1021/ma981246f (1999).
260. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63; 10.1016/0022-1759(83)90303-4 (1983).
261. *An overview on toxicity testing method* (2016).
262. Ma, Y. *et al.* Bioprinting-Based PDLSC-ECM Screening for in Vivo Repair of Alveolar Bone Defect Using Cell-Laden, Injectable and Photocrosslinkable Hydrogels. *ACS biomaterials science & engineering* **3**, 3534–3545; 10.1021/acsbiomaterials.7b00601 (2017).
263. Carraro, A. *et al.* In vitro analysis of a hepatic device with intrinsic microvascular-based channels. *Biomedical microdevices* **10**, 795–805; 10.1007/s10544-008-9194-3 (2008).
264. Kappings, V. *et al.* vasQchip: A Novel Microfluidic, Artificial Blood Vessel Scaffold for Vascularized 3D Tissues. *Adv Materials Technologies* **3**; 10.1002/admt.201700246 (2018).
265. Tsvirkun, D., Grichine, A., Duperray, A., Misbah, C. & Bureau, L. Microvasculature on a chip: study of the Endothelial Surface Layer and the fLow structure of Red Blood Cells. *Scientific reports* **7**, 45036; 10.1038/srep45036 (2017).
266. Zheng, Y. *et al.* In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 9342–9347; 10.1073/pnas.1201240109 (2012).
267. Ashraf, M. W., Tayyaba, S. & Afzulpurkar, N. Micro Electromechanical Systems (MEMS) Based Microfluidic Devices for Biomedical Applications. *International journal of molecular sciences* **12**, 3648–3704; 10.3390/ijms12063648 (2011).
268. Chen, W., Lam, R. H. W. & Fu, J. Photolithographic surface micromachining of polydimethylsiloxane (PDMS). *Lab on a chip* **12**, 391–395; 10.1039/C1LC20721K (2012).
269. Lee, H. & Cho, D.-W. One-step fabrication of an organ-on-a-chip with spatial heterogeneity using a 3D bioprinting technology. *Lab on a chip* **16**, 2618–2625; 10.1039/C6LC00450D (2016).
270. Matsusaki, M., Sakaue, K., Kadowaki, K. & Akashi, M. Three-dimensional human tissue chips fabricated by rapid and automatic inkjet cell printing. *Advanced healthcare materials* **2**, 534–539; 10.1002/adhm.201200299 (2013).
271. Zhou, K. *et al.* Fabrication of PDMS microfluidic devices using nanoclay-reinforced Pluronic F-127 as a sacrificial ink. *Biomedical materials (Bristol, England)*; 10.1088/1748-605X/abe55e (2021).
272. Molitor Tamara. In vitro Rekonstruktion der äußeren Blut-Retina-Schranke in Organ-on.chip Systemen mit Hilfe neuer Stammzelltechnologien, 2022.
273. Jo, B.-H., van Lerberghe, L. M., Motsegood, K. M. & Beebe, D. J. Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer. *J. Microelectromech. Syst.* **9**, 76–81; 10.1109/84.825780 (2000).

274. Perry, S. F. Herz und Blutgefäßsystem. In *Spezielle Zoologie*, edited by W. Westheide & G. Rieger (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2010), pp. 103–119.
275. Ebenbeck, M. & Garcke, H. Wie mathematische Modelle helfen, das Wachstum von Tumoren zu verstehen. *Mitteilungen der Deutschen Mathematiker-Vereinigung* **29**, 62–67; 10.1515/dmvm-2021-0026 (2021).
276. Alscher, M. D. & Märker-Hermann, E. Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **143**, 65; 10.1055/s-0043-106567 (2018).
277. Kroll, J. & Waltenberger, J. Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Zeitschrift für Kardiologie* **89**, 206–218; 10.1007/s003920050472 (2000).
278. Schwarzacher S.P. Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen, 2002.
279. HEINZ, E. & OBRINK, K. J. Acid formation and acidity control in the stomach. *Physiological reviews* **34**, 643–673; 10.1152/physrev.1954.34.4.643 (1954).
280. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671–674; 10.1038/386671a0 (1997).
281. Tetzlaff, F. & Fischer, A. Human Endothelial Cell Spheroid-based Sprouting Angiogenesis Assay in Collagen. *Bio-protocol* **8**, e2995; 10.21769/BioProtoc.2995 (2018).
282. Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine* **1**, 27–31; 10.1038/nm0195-27 (1995).
283. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews. Cancer* **2**, 795–803; 10.1038/nrc909 (2002).
284. Korff, T. & Augustin, H. G. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *Journal of cell science* **112** ( Pt 19), 3249–3258; 10.1242/jcs.112.19.3249 (1999).
285. Neeley, C. A Brief History of Spheroids (2016).
286. ibidi GmbH. Generation of Spheroids. Application Note 32, 2019.
287. Korff, T. & Augustin, H. G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *The Journal of cell biology* **143**, 1341–1352; 10.1083/jcb.143.5.1341 (1998).
288. Heiss, M. *et al.* Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **29**, 3076–3084; 10.1096/fj.14-267633 (2015).
289. Nehls, V. & Drenckhahn, D. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvascular research* **50**, 311–322; 10.1006/mvre.1995.1061 (1995).
290. Gerber, H. P. *et al.* VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)* **126**, 1149–1159; 10.1242/dev.126.6.1149 (1999).
291. Dumont, D. J. *et al.* Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Developmental*

- dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **203**, 80–92; 10.1002/aja.1002030109 (1995).
292. Breier, G., Clauss, M. & Risau, W. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **204**, 228–239; 10.1002/aja.1002040303 (1995).
293. Carmeliet, P. & Collen, D. Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney international* **53**, 1519–1549; 10.1046/j.1523-1755.1998.00936.x (1998).
294. Mignatti, P. & Rifkin, D. B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme & protein* **49**, 117–137; 10.1159/000468621 (1996).
295. Slavin, J. Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell biology international* **19**, 431–444; 10.1006/cbir.1995.1087 (1995).
296. Klagsbrun, M. & Dluz, S. Smooth muscle cell and endothelial cell growth factors. *Trends in cardiovascular medicine* **3**, 213–217; 10.1016/1050-1738(93)90042-5 (1993).
297. Fukumura, D. *et al.* Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* **94**, 715–725; 10.1016/s0092-8674(00)81731-6 (1998).
298. Kellouche, S. *et al.* Platelets, thrombospondin-1 and human dermal fibroblasts cooperate for stimulation of endothelial cell tubulogenesis through VEGF and PAI-1 regulation. *Experimental cell research* **313**, 486–499; 10.1016/j.yexcr.2006.10.023 (2007).
299. Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G. & Hanahan, D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS medicine* **5**, e19; 10.1371/journal.pmed.0050019 (2008).
300. Newman, A. C., Nakatsu, M. N., Chou, W., Gershon, P. D. & Hughes, C. C. W. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Molecular biology of the cell* **22**, 3791–3800; 10.1091/mbc.E11-05-0393 (2011).
301. Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* **125**, 5591–5596; 10.1242/jcs.116392 (2012).
302. Birbrair. *Tumor Microenvironment* (Springer International Publishing, 2020).
303. Tomanek, R. J. *et al.* Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovascular research* **31**, E116-E126; 10.1016/s0008-6363(95)00242-1 (1996).
304. Jackson, A., Tarantini, F., Gamble, S., Friedman, S. & Maciag, T. The release of fibroblast growth factor-1 from NIH 3T3 cells in response to temperature involves the function of cysteine residues. *The Journal of biological chemistry* **270**, 33–36; 10.1074/jbc.270.1.33 (1995).
305. Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. A self-assembled fibroblast-endothelial cell co-culture system that supports in vitro vasculogenesis by both human umbilical vein

- endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells. *Cells, tissues, organs* **186**, 157–168; 10.1159/000106670 (2007).
306. O'Connell, K. A. & Edidin, M. A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *The Journal of Immunology* **144**, 521–525; 10.4049/jimmunol.144.2.521 (1990).
307. Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W. & Rylander, M. N. In vitro angiogenesis induced by tumor-endothelial cell co-culture in bilayered, collagen I hydrogel bioengineered tumors. *Tissue engineering. Part C, Methods* **19**, 864–874; 10.1089/ten.tec.2012.0684 (2013).
308. Steinbach, A. Etablierung und Charakterisierung von vaskularisierten, gelatinebasierten 2,5D Hydrogelzellkulturen. Institut für funktionelle Grenzflächen, 2022.
309. Gerhardt Holger. VEGF and Endothelial Guidance in Angiogenic Sprouting., 2000-2013.
310. Petrová, K. *et al.* Usnic Acid Isolated from *Usnea antarctica* (Du Rietz) Reduced In Vitro Angiogenesis in VEGF- and bFGF-Stimulated HUVECs and Ex Ovo in Quail Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *Life (Basel, Switzerland)* **12**; 10.3390/life12091444 (2022).
311. Wang, Y., Kankala, R. K., Ou, C., Chen, A. & Yang, Z. Advances in hydrogel-based vascularized tissues for tissue repair and drug screening. *Bioactive materials* **9**, 198–220; 10.1016/j.bioactmat.2021.07.005 (2022).
312. Lee H., Chung M., Jeon N.L. Vascularization Strategies for Organ-on-a-chip. School of Mechanical Engineering, Seoul National University, SOUTH KOREA, 2014.
313. Jain, A. *et al.* Primary Human Lung Alveolus-on-a-chip Model of Intravascular Thrombosis for Assessment of Therapeutics. *Clinical pharmacology and therapeutics* **103**, 332–340; 10.1002/cpt.742 (2018).
314. Liu, Y. *et al.* Angiogenesis and Functional Vessel Formation Induced by Interstitial Flow and Vascular Endothelial Growth Factor Using a Microfluidic Chip. *Micromachines* **13**; 10.3390/mi13020225 (2022).
315. Ouyang, L., Armstrong, J. P. K., Chen, Q., Lin, Y. & Stevens, M. M. Void-free 3D Bioprinting for In-situ Endothelialization and Microfluidic Perfusion. *Advanced functional materials* **30**; 10.1002/adfm.201908349 (2020).
316. Park, S., Kim, T. H., Kim, S. H., You, S. & Jung, Y. Three-Dimensional Vascularized Lung Cancer-on-a-Chip with Lung Extracellular Matrix Hydrogels for In Vitro Screening. *Cancers* **13**; 10.3390/cancers13163930 (2021).
317. Friis, T., Kjaer Sørensen, B., Engel, A.-M., Rygaard, J. & Houen, G. A quantitative ELISA-based co-culture angiogenesis and cell proliferation assay. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **111**, 658–668; 10.1034/j.1600-0463.2003.1110609.x (2003).
318. Vailhé, B., Vittet, D. & Feige, J. J. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **81**, 439–452; 10.1038/labinvest.3780252 (2001).

319. Johnson, K. E. & Wilgus, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in wound care* **3**, 647–661; 10.1089/wound.2013.0517 (2014).
320. *Expression patterns of VEGF and Flk-1 in human endometrium at the various phases of the natural menstrual cycle* (2014).
321. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674; 10.1016/j.cell.2011.02.013 (2011).
322. Azizi, G., Boghozian, R. & Mirshafiey, A. The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. *International journal of rheumatic diseases* **17**, 369–383; 10.1111/1756-185X.12280 (2014).
323. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **285**, 1182–1186; 10.1056/NEJM197111182852108 (1971).
324. Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J. & Jiang, W. G. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. University Hospital Wales, 2000-2013.
325. Brooks, P. C. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer metastasis reviews* **15**, 187–194; 10.1007/BF00437471 (1996).
326. Green, S. E. Operative surgery and surgical topics for the FRCS. K. M. Mokbel. 215 × 138 mm. Pp. 128. Illustrated. 1995. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers Group. £12·95. *Br J Surg* **83**, 140; 10.1002/bjs.1800830164 (2005).
327. Folkman, J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *The New England journal of medicine* **333**, 1757–1763; 10.1056/NEJM199512283332608 (1995).
328. Folkman, J. Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* **275**, 150–154; 10.1038/scientificamerican0996-150 (1996).
329. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* **267**, 10931–10934 (1992).
330. Martin, T. A. & Jiang, W. G. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 872–891; 10.1016/j.bbamem.2008.11.005 (2009).
331. Kerbel, R. S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **13**, 31–36; 10.1002/bies.950130106 (1991).
332. Lee, J. *et al.* Organ-Level Functional 3D Tissue Constructs with Complex Compartments and their Preclinical Applications. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **32**, e2002096; 10.1002/adma.202002096 (2020).
333. Park, S. H. *et al.* Hypoglycemia-induced VEGF expression is mediated by intracellular Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C signaling pathway in HepG2 human hepatoblastoma cells. *International journal of molecular medicine* **7**, 91–96 (2001).

334. Terashima, J., Tachikawa, C., Kudo, K., Habano, W. & Ozawa, S. An aryl hydrocarbon receptor induces VEGF expression through ATF4 under glucose deprivation in HepG2. *BMC molecular biology* **14**, 27; 10.1186/1471-2199-14-27 (2013).
335. Yao, Y., Wang, T., Liu, Y. & Zhang, N. Co-delivery of sorafenib and VEGF-siRNA via pH-sensitive liposomes for the synergistic treatment of hepatocellular carcinoma. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **47**, 1374–1383; 10.1080/21691401.2019.1596943 (2019).
336. Tian, T. *et al.* PTEN regulates angiogenesis and VEGF expression through phosphatase-dependent and -independent mechanisms in HepG2 cells. *Carcinogenesis* **31**, 1211–1219; 10.1093/carcin/bgq085 (2010).
337. Kappings, V. Tumormodelle in vitro: von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System, 2017.
338. Park, J., Kim, S., Hong, J. & Jeon, J. S. Enabling perfusion through multicellular tumor spheroids promoting lumenization in a vascularized cancer model. *Lab on a chip* **22**, 4335–4348; 10.1039/D2LC00597B (2022).
339. Chiew, G. G. Y., Fu, A., Perng Low, K. & Qian Luo, K. Physical supports from liver cancer cells are essential for differentiation and remodeling of endothelial cells in a HepG2-HUVEC co-culture model. *Scientific reports* **5**, 10801; 10.1038/srep10801 (2015).
340. Chiew, G. G. Y., Wei, N., Sultania, S., Lim, S. & Luo, K. Q. Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnology and bioengineering* **114**, 1865–1877; 10.1002/bit.26297 (2017).
341. Yukawa, H. *et al.* Imaging of angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by uptake of exosomes secreted from hepatocellular carcinoma cells. *Scientific reports* **8**, 6765; 10.1038/s41598-018-24563-0 (2018).
342. Timmins, N. E., Dietmair, S. & Nielsen, L. K. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* **7**, 97–103; 10.1007/s10456-004-8911-7 (2004).
343. Carbajo-Pescador, S. *et al.* Inhibition of VEGF expression through blockade of Hif1 $\alpha$  and STAT3 signalling mediates the anti-angiogenic effect of melatonin in HepG2 liver cancer cells. *British journal of cancer* **109**, 83–91; 10.1038/bjc.2013.285 (2013).
344. Dumas, S. J., García-Caballero, M. & Carmeliet, P. Metabolic Signatures of Distinct Endothelial Phenotypes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **31**, 580–595; 10.1016/j.tem.2020.05.009 (2020).
345. Kwak, T. J. & Lee, E. In vitro modeling of solid tumor interactions with perfused blood vessels. *Scientific reports* **10**, 20142; 10.1038/s41598-020-77180-1 (2020).
346. Alkasalias, T., Moyano-Galceran, L., Arsenian-Henriksson, M. & Lehti, K. Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *International journal of molecular sciences* **19**; 10.3390/ijms19051532 (2018).

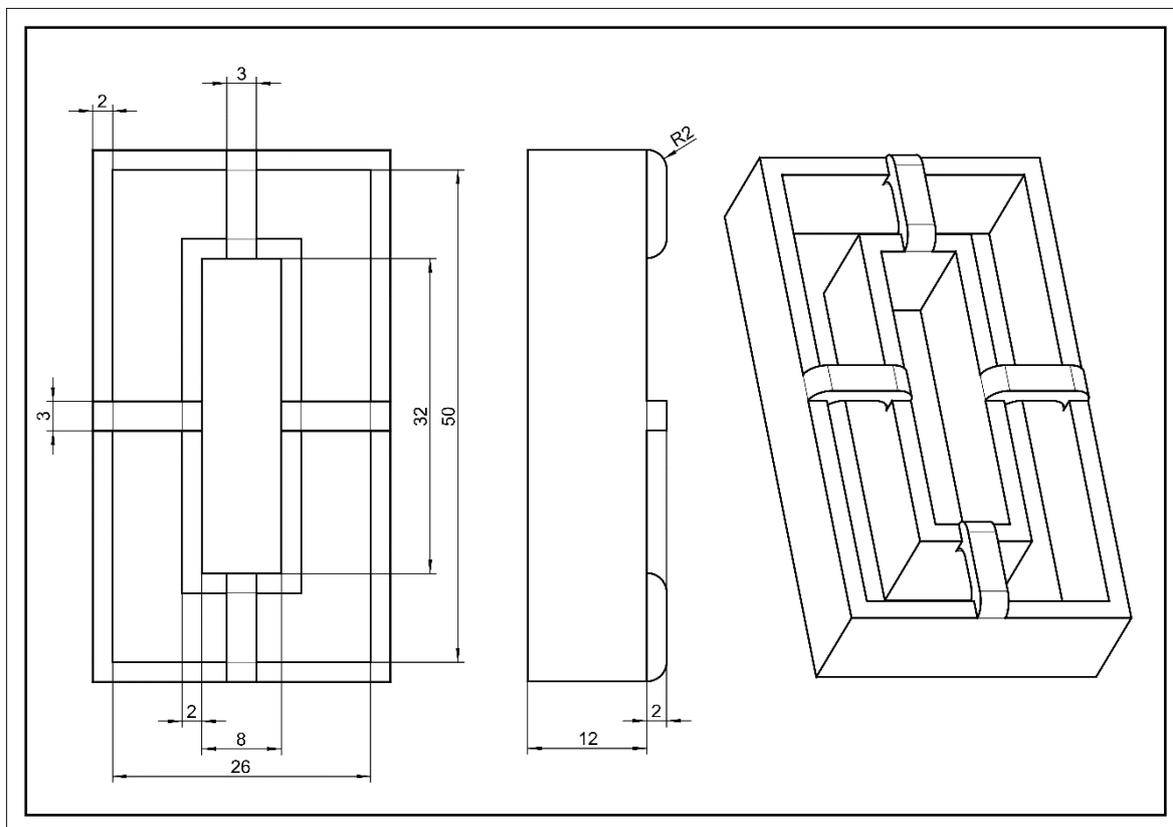
347. Akhavan, A. *et al.* Loss of cell-surface laminin anchoring promotes tumor growth and is associated with poor clinical outcomes. *Cancer research* **72**, 2578–2588; 10.1158/0008-5472.CAN-11-3732 (2012).
348. Klein, G. Evolutionary aspects of cancer resistance. *Seminars in cancer biology* **25**, 10–14; 10.1016/j.semcan.2014.01.001 (2014).
349. Mouw, J. K. *et al.* Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nature medicine* **20**, 360–367; 10.1038/nm.3497 (2014).
350. Seewaldt, V. ECM stiffness paves the way for tumor cells. *Nature medicine* **20**, 332–333; 10.1038/nm.3523 (2014).
351. Stansbury, J. W. & Idacavage, M. J. 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **32**, 54–64; 10.1016/j.dental.2015.09.018 (2016).
352. Unkovskiy, A. *et al.* Stereolithography vs. Direct Light Processing for Rapid Manufacturing of Complete Denture Bases: An In Vitro Accuracy Analysis. *Journal of clinical medicine* **10**; 10.3390/jcm10051070 (2021).
353. Laske, L. M. Photocages zur radikalfreien Photoclickreaktion von gelatinebasierten Hydrogelen für den 3D-Biodruck, 2023.
354. Vijayavenkataraman, S., Yan, W.-C., Lu, W. F., Wang, C.-H. & Fuh, J. Y. H. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews* **132**, 296–332; 10.1016/j.addr.2018.07.004 (2018).
355. Richard, C., Neild, A. & Cadarso, V. J. The emerging role of microfluidics in multi-material 3D bioprinting. *Lab on a chip* **20**, 2044–2056; 10.1039/C9LC01184F (2020).
356. Folkman, J. Angiogenesis Inhibitors: A New Class of Drugs. *Cancer Biology & Therapy* **2**, 126–132; 10.4161/cbt.212 (2003).
357. Auerbach, W. & Auerbach, R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacology & therapeutics* **63**, 265–311; 10.1016/0163-7258(94)90027-2 (1994).
358. Morabito, A., Maio, E. de, Di Maio, M., Normanno, N. & Perrone, F. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *The oncologist* **11**, 753–764; 10.1634/theoncologist.11-7-753 (2006).
359. Hojjat-Farsangi, M. Small-molecule inhibitors of the receptor tyrosine kinases: promising tools for targeted cancer therapies. *International journal of molecular sciences* **15**, 13768–13801; 10.3390/ijms150813768 (2014).
360. Hahn, O. & Stadler, W. Sorafenib. *Current opinion in oncology* **18**, 615–621; 10.1097/01.cco.0000245316.82391.52 (2006).
361. Rini, B. I. Sorafenib. *Expert opinion on pharmacotherapy* **7**, 453–461; 10.1517/14656566.7.4.453 (2006).
362. Kim, W., Park, A., Jang, H. H., Kim, S.-E. & Park, K.-S. Breast Tumor Cell-Stimulated Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Sprouting Capacity of Endothelial Cells by Promoting VEGF Expression, Mediated in Part through HIF-1 $\alpha$  Increase. *Cancers* **14**; 10.3390/cancers14194711 (2022).

- 
363. Gonçalves, I. M. *et al.* Organ-on-a-Chip Platforms for Drug Screening and Delivery in Tumor Cells: A Systematic Review. *Cancers* **14**; 10.3390/cancers14040935 (2022).
364. Wang, S., Mao, S., Li, M., Li, H.-F. & Lin, J.-M. Near-physiological microenvironment simulation on chip to evaluate drug resistance of different loci in tumour mass. *Talanta* **191**, 67–73; 10.1016/j.talanta.2018.08.016 (2019).
365. Sobrino, A. *et al.* 3D microtumors in vitro supported by perfused vascular networks. *Scientific reports* **6**, 31589; 10.1038/srep31589 (2016).
366. Liu, Y. *et al.* Human in vitro vascularized micro-organ and micro-tumor models are reproducible organ-on-a-chip platforms for studies of anticancer drugs. *Toxicology* **445**, 152601; 10.1016/j.tox.2020.152601 (2020).
367. Phan, D. T. T. *et al.* A vascularized and perfused organ-on-a-chip platform for large-scale drug screening applications. *Lab on a chip* **17**, 511–520; 10.1039/c6lc01422d (2017).
368. Nashimoto, Y. *et al.* Vascularized cancer on a chip: The effect of perfusion on growth and drug delivery of tumor spheroid. *Biomaterials* **229**, 119547; 10.1016/j.biomaterials.2019.119547 (2020).
369. Lam, R. H. W., Sun, Y., Chen, W. & Fu, J. Elastomeric microposts integrated into microfluidics for fLow-mediated endothelial mechanotransduction analysis. *Lab on a chip* **12**, 1865–1873; 10.1039/C2LC21146G (2012).
370. Polacheck, W. J., Li, R., Uzel, S. G. M. & Kamm, R. D. Microfluidic platforms for mechanobiology. *Lab on a chip* **13**, 2252–2267; 10.1039/C3LC41393D (2013).
371. Gray, K. M. & Stroka, K. M. Vascular endothelial cell mechanosensing: New insights gained from biomimetic microfluidic models. *Seminars in cell & developmental biology* **71**, 106–117; 10.1016/j.semcdb.2017.06.002 (2017).
372. Caplin, J. D., Granados, N. G., James, M. R., Montazami, R. & Hashemi, N. Microfluidic Organ-on-a-Chip Technology for Advancement of Drug Development and Toxicology. *Advanced healthcare materials* **4**, 1426–1450; 10.1002/adhm.201500040 (2015).
373. Maschmeyer, I. *et al.* A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab on a chip* **15**, 2688–2699; 10.1039/C5LC00392J (2015).
374. Caballero, D. *et al.* Organ-on-chip models of cancer metastasis for future personalized medicine: From chip to the patient. *Biomaterials* **149**, 98–115; 10.1016/j.biomaterials.2017.10.005 (2017).



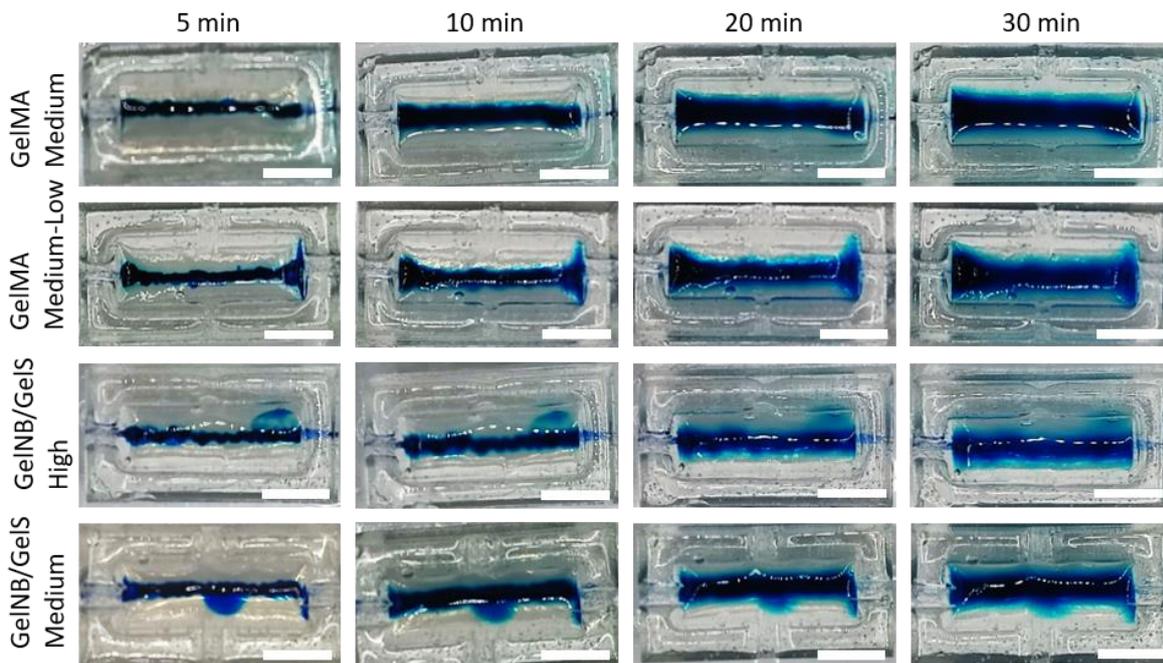
## 8 Anhang

### Kapitel 3.2.1.1: Fertigung der Chips

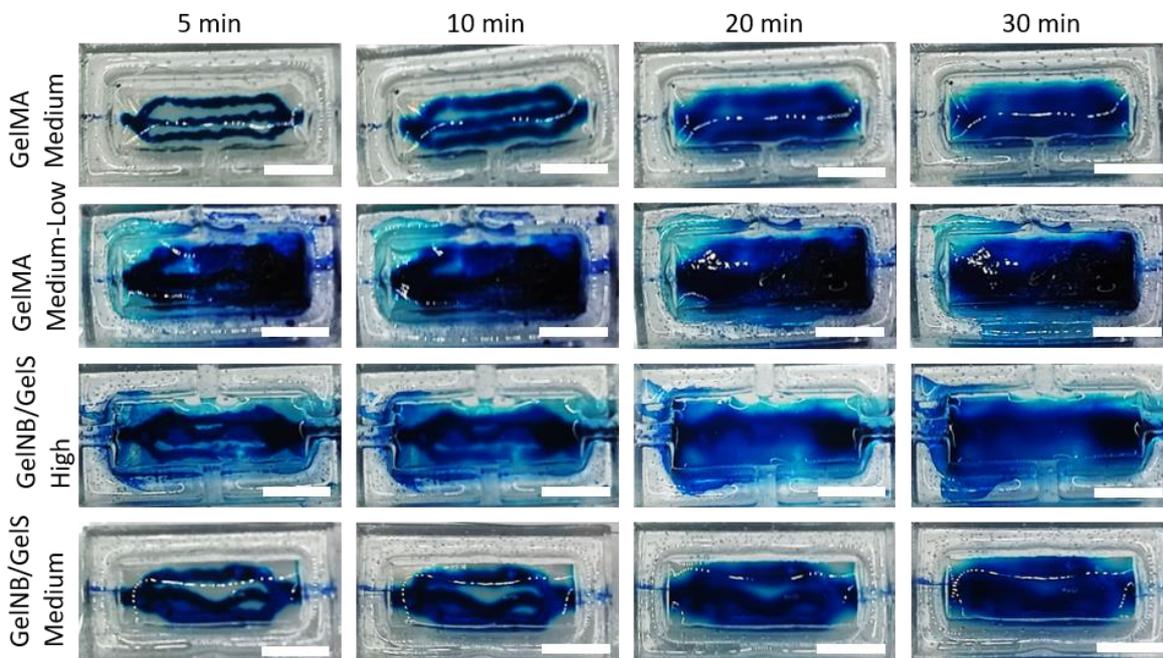


**Abbildung 88: Technische Zeichnung des Gussrahmens.** Technische Zeichnung der mit CAD konstruierten PDMS-Gussform für den Rahmen des extrusionsbasierten Chips.

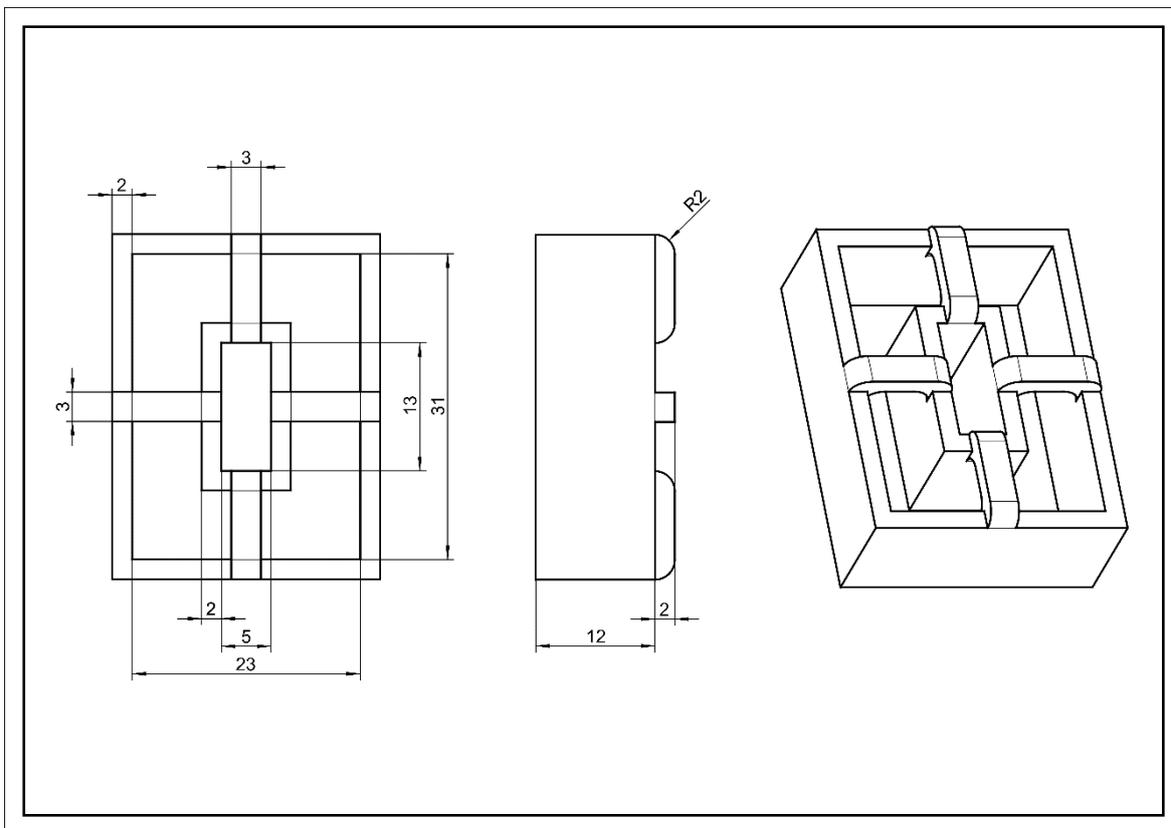
### Kapitel 3.2.1.2: Kanalstrukturen



**Abbildung 89: Diffusion im Chip mit einfachem Kanal.** Zur Untersuchung der Diffusionseigenschaften in den Hydrogelchips mit einfachen Kanälen wurden Chips aus GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* hergestellt. Die Gelatine wurde zunächst mit Wasser aus den Kanalstrukturen gespült, dann wurden alle mit einer 30 mM Methylenblaulösung gefüllt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde von jedem Chip alle 5 min ein Foto aufgenommen um die Diffusion des Farbstoffs aus dem Kanal in das Hydrogelkompartiment hinein zu beobachten. Maßstab: 1,5 mm.



**Abbildung 90: Diffusion im Chip mit verzweigtem Kanal.** Zur Untersuchung der Diffusionseigenschaften in den Hydrogelchips mit verzweigten Kanälen wurden Chips aus GelMA *Medium*, GelMA *Medium-Low*, GelNB/GelS *High* und GelNB/GelS *Medium* hergestellt. Die Gelatine wurde zunächst mit Wasser aus den Kanalstrukturen gespült, dann wurden alle mit einer 30 mM Methylenblaulösung gefüllt. Über einen Zeitraum von 30 min wurde von jedem Chip alle 5 min ein Foto aufgenommen um die Diffusion des Farbstoffs aus dem Kanal in das Hydrogelkompartiment hinein zu beobachten. Maßstab: 1,5 mm

**Kapitel 3.2.2.1: Fertigung der Chips**

**Abbildung 91: Technische Zeichnung des Gussrahmens.** Technische Zeichnung der mit CAD konstruierten PDMS-Gussform für den Rahmen des Xolographie-basierten Chips.