

Elektrojetting von polymerbasierten 3D-Strukturen für maßgeschneiderte biologische Systeme

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (DR.-ING.)

von der KIT-Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
M.Sc. Anke Steier

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2025

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb

Zweitgutachter: Prof. Dr. Joerg Lahann



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung -
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 International Lizenz (CC BY-SA 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.de>

Kurzfassung

Dank fortschrittlicher Techniken kann die Transplantation heute viele Leben retten. Das Hauptproblem ist jedoch der Zugang zu ausreichend verfügbaren Organen und Geweben. Eine mögliche Lösung ist die künstliche Reproduktion. Maßgeschneiderte biologische Systeme sind technisch hergestellte Systeme mit biologischen Komponenten, die biologische Funktionen übernehmen. Sie können als Organersatz, zur Heilung von Krankheiten oder zur Medikamentenherstellung eingesetzt werden. Die Herausforderung, die gewünschte Endfunktion zu erreichen, liegt in der komplexen Beziehung zwischen den künstlichen und den natürlichen Komponenten. Ein Ansatz im Bereich des Tissue Engineering sind additive Fertigungsverfahren, unter anderem das Bioprinting. Um die biologische Aktivität nach der Herstellung zu gewährleisten, müssen die gewählte Herstellungsmethode und die verwendeten Materialien zellverträglich sein. Diese Anforderung schränkt die zur Verfügung stehenden Methoden, z.B. durch den Einsatz von Wärme, stark ein. Um eine geeignete Auflösung der fein strukturierten extrazellulären Matrix (ECM) abilden zu können, bieten sich hochauflösende 3D-Druckverfahren auf Basis des Elektrojetting an. In dieser Arbeit werden neue Materialsysteme und Herstellungsverfahren vorgestellt. Zwei Materialsysteme, basierend auf Poly(acrylsäure) (PAA) und Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) / PAA, bestehen aus synthetischen Hydrogelen. Das dritte Materialsystem besteht aus natürlich vorkommendem Kollagen. Für jedes dieser Materialsysteme wurde ein Elektrojetting-Prozess optimiert, so dass orientierte Fasern, Scaffolds und dreidimensionale Netzwerke hergestellt werden konnten. Durch elektrohydrodynamisches Co-Jetting konnten intelligente PAA-Fasern mit einem Durchmesser von 5,2 µm produziert werden. Die PAA-Fasern rollten sich spontan auf und bildeten Mikrofedern, wenn sie Puffern als Stimulus ausgesetzt waren. Die formgebende Bewegung ist auf das anisotrope Quellverhalten der unterschiedlichen Vernetzungsgrade der Polymerlösungen zurückzuführen und somit abhängig von der verwendeten Puffersubstanz, dem pH-Wert und der Ionenstärke. Die Mikrofedern bildeten sich innerhalb von Sekunden und sind damit deutlich schneller als bisher bekannte Formänderungsbewegungen. Die Fasern bildeten Federn mit einem maximalen Durchmesser von 487 µm und zeigten ein gutes Rückstellverhalten nach äußerer Krafteinwirkung. Diese Mikrodimensionen machen die elektrogesponnenen Mikrofedern für den Bereich der künstlichen Muskeln und der Soft-Robotik sehr interessant. Durch Stapelung der Einzelfasern konnten rechteckige Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Gittergrößen und einer maximalen Höhe von 150 µm hergestellt werden. Um eine möglichst naturgetreue dreidimensionale Nachbildung der ECM zu erreichen, wurden dreidimensionale Proteinnetze aus Kollagen mikrometergenau positioniert. Dies konnte mit Hilfe einer eigens entwickelten 3D-Netz Jet Station realisiert werden. Grundlage der Optimierung der elektrodynamischen Herstellungstechnik war die Gestaltung der Erdung und deren Einfluss auf das elektrische Feld. Dies ermöglichte die gezielte Ablagerung von Kollagenfasern in Mikrokavitäten verschiedener Arrays und Scaffolds. Die Proteinfasern spannten sich als dreidimensionale Kollagennetzwerke über den gesamten Querschnitt sowie über die gesamte Höhe der einzelnen Kavitäten. Durch das Aufbringen einer doppelten Linienerdung erhielt das Kollagennetz zusätzlich eine Richtungsorientierung. Auf diese Weise können Gewebetypen nachgebildet werden, die Belastungen in einer bestimmten Richtung ausgesetzt sind. Zellkulturen von Hepatozyten in Mikrokavitäten mit Kollagennetzen zeigten die Eignung als biologisches System. Darüber hinaus wurden direkt biologisch aktive 3D-Strukturen mit kontrollierten und definierten Mikroporen gedruckt. Unter anderem wurden Enzyme in filigranen Mikrostrukturen immobilisiert. Die Enzyme zeigten eine hohe Aktivität auch über längere Zeiträume hinweg und eignen sich für den Einsatz

in industriellen Enzymprozessen. Darüber hinaus eignet sich das Materialsystem für das direkte Drucken von Zellen und eröffnet damit eine völlig neue Dimension des Bioprintings.

Abstract

Thanks to revolutionary techniques transplantation can save many lives today. However, the main issue is the access to enough available organs and tissues. One possible solution is artificial replication. Tailor-made biological systems are engineered systems with biological components that take on biological functions. They can be used to replace organs, to cure diseases or to manufacture drugs. The challenge of achieving the desired end function lies in the complex relationship between the artificial and natural components. One approach to tissue engineering is additive manufacturing, including bioprinting. To ensure biological activity after fabrication, the chosen manufacturing method and the materials used must be cell compatible. This requirement severely limits the available methods, e.g. through the use of heat. High-resolution 3D printing methods based on electrojetting are suitable to mimic the finely structured extracellular matrix (ECM) at a sufficient resolution. In this work, new material systems and fabrication methods are presented. Two material systems, based on Poly(acrylic acid) (PAA) and Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) / PAA, are composed of synthetic hydrogels. The third material system is naturally occurring collagen. An electrojetting process was then optimised for each of these material systems to produce oriented fibres, scaffolds and three-dimensional meshes. Electrohydrodynamic co-jetting was used to produce smart PAA fibres with a diameter of 5.2 μm . The PAA fibres spontaneously coiled and formed microsprings when stimulated by buffers. The shaping movement is due to the anisotropic swelling behaviour of the different cross-linking degrees of the polymer solutions and is therefore dependent on the buffer substance, pH and ionic strength used. The microsprings formed within seconds, which is much faster than previously published shape-changing movements. The fibres formed springs with a maximum diameter of 487 μm and showed good recovery behaviour after external force application. This microdimension makes the electrojet microsprings very interesting for artificial muscles and soft robotics. By stacking the individual fibres, rectangular framework structures with different lattice sizes and a maximum height of 150 μm could be produced. To achieve the most lifelike three-dimensional mimic of the ECM, three-dimensional protein networks of collagen were positioned with micrometre precision. The optimization of the electrodynamic fabrication technique was based on the design of the grounding and its influence on the electric field. This enabled the targeted deposition of collagen fibres in microcavities of different arrays and scaffolds. The protein fibres spanned the entire cross-section and height of the individual cavities as three-dimensional collagen networks. The application of a double line grounding gave the collagen network an additional directional orientation. In this way, it is possible to mimic tissue types that are subjected to stress in a specific direction. Cell cultures of hepatocytes in microcavities with collagen networks showed the suitability as a biological system. Furthermore, biologically active 3D structures with controlled and defined micropores have been directly printed. This included immobilizing enzymes in filigree microstructures. The enzymes showed high activity even over long periods of time and are suitable for use in industrial enzyme processes. In addition, the material system is suitable for the direct printing of cells and thus opens up a completely new dimension in the scaling of bioprinting.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	i
Abstract.....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
Vorwort.....	xv
1 Einleitung.....	1
1.1 Maßgeschneiderte biologische Systeme	1
1.1.1 Geweberekonstruktion	2
1.1.2 Industrielle Enzymprozesse	3
1.2 Mikrofabrikation von Scaffolds	5
1.2.1 Bioprinting	6
1.2.2 Elektrojetting	7
1.2.3 Strukturiertes Elektrojetting	8
1.3 Die naturinspirierte vierte Dimension durch Selbstassemblierung	12
1.4 Das Material: Polymere.....	13
1.4.1 Natürlich vorkommende Biomakromoleküle.....	14
1.4.2 Synthetische Polymere	15
2 Herausforderung der aktuellen Forschung	19
3 Zielsetzung der Arbeit	21
4 Material und Methoden.....	23
4.1 Materialien	23
4.2 Polymertinten für Elektrojettingverfahren	23
4.3 Herstellung der Puffer	25
4.4 Elektrojettingverfahren	25
4.5 Extrusionsbasierter 3D-Druck	28
4.6 Molekulare Quervernetzung	29
4.7 Charakterisierung der Materialsysteme.....	30
4.8 Charakterisierung der Gerüststrukturen und Fasern	32
4.9 Enzymversuche	33
4.10 Simulation	34
4.11 Zellkultivierung.....	35
5 Konzipierung von Smart-actuating-Polymerfasern und Scaffolds	37
5.1 Elektrojetting von bikompartimentellen PAA Fasern und 3D-Scaffolds	38
5.1.1 Die PAA Faser und ihre zwei Kompartimente	38
5.1.2 3D-Architekturen aus bikompartimentalen Polymerfasern	40
5.2 Vernetzungsgrad und Quellverhalten der Einzelkompartimente	41

5.3	Shape-shifting-Fasern und der Einfluss des Stimulus	43
5.3.1	Spontanes Shape-Shifting von bikompartimentellen Fasern	44
5.3.2	Einflussfaktoren auf die formgebende Bewegung	45
5.3.3	Charakterisierung der Mikrofeder	47
5.4	Anwendung der Mikrofedern in Sensoren und deren Potenzial in der Soft-Robotik	50
6	Konzipierung von 3D Proteinstrukturen zur Nachbildung der ECM	53
6.1	Der Einfluss der Jett- und Lösungsparameter auf die Morphologie und Stabilität von Kollagen-Membranen.....	53
6.1.1	Entwicklung eines PLGA-Stützgitters als Membranunterkonstruktion.....	53
6.1.2	Die Kollagenfaser in Abhängigkeit der Polymerkonzentration	54
6.1.3	Die Morphologie der Kollagenmembran in Abhängigkeit der zeitlichen Jet- und Vernetzungparameter	56
6.2	Entwicklung der 3D Netz-Jet Anlage	63
6.3	Dreidimensionale Proteinnetze: Struktur, Anordnung und Toxizität.....	65
6.3.1	Ausbildung des 3D-Proteinnetzes in Z-Ebene	65
6.3.2	Strukturmanipulation mittels elektrischem Feld	67
6.3.3	Zellkultivierung in dreidimensionalen Kollagen-Netzen	69
6.4	Potenzial und Forschungsansätze der Kollagenstrukturen	70
7	3D-jet Writing von enzym- und zellbeladenen Hydrogelstrukturen	73
7.1	Die elektrohydrodynamische Hydrogellösung und ihre makromolekulare Struktur	74
7.1.1	Tintenentwicklung auf Wasserbasis und ihre rheologischen Eigenschaften	74
7.1.2	Makromolekulare Struktur der Biotinte	75
7.2	Einstellbare dreidimensionale Gerüstarchitekturen im Mikrometermaßstab	77
7.2.1	Mikrostrukturierte Hydrogelscaffolds.....	77
7.2.2	Quellverhalten der Gerüststrukturen	79
7.3	3D-jet Writing von biologisch aktiven Enzymen	80
7.3.1	Enzymaktivitäten im Batch-Ansatz.....	80
7.3.2	Transportkapazität der Reaktanten	82
7.4	3D-jet Writing von biologisch aktiven Zellen.....	85
7.5	Potenzial der mehrdimensionalen aktiven Materialsysteme für multidimensionale Zellsysteme.....	86
8	Fazit und Ausblick	89
	Literaturverzeichnis.....	93
	Publikationen und internationale Vorträge	101
	Betreute Abschlussarbeiten	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Arbeitsablauf bei der Herstellung künstlicher Gewebe unter Verwendung von informationsgesteuertem Design für Tissue Engineering und regenerative Medizin.	3
Abbildung 2	Schematische Darstellung von unterschiedlichen Immobilisierungsarten von Enzymen.	4
Abbildung 3	Mikrofabrikationsmethoden aufgeschlüsselt nach ihrer Auflösung der hergestellten Filamentgröße und der verwendeten physikalischen Methode	6
Abbildung 4	Formierung des Tylorkegels beim Elektrojetten in Abhängigkeit der angelehten elektrischen Spannung	7
Abbildung 5	Schematischer Aufbau einer Elektrojetting-Station.	8
Abbildung 6	In der Forschung verwendete Kollektordesigns zur strukturierung der Faserabscheidung beim Elektrojetting	9
Abbildung 7	Aufbauten verschiedener Elektrospinnmethoden zur kontrollierten und strukturieren Anordnung der Fasern.	11
Abbildung 8	Durch spezielle Anordnung der Nadeln können mittels elektrohydrodynamischen Co-Jetting Fasern mit mehren Kompartimenten herstellt werden.....	12
Abbildung 9	Prinzip des Shape-Shiftings anhand einer sich öffnenden Blüte. Die Bewegung wird dabei durch einen Stimulus ausgelöst.	13
Abbildung 10	Molekularer und makromolekularer Aufbau von Kollagen	15
Abbildung 11	Einflussfaktoren auf die Funktion und das Verhalten von Zellen beim Tissue Engineering	19
Abbildung 12	Schematische Darstellung der Fabrikationsparameter und deren Einfluss auf die Hydrogele, Herstellverfahren und Zellen. Diese stehen in komplexen Wechselwirkungen zueinander.	20
Abbildung 13	Übersicht der Arbeitspaketegliedert in Material, Herstellverfahren, Scaffoldcharakterisierung und potenzielle Anwendung.....	22
Abbildung 14	Laboraufbau einer variablen Jetting-Station. Weiterentwicklung des Grundaufbaus durch einen beweglichen und computergesteuerten Kollektor zur präzisen Orientierung der Fasern auf dem Kollektor	26
Abbildung 15:	Schema zur Herstellung von Gerüststrukturen mit einstellbarer Quadrantengröße (a) und Anfahrtstrecke (b)	27
Abbildung 16	Reaktionskammer zum Aushärten von filigranen Hydrogelstrukturen unter Schutzgas	30
Abbildung 17	Schematischer Aufbau der 3D-Elektrojetting-Station mit computergesteuertem Kollektor. Durch hydrodynamisches Co-Jetting können bikompartimentale PAA Fasern mikrometergenau positioniert und strukturiert werden	37
Abbildung 18	Floureszenzmikroskopische Aufnahmen der bikompartimentellen Fasern	39
Abbildung 19	Fourier-Transformations-Infrarotspektrum von EG, PAA, 15 % PAA und 0,5 % EG in Wasser, 15 % PAA und 20 % EG in Wasser und vernetzten bikompartimentalen Fasern.	40

Abbildung 20	Elektrogejettete 3D-Architekturen aus PAA-Polymer-Fasern.....	41
Abbildung 21	Quellverhalten der einzelnen PAA-Kompartimente in Abhängigkeit vom Puffer und des pH-Wertes.....	43
Abbildung 22	Formveränderung von Fasern zu Mikrofedern.....	45
Abbildung 23	Aufrollverhalten der Polymerfasern.....	47
Abbildung 24	Mikroskopische Aufnahme einer bikompartimentellen Feder.....	48
Abbildung 25	Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen vom Rückstellverhalten einer auf einer Seite befestigten Mikrofeder.....	49
Abbildung 26	Eine temperaturabhängige Mikrofeder.....	50
Abbildung 27	Faserdurchmesser des PLGA Stützgitters in Abhängigkeit von der Druckgeschwindigkeit und der Flussrate der Polymerlösung.....	54
Abbildung 28	REM-Bilder von Kollagenfasern bei verschiedenen Polymerkonzentrationen der Jetlösung.....	55
Abbildung 29	Einfluss der Polymerkonzentration auf die Faserdurchmesser von elektrogejetteten Kollagenfasern.....	56
Abbildung 30	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfasern auf PLGA-Stützgerüst mit variabler Jettingzeit.....	57
Abbildung 31	Mikro-Kollagen-Hängematten nach einer Jettingzeit von 10 min,	57
Abbildung 32	REM Aufnahmen der Kollagenmembranen vor (oben) und nach(mittig) dem Quervernetzen mittels verschiedener Methoden zeigen unterschiedliches Quellverhalten;	59
Abbildung 33	Über die Jettingdauer lässt sich die Porosität der Membran einstellen.....	60
Abbildung 34	Prozentuale Porenflächenverteilung von elektrogejettetem Kollagenmembranen aus 3,5 % (w/v) Kollagen in HFP bei unterschiedlichen Jettingzeiten	61
Abbildung 35	REM-Aufnahmen von verschiedenen Quervernetzungszeiten und einer anschließenden Verweilzeit im wässrigem Milieu von 1 h zeigen eine Stabilisierung der Fasermorphologie nach 8h;	62
Abbildung 36	Kollagenmembran mit 5 cm Kantenlänge mit gewünschter und einstellbarer Morphologie auf Grund optimierter Parameter:.....	63
Abbildung 37	Entwicklung und Konstruktion einer punktuellen 3D-Jetting Station zur gezielten Deposition von Proteinstrukturen.....	64
Abbildung 38	Aufnahmen mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop von unterschiedlichen Mikrokavitäten zeigen Kollagenfasern (grün) die sich dreidimensional durch die Mikrokavität spannen.....	66
Abbildung 39	Aufnahmen mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop von elektrogejetteten PAA Scaffolds (rot) in welchen sich dreidimensionale Kollagennetze (grün) spannen.	67
Abbildung 40	Ersatz der Punktierung (oben) durch eine Doppelerdung (unten) im 3D-Netz-Jetting Aufbau.....	68
Abbildung 41	Verteilung der Faserorientierung bei Verwendung verschiedener Erdungsdesigns während des Jet-Vorgangs.....	69
Abbildung 42	cLSM-Aufnahmen zur Kultivierung von Hepatocyten in 300 µm-Mikrokavitäten mit elektrogesponnenen Kollagenfasern	70

Abbildung 43	Aufbau der 3D-jet Writing Station für Hydrogelfasern.....	73
Abbildung 44	Variationen der verschiedenen Polymerkonzentrationen zeigen einen enormen Einfluss auf die Stabilität des elektrodymanischen Jets.	74
Abbildung 45	Rheologiemessungen von reinem PEGDA und PEGDA gemischt mit PAA.....	75
Abbildung 46	SAXS Messungen zeigten den Einfluss von PAA und PEGDA auf die makromolekulare Struktur der Hydrogele;	77
Abbildung 47	REM-Aufnahmen von Gerüststrukturen aus Hydrogel, die durch 3D-jet Writing hergestellt wurden,	77
Abbildung 48	Mittels 3D-jet Writing ist eine hohe Präzision bei der Faserorientierung möglich	78
Abbildung 49	Dreidimensionale Mikroarchitektur der Hydrogelgerüste.	79
Abbildung 50	Wasseradsorptionskapazität für Hydrogelgerüste, um eine attraktive Umgebung für biologisch aktive Materialien zu schaffen.	80
Abbildung 51	Aktivitätsmessungen für eingeschlossene β -Galaktosidase in den Hydrogelgerüsten. ..	81
Abbildung 52	Digital nachgebildete Elementarzelle der Hydrogel-Scaffolds zur Simulation der Diffusion.	82
Abbildung 53	Die Simulation der Diffusion des Substrats oNPG und des Produkts oNP veranschaulicht die Verteilung von Reaktant und Produkt innerhalb des Hydrogel-Gerüsts.	83
Abbildung 54	Die stabile Immobilisierung von Enzymen in elektrohydrodynamischen Hydrogelgerüsten	84
Abbildung 55	Produktkonzentrationsdaten eines Durchflussreaktors mit enzymbeladenen Hydrogel-Gerüsten.	85
Abbildung 56	Bioprinting mittels 3D-jet Writing von lebenden Zellen.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zusammensetzung der verschiedenen Jetting-Tinten mit unterschiedlichen PAA- und Wasser/PEGDA-Verhältnissen	24
Tabelle 2	Zusammensetzung der verschiedenen Puffern	25

Abkürzungsverzeichnis

IMR	Institut für Mess- und Regelungstechnik
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
4D	vierdimensional
CAD	computergestütztes Design
CLIP	Continuous Liquid Interface Production
cLSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
DIW	Direct Ink Writing
DLW	Direct Laser Writing
Ecoli	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EG	Ethylenglykol
EMW	Schmelzelektrospinnschreiben (melt electrospinning writing)
et al.	und andere (et alia)
FDM	Fused Deposition Modelling
GDA	Glutardialdehyde
Gly	Glycin
HFP	1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol
hMSCs	humanen mesenchymalen Stromazellen
hPDL	humanem Parodontalligamentzellen
IR	Infrarot
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
NFES	Nahfeld-Elektrospinnen (near-field electrospinning)
oNP	ortho-Nitrophenol
oNPG	O-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

PAA	Poly(acrylsäure)
PEGDA	Poly(ethylenglykol)diacrylat
PLA	Polymilchsäure
PLC	Polycaproacton
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PNIPAAm	Poly-N-Isopropylacrylamid
PPII	Polypropoline-II (Helix)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAXS	Röntgenkleinwinkelstreuung (small-angle X-ray scattering)
UV	Ultraviolettstrahlung
z.B.	zum Beispiel

Vorwort

Jetzt am Ende meiner Promotion kann ich mit Gewissheit sagen, dass das Anfertigen einer Doktorarbeit nicht bedeutet, sich in ein dunkles Labor zurückzuziehen und nach ein paar Jahren mit einem schlauen Titel wieder herauszukommen. Zum Gelingen meiner Dissertation war die Hilfe und die Unterstützung vieler toller Menschen notwendig, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Mein herzlichster Dank geht zuallererst an Prof. Dr. Jörg Lahann und Prof. Dr.-Ing. Matthias Franzreb für das entgegengebrachte Vertrauen während meiner ganzen Promotion und die Freiheit bei der Gestaltung des Themas. Vielen Dank für die fachliche Unterstützung und richtungsweisenden Diskussionen. Ihr habt mir beigebracht Experimente kritisch zu betrachten und mich für meine Ziele einzusetzen, sodass ich sowohl persönlich als auch beruflich wachsen konnte.

Ein großes Dankeschön geht an Dr.-Ing Barbara Schmieg und Dr. Meike König-Edel die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Ich hatte das Glück von zwei erfahrenen Wissenschaftlerinnen lernen zu dürfen, die sowohl fachlich als auch privat immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Ich möchte außerdem meinen fleißigen Studenten danken. Ohne eure Unterstützung im Labor wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank an Roxana Diesela und Yannic Irtel von Brenndorf für das entgegengebrachte Vertrauen, eure Masterarbeit betreuen zu dürfen. Dies gilt ebenfalls für die Bacheloranten Dhana Röhrs, Judith Dangel und Enrique Sampero. Zudem unterstützen mich Philipp Weber, Leonie Hillen, Andres Gonzales und Lorenzo Wormer bei den Experimenten im Labor. Ich danke euch für euren Elan, eure Ideen, eure selbstständige Arbeitsweise und die entspannte und lustige Stimmung im Labor.

Des Weiteren danke ich meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Eric Gottwald, Dr. Taleieh Rajabi und Dr.-Ing Barbara Schmieg für die Unterstützung, Mitentwicklung und Befeuierung meiner Ideen. Es hat mir wirklich große Freude bereitet gemeinsam mit euch Ideen weiter zu spinnen, auf Machbarkeit zu überprüfen und Problemlösungen zu entwickeln.

Die fantastische Unterstützung bei organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten durch Dr. Angela Weiss, Astrit Biedermann und Annette Böttcher war mir eine große Hilfe. Vielen Dank für eure unermüdliche Power im Hintergrund.

Bei allen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern möchte ich mich für die stete Hilfsbereitschaft und lehrreiche Zeit bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an die Abteilung für Bioprozesstechnik und Biosysteme für die sympathische „Adoption“ in den Pausen. Außerdem möchte ich meinen Kollegen in Michigan, vor allem Ayse Muniz und Dylan Neale für die wöchentlichen fachlichen Diskussionen im Subgroupmeeting und während des Reviews danken und für euer Verständnis und den guten Humor, mit dem ihr immer wieder die Sprachbarriere abgefangen habt.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und Mitbewohnern für die Unterstützung und Motivation bedanken. Durch euch hatte ich eine tolle Zeit in Karlsruhe und konnte neue Energie für die Arbeit sammeln. Mein tiefempfundener Dank gebührt meiner Familie, die mit ihrer lieben und verständnisvollen Art sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ohne die Unterstützung durch

Vorwort

meine Eltern, meinem Bruderherz Steffen, meinem Mann Volker, und meinem lieben Sohn Thorin wäre der Abschluss dieser Arbeit nicht gelungen.

Friedrichshafen, im August 2024

Anke Steier

1 Einleitung

Der Traum, geliebte Menschen zu retten, ist so alt wie die Menschheit. Verletzungen, Krankheiten und angeborene Missbildungen sind seit jeher Teil der menschlichen Erfahrung. In der Geschichte manifestierte sich dieser Wunsch lange Zeit in Magie, Mythen und Legenden. Erst mit der Entdeckung der Wissenschaft kam ein neues Verständnis von Biologie, Krankheit und Trauma auf. Die daraus entstandene rekonstruktive Chirurgie konnte die Lebensqualität vieler Patienten durch den Wiederaufbau von Körperstrukturen, die fehlende Funktionen ersetzen, erheblich verbessern. Die ständige Weiterentwicklung des Wissens führte zu revolutionären Techniken wie der Transplantation von Geweben und Organen von einem Menschen auf einen anderen. In Verbindung mit der Pharmazie und der Arzneimittelentwicklung ist es gelungen, die molekularen und zellulären Ereignisse der Immunreaktion des Patienten zu steuern und so die lebensrettenden Funktionen der Organe zu gewährleisten. Auch wenn die Transplantation heute eine sehr erfolgreiche Lösung darstellt, ist das Hauptproblem der Zugang zu ausreichend verfügbaren Organen und Geweben. In Deutschland stehen derzeit 9697 Patienten auf der Warteliste für eine Transplantation. Demgegenüber stehen 3113 postmortal gespendete Organe im Jahr 2018.^[1] Diese Diskrepanz führt zu vielen Leidens- und Todesfällen bei den wartenden Patienten. Selbst eine erfolgreiche Transplantation kann im Nachhinein zu Problemen mit dem Immunsystem, chronischer Abstoßung und Gewebezerstörung führen. Bei Implantaten, die die Funktion des betroffenen Gewebes ersetzen sollen, werden zusätzlich Fremdkörper verwendet. Diese führen im Laufe der Zeit häufig zu Infektionen an der Gewebegrenzfläche, Frakturen oder Abstoßungsreaktionen.^[2] Der Bedarf, maßgeschneidertes funktionsfähiges Gewebe bereitzustellen hat neue Lösungswege durch die Kombination aus Biologie und Technik entstehen lassen.

1.1 Maßgeschneiderte biologische Systeme

Systema kommt aus dem Altgriechischen und bedeutet „aus mehreren Einzelteilen zusammengesetztes Ganzes“. Es bezeichnet damit ein abgrenzbares Gebilde, das aus verschiedenen Komponenten besteht, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Aufgrund bestimmter geordneter Beziehungen der Komponenten zueinander kann das System als geschlossenes Ganzes mit eigenen Merkmalen betrachtet werden. Natürliche biologische Systeme sind Systeme, die sich selbst erhalten und ohne gezielten anthropogenen Einfluss entstanden sind, zum Beispiel Organe, Organismen oder Biofilme.^[3] Sie stehen denen von Menschen erdachten und konstruierten künstlichen Systemen wie einer Maschine oder technischen Anlage entgegen. Maßgeschneiderte biologische Systeme vereinen beide Kategorien. Die Merkmale eines biologischen Systems können durch künstlich eingebrachte Komponenten beeinflusst werden. Genau so kann ein technisches System so ausgelegt werden, dass es durch Zugabe von natürlichen biologischen Komponenten die Fähigkeit erhält, biologische Funktionen auszuführen, um diese beispielsweise für die Medizin nutzbar zu machen. Die Herausforderung ist dabei, die Beziehungen der künstlichen und natürlichen Komponenten zueinander so zu gestalten, dass die gewünschte Endfunktion gegeben ist.

1.1.1 Geweberekonstruktion

Tissue Engineering (englisch für Gewebekonstruktion oder Gewebezüchtung) ist die Herstellung von lebendem künstlichen Gewebe als biologischer Ersatz für eingeschränktes oder krankhaftes Gewebe eines Patienten. Um das ursprüngliche Gewebe rekonstruieren zu können, ist dazu ein fundamentales Verständnis von den Struktur-Funktions-Beziehungen der natürlichen Vorlage notwendig. Ein Organ ist ein hochspezialisierter Teil des Körpers, der als selbstständiges System eine bestimmte Aufgabe erfüllt. Es setzt sich wiederum aus mehreren strukturiert angeordneten Geweben zusammen. Der Mensch besitzt vier verschiedene Grundgewebearten: das Epithelgewebe, das Bindegewebe, das Muskelgewebe und das Nervengewebe. Diese wiederum haben verschiedene Aufgaben wie die Abgrenzung und der Verbund von Strukturen, die Bewegung oder die Steuerung^[4]. Grundsätzlich setzt sich jedes Gewebe aus Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM) zusammen. Die ECM als nicht zelluläre Komponente übernimmt wichtige Funktionen innerhalb des Körpers. Sie bildet das physische Gerüst für die Zellen und sendet biochemische und biomechanische Signale, welche die Form und Funktion von Geweben beeinflussen. Die ECM ist eine hochdynamische Struktur, die ständig enzymatisch oder nicht-enzymatisch umgebaut wird und deren molekulare Komponenten einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen unterzogen werden. Um die Komplexität nachzuhören zu können, müssen die Methoden von Bio-, Werkstoff- und Ingenieurwissenschaften interdisziplinär kombiniert und die grundlegendsten Eigenschaften von Geweben berücksichtigen werden, die eine Funktion ermöglichen.^[5] Das klassische Tissue Engineering beruht auf der Nachahmung der extrazellulären Matrix durch die Verwendung natürlicher oder synthetischer Materialien, die typischerweise als "Scaffolds" (englisch für Gerüste) bezeichnet werden und die Zellen unterstützen.^[6] Zusammensetzung, Architektur, mechanische Eigenschaften und die biologisch aktiven Zusätze des Gerüsts sollten genau auf das Zielgewebe abgestimmt sein.^[7] So ist es extrem wichtig die Interaktion zwischen Zellen und den Zellen mit der umgebenden ECM bestmöglich nachzuahmen. Bei der Betrachtung dieses riesigen Designraums sollte man sich bewusst sein, dass sich native Matrixmoleküle hierarchisch zu komplexen und vielfältigen Suprastrukturen zusammensetzen, die verschiedene Funktionen ermöglichen. Diese können beispielsweise von der Lichtübertragung in der Hornhaut bis zur lebenslang anhaltenden Kontraktion des Herzmuskels reichen.^[8] Die Fähigkeit der Natur zur präzisen hierarchischen Organisation ermöglicht eine enorme Funktionalität, mit der Gewebetechniker und Materialwissenschaftler nur schwer konkurrieren können.^[9]

Jüngste Fortschritte in der Mikro- und Biofabrikation haben mit neuen biologischen und computergestützten Werkzeugen eine neue Dimension in der Entwicklung komplexer biologischer Systeme eröffnet. Um geeignete physikalische, mechanische und biologische Eigenschaften zu erreichen, ist es erforderlich in der regenerativen Medizin biologische Systeme mit synthetischen Polymermaterialien zu kombinieren.^{[10][11]} Das aktuelle Vorgehen ist dabei schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Des Weiteren haben Fortschritte bei den additiven Herstellungstechniken zu einer erhöhten Funktionalität und Komplexität der gezüchteten Gewebestrukturen geführt.^[12] Allerdings wurden breitere Durchbrüche durch technologische Kompromisse behindert, die durch ein begrenztes Verständnis der strukturellen Komplexität biologischer Gewebe bedingt sind. Um natives Gewebe imitieren zu können, muss das komplexe Zusammenspiel zwischen Zellen verschiedener Phänotypen, ihrer lokalen Mikroumgebung und ihrer zeitabhängigen Interaktionen definiert werden.^[13] Neben einer klaren Reihe von Biospezifikationen sind individuelle anatomische Architekturen Schlüsselemente, die für die Nachahmung von natürlichem Gewebe erforderlich sind. In diesem Zusammenhang ermöglicht die medizinische Bildgebung die Visualisierung der anatomischen Struktur, was zu einer informationsgesteuerten Konstruktion von 3D-Modellen im computergestützten Design (CAD) des Zielgewebes führt.^[14] Mit Hilfe fortschrittlicher computergestützter Fertigungstechniken können

Polymergerüste mit hoher Auflösung hergestellt werden, um Stabilität und Flusstransport als Teil der extrazellulären Mikroumgebung zu unterstützen. In Anbetracht der Materialanforderungen, die von mechanischen Eigenschaften bis hin zur biologischen Abbaubarkeit reichen, bleibt die Wahl der Materialien ein wichtiger Gesichtspunkt während des Designprozesses.^{[15][16]} Zusätzlich wird eine zellinstruktive Proteinmatrix benötigt, die der nativen extrazellulären Matrix in Bezug auf die Steuerung der Zellhaftung, Orientierung, Proliferation und Differenzierung so nahe wie möglich kommt.^[17] Störungen in der extrazellulären Matrix können schwerwiegende Folgen haben, da sie mit zahlreichen Krankheitsbildern wie Bindegewebserkrankungen und Herz-Kreislauf-Problemen in Verbindung gebracht werden.^[18] Während einer Krebserkrankung wird die ECM dereguliert und fördert anschließend durch zelluläre Transformation und Metastasierung das Krebswachstum.^[19] Sobald ein geeignetes Materialsystem für eine bestimmte Tissue-Engineering-Anwendung entwickelt worden ist, kann es als azelluläres oder zelluläres Gerüst kategorisiert werden. Die Zellularisierung eines Gerüsts kann nach der Herstellung des Gerüsts, während der Herstellung oder durch den Wirt, in den das Gerüst implantiert wird, erfolgen. Die Idee hierbei ist es, körpereigene Stammzellen zu verwenden, welche sich entsprechend der vorgegebenen Gerüststruktur zu dem eigentlichen Zielgewebe entwickeln. Dadurch erkennt der Wirt das Gewebe später als eigenes an und es erfolgt keine Immunantwort oder Abstoßungsreaktion. In vitro gezüchtetes Gewebe kann statt der Implantation auch zu Medikamentenstudien verwendet werden und zukünftig Tier- und Probandenversuche reduzieren.^[20] Zudem ist eine personalisierte Medikamentenwirkweise überprüfbar.

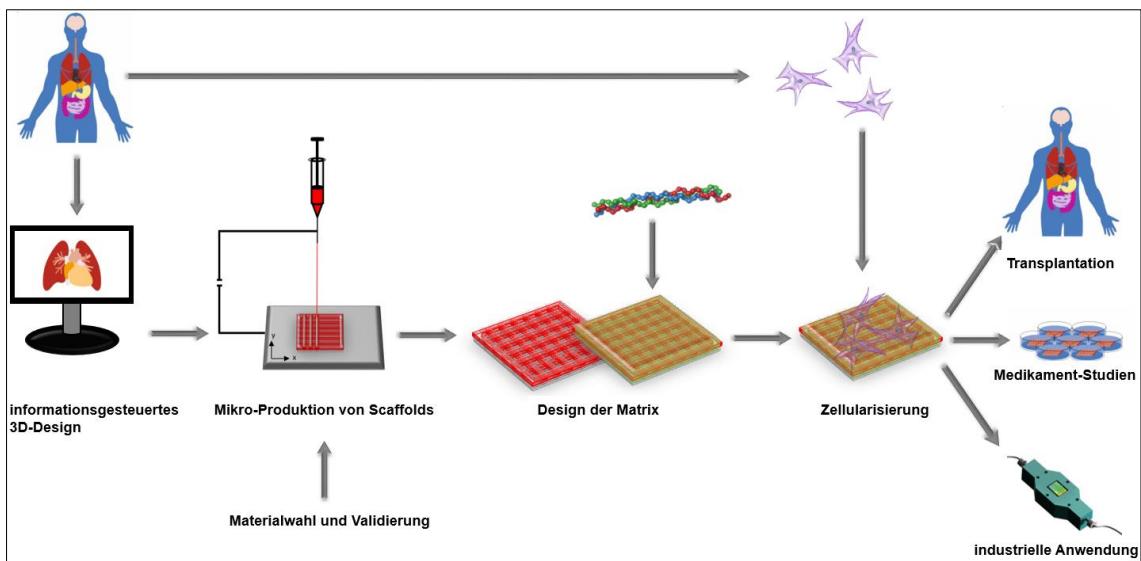


Abbildung 1 Arbeitsablauf bei der Herstellung künstlicher Gewebe unter Verwendung von informationsgesteuertem Design für Tissue Engineering und regenerative Medizin.

1.1.2 Industrielle Enzymprozesse

Neben dem Tissue Engineering, welches versucht ganze Gewebe nachzubauen, stellen Enzyme-Systeme ein weiteres maßgeschneidertes biologisches System dar. Enzyme sind katalytisch aktive Proteine, die durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie eine chemische oder biochemische Reaktion beschleunigen. Für industrielle Prozesse werden Enzyme meistens in tierischen, pflanzlichen oder bakteriellen Zellen produziert und finden in Waschmitteln oder in lebensmittelverarbeitenden und pharmazeutischen Prozessen Verwendung.

Der Einsatz von Enzymen als Katalysatoren ist ein wichtiger Ansatz, um umweltschädliche organische Synthesen durch umweltfreundlichere Methoden zu ersetzen. Enzyme werden aufgrund hoher Umwandlungsraten sowie der Regional- und Stereoselektivität durch Eliminierung der Bildung von Nebenprodukten konventionell in homogenen Systemen eingesetzt.^[21] Die kommerzielle Nutzung von Enzymen in homogenen Systemen wird jedoch durch mangelnde Stabilität und Recyclingkapazität behindert.^[22] Als Lösung für die Einschränkungen homogener Systeme hat sich die Enzymimmobilisierung auf Substraten insbesondere für selten vorkommende und aufwendig herzustellende Enzyme durchgesetzt.^[23] Obwohl die Immobilisierung die anfänglichen Investitionskosten erhöht, spart die Wiederverwendung in aufeinanderfolgenden Prozesszyklen langfristig Geld. Darüber hinaus ermöglicht die Enzymimmobilisierung den Einsatz in Durchflussreaktoren, was zu einem erhöhten Durchsatz führen kann.^{[24][25]} Die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Trägermaterials sowie des Enzyms sind entscheidende Faktoren bei der Enzymimmobilisierung.^[26] Enzymimmobilisierungsmethoden können in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden (Abbildung 2):^[27]

- 1) intermolekulare Quervernetzung zwischen dem Enzym und einem Füllstoffmolekül,
- 2) Konjugation an einen Träger und
- 3) physikalischer Einschluss innerhalb einer Matrix

Im Vergleich zur kovalenten Bindung (1+2), die eine Optimierung maßgeschneiderter chemischer Reaktionen erfordert,^[28] ist der physikalische Einschluss auf verschiedene Proteine anwendbar, ohne dass aufwendige Fall zu Fall Optimierungen erforderlich sind. Der einfache und schnelle Prozess des physikalischen Einschlusses in einer porösen Matrix ermöglicht die Immobilisierung von Proteinen über einen weiten pH-Bereich sowie den Einschluss von unbehandeltem Zellextrakt.^{[29][30]} Darüber hinaus kann eine reduzierte Enzymaktivität aufgrund sterischer Behinderung vermieden werden, und es sind keine zusätzlichen Vernetzungsreagenzien erforderlich.^[31]

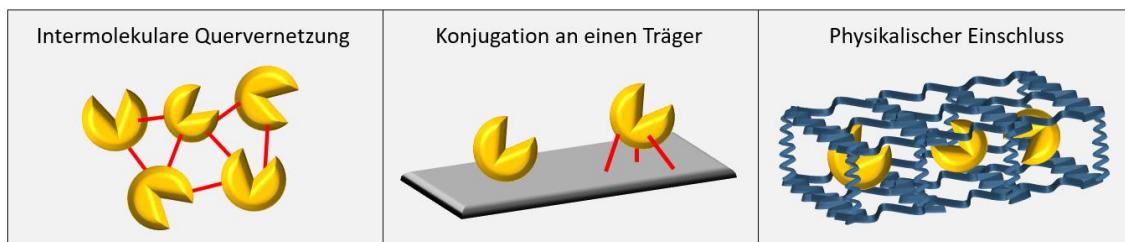


Abbildung 2 Schematische Darstellung von unterschiedlichen Immobilisierungsarten von Enzymen. Links: intermolekulare Quervernetzung von Enzymen durch Füllstoffmoleküle oder Cross-linker; Mitte: Immobilisierung von Enzymen an ein Trägermaterial durch Adsorption oder mit Hilfe eines Linkers; Rechts: Immobilisierung durch physikalischen Einschluss innerhalb einer Matrix.

Obwohl der physikalische Einschluss von Enzymen in einer Matrix viele Vorteile bietet, gibt es immer noch Mängel zu beheben. Gängige Probleme sind die ungleiche Verteilung der Enzyme innerhalb des Matrixmaterials, die langsame Diffusion des Substrats zum aktiven Zentrum und Mikro-Umwelt-Effekte wie Ionenstärke oder Hemmeffekte, welche die Enzymaktivität direkt beeinflussen.^[32] Um eine spezifische Aktivitätsreduktion und Kontamination des Produkts zu vermeiden, ist ein weiterer wichtiger Aspekt die Verhinderung der Denaturierung des Enzyms sowie das Ausschwemmen aus der Matrix.^[33] Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, geht der sich abzeichnende Trend hin zu porösen Polymerstrukturen als Einschlussmatrix. Im Idealfall sind die Enzyme in eine Matrix aus schmalen Strukturen eingebettet, die durch Poren und Kanäle miteinander verbunden sind, um die Diffusion zu erleichtern und gleichzeitig sicherzustellen, dass die Enzyme in der Trägermatrix zurückgehalten werden. Diese Strukturierung der

Matrix muss ähnlich zu den oben beschriebenen Scaffolds in ihren Eigenschaften genau eingestellt werden, um die gewünschten Funktion erfüllen zu können. Die Anforderungen der ausreichenden Stabilität bei gleichzeitiger Versorgung durch Substratmoleküle im wässrigem Milieu muss auch hier gewährleistet sein. Da Enzyme vorwiegend in Zellen oder der umgebenden ECM vorkommen ist es naheliegend, dass die oben genannten Anforderungen der Scaffolds ebenfalls für optimale Enzymbedingungen sorgen und die Entwicklung beider künstlicher biologischer Systeme Hand in Hand stattfindet.

1.2 Mikrofabrikation von Scaffolds

Bei der Entwicklung maßgeschneiderter biologischer Systeme können Materialeigenschaften als Eingabeparameter und biologische Ergebnisse als Ausgabeparameter betrachtet werden. Ein Aspekt des informationsgesteuerten Designs, der für eine zuverlässige experimentelle Interpretation notwendig ist, ist die genaue Kenntnis der Eingabeparameter. Mit anderen Worten, die Materialeigenschaften müssen genau definiert werden.^[9] Die Kontrolle über diese Eigenschaften ist in den letzten Jahren durch das Aufkommen von Mikro- und Bio-Fabrikationstechniken, die eine präzise Platzierung von Materialien und biologischen Komponenten ermöglichen, vorangekommen. Vor allem 3D-Drucker sind vielversprechende Werkzeuge für In-vitro-Modelle und deren Anwendungen in der regenerativen Medizin, da sie die genaue Platzierung verschiedener Materialien ermöglichen.^[34]

Der Begriff „3D-Druck“ umfasst alle Fertigungsverfahren, bei denen dreidimensionale Gegenstände durch einen schichtweisen Aufbau von Material erzeugt werden.^[35] Sie grenzen sich damit zu den subtraktiven Fertigungsmethoden ab, wie beispielsweise dem Fräsen, bei denen die gewünschte Form durch Abtragung von Material zustande kommt. Dank der hohen Freiheitsgrade bei dem computergestützten Design (CAD) des Objektes und die passgenaue Herstellung durch den 3D-Druck, entwickelten sich schnell verschiedene Methoden um den notwendigen physikalischen oder chemischen Schmelz- oder Härtungsprozess der Materialien zu realisieren (Abbildung 3).^[36] Dazu gehören lichtbasierte Ansätze wie Stereolithographie (SLA), digitale Projektionslithographie (DLP), Continuous Liquid Interface Production (CLIP) und Direct Laser Writing (DLW). Tinten- oder filmbasierte Druckverfahren umfassen Fused Deposition Modelling (FDM), Extrusionsdruck, Direct Ink Writing (DIW) und Tintenstrahldruck sowie Elektrospinntechniken.^{[34][37][38][39]}

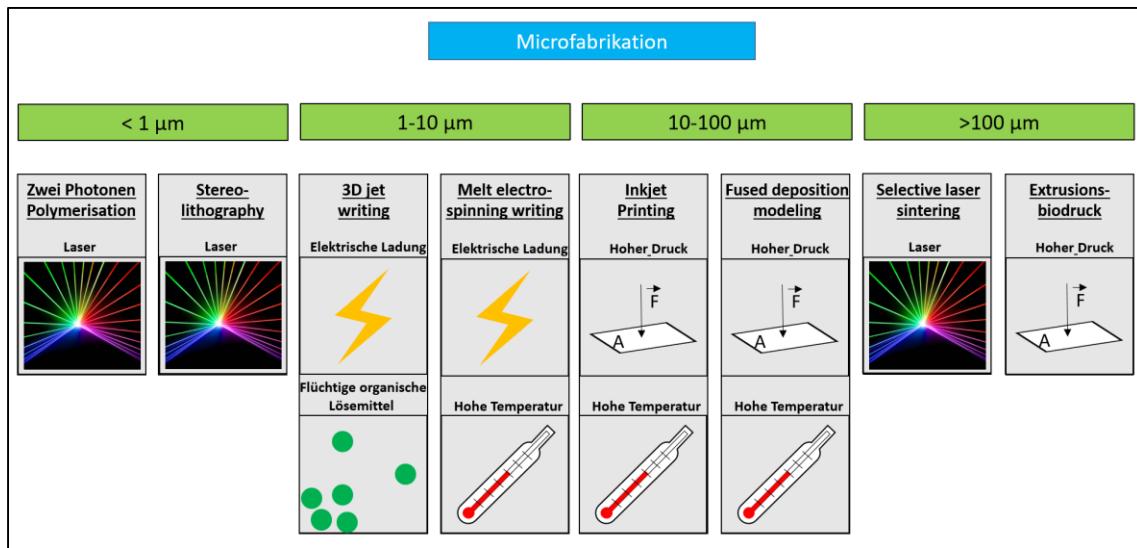


Abbildung 3 Mikrofertigungsmethoden aufgeschlüsselt nach ihrer Auflösung der hergestellten Filamentgröße und der verwendeten physikalischen Methode

Der Extrusionsdruck, auch als "tintenbasierter Druck" bezeichnet, umfasst additive Herstellungsansätze, die zur 3D-Abscheidung von Materialien wie Filamenten und Tröpfchen führen.^{[38][40]} Die eingesetzten Materialien können während der Abscheidung oder in der Nachbearbeitung einer thermischen, pneumatischen, lichtbasierten oder mechanischen Behandlung unterzogen werden. Fused Deposition Modelling (FDM) war die früheste Implementierung des Filamentdrucks, bei welchem thermoplastische Filamente durch eine beheizte Düse auf eine Bauplattform geführt werden und die Strukturen schichtweise zusammengefügt werden, während sie unter ihre Glasübergangstemperatur abkühlen. FDM wurde für die Herstellung von mikrofluidischen Geräten, Tabletten und Implantaten mit einer Vielzahl von Materialien angewendet.^{[41][42]} FDM dominiert den Marktsegment der Desktop-3D-Drucker aufgrund der verfügbaren Materialien, der Benutzerfreundlichkeit und des relativ effizienten Drucks.^[34] Bei der Herstellung biomedizinischer Geräte oder anderer Biomaterialien gibt es jedoch viele Einschränkungen für FDM, wie z.B. eine mit 200 µm relativ große minimale Merkmalsbreite und eine allgemeine Beschränkung der Materialien, die gedruckt werden können, von denen viele nicht biokompatibel oder für die meisten Tissue-Engineering-Anwendungen geeignet sind.^[9] Um die Materialien-Bandbreite zu erweitern, liegt der Forschungsschwerpunkt auf der Identifizierung von Bedingungen, unter denen Ausgangsmaterialien durch Optimierung von Parametern wie Viskosität, Wärmeleitfähigkeit und Scherverdünnungseigenschaften druckbar sind.

1.2.1 Bioprinting

Im Bereich Tissue-Engineering werden momentan verschiedene Ansätze für die Kombination von Materialien und Zellen erforscht. Bei der klassischen Geweberekonstruktion wird ein Gerüst hergestellt, auf welches nachträglich Zellen gegeben werden, die dort wachsen und sich durchgehend vermehren. Das moderne „Bioprinting“ (englisch für Biodruck oder Biofertigung) hingegen ermöglicht die kontrollierte Ablagerung von biologisch aktiven Tinten. Diese bestehen meist aus synthetischen oder natürlichen Matrices gemischt mit aktiven Biokomponenten wie Zellen oder Enzyme. Hierbei muss die Tinte allen materiellen Anforderungen entsprechen und zusätzlich muss die Fertigungsmethode zellkompatibel sein, um die biologische Aktivität nach der Fertigung zu gewährleisten. Diese Herausforderung schränkt

die zur Verfügung stehenden Methoden, z.B. durch Verwendung von Hitze, stark ein. Daher werden die oben genannten 3D-Druckmethoden hauptsächlich für azelluläre Gerüste verwendet. Ausnahmen bildet hier das Inkjet-Verfahren, Laser-assisted bioprinting Systeme sowie das Extrusionsverfahren.^[12] Ziel ist dabei die Herstellung von passgenauen Gewebestrukturen, welche individuell für den Patienten angefertigt werden können. Realisierbar sind bereits dünne Strukturen, wie Hautgewebe oder Objekte mit geringer interner Komplexität, wie beispielsweise Knochenstrukturen oder Hydrogelsegmente.^{[43][44]} Durch räumlich strukturierte Blutgefäße versorgte komplexe Gewebe oder ganze Organe ist die Vision und gleichzeitig die Herausforderung der heutigen Wissenschaft.^{[45][46]} Insgesamt geht der Trend beim Biomanufacturing zu höheren Druckgeschwindigkeiten, verbesserter Auflösung und der Verwendung anspruchsvoller Materialien. Diese Fortschritte entstehen durch die Entwicklung neuartiger Materialien und Herstellungsansätze, die komplexe Designs ermöglichen und die native in-vivo-Gewebe rekonstruieren können.^[9]

1.2.2 Elektrojetting

Die Nutzung elektrostatischer Kräfte zur Herstellung von Fasern ist ein seit über 100 Jahren bekanntes Verfahren. Eine Hochspannungsquelle speist einen Gleichstrom mit einer bestimmten Polarität in eine Polymerlösung oder -schmelze ein, die mit einer konstanten Flussrate aus einer Spritze gegeben wird. Die Erdung des Kollektors führt zu einem elektrischen Feld, das die Polymerlösung in Richtung des Kollektors streckt. Bei einer bestimmten kritischen Spannung steigt die elektrische Ladung der Polymerlösung ausreichend an, um den Tropfen auf der Nadel der Spritze in eine konische Form, den so genannten Taylorkegel, zu verformen. Übersteigt die Kraft des elektrischen Feldes die gegenwirkende Kraft durch die Oberflächenspannung der Lösung, so wird die Flüssigkeit als Flüssigkeitsstrahl (Jet) zum Kollektor hin beschleunigt (Abbildung 4).^{[47][9]}

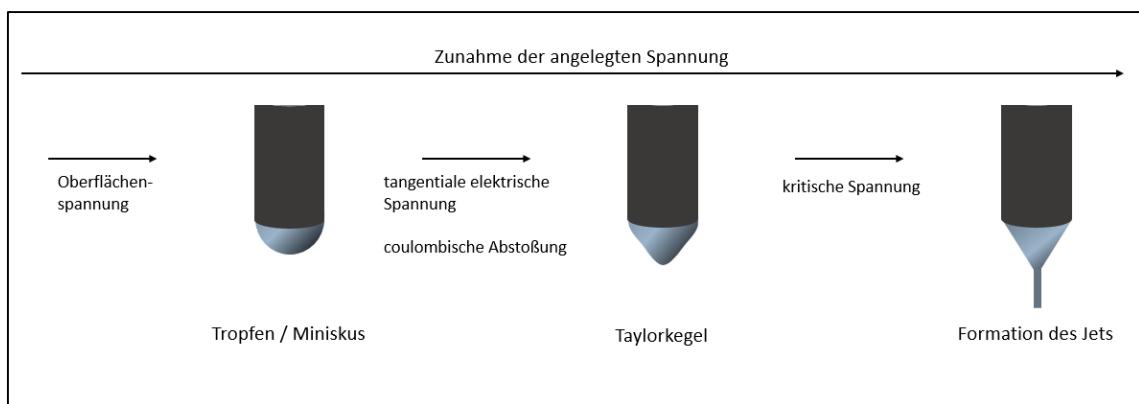


Abbildung 4 Formierung des Taylorkegels beim Elektrojetten in Abhängigkeit der angelegten elektrischen Spannung

Beim Durchströmen der umgebenden Gasphase, meist Luft, verdampft das Lösungsmittel des Jets und führt zur Ablagerung einer festen Polymerfaser auf dem geerdeten Kollektor. Während des Vortriebs des Jets in Richtung der Masseelektrode entsteht eine Biege- oder Peitscheninstabilität, bei der das untere Ende des Jets eine zunehmende oszillierende Kreisablenkung erfährt.^{[47][48]} Das Schlagen führt zu einer Verdünnung des Jets in den Submikrometerbereich, wodurch die Oberfläche vergrößert und die für die Verdampfung des Lösungsmittels benötigte Zeit verringert wird (Abbildung 5). Die verbleibende Polymerfaser wird an der Masseelektrode als Vliesstoffmatte aus miteinander verbundenen Fasern abgeschieden. Heutzutage kann eine breite Palette von natürlichen Materialien, biologisch abbaubaren

und nicht abbaubaren synthetischen Polymeren verwendet werden, um Fasern mit diesem als Elektrojetting bezeichneten Verfahren herzustellen.^[9]

Die Arbeitsparameter des Elektrojettings spielen eine zentrale Rolle, um nicht nur die Natur des Elektrospinnens zu verstehen, sondern auch das Umwandeln von Polymerlösungen in Nano- und Mikrofasern durch Elektrospinnen. Diese Parameter können grob in drei Gruppen unterteilt werden: Lösungsparameter, Prozessparameter und Umgebungsparameter. Jeder dieser Parameter kann die Morphologie der Fasern beeinflussen und durch die richtige Steuerung dieser Parameter können elektrogesponnene Fasern und Fasermatten mit der gewünschten Morphologie und zielgerichteten Durchmessern hergestellt werden.^[49]

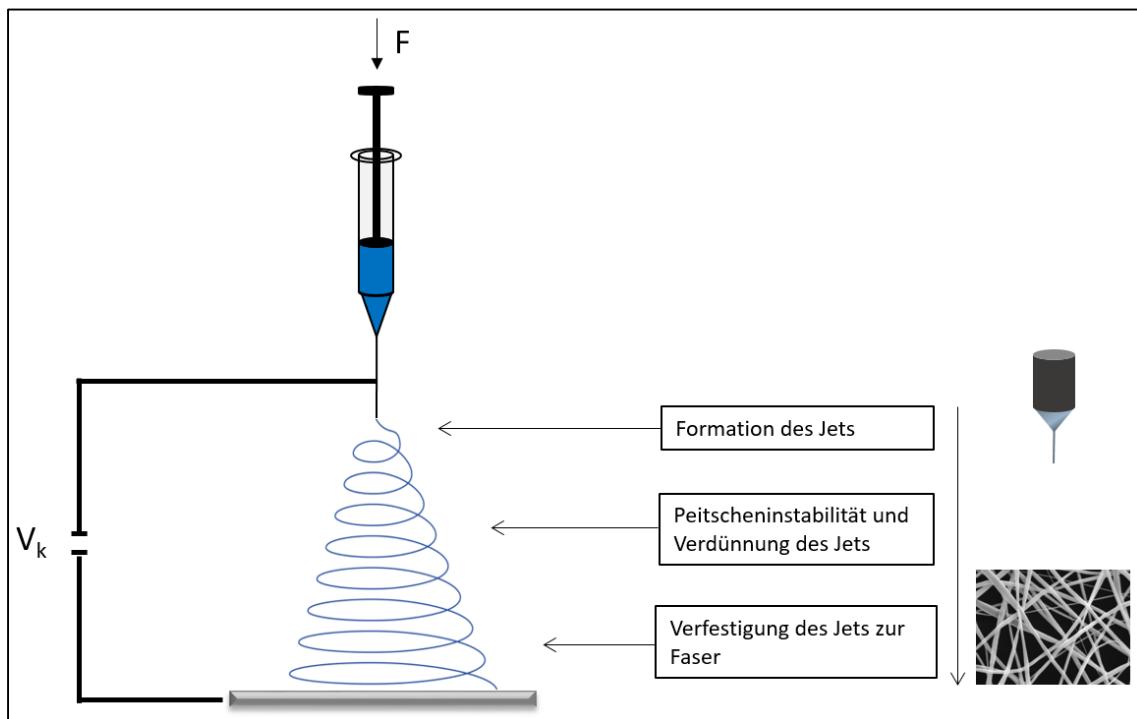


Abbildung 5 Schematischer Aufbau einer Elektrojetting-Station. Über eine angelegte Spannung wird eine Polymerlösung verwendet um Nano- oder Mikrofasern zu erzeugen. Der Jet erfährt dabei Biege- oder Peitscheninstabilitäten, welche zu einer oszillierende Kreisablenkung führen. Lösungsparameter, Prozessparameter und Umgebungsparameter beeinflussen dabei maßgeblich das Faserbild.

In den letzten 25 bis 30 Jahren hat das Interesse an der Verwendung von Fasern für Tissue-Engineering-Anwendungen stark zugenommen. Aufgrund der hohen Porosität und der Mikrotopographie sind Faservliesmatten der nativen extrazellulären Matrix sehr ähnlich.^[50] Neben der großen Auswahl an Materialien sind die hohe Produktionsrate und die große Vielfalt an Faserdurchmessern als weitere Vorteile zu nennen. Mehrere Forschungsgruppen verwenden elektrogejettete Fasermatten zur Nachahmung der ECM für das Knochen-, Haut-, Nerven- und vaskuläre Tissue Engineering.

1.2.3 Strukturiertes Elektrojetting

Dennoch sind die zweidimensionalen elektrogesponnenen Membranen mit willkürlich angeordneten Fasern in ihrem Potenzial hinsichtlich der Anwendung begrenzt. Viele Forschungsarbeiten konzentrieren

sich daher auf die Ausrichtung der Fasern durch das Design des Kollektors (Abbildung 6).^{[51][52][53]} Dazu wurde der geerdete Kollektor meist in Form von Trommeln, Ringen oder zwei Polen ausgeführt. Das elektrische Feld wird durch das Design des Kollektors manipuliert und die Fasern können in einer bestimmten Anordnung gesammelt werden. So konnten Fasermatten hergestellt werden, in denen die Fasern linear angeordnet sind. Zusätzlich gab das Design des Kollektors bei kompletter Ummantelung des Kollektors mit der Fasermatte die dritte Dimension vor. Um ein fasriges Rohr mit gemusterten Architekturen zu produzieren, verwendeten Jiang Chang und seine Gruppe einen zylindrischen Kollektor mit gleichmäßig angeordneten Abzweigungen. Sie konnten dadurch 3D-Faserrohre mit unterschiedlichen Durchmessern, Längen und verschiedenen Querschnittsformen aus Polycaproacton (PCL) und Polymilchsäure (PLA) herstellen.^[54]

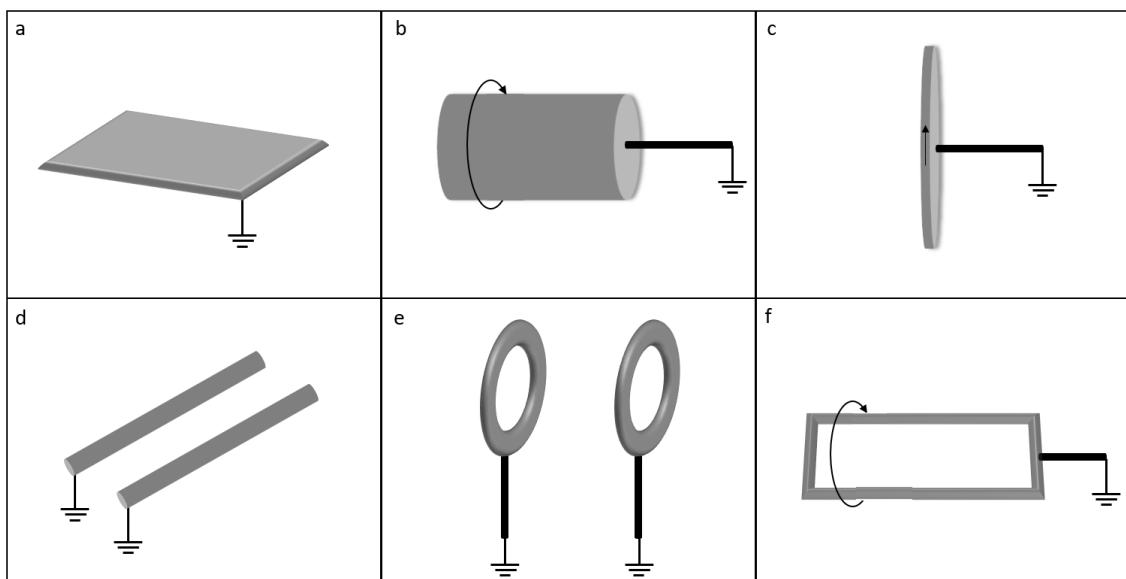


Abbildung 6 In der Forschung verwendete Kollektordesigns zur strukturierung der Faserabscheidung beim Elektrojetting

Obwohl die abgelagerten Fasern eine Hauptrichtung hatten, waren sie jedoch immer noch sehr ungeordnet mit Porengrößen von weniger als 20 µm. Die Konsequenz war die Kombination und Optimierung der Arbeitsparameter hin zu hochgeordneten und klar strukturierten Faseranordnungen. Durch die Verbindung des Kollektordesigns mit angepassten Lösungsparametern gelang eine hochlineare und parallele Anordnung der einzelnen Poly(lactid-co-glycolid)-Fasern (PLGA) zueinander. Ausschlaggebend war die Verringerung der Oberflächenladungsakkumulationstendenzen der eingesetzten organischen Lösungsmittel, gekoppelt mit einem dynamischen Anstieg der Viskosität aufgrund der hohen Flüchtigkeit von Chloroform.^[55]

Die Stabilisierung des Migrationspfades des Jets als Folge der aufgezeigten Biege- und Tinteninstabilitäten zeichnet sich einen Trend hin zur additiven Strukturierung der einzelnen Fasern ab. Durch die gezielte Abscheidung der einzelnen Fasern aufeinander ist die Herstellung von hoch geordneter dreidimensionalen Fasergerüsten möglich. Im Gegensatz zu implementierten additiven Fertigungsmechanismen wie dem Extrusionsdruck ermöglicht die Verwendung der elektrischen Felder als Treiber des physikalischen Massenstromes dreidimensionale Strukturen im unteren Mikrometerbereich.^[9] Der enorme Einsatz- und Anwendungsbereich vor allem in der Biotechnologie, der Sensorik oder der gedruckten Elektronik hat die Entwicklung verschiedener Techniken wie den

hochauflösenden E-Jet-Druck, den piezo-elektrodynamischen Druck oder andere elektrodynamische Verfahren vorangetrieben.^{[56][57]} Um die Biege- und Peitscheninstabilitäten des Jets zu unterbinden, wurde unterschiedliche Fertigungsverfahren entwickelt, die sich im mechanischen Aufbau und Prozessparameter unterscheiden und damit mit unterschiedlichen Vor- und Nachteilen zur Herstellung von maßgeschneiderten biologischen Systemen einhergehen.^{[9][58]}

Meltelektrospinning

Im Vergleich zu den meisten anderen Elektrospinntechniken ist das Schmelzelektrospinnen eine lösungsmittelfreie, aber wärmeintensive Technik. Das Schmelzen des Polymers in der Zuführzone auf 80-300 °C und die ausreichende Kühlung des Filaments über einen relativ langen Verfahrensweg verhindern eine Spinnverklebung, bei der Faservliesmatten entstehen würden.^[59] Dalton und Hutmacher berichteten über eine auf Schmelzelektrospinnen basierende Direktschreibtechnik, die als Schmelzelektrospinnnschreiben (engl.: melt electrospinning writing (EMW)) bezeichnet wird (Abbildung 7 a). Durch die Kombination eines computergesteuerten Translationsstufenkollektors mit dem Schmelzelektrospinnaufbau können orientierte PCL-Strukturen über eine große Grundfläche hergestellt werden.^{[59][60]} Durch die Untersuchung und Optimierung der Arbeitsparameter, speziell der elektrischen Feldstärke, der Flussrate und der Durchmesser der Spinndüse, konnten die Abscheidung der Filamente in hohem Maße kontrolliert werden. Kastenstrukturen mit unterschiedlichen Gittergrößen und einer Höhe von bis zu einem Millimeter konnten durch ein Aufeinanderlegen der Fasern im Submikrometerbereich hergestellt werden. Erweitert wurde die Gesamthöhe auf maximal 7 mm durch eine zusätzliche computergestützte Simulation zur Erhaltung einer konstanten elektrostatischen Kraft bei gleichzeitiger Variation des Arbeitsabstandes.^[61] In-vitro Zellkulturstudien zeigten eine gute Adhäsion, Wachstum und Differenzierung von primären humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSCs), humanem Parodontalligamentzellen (hPDL) und mesenchymalen Vorläuferzellen.^{[60][61]} Obwohl EMW ein lösungsmittelfreies Verfahren ist, ist es aufgrund der hohen Temperatur für die meisten biologisch abbaubaren Polymere und biologischen Materialien, die im Tissue Engineering und in der regenerativen Medizin verwendet werden, wie Proteine, inkompatibel.^{[62][63]} Gleicher gilt für lebende Zellen, diese können ebenfalls auf Grund der hohen Temperatur nicht direkt mittels Schmelzelektrospinnen verarbeitet werden.^{[9][64]}

Near-field electrospinning

Das Verringern des Arbeitsabstandes zwischen Spinndüse und dem Faserkollektor auf eine Position vor Beginn der Peitscheninstabilität ermöglicht eine vorhersagbare Ortskontrolle für die Abscheidung der Fasern.^[65] Da der Abstand zwischen Nadel und Kollektor funktionsbedingt 500 µm - 1 mm nicht überschreiten darf, wird diese Technik als Nahfeld-Elektrospinnen (engl: near-field electrospinning (NFES)) bezeichnet. Durch den verringerten Abstand hat das Lösungsmittel im Polymerjet bis zum Kontakt mit dem Kollektor nicht immer ausreichend Zeit, um vollständig zu verdampfen und kann bei der Abscheidung flüssig bleiben.^[66] Durch eine computergestützten x-y Translation des Kollektors ist es möglich, die Faser zusätzlich mechanisch zu dehnen, was zu einer dünneren Faser und einer schnelleren Verdampfung des Lösungsmittels führt (Abbildung 7 b). Zusätzlich ermöglicht der exakt positionierbare Kollektor eine kontrolliert orientierte Abscheidung der Fasern.^[67] Parker untersuchte den Einfluss verschiedener Parameter wie den Arbeitsabstand, die Flussrate und die Translationsgeschwindigkeit des Kollektors auf die Morphologie von PCL-Fasern und Zucker-PCL-Fasern, um Mikrostrukturen analog zu Neuronen- und Muskelgewebe zu erzeugen.^[65] Kai He und sein Labor stellten hochauflösende PCL-Gerüste mit Mustern im kontrollierten Mikrometer-Maßstab und mehrschichtige Gerüste mit verschiedenen Wickelmustern her.^[67] Die geringe Verdampfungszeit des Lösungsmittels machen

organische Lösungsmittel unabdingbar und der geringe Arbeitsabstand limitiert die Gesamthöhe der mit NFES hergestellten Gerüste.^[9]

3D-jet Writing

Die dritte Hauptmethode zur Kontrolle der Ablagerung von elektrogesponnenen Fasern wird als 3D-Jet-Schreiben bezeichnet (engl.: 3D-jet Writing). Bei dieser Methode werden die Biege- und Peitscheninstabilitäten während des Jets durch Anlegen eines zweiten elektrischen Feldes kontrolliert.^[68] Die nach außen gerichtete Jet-Bewegung wurde durch eine sekundäre Ringelektrode unterdrückt, die eine elektrische Spannungsquelle erzeugt und die Richtung des elektrischen Feldes zur Mitte des kreisförmigen Rings umkehrt (Abbildung 7 c). Die Kombination des stabilen Polymer-Jets mit einer computergestützten x-y-Stufe ermöglicht die präzise Strukturierung von biologisch abbaubaren PLGA-Fasern zu offenporigen Strukturen in verschiedenen Formen und Größen.^[68] Menschliche mesenchymale Stammzellen wurden auf Fibronectin-beschichteten Wabengerüsten kultiviert und füllten nach dreitägiger Kultivierung das gesamte freie Volumen der Poren mit 500 µm Länge aus. Die Zelldichte war mit $1,4 \cdot 10^6$ siebenmal höher als anderswo berichtet. Zusätzlich wurden der maximale Zell-Zell-Kontakt und die Differenzierung in Richtung einer osteogenen Linie bestimmt. In-vivo-Studien zur Anheftung des zellarisierten Gerüsts an benutzerdefinierte Defektbereiche beeinflusste die Knochengeweberegeneration unter Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Interaktion.^{[68][69]}

Aufgrund der sehr präzisen Ablagerung der Fasern ohne Temperaturerhöhung ist das 3D-Jet-Schreiben eine vielversprechende Technik für physiologisch relevante 3D-Kulturplattformen. Obwohl das System immer noch lösungsmittelbasiert ist, ist es offen für weitere Materialien sowie für wasserbasiertes Jetting und könnte damit direktes Jetten von Zellen und Proteinen erlauben.^{[9][70]}

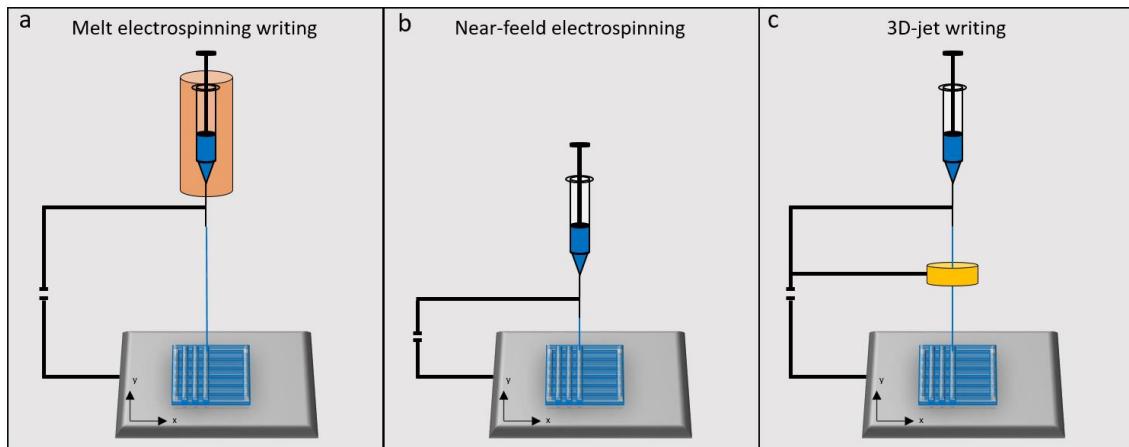


Abbildung 7 Aufbauten verschiedener Elektrospinnmethoden zur kontrollierten und strukturierten Anordnung der Fasern.

Co-Elektro-Jetting

Das elektrohydrodynamische Co-Jetting ist eine konstruktive Variante des Elektrojettings, die eine Synthese von Fasern mit zwei unterschiedlichen Phasen ermöglicht. Dabei werden zwei Polymerlösungen unter dem Einfluss des elektrischen Feldes gleichzeitig parallel gejettet. Durch die Kontrolle der räumlichen Verteilung unterschiedlicher Materie auf einer so kleinen Skala wird der Zugang zu unbekanntem anisotropem Material ermöglicht.^{[71][72]} Im Vergleich zu dem im obigen Abschnitt erläuterten Standard-Laboraufbau für ein Elektrojetting-Experiment werden bei einem

elektrohydrodynamischen Co-Jetting-Experiment zwei Spritzen (oder sogar mehr) parallel verwendet (Abbildung 8). Je nach Polymer und Lösungsmittelanteil bildet der Jet bi- oder polykompartimentelle Fasern.^[73] Diese Fasern könnten zum Beispiel zur Herstellung von multikompartimentellen dreidimensionalen Gerüsten für die Zellkultur verwendet werden, wobei die chemischen Eigenschaften der Fasern die zelladhäsiven Eigenschaften steuern. Durch die Verwendung dieser ausgerichteten multikompartimentalen Mikrofasergerüste als Schablonen für die spatioselektive Azid-Peptid-Immobilisierung wurde ein Zellkultursubstrat für die geführte Zelladhäsion von Fibroblasten entworfen.^{[55][74]} Weiterhin könnten die Fasern als Hybridmaterialien in Sensoren als miniaturisierte Energiespeicher und -wandler eingesetzt werden.^[73]

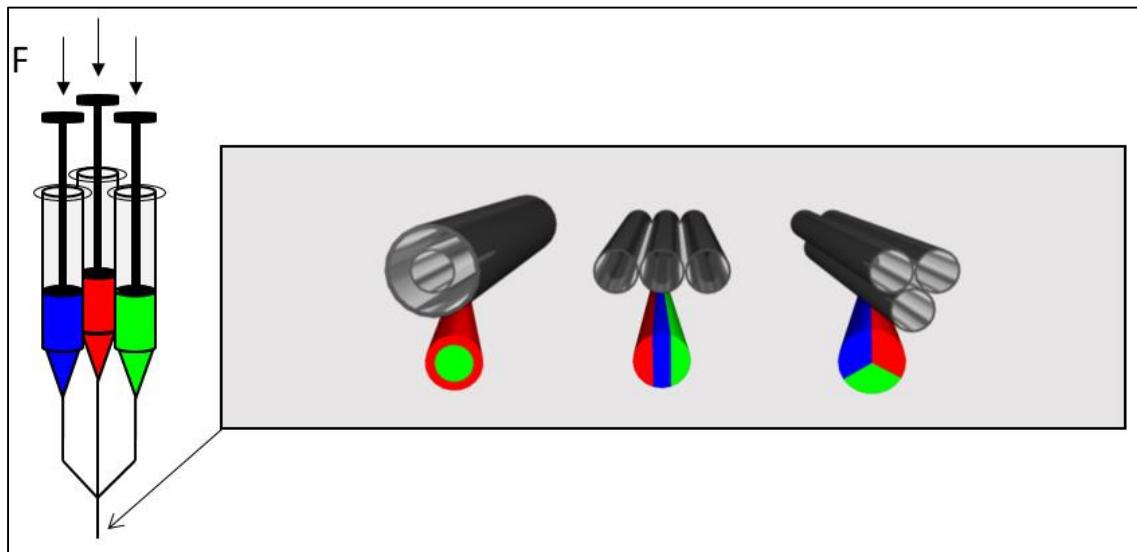


Abbildung 8 Durch spezielle Anordnung der Nadeln können mittels elektrohydrodynamischen Co-Jetting Fasern mit mehreren Kompartimenten hergestellt werden

1.3 Die naturinspirierte vierte Dimension durch Selbstassemblierung

Shape-Shifting, auch Formveränderung genannt, ist die Fähigkeit von Strukturen, ihre Form aufgrund eines äußeren Reizes zu verändern. Die Idee der formverändernden Architektur ist von der Natur inspiriert. Pflanzen sind bekannt für ihre vielfältigen Fähigkeiten, Veränderungen in der Umgebung wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Eine auf Stimuli reagierende Formveränderung kann bei der Bewegung von Blüten, Blättern und Ranken beobachtet werden (Abbildung 9). Ein Stimulus für Pflanzen kann z.B. die Temperatur sein. Die Veränderung der Temperatur führt zum Öffnen und Schließen der Blüte.^[75]

Selbstorganisationsprozesse sind in Natur und Technik weit verbreitet. Biologische Systeme bauen Strukturen mit weitaus mehr Komplexität, Informationskapazität und Montageanweisungen auf als selbst die fortschrittlichsten Strukturen, die mit aktuellen Technologien möglich sind. Die wichtigste Zutat ist laut Tibbets die Selbstassemblierung.^[76] Strukturen, die sich selbst aus intelligenten Materialien aufbauen, sind eine revolutionäre Idee im Bereich der Konstruktion und Fertigung. Für einen Selbstassemblierungsprozess werden drei Komponenten benötigt. Neben dem richtigen Material und der

richtigen Geometrie werden intelligent gestaltete Wechselwirkungen zwischen den Teilen und passive Energie wie Wärme oder Magnetismus (Stimuli) benötigt.^[77] Sind diese drei Komponenten vorhanden ist es möglich, 1D-, 2D-, 3D- und sogar 4D-Objekte zu erzeugen. Ein Kiefernzapfen kann zum Beispiel je nach Luftfeuchtigkeit die Form verändern. Die Schuppen klaffen bei Trockenheit auf, um die Zapfensamen freizugeben, und schließen sich, wenn es feucht ist. Diese Schuppen des Kiefernzapfens bestehen aus zwei verschiedenen Geweben. Die innere Oberfläche der Schuppe besteht aus Sklerenchymfasern und die äußere Oberfläche aus Skleriden. Der Sklerenchym-Faserbereich ist entlang der Längsachse der Schuppe gegen Quellung verstärkt, der Skleridenbereich dagegen nicht. Durch die Hydratation dehnt sich der untere Bereich aus, bleibt aber mit dem verstärkten oberen Bereich verbunden, wodurch sich die Schuppen der Kiefer biegen.^[78] Die vierte Dimension wird folglich als Veränderung über die Zeit betrachtet.^[77] Während dieser Zeit ändert sich die Konfiguration oder die Funktion des 3D-Objekts als Reaktion auf einen externen Reiz, was den 4D-Druck lebendig macht.^[79] Das neue interdisziplinäre Feld des 4D-Drucks bringt viele Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Soft-Robotik, der Luftfahrt, der intelligenten Textilien und der biomedizinischen Technik wie Medikamentenverabreichung, künstliche Muskeln oder Stents. In mehreren ausgezeichneten Rezensionen wurde die nachträgliche Selbstassemelierung von gedruckten Strukturen für das Tissue Engineering diskutiert und bildet eine zusätzliche Komplexitätsschicht bei der Nachahmung von komplexen biologischen Systemen.^{[9][80][81][82]}

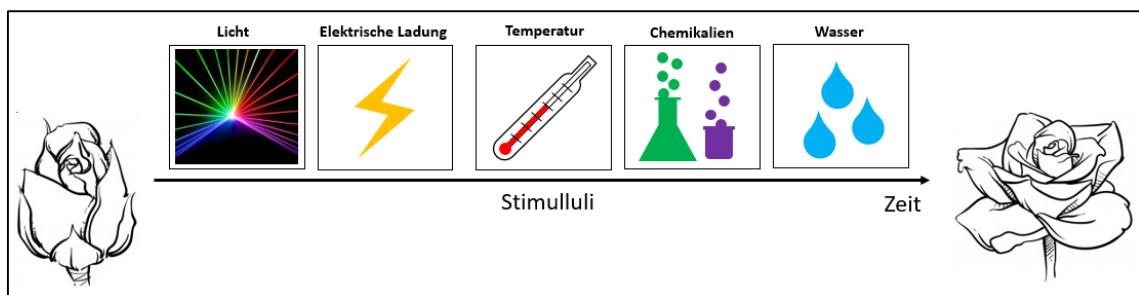


Abbildung 9 Prinzip des Shape-Shiftings anhand einer sich öffnenden Blüte. Die Bewegung wird dabei durch einen Stimulus ausgelöst.

1.4 Das Material: Polymere

Es gibt eine Fülle von Materialien, die in der Mikrofertigung von bio-integrativen Systemen mit verschiedenen in vitro oder in vivo Anwendungen eingesetzt werden. Diese Materialien bestehen aus Metallen, Keramiken, Makromolekülen oder Verbundstoffen daraus. Neben Polymeren und natürlich gewonnenen Materialien haben keramische und metallische Materialien eine lange und erfolgreiche Geschichte in dentalen und orthopädischen Anwendungen sowie als Medizinprodukte.^{[83][84][85][86]} Auf Grund von Elektrospinning wird hier ein besonderes Augenmerk auf den Einsatz von makromolekularen Materialien im Tissue Engineering gelegt. Dabei wird hauptsächlich zwischen synthetischen Polymeren und natürlich vorkommenden Polymeren unterschieden. Natürlich vorkommende Biomakromoleküle werden als Biomaterialien eingesetzt und bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden und Proteinen. Sie zeichnen sich in der Regel durch physiologisch relevante Zusammensetzungen, Biokompatibilität, reichliche Verfügbarkeit sowie bio-induktive Eigenschaften aus.^[87] Synthetische Makromoleküle, die in Biomaterialien eingesetzt werden, bestehen in der Regel aus synthetischen Polymeren, wie z. B. Polyestern, Polyurethanen, Hydrogelen oder Acrylat-funktionalisierten Polymeren. Synthetische Materialien ermöglichen oft eine genauere Kontrolle der physikalischen Eigenschaften wie die chemische

Zusammensetzung, Steifigkeit, Abbaubarkeit und Architektur oder das Potenzial, sich dem Immunsystem zu entziehen.^{[9][88]}

1.4.1 Natürliche vorkommende Biomakromoleküle

Zu den Biomaterialien auf Proteinbasis gehören z. B. Kollagen, Fibrin, Laminin, Fibronektin und Elastin. Beispiele für Biomaterialien auf Polysaccharidbasis sind Alginat, Chondroitinsulfat, Heparinsulfat, Chitosan und Hyaluronsäure. Viele dieser Materialien sind mechanisch labil und benötigen eine sekundäre Vernetzung, um sie vor der Zellularisierung zu stabilisieren. Darüber hinaus fehlt ihnen aufgrund der unterschiedlichen phänomenologischen Assemblierungsprozesse verschiedener natürlich gewonnener Materialien im Allgemeinen die orthogonale Kontrolle über physikalische Eigenschaften wie Steifigkeit, Ligandendichte und Architektur.^[89]

Praktisch alle diese Materialien, entweder allein oder in Kombination mit einem anderen natürlichen/synthetischen Material, wurden auf Grund ihrer Biokompatibilität und ihrer inhärente Abbaubarkeit mit Hilfe von Elektrospinning zu Gewebegerüsten verarbeitet.^{[90][91][92][93]} Während herkömmliche elektrogesponnene Gewebe-Scaffolds die Fibrillenstruktur der ECM rekapitulieren, neigen sie dazu, dicht, relativ dünn und schwer zu handhaben zu sein und es ist schwierig, eine organisierte Architektur höherer Ordnung herzustellen. Andere traditionelle Herstellungstechniken wie Gefriertrocknung, Phasentrennung und Gassschäumungstechniken wurden mit proteinhaltigen Materialien wie Gelatine und Kollagen verwendet, um poröse Scaffolds herzustellen.^{[94][95][96][97]} Einige dieser Scaffolds weisen zwar eine ideale Porosität auf, aber es fehlt ihnen an einer präzisen Kontrolle über die mikroskaligen Eigenschaften und ihre hierarchische Organisation.^{[9][69]}

Da viele dieser Biomaterialien wie Alginat und Kollagen von Natur aus Hydrogele bilden, können sie in 3D-Druckverfahren eingesetzt werden. Diese Systeme sind in der Regel zellkompatibler als synthetische Drucklösungen; allerdings können hochauflösende 3D-gedruckte Strukturen mit natürlich gewonnenen Materialien eine Herausforderung darstellen. Dennoch wurden in jüngster Zeit Fortschritte beim 3D-Druck von Kollagengerüsten erzielt. Diese Gerüste haben jedoch relativ große gedruckte Strukturen, die aus kleineren Kollagenfibrillen bestehen.^[98]

Kollagen

Das häufigste vorkommende Faserprotein ist Kollagen. Es bietet der ECM Zugfestigkeit, reguliert die Zelladhäsion und unterstützt die direkte Gewebeentwicklung. Kollagen ist ein Strukturprotein, das im menschlichen Körper ein Drittel der Gesamtproteinmasse ausmacht.^[99] Es besteht aus drei parallelen Polypeptidsträngen, die sich in einer linksdrehenden Polyproline-II-Helix (PPII Helix) anordnen. Drei dieser Helices formen wiederum eine rechtsdrehende Tripelhelix (Abbildung 10). Die einzelnen Tripelhelices ordnen sich zu Fasern und Netzwerken an, die in Gewebe, Knochen und Basalmembran beobachtet werden können. Die dichte Anordnung der PPII Helices innerhalb der Tripelhelix ist nur möglich, da in der Primärstruktur jede dritte Aminosäure Glycin (Gly) ist. Gly ist klein genug, um die Kurven der Tripelhelix zu ermöglichen. Innerhalb jedes Basentriplets befindet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Wasserstoff des Glycins und dem Sauerstoff einer anderen Aminosäure.^[99] Es gibt 29 verschiedene Arten von Kollagen, die aus 25 unterschiedlichen Ketten zusammengesetzt sind. Die Anordnung der Ketten variiert bei jedem Typ Kollagen. Typ I ist in Tieren am weitesten verbreitet und wird am häufigsten für medizinische Zwecke genutzt.^[100] Kollagen wird häufig aufgrund seiner angeborenen Neigung zur Autopolymerisation in vitro und zur Bildung von Hydrogelen mit physiologisch relevanter Fibrillenarchitektur verwendet.^[101,102] Dies stellt gleichzeitig einen Nachteil dar, da subtile Änderungen

der Lösungseigenschaften wie Temperatur oder Konzentration die strukturellen Eigenschaften der resultierenden Kollagenhydrogele verändern können. Das betrifft vor allem das Extrahieren, Aufreinigen und anschließende Formen und Verarbeiten von Kollagen durch Mikroproduktionsverfahren. Rho et al. erreichten bei der Herstellung ihrer Kollagenmembran mittels Elektrojetting eine Dicke von 200 µm.^[103] Für eine möglichst naturgetreue Darstellung einer Basalmembran sollte die Schichtdicke einen Wert von 50 – 100 nm nicht überschreiten. Gleichzeitig muss jedoch gewährleistet sein, dass die hergestellte Membran stabil und transportierbar ist. Ebenfalls problematisch bei der anschließenden notwendigen Quervernetzung mittels chemischer Lösungsmittel wie Glutaraldehyd ist, dass toxische Komponenten mit dem Kollagen in Kontakt kommen. Durch gründliches Waschen der Membran nach dem Vernetzungs-Vorgang kann jedoch die Cytotoxität reduziert werden.^[104] Bisher gibt es keine ausreichenden Untersuchungen, inwieweit sich die Porengröße der gejetzten Kollagenmembranen durch das Vernetzen verändert und welchen Einfluss das anschließende Waschen auf die Fasermorphologie hat.

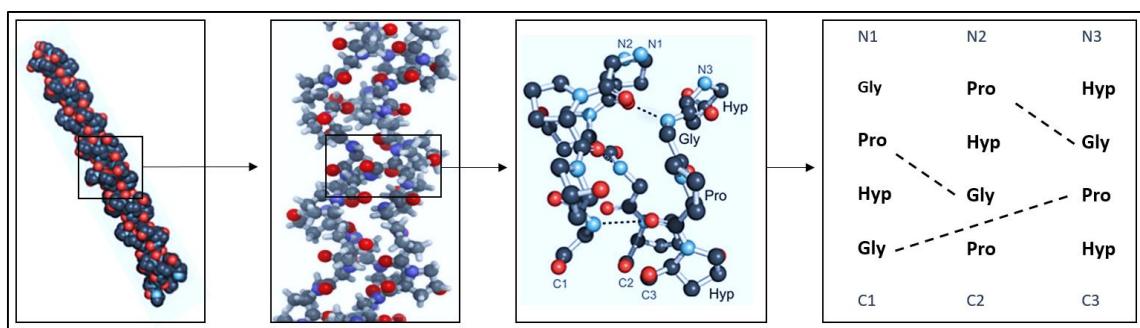


Abbildung 10 Molekularer und makromolekularer Aufbau von Kollagen

1.4.2 Synthetische Polymere

Polyester sind biologisch abbaubar, tendenziell biokompatibel und haben eine lange Geschichte der Verwendung in verschiedenen In-vivo-Anwendungen, wie z. B. Nahtmaterial. Gängige Polyester-Biomaterialien sind Poly(milchsäure) (PLA), Poly(milch-co-glykolsäure) (PLGA), Poly(-caprolacton) (PCL) und Poly(lactid-co-caprolacton) (PLCL). Diese Polymere werden häufig elektrogesponnen, um Fasermatten zu erzeugen, die für das Tissue Engineering verwendet werden.^{[105][106][107]} Während elektrogesponnene Matten im Tissue-Engineering üblich sind, gibt es subtilere biologische Implikationen, nämlich das Potenzial für Protein-Fouling auf implantierten Scaffolds, das eine negative Immunreaktion auslösen kann, die angegangen werden muss. Kostina et al. gehen dieses Problem an, indem sie die Oberfläche von PCL-Fasern mit Anti-Fouling-Beschichtungen modifizieren.^[108] Unser Labor hat die chemische Funktionalität von Polyestern genutzt, um elektrogesponnene zweiphasige Fasern aus PLGA-Derivaten herzustellen, um die Anhaftung von Zellen an Mikrofasern zu steuern.^[109] Polyester werden auch wegen ihrer inhärenten Abbaubarkeit bevorzugt, die durch säure- oder basenkatalysierte Hydrolyse des Esterrückgrats erfolgt. Bei PLGA führt dies zur Freisetzung von Metaboliten, d. h. Glykolsäure und Milchsäure, die vom Wirt abgebaut werden können. Die Abbaugeschwindigkeit kann durch das Verhältnis von Milchsäure- und Glykolsäureblöcken sowie durch die Mischung von PLGA mit anderen Polymerderivaten gesteuert werden.^{[110][111]}

Da Polyester thermoplastisch sind, können sie leicht in Schmelzextrusions- oder filamentbasierte 3D-Drucksysteme eingearbeitet werden.^{[112][113][114]} Im Allgemeinen werden mit diesen Techniken größere Fasern (>100 µm) hergestellt, was für bestimmte maßgeschneiderte biologische Systeme nicht

erwünscht ist, da die Merkmale idealerweise subzellulär sein sollten. Wunner et al. entwickelten eine Schmelz-Elektronenspinntechnik zur Herstellung poröser Scaffolds, die aus Fasern mit 20 µm Durchmesser bestehen.^[115] Bisher ist PGLA auch das einzige Material, welches für 3D-jet Writing eingesetzt werden konnte, welches Scaffolds aus sehr feinen PLGA-Fasern (≤ 10 µm Durchmesser) ermöglichte, die bei der Reparatur eines Schädeldefekts in einem Mausmodell sehr erfolgreich waren.^[68] Neben Polyestermaterialien kann auch der hochauflösende 3D-Druck von Polyelektrolytlösungen zur Herstellung von Gewebegerüststrukturen verwendet werden. Diese Tinten sind Kombinationen aus Polyanionen wie Poly(acrylsäure) (PAA) und Polykationen wie Poly(ethylenimin) (PEI) oder Poly(allylaminhydrochlorid) (PAH), die in Strukturen mit Filamentgrößen von bis zu 1 µm geschrieben werden können.^{[116][40]} PAA ist beispielsweise ein anionisches Polymer, welches durch seine, in Lösung negativ geladenen Carboxylgruppen, Wasser bindet und zu einem Vielfachen seines ursprünglichen Volumens anschwellen kann. Diese Eigenschaften als Superadsorber werden unter anderem in pharmazeutischen Anwendungen genutzt.^[117]

Außerhalb der oben genannten Verarbeitungstechniken ist die lichtbasierte Polymerisation synthetischer Polymere aufgrund ihres Potenzials für ultrafeine Auflösung und räumlich-zeitliche Kontrolle sehr attraktiv für die Herstellung komplexer Materialsysteme. Für die vorteilhafte Photopolymerisation werden verschiedene Acrylate oder Acrylat-modifizierte Polymere verwendet, die präzise einstellbare Eigenschaften ermöglichen. Auf Photopolymerisation basierende Strategien werden aufgrund ihrer praktischen Kompatibilität mit vielen Druckstrategien häufig in additiven Fertigungsverfahren eingesetzt. Im Allgemeinen basieren diese Verfahren auf einem Fotoinitiator, der bei Beleuchtung Radikale bildet, die ein Monomer polymerisieren, das multifunktionale Vernetzer besitzt.^[118] Verschiedene Additive, einschließlich anderer Polymere, können hinzugefügt werden, um die für den 3D-Druck kritischen Lösungseigenschaften einzustellen.^{[118][119]}

Das Hydrogel Poly(ethylenglykol) und sein Derivat Poly(ethylenglykol)diacrylat

Hydrogele bilden eine große Klasse von wasserhaltigen Polymernetzwerken, die typischerweise biokompatibel sind und physiologische Steifigkeitswerte aufweisen, die denen vieler Weichgewebe ähneln. Hydrogele können über kovalente Bindungen (chemische Hydrogele) oder nicht-kovalente (physikalische Hydrogele) molekulare Wechselwirkungen vernetzt werden.^{[9][119]} Poly(ethylenglykol) (PEG) ist ein nicht-ionischer Polyester, der durch seine Hydrophilie und geringe Immunogenität in biomedizinischen Anwendungen weit verbreitet ist.^[120] Es ist ein allgegenwärtiges Hydrogel im Tissue Engineering, das sehr bioinert ist, aber dennoch dramatischen chemischen Modifikationen unterworfen werden kann, um eine Vielzahl von funktionellen PEG-Derivaten zu schaffen.^[121]

PEG kann so funktionalisiert werden, dass es photoreaktiv ist, wobei PEG-Di-Acrylate (PEGDA) und PEG-Methacrylate (PEGMA) die häufigsten Kandidaten sind.^[119] Beim 3D-Druck von Hydrogelen gibt es viele Überlegungen, die von den Flüssigkeitseigenschaften, dem Düsendesign und der Wahl der Vernetzungsmethode (physikalisch vs. chemisch) bis hin zu den Lösungseigenschaften, wie Scherverdünnung, Verdickung, Viskosität und Zeit bis zur Gelierung, reichen. Eine genauere Kontrolle dieser Lösungseigenschaften, insbesondere derjenigen, die während der Gelierung/Vernetzung dynamisch auftreten, sind der Schlüssel für die Zukunft des 3D-Drucks von Hydrogelen.^[119] Dabei besteht die Herausforderung im gleichzeitigen Erhalt der Biokompatibilität. Hochauflösende Hydrogelstrukturen wurden von Richter et al. demonstriert, wo 1 µm große PEGDA-Strukturen erzeugt wurden, um proteinabweisende Teile der genannten Mikrostrukturen zu entwickeln.^[122]

Während Hydrogele eine präzise Kontrolle über physikalische Parameter wie Steifigkeit und Abbaubarkeit ermöglichen, fehlt es vielen synthetischen Hydrogelen an physiologisch relevanten architektonischen Motiven, wie z. B. Fibrillenstrukturen, was das Interesse auf die Verwendung von natürlich gewonnenen Materialien lenkt.^{[9][88]}

2 Herausforderung der aktuellen Forschung

Wie bereits eingangs erwähnt, kann die Nachbildung von biologischen Systemen viele Leben retten, egal ob als Organersatz, zur Heilung von Krankheiten oder zur Herstellung von Medikamenten. Wichtig dabei ist die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten aus Gerüststruktur, ECM und Zellen und ihrer Interaktion untereinander. Kleine Abweichungen in der Morphologie und Materialbeschaffenheit können hierbei große Auswirkungen auf die erfolgreiche Bildung des Zielgewebes und das Verhalten der einzelnen Zellen oder Enzymen haben. Studien haben gezeigt, dass die ECM-Komponenten biochemische Hinweise liefern, die für die Zellsignalisierung und Gewebemorphogenese notwendig sind. Je genauer das Gerüst die physikalische Anordnung und die biochemischen Eigenschaften des ECM nachahmt, desto erfolgreicher ist der Geweberegenerationsprozess bei geschädigtem Material. Bei der Anfertigung von biologischen Systemen ist es daher unerlässlich, die Materialzusammensetzung und deren Auswirkung auf die biologisch aktiven Komponenten genau zu kennen. Um das Zielgewebe effektiv zu rekonstruieren, müssen daher neben der Materialzusammensetzung auch die Geometrie und die mechanische Architektur der ECM berücksichtigt werden. Diese bestimmen zusammen mit der Kommunikation der Zellen untereinander die Beschaffenheit des Gewebes und beeinflussen die Entwicklung der einzelnen Gewebezellen hinsichtlich ihrer Morphologie, Proliferation und Differenzierung sowie der Expression bestimmter Gene und damit Proteine, die allesamt für die Effektivität des Zielgewebes entscheidend sind. (Abbildung 11).^[123]

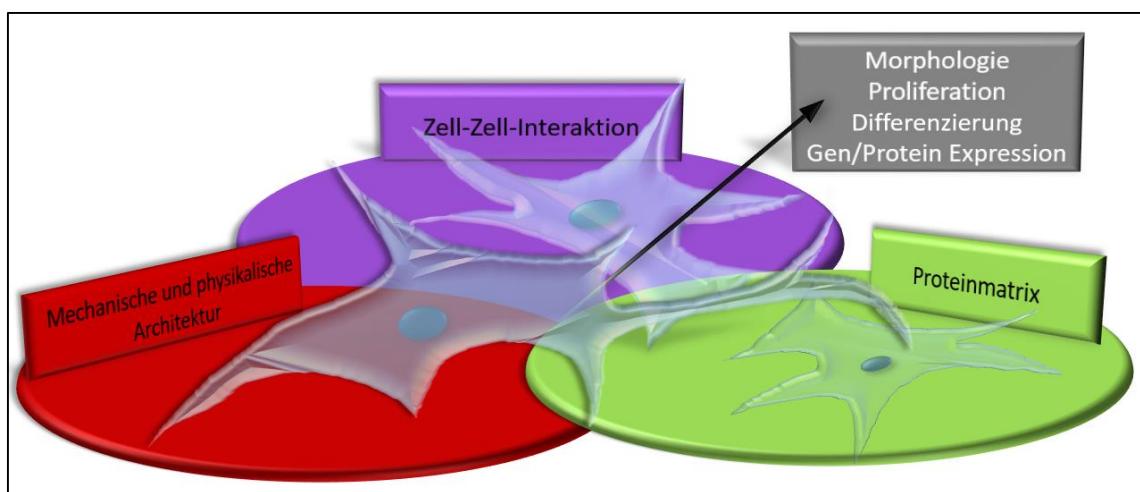


Abbildung 11 Einflussfaktoren auf die Funktion und das Verhalten von Zellen beim Tissue Engineering

Natürliche und synthetische Hydrogele haben sich hier in der Anwendung bewährt.^[124] Die Herausforderung besteht dabei in der Verarbeitung der zu verwendenden Materialien.^[125] Um geeignete Auflösungen der fein strukturierten ECM mimiken zu können, bieten sich hierbei hochauflösende 3D Druckverfahren auf Elektrojetting-basis an. Dabei ist zu beachten, dass die Eigenschaften der Hydrogele, wie die Viskosität, Einfluss auf das Herstellverfahren, die Genauigkeit und die Produktionsgeschwindigkeit

haben und sich damit auch auf die Gewebebildung auswirken. Die komplexen Wechselwirkungen der Parameter zwischen Hydrogelen, Herstellverfahren und Zelle sind in Abbildung 12 dargestellt.

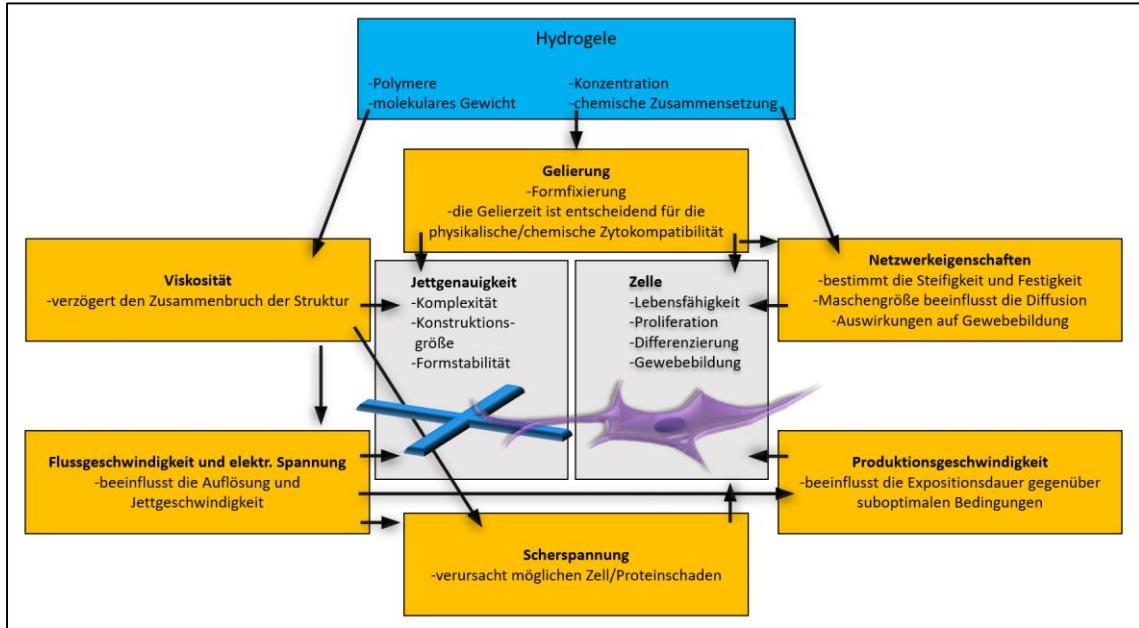


Abbildung 12 Schematische Darstellung der Fabrikationsparameter und deren Einfluss auf die Hydrogele, Herstellverfahren und Zellen. Diese stehen in komplexen Wechselwirkungen zueinander.

3 Zielsetzung der Arbeit

Unter Betrachtung und Berücksichtigung dieses komplexen Zusammenspiels wurden in dieser Arbeit neue Materialsysteme als Tinten für strukturierte Druckverfahren auf Elektrojetting-basis untersucht. Dafür wurden verschiedene Materialkompositionen charakterisiert und hinsichtlich ihrer Verwendung als 3D-Tinte optimiert. Zwei Materialsysteme, auf PAA und PEGDA/PAA Basis, setzen sich dabei aus synthetischen Hydrogelen zusammen. Das dritte Materialsystem ist das natürlich vorkommende Kollagen. Für jedes dieser Materialsysteme galt es anschließend ein passendes Herstellverfahren zu etablieren, um daraus 3D-Strukturen produzieren zu können. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Parametereinstellung des Druckverfahrens um eine robuste Prozessführung zu etablieren, welches Hand in Hand mit der Materialzusammensetzung und deren Eigenschaften wie Viskosität ging. Nach erfolgreicher iterativer Optimierung und Erhalt der gewünschten 3D-Gerüststrukturen wurden diese hinsichtlich ihrer Auflösung, Architektur und Formstabilität charakterisiert. Die charakteristischen Eigenschaften der Gerüststruktur sind ausschlaggebend für ihr Anwendungspotenzial. Dieses wurde im letzten Schritt in Bezug auf die Eignung als maßgeschneidertes Biologisches System hin untersucht (Abbildung 13).

Das erste Arbeitspaket beinhaltet die Entwicklung einer Hydrogeltinte auf PAA und Wasser Basis, um durch Elektrojetting smart-actuating Polymerfasern herzustellen, die für 4D-Objekte verwendet werden können. Durch Einstellung der Tintenviskosität und Prozessparameter wird dabei ein Verfahren etabliert, um eine gerichtete Deposition der Hydrogelfasern zu erreichen. Durch die Kombination von Kompartimenten mit verschiedenen Vernetzungsgraden innerhalb der Faser durch Co-Jetting soll eine anisotrope Faser im Mykrometerbereich entwickelt werden, und deren Smart-Actuating-Eigenschaften durch Variation des Reizes getestet werden. Der Schwerpunkt liegt auf der Charakterisierung der PAA-Fasern und ihrer intelligenten Bewegungseigenschaften. Untersucht werden die formverändernde Bewegung, die Architektur und Eigenschaften der Fasern sowie ihre Zusammensetzung. Weiterhin gilt es die Reaktion auf den Stimulus in Abhängigkeit von pH-Wert, Ionenstärken und Puffersubstanzen zu untersuchen. In Kombination mit weiteren natürlichen Materialien gilt es die 3D Gerüststruktur und ECM von Gewebe nachzuahmen, welche durch einen Stimulus über die Zeit ihre Form verändert.

Im zweiten Arbeitspaket liegt der Fokus auf der Entwicklung einer Mikrofabrikationsmethode, mit der natürlich vorkommendes Kollagen im 3D-Mikrometerbereich präzise platziert und orientiert werden kann, um den Einfluss der ECM-Architektur in zellulären Systemen zu untersuchen. Dazu soll der Einfluss des elektrischen Feldes während der Herstellung auf die 3D-Deposition und Architektur der Kollagenfasern untersucht und ihre Verwendung als zellkompatible ECM demonstriert werden. Eine große Herausforderung stellt dabei die Stabilisierung der einzelnen Fasern und der Einfluss des Vernetzungsprozesses auf die morphologischen Eigenschaften der Faserarchitektur dar.

Im letzten Arbeitspaket soll eine biologisch aktive Tinte auf Hydrogelbasis entwickelt werden. Damit sollen biologisch aktive 3D-Strukturen mit kontrollierten und definierten Mikroporen mittels 3D-jet Writing direkt gedruckt werden können. Die Herausforderung liegt hierbei in der Optimierung der Prozessparameter und der Stabilisierung der Tinte für den Einsatz in wässrigen Systemen ohne Verlust der biologischen Aktivität. Durch direktes Drucken von enzymgeladenen Scaffolds können anschließend Stofftransfereffekte im Hydrogel untersucht werden. Durch den Einsatz im Durchflussreaktor können die 3D gedruckten Hydrogelstrukturen auf ihre Langzeitaktivität hin überprüft werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, inwieweit sich der Einsatz dieses Materialsystems für den direkten Druck von Zellen

eignet und damit eine völlig neue Dimension des Bioprintings durch kleinere und feinere Strukturen eröffnet.

Durch die Kombination der Arbeitspakete stehen neue Materialsysteme und entsprechende Mikroproduktionssysteme auf Basis des Elektrojetting zur Verfügung. Die daraus hergestellten hochauflösenden 3D- und 4D-Scaffolds stellen maßgeschneiderte biologische Systeme dar, die für Anwendungen in der regenerativen Medizin, der Soft Robotik, dem Tissue Engineering sowie für industrielle Enzymprozesse geeignet sind.

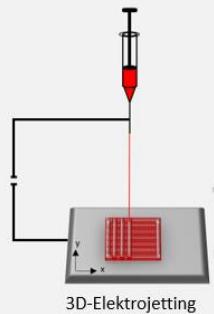
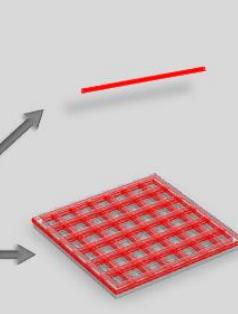
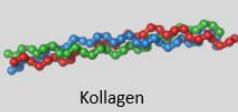
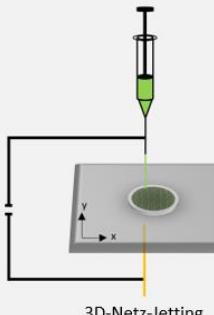
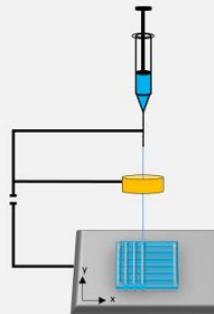
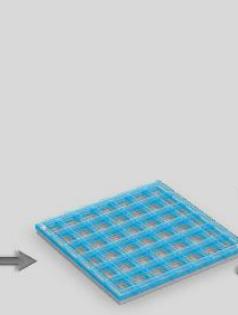
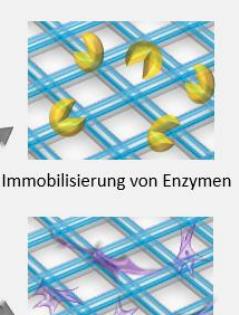
Material Charakterisierung und Validierung	Elektrojetting Prozess- und Parameteroptimierung	Scaffold Charakterisierung	Anwendung Potenzial und Validierung
Poly(acrylsäure) $\text{HO} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$ Ethylenglycol $\text{HO} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{OH}$	 <p>3D-Elektrojetting</p>	 <p>Shape-shifting</p>	<p>ECM-Nachahmung</p>
 <p>Kollagen</p>	 <p>3D-Netz-Jetting</p>	 <p>ECM-Nachahmung</p>	<p>Zellkultur mit HEP G2</p>
$\text{Poly(ethylenglycol)diacrylat}$ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ Poly(acrylsäure) $\text{HO} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$ Irgacure $\text{HO} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_3$	 <p>3D-jet Writing</p>	 <p>Immobilisierung von Enzymen</p>	 <p>Immobilisierung von Zellen</p>

Abbildung 13 Übersicht der Arbeitspakete gegliedert in Material, Herstellverfahren, Scaffoldcharakterisierung und potenzielle Anwendung.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

Poly(acrylsäure) (durchschnittliches Mv 450.000) (PAA), Poly(ethylenglykol)diacrylat (durchschnittliches Mn 700) (PEGDA), Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (ester terminated, Mw 50.000-75.000), 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon, β -Galactosidase (EC 3. 2.1.23) aus Aspergillus oryzae, O-Nitrophenyl- β -d-galactopyranosid (oNPG), ortho-Nitrophenol (oNP), Kollagen (from calf skin, Bornstein and Traub Type I, solid), Trizma® base und Poly[tris(2,5-bis(hexyloxy)-1,4-phenylenevinylene)-alt-(1,3-phenylenevinylene)] wurden von Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Ethanol, Natriumcitrat, NaOH, Na₂CO₃, NaCl (alle analytische Qualität) und Salpetersäure (hochreine Qualität) wurden von VWR (Radnor, Pennsylvania, USA) bezogen.

Ethylenglykol (EG), Zitronensäure, Glutardialdehyde (GDA) (25 % solution in water for synthesis contains Glutaraldehyde) und HCL wurde von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Poly-N-Isopropylacrylamid (PNIPAAm) wurde von Polymer Source (Dorval, Kanada) bezogen.

Lebensmittelfarbe wurde von Wusitta (Sitzendorf, Deutschland) bezogen

1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol (HFP) wurde von Fluorochem Ltd, (Hadfield, Vereinigtes Königreich) bezogen

Chloroform (Chromasolv™ Plus, for HPLC, contains amylenes as stabilizer, \geq 99,9 %) wurde von Honeywell (Morristown, USA) bezogen.

Kaliumdihydrogenphosphat wurde von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Natriumdihydrogenphosphat wurde von EMD Millipore (Billerica, USA) bezogen.

Deionisiertes Wasser wurde mit einem Milli-Q Ultrapure System von Merck Millipore (Billerica, USA) hergestellt. Alle Chemikalien wurden wie erhalten verwendet.

Für die Herstellung von Lösungen wurde die Waage Pioneer von Ohaus (USA) verwendet. Die Durchmischung erfolgte mittels Orbitalschüttler (Heathrow Scientific Digital Orbital Shaker).

4.2 Polymertinten für Elektrojettingverfahren

PAA Tinten für bikompartimentelle Fasern und 3D-Architekturen

Die Polymerlösung mit 15 % (w/v) Poly(acrylsäure) und 0,5 % (v/v) Ethylenglykol wurde durch Zugabe von 995 μ l deionisiertem Wasser zu 150 mg PAA hergestellt. Nach manuellem Schütteln wurden 5 μ l EG zu der Lösung gegeben. Dann wurde sie auf den Orbitalschüttler gestellt und über Nacht bei 200 rpm geschüttelt.

Die Polymerlösung mit 15 % (w/v) PAA und 20 % (v/v) EG wurde durch Zugabe von 800 µl deionisiertem Wasser zu 150 mg PAA hergestellt. Nach manuellem Schütteln wurden 200 µl EG zu der Lösung gegeben. Die Mischung erfolgte analog.

Zur Herstellung von der Polymerlösung mit PNIPAAm wurden 100 mg des Amin-terminierten PNIPAAm und 150 mg PAA in 995 µl deionisiertem Wasser und 5 µl EG gemischt und über Nacht bei 200 rpm geschüttelt.

Für die dreidimensionalen bikompartimentalen Gerüststrukturen wurden Jetting-Tinten mit 17 % (w/v) PAA in deionisiertem Wasser und unterschiedlichen Ethylenglycol-Konzentrationen von 0,5 % (v/v) und 20 % (v/v) verwendet.

Zur optischen Anfärbung wurde den Polymerlösungen Lebensmittelfarbe beigemischt. Die rote Lebensmittelfarbe bestand aus Wasser, Anthocyane aus schwarzem Karottenextrakt und Zitronensäure. Die grüne Lebensmittelfarbe enthielt Wasser und Kupferchlorophyllin.

Kollagentinten

Um den Einfluss der Kollagenkonzentration auf die Faserarchitektur zu untersuchen, wurde Kollagen im Bereich von 0,5 – 10 % (w/v) in 1,1,1,3,3,3 Hexafluoro-2-propanol (HFP) gelöst und für mindestens 2 h bei 200-250 rpm geschüttelt.

Als Kollagentinte für dreidimensionale Mikronetze wurde eine 5 % (w/v) Kollagenlösung in HFP verwendet. Die beiden Komponenten wurden gemischt und für mindestens 2 Stunden bei 200-250 rpm geschüttelt

Zur Beobachtung der Proben, sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch unter dem Konfokalmikroskop, wurde das HFP vorab mit 0,04 % (w/v) Poly[tris(2,5-bis(hexyloxy)-1,4-phenylenevinylene)-alt-(1,3-phenylenevinylene)] versehen.

Hydrogel-Tinten

Verschiedene Mengen von PAA wurden mit PEGDA gemischt, bis die Lösung homogen weiß war. Dann wurde die β -Galactosidase-Wasserlösung oder reines Wasser hinzugefügt. Um die Enzymaktivität vergleichbar zu halten, wurde eine Enzymmenge von 1,98 mg pro Gramm Trockenmasseausbeute des Hydrogels verwendet. Es wurden drei verschiedene Tinten mit unterschiedlichen Verhältnissen von PAA und Wasser zu PEGDA untersucht. Die resultierenden Volumina und Massen sind in Tabelle 1 beschrieben. Vor der Verwendung der Tinte wurden 80 µL einer frisch hergestellten 10 %igen (w/v) 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon-Lösung in Ethanol und Wasser (70:30) als Radikalinitiator zugegeben und vor dem Jetten 10 Minuten lang gemischt.

Tabelle 1 Zusammensetzung der verschiedenen Jetting-Tinten mit unterschiedlichen PAA- und Wasser/PEGDA-Verhältnissen. Für nicht-enzymatische Gerüste wurde deionisiertes Wasser ohne β -Galactosidase verwendet

	m_{PAA} [mg]	V_{PEGDA} [µL]	$V_{\beta\text{-Galactosidase-Wasserlösung}}$ [µL]	$C_{\beta\text{-Galactosidase-Wasserlösung}}$ [g L ⁻¹]
7.5PAA_80PEGDA	120	1216	304	10
10PAA_80PEGDA	160	1216	304	10
10PAA_90PEGDA	160	1368	152	23

PGLA Tinte für die Membranunterkonstruktion

Als Tinte wurde eine 35 % (w/v) PLGA Lösung in Chloroform hergestellt und für 2 h bei 250 rpm geschüttelt.

4.3 Herstellung der Puffer

Die Puffer wurden hergestellt, indem die jeweilige Pufferkomponente in deionisiertem Wasser gelöst, mit 1 M NaOH oder 1 M HCl auf den gewünschten pH-Wert titriert und das Gefäß mit deionisiertem Wasser auf das erforderliche Volumen aufgefüllt wurde. Alle Puffer hatten eine Molarität von 0,1 M. Um eine bestimmte Ionenstärke zu erhalten, erhielten die Puffer zusätzlich das Salz Natriumchlorid. Die benötigte Menge an Salz und Puffersubstanz wurde über den Online-Pufferrechner der Universität Liverpool berechnet.^[126] In Tabelle 2 sind entsprechend alle Puffer aufgeführt.

Tabelle 2 Zusammensetzung der verschiedenen Puffern

pH	Ionenstärke [M]	zugegebenes Salz	Pufferkomponente
3.0	0.265	Natriumchlorid	Zitronensäure
4.0	0.265	Natriumchlorid	Zitronensäure
5.0	0.265	-	Zitronensäure
7.0	0.224	-	Kaliumdihydrogenphosphat
7.0	0.245	Natriumchlorid	Kaliumdihydrogenphosphat
7.0	0.265	Natriumchlorid	Kaliumdihydrogenphosphat
7.0	0.285	Natriumchlorid	Kaliumdihydrogenphosphat
7.0	0.500	Natriumchlorid	Kaliumdihydrogenphosphat
7.0	0.265	Natriumchlorid	Natriumdihydrogenphosphat
7.1	0.265	Natriumchlorid	Trizma® base
9.0	0.265	Natriumchlorid	Trizma® base

4.4 Elektrojettingverfahren

Grundaufbau Elektrojetting

Folgender einfacher Grundaufbau wurde zur Herstellung von Kollagenmembranen verwendet. Die Jettingstation wurde in einer Plexiglasbox aufgebaut und bestand aus einer Pumpe (LA 120, Landgraf Laborsysteme HLL GmbH), einer abgestumpften Nadel (NE-253PL, Component Supply) auf einer 1 mL Spritze (Norm-Ject, Henke-Sass Wolf GmbH) und einer Metallplatte als Kollektor. Die benötigte Spannung wurde mittels eines Hochspannungsnetzgeräts (HCP 14-20000, FuG Elektronik GmbH) bereitgestellt. Die

Distanz zwischen Nadel und Kollektorplatte betrug 10,5 cm und die Flussrate der Polymerlösung 450 µL/h. Die angelegte Spannung lag bei den jeweiligen Versuchen in einem Bereich von 9 bis 12,5 kV. Die Temperatur im Labor wurde auf etwa 23 °C geregelt. Die Luftfeuchtigkeit konnte nicht reguliert werden, wurde aber aufgezeichnet.

Der Grundaufbau wurde weiterentwickelt, indem die Kollektorplatte auf eine bewegliche Station (ILS300LM, Newport Corporation) gesetzt wurde, welche über einen Controller (XPS driver) und einen Computer in x- und y-Richtung gesteuert werden konnte. Um die Station wurde ein Gerüst aus einem nichtleitenden Holz-Kunststoffverbund errichtet, um die Spritzenpumpe und weitere Geräte fixieren zu können. Mittels Klemmen konnten so die Abstände einfach variiert werden und innerhalb der Versuche konstant gehalten werden. Auch war es möglich, mehrere parallel angeordnete Versuchsaufbauten gleichzeitig zu betreiben und so die Herstellung zu beschleunigen. Platten aus demselben Holz-Kunststoffverbund konnten als Seitenwände eingezogen werden um Luftzüge zu unterbinden. Der Aufbau ist in Abbildung 14 dargestellt. Bei den folgenden Aufbauten handelt es sich um Variationen des verwendeten Systems.

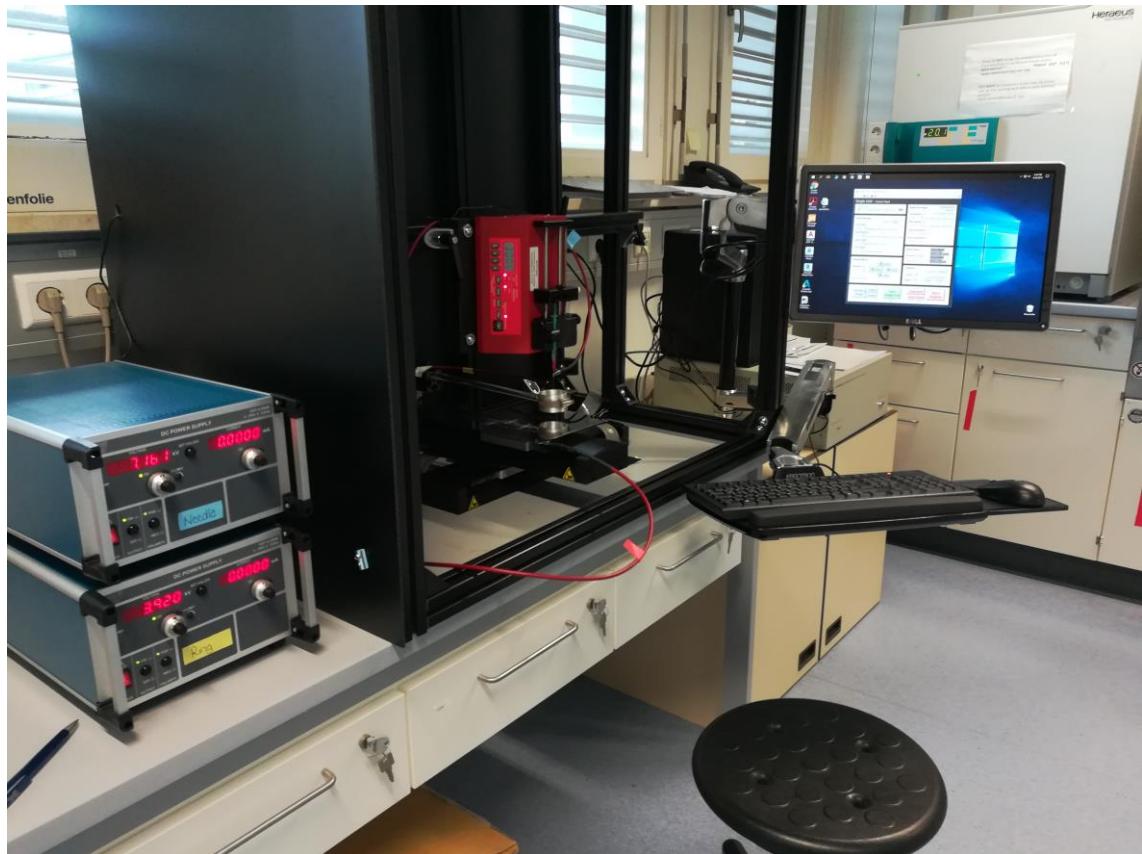


Abbildung 14 Laboraufbau einer variablen Jetting-Station. Weiterentwicklung des Grundaufbaus durch einen beweglichen und computergesteuerten Kollektor zur präzisen Orientierung der Fasern auf dem Kollektor

3D-Elektrojetting

3D-Elektrojetting wurde zur Herstellung von PAA-Fasern verwendet. Dabei wurden bikompartimentale Fasern durch elektrohydrodynamisches Co-Jetting hergestellt. Je eine 1 ml Spritze wurde mit einer der

beiden Polymerlösung gefüllt. Die beiden Spritzen wurden nebeneinander in der Pumpe mit Hilfe einer 3D-gedruckten Kunststoffkonstruktion platziert. Die Pumpe arbeitete mit einer Flussrate von 70 $\mu\text{l}/\text{h}$ pro Spritze. Stumpfe Nadeln (NE-253PL, Component Supply, 18 G) wurden auf beide Spritzen aufgesetzt. Die Kanülen wurden so gebogen, so dass die Spitzen parallel nebeneinander lagen und sich berührten. Über ein Hochspannungsnetzteil wurde an der Spitze der Kanülen eine Spannung von -5 kV bis -10 kV induziert. Die Erdung war mit der Kollektorplatte verbunden. Bei der Kollektorplatte handelte es sich um eine Metallplatte, die auf einen beweglichen Tisch gesetzt wurde, der über einen Controller und einen Computer gesteuert wurde. Der Abstand zwischen den Kanülenenden und der Kollektorplatte wurde auf 8,3 cm eingestellt. Die Pumpe wurde gestartet und sobald sich die beiden austretenden Polymertropfen berührten wurde die Spannung angelegt. Die angelegte Spannung wurde erhöht bis ein Taylor-Kegel sichtbar wurde, aus dem sich ein kleiner Polymer-Jet in Richtung der Kollektorplatte bewegte. Die Fasern wurden auf Glasobjektträgern aufgefangen, die mit Klebeband an der Metallkollektorplatte befestigt waren, während diese bewegt wurde. Nach der Vernetzung wurden die Fasern auf eine Länge von etwa 1 cm zugeschnitten, so dass die Enden im Sichtfeld des Lichtmikroskops lagen. Die übrigen Faserfragmente wurden mit einer Druckluftpistole vom Objektträger entfernt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Hydrophilie des Kollektormaterials wurde der Glasobjektträger durch verschiedene Materialplättchen ersetzt. Zur Sammlung von freien Fasern wurde statt der Metallplatte ein rotierender und geerdeter Metallrahmen als Kollektor verwendet. Die kürzere Seite des ca. 5 cm mal 15 cm großen rechteckigen Rahmens war mit einem Rotor verbunden, an dem die Erdung über Kupferband angebracht war. Die Fasern wurden über die längere Seite des Rahmens aufgewickelt, während dieser rotierte.

Dreidimensionale bikompartimentelle Scaffolds wurden durch mehrfaches Abfahren eines Schemas hergestellt. Da der Kollektor über ein computergesteuertes Positionierungssystem gesteuert wurde, konnte ein Schema mittels eines internen in LabVIEW entwickelten Programmes abgefahrene werden (Abbildung 15). Innerhalb des Programms war es möglich, die Anzahl und Größe der Quadranten einzustellen und zu variieren.

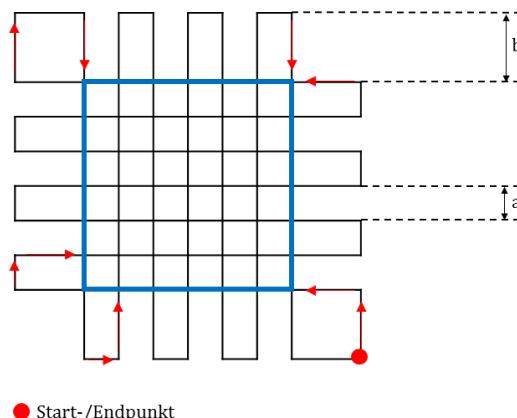


Abbildung 15: Schema zur Herstellung von Gerüststrukturen mit einstellbarer Quadrantengröße (a) und Anfahrtstrecke (b)

3D-Netz-Jetting

Beim Nahfeld-Jetten in die Mikrokavitäten betrug der Abstand zwischen der an der Spritze befestigten abgestumpften Präzisionsnadel (Tip 30 Gauge-0,255 mm, Nordson EFD, USA) und dem Array 0,1-0,5 cm.

Die 300 µm- und 800 µm-Arrays wurden von der Abteilung 3D-Zellkultursysteme zur Verfügung gestellt. Der Array wurde auf die gedruckte Kollektorplatte zwischen Nadel und Erdung gelegt. Als Punkterdung wurde ebenfalls eine abgestumpfte Nadel gewählt, die sich 0,1 cm- 0,5 cm vom Array entfernt und genau unter der Nadel der Spritze befand. Die Ansteuerung der einzelnen Mikrokavitäten erfolgte über die bewegbare Station und das Programm LabVIEW. Für das Electrojetting in die Mikrokavitäten lag die Flussrate bei 60 µL/h, die Geschwindigkeit bei 0,33-0,89 mm/s und die Spannung in einem Bereich von 7,8 kV-9,2 kV. Als Doppelerdung wurden entsprechend zwei Nadeln parallel zueinander abgebogen.

3D-jet Writing

Zur Herstellung der Hydrogelgerüste wurde ein 3D-jet Writing-Setup verwendet, wie es bereits beschrieben wurde:^[127] Kurz gesagt wurde eine Nadel (ID=0,84 mm, Nordson EFD, USA) an einer mit der Hydrogeltinte gefüllten 1 mL Spritze befestigt und auf die Spritzenpumpe montiert. Die Flussrate wurde auf 70 µL/h eingestellt und die Nadel wurde mit einer externen Spannungsquelle auf +7 kV aufgeladen. Eine geerdete Metallplatte wurde als Kollektor auf der computergestützten x-y-Sation in einem Abstand von 8 cm zur Nadel montiert. Um die Biege- und Peitschinstabilität während der Jetvorgangs zu kontrollieren, wurde ein sekundäres elektrisches Feld angelegt, indem ein Metallring zwischen Nadel und Kollektor platziert wurde. Durch Aufladen der Ringelektrode auf +3,5 kV über ein zweites separates Hochspannungsnetzteil wurde ein elektrischer Potentialtopf erzeugt und die Richtung des elektrischen Feldes zur Mitte des Rings hin umgekehrt. Die nach außen gerichtete Jetbewegung wurde dadurch unterdrückt. Die Kombination des stabilen Polymer-Jets mit einem computergestützten Positionierungssystem ermöglichte die präzise Strukturierung der Hydrogelfasern zu hoch geordneten Strukturen. Zur einfacheren Handhabung wurde ein Glasobjektträger auf den Kollektor gelegt und das Gerüst mit einer Kollektorgeschwindigkeit von 12 mm/s darauf platziert.

4.5 Extrusionsbasierter 3D-Druck

Zur Herstellung von PGLA Unterkonstruktionen für die Kollagenmembranen wurde der Aufbau der Jettingstation modifiziert. Die PGLA Polymerlösung wurde mit Hilfe der Spritzenpumpe durch eine 25 G Nadel (NE-253PL, Component Supply) extrudiert. Direkt an der Nadel befand sich eine Metallplatte, die über das computergesteuertes Positionierungssystem von Newport gesteuert wurde. Um die Parameter für einen geeigneten Faserdurchmesser des PLGA zu bestimmen, wurden sowohl die Flussrate von 100 bis 300 µL/h durch die Pumpe als auch die Druckgeschwindigkeit des Positionierungssystems von 3 bis 7 mm/s variiert. Die Herstellung der Stützgitter für die Kollagenfasern erfolgte bei einer optimierten Druckgeschwindigkeit von 3 mm/s und einer Flussrate von 250 µL/h sowie einer Quadrantengröße von 1 mm bei einer Größe von ca. 1 cm x 1 cm. Außerdem wurde eine große Membran von ca. 5 cm x 5 cm hergestellt, ebenfalls mit einer Quadrantengröße von 1 mm.

Um die Breite des 3D-jet Writings mit einem konventionellen extrusionsbasierten gedruckten Hydrogelstrang zu vergleichen, wurde die Tintenlösung 7,5PAA_80PEGDA mit einem pneumatischen 3D-Drucker (3D Discovery, regenHU, Villaz-St-Pierre, Schweiz) gedruckt. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden die Parameter so weit wie möglich konstant gehalten. Daher erfolgte die Extrusion durch eine Nadel mit einem Innendurchmesser von 0,84 mm (Nordson EFD, USA), einem Extrusionsdruck von 0,04 MPa, einer Anfangshöhe von 0,2 mm und einer Druckgeschwindigkeit von 12 mm/s. Es wurden 50 mm lange Einzelstränge gedruckt und die Architektur wurde auf die gleiche Weise wie bei den gejetteten Gerüsten analysiert, was zu einer Strangbreite von $858 \pm 61 \mu\text{m}$ führte.

4.6 Molekulare Quervernetzung

Zur Vernetzung der bikompartimentellen PAA Fasern wurden die Objektträger für 2 Stunden bei einer Temperatur von 130 °C in den Ofen (T12 Kendro, Heraeus Instruments) gegeben. Unter dieser Bedingung konnten Polyacrylsäure und Ethylenglykol reagieren und eine vernetzte Struktur bilden. Durch die Vernetzung bildete sich ein Netzwerk zwischen den Polymerketten, die Fasern waren nicht mehr in Wasser löslich.

Zur molekularen Quervernetzung von Kollagen wurden verschiedene Methoden untersucht. Um die Auswirkungen der UV-Strahlung auf die gejettete Kollagenmembran zu untersuchen wurde die Membran 2 cm unter einer UV-Lampe (3 Watt, 365 nm; Tank007) positioniert und für 1 h bestrahlt. Dabei wird die Bildung von freien Radikalen an aromatischen Aminosäurenresten wie Tyrosin und Phenylalanin initiiert. Anschließend formen diese Radikale Bindungen untereinander, sodass sich die Stabilität der Kollagenfasern erhöht.^[128] Zusätzlich wurde die molekulare Quervernetzung durch Verwendung von Glutardialdehyde (GDA) untersucht. Die Aldehydgruppen des GDA reagieren mit dem ϵ -Aminogruppen der Lysyl- und Hydroxylysylresten des Kollagens. Dadurch wird ein Wassermolekül frei und eine Schiffsche Base bildet sich als Zwischenprodukt. Diese Zwischenprodukte verknüpfen sich untereinander zu größeren quervernetzten Einheiten.^[129] Zunächst wurde die Kollagenmembran oder das Array auf einem gläsernen Objektträger mit Hilfe von Klammern befestigt um ein Zusammenrollen auf Grund der hohen Luftfeuchtigkeit zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger inklusive Probe in die jeweiligen Aufbauten gelegt. Für größere Membranen wurde die Membran freistehend an einem Metallgestell befestigt. Bei einem Versuchsaufbau wurde 25 % GDA in wässriger Lösung in ein Glasgefäß gefüllt und ein Metallgestell aus Edelstahl hineingestellt. Dieses diente als Ablage und plazierte den Objektträger oberhalb des Flüssigkeitspiegels. Das Glasgefäß wurde anschließend mit einer Platte verschlossen und die Probe für eine definierte Zeit dem GDA-Dampf ausgesetzt. Bei einem zweiten Versuchsaufbau wurde ein Glaskolben mit 25 % GDA in wässriger Lösung gefüllt. Durch einen Schlauch wurde Stickstoff mit einem Druck von ca. 0,1 bar direkt in die Flüssigkeit geleitet, so dass es in Blasen aufstieg und sich mit GDA anreicherte. Anschließend wurde das Gas in eine Plastikbox mit Ventil geleitet, in der sich die Probe auf dem Objektträger befand.

Um das PEGDA der dünnen Gerüststränge aushärten zu können war es notwendig, die radikalische Kettenreaktion unter inertnen Bedingungen durchzuführen. Dazu wurde eine speziell angefertigte Reaktionskammer 3D-gedruckt (Connex3 von Stratasys, Eden Prairie, USA) (Abbildung 16). In diesem Aufbau wurde Stickstoffgas in ein Wasserbad diffundiert und strömte anschließend in einer geschlossenen Umgebung über die Hydrogelprobe. Die Probe wurde 3 Minuten lang mit einer UV-Lampe (365 nm, 3 W, Fuyong Town, China) bestrahlt. Für die Enzymaktivitätstests wurden die Proben direkt nach der Vernetzung in Wasser gelegt, um eine Dehydrierung der Gerüste zu vermeiden. Für das Gehäuse der Reaktionskammer wurden Materialien des Farbsystems VeroCyan, VeroMagenta, VeroYellow und für den Deckel das Material VeroWhite verwendet (Stratasys, Eden Prairie, USA). Gehäuse, Deckel, Schublade und Diffusor wurden separat gedruckt und anschließend zusammengefügt. Das Gewinde für das Auslassventil (1/4 " Entleerungsventil mit O-Ring) wurde mit einem Gewindeschneider eingearbeitet. Das Ventil, der Schlauchanschluss und der Diffusor wurden anschließend mit LOCTITE® 401 ein- bzw. angeklebt. Das Wasserbad wurde soweit gefüllt, dass sich der Diffusor gänzlich unter Wasser befand. Deckel und Schublade wurden mit einer aufgeklebten Dichtmatte aus 1 mm dickem Silikon abgedichtet. Die UV-Taschenlampe wurde durch das Loch im Deckel eingeführt und mittels O-Rings abgedichtet. Anschließend wurden Gehäuse und Deckel miteinander verschraubt und die Kammer somit verschlossen. Damit sich eine feuchte und stickstoffreiche Atmosphäre ausbilden konnte, wurde für mindestens 30 min mit

Stickstoff gespült, bevor die Probe zum Aushärten über die Schublade in die Reaktionskammer eingebbracht wurde.

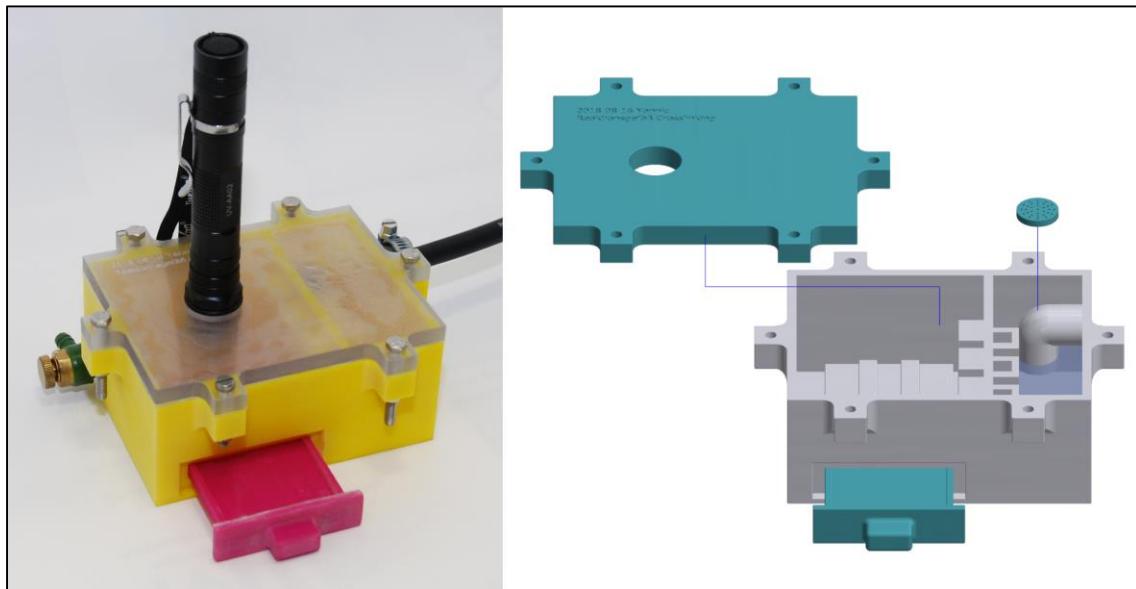


Abbildung 16 Reaktionskammer zum Aushärten von filigranen Hydrogelstrukturen unter Schutzgas (links) und die zugehörige CAD-Zeichnung der Reaktionskammer (rechts) erstellt mit Autodesk® Inventor.

4.7 Charakterisierung der Materialsysteme

Quellfaktor

Zur Bestimmung des Quellfaktors Q wurde das Gewicht der trockenen vernetzten Polymerproben m_d und das Gewicht der feuchten Polymerproben m_w gemessen. Der Quellungsfaktor wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$Q = \frac{m_w - m_d}{m_d} \quad 1$$

Die Bestimmung der Nassmasse erfolgte dabei nach der Lagerung in deionisiertem Wasser oder Puffer über Nacht (mindestens 15 h). Anschließend wurden die Proben in einem Trockenschrank (T12 Kendro, Heraeus instruments) bei 40°C 7 h lang getrocknet und erneut gewogen, um die Trockenmasse zu bestimmen.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie:

Um die molekulare Struktur zu bestimmen wurde eine Infrarotspektroskopie (IR Spektroskopie) mit einem Fourier-Transform-IR-Spektrometer (Platinum ATR, Bruker) durchgeführt. Während der IR-Spektroskopie wurde ein Diamant aus Kristall verwendet und in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 4000 cm^{-1} gemessen. Der IR-Strahl wurde in einem Winkel von etwa 45° auf die Kante des Reflexionselements gerichtet. Insgesamt wurden die Messungen 32-mal pro Probe durchgeführt und anschließend der Mittelwert durch die OPUS Spektroskopiesoftware von Bruker ausgegeben. PAA wurde als Pulver, EG als Flüssigkeit und die Polymerlösungen als separate vernetzte Polymerropfen gemessen.

Rheologie

Die rheologischen Kurven der Hydrogelmischungen wurden bei 25 °C mit einem Physica MCR 301 Plattenrheometer mit einer ebenen Platte und einem CP-25-1 Konus (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) und einem Spaltabstand von 0,048 mm ermittelt. Rotationsversuche mit reinem PEGDA und der Hydrogeltinte (7,5PAA_80PEGDA) wurden mit einem logarithmischen Schergeschwindigkeitsgradienten zwischen 0,001 und 1000 s⁻¹ geschert, der über eine Dauer von 5 min angelegt wurde, während die Scherspannung gemessen wurde. Die Hydrogeltinte mit unterschiedlichen PAA- und Wasserkonzentrationen wurde zunächst 30 s lang bei einer konstanten Scherrate von 0,1 s⁻¹ geschert, gefolgt von einer Ruhezeit von 30 s zur Homogenisierung der Ausgangsbedingungen. Anschließend wurde über eine Dauer von 267 s ein logarithmischer Schergeschwindigkeitsgradient zwischen 0,001 und 10 s⁻¹ angelegt und die resultierende Scherspannung gemessen. Die Scherviskosität η wurde berechnet, indem die Scherspannung τ durch die entsprechende Scherrate $\dot{\gamma}$ geteilt wurde. Die Null-Scherviskosität η_0 ist durch den Grenzwert der schergeschwindigkeitsabhängigen Viskositätsfunktion bei einer unendlich kleinen Schergeschwindigkeit gegeben:^[130]

$$\eta_0 = \lim_{\dot{\gamma} \rightarrow 0} \eta(\dot{\gamma}) \quad 2$$

SAXS

Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)-Messungen wurden in Kooperation mit dem Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik am KIT praktiziert. Dazu wurden die Messungen der Proben in Gel-Haltern mit einem Xeuss 2.0 (Fa. Xenocs, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Der Abstand zwischen Probe und Detektor wurde auf 1000 mm eingestellt. Die Streudaten wurden mit einem Pilatus 300 K Detektor (Fa. Dectris, Schweiz) für 600 s gesammelt. Die mittels SAXS erhaltene Intensität $I(q)$ wurde als Funktion des Streuvektors q unter Verwendung der folgenden Gleichung gemessen:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} * \sin \frac{\theta}{2} \quad 3$$

wobei 2θ der Streuwinkel ist und $\lambda=0,154$ nm der Wellenlänge des verwendeten Cu-K α -Röntgenstrahls entspricht. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Foxtrot, während die Analyse mit IgorPro durchgeführt wurde. Die Auswertung der Streudaten basierte auf dem Global Unified Fit Modus.^{[131][132][133]} Um die Gleichung an mehrere Strukturebenen anzupassen, enthält jede Anpassungsebene i ein Guinier-Regime zur Beschreibung der Strukturgröße (z. B. Primärpartikel oder Aggregate) und ein Potenzgesetz-Regime zur Beschreibung der inneren (Massenfraktal) oder äußeren Strukturmerkmale (Oberflächenfraktal), gegeben durch:

$$I(q) = \sum_{i=1}^n \left[G_i \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{gi}^2}{3}\right) + B_i \cdot \exp\left(\frac{-q^2 R_{g(i+1)}^2}{3}\right) \cdot \left\{ \frac{q}{\left[\text{erf}(qR_{gi}/\sqrt{6})\right]^3} \right\}^{-p_i} \right] \quad 4$$

mit dem Trägheitsradius R_{gi} , der Fehlerfunktion erf , dem Guinier-Vorfaktor G_i und dem für die Potenzgesetzstreuung spezifischen Vorfaktor B_i mit einem Exponenten p_i . Die Partikelgröße ist gegeben durch:

$$d_p = 2 \sqrt{\frac{5}{3}} R_g \quad 5$$

Im Falle von Partikeln oder Clustern beschreibt der Exponent p in unteren q -Bereichen den Formfaktor $P(q)$. Für Kugeln ist der Formfaktor durch 0 gegeben, 1 beschreibt eine zylindrische und 2 eine scheibenförmige Form.^[134] Die fraktalen Eigenschaften eines einzelnen Clusters können durch die fraktale Dimension der Oberfläche D_{sf} beschrieben werden und sind gegeben durch:^[135]

$$D_{sf} = 6 - p$$

6

4.8 Charakterisierung der Gerüststrukturen und Fasern

Charakterisierung der Architektur

Zur lichtmikroskopische Analyse wurden die Fasern oder Gerüststrukturen mithilfe eines optischen Digitalmikroskops (Keyence VHX-5000, Deutschland) betrachtet. Verwendet wurden Objektive mit einer Gesamtvergrößerung von 20x-200x- und 200x-2000x (ZS20 und ZS200, Keyence, Deutschland).

Die Architektur der Gerüste und Netze wurden mit ImageJ (Open-Source-Software) ausgewertet. Zur Bestimmung des Durchmessers der Kollagenfasern, sowie zur Analyse der Porengröße wurde das Plugin DiameterJ verwendet. Um den arithmetischen Mittelwert \bar{x} zu berechnen, wurde Formel 7 mit der Summe aller Häufigkeiten n , der Häufigkeit eines einzelnen Durchmessers n_i und dem jeweiligen Durchmesser x_i verwendet. Für die zugehörige Standardabweichung s wurde Formel 8 benutzt.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^k n_i * x_i \quad 7$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^k n_i * (x_i - \bar{x})^2} \quad 8$$

Die Winkel an den Knotenpunkten der Gerüste sowie die Orientierung der Fasern wurden mit dem Plugin OrientationJ gemessen.

Für die Querschnittsanalyse wurden die trockenen Gerüste mit einer frischen Rasierklinge geschnitten und mit dem Lichtmikroskop im nassen und trockenen Zustand betrachtet. Mit der Keyence-Software (Version 1.8.0) wurden die Strangbreite s , die Stranghöhe h , der Radius R und die Bogenlänge b gemessen. Die Querschnittsfläche der Strähnen wurde mit der angegebenen Formel für Kreissegmente A berechnet:

$$A = R^2 * \arcsin\left(\frac{s}{2R}\right) - \frac{s * (R - h)}{2} \quad 9$$

Bei der Messung des Rollverhaltens von PAA Fasern wurde ein Glasträger mit den Fasern unter dem Mikroskop platziert. Von jeder einzelnen Faser wurde der Durchmesser bestimmt. Anschließend wurde das Rollverhalten der Fasern gefilmt. Dazu wurde ein Tropfen Puffer auf den Objektträger gegeben, so dass der sichtbare Teil vollständig befeuchtet wurde. Nach 10 Minuten wurde das Filmen gestoppt und es wurden Bilder der gerollten oder gekräuselten Fasern aufgenommen. Die Bilder der Fasern wurden dann in Kategorien wie "definiertes Aufrollen", "undefinierte Rollbewegung" und "keine Veränderung" eingeteilt.

Rasterelektronenmikroskopie:

Die Gerüststrukturen und Fasern wurden mit kohlenstoffhaltigen Klebepads an einem Probenhalter befestigt. Zur Verbesserung der Leitfähigkeit wurden sie mit 4 bis 5 nm Gold-Palladium [80:20] beschichtet, was bei 21,3 mA für 32 Sekunden mit einem MED 020-Gerät (Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein) unter Argon Atmosphäre durchgeführt wurde. Die Bilder wurden mit einem VEGA 3 von TESCAN (Dortmund, Deutschland) mit einer Strahlintensität von 10, einer Spannung von 8,0 kV und einem Arbeitsabstand von 7 mm aufgenommen.

Fluoreszenzmikroskopie:

Die Bildgebung gelang mittel Axio Observer Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) und der Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH). Für die Aufnahmen wurde der ApoTome und die beiden Objektiven Apo Chromat 63 x ohne Emersionsöl und mit Plan Neo Fluar 100 x mit Emersionsöl verwendet.

Zur genaueren Beobachtung der 3D-Netzstruktur in den Mikrokavitäten sowie der einzelnen Kompartimente der PAA Faser wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) (Leica TCS SP5 Confocal Laser Scanning Microscope, Deutschland) verwendet. Für dreidimensionale Aufnahmen wurden mehrere Bilder in z-Achse aufgenommen und anschließend mittels ImageJ zu einem 3D-Bild gestapelt.

4.9 Enzymversuche

Leaching tests mit Micro BCA

Auf jedes hergestellte Gerüst wurde ein Tropfen Wasser (0,65 mL) gegeben, um es vom Objekträger abzulösen. Nach 5 Minuten wurde das Gerüst in ein neues Wasserbad (1 mL) überführt und 15 min lang inkubiert. Dann wurde das Gerüst über Nacht in einem neuen Wasserbad (1 mL) im Kühlschrank bei 8 °C gelagert, bevor es für die Enzymkinetik oder für den kontinuierlichen Reaktor verwendet wurde. Um die Menge des ausgewaschenen Enzyms zu bestimmen, wurde von jeder Waschlösung ein Mikro-BCA-Assay (Micro BCATM Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) gemäß den Anweisungen auf dem Kit durchgeführt.

Enzymkinetik von freien und immobilisierten Enzymen

Zur Bestimmung der Batch-Kinetik wurden sowohl reine Enzymlösungen als auch gejettete Hydrogelstrukturen mit eingeschlossenem Enzym auf ihre enzymatische Aktivität hin getestet. Neben der enzymatischen Aktivität der Scaffolds wurde auch der Verlust an Enzymaktivität während des Jetting-Prozesses bestimmt. Dazu wurden Gerüste hergestellt und die Aktivität vor der Vernetzung durch Auflösen getestet. Dies wurde mit der gleichen Menge an Hydrogeltinte vor dem Jetting und mit der Aktivität des freien Enzyms verglichen. Die Tests wurden in 1,8 mL Citratpuffer (333 mM Natriumcitrat, titriert gegen NaOH auf pH 4,6) durchgeführt. Der Puffer enthielt den Reaktanten oNPG in einer Konzentration von 2,2 mmol/L. Das Enzym katalysiert die Reaktion der Hydrolyse von oNPG zu oNP und Galaktose. Die Experimente wurden bei 37 °C in einem Eppendorf-Thermoshaker (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 750 rpm durchgeführt. Proben von 25 oder 50 µl wurden über einen Zeitraum von einer Stunde entnommen. Diese Aliquots wurden zu 100 µl 1 M Natriumcarbonatlösung in Mikrotiterplatten gegeben und mit Citratpuffer auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Die UV-Vis-Spektren der Lösungen wurden bei 420 nm gemessen, um das Absorptionsprofil und die Intensität des oNP-Produkts zu bestimmen.^[136] Unter Verwendung eines handelsüblichen oNP wurde eine Kalibrierungskurve ermittelt, um die Konzentration zu quantifizieren. Da sich der effektive Extinktionskoeffizient bei Vorhandensein

von gelösten und dispergierten Partikeln ändern kann, wurden Hydrogelgerüste ohne Enzyme als Referenz getestet.

Kontinuierlicher Reaktor:

Zur Untersuchung der Langzeitaktivität der eingeschlossenen Enzyme wurde ein Durchflussreaktor mit einem Reaktionsvolumen von 3 mL verwendet. Der Reaktor wurde mit VeroWhitePlus RGD835 (Stratasys, Eden Prairie, USA) 3D-gedruckt, wie in anderen Veröffentlichungen beschrieben.^{[137][138]} Aufgrund von Adsorptionseffekten wurde der Reaktor mehrere Stunden lang mit oNP-Lösung gespült, um eine vollständig gesättigte Reaktorwand zu gewährleisten. Vor Beginn des Experiments wurde der Reaktor mit Citratpuffer gespült, bis kein oNP mehr im Auslass nachweisbar war. 14 Hydrogelgerüste (Querschnittsfläche: $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$) wurden in der Reaktionskammer platziert. Der Reaktor sowie die Ein- und Auslassrohre wurden mit Citratpuffer gefüllt und gespült, um Luftblasen zu entfernen. Das gesamte System wurde in einem Wasserbad (E100, Laud Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland) auf 37 °C erhitzt. Eine Spritze mit dem in Citratpuffer gelösten Reaktanten wurde an den Einlass angeschlossen und eine Flussrate von 3 mL/h angelegt. Dies entspricht einem oNPG-Massenfluss von $6,64 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/h}$. Der oNP-haltige Ausgang wurde mit einem automatischen Fraktionssammler (Superfrac, Pharmacia Biotech AB, Schweden) in 3 mL Proben fraktioniert, und die oNP-Konzentration wurde wie oben beschrieben gemessen. Aufgrund der bleichenden Wirkung von oNP wurden die Proben während des Tages sofort analysiert. Die während der Nachtstunden gesammelten Proben wurden am Morgen gemessen. Die Gesamtdauer der Versuche betrug 76 Stunden, wobei die Substratlösung zweimal täglich neu hergestellt wurde.

4.10 Simulation

Die Simulationen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik und Biosysteme am KIT durchgeführt.

Berechnung und Simulation der Diffusionseigenschaften

Für die Simulation des Diffusionsverhaltens wurde die Elementarzelle des Hydrogelgerüsts in der 3D-CAD-Software Inventor 2019 Professional (Autodesk Inc., San Rafael, USA) auf Basis der Daten der Bildanalyse konstruiert. Die Software erzeugt dreidimensionale Formen, die im *.ipt-Datenformat gespeichert werden und direkt in die Simulationssoftware COMSOL Multiphysics 5.4 (COMSOL AB, Stockholm, Schweden) importiert werden können. Die globalen Parameter wurden wie in den folgenden Sätzen beschrieben definiert. Die Oberfläche und das Volumen der entworfenen Hydrogelknoten wurden mit den in Inventor enthaltenen iParametern mit der Einstellung "hohe Genauigkeit" berechnet. Der Diffusionskoeffizient wurde aus den kinetischen Batch-Experimenten berechnet. Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrogelgitter wurde mit der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms in Lösung verglichen, was einen Effektivitätsfaktor von etwa 21,2 % ergab. Als grobe Schätzung betrug die Diffusionsdistanz von der Oberfläche des Hydrogels zum Zentrum eines Strangs etwa 15 μm für die Strukturen mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$. Die Reaktionskonstante k [s^{-1}] für die enzymatische Reaktion, die charakteristische Diffusionslänge L [m] und der Diffusionskoeffizient [m^2/s] bilden die dimensionslose Zahl Thiele-Modul ϕ , die sich auch mathematisch aus dem Effektivitätsfaktor η_{cat} ableiten lässt. Er korreliert die enzymatische Aktivität von immobilisierten Enzymen mit der Aktivität von freien Enzymen in Lösung. Für diffusionsbegrenzte Systeme mit Thiele-Moduln > 3 kann die

Reaktionskinetik erster Ordnung und eine Katalysatorplatte η_{cat} durch die folgende Gleichung vereinfacht werden:[139]

$$\eta_{cat} = \frac{\tanh(\phi)}{\phi} \quad 10$$

$$D_{eff} = k * \left(\frac{L}{\phi}\right)^2 \quad 11$$

Die Lösung des Gleichungssystems ergab einen effektiven Diffusionskoeffizienten von $2,2 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$. Diese globalen Parameter wurden in COMSOL in die Gleichungen der Physik "Transport verdünnter Spezies in porösen Medien" aufgenommen, um die zeitabhängigen Transport- und Reaktionsprozesse innerhalb der Hydrogelgeometrie zu beschreiben. Als Randbedingungen wurden Anfangskonzentrationen von $c_{reactant}=2.2 \text{ mmol/L}$ an der Oberfläche und kein Reaktant oder Produkt innerhalb der Struktur festgelegt. Als Regime für den Stofftransport wurde Diffusion gewählt und für die enzymatische Reaktion eine Annäherung der Michaelis-Menten-Kinetik an die Kinetik erster Ordnung ($k=7,33 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). Das Netz der Geometrie bestand aus der automatischen Einstellung "fine mesh" (maximale Elementgröße von $2 \cdot 10^{-5}$, Elementwachstumsrate von 1,4, Krümmungsfaktor von 0,4, Skalierung 1 für alle Dimensionen) und 12 Oberflächenschichten (Dickenwert von $0,2 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ (Gerüste mit Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \text{ } \mu\text{m}^2$) und $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ m}$ (alle anderen)). Das Produktprofil wurde durch die Mitte des Knotens und durch die Mitte des Strangs bewertet.

Simulation von elektrischen Feldern

Für die Simulation der elektrischen Felder wurden in der Simulationssoftware COMSOL Multiphysics 5.4 die geometrischen Anordnungen des Versuchsaufbaus mit unterschiedlichen Erdungen erstellt. Folgender Parametersatz wurde verwendet: Der Abstand der Nadel zum Kollektor $d=2,6 \text{ mm}$, Abstand Erdung zum Kollektor $d=5 \text{ mm}$, der Abstand zwischen den Erdungen $d=2 \text{ mm}$ und die Länge der parallelen Erdungen $l=10 \text{ mm}$. Die Spannung wurde mit $U=6,7 \text{ V}$ angegeben. Die Simulation fand unter atmosphärischen Bedingungen mit einer Luftfeuchtigkeit von $H=45 \%$ unter Verwendung der Einstellung „Elektrostatik“ statt.

4.11 Zellkultivierung

Zellkultivierung mit Hepatocyten

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe 3D-Zellkultursysteme KIT wurden Zellversuche zur Kultivierung von Zelllinien in den Mikrokavitäten durchgeführt: Es wurden 6.000.000 Hepatocyten mit Cell Tracker Red und Hoechst 33342 gefärbt und anschließend für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 in einem Minimal Essential Medium mit den Zusätzen 10 % fötales Kalbsserum und je 1 % Penicillin/ Streptomycin, nicht essentiellen Aminosäuren und Glutamat kultiviert.

Zellkultivierung mit E.Coli

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Bioprozesstechnik und Biosysteme am KIT wurden Zellversuche mit E.coli durchgeführt. Für die Vorkultur wurden 20 ml LB-Medium bestehend aus 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Trypton, 10 g/L NaCL und 1 % Ampicillin mit 50 μL Glycerinkultur E.coli BW3110 pJOE 4056.2 angeimpft und über Nacht bei 37°C und 130 rpm inkubiert. Die Gerüststrukturen wurden nach dem Jet-Vorgang und dem Quervernetzen mit UV-Licht schnellstmöglich mittels LB-Medium vom Objektträger abgelöst und in

eine 6-Well Platte übertragen. Zur eGMP Bildung wurde eine 20 % (w/v)-ige Rhamnose-Monohydratlösung hinzugefügt.

Zellkultivierung mit Fibroblasten

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molekulare Aufarbeitung von Bioprodukten am KIT wurden Zellversuche mit Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurden Vorkulturen von L929 Zellen in Zellkulturflaschen mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit Glutamax, Penicillin, Streptomycin und FCS (fetal calf serum) kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und in neues Medium überführt mit einer Zellzahl von 4 Millionen Zellen pro mL und statt Wasser zur Hydrogel-Tinte hinzugefügt. Die Gerüststrukturen wurden nach dem Jet-Vorgang und dem Quervernetzen mit UV-Licht schnellstmöglich mittels oben beschriebenem Medium vom Objektträger abgelöst und in eine 6-Well Platte übertragen. Das zur Ablösung verwendete Medium war mit Calcein AM und Ethidium homodimer zur Lebend-tot-Färbung angereichert. Die Kultivierung in den 6-Well Platten fand ohne Farbstoffe statt. Die Proben wurden vor der Begutachtung unter dem Mikroskop erneut in farbstoffhaltiges Medium überführt.

5 Konzipierung von Smart-actuating-Polymerfasern und Scaffolds

Das Öffnen und Schließen eines Tannenzapfens zur Freigabe der Pflanzensamen ist abhängig von der Umgebungsluftfeuchtigkeit. Die Schuppen des Zapfens sind dabei aus zwei Schichten aufgebaut. Eine der beiden Schichten dient der Stabilisierung, die andere dehnt sich bei Anwesenheit von Feuchtigkeit aus. Durch den Verbund der beiden Schichten entsteht so eine feuchtigkeitsinduzierte Bewegung. Selbiges Prinzip wird in diesem Kapitel angewendet, um Fasern im Mikrometerbereich zu fertigen, welche sich bei Anwesenheit eines Stimulus selbstständig bewegen. Um dies technisch umzusetzen, wurde das Polymer PAA auf Grund seiner sehr guten Quelleigenschaften ausgewählt. Der Quellfaktor wird dabei über eine unterschiedliche Konzentration des beigemischten Vernetzers Ethylenglycol (EG) eingestellt. Je höher der Vernetzungsgrad der Polymerketten, desto geringer ist die intermolekulare Aufnahme von Flüssigkeit und desto geringer der Quellfaktor. Die Idee ist, eine Faser zu fertigen, welche aus zwei verbundenen Kompartimenten besteht, welche unterschiedliche Quellfaktoren aufweisen. Die Quellanisotropie führt dann zu einer Beugung der Faser und damit zu einer stimulusinduzierten Bewegung (Abbildung 17).

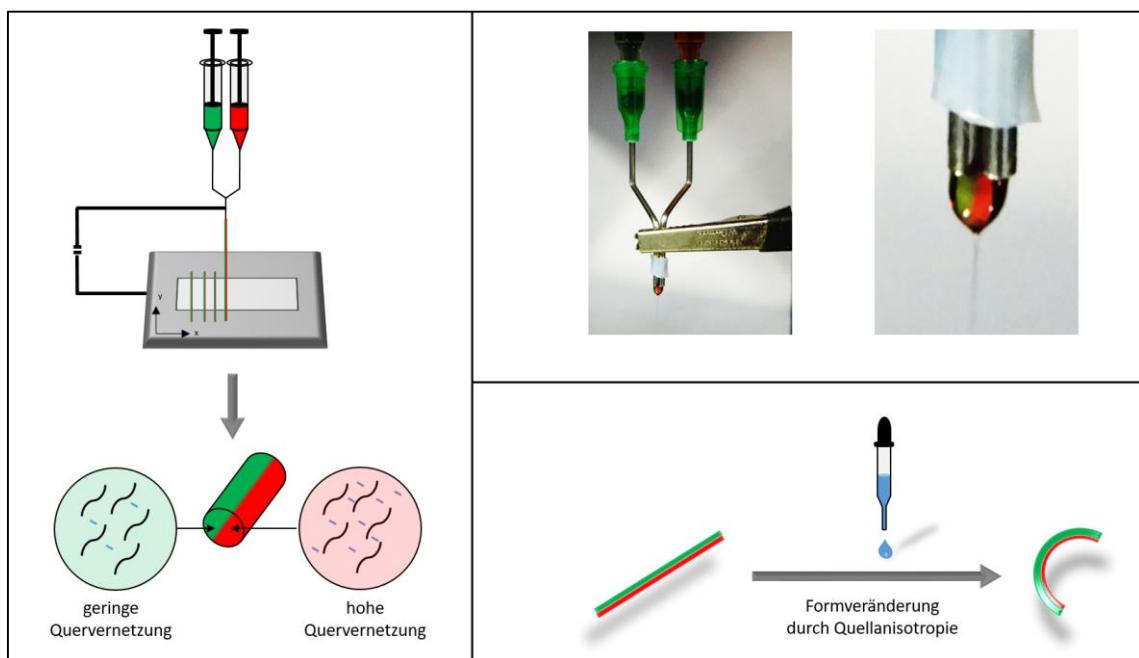


Abbildung 17 Schematischer Aufbau der 3D-Elektrojetting-Station mit computergesteuertem Kollektor. Durch hydrodynamisches Co-Jetting können bikompartimentale PAA Fasern mikrometrisch genau positioniert und strukturiert werden (links). Oben rechts: Photographische Aufnahme des Taylorkegels während des Jetvorgangs, welcher sich erkennbar aus beiden Jetlösungen zusammensetzt. Unten rechts: Schematische Darstellung der Grundidee. Durch ein unterschiedliches Quellverhalten der beiden Kompartimente wird, bei Anwesenheit von Puffer, Bewegung in die Faser gebracht.

5.1 Elektrojetting von bikompartimentellen PAA Fasern und 3D-Scaffolds

5.1.1 Die PAA Faser und ihre zwei Kompartimente

Zur Fertigung dieser PAA Fasern wurde eine 3D-Elektrojetting Station entwickelt. Diese besteht aus fixierten polymergefüllten Spritzen, an denen eine negative Ladung angelegt wird. Der geerdete Kollektor hingegen ist computergesteuert und damit beweglich konstruiert. Die entwickelte Polymerlösung besteht aus 15 % PAA in MilliQ Wasser und weist durch die hohe Polymerkonzentration eine hohe Viskosität auf, welche die Biege und Peitscheninstabilität während des Jets unterbindet. Durch die exakte Steuerung des Kollektors konnten so die Fasern mikrometergenau positioniert und strukturiert werden. Um eine Faser aus zwei verschiedenen Kompartimenten zu erzeugen, wurde das hydrodynamische Co-Jetting angewendet. Dabei wurden die Kanülenenden zweier Spritzen mit unterschiedlichem EG Gehalt gebündelt, um einen Taylorkegel zu erhalten. So entstanden PAA-Fasern mit glatter Oberfläche und gleichmäßigem Durchmesser entlang der Fasern. Der Durchmesser dieser Fasern lag zwischen 2 µm und 10 µm mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5,2 µm. Nach der Vernetzung bildeten die Fasern eine harte Struktur durch den Wasserentzug im Ofen und ließen sich nur schwer schneiden. Des Weiteren zeigten sie eine hohe Anhaftung am Glasobjektträger und auch nach mehrtägiger Lagerung war keine Form- oder Strukturveränderung erkennbar.

Die beiden Polymerlösungen mit unterschiedlichem EG Gehalt wurden mit grüner, bzw. roter Farbe versetzt. In Aufnahmen des Taylorkegels während des hydrodynamischen Co-Jettings sind beide Farben erkennbar und damit beide Lösungen vertreten (Abbildung 17). Auch zeigt sich eine klare Trennlinie zwischen den beiden Lösungen innerhalb des Kegels. Es kann davon ausgegangen werden, dass in den entstandenen Fasern beide Kompartimente ohne Durchmischung vertreten sind. Um dies zu verifizieren wurden fluorierende Farbstoffe in die beiden Ausgangslösungen gemischt und die hergestellten Fasern nach dem Vernetzen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Alle Aufnahmen verschiedener Fasern zeigen dabei sowohl den grünen als auch den roten Farbstoff (Abbildung 18). Die Fasern bestehen damit aus zwei verschiedenen nicht durchmischten Kompartimenten mit unterschiedlicher Quervernetzung. Je nach Laufrichtung des Kollektors orientieren sich die Kompartimente innerhalb der Faser unterschiedlich. Die Fasern 1, 3 und 5 mit derselben Laufrichtung zeigen dabei eine vergleichbare und damit reproduzierbare Anordnung der Kompartimente. Der grün gefärbte Faserteil mit einer niedrigen Vernetzungsrate wird dabei links und rechts von dem Kompartiment mit einem hohen Vernetzungsgrad in Rot begleitet.

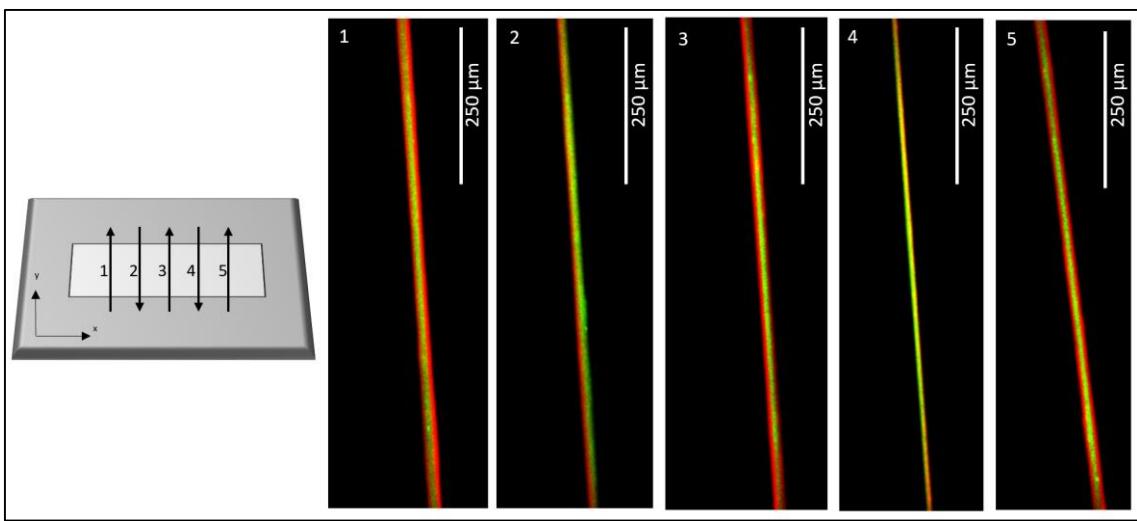


Abbildung 18 Floureszenzmikroskopische Aufnahmen der bikompartimentellen Fasern (rechts) und die schematische Darstellung der Laufrichtung einzelner Fasern auf dem Kollektor während des Jettvorgangs (links). Die Fasern bestehen aus zwei Polymerlösungen mit unterschiedlicher EG-Vernetzerkonzentration, der grün gefärbte Faser teil hat eine niedrige Vernetzungsrate, Kompartimente mit einem hohen Vernetzungsgrad sind rot gefärbt.

Die chemische Zusammensetzung der bikompartimentalen PAA-Fasern wurde mittels Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie untersucht. Die bikompartimentalen Fasern wurden zuvor vernetzt. In Abbildung 19 werden die Spektren des reinen PAA, des reinen EG, des vernetzten Kompartiments mit 0,5 % EG, des vernetzten Kompartiments mit 20 % EG und der bikompartimentalen Faser verglichen. Bei den höheren Frequenzen zeigt das FT-IR-Spektrum von Ethylenglykol zwei Banden von geringer Intensität bei 2940 cm^{-1} und 2875 cm^{-1} . Diese Banden sind auf die C-H-Streckung der aliphatischen Kohlenstoffverbindungen in EG zurückzuführen.^[140] Die Banden bei 1084 cm^{-1} und 1035 cm^{-1} in EG werden durch die CO-Streckung und die CC-Streckschwingung verursacht, während die Bande bei 883 cm^{-1} in EG durch CH_2 -Streckschwingungen verursacht wird.^[141] Polyacrylsäure zeigt eine Bande mit hoher Frequenz bei 2946 cm^{-1} , die durch die CH_2 oder CH-Streckschwingung zustande kommt.^[142] Die Bande mit der höchsten Intensität im PAA-Spektrum liegt bei 1711 cm^{-1} und wird durch die Streckschwingung der C=O-Doppelbindung verursacht.^[143] Die Banden bei 1450 cm^{-1} und 1413 cm^{-1} werden durch die CH_2 -Verformung und die C-O-Streckschwingung in Verbindung mit der O-H-Biegung in der Ebene verursacht.^[142] Die zweithöchste Intensität weisen die Banden bei 1240 cm^{-1} und 1168 cm^{-1} auf, wo Streckschwingungen in Verbindung mit O-H-Biegung in der Ebene auftreten.^[142] Bei der Bande mit geringer Intensität bei 1114 cm^{-1} sind $\text{C}-\text{CH}_3$ -Streckschwingungen erkennbar.^[142] Die Bande bei 798 cm^{-1} zeigt CH_2 -Verdrehungen und C-COOH-Streckungen.^[142] Das FT-IR-Spektrum der Polymerlösung mit 0,5 % EG sieht ähnlich aus wie das Spektrum von PAA. Das FT-IR-Spektrum der Polymerlösung mit 20 % EG weist zwar sehr viele Übereinstimmungen mit dem Spektrum von PAA auf, zeigt jedoch intensivere Banden bei 1064 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} und 883 cm^{-1} . Diese Banden sind auch im EG zu sehen und weisen auf die höhere EG Konzentration in dieser Polymerlösung hin. Das Spektrum der bikompartimentalen Faser ist dem Spektrum der Polymerlösung mit 0,5 % EG sehr ähnlich, mit Ausnahme der Bande bei 1540 cm^{-1} , die eine höhere Intensität aufweist. Die Bande bei 1540 cm^{-1} entsteht durch die Schwingungen der asymmetrischen und symmetrischen Carbonylbindungen im COO-.^[144] Das Vorhandensein einer Doppelbindung (C=C) verstärkt die Resonanz zwischen C=O- und C-O-Gruppen. Dadurch wird die asymmetrische Schwingung in COO- geschwächt und die symmetrische Schwingung in COO- verstärkt. Die

erhöhte Anzahl der COO-Gruppen erklärt sich durch das Anlegen einer negativen Spannung während des Elektrojettings.

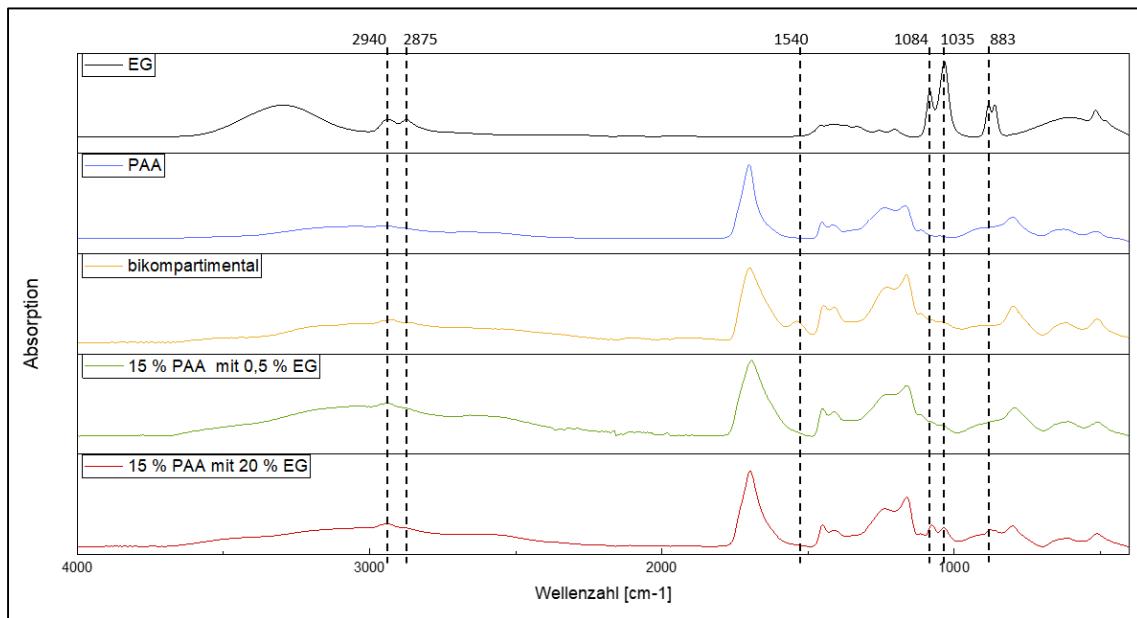


Abbildung 19 Fourier-Transformations-Infrarotspektrum von EG, PAA, 15 % PAA und 0,5 % EG in Wasser, 15 % PAA und 20 % EG in Wasser und vernetzten bikompartimentalen Fasern.

5.1.2 3D-Architekturen aus bikompartimentalen Polymerfasern

Die hohe Viskosität der Polymerlösungen unterband die Peitschen- und Biegeinstabilitäten während des Jetvorganges. Durch die exakte Ansteuerung des Kollektors konnten die Fasern wie oben beschrieben genau auf dem Kollektor positioniert werden. Dieser Vorteil wurde genutzt, um die Fasern dreidimensional anzurichten. Im ersten Schritt wurde eine Lage Fasern in Rechtecken angeordnet. Durch wiederholtes Abfahren desselben Kollektorweges, konnten die nächste Faser an exakt derselben Stelle auf der ersten Lage positioniert werden und bildete so eine weitere Lage. So konnten dreidimensionale Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Gittergrößen gejetzt werden. Abbildung 20 oben zeigt von links nach rechts 3 verschiedene Gittergrößen mit 1 mm, 750 µm und 500 µm großen Quadranten. Darunter ist die exakte Stapelung der einzelnen Fasern an Kreuzungspunkten mit unterschiedlicher Lagenanzahl dargestellt. Links sind es 15 Lagen, mittig 20 Lagen und rechts 50 Lagen. Mit 100 Lagen von Zweikomponentenfasern übereinander konnte eine maximale Höhe von 150 µm erreicht werden (Abbildung 20 unten). Die exakte Anordnung einer wasserbasierten Polymertinte durch Elektrojetting ohne Hitzeeinwirkung zu einer dreidimensionalen Struktur mit einer Wandstärke von um die 5 µm ist in der Literatur bisher nicht bekannt und bietet enormes Potential für biologische Anwendungen. Durch das Co-Jetting kann zusätzlich der Quervernetzungsgrad innerhalb jeder einzelnen Faser definiert werden und damit das Quellverhalten der gesamten Gerüststruktur.

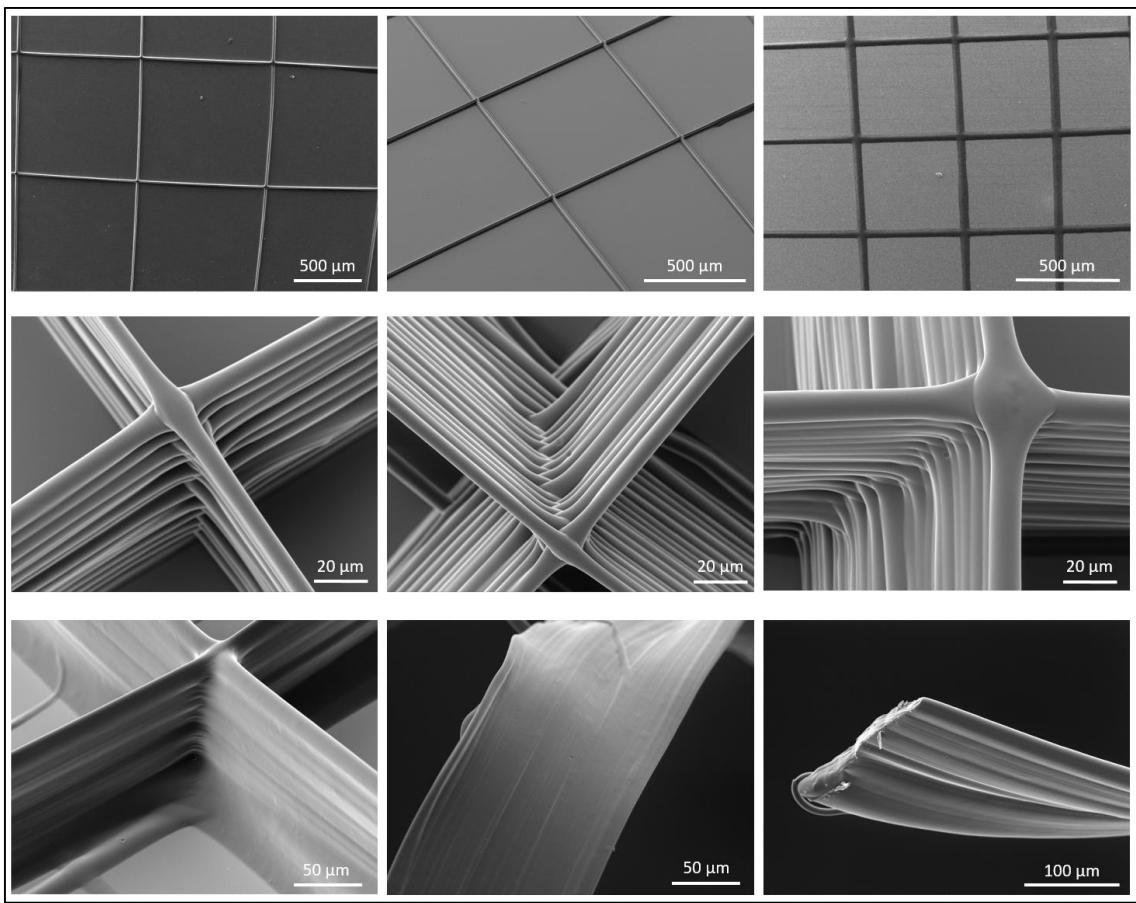


Abbildung 20 Elektrogejettete 3D-Architekturen aus PAA-Polymer-Fasern. Oben: rechteckige Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Gittergrößen mit einer Höhe von 15 Lagen. Mittig: Kreuzungspunkte mit unterschiedlicher Lagenhöhe zeigen die exakte Stapelung der einzelnen Fasern übereinander. Unten: Durch Stapeln der Fasern übereinander konnte eine maximale Höhe von 150 μm erreicht werden.

5.2 Vernetzungsgrad und Quellverhalten der Einzelkompartimente

Der Einfluss des pH-Wertes auf das Quellverhalten der Polymere in den Einzelkompartimenten wurde bei pH 3,0, 4,0, 5,0, 7,0, 7,1 und 9,0 getestet. Es wurden Puffer mit Zitronensäure, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat und Trizma®-Base als Puffersubstanzen verwendet. Alle Puffer hatten eine konstante Molarität von 0,1 M und eine konstante Ionenstärke von 0,265 M. Der Quellfaktor jedes Kompartiments ist in Abhängigkeit des pH-Wertes und der verwendeten Puffersubstanz in Abbildung 21 oben links dargestellt. Der Quellfaktor von 15 % PAA mit 0,5 % EG, beginnt bei pH 3 mit 2,8 und steigt mit zunehmendem pH-Wert linear auf 11,7 bei pH 7 in Kaliumdihydrogenphosphat an. Das Hydrogel mit 15 % PAA und 20 % EG beginnt mit einem Quellfaktor von 1,2 bei pH 3 und steigt mit zunehmendem pH auf 3,2 bei pH 9 an. Die Proben mit 0,5 % EG hatten einen höheren Quellfaktor als die Proben mit 20 % EG um den Faktor 2,4 bis 4,6.

Die Werte der drei Puffer mit einem pH-Wert um 7 sind als Diagramm in Abbildung 21 oben rechts detailliert dargestellt. Der Trizma®-Base Puffer mit pH 7,1 weist mit 2,8 für das Hydrogel mit 0,5 % EG und

1,3 für das Hydrogel mit 20 % EG einen weitaus geringeren Quellfaktor auf als die beiden anderen getesteten Puffer. Der Quellfaktor bei beiden anderen pH 7,0-Puffer liegt für das Hydrogel mit 0,5 % EG in Kaliumdihydrogenphosphatpuffer bei 11,7 und für Natriumdihydrogenphosphatpuffer bei 10,7 und zeigt damit keinen großen Unterschied. Dasselbe gilt für das Hydrogel mit 20 % EG, wobei der Quellfaktor hier bei 2,6 und 2,5 liegt.

Im Allgemeinen scheint der Quellfaktor mit steigendem pH-Wert bis pH 7 zuzunehmen, obwohl die verschiedenen Puffersubstanzen nicht miteinander vergleichbar sind. Auch das Verhältnis zwischen den beiden unterschiedlichen Polymerlösungen nimmt mit steigendem pH-Wert bei gleicher Puffersubstanz zu. Kaliumphosphatpuffer bei pH 7 zeigt den größten experimentell ermittelten Unterschied im Quellfaktor und wird im Folgenden verwendet, wenn nicht anders angegeben. Wie aus den Experimenten und der Literatur hervorgeht, ist das Quellverhalten von PAA-Hydrogelen stark vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig und nimmt mit steigendem pH-Wert zu.^{[145][146][147][148]} Dies lässt sich durch die Anwesenheit von Carbonsäuregruppen in PAA erklären. Die Carboxylgruppen sind leicht ionisierbar und verbinden sich stark mit Wassermolekülen. PAA als anionischer Polyelektrolyt wird bei hohem pH-Wert ionisiert.^[149] Der pKa-Wert von Polyacrylsäure, bei dem 50 % der Carboxylgruppen in ihrer ionisierten Form vorliegen, liegt bei 4,7.^[148] Die Ionisierung von Polyacrylsäure ist in Abbildung 21 unten links dargestellt. In ihrer ionisierten Form quellt sie stark im Vergleich zu ihrer deionisierten Form.^[146] Die Quellung von Polyelektrolyt-Hydrogelen erfolgt in der Polymerkette hauptsächlich aufgrund der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Ladungen.^[149] Es liegt nahe, dass der Quellfaktor der Polymerlösung mit 0,5 % EG höher ist als der der Polymerlösung mit 20 % EG, da das Polymer mit weniger Vernetzer wahrscheinlich weniger Vernetzungen und daher eine größere Maschenweite aufweist. In den größeren Zwischenräumen kann sich mehr Flüssigkeit ansammeln, was zu einer stärkeren Quellung führt.^[150] In den Experimenten und auch in der Literatur ist festgehalten, dass die Quellung des Hydrogels durch die Gegenionen beeinflusst wird.^[149] Die Quellkinetik ist in Gegenwart von schwachen Elektrolyten deutlich schneller als in Gegenwart von starken Elektrolyten.^[151]

Der Einfluss der Ionenstärke auf das Quellverhalten der Einzelkomponenten wurde mit 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat Puffer bei einem pH-Wert von 7,0 mit verschiedenen Ionenstärken getestet. Die Ionenstärke der Puffersubstanz ohne Salzzusatz betrug 0,224 M. Weitere Puffer mit 0,245 M, 0,285 M und 0,500 M wurden durch Zugabe von Natriumchloridzusatz hergestellt. Die Polymere beider Kompartimente wurden getestet und ihrer Quellfaktoren über die Ionenstärke des Quellpuffers aufgetragen (Abbildung 21 unten rechts). In der 15 %igen PAA Polymerlösung mit 0,5 % EG steigen die ersten drei Werte exponentiell von 6,1 bei 0,224 M auf 11,7 bei 0,265 M an, während die letzten beiden Werte auf 4,4 bei 0,285 M und 3,5 bei 0,500 M fallen. Bei der PAA-Tinte mit 20 % EG steigt der Quellfaktor von 1,6 bei 0,224 M auf 2,6 bei 0,265 M. Während er bei 0,285 M auf 1,8 abfällt, steigt er bei 0,500 M wieder auf 2,4 an. Die Werte der Quellfaktoren der Polymerlösung mit 0,5 % EG waren 1,5 bis 4,6-mal höher als die Werte der Polymerlösung mit 20 % EG. Beide Polymere haben ihren maximalen Quellfaktor bei einer Ionenstärke von 0,265 M. Bei dieser Ionenstärke ist der Unterschied zwischen den Kompartimenten am größten. Folglich liegen die optimalen Bedingungen für ein hohes Quellverhalten des PAA und ein hohes definiertes Rollverhalten bei einer Ionenstärke von 0,265 M.

Sowohl in den Experimenten als auch in der Literatur zeigt sich, dass das Quellverhalten von der Ionenstärke der umgebenden Lösung abhängig ist.^{[148][146]} Mit zunehmender Ionenstärke nimmt das Quellverhalten zu, da mehr Carboxylgruppen in ionisierter Form vorliegen und dies zu einer verstärkten Quellung führt. Es könnte sein, dass eine hohe Ionenstärke zu einer Ionenabschirmung führt.^[145] Da hier eine niedrige Ionenstärke untersucht wurde, liegt es auch nahe, dass die Ionen im Puffer durch die

ionisierten Carboxylgruppen im Hydrogel gebunden werden. In diesem Fall würde die ideale Ionenkonzentration vom Volumen des Hydrogels im Verhältnis zum Volumen des quellenden Puffers abhängen. Wie oben diskutiert ist es logisch, dass das Polymer mit weniger Vernetzerlösung eine größere Maschenweite hat, was zu einer stärkeren Quellung führt.^[150]

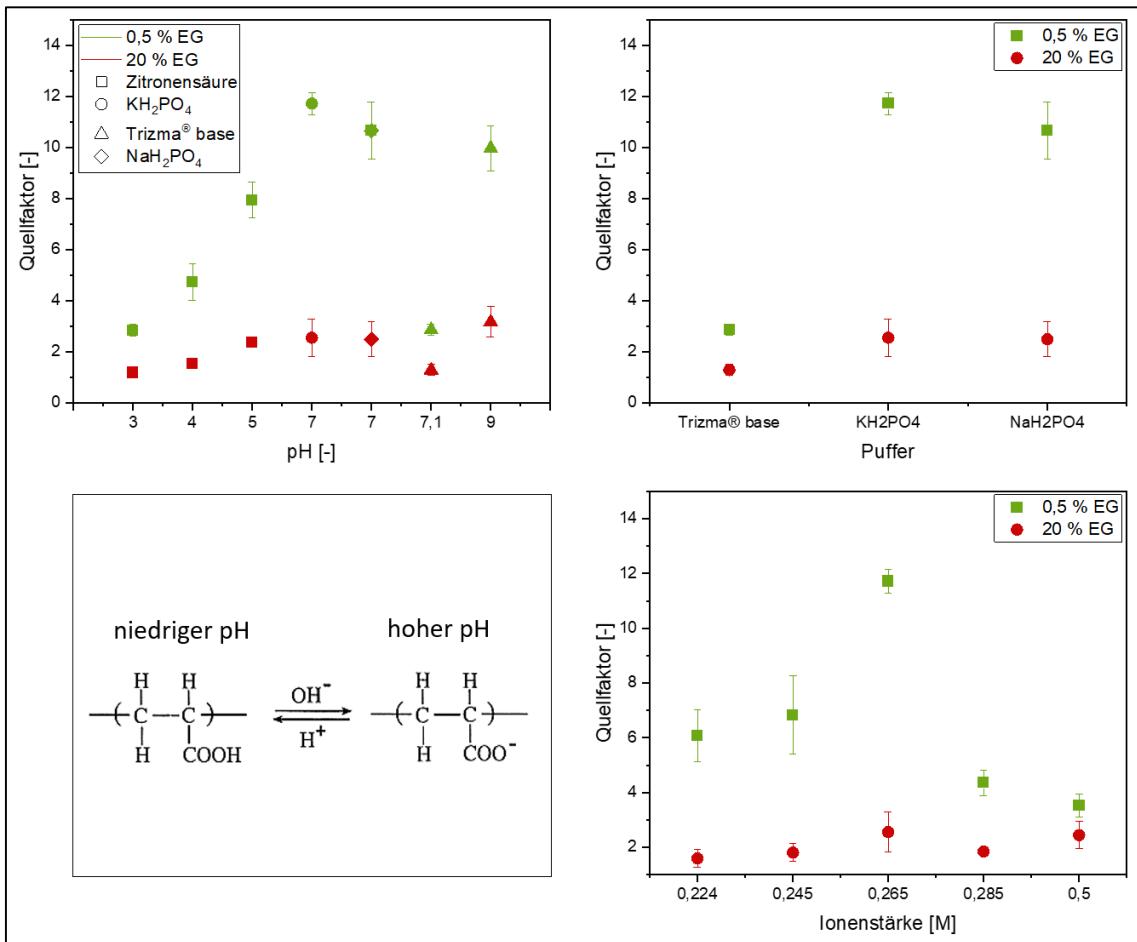


Abbildung 21 Quellverhalten der einzelnen PAA-Kompartimente in Abhängigkeit vom Puffer und des pH-Wertes. Oben links: Diagramm zeigt den Quellfaktor in Abhängigkeit vom pH-Wert der wässrigen Umgebung für beide Hydrogelle. Eine niedrige Konzentration des Vernetzers EG führt dabei zu einem hohen Quellfaktor. Zusätzlich ist der Quellfaktor abhängig von der verwendeten Puffersubstanz (oben rechts). Unten links ist die pH-abhängige Ionisierung von Polyacrylsäure schematisch dargestellt. Unten rechts: Diagramm des Quellfaktors in Abhängigkeit von der Ionenstärke der wässrigen Umgebung. Beste Ergebnisse wurden mit einem 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphat Puffer bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Ionenstärke von 0,265 M erzielt.

5.3 Shape-shifting-Fasern und der Einfluss des Stimulus

Mittels elektrohydrodynamischem Co-Jetting wurden bikompartimentale Fasern erzeugt. Dazu wurden die beiden Kompartimente mit demselben Polymer PAA, aber mit unterschiedlichen Konzentrationen von Vernetzer EG angereichert. Nach dem Jetting und der Vernetzung wurden die Fasern mit 0,1 M pH 7,0 Kaliumphosphatpuffer befeuchtet.

5.3.1 Spontanes Shape-Shifting von bikompartimentellen Fasern

Nach der Befeuchtung schwollen die Fasern an und begannen, sich von den Enden zur Mitte hin aufzurollen (Abbildung 22 oben). Der Rollvorgang dauerte zwischen 31 s und 217 s. Am Ende nahmen die Fasern mikrofeder-artige Formen an mit einem durchschnittlichen Rolldurchmesser von 284 μm . Im Folgenden wird die Faser in ihrer aufgerollten Struktur daher als Mikrofeder bezeichnet. Die Größe der Mikrofeder hängt von der Länge der ursprünglichen Fasern ab. Die in dieser Arbeit gezeigten Mikrofedern sind etwa 800 μm groß. Während der Formverschiebungsbewegung rollten sich die Fasern zunächst von einem oder beiden Enden her auf. Nach dem dargestellten Zeitraum von 800 ms waren 298 μm der Faser aufgerollt (Abbildung 22 unten). Die Bewegung selbst und die Bildung der definierten aufgerollten Struktur ist reproduzierbar. Um die Bewegung besser zu verstehen und um sicherzustellen, dass die Ursache die anisotrope bikompartimentale Faser ist, wurden Negativproben hergestellt, bei denen nur eine Polymerlösung verwendet wurde. Die Proben wurden mit Puffer befeuchtet und beobachtet. Beide Polymerlösungen produzierten Fasern, die sich kräuselten. Keine der Fasern rollte sich definiert auf und bildete eine Mikrofeder. Die formverändernde Bewegung ist also auf den Mechanismus der bikompartimentalen Fasern mit zwei Kompartimenten mit unterschiedlichem Quellverhalten zurückzuführen.

Zur Einordnung des Neuwertes wurde die Faser und ihre formverändernde Bewegung mit in der Literatur als Hydrogel-4D-Objekten beschriebenen Strukturen verglichen. Die stimuli-responsive Hydrogel-Mikrofedern von Yoshida et al.^[152] wurden aus Mikroröhren mit einem Innendurchmesser von entweder 200 μm oder 300 μm extrudiert, so dass der Faserdurchmesser selbst ebenfalls in diesem Größenbereich liegen muss. Die Schrumpfung der einlagigen Mikrofeder von Yoshida et al. dauerte in etwa 300 s.^[152] Die Hydrogelschicht in den nachempfundenen Gelenken von Raviv et al. hat im trocken Zustand eine Dicke von 800 μm und nass von 1900 μm .^[153] Je nach dem gewünschten Winkel des Gelenks dauert die formverändernde Bewegung 40 s bis 7 min. Gladman et al. verwenden für ihre anisotropen zellulosehaltigen Hydrogelstrukturen Filamente mit einem Durchmesser von etwa 200 μm .^[154] Die formverändernde Bewegung der gedruckten Blumen dauert je nach Druckwinkel entweder 5 oder 25 Minuten. Die hier gezeigten elektrogejetteten Fasern sind um den Faktor 40 bis 150 kleiner als die genannten 4D-Strukturen in der Literatur. Die Formveränderung der bikompartimentalen Fasern in dieser Arbeit war um den Faktor 1,4 bis 10 schneller. Die schnelle formverändernde Bewegung der elektrogejetteten Fasern in dieser Arbeit kommt zustande, das die Fasern einen deutlich geringeren Durchmesser haben und daher der Quellungsprozess aufgrund des hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses viel schneller verläuft als bei größeren Strukturen wie bisher in der Literatur beschrieben.

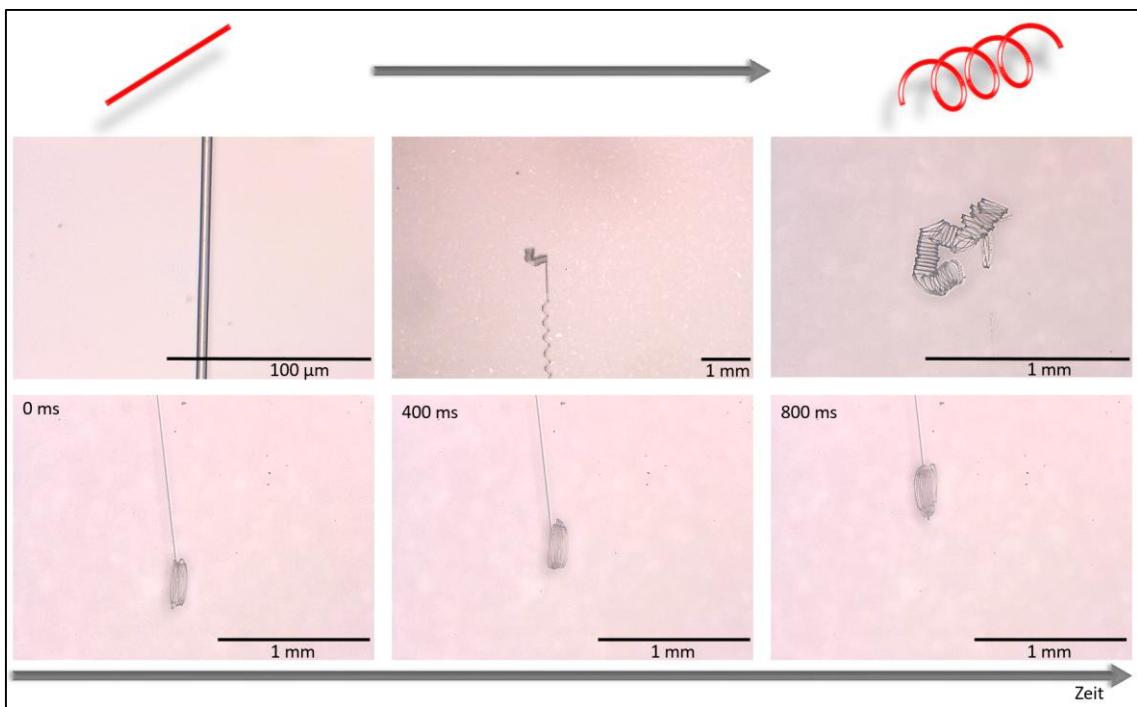


Abbildung 22 Formveränderung von Fasern zu Mikrofedern. Schematische Darstellung oben. Mittig: mikroskopische Aufnahme einer elektrogejetteten bikompartimentellen geraden Faser auf dem Glasobjektträger (links). Nach Zugabe von Puffer quillt die Faser auf, rollt sich auf (mittig) und bildet schlussendlich eine Mikrofeder (rechts). Unten: Die Aufrollbewegung der Fasern wurde alle 400 ms abgebildet. In der dargestellten Zeit von 800 ms wurden 298 µm der Faser aufgerollt.

Die aufgerollten Fasern blieben in der Form einer Mikrofeder, wenn sie in einer wässrigen Umgebung aufbewahrt wurden. Auch wenn sie aus dem Puffer in MilliQ-Wasser überführt wurden, veränderten sie ihre Form nicht und waren drei Monate lang stabil. Zudem konnte ein reversibles Verhalten gezeigt werden: Nach der Entnahme von Mikrofedern aus dem Puffer konnten die Fasern grade gezogen und zum Trocknen in gerader Form auf einen neuen Glasträger gelegt werden. Mit dieser geraden Faser war es möglich, die formverändernde Bewegung zu wiederholen, wenn sie erneut mit Puffer benetzt wurde. Die Faser nahm schnell die ursprüngliche Form einer zylindrischen Rolle mit einem ähnlichen Durchmesser an. Die formgebende Bewegung selbst ist also umkehrbar und kann wiederholt reproduziert werden.

5.3.2 Einflussfaktoren auf die formgebende Bewegung

Um zu evaluieren, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Faserdurchmesser und dem Aufrollverhalten sowie dem resultierenden Mikrofederdurchmesser gibt, wurde folgende Studie durchgeführt. Der Faserdurchmesser jeder Faser wurde nach der Vernetzung bestimmt. Nach dem Benetzen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,0 wurde außerdem der Rollendurchmesser der resultierenden zylindrischen Rolle gemessen. Zusätzlich wurde die Aufrollbewegung in die Kategorien "definiertes Aufrollen", "undefinierte Aufrollbewegung" und "keine Veränderung" eingeteilt. Von den 157 untersuchten Fasern fielen 22,3 % in die Kategorie "definiertes Aufrollen", 39,5 % in die Kategorie "undefinierte Aufrollbewegung" und 38,2 % in die Kategorie "keine Veränderung". Wenn sich die Fasern nicht vollständig vom Glasobjektträger lösten wurden diese in der Kategorie "undefinierte Aufrollbewegung" aufgeführt. In Abbildung 23 links ist der Federdurchmesser über dem

Faserdurchmesser dargestellt. Undefinierte Federn bilden sich aus Fasern mit einem Durchmesser zwischen 1,8 µm und 38,5 µm. Die Mikrofederdurchmesser dieser Kategorie lagen zwischen 95 µm und 1063 µm. Fasern, die eine definierte Aufrollbewegung und definierte Federn vorwiesen, hatten einen Durchmesser von 2,8 µm und 11,4 µm. Der resultierende Federdurchmesser mit 149 µm und 487 µm bildet damit ein funktionierendes Fenster. Es ist kein (linearer) Zusammenhang zwischen dem Faserdurchmesser und dem Mikrofederdurchmesser erkennbar. Es ist jedoch zu erkennen, dass Fasern mit einem Durchmesser von mehr als 11,4 µm undefiniert gerollte Fasern anstelle von definierten Rollen erzeugen. Es scheint also, dass der Bereich zwischen 2,8 µm und 11,4 µm geeignet ist, um definierte Rollen zu erzeugen. Entlang einer einzelnen Faser kann es natürlich Schwankungen im Durchmesser geben. Eine Varianz des Durchmessers außerhalb des funktionierenden Fensters führt demnach ebenfalls zu einer undefinierten Aufrollbewegung. Fasern mit einem gleichbleibenden Faserdurchmesser entlang der Faser könnten daher zu einem besseren Ergebnis führen.

Ein weiterer Effekt, der den Mikrofederdurchmesser beeinflussen könnte, ist das Quellverhalten. Durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Ionenstärke oder Puffersubstanz wird die Quellung des Hydrogels wie bereits gezeigt beeinflusst. Deshalb wurde das Aufrollverhalten in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht. Fasern im Zitronensäurepuffer mit pH 3,0 und pH 4,0 zeigten keine Veränderung ihrer Konfiguration und rollten sich nicht auf. Bei Verwendung des Zitronensäurepuffers mit einem pH-Wert von 5,0 zeigten 50 % der Fasern ein undefiniertes Aufrollverhalten, während der Rest der Fasern keine Veränderung der Konfiguration aufwies. Im Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer mit pH 7,0 formten sich 22,3 % der Fasern zu definierten Rollen, während 39,5 % immer noch ein undefiniertes Aufrollen zeigten. Im Trizma®-Base-Puffer mit einem pH-Wert von 7,1 zeigten nur 28,6 % der Fasern ein undefiniertes Rollverhalten, während der Rest der Fasern keine Veränderung der Konfiguration zeigte. Im Trizma®-Base-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 bildeten immerhin 21,4 % der Fasern definierte Rollen und 42,9 % undefinierte Federn. Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer mit pH 7,0 und Trizma®-Base-Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 scheinen daher am geeignetsten für die Bildung der definierten Mikrofedern. Generell ist die Tendenz erkennbar, dass Fasern mit erhöhtem pH-Wert auch ein definierteres Rollverhalten zeigen. Die einzelnen Kompartimente der Faser zeigten bei hohen pH-Werten ebenfalls eine deutliche Unterscheidung im Quellverhalten wie in Kapitelxx beschrieben. Je höher die Differenz des Quellfaktors der unterschiedlichen Kompartimente bei gleichem pH, desto gleichmäßiger die Aufrollbewegung und desto definierter die entstandene Mikrofeder.

Es wurde ebenfalls das Aufrollverhalten in Abhängigkeit der Ionenstärke mit 0,1 M Kaliumphosphat bei pH 7,0 untersucht (Abbildung 23 rechts). Mit zunehmender Ionenstärke steigt der Anteil der definierten Aufrollbewegung von 22,2 % im 0,224 M-Puffer auf 58,8 % im 0,285 M-Puffer. Das sind im Vergleich 36,6 % mehr definiert gerollte Fasern. Wenn die Ionenstärke jedoch auf 0,500 M ansteigt, werden weniger definierte Rollen produziert (43,7 %). Das optimale Aufrollverhalten liegt folglich bei 0,285 M, wo zudem alle getesteten Fasern eine Aufrollbewegung zeigen. Aus den Quellstudien der Einzelkompartimente wurde auf Grund der hohen Differenz des Quellfaktors das beste Aufrollverhalten bei 0,224 M und 0,245 M Ionenstärke erwartet.

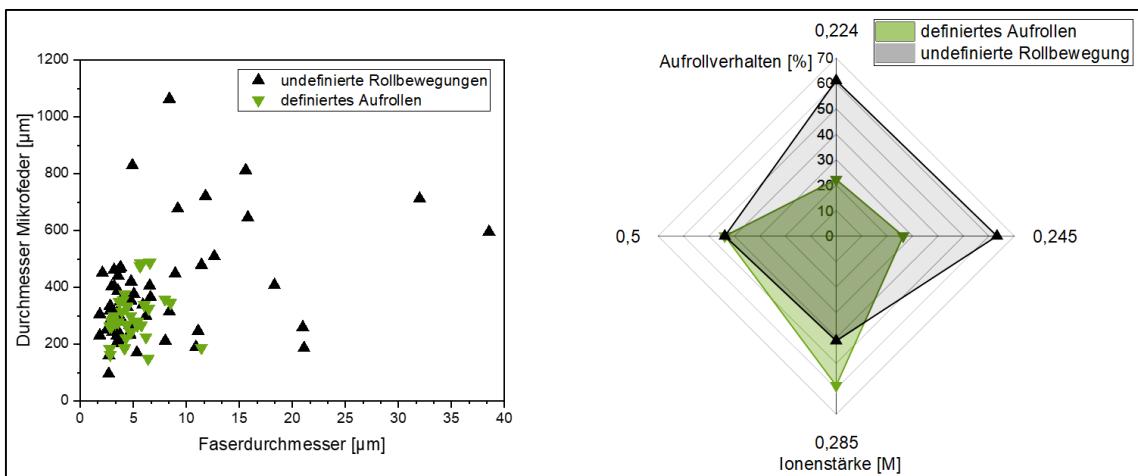


Abbildung 23 Aufrollverhalten der Polymerfasern. Wenn der Faserdurchmesser der trockenen bikompartimentalen Faser zwischen $2,8 \mu\text{m}$ und $11,4 \mu\text{m}$ lag, bildeten sich definierte Mikrofedern mit einem Durchmesser von unter $487 \mu\text{m}$ (links). Das Aufrollverhalten ist stark abhängig von der Puffersubstanz und dessen pH-Wert. Das experimentell beste Ergebnis wurde dabei in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphat bei pH 7,0 und einer Ionenstärke von $0,285 \text{ M}$ erzielt (rechts).

5.3.3 Charakterisierung der Mikrofeder

Die beiden Jet-Tinten wurden vor dem Elektrojetten mit fluoreszierendem Farbstoff versetzt. Die Polymerlösung mit niedriger EG Konzentration erhielt einen grün fluoreszierenden Farbstoff, die andere einen roten Farbstoff. Abbildung 24 zeigt Aufnahmen einer geformten bikompartimentellen Feder in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer. Links ist dabei nur grüne Fluoreszenz, mittig die rote und rechts die Überlagerung beider Farben gezeigt. Im Vergleich zu Abbildung 18 ist keine Unterscheidung der beiden Kompartimente im Puffer-Milieu mehr möglich. Beide Farben überlagern sich über die komplette Mikrofeder hinweg. Der Federausschnitt zeigt einen runden Querschnitt der Faser mit leichter Varianz im Durchmesser. Zur bildgebenden Untersuchung im REM unter Vakuum mussten die Mikrofedern getrocknet und beschichtet werden. Die Faser zeigt dann einen konkav-konvexen Querschnitt und eine glatte Oberfläche (Abbildung 24 unten). Die Querschnittsform der Faser wird neben dem umgebenden Milieu auch vom Jet-Vorgang selber bestimmt. Wasser ist ein Lösungsmittel, das beim Elektrojetten vergleichsweise lange braucht, um zu verdampfen. Wahrscheinlich sind die Fasern noch nicht vollständig getrocknet, wenn sie den Glasobjektträger als Kollektorplatte erreichen. Der Benetzungswinkel zwischen dem PAA und dem Oberflächenmaterial hat dann einen großen Einfluss auf die Form des Faserquerschnittsprofils der Faser. Im Umkehrschluss kann daher das Material und dessen Hydrophobilität vom Kollektor das Querschnittsprofil der Faser maßgeblich prägen. In experimentellen Untersuchungen zeigte sich allerdings Gold, Edelstahl, Kupfer und PE als Kollektormaterial weniger geeignet als Glas. Auch freihängende Fasern, welche auf einem Rahmen gesammelt wurden, zeigten zwar Aufrollbewegungen, bildeten aber keine definierten Federn.

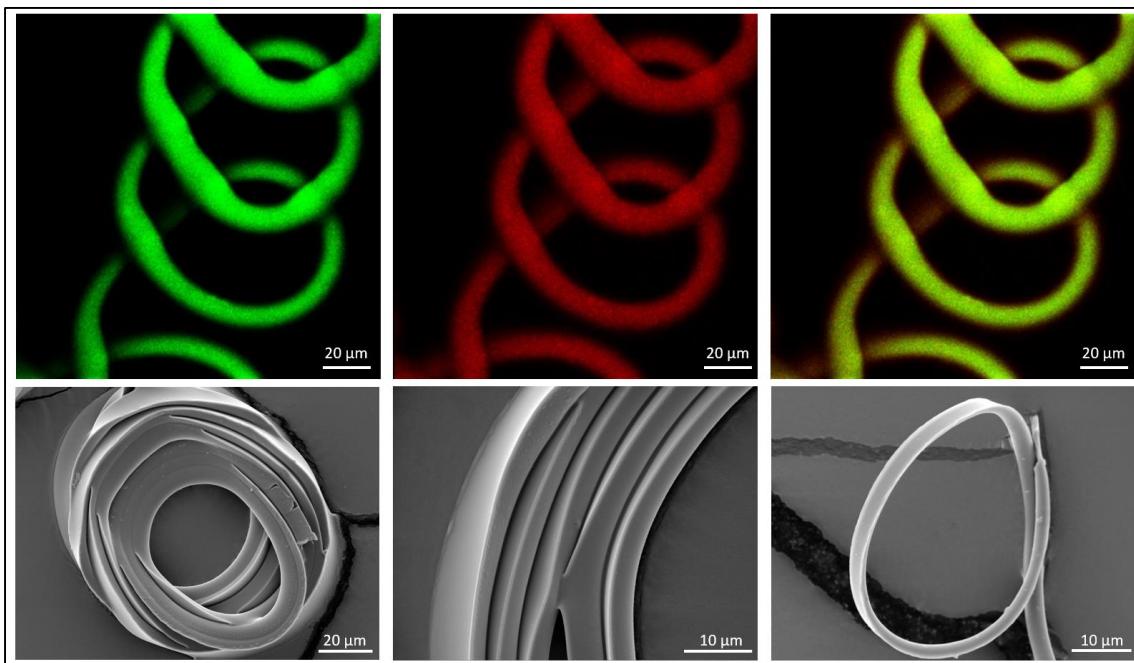


Abbildung 24 Mikroskopische Aufnahme einer bicompartimentellen Feder. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (oben): Der geringer vernetzte Polymeranteil wurde grün (oben links), der andere rot (oben mitte) eingefärbt. Die Faser zeigt im Puffer einen runden Querschnitt. Unten: REM-Aufnahmen von gerollten Mikrofasern nach dem Trocknen. Die Fasern zeigen einen konkav-konvexen Querschnitt.

Um das Federverhalten zu eruieren, wurde die Mikrofeder mit einer Seite am Objektträger fixiert und die andere Seite im Puffer mit Hilfe einer Pinzette gespannt. Nach dem Loslassen des freien Endes sprang die Feder innerhalb von 800 ms in ihre ursprüngliche Form zurück. Mikroskopische Aufnahmen des Zurückspringens sind in chronologischer Reihenfolge in Abbildung 25 dargestellt. Die Mikrofeder konnte mehrfach gespannt und losgelassen werden. Das Rückstellverhalten der Mikrofeder war reproduzierbar.

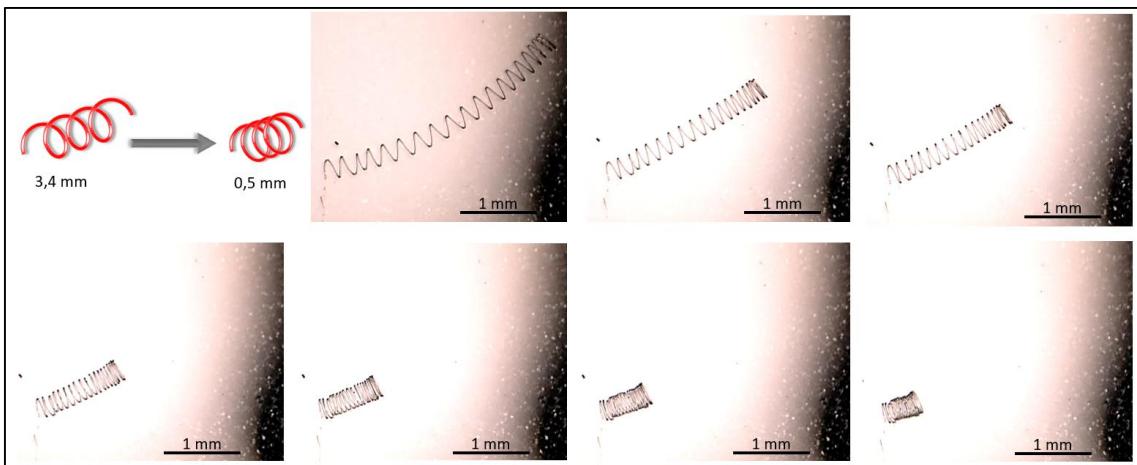


Abbildung 25 Schematische Darstellung und mikroskopische Aufnahmen vom Rückstellverhalten einer auf einer Seite befestigten Mikrofeder. Das freie Ende der Mikrofeder wurde mit einer Pinzette gezogen. Wenn die Mikrofeder losgelassen wurde, sprang sie innerhalb von Millisekunden wieder auf ihre ursprüngliche Größe zurück.

Im Folgenden soll die Fragestellung untersucht werden, ob es möglich ist, das Federverhalten nach abgeschlossener Bildung der Mikrofeder zu beeinflussen. Konkret, ob durch einen zweiten Stimulus, wie beispielsweise der Temperatur, der Durchmesser der Feder nachträglich verändert werden kann. Dazu wurde beim Elektrojetten die Polymerlösung mit 15 % PAA und 0,5 % EG durch Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAAm) ersetzt. Die höhere Viskosität der PNIPAAm-Lösung führte zu etwas dickeren bikompartimentellen Fasern. Der durchschnittliche Faserdurchmesser lag bei 14,8 μ m. Die Fasern wurden mittels Hitze auf molekularer Ebene quervernetzt und anschließend mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit pH 7,0 und einer Temperatur von 23 °C befeuchtet. Die Fasern rollten sich auf (Abbildung 26 mittig). Anschließend wurde die aufgerollte Faser in 48 °C warmes Wasser überführt. Die aufgerollte Struktur zog sich dadurch weiter zusammen und bildete einen Knäuel mit deutlich geringerem Durchmesser als er bei niedriger Temperatur besaß (Abbildung 26 rechts).

PNIPAAm ist ein negativ wärmeempfindliches Hydrogel und kollabiert, wenn die Temperatur über seine charakteristische untere kritische Lösungstemperatur steigt. Dies geschieht, wenn die Faser in das warme Wasser überführt wird. Dadurch ist es möglich eine axiale Kompression oder Expansion der Mikrofedern in Abhängigkeit von der äußeren Reizwärme zu induzieren. Dieser Effekt wird bereits von Yoshida et al. in stimuli-responsiven Hydrogel-Mikrofedern genutzt.^[152] Der Vorteil der elektrogejetteten Fasern ist, dass sie eine andere initiale Formveränderungsbewegung bei der Bildung der Mikrofeder haben und zudem viel kleiner sind. Die Mikrofedern von Yoshida et al. haben einen Faserdurchmesser von 200 μ m bzw. 300 μ m und sind damit 13 bis 20 mal größer als die in dieser Arbeit hergestellten Mikrofedern.^[152] Die Verwendung kleinerer Mikrofedern ist im Falle der negativ thermosensitiven Mikrofedern von Vorteil, da das Innere der kleinen Fasern theoretisch früher die hohe Soll-Temperatur erreicht und daher die zweite formändernde Bewegung durch das PNIPAAm schneller erfolgt.

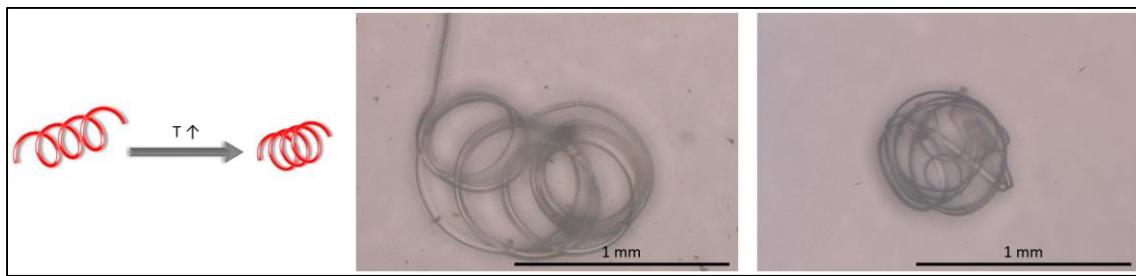


Abbildung 26 Eine temperaturabhängige Mikrofeder. Schematische Darstellung links; Die mittels elektrohydrodynamisches Co-Jetting hergestellte Faser aus PAA und PNIPAAm rollte sich in 23 °C warmen Puffer auf (mittig). Durch eine Überführung in 48 °C heißes Wasser zog sich die Struktur weiter zusammen (rechts). Der Durchmesser der Mikrofeder kann also nachträglich temperaturabhängig eingestellt werden.

5.4 Anwendung der Mikrofedern in Sensoren und deren Potenzial in der Soft-Robotik

Es ist demnach gelungen, mittels elektrohydrodynamisches Co-Jetting und wasserbasierten Jet-Tinten bikompartimentelle Fasern und Scaffolds mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5,2 μm zu produzieren. Die Fasern rollten sich bei Kontakt mit Puffer spontan auf und bildeten stabile Mikrofedern mit Durchmessern von unter 500 μm . Die gezeigte formgebende Bewegung ist im Vergleich zur Literatur sehr viel schneller.^{[153][154]} Das Konzept aus der Natur, durch einen externen Stimulus die Form und Struktur zu ändern, hat großes Interesse in der technischen Anwendung gefunden. Das Potenzial Einzelteile autonom in bestimmten Mustern und Formen anzugeordnen kann den Bereich der Fertigung und Konstruktion revolutionieren.^[76] Darüber hinaus bietet es die Möglichkeit Strukturen mit größerer Komplexität und Informationsgehalt aufzubauen als es momentan mit aktuellen Technologien möglich ist.^[155]

So wurde die formgebende Bewegung der gezeigten Fasern beispielsweise zur Überwindung der Beschränkung des Massentransports in mikroanalytischen Systemen genutzt. Dazu konnten verstreute Analyten durch sternförmig angeordnete Fasern aktiv zum Zentrum hin konzentriert werden. Die punktuell erhöhte Konzentration der Analyten im Sensor- oder Detektorbereich erhöht die Nachweisbarkeit und Empfindlichkeit der Analytiktests. Im Vergleich zu freien Partikeln zeigen die rekonfigurierbaren Fasernetzwerke eine 57-fache Steigerung der Nachweisbarkeit von Analyten, eine durchschnittliche Transporteffizienz von $91,9 \pm 2,4\%$ und eine Trennselektivität zwischen verschiedenen Oberflächeneigenschaften von $95 \pm 3\%$. Dies stellt einen extremen technologischen Fortschritt gegenüber konventionellen Analysemethoden in Bezug auf Flexibilität und Spezifität dar. Aufgrund der Fähigkeit des gerichteten Transports unter Verwendung von kostengünstigen Materialien und Herstellmethoden ist das Potenzial gegeben, diese Biosensoren an die Spitze der mikroanalytischen Methoden zu bringen.^[156]

Die Mikrofedern zeigten nach externer Krafteinwirkung sehr gutes Rückstellverhalten. Außerdem konnte durch Beimischung des wärmeempfindlichen Polymers PNIPAAm der Durchmesser der Feder nachträglich temperaturabhängig reduziert werden. Die geringe Größe der Federn machen sie sehr interessant für den Bereich der künstlichen Muskeln und der Soft-Robotik. Das verwendete Material PAA ist ein Polymer, das durch verschiedene Auslöser stimuliert werden kann.^[150] Das Anlegen eines elektrischen Feldes führt beispielsweise zu einer schnellen Volumenverringerung des Polymers.^[149] Die pH abhängigen

Quelleigenschaften konnten in dieser Arbeit bereits gezeigt werden.^[146] Werden verschiedene Stimuli kombiniert, kann die Mikrofeder als 3D-Objekt gezielt über äußere Einflüsse beliebig in Form, Gösse und kinetischen Eigenschaften manipuliert und gesteuert werden.

6 Konzipierung von 3D Proteinstrukturen zur Nachbildung der ECM

Kollagene sind der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Bindegeweben wie Haut, Knochen, Knorpel und Sehnen, deren Aufgabe es ist, die strukturelle Integrität der ECM zu gewährleisten. Die Kollagenfasern verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit und spielen damit eine Schlüsselrolle in der Zellbiologie und bei biomedizinischen Anwendungen. Kollagen erleichtert die Anheftung, Differenzierung, Migration und das Wachstum von Zellen und ist dadurch das am häufigsten verwendete Protein für die ECM in der zwei- und dreidimensionalen Zellkultur. Eine unzureichende oder andersartige Kollagenproduktion führt zu erheblichen Krankheitsbildern wie beispielsweise der Glasknochenkrankheit (Osteogenesis imperfecta) oder hat Auswirkungen auf die Anheftung und Proliferation von Brustkrebszellen.^{[157][158]}

6.1 Der Einfluss der Jett- und Lösungsparameter auf die Morphologie und Stabilität von Kollagen-Membranen

6.1.1 Entwicklung eines PLGA-Stützgitters als Membranunterkonstruktion

Zur besseren Handhabung der Membran und zur Stabilisierung der dünnen Kollagenfasern wurde ein Stützgitter aus PLGA entwickelt. Hierbei wurden Drucke bei unterschiedlichen Flussraten und Druckgeschwindigkeiten durchgeführt und der resultierende Faserdurchmesser ermittelt (Abbildung 27 links). Um durchgängige Fasern zu erhalten war eine Mindestdruckgeschwindigkeit von 100 µL/h notwendig. Durchgängige Fasern resultierten in Stützgittern mit gleichmäßigen Faserdicken, erkennbar an den geringen Standardabweichungen. Eine steigende Flussrate von 150 µL/h auf 300 µL/h bei konstanter Druckgeschwindigkeit von 5 mm/s zeigte steigende Faserdurchmesser von $181,8 \pm 9,6$ µm auf $355,9 \pm 10,6$ µm. Eine Erhöhung der Druckgeschwindigkeit bei konstanter Flussrate resultierte wiederum in dünneren Fasern. Für eine Flussrate von 250 µL/h sinkt der Faserdurchmesser von $402,9 \pm 12,5$ µm auf $224,3 \pm 9,6$ µm, wenn die Druckgeschwindigkeit erhöht wird. Dementsprechend finden sich die dünnsten Fasern mit einem Durchmesser von $157,0 \pm 10,9$ µm bei einer Flussrate von 150 µL/h und einer Druckgeschwindigkeit von 7 mm/s. Der größte Faserdurchmesser von $412,3 \pm 12,3$ µm findet sich bei 300 µL/h und 3 mm/s.

Durch eine höhere Flussrate wird in gleicher Zeit mehr PLGA zur Verfügung gestellt wodurch die Fasern dicker werden. Wenn die Druckgeschwindigkeit erhöht wird, bewegt sich das Positionierungssystem schneller, sodass dünnerne Fasern entstehen, da die Materialabscheidung abnimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten PLGA-Gitter wurden mit einer Flussrate von 250 µL/h und einer Druckgeschwindigkeit von 3 mm/s hergestellt, wodurch ein Faserdurchmesser von $402,9 \pm 12,5$ µm erreicht wurde (Abbildung 27 mittig und rechts). Grund war die Stabilität des abgelösten PGLA-Stützgitters von dem Kollektor und ein damit einhergehendes robusteres Arbeiten im Labor sowie einer möglichst großen Auflagefläche für das Kollagennetz. Dadurch war der verlustfreie Transport der Kollagenfasern gesichert.

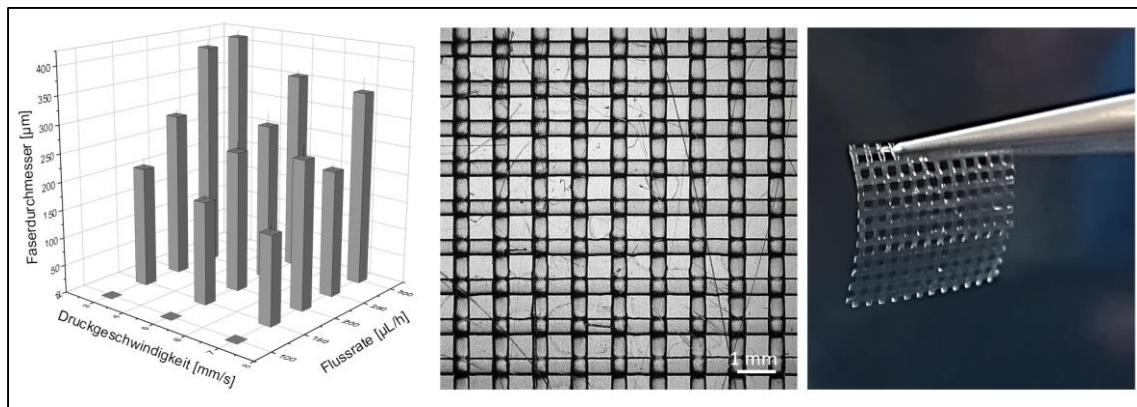


Abbildung 27 Faserdurchmesser des PLGA Stützgitters in Abhängigkeit von der Druckgeschwindigkeit und der Flussrate der Polymerlösung (links). Lichtmikroskopische Aufnahme des PLGA-Stützgerüst bei 250 µL/h Flussrate und 3 mm/s Druckgeschwindigkeit (mittig). Diese Parameter führten zu einer robusten Unterkonstruktion für Herstellung und Charakterisierung der Kollegenmembran (rechts).

6.1.2 Die Kollagenfaser in Abhängigkeit der Polymerkonzentration

Ein ausschlaggebender Parameter für die Morphologie der Fasern beim Elektrojetting ist die Konzentration des Polymeren in der Jett-Lösung. Um den Einfluss genauer zu untersuchen und zu optimieren wurden Polymerlösungen mit Kollagenkonzentrationen von 0,5 % (w/v) bis 10 % (w/v) in HFP gejettet und die resultierenden Ergebnisse mittels REM-Bildern dargestellt (Abbildung 28).

Erkennbar ist, dass es bei einer niedrigen Konzentration von 0,5 % (w/v) zu einer Bildung von Partikeln kommt. Wenn die Konzentration auf 1 % (w/v) erhöht wird, sind ebenfalls Partikel vorhanden, die jedoch bereits einen faserähnlichen Fortsatz besitzen. Bei einer Konzentration von 2 % (w/v) sind Perlenschnüre zu erkennen. Ab 3,5 % (w/v) kommt es zu einer gleichmäßigen Faserbildung ohne Perlenschnüren bzw. Partikeln. Je höher die Konzentration wird, desto größer wird der Faserdurchmesser und ab einer Konzentration von 7,5 % (w/v) bilden sich flache Bänder aus. Ab dieser Konzentration variiert die Dicke der Fasern bzw. Bänder stark und es sind vermehrt Nanonetze erkennbar.

Dieses Verhalten kann durch das sogenannte *chain entanglement* (deutsch: Kettenverschränkung) erklärt werden. Dieser Effekt bezeichnet die physische Verschränkung von Polymerketten in Lösung und tritt auf, wenn sich die molekularen Ketten überlappen. Das *chain entanglement* ist sowohl von der Konzentration als auch dem Molekulargewicht in einer Polymerlösung abhängig. Im Elektrojetting wird dieser Effekt durch die Morphologieänderungen deutlich. Bei einer sehr niedrigen Konzentration kommt es zu keiner Verschränkung der Ketten. Dies wird durch die Bildung von Partikeln sichtbar. Erhöht man nun die Konzentration, führt das zunächst zur Entstehung von Perlenschnüren. In diesem Zustand ist das *chain entanglement* nicht ausreichend, um Fasern während des Elektrojettings vollständig zu stabilisieren. Dies wird erst durch eine weitere Erhöhung der Konzentration erreicht und führt zur Bildung von durchgängigen Fasern. ^[159] Durch die REM Bilder in Abbildung 28 wird ersichtlich, dass ab einer Kollagenkonzentration von 3,5 % in der Jetlösung ausreichend *chain entanglement* vorhanden ist, um einen stabilen Jet und gleichmäßige Fasern zu ermöglichen. Für die Bildung von Netzen ist ein zeitweise instabiler Taylor Kegel verantwortlich. Wenn sich lösende Tropfen in Richtung Kollektor bewegen, werden sie durch die angreifenden Kräfte im elektrischen Feld zu einem dünnen Film auseinandergezogen, der Risse bildet und die Form eines Netzes annimmt. ^[160] Eine dezellularisierte natürliche ECM besitzt eine eindeutige gleichmäßige Faserstruktur. Um diese zu imitieren sind durchgängige Fasern ohne

Unterbrechung durch Partikel oder Perlenschnüre zu bevorzugen. Demnach ist eine Konzentration zwischen 3,5 % (w/v) und 6,5 % (w/v) geeignet.

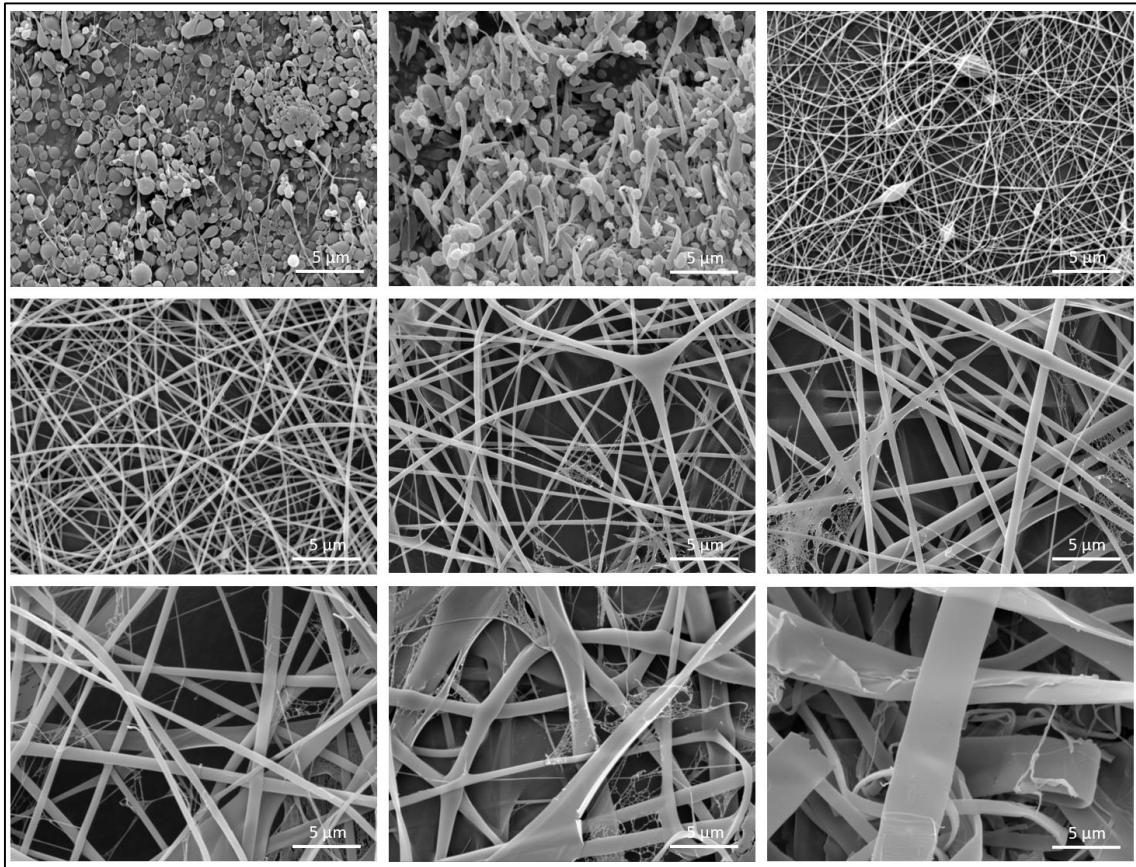


Abbildung 28 REM-Bilder von Kollagenfasern bei verschiedenen Polymerkonzentrationen der Jetlösung. Eine Erhöhung der Kollagenkonzentration führt zur Bildung von Partikeln über Tropfen zu durchgängigen Fasern und Bändern; von links nach rechts: 0,5 % (w/v), 1 % (w/v) und 2 % (w/v) oben; 3,5 % (w/v), 5 % (w/v) und 6,5 % (w/v) mittig und 7,5 % (w/v), 8,5 % (w/v) und 10 % (w/v) unten

Um die Änderung des Faserdurchmessers auf Datenbasis zu beurteilen, wurden die REM-Bilder mittels ImageJ ausgewertet und der prozentuale Anteil der Häufigkeit des Durchmessers wurde gegen den Faserdurchmesser aufgetragen (Abbildung 29 links). Hierbei wurden Auswertungen ab einer Konzentration von 2 % (w/v) und damit verbundenen durchgängigen Fasern berücksichtigt. Aus Abbildung 29 rechts lässt sich für jede Konzentration der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung entnehmen. Alle Faserdurchmesser bewegen sich in einem Bereich von 0,01 μm bis 3,5 μm. Auffällig ist, dass mit steigender Konzentration sowohl der mittlere Faserdurchmesser als auch die Standardabweichung annähernd exponentiell zunehmen. Bei einer Konzentration von 2 % (w/v) beträgt der mittlere Durchmesser 0,17 μm mit einer Standardabweichung von 0,07 μm. Auch bei 3,5 % (w/v) ist die Standardabweichung mit 0,12 μm verhältnismäßig klein und der mittlere Faserdurchmesser liegt bei 0,26 μm. Mit weiter ansteigender Konzentration werden die Graphen immer flacher und breiter, was sich auch in den arithmetischen Mittelwerten und Standardabweichungen spiegelt. Der mittlere Durchmesser erhöht sich bei 6,5 % (w/v) bereits auf 0,44 μm und die Standardabweichung von 0,27 μm hat sich im Vergleich zu 3,5 % (w/v) mehr als verdoppelt. Ab einer Konzentration von 7,5 % (w/v) ist die Streuung der ermittelten Durchmesser erheblich und steigert sich mit zunehmender Konzentration.

Bei der Analyse der Graphen wird erkennbar, dass die Konzentrationen von 2 – 5 % (w/v) eine geringe Standardabweichung aufweisen. Dies deutet auf durchgängige, gleichmäßige Fasern hin. Betrachtet man zum Vergleich die REM Bilder aus Abbildung 28 wird jedoch ersichtlich, dass bei einer Konzentration von 2 % (w/v) die Perlenschnurbildung bei der Ermittlung der Faserdurchmesserverteilung durch den Algorithmus von ImageJ nicht berücksichtigt wurden. Deshalb ist diese Konzentration für die Herstellung von gleichmäßigen Fasern nicht geeignet. Die homogenste Morphologie wird bei einer Konzentration von 3,5 % (w/v) erreicht. Daher werden die folgenden Versuche mit dieser Konzentration durchgeführt.

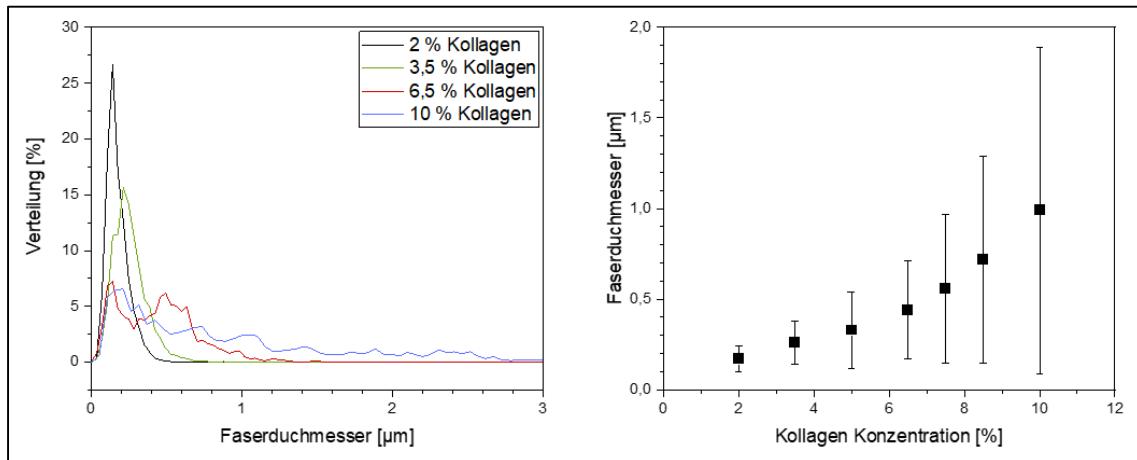


Abbildung 29 Einfluss der Polymerkonzentration auf die Faserdurchmesser von elektrogejetteten Kollagenfasern. Links: Prozentuale Faserdurchmesserverteilung bei verschiedenen Konzentrationen von Kollagen in HFP; rechts: mittlerer Faserdurchmesser steigt mit Zunahme der Polymerkonzentration.

6.1.3 Die Morphologie der Kollagenmembran in Abhängigkeit der zeitlichen Jet- und Vernetzungparameter

Um die Verteilung der Kollagenabscheidung auf der PLGA-Unterkonstruktion zu verifizieren, wurden unterschiedliche Jettingdauern evaluiert. Die Verteilung der Kollagenfasern auf dem Stützgitter in Abhängigkeit von der Jettingdauer ist in Abbildung 30 mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen dargestellt. Bei einer kurzen Dauer von 2 min bis 5 min sind nicht alle Zwischenräume der Unterkonstruktion flächendeckend mit Kollagen bedeckt. Ab 10 min ist auf allen Gerüstzwischenräumen eine Kollagenschicht erkennbar. Bei den genannten Jettingzeiten hat das Kollagen die Tendenz sich nicht gleichmäßig auf das PLGA zu verteilen, sondern sich vor allem in der Mitte der Poren zu sammeln. Hier ist das elektrische Feld auf Grund des direkten Kontaktes mit dem geerdeten Kollektors am größten. Hierbei erfolgt die Befestigung der Fasern am PLGA hauptsächlich an den Ecken. Bei einer Jettingdauer von 10 min entstehen dadurch mikrometergroße Hängematten aus Kollagen (Abbildung 31). Ab einer Dauer von 30 min ist dieser Effekt nicht mehr auf den lichtmikroskopischen Bildern erkennbar und die Membran wird homogen (Abbildung 30).

Eine kurze Jettingdauer von 2 min bis 5 min trägt nicht zur Homogenität der Membran bei. Durch die niedrige Anzahl an Kollagenfasern ist keine Stabilität gegeben, die eine robuste Handhabung im Labor gewährleistet. Die inhomogene Verteilung auf der Unterkonstruktion ist auf die Interaktion zwischen den beiden Polymeren und dem elektrischen Feld zurückzuführen. Ab 10 min Jettingzeit ist die Membran aus Kollagenfasern stabil genug, um ohne Probleme transportiert und verwendet zu werden.

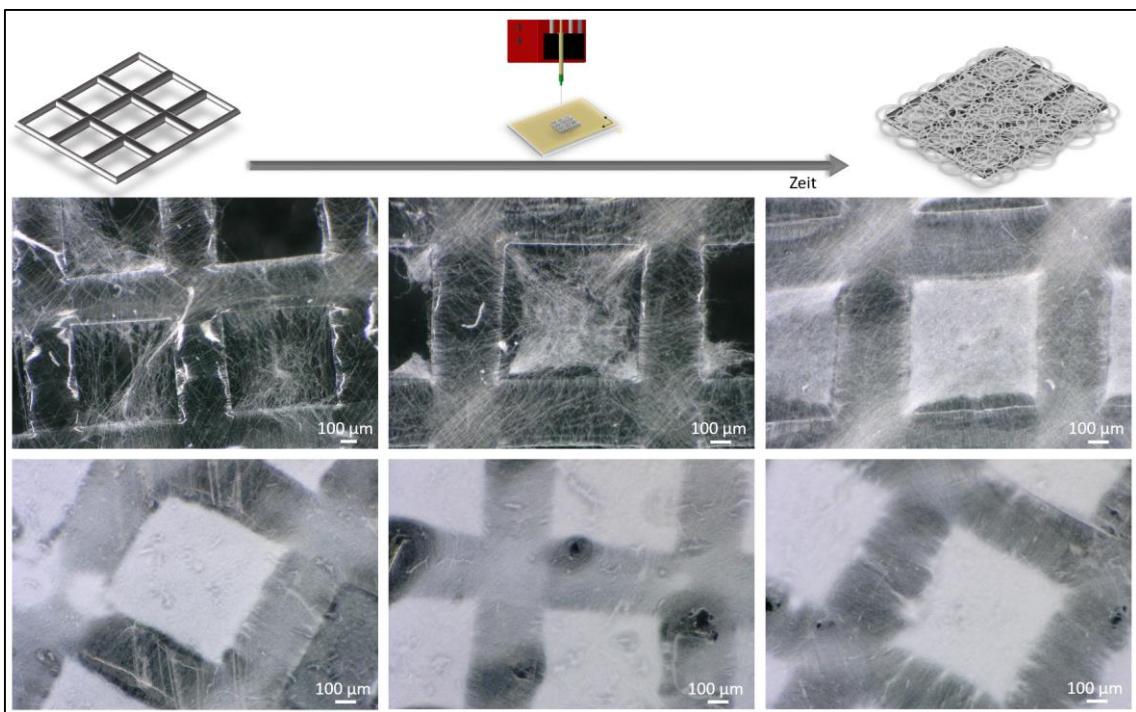


Abbildung 30 Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kollagenfasern auf PLGA-Stützgerüst mit variabler Jettingzeit zeigen eine zunehmend homogene Verteilung der Kollagenfasern auf der PLGA-Unterkonstruktion; von links nach rechts: 2 min, 5 min und 10 min oben sowie 30 min, 60 min und 90 min unten.

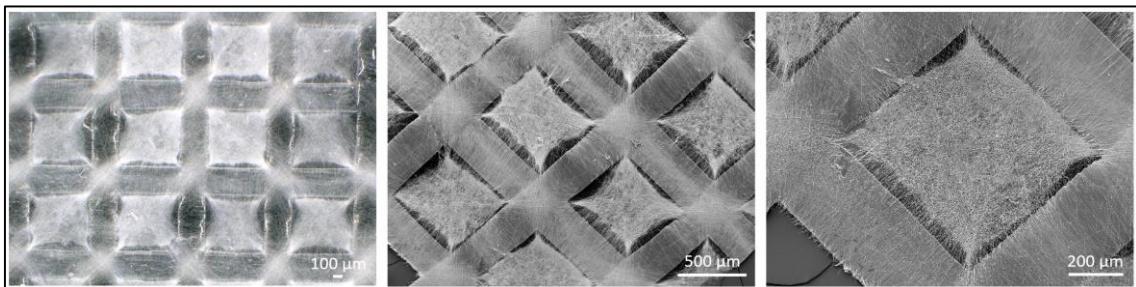


Abbildung 31 Mikro-Kollagen-Hängematten nach einer Jettingzeit von 10 min, links: lichtmikroskopische Aufnahme, mittig und rechts: REM-Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen

Die Stabilität der Membran in wässriger Lösung ist von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Kultivierung von Zellen. Hierzu wurden verschiedene Quervernetzungs-Methoden auf Kollagenmembranen angewendet und deren REM-Aufnahmen vor und nach dem Quervernetzen sowie nach einem einstündigen Test in Wasser verglichen. Die Jettingdauer der gezeigten Membranen beträgt jeweils 2 h.

Nach einer Bestrahlung der Kollagenmembran mit UV-Licht für 1 h sind keine morphologischen Änderungen der Kollagenfasern zu erkennen. Es wird außerdem deutlich, dass die Faserstruktur nach Kontakt mit Wasser vollständig verloren geht und nur eine unstrukturierte Oberfläche aus Kollagen zurückbleibt (Abbildung 32 links). Bei dem mittigen Versuchsaufbau wurde die Membran für 22 h über einer GDA-Lösung platziert. In Abbildung 32 mittig ist sichtbar, dass der Kontakt der Membran mit der

Gasphase, die mit GDA-Lösung, gesättigt ist, zu einem Aufquellen der Fasern führt. Im Vergleich zur Membran vor dem Quervernetzen sind deutlich weniger Poren zu erkennen. Nach der Interaktion mit Wasser sind keine Poren mehr zu erkennen, jedoch ist weiterhin eine Faserstruktur sichtbar. Beim rechten Versuchsaufbau wurde die Membran 22 h mit durch GDA-Lösung geleiteten Stickstoff überströmt. Auch hier ist ein Aufquellen der Kollagenfasern zu beobachten, jedoch deutlich weniger als im Vergleich zum mittleren Versuchsaufbau. Es sind jedoch mehr Poren erhalten geblieben und die einzelnen Fasern treten deutlicher hervor.

Aus den elektronenmikroskopischen Bildern wird sichtbar, dass UV-Licht mit dem gewählten Versuchsaufbau keine geeignete Vernetzungsmethode für die Kollagenmoleküle ist. In der Literatur wird dieser Methode zwar verwendet, geeignete Vergleichsbilder nach Kontakt mit Wasser, die eine erhaltene Faserstruktur zeigen, sucht man vergeblich. Andere Arbeiten weisen auf einen Abbau der Kollagenstruktur durch UV-Strahlung hin.^[161,162] Eine vielversprechendere Methode ist das Quervernetzen mittels GDA. Da bei beiden Versuchsaufbauten die Faserstruktur erhalten bleibt, scheint ein hohes Maß an molekularer Vernetzung stattgefunden zu haben. Im mittleren Versuchsaufbau wird deutlich, dass die gesättigte Gasphase zu viel Wasser enthält. Dies führt zu einem Aufquellen der Fasern, die dann in diesem Zustand quervernetzt werden. Durch das Überströmen mit gesättigtem Stickstoff wird das Aufquellen der Kollagenfasern verringert und die ursprüngliche Faserstruktur bleibt erhalten. Analog zum Vorbild der Natur ist diese Struktur vorteilhaft auf Grund ihrer vergrößerten Oberfläche und hohen Diffusionseigenschaften und ermöglicht so ein optimales Wachstum der Zellen. Endothelzellen nutzen beispielsweise die Fasern als Verankerungspunkt, um ihre charakteristische Anordnung innerhalb von Lymphgefäßen zu erhalten. Alle weiteren Quervernetzungen von Kollagen werden daher mit dem rechten Versuchsaufbau durchgeführt. Generell lässt dieser Versuch vermuten, dass die Porengröße der Kollagenmembran sowohl von der Jettingdauer, als auch von der Quervernetzungs-Methode abhängt. Dieser Zusammenhang soll im Folgenden weiter untersucht werden, um eine optimal einstellbare Morphologie der Membran zu erhalten.

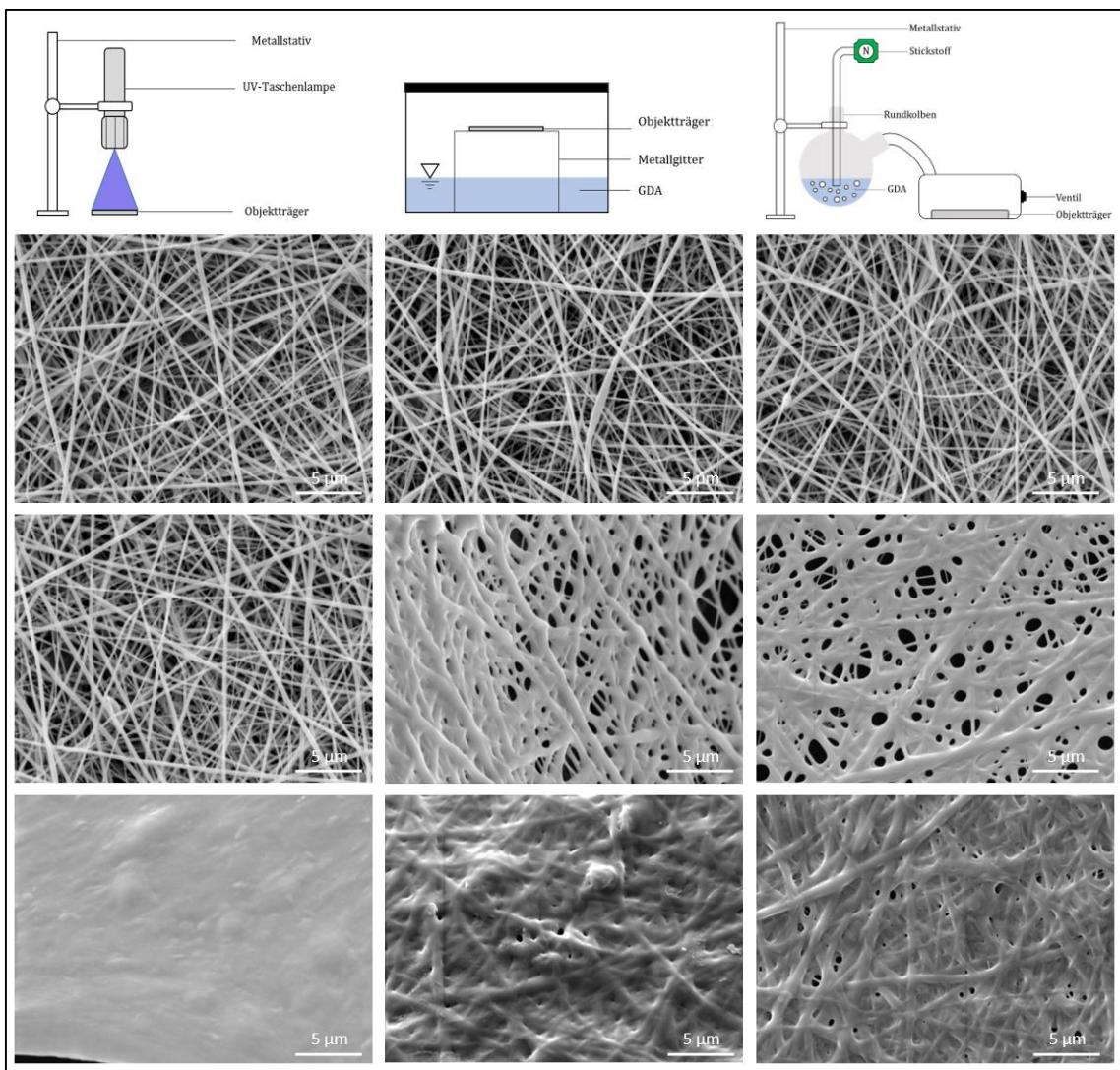


Abbildung 32 REM Aufnahmen der Kollagenmembranen vor (oben) und nach(mittig) dem Quervernetzen mittels verschiedener Methoden zeigen unterschiedliches Quellverhalten; links: UV-Licht (1 h, 3 W); mittig: Platzierung der Membran über einer GDA Lösung für 22h; rechts: Überströmung mit GDA angereichertem Stickstoff für 22h; sowie jeweils nach dem 1 h Test in deionisiertem Wasser (unten).

Die Auswirkungen der Jettingdauer auf die Morphologie der quervernetzten Membran vor und nach dem Quervernetzen sind in Abbildung 33 mittels elektronenmikroskopischer Bilder dargestellt. Es wird deutlich, dass ein Zusammenhang zwischen steigender Jettingdauer und Abnahme der Porengröße besteht. Bei einer Dauer von 2 min sind viele sehr unterschiedlich große Poren zu erkennen. Bei 10 min hat die Größe der Poren abgenommen, dafür ist die Porengröße konstanter. Ab einer Dauer von 30 min sind fast keine Poren mehr vorhanden. Als Vergleich sind zusätzlich die REM-Aufnahmen nach einem einstündigen Test in Wasser dargestellt. Die Aufnahmen bestätigen das erfolgreiche Stabilisieren der Fasern durch Quervernetzen, da bei allen Ansätzen die Fasern und Poren erhalten bleiben. Der Kontakt mit dem Wasser hat zu einem geringen zusätzlichen Aufquellen geführt und zeigt rein optisch keinen großen Einfluss mehr auf die Porengröße und Verteilung. Durch die Orientierung an der Natur werden weiter Versuche mit Jettingzeiten von über 30 min in den folgenden Versuchen dieser Arbeit nicht mehr betrachtet.

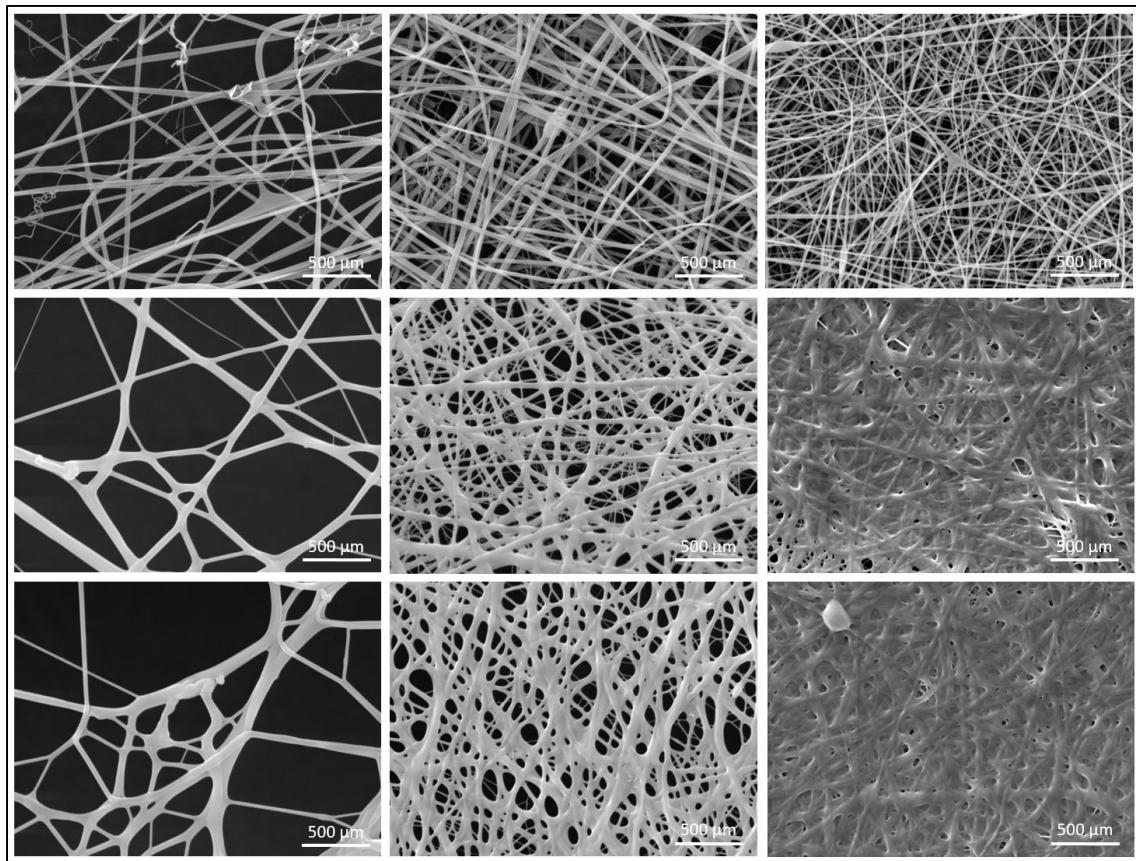


Abbildung 33 Über die Jettingdauer lässt sich die Porosität der Membran einstellen. REM-Aufnahmen zeigen die Faseranordnung in Abhängigkeit der Jettingdauer von 2 min (links), 10 min (mittig) und ≥ 30 min (rechts) jeweils direkt nach dem Elektrojetting (oben), dem molekularen Quervernetzen (mittig) und nach 1 h im Wasserbad (unten).

Um die obigen Aussagen mit Daten zu belegen, wurde die prozentuale Porenflächenverteilung für die Jettingzeiten von 2 min, 5 min und 10 min ausgewertet (Abbildung 34). Bei einer Dauer von 2 min wird ersichtlich, dass die Porenfläche zwischen $0,01 \mu\text{m}^2$ bis $75,05 \mu\text{m}^2$ variiert. Hierbei liegt eine gleichmäßige Verteilung über den ganzen Bereich vor und ein prozentualer Anteil von 10 % wird von keinem Durchmesser überschritten. Die durchschnittliche Porengröße verringert sich nach 1h im Wasser erheblich. Wenn die Jettingzeit erhöht wird, liegt die Porenfläche in einem Bereich von $0,1 \mu\text{m}^2$ bis $4 \mu\text{m}^2$. Der arithmetische Mittelwert für eine Jettingdauer von 5 min liegt bei $0,26 \mu\text{m}^2$. Bei 10 min ist eine Verringerung auf $0,19 \mu\text{m}^2$ erkennbar. Die Standardabweichung für Jet-Zeiten ab 5 min sind gering. Für 5 min liegt das Maximum von 45 % bei $0,05 \mu\text{m}$. Das Maximum von 50 % wird für 10 min ebenfalls bei einem Durchmesser von $0,05 \mu\text{m}$ erreicht. Nachdem die Membranen für 1 h im Wasser waren, erhöht sich die mittlere Porenfläche. Für 5 min liegt sie bei $0,42 \mu\text{m}^2$ und für 10 min bei $0,23 \mu\text{m}^2$. Insgesamt gesehen ist keine signifikante Veränderung der Porengröße im Vergleich zu den Membranen ohne Wasserkontakt für Jettingzeiten ab 5 min erkennbar.

Um den Nährstofftransport für die zu kultivierenden Zellen zu verbessern sollte eine möglichst große Anzahl von Poren sowie eine große mittlere Porenfläche vorhanden sein. Bei einer Jettingdauer von 2 min sind zwar diese Voraussetzungen gegeben, jedoch wird die Membran dabei sehr inhomogen. Um konstante Wachstumsbedingungen für alle Zellen zu garantieren ist dies nicht von Vorteil. Zwar nimmt

die Anzahl und Größe der Poren mit steigender Jettingdauer ab, jedoch nimmt die Homogenität der Membran zu. Unter dem Gesichtspunkt der Porengröße sind die Membranen mit einer Jettingzeit von 5-10 min geeignet, um eine Kultivierung mit möglichst konstanten Wachstumsbedingungen für alle Zellen zu gewährleisten.

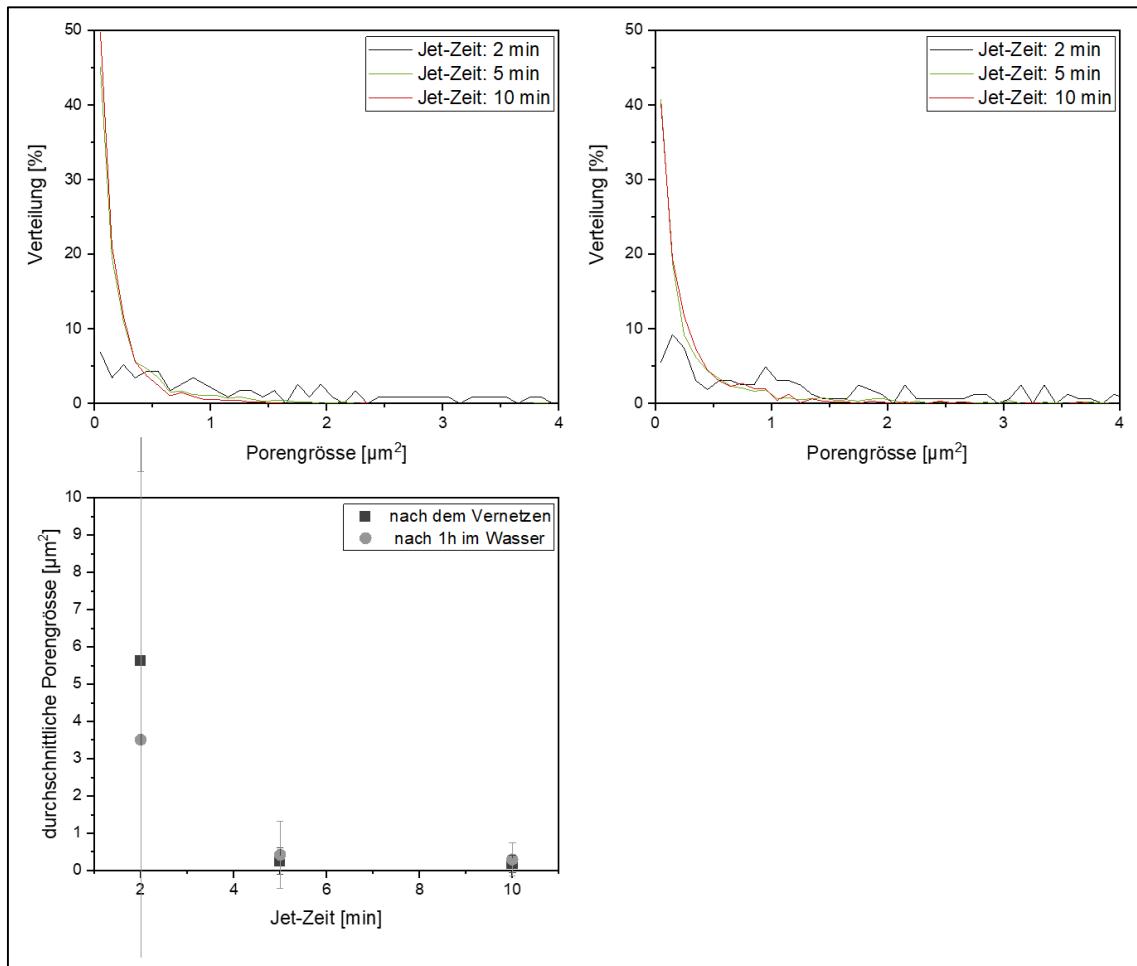


Abbildung 34 Prozentuale Porenflächenverteilung von elektrogejettem Kollagenmembranen aus 3,5 % (w/v) Kollagen in HFP bei unterschiedlichen Jettingzeiten jeweils nach molekularem Quervernetzen (links oben) sowie nach 1 h im Wasser (rechts oben). Die durchschnittliche Porengröße über die Jet-Dauer (links unten) zeigt eine homogene Porengröße im Nanometerbereich ab einer Dauer von 5 min.

Im Folgenden soll nun die minimal notwendige Zeit ermittelt werden, welche die Kollagenmembran benötigt, um mittels GDA gesättigtem Stickstoff auf molekularer Ebene quervernetzt zu werden und die Stabilität im wässrigem Milieu zu gewährleisten. Dazu wurden Membranen mit unterschiedlich langen Quervernetzungszeiten gelegt und anschließend mittels REM-Aufnahmen analysiert (Abbildung 35). Bei einer Vernetzungszeit von 1 h und 3 h ist ein Vlies ohne eine Faserstruktur und Poren erkennbar. Ab 8 h sind keine morphologischen Änderungen der Kollagenfasern zu erkennen. Die Poren sind erhalten geblieben und die einzelnen Fasern sind klar erkennbar. Unter einer Vernetzungszeit von 3 h gehen die Faserstrukturen nach Kontakt mit Wasser vollständig verloren und es bleibt nur ein Vlies aus Kollagen zurück, da ein zu geringes Maß an Quervernetzung stattgefunden hat. In Kontakt mit Wasser führt dies zu einem Verlust der Fasermorphologie. Ab einer Zeit von 8 h sind die Kollagenmoleküle ausreichend

quervernetzt, sodass sie im Wasser stabil sind und die Faserstruktur auch mit Faserdurchmesser in unteren Mikrometerbereich erhalten bleibt. Zu hohe Mengen an GDA wirken toxisch auf die zu kultivierenden Zellen. ^{[163],[164]} Zudem interagieren Zellen über transmembrane Adhäsionsrezeptoren, den sogenannten Integrinen mit der RGD-Sequenz in der ECM. GDA nutzt ebenfalls diese Sequenzen zur Quervernetzung und steht damit in Konkurrenz zu den freien Bindungsstellen für die Zellen. ^{[165],[166]} Als Konsequenz wurde für die weiteren Versuche die kürzeste molekulare Vernetzungszeit von 8 h verwendet.

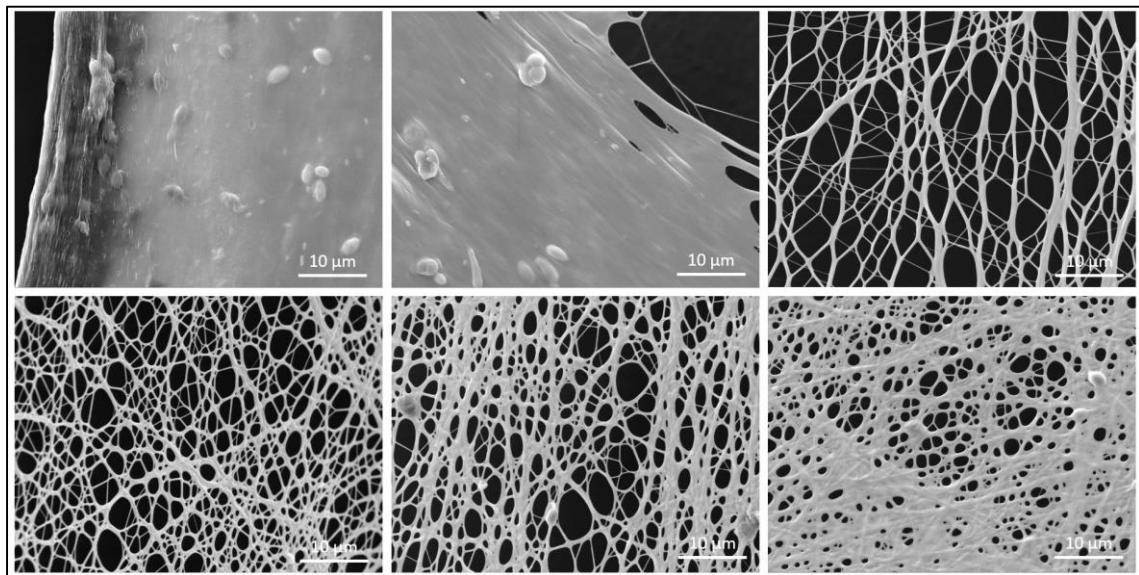


Abbildung 35 REM-Aufnahmen von verschiedenen Quervernetzungszeiten und einer anschließenden Verweilzeit im wässrigem Milieu von 1 h zeigen eine Stabilisierung der Fasermorphologie nach 8h; von links nach rechts: Vernetzungszeiten von 1 h, 3 h und 8 h (oben) sowie 10 h, 14 h, und 16 h (unten)

Anhand der Ergebnisse ist es möglich, die optimalen Parameter zur Herstellung einer Kollagenmembran zu ermitteln. Das PLGA-Stützgitter wurde mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{L}/\text{h}$ und einer Druckgeschwindigkeit von 3 mm/s optimiert. Eine Konzentration von 3,5 % (w/v) Kollagen in HFP, sowie eine Jettingzeit von 5 bis 10 min haben zu durchgängigen, homogenen Fasern sowie einer geeigneten Porengröße geführt. Um die Stabilität der Membran zu verbessern und eine gleichmäßige Verteilung des Kollagens auf der Unterkonstruktion zu erreichen ist es sinnvoll, eine Jettingdauer von 10 min anzusetzen. Die chemische Vernetzungs-Methode mittels GDA hat sich zur Stabilisierung der Membran in Wasser als geeignet erwiesen. Je nach Aufgabengebiet werden unterschiedliche Anforderungen an die Größe und Flexibilität einer Membran gestellt. Daher ist es wichtig, die Kollagenmembran in jedem Maßstab herstellen zu können. In Abbildung 36 ist eine ca. 5 cm x 5 cm große Kollagenmembran dargestellt. Auch nach der chemischen Quervernetzung mittels GDA ist die Membran stabil genug, um gerollt zu werden und sie lässt sich ohne Verlust von Kollagen transportieren.

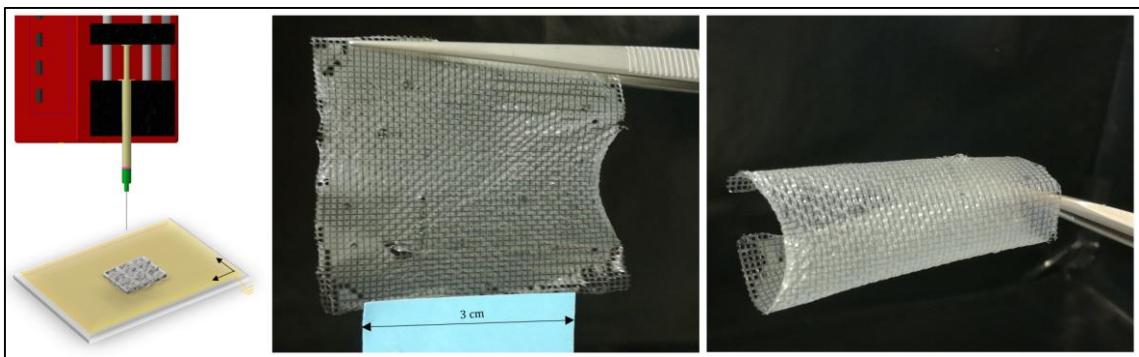


Abbildung 36 Kollagenmembran mit 5 cm Kantenlänge mit gewünschter und einstellbarer Morphologie auf Grund optimierter Parameter: 3,5 % (w/v) Kollagenkonzentration, 10 min Jettingdauer und stabil im wässrigen Milieu.

6.2 Entwicklung der 3D Netz-Jet Anlage

Nach erfolgreicher Charakterisierung und Validierung der Jet- und Stabilisierungsparameter für Kolagenmembranen mit einer einstellbaren Fasermorphologie und Porengrößenverteilung mittels Elektrojetting stellt das Hinzufügen einer dritten Dimension die nächste Herausforderung dar. Auch wenn die hergestellte Membran rollbar ist, so bewegt sich die flache Membran immer noch in der zweiten Dimension. Um den Einfluss der ECM Architektur zu untersuchen und zukünftig besser verstehen zu können, ist das Hinzufügen einer räumlichen Tiefe vorteilhaft. Im Folgenden wurde eine Mikrofabrikationsmethode entwickelt, mit welcher das natürlich vorkommende Kollagen im 3D-Mikrometerbereich genau platziert und orientiert werden kann. Als Unterkonstruktion für die einfacheren Handhabung des feinen Kollagennetzes wurden hierzu sogenannte Mikrokravitäten-Arrays verwendet.^[167] Dabei handelt es sich um eine dünne Polymerfolie, welche mittels Mikrothermoformverfahrens zu kleinen Mikrokravitäten umgeformt wird. So entsteht eine wenige Zentimeter große Mikrotitterplatte (Array), welche vor allem zu Screening-Zwecken eingesetzt wird.^{[167][168]} Diese gewährleistet auf Grund der geringen Größe den Zell-Zell-Kontakt als auch eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen.^[169] Im Folgenden wurden Arrays mit 300 µm und 800 µm großen Mikrokravitäten verwendet.

Wie bisher wurde eine Spritzenpumpe mit einer 1 ml Spritze in fixer Position montiert, welche die Polymerlösung enthält. An den Nadelaufsatz der Spritze in metallischer Ausführung wurde mittels Netzteils eine positive Spannung angelegt. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse zur Beeinflussung der Deposition der Fasern wurde die Nahfeld Elektrospinning-Methode angewendet.^{[170],[171],[172]} Zusätzlich wurde die Erdung als Punkterdung aufgeführt. Dazu wurde eine geerdete Nadel analog zur Spritzenpumpe fix montiert. Die beiden Nadeln zeigten in vertikaler Linie zueinander (Abbildung 37). Um die einzelnen Mikrokravitäten exakt zwischen den beiden Nadeln positionieren zu können, wurde eine in x-y-Richtung steuerbare und programmierbare Station als Grundlage verwendet. Auf die Verschraubung der Station wurde mittels Abstandshalter in passender Innenimbusform eine quadratischen Platte mit den Maßen 120 mm x 120 mm x 4 mm zwischen die beiden geladenen Nadeln gesetzt. Mittig in dieser Platte befindet sich eine runde 2 mm tiefe Vertiefung mit einem Durchmesser von 40 mm und einer quadratischen Aussparung von 10 mm x 10 mm, in welche die Arrays platziert werden konnten. Alle Bauteile der Proben- und Nadelhalterungen wurden mittels CAD entworfen und anschließend mit einem kommerziellem 3D-Drucker modelliert.

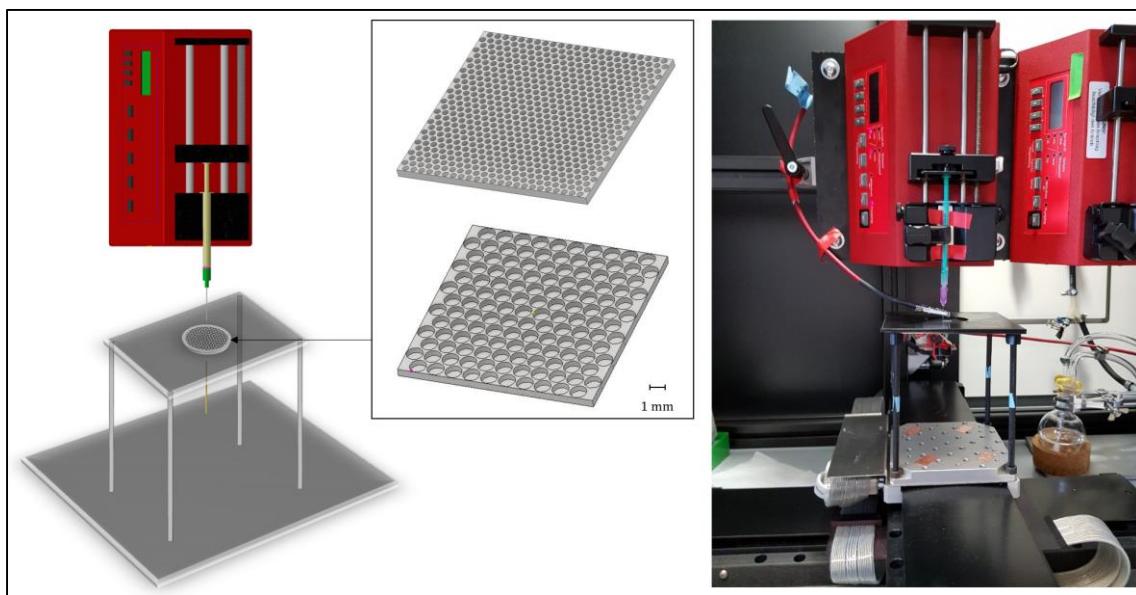


Abbildung 37 Entwicklung und Konstruktion einer punktuellen 3D-Jetting Station zur gezielten Deposition von Proteinstrukturen. Links der schematische Aufbau mit Arrays als Probenaufnahme und rechts eine Fotografie des Laboraufbaus. Konstruktiv wurde hier eine Nahfeld Electrospinning-Methode mit zusätzlicher Punkterdung realisiert.

Um optimale Kollagenfasern und damit eine ECM innerhalb der Mikrokavitäten platzieren zu können, wurde unter anderem der Abstand zwischen Nadel und Array von 1 mm zu 2,6 mm variiert. Die Versuche ergaben, dass unter 2,6 mm sehr lösungsmittelhaltige Fasern in den Kavitäten abgeschieden wurden, welche verklebten und die gewünschte Fasermorphologie verloren. Die Spannung wurde abhängig von Temperatur und Luftfeuchtigkeit immer neu in einem Bereich von 7,8 kV und 9,2 kV eingestellt, und betrug damit deutlich mehr als die in der Literatur beschriebenen 0,2-2,5 kV für das Nahfeld-Jetting.^{[173],[170],[172]} Auf Grund des Wetters gab es Schwankungen in der Temperatur von 22 °C-24 °C und in der Luftfeuchtigkeit von 34 %-78 %, welche durch die Variation der angelegten Spannung ausgeglichen werden konnten. Da sich der Faserdurchmesser und die abgeschiedene Menge an Kollagen mit steigender Flussrate erhöht, wurde eine Flussrate von 60 µL/h gewählt.^[65] Der Abstand zwischen der als Nadel verwendeten Punkterdung und dem Array auf der Platte wurde auf 5 mm festgelegt, da bei einem geringeren Abstand von 1-3 mm elektrische Blitze entstanden.^{[174],[175]} Um das elektrische Feld möglichst stark zu halten, wurden keine größeren Abstände als 5 mm betrachtet.

Um eine optimale Abscheidung der Kollagenfasern innerhalb einer einzelnen Mikrokavität zu gewährleisten, wurden verschiedene Nadelpositionen über den Mikrokavitäten ausgetestet. Auch die Anfahrgeschwindigkeit und Verweildauer der Nadel über der Kavität hatte einen großen Einfluss auf die abgeschiedenen Kollagenmengen und die Membranmorphologie, vor allem auf die Porosität wie oben beschrieben. Da bei der manuellen Bedienung der x-y-Station ein Umstellen der Bewegungsabstände innerhalb eines Arrays zu zeitintensiv gewesen wäre und die Kavitäten versetzt angeordnet sind, wurden die Mittelpunkte der Kavitäten nur in jeder zweite Reihe exakt angefahren. Für 300 µm große Mikrokavitäten wurde der Laufweg in x-Richtung mit 410 µm und in y-Richtung mit 360 µm gewählt. Bei 800 µm großen Kavitäten analog mit x=890 µm und y=770 µm. Die Bewegungsgeschwindigkeit wurde auf 0,4 mm/s gesetzt und die Verweildauer betrug 0,5 s. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die Arrays mithilfe von CAD digital abgebildet und das Bewegungsschema als Vektordatei darüber

gelegt. Mit Hilfe der Vektordatei konnte anschließend das Bewegungsschema von der Station automatisch abgefahren werden.

6.3 Dreidimensionale Proteinnetzze: Struktur, Anordnung und Toxizität

6.3.1 Ausbildung des 3D-Proteinnetzes in Z-Ebene

Zur Untersuchung der Abscheidung und Morphologie von Kollagenfasern in den einzelnen Mikrokavitäten wurde die Polymerlösung vor dem Jet-Vorgang mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Die Kollagenfasern im Array wurden anschließend mittels GDA auf molekularer Ebene quervernetzt und somit für das wässrige Milieu stabilisiert. Dies wurde 1 h lang in Wasser getestet. Abbildung 38 oben rechts zeigt eine Aufnahme einer 300 µm-Kavität mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop. Die Kollagenfasern sind in grün ersichtlich. In der Mikrokavität befindet sich netztartig angeordnetes Kollagen. Abbildung 38 oben links zeigt auf der z-Achse die Intensität der Floureszenz über eine dreidimensional aufgenommene 300 µm-Kavität. Die x- und y-Achse stellen maßstabsgetreu die Maße der Kavität in µm da. Dabei ist in der Kavität die Intensität der Floureszens am höchsten. Im unteren Bereich der Abbildung sind Aufnahmen einer 800 µm-Kavität dargestellt. Dabei zeigt jede Aufnahme einen anderen Schnitt in der z-Achse im Abstand 37 µm. Die erste Aufnahme zeigt die Oberfläche des Arrays und die letzte den Boden der Mikrokavität. In der obersten Ebene befinden sich viele Kollagenfasern auf den Rändern zwischen den Mikrokavitäten und damit auf der Oberfläche des Arrays. Die nächsten 5 Ebenen stellen den Hohlraum der Kavität dar. In Jeder Ebene sind Kollagenfasern über den gesamten Querschnitt der Kavität ersichtlich. Die letzten zwei Bilder zeigen, dass sich auch am Boden der Kavität Kollagenfasern abgeschieden haben.

Mit Hilfe der oben entworfenen 3D-Netz-Jet Anlage und den optimierten Parametern konnten Mikrokavitäten von 300 µm Durchmesser gezielt angesteuert und Kollagenfasern innerhalb der Kavitäten abgelagert werden. Die Kollagenfasern bilden eine netzartige Struktur und spannen sich durch den gesamten Raum der Mikrokavität bis zum Boden. Sie bilden damit eine dreidimensionales Mikronetz. Die Morphologie der Netzstruktur verändert sich nicht durch das Quervernetzen des Kollagens oder das anschließende Waschen.

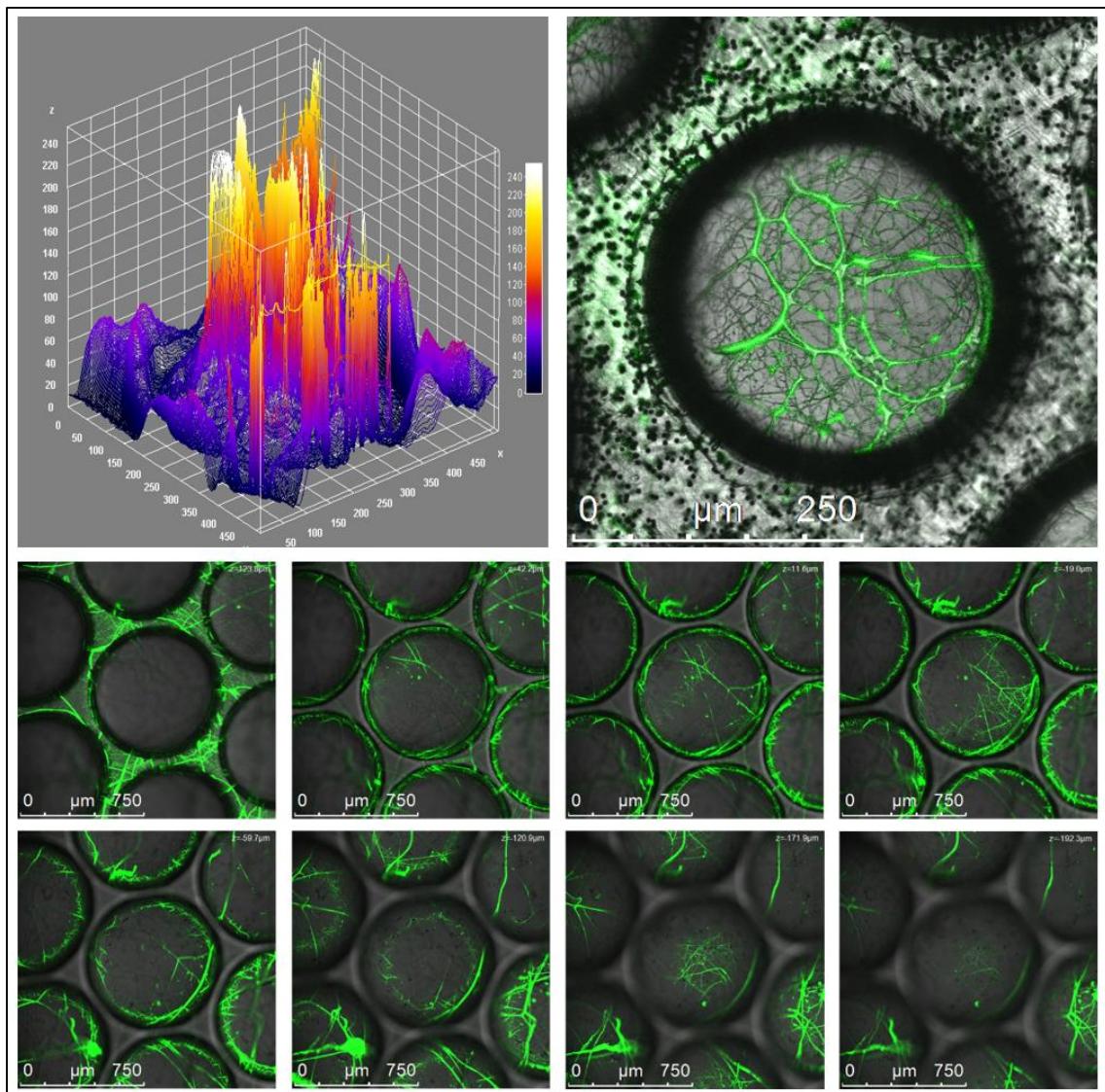


Abbildung 38 Aufnahmen mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop von unterschiedlichen Mikrokavitäten zeigen Kollagenfasern (grün) die sich dreidimensional durch die Mikrokavität spannen. Die Netze sind stabil in wässrigem Milieu. Oben links: Intensität (z) über einer dreidimensional aufgenommenen 300 μm -Kavität; oben rechts: Fluoreszenzaufnahmen einer 300 μm -Kavität mit erkennbarer Netzanordnung der Kollagenfasern; unten: Fluoreszenzaufnahmen einer 800 μm -Kavität in verschiedenen z-Höhen (von links oben nach rechts unten) zeigen, dass sich die Kollagenfasern über die gesamte Höhe der Mikrokavität abgelagert haben.

Um die Vielfältigkeit der 3D-Netz-Jet Anlage zu zeigen, wurden statt der Arrays weitere dreidimensionale Trägermaterialien auf dem Probentisch der 3D-Netz-Elektrojetting Anlage platziert. Unter anderem eine zuvor mittels 3D-Elektrojetting hergestellte Gerüststruktur aus PAA, wie in Kapitel 5.1.2 gezeigt. Die Porengröße der Scaffolds betrug 1 mm und die Höhe 300 μm . Das PAA wurde zuvor angefärbt und ist in Abbildung 39 in rot dargestellt. Auch hier ist bei beiden dargestellten Scaffolds zu erkennen, dass sich die in grün dargestellten Kollagenfasern netzartig über die gesamte Höhe der Gerüststrukturen ablagerten. Durch die Flexibilität der Scaffolds in Form, Größe und Material, welche die Struktur und Steifigkeit vorgeben in Kombination mit dem Kollagennetz auf natürlicher Proteinbasis, ist es möglich die

Zellkulturumgebung präzise vorzugeben und den Einfluss der Umgebung oder ECM auf die Zellen zu studieren.

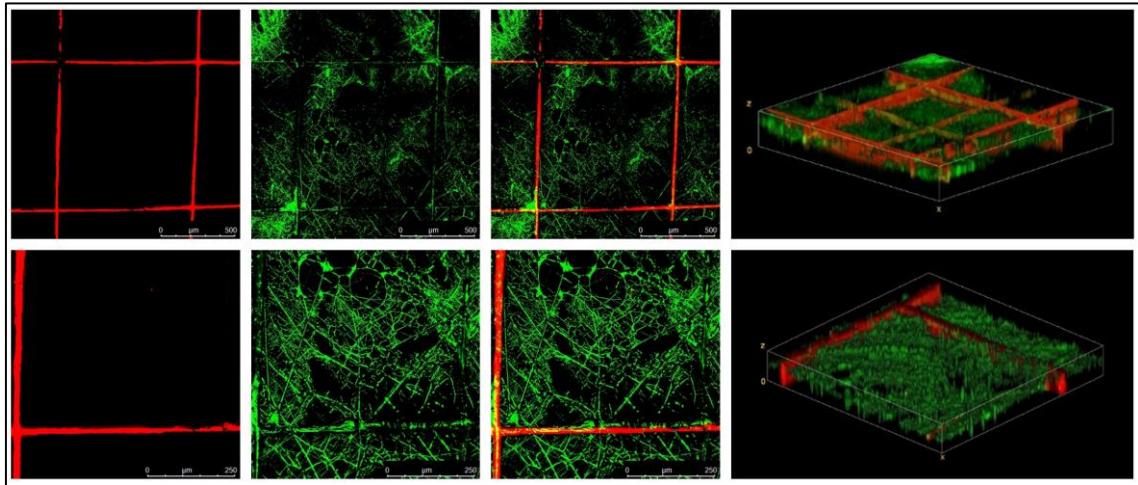


Abbildung 39 Aufnahmen mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop von elektrogejetteten PAA Scaffolds (rot) in welchen sich dreidimensionale Kollagennetze (grün) spannen. Links: Darstellung der PAA Struktur in rot, daneben die Kollagenstrukturen in grün des selben Scaffoldausschnittes. Rechts: Überlagerung als zwei und dreidimensionale Darstellung der beiden linken Aufnahmen.

6.3.2 Strukturmanipulation mittels elektrischem Feld

Um die Möglichkeiten zu erweitern und auch gegebenenfalls das Kollagennetz strukturieren zu können, wurde der Einfluss der Punkterdung auf die Kollagenabscheidung untersucht. Dazu wurde die oben beschriebene Punkterdung mittels Nadel durch zwei Stricherdungen von 10 mm Länge ersetzt. Der Vergleich des Aufbaus ist in Abbildung 40 links schematisch dargestellt. Sonstige Abstände und Parameter wurden gleich gehalten. Die elektrischen Felder wurden mittels Comsol simuliert und verglichen. Dabei fällt auf, dass die Stärke des Feldes bei der Doppelerdung auf Grund der größeren Erdung zunimmt (Abbildung 40 unten). Betrachtet man die lange Seite der Erdung, unten rechts dargestellt, nimmt das Vektorfeld zu im Vergleich zur kurzen Erdungsseite (Abbildung 40 unten mittig) zu.

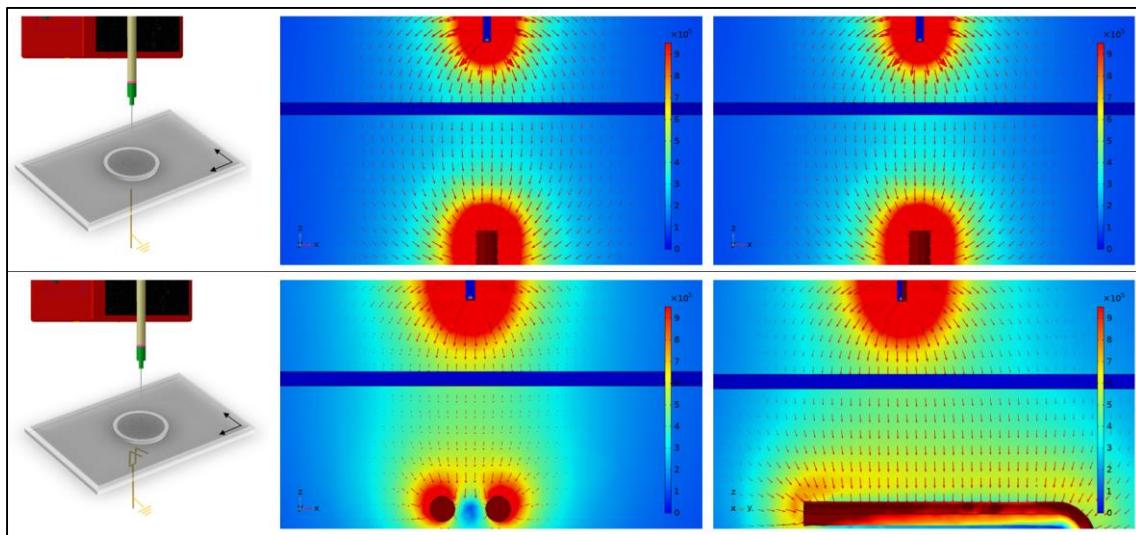


Abbildung 40 Ersatz der Punkterdung (oben) durch eine Doppelerdung (unten) im 3D-Netz-Jetting Aufbau. Links ist der Aufbau schematisch dargestellt, sowie der simulierte Einfluss auf das elektrische Feld (mittig und rechts).

Mit beiden Erdungen wurden anschließend Kollagennetze in Mikrokavitäten gejettet und mittels REM analysiert. In Abbildung 41 rechts oben ist die bereits bekannte Netzstruktur, welche mittels Punkterdung erzeugt wurde, abgebildet. Im Vergleich zeigt das Kollagennetz darunter eine diagonale Orientierung der Fasern. Dieses wurde unter Verwendung der Doppelerdung erzeugt. Es handelt sich immer noch um eine Netz-Struktur aber mit klar ersichtlicher Orientierung in eine Hauptrichtung. Die Orientierung der Fasern wurde mittels ImageJ für mehrere Kavitäten und Jet-Vorgänge ausgewertet und ist in Abbildung 41 links dargestellt. Die Verteilung der Faserorientierung der Kollagennetze mittels Punkterdung zeigt vier Spitzen bei 90°, -45,5°, -0,5° und 44,5°. Die Fasern unter Verwendung der Doppelerdung zeigen hingegen nur einen Hochpunkt bei 8,5°, welcher auch weiter über den Verteilungshochpunkten der Punkterdung liegt. Das Anbringen einer doppelten Linienerdung gibt demnach dem Kollagennetz eine Richtungsorientierung direkt beim Jetting vor. Durch weitere Manipulation des elektrischen Feldes über verschiedene Erdungsdesigns sind hier weitere Strukturen der Polymeranordnung denkbar. Vorteilhaft ist zudem, dass die Strukturierung nicht durch aufwendige Nachbehandlungen erfolgen muss. Kollagenfasern sind in ihrer Längsrichtung zugfest. Dies zeigt sich auch in der Anordnung der Kollagenfasern in bestimmten Gewebetypen. Wird ein Gewebe in nur eine Richtung beansprucht, sind die Fasern parallel in Richtung der Beanspruchung ausgerichtet, wie beispielsweise bei Sehnen, Bändern oder dem Dentin. In Geweben wie der Dermis oder den Hirn- und Rückenmarkshäuten (Dura mater), bei der die Gewebebeanspruchung in alle Richtungen erfolgt, liegen die Kollagenfasern geflechtartig vor.^[158]

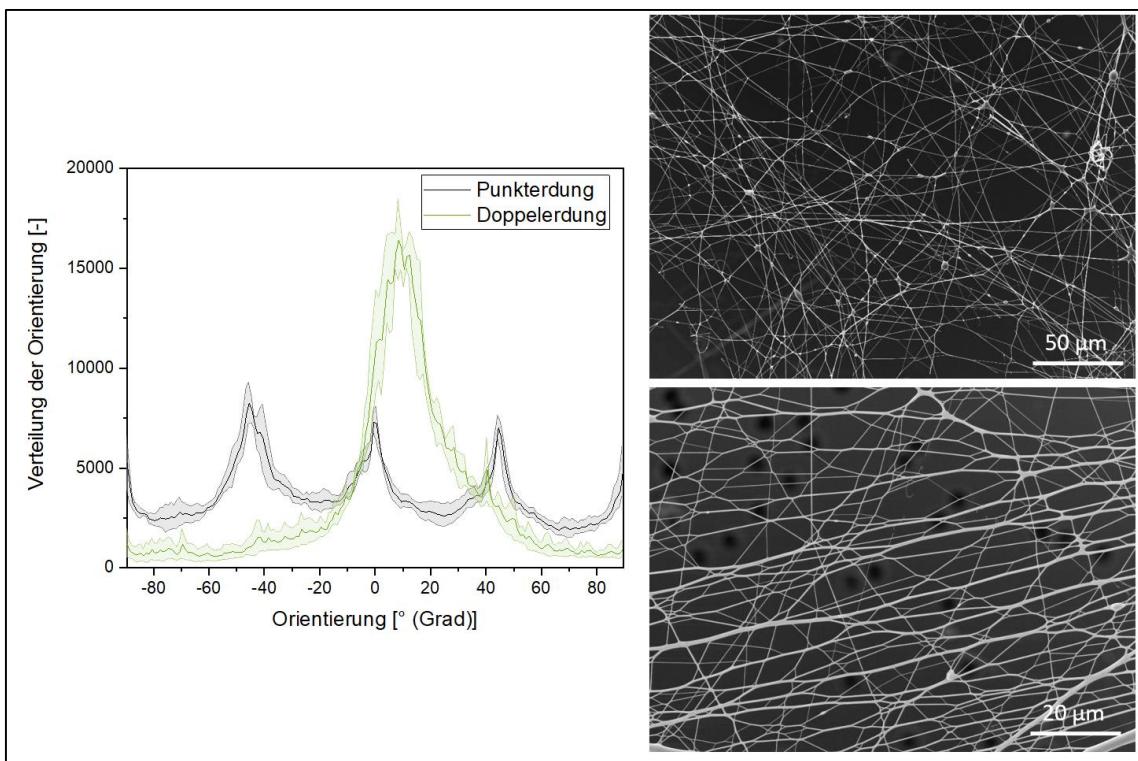


Abbildung 41 Verteilung der Faserorientierung bei Verwendung verschiedener Erdungsdesigns während des Jet-Vorgangs (links); Rechts: REM Aufnahmen von elektrogejetteten dreidimensionalen Kollagennetzen mittels Punkterdung (oben) und Doppelerdung (unten) zeigen deutliche Unterschiede in der räumlichen Orientierung der Faseranordnung.

6.3.3 Zellkultivierung in dreidimensionalen Kollagen-Netzen

Um die Eignung der Kollagennetze als ECM Ersatz weiter zu charakterisieren, wurden dreidimensionale Kollagennetze mittels Punkterdung in Mikrokavitäten gejettet. Nach erfolgreicher molekularer Quervernetzung und anschließendem Waschvorgang wurden die Kavitäten mit Hepatocyten angeimpft und für 24 h kultiviert. Fluoreszenzaufnahmen der angefärbten 300 μm großen Kavitäten sind in Abbildung 42 aufgeführt. Dabei wurde bei der linken Aufnahme nur der rote Farbstoff angeregt, um das Vorhandensein von Zellplasma zu verifizieren. In Mikrokavitäten mittig und rechts sind sowohl die Kollagenfasern (grün) als auch Zellkern (blau) erkennbar. Die Zellen lebten nach 24 h noch und haben sich geteilt. Zudem war erkennbar, dass sich die Zellen bevorzugt um die Kollagenfasern befanden. Hier ist eine mechanische Verankerung möglich durch die Adhäsion der Integrine an Kollagen über deren RGD-Sequenz. Da die Zellen nach einem Tag noch lebten, konnte eine Toxizität durch GDA ausgeschlossen werden. Auch eine eventuell zu lange Quervernetzungszeit und dadurch belegte Bindungsstellen des Kollagens für die Zellen, konnte mithilfe dieses Ergebnisses widerlegt werden. Die dreidimensionalen elektrogejetteten Netzstrukturen aus dem natürlichen Polymer Kollagen sind daher bestens für die

Zellkultur einsetzbar und ermöglichen neue Möglichkeiten zur Erforschung der ECM.

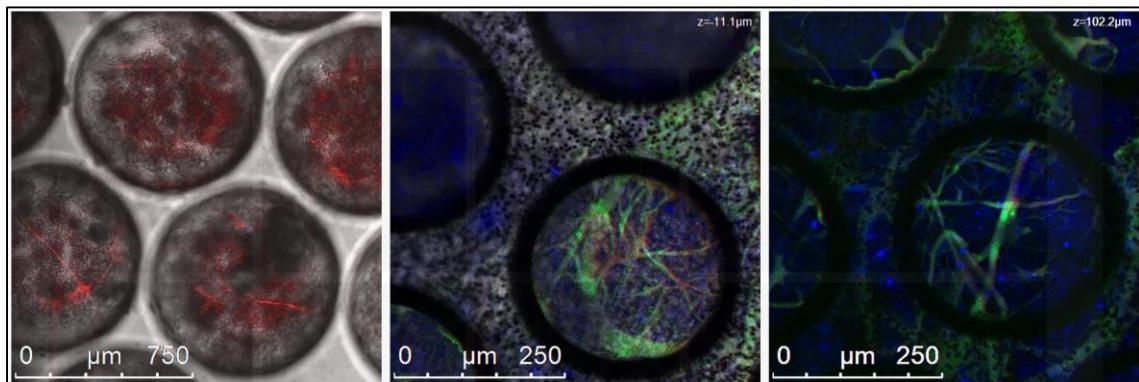


Abbildung 42 cLSM-Aufnahmen zur Kultivierung von Hepatocyten in 300 μm -Mikrokavitäten mit elektrogesponnenen Kollagenfasern (grün), Zellkernen (blau) und Cytoplasamata (rot)

6.4 Potenzial und Forschungsansätze der Kollagenstrukturen

Mittels Elektrojetting konnten mehrdimensionale Kollagenstrukturen geschaffen werden, die der natürlichen ECM sehr nahekommen. Die entstandenen Proteinstrukturen sind vor allem mit der Basalmembran von Lymphgefäßen in Porosität und Faserstruktur vergleichbar.^[176] Mittels Stützgitter oder Umrahmung durch eine Mikrokavität wurde die Handhabung und Stabilität für den Einsatz im gewerblichen Umfeld optimiert. Auch die Orientierung der Fasern kann direkt während des Jettvorganges beeinflusst werden, je nach gewünschtem Gewebetyp. Gerade in den Mikrokavitäten ist ein standardisierter Ansatz zum Screening von Zellen und Medikamenten denkbar. Eine Erweiterung des Einsatzes ist die Integration in mikrofluidische Apparate, die als multifunktionelle Plattform für gezielte, analytische Untersuchungen der kultivierten Zellen dienen.^[177] Es gibt bereits Beispiele von mikrofluidischen Apparaten, die zur Kultivierung und Untersuchung speziell von Endothelzellen dienen.^[178,179] Eine optimierte, naturgetreue Proteinmembran ist dabei Kernbestandteil, da sie als Verankerungspunkt der Zellen dient. Erwarten lassen sich dadurch genauere Kenntnisse zur Rolle der ECM, speziell der Basalmembran und deren Zusammenhang mit Zellvorgängen und Erkrankungen.

Neben Kollagen machen das Glykoprotein Laminin einen Grossteil der Basalmembran aus.^[180] Durch Nidogen und Heparan Sulfate ist Kollagen mit dem Laminin Netzwerk verbunden. Analog zu Kollagen, weisen auch die Laminine Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf.^[181] Die Untersuchung der Wechselwirkungen beider Proteine in Verbindung mit Endothelzellen könnte zu einem besseren Verständnis beitragen. Einen ersten praktischen Ansatz liefert Elastin, da dieses bereits mehrmals gemeinsam mit Collagen im Bereich des Tissue Engineering gejetzt und ebenfalls im gleichen Lösungsmittel HFP gelöst wurde.^{[182],[183],[184]}

Zusätzlich konnte die Stabilität im wässrigen Milieu als Voraussetzung für Zellversuche durch den Einsatz von GDA sichergestellt werden. Auch wenn die gezeigten Zellversuche eine Toxizität ausschließen, besteht für die gewählte Crosslink-Methode noch Optimierungsbedarf. Es wurde nachgewiesen, dass mittels GDA quervernetzte Membranen teilweise toxisch für die zu kultivierenden Zellen sein können.^[163] Grund hierfür ist zum einen das Austreten von nicht umgesetztem GDA und zum anderen die fortbestehende Reaktivität der freien Aldehydgruppen.^[185] Es gibt verschiedenen Ansätze dieses Problem zu lösen und damit den aufwändigen Waschschritt zu eliminieren. Kandidaten für Alternativen zum GDA mit geringerer

Toxizität wären beispielsweise Genipin und N-[3-(dimethylamino)propyl]-N'-Ethylcarbodiimide Hydrochloride in Anwesenheit von N-Hydroxysuccinimide.^[162,163] In Der Literatur finden sich auch Ansätze zum Quervernetzen von Kollagen mittels enzymatischer Methoden z. B. mit Transglutaminasen.^[162]

7 3D-jet Writing von enzym- und zellbeladenen Hydrogelstrukturen

Die computergesteuerte dreidimensionale Herstellung von zellhaltigem Gewebe mittels Drucker wird Bioprinting genannt. Die Voraussetzung für das direkte Jetten von biologisch aktiven Materialien ist eine Jet-Tinte auf Wasserbasis, um die Stabilität und Aktivität der Enzyme und Zellen während des Produktionsprozesses aufrechtzuerhalten. Im Folgenden ist die Entwicklung und Charakterisierung einer Biotinte zum Aufbau von biologisch aktivem Gewebe mittels Elektrojetting beschrieben.

Grundlage für das 3D-jet Writing bildete eine computergesteuerte x-y-Station (Abbildung 43). Die Fixierung der Spritzenpumpe und des Ringes erfolgten mittels Klemmen an einem Außengerüst aus einem Holzfaser-Kunststoffverbund, so dass die Fixierpunkte und damit die Abstände zueinander einfach zu ändern waren. Außerdem war es dadurch möglich, mehrere Spitzenpumpen parallel zueinander anzurordnen und somit mehrere Scaffolds zeitgleich zu produzieren. Auch der Transfer der Station in andere Labortrakte für Zellkulturen oder unter die Sterilbank war dadurch problemlos möglich.

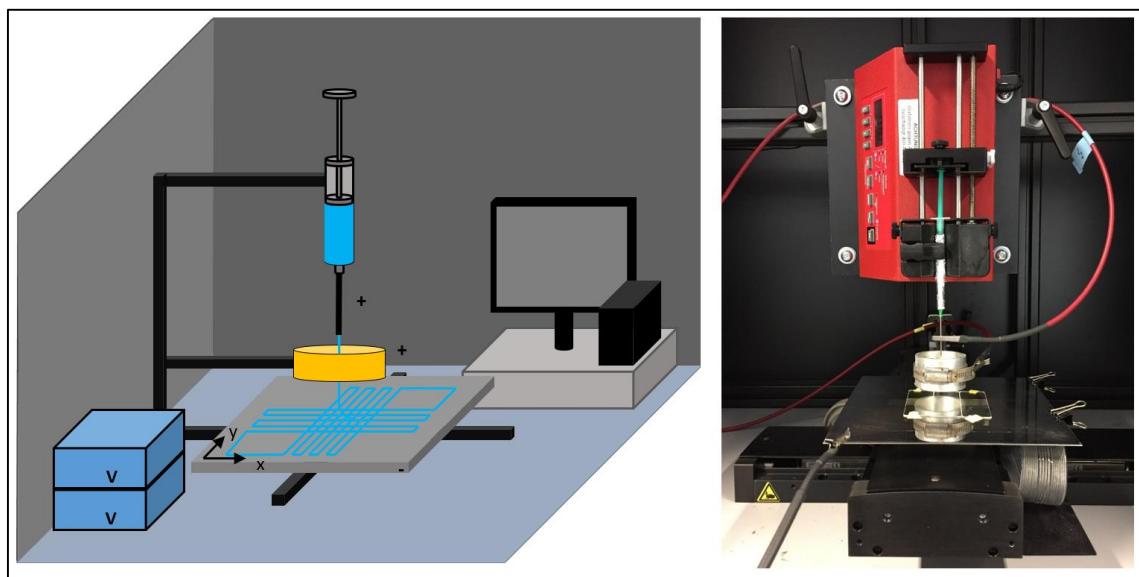


Abbildung 43 Aufbau der 3D-jet Writing Station für Hydrogelfasern. Das Verfahren ermöglicht die Herstellung von präzise orientierten Hydrogelfasern indem die Biege- und Peitscheninstabilitäten durch das Anlegen eines zweiten elektrischen Feldes kontrolliert werden.

7.1 Die elektrohydrodynamische Hydrogellösung und ihre makromolekulare Struktur

7.1.1 Tintenentwicklung auf Wasserbasis und ihre rheologischen Eigenschaften

Die Gewebematrix hat meist typischerweise die Konsistenz eines wasserhaltigen Gels. Als UV-vernetzbares Makromer wurde Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) verwendet, das aufgrund seiner einheitlichen Porengröße ein Hydrogel mit hoher Wasseraufnahmekapazität bildet.^[186] Die erfolgreiche Bildung des Taylor-Kegels und der anschließenden Fasern beim Anlegen des elektrischen Feldes hängt von der Polymerkonzentration, der Art des Lösungsmittels, der Leitfähigkeit und der Viskosität der Polymerlösung ab.^[187] Einerseits sind reines PEGDA ($M_n=700 \text{ g mol}^{-1}$) und PEGDA-Wasser-Kombinationen aufgrund ihrer niedrigen Viskosität nicht zum Jetten geeignet, wie in Abbildung 44 gezeigt. Die grün markierten Proben sind für ein stabiles Jetting geeignet, während der Jet der anderen Lösungen instabil war. Die Variation der PAA-Konzentration zeigte, dass ein Jetten von Hydrogelfasern mit einem Anteil von 5 % (w/v) PAA in Kombination mit einem Gemisch aus PEGDA und Wasser nicht möglich ist. Die Lösung wurde durch eine Erhöhung der Konzentration an PAA auf 7,5 % bzw. 10 % viskoser. In Kombination mit der Verschiebung des PEGDA/Wasser-Verhältnisses in Richtung einer hohen PEGDA-Konzentration konnten anschließend stabile Fasern und Gitterstrukturen gejetzt werden.

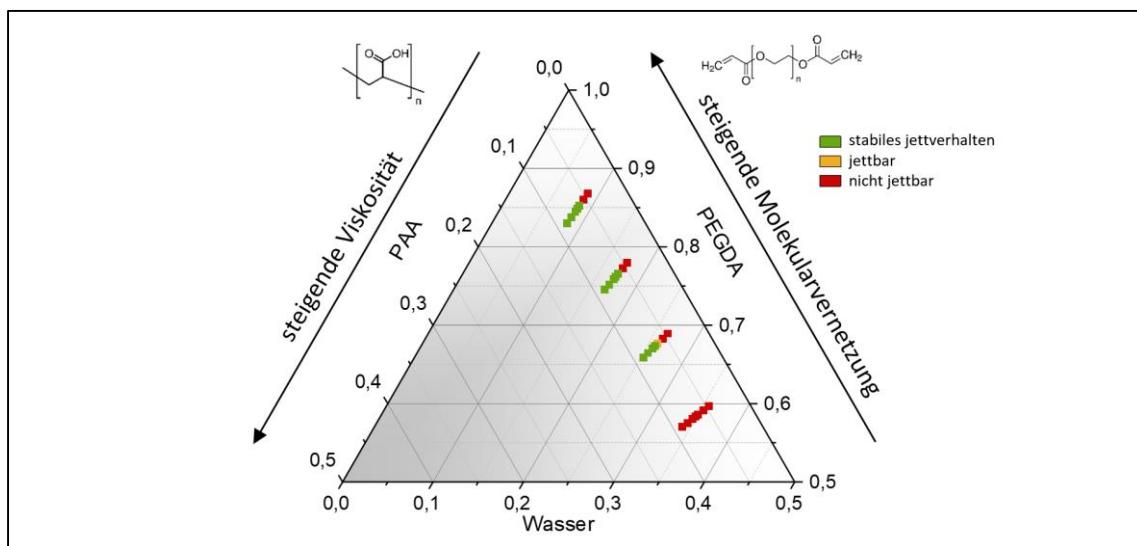


Abbildung 44 Variationen der verschiedenen Polymerkonzentrationen zeigen einen enormen Einfluss auf die Stabilität des elektrohydrodynamischen Jets. Über das Verhältnis von PAA, PEGDA und Wasser konnte sowohl die Viskosität als auch die Molekularvernetzung des Hydrogels beeinflusst werden.

Andererseits zeigt ein Gemisch aus PAA und PEGDA in Wasser einen starken Viskositätsanstieg und die Lösung zeigt ein scherverdünnendes Verhalten, das für das hydrodynamische Jetting notwendig ist (Abbildung 45 oben links).^{[188][189]} Um ein Jetting-Fenster zu definieren, wurde die Nullscherviskosität durch Variation des PAA-, PEGDA- und Wassergehalts der Jetting-Tinte bestimmt (Abbildung 45 unten rechts). Die Ergebnisse zeigen einen linearen Anstieg der Nullscherviskosität durch Erhöhung der PAA-Konzentration.

Abbildung 45 oben rechts zeigt den Einfluss der PAA Konzentration auf das Scherverhalten bei gleichbleibendem PEGDA zu Wasser Verhältnis. Alle drei Lösungen zeigen scherverdünzendes Verhalten, während mit steigender Polymerkonzentration mehr Schubspannung notwendig war zum Erreichen der selben Schergeschwindigkeit. Selbes Phänomen ist bei Erhöhung des PEGDA Gehaltes der Lösung zu erkennen, wenn die PAA Konzentration gleichbleibt (Abbildung 45 unten links). Dieser Effekt ist aber nicht ganz so stark ausgeprägt, da es sich bei PEGDA im Vergleich zu PAA bereits um eine Flüssigkeit handelt. Für einen stabilen Jettingprozess waren PAA-Konzentrationen von mehr als 7 % (w/v) erforderlich und ein Wassergehalt von höchstens 30 % (v/v) war ideal.

Die besten experimentellen Jetting-Ergebnisse wurden mit einer PAA-Konzentration von 7,5 % (w/v) und einem PEGDA-Wasser-Gehalt von 80:20 % (v/v) erzielt. Diese Kombination wird für die folgenden Experimente verwendet werden, sofern nicht anders angegeben und wird im Weiteren als Hydrogel-Tinte bezeichnet.

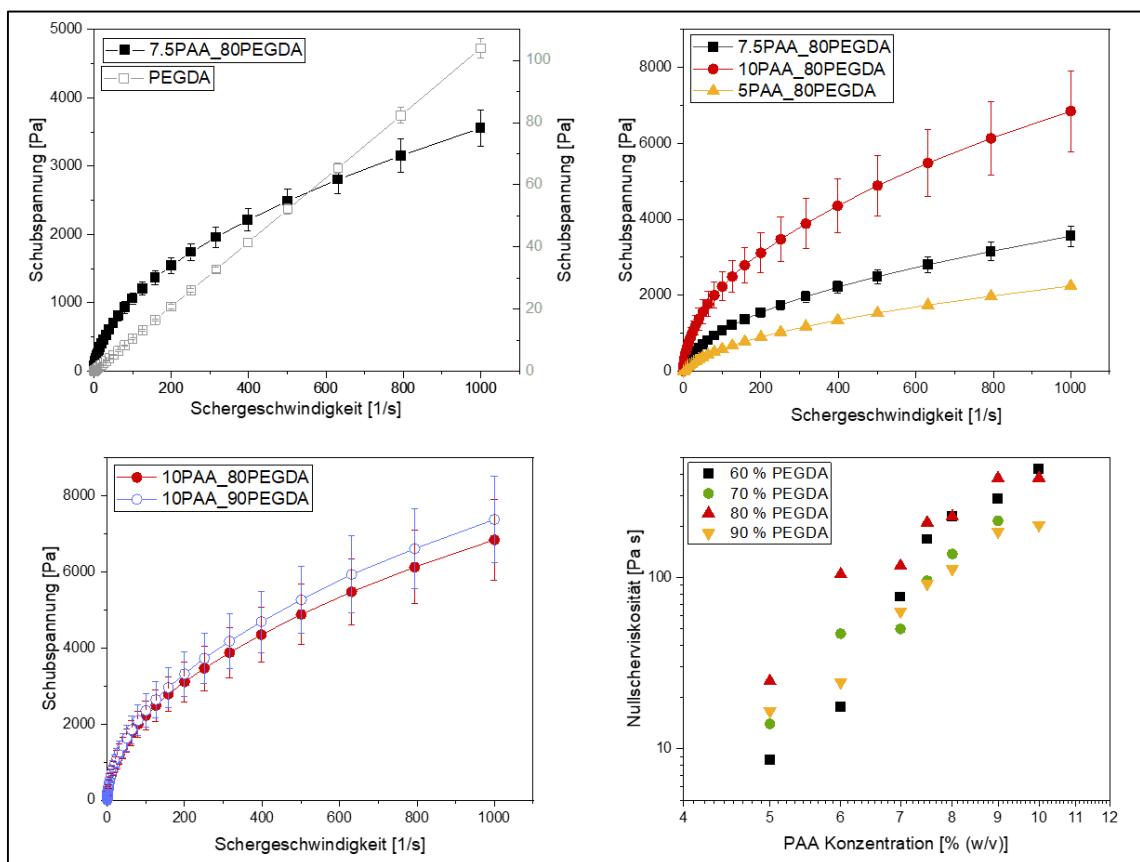


Abbildung 45 Rheologiemessungen von reinem PEGDA und PEGDA gemischt mit PAA. Oben links: Durch die Zugabe von PAA verschiebt sich das Newtonsche Verhalten von PEGDA zu einem scherverdünndenden Verhalten und die Viskosität steigt an, so dass es sich zum Jetten eignet; oben rechts und unten links: Einfluss der Konzentration von PEGDA und PAA auf das rheologische Verhalten der Jet-Lösungen; unten rechts: die Daten der Null-Scher-Viskosität für verschiedene PAA-, PEGDA- und Wasser-Verhältnisse.

7.1.2 Makromolekulare Struktur der Biotinte

Nach erfolgtem Jet-Vorgang wurde die Hydrogeltinte mittels UV-Licht auf molekularer Ebene quervernetzt. Eine sauerstoffarme Schutzatmosphäre war notwendig, um Nebenreaktionen wie das

Abbrechen der Radikalkettenreaktion, die zur Quervernetzung der PEGDA-Moleküle führt, zu unterbinden. Als Schutzatmosphäre wurde Stickstoff gewählt. Dazu wurde eine Reaktionskammer zum leichten Probeneintrag und integriertem Wasserbad zur Befeuchtung des Stickstoffstroms entwickelt. Die Eignung einer Tinte für ein elektrohydrodynamisches Jetting-Verfahren hängt von der effektiven makromolekularen Verschränkung ab. Dies führt zu relativ hohen Gewichtsanteilen des Polymers im Vergleich zu anderen Hydrogel-Druckverfahren und kann zu einer unerwünschten Aggregation von PEGDA führen. Um die Bildung von PEGDA-Aggregaten während der Radikalpolymerisation zu bewerten, wurden Polymerlösungen mit und ohne PAA mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. SAXS-Messungen ermöglichen eine zerstörungsfreie Analyse der Gelstruktur in einem Größenbereich zwischen 1 und 130 nm. Um den Einfluss von PEGDA auf die interne Strukturveränderung der Hydrogel-Tinte während der UV-Härtung zu charakterisieren, wurden einige Mischungen, die die spezifischen Komponenten der Tinte repräsentieren, analysiert. Die Streuungsdaten von PEGDA vor und nach der UV-Härtung sind in Abbildung 46 links dargestellt. Nach der UV-Härtung zeigt PEGDA eine signifikante Streuung bei größeren Streuvektoren ($q=0,03\ldots0,1\text{ \AA}^{-1}$), was auf eine Clustergröße von etwa 6 nm Durchmesser hindeutet, sowie eine höhere Größenordnung der Cluster bei niedrigeren Streuvektoren ($q < 0,03\text{ \AA}^{-1}$). Die Auswertung der Streudaten nach Hintergrundkorrektur für PEGDA, PEGDA mit Wasser und die Hydrogeltinte ist in Abbildung 46 rechts dargestellt. Die Clustergröße von PEGDA und seine Form ist zu groß, um aufgelöst zu werden. Die fraktale Dimension der Oberfläche D_{sf} weist jedoch auf eine glatte Clusteroberfläche hin ($D_{sf} = 2,42$). Nach der Zugabe von Wasser zu der Stammlösung verschwanden beide Streuungsbereiche. In Anwesenheit von PAA wurde eine Streuung bei niedrigeren Streuvektoren ($q < 0,03\text{ \AA}^{-1}$) festgestellt. Ähnlich wie bei der reinen PEGDA-Lösung sind Größe und Form der Cluster zu groß, um aufgelöst zu werden. Die fraktale Dimension der Oberfläche D_{sf} weist jedoch auf eine glattere Clusteroberfläche ($D_{sf} = 2,38$) im Vergleich zu reinem PEGDA hin. Da PEGDA in Gegenwart von Wasser keine Streuung zeigt kann angenommen werden, dass diese Streuung von den zugesetzten PAA-Moleküle erzeugt wird. Somit wird die Hydrogelstruktur hauptsächlich von PAA beeinflusst und nicht von PEGDA.

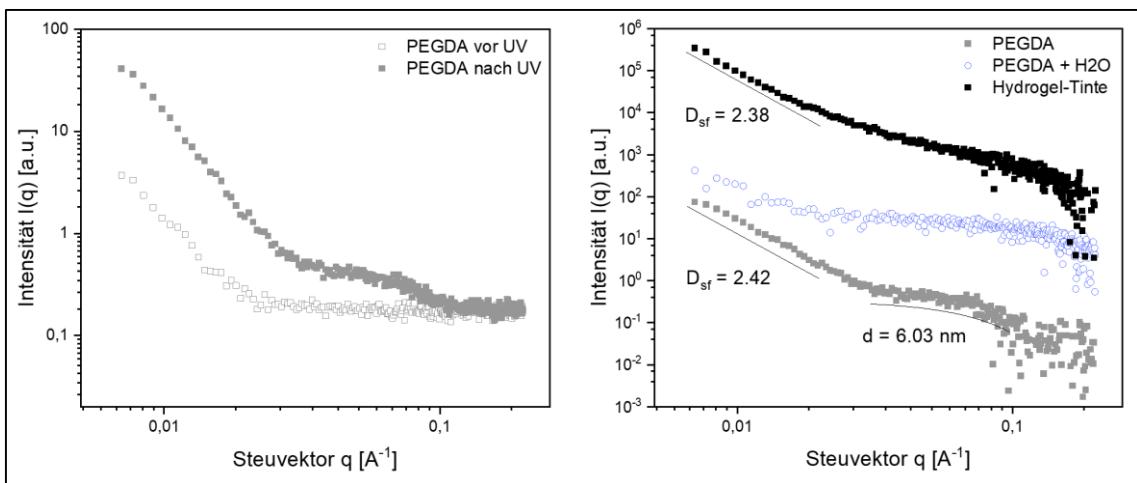


Abbildung 46 SAXS Messungen zeigten den Einfluss von PAA und PEGDA auf die makromolekulare Struktur der Hydrogele; links: Streudaten von PEGDA vor und nach der UV-Härtung; rechts: Streudaten und Auswertung nach der Hintergrundkorrektur für PEGDA, PEGDA mit Wasser und die Hydrogel-Tinte.

7.2 Einstellbare dreidimensionale Gerüstarchitekturen im Mikrometermaßstab

7.2.1 Mikrostrukturierte Hydrogelscaffolds

Nach erfolgtem molekularen Quervernetzen zeigen die Gerüststrukturen unter dem Elektronenmikroskop eine gleichmäßige glatte Oberfläche (Abbildung 47). Ausgehärtete Fasern können mittels Skalpell gut abgeschnitten werden. Ein so erzeugter Schnitt durch die Faser eines zweilagigen Scaffolds zeigt ein homogenes Material ohne einzelne Schichten (Abbildung 47 rechts). Die aufeinander gefertigten Lagen verbinden sich nahtlos während des Aushärtens. Die Höhe einer solchen 2-lagigen Faser liegt im Schnitt bei 24,52 μm .

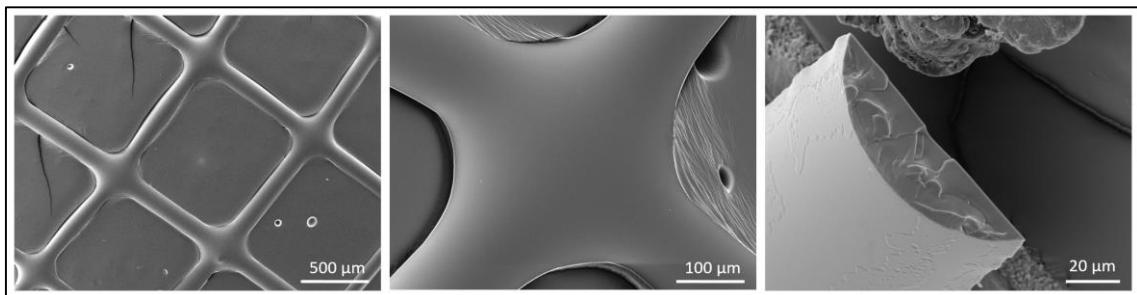


Abbildung 47 REM-Aufnahmen von Gerüststrukturen aus Hydrogel, die durch 3D-jet Writing hergestellt wurden, zeigen eine glatte gleichmäßige Oberfläche (links und mittige) sowie einen nahtlosen Querschnitt.

Die Architektur der trockenen Gerüste nach der Vernetzung zeigt eine regelmäßige Mikrostruktur über eine große Kollektorfläche, wie in Abbildung 48 unten links dargestellt. Die einzelnen Stränge sind linear ausgerichtet und kreuzen sich im rechten Winkel mit $89,77 \pm 0,13^\circ$ an den Verbindungsstellen. Die Strangbreite ist 6,5-mal dünner als beim Extrusionsdruck mit vergleichbaren Parametern. Die höchste

erreichbare Auflösung mittels 3D-jet Writing beträgt $120 \mu\text{m}$, gemessen an der Mittellinie zweier paralleler Stränge (Abbildung 48 unten rechts). Dies erklärt auch, warum es nicht möglich war in Gegenwart von Sauerstoff die mikrometerdünnen Strukturen mit diesem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu härten. Die UV Härtung musste demnach unter inerten atmosphärischen Bedingungen durchgeführt werden, um die Gerüste zu verfestigen. Nach dem Abschneiden der überflüssigen Gerüstbeine löste sich das Gerüst bei Zugabe eines Wassertropfens vom Sammelglasobjektträger ab und bildete eine stabile, freistehende 3D-Struktur. Dieser Vorgang wird im Folgenden als Ablösen bezeichnet. Die erstandenen dreidimensionalen Scaffolds waren sehr robust und konnten problemlos im trockenen als auch im nassen Zustand mit Pinzetten gehandhabt werden.

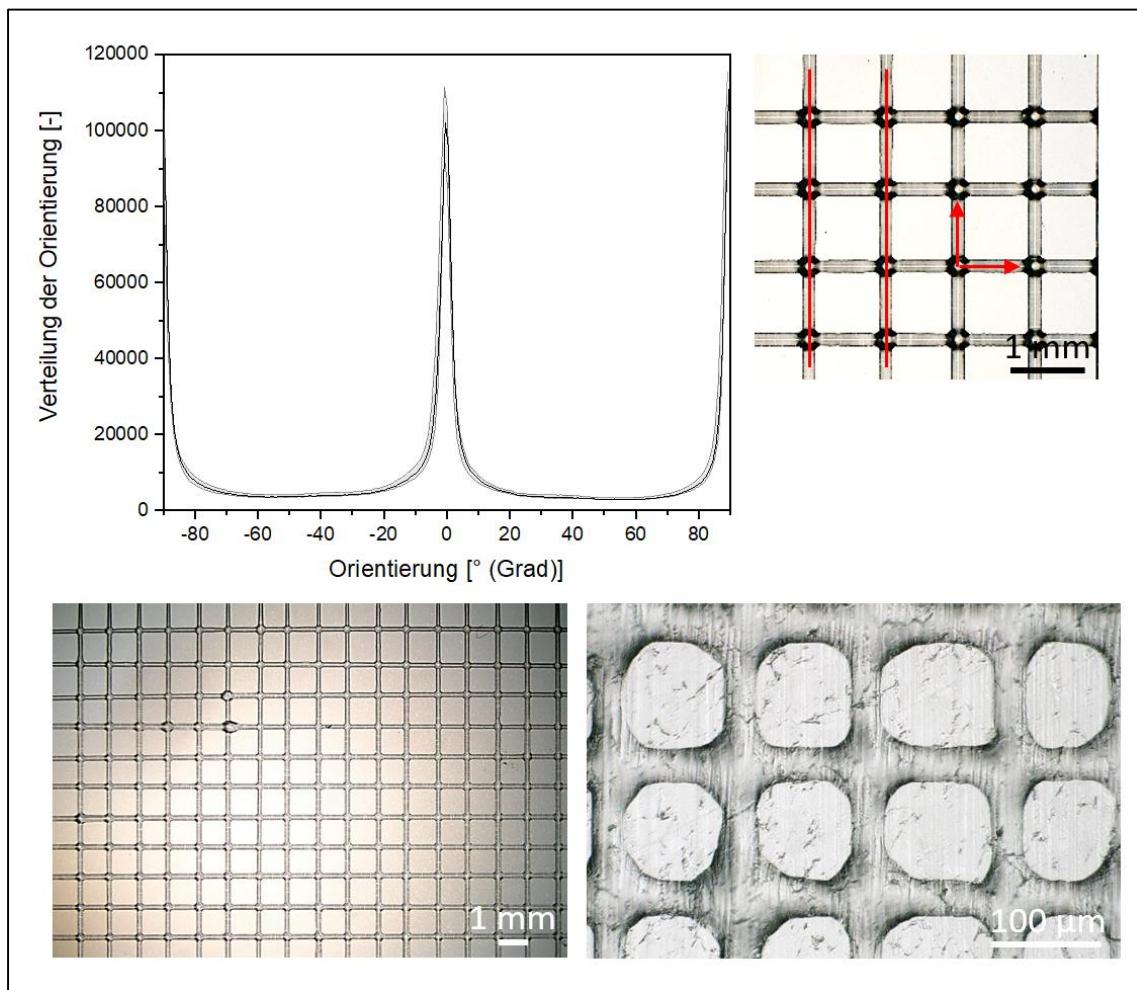


Abbildung 48 Mittels 3D-jet Writing ist eine hohe Präzision bei der Faserorientierung möglich (oben und unten links) sowie eine hochauflösende Platzierung (unten rechts) der Hydrogeltinte.

Durch Hinzufügen weiterer Schichten während des Jet-Vorgangs kann die Höhe der Struktur angepasst werden. Abbildung 49 zeigt die zunehmende Höhe der Gerüststränge in Abhängigkeit von der Anzahl der gejetteten Schichten. Bei einem zweischichtigen Gerüst ergibt sich beispielsweise eine Höhe von $24,5 \pm 2,1 \mu\text{m}$, bei einem viersechichtigen von $41,0 \pm 5,3 \mu\text{m}$ und bei sechs Schichten von $57,1 \pm 5,6 \mu\text{m}$. Die Höhe der Knotenpunkte, an denen sich zwei der Stränge kreuzen, nahm beim Stapeln der Stränge ebenfalls zu und war doppelt so hoch wie bei den entsprechenden Einzelsträngen. Allerdings nahm die

Breite der Stränge aufgrund des hohen Flüssigkeitsgehalts von PEGDA und Wasser in der Hydrogel-Tinte zu. Die Tinte kann auf der Kollektorplatte leicht zerfließen, aber aufgrund der scherverdünnenden Eigenschaft der Polymerlösung ist es dennoch möglich, bis zu zehn Schichten in die Höhe zu stapeln. Der Querschnitt des Strangs ergibt ein Kreissegment mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ für zwei Schichten, $7,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ für vier Schichten und $13,8 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ für sechs Schichten. Der Größenvergleich ist in Abbildung 49 oben links schematisch dargestellt und stimmt mit der effizienten Form von Letikats überein^[190].

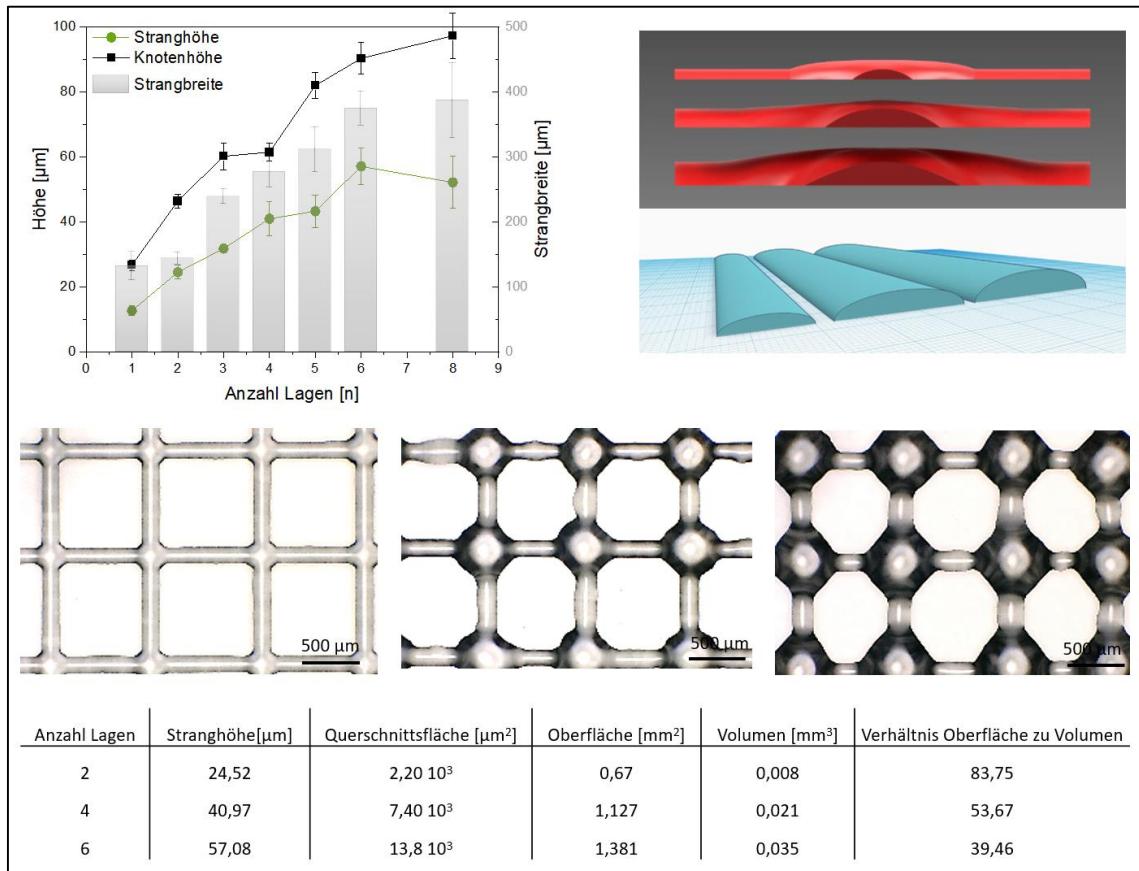


Abbildung 49 Dreidimensionale Mikroarchitektur der Hydrogelgerüste. Oben links und unten: Höhenangabe der Stränge und Knoten sowie der Strangbreite; oben rechts: schematischer Größenvergleich für Gerüste mit Querschnitten von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, $7,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ und $13,8 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$; mittig: mikroskopische Aufnahmen von 1-, 3- und 5-lagigen Gerüsten.

7.2.2 Quellverhalten der Gerüststrukturen

Um die notwendige wässrige Umgebung für eingeschlossene Enzyme oder Zellen zu gewährleisten und die Zugänglichkeit kleiner Substratmoleküle sicherzustellen, ist die Wasseraufnahmekapazität der Hydrogele ein kritischer Faktor. Die Nass- und Trockenmasse von Gerüsten mit Querschnittsflächen von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ und $7,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ sind in Abbildung 50 links dargestellt. Die Massen sind über mindestens 5 Zyklen des Quellens und Trocknens reproduzierbar. Unabhängig von der Architektur und der Polymerzusammensetzung können die Gerüste etwa das Dreifache ihres eigenen Trockengewichts an Wasser aufnehmen (Abbildung 50 rechts). Nur Gerüste mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ und einer niedrigen PAA-Konzentration weisen einen höheren Wasseraufnahmefaktor von 5,6 auf. Bestimmt man die Architektur eines gequollenen Einzelstrangs, so ist eine minimale anisotrope Quellung durch eine

Zunahme der Höhe um 9 % festzustellen, während die Breite nur um 4 % zunimmt. Die Gesamtzunahme der Querschnittsfläche beträgt somit $15\% \pm 3$. Daraus kann geschlossen werden, dass das entwickelte Hydrogelgerüst seine stabile 3D-Porenstruktur in Abwesenheit von Wasser beibehält und aufgrund der hydrophilen Materialien zusätzlich Wasser in den interstitiellen Bereich eindringen lässt.

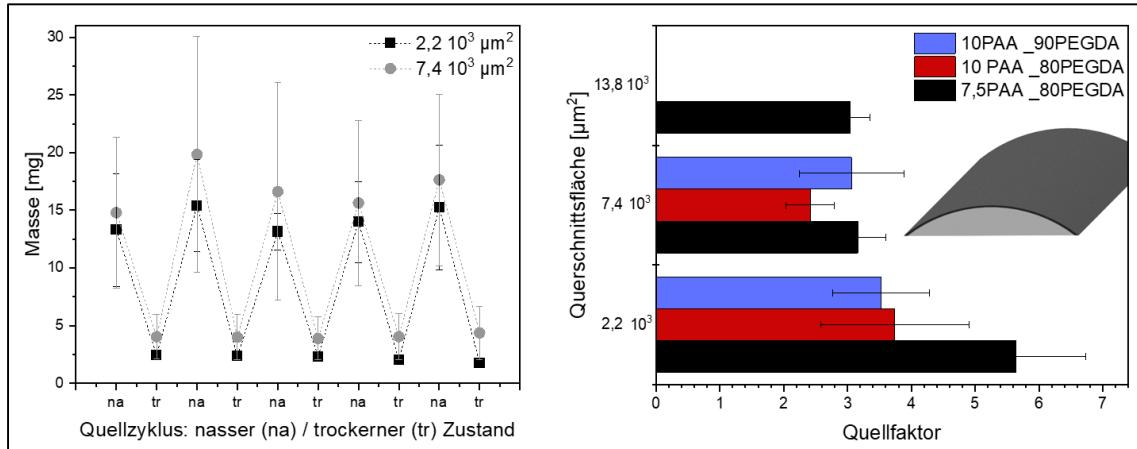


Abbildung 50 Wasseradsorptionskapazität für Hydrogelgerüste, um eine attraktive Umgebung für biologisch aktive Materialien zu schaffen. Links: Massen von trockenen und gequollenen Gerüsten über mehrere Quellzyklen; rechts: Quellverhältnis für verschiedene Polymerverhältnisse und Faserarchitekturen sowie der schematische Größenvergleich eines trockenen Strangs (hellgrau) mit dem gequollenen Strang (dunkelgrau). Die Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ nimmt nur um 15 % zu.

7.3 3D-jet Writing von biologisch aktiven Enzymen

7.3.1 Enzymaktivitäten im Batch-Ansatz

Um die Aktivität des eingeschlossenen aktiven Materials zu bestimmen, wurde β -Galaktosidase als Modellenzym verwendet. Es wurde direkt in die Hydrogel-Tinte gemischt und das anschließende 3D-jet Writing durchgeführt. Die katalytische Aktivität des enzymatischen Gerüsts wurde durch die Umwandlung des Reaktanten O-Nitrophenyl- β -d-galactopyranosid (oNPG) getestet, der zu ortho-Nitrophenol (oNP) und Galaktose hydrolysiert wird. Das dabei entstehende gelbe Produkt oNP konnte anschließend durch Spektroskopie quantitativ nachgewiesen werden.

Um zu beweisen, dass die entwickelte Hydrogel-Tinte mit Enzymen kompatibel ist, wurde β -Galaktosidase in die Polymerlösung gemischt und die Aktivität nach einstündigem Rühren der Tinte getestet. Dies wurde mit der gleichen Menge an freiem Enzym sowie mit der wieder aufgelösten Tinte nach Durchführung des Jet-Prozesses verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 oben links dargestellt. Es ist kein Aktivitätsverlust zu erkennen. Dadurch kann eine Toxizität der Tinte für die Enzyme oder ein Einfluss der angelegten Hochspannung während des Jet-Vorgangs auf die Enzymaktivität ausgeschlossen werden.

Pro Batch-Ansatz wurde je ein enzymbeladenes Scaffold nach dem Aushärten mittels UV auf seine Aktivität hin untersucht. Wie in Abbildung 51 oben rechts zu sehen ist, steigt die Produktkonzentration um die Enzym-Scaffolds mit der Zeit an. Dies zeigt, dass die Enzyme im Inneren des Trägermaterials noch aktiv sind. Die Zunahme der Querschnittsfläche der Gerüste steht in direktem Zusammenhang mit der Produktbildung. Dies kann auf den erhöhten Gehalt an einzelnen Enzymen pro Charge zurückgeführt

werden. Je mehr Scaffold-Material auf Grund der unterschiedlichen Strangdicke im Batch-Ansatz vorhanden ist, desto mehr Enzym befand sich im Ansatz. Die normierte Enzymaktivität steigt jedoch mit abnehmender Querschnittsfläche des Gerüsts (Abbildung 51 unten links). Dies verläuft parallel zum Anstieg des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und wirft die Frage auf, ob der Reaktant für das gesamte immobilisierte Enzym zugänglich ist oder nur für die Enzyme an der Oberfläche der Hydrogelstruktur. Daher wurden Gerüste mit unterschiedlichen Tintenformulierungen, aber gleicher Größe und Architektur, hinsichtlich ihrer Aktivität miteinander verglichen (Abbildung 51 unten rechts). Die Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Aktivität bei abnehmender Polymerkonzentration. Die Aktivität wird also von der Architektur und der Materialzusammensetzung des Gerüsts beeinflusst. Weder die Tinte noch das 3D-jet Writing hatten jedoch einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität. Um die Zugänglichkeit des Substrates zu den Enzymen im inneren der Scaffolds genauer beurteilen zu können, wurde die Diffusion unter Berücksichtigung der Enzymkinetik weiter untersucht.

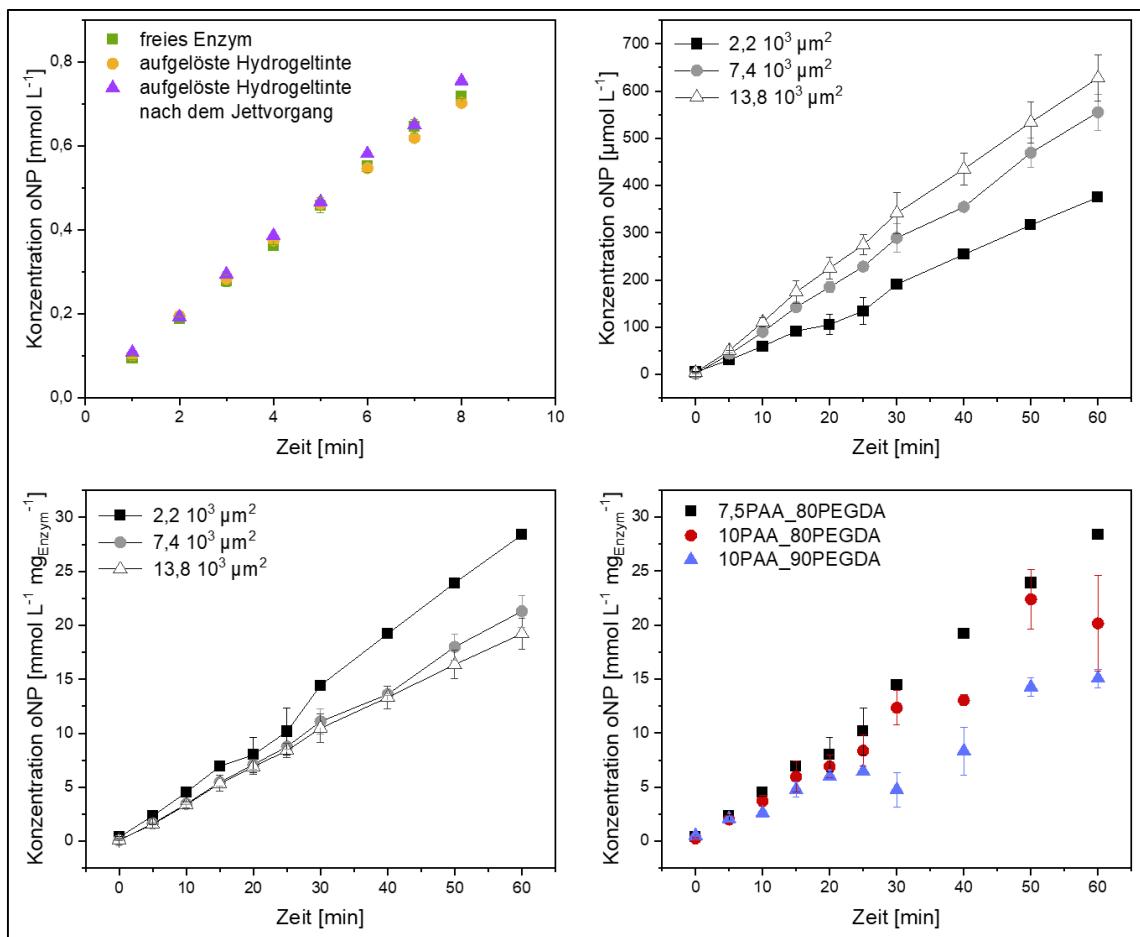


Abbildung 51 Aktivitätsmessungen für eingeschlossene β -Galaktosidase in den Hydrogelgerüsten. Oben links: die Enzymaktivität bleibt unter den Bedingungen des 3D-jet Writings vollständig erhalten. Oben rechts: oNP-Produktion verschiedener Gerüstarchitekturen im direkten Vergleich und (unten links) normiert auf die verwendete Enzymmenge. Unten rechts: oNP-Konzentrationen für verschiedene Polymerverhältnisse des Gerüstmaterials bei gleicher Architektur.

7.3.2 Transportkapazität der Reaktanten

Eine Elementarzelle mit verschiedenen Gerüstarchitekturen wurde mit Hilfe eines computergestützten Entwurfs originalgetreu digital nachgebildet und die Diffusion anschließend simuliert (Abbildung 52). Die Parameter wurden daher durch Vergleich der Aktivität von enzymbeladenen Gerüsten mit der von freien Enzymen in Lösung ermittelt, was dabei zu einem Katalysatorwirkungsgrad von $21,2 \pm 4\%$ und einem Diffusionskoeffizienten von $2,2 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ führte. Der Diffusionskoeffizient und der Thiele-Modul von etwa 5 sind im Vergleich zu anderen PEGDA-Hydrogelen aufgrund des hochmolekularen PAA-Gehalts und der fehlenden Volumenzunahme durch Quellung niedriger.^{[136][191][192]}

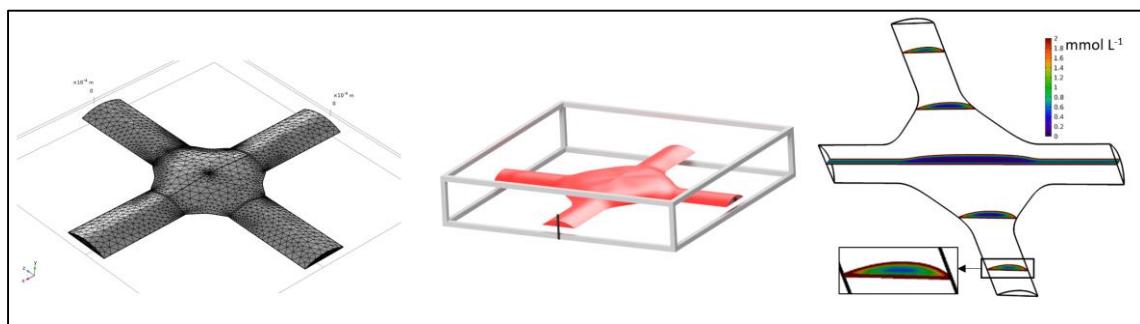


Abbildung 52 Digital nachgebildete Elementarzelle der Hydrogel-Scaffolds zur Simulation der Diffusion.

Die simulierte Diffusion von oNPG in ein Gerüst mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ ist in Abbildung 53 oben links dargestellt. Das Reaktionsmittel oNPG diffundiert mit der Zeit in das Gerüst. Gleichzeitig wird es von den Enzymen in oNP umgewandelt, so dass sich die Konzentration nach einer Stunde einpendelt. Das entstandene Produkt oNP unterliegt im Gegensatz zum Reaktanden keiner weiteren enzymatischen Umwandlung und kann weiter in das Gerüst diffundieren (Abbildung 53 oben und mittig rechts). Hier wird der stationäre Zustand durch das Konzentrationsgleichgewicht zum umgebenden Medium erreicht. Dabei kommt es zu Produktverlusten im Gerüst, die aber aufgrund des relativ geringen Volumens des Gerüsts im Vergleich zum umgebenden Medium experimentell vernachlässigbar sind.

Betrachtet man verschiedene Strangarchitekturen, so nimmt die oNP-Konzentration in der Mitte des Stranges mit zunehmender Querschnittsfläche ab (Abbildung 53 mittig und unten links), was auf den längeren Diffusionsweg zurückzuführen ist. Es fällt auf, dass Gerüste mit Querschnittsflächen von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ eine deutlich höhere Reaktanten- und Produktkonzentration im Inneren des Stranges aufweisen als Gerüste mit $7,4 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ und $13,8 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 53 unten). Dies ist auf die entsprechenden Oberflächen-Volumen-Verhältnisse zurückzuführen und passt zu den zuvor erörterten experimentellen Aktivitätsdaten.

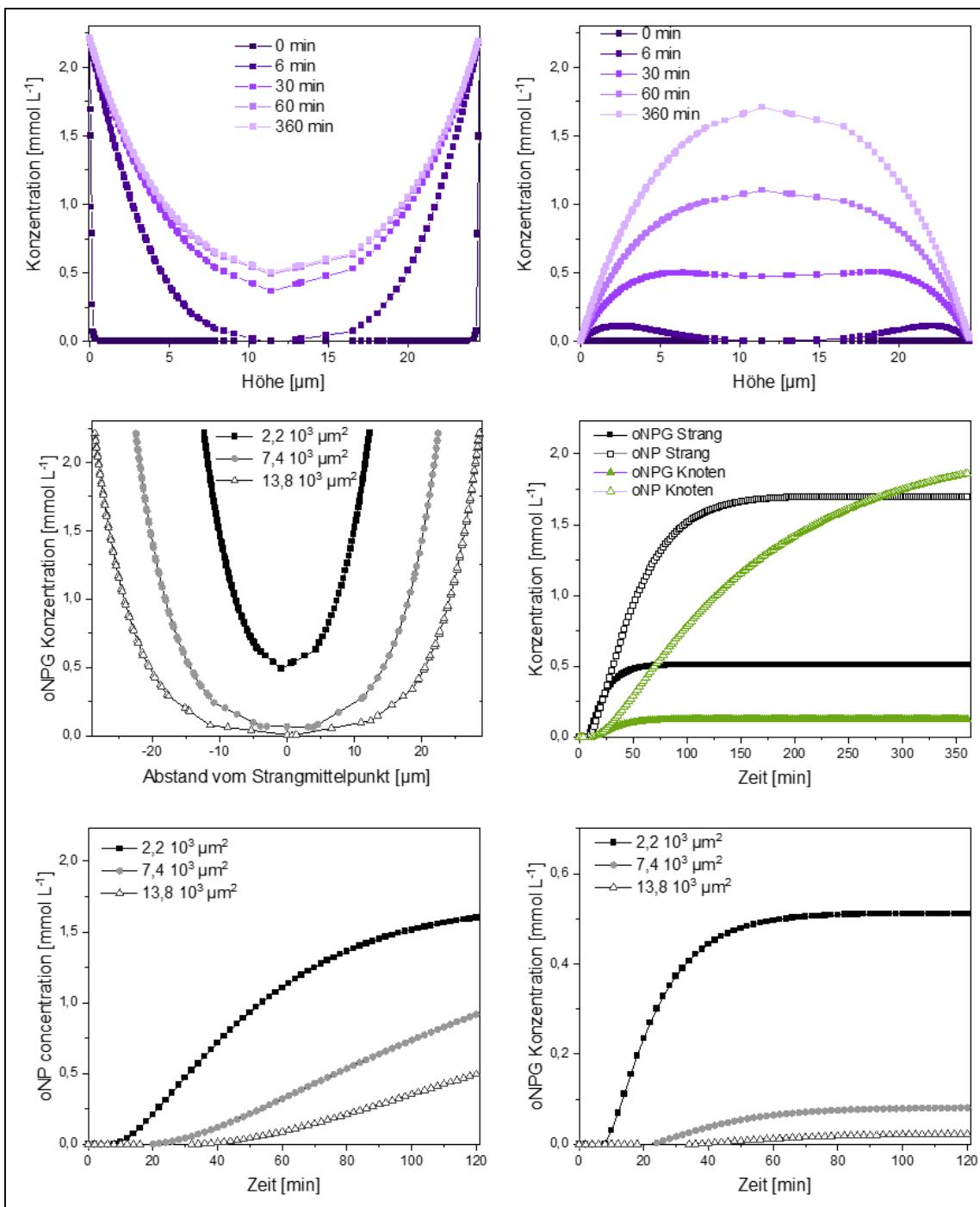


Abbildung 53 Die Simulation der Diffusion des Substrats oNPG und des Produktes oNP veranschaulicht die Verteilung von Reaktant und Produkt innerhalb des Hydrogel-Gerüsts. Zeitabhängige oNPG- (oben links) und oNP-Konzentration (oben rechts) über die Stranghöhe, dargestellt für ein Gerüst mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$; mittig links: Vergleich der oNPG-Konzentration für verschiedene Gerüstarchitekturen nach Erreichen des Fließgleichgewichts. Das Gerüst mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ wies durchgängig die höchste Reaktantenkonzentration auf. Mittig rechts: Zeitabhängige Konzentrationen in der Mitte des Strangs und des Knotens für ein Gerüst mit einer Querschnittsfläche von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$; unten: Der Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Reaktanten und Produkte in der Mitte des Strangs für Gerüste mit unterschiedlichen Architekturen zeigt eine deutlich höhere oNP- und oNPG-Konzentration, je kleiner die Querschnittsfläche des Strangs ist

Alle bisherigen Berechnungen beruhen auf der Annahme, dass das Enzym noch vollständig vorhanden ist und in der Lösung nicht ausgewaschen wird. Um dies zu beweisen, wurde die Menge des Proteins in der Wasch- und Lagerlösung bestimmt. Wie aus Abbildung 54 hervorgeht, liegt die Proteinkonzentration in der Wasch- und Lagerlösung bei allen getesteten Gerüsten um die Nachweisgrenze. Der einzige nachweisbare Proteinverlust tritt während des Ablöseschrittes auf, der direkt auf dem Glasträger nach dem Abschneiden der Überstände stattfindet. Hier ist der Enzymverlust umso höher, je größer der Schnittquerschnitt ist. Bei der verwendeten Menge ist dies jedoch unbedeutend und es wird kein weiteres Enzym durch einen zusätzlichen Waschschritt oder durch anschließende Lagerung ausgewaschen.

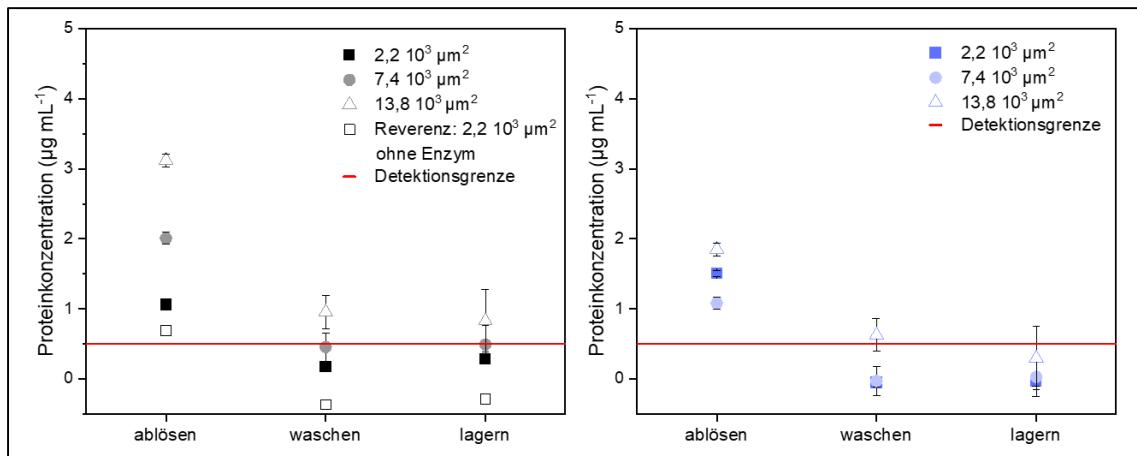


Abbildung 54 Die stabile Immobilisierung von Enzymen in elektrohydrodynamischen Hydrogelgerüsten wird durch den Auswaschtest durch Bestimmung der Enzymkonzentration im Überstand nach dem Waschen und Lagern der Gerüste aus 7,5PAA_80PEGDA (links) und 10PAA_90PEGDA (rechts) bestätigt. Nach dem Ablösen vom Objektträger kann kein signifikanter Enzymverlust festgestellt werden.

Nimmt man Substratzugänglichkeit, Materialeigenschaften, Wasseradsorptionsvermögen, Stabilität und Architektur zusammen, so zeigten elektrohydrodynamisch gejetzte Scaffolds mit Querschnittsflächen von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, bestehend aus 7,5 % PAA und einem PEGDA-Gehalt von 80 %, die höchste Aktivität. Um die langfristige Stabilität und Aktivität der eingeschlossenen Enzyme zu testen, wurden 14 diese Gerüste in einen Reaktor mit kontinuierlichem oNPG-Zufluss eingebracht. Bei einem Gesamtrockengewicht von 76,9 mg und einer Beladung von $1,9831 \text{ mg}_{\text{Enzym}} \text{ g}_{\text{Trockenmasse}}^{-1}$ entspricht dies einer eingesetzten Enzymmasse von 152,50 µg β -Galactosidase im Reaktor. Die Konzentration des umgewandelten Produkts im Auslass wurde bestimmt und ist in Abbildung 55 dargestellt. Nach sechs Stunden war die oNP-Konzentration bis zum Ende des Experiments mit etwa 7 mmol L^{-1} pro mg Enzym stabil, was einem Umsatz von 50 % entspricht. Dies ist etwa doppelt so hoch wie bei vergleichbaren Experimenten mit 3D-gedruckten Scaffolds^[137]. Die Schwankungen der aufgezeichneten Ergebnisse sind auf das Bleichen der Produktlösung während der Nachtstunden zurückzuführen. Am Ende der Experimente mit einer Dauer von 76 Stunden waren alle Gerüste noch intakt und ohne erkennbare Schäden. Somit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der Immobilisierung von β -Galactosidase in einem elektrohydrodynamisch hergestelltem Hydrogel eine über mehrere Tage stabile, kontinuierliche Enzymreaktion realisierbar ist. Durch eine Verringerung der Durchflussrate oder der Reaktantenkonzertierung kann die Effizienz des Reaktors weiter verbessert werden.

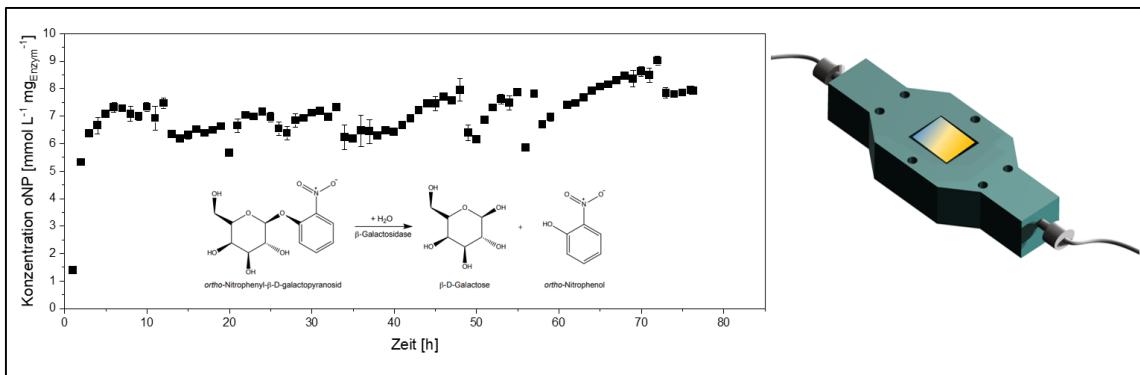


Abbildung 55 Produktkonzentrationsdaten eines Durchflussreaktors mit enzymbeladenen Hydrogel-Gerüsten. Ein stabiler Umsatz von bis zu 50 % über 76 Stunden wurde erreicht, ohne dass es zu einem Verlust an Enzymaktivität oder einer Beschädigung der Scaffolds kam.

7.4 3D-jet Writing von biologisch aktiven Zellen

In weiteren Untersuchungen soll das Spektrum der biologischen Substrate erweitert werden, um die Eignung der Hydrogelgerüste für Anwendungen in der Diagnostik oder für die Gewebereproduktion zu prüfen. Aufgrund der verwendeten biokompatiblen Materialien und der guten Penetration kleiner Moleküle in das Innere der Gerüststränge soll experimentell untersucht werden, ob es ebenfalls möglich ist, lebende Zellen einzuschließen und zu kultivieren. Dazu wurden *E.coli* BW3110 pJOE 4056.2 über Nacht in LB Medium kultiviert. Der Wasseranteil der Hydrogel-Tinte wurde durch die Zellsuspension ersetzt. Die Tinte wurde mittels 3D-jet Writing zu Gerüststrukturen elektrogejettet und unter UV ausgehärtet. Anschließend wurde das Scaffold direkt in ein Kulturmedium mit Rhamnose überführt und weiterkultiviert (Abbildung 56 oben). In Abbildung 56 mittig sind Floureszenzaufnahmen der Scaffolds gezeigt. In grün sind die *E.coli* Zellen sichtbar. Der verwendete Stamm produziert auf Grund seines Plasmides eGFP bei einer hohen cAMP-Konzentration und in Anwesenheit von Rhamnose. Die vorhandene grün fluoreszierende eGFP zeigt daher, dass die Zellen den Jet-Vorgang und das Aushärten mittels UV überlebt haben und einen aktiven Stoffwechsel besitzen. Die Batterien waren vor allem an den dünn zulaufenden Rändern der Fasern ersichtlich.

Da Bakterien im Vergleich zu Säugetierzellen sehr robust erscheinen, soll im Folgenden überprüft werden, ob das oben gezeigte Bioprinting mittels 3D-jet Writing auch auf Fibroblasten übertragen werden kann. Die vorkultivierten Mauszellen L929 wurden geerntet und in die Hydrogel-Tinte überführt. Nach erfolgtem Jet-Vorgang und molekularer Quervernetzung wurden die Scaffolds mittels Kulturmedium vom Kollektor abgelöst, gewaschen und in eine 6-well Platte überführt. Die Hydrogelgerüste mit Fibroblasten sind in Abbildung 56 unten dargestellt, wobei lebende Zellen in Grün und tote Zellen in Rot angefärbt sind. Die Aufnahmen entstanden nach Inkubationszeiten von einer Stunde (links), zwei Tagen (mittig) und sieben Tagen (rechts). In allen Aufnahmen sind grün floureszierende und damit Lebende Zellen ersichtlich. Die Zellen überlebten in der Hydrogel-Tinte sowohl die Hochspannung während des Elektrojettrags als auch die anschließende Bestrahlung mit UV. Auch die Anwesenheit von Irgacure, welches eine toxische Wirkung auf Zellen hat, scheint vernachlässigbar zu sein. Nach 7 Tagen waren noch lebende Zellen in den Hydrogelscaffolds ersichtlich, dadurch scheint eine ausreichende Nährstoffversorgung durch Diffusion in die einzelnen Stränge der Gerüststrukturen gegeben zu sein. Die Fibroblasten waren innerhalb des

Hydrogels immobilisiert, da außerhalb der Gerüststrukturen oder im umgebenden Medium keine Zellen zu finden waren.

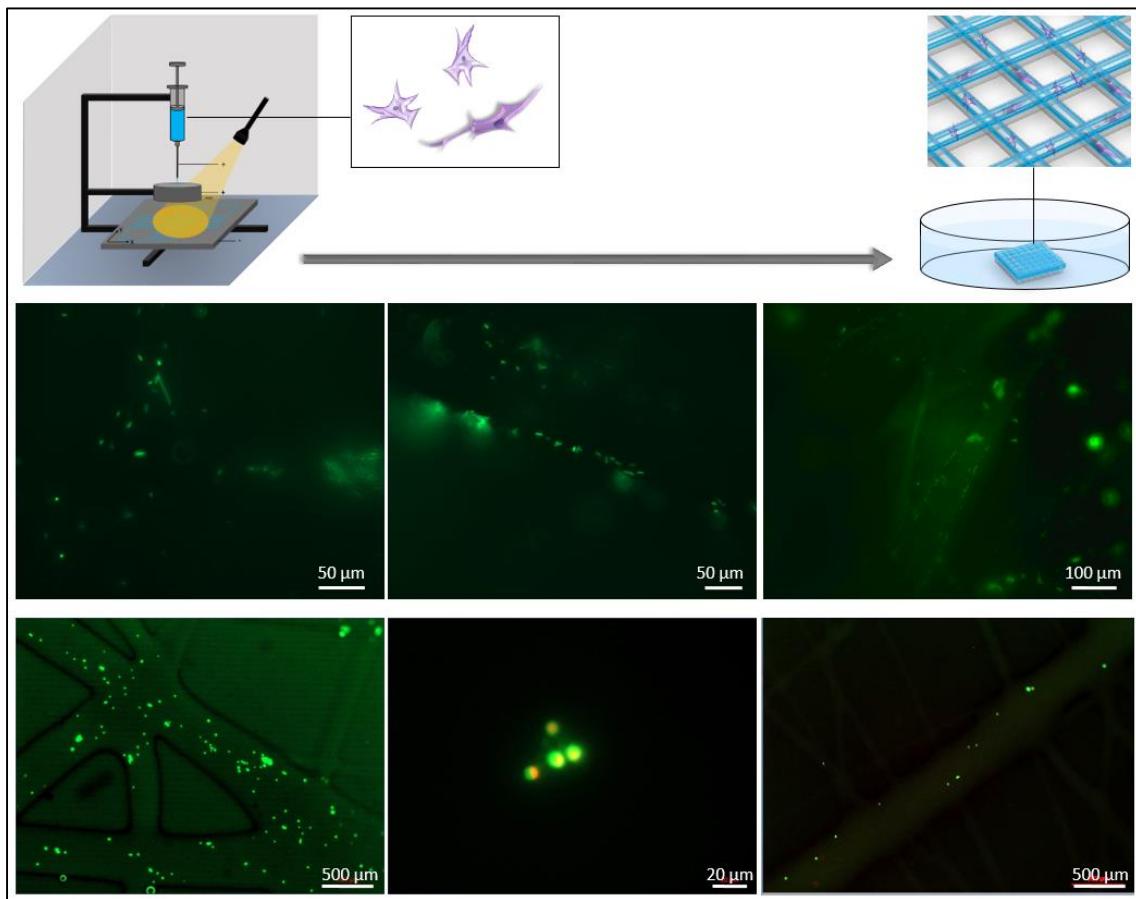


Abbildung 56 Bioprinting mittels 3D-jet Writing von lebenden Zellen. Die Zellen wurden in die Hydrogeltinte gemischt und die elektrogejetteten Gerüststrukturen anschließend kultiviert wie oben schematisch dargestellt. Die Aufnahmen mittig zeigen, dass E.coli Bakterien im Hydrogel grün fluoreszierendes eGMP produzieren. Auch Fibroblasten von Mäusen überleben die Herstellung von dreidimensionalen Gerüststrukturen mittel Hochspannung (unten links). Die immobilisierten Zellen sind auch nach einer Kultur der Hydrogelstrukturen von zwei Tagen (unten mittig) und sieben Tagen (unten rechts) noch am Leben (grün).

7.5 Potenzial der mehrdimensionalen aktiven Materialsysteme für multidimensionale Zellsysteme

Das 3D-jet Writing bietet die Möglichkeit, mit einer wasserbasierten Jet-Tinte präzise Muster aus mikroskopisch kleinen Polymerfasern zu erzeugen. Die Fasern wurden in freistehenden Gerüsten mit reproduzierbarer Architektur und einstellbaren Porengrößen ausgerichtet. Enzyme, Bakterien und Säugetierzellen konnten direkt in dreidimensionale Strukturen gedruckt werden und überlebten die angelegte Hochspannung als auch die anschließende Polymerisation von PEGDA. Die immobilisierten Biomaterialien waren nicht nur viable, sondern zeigten auch eine sehr gute biologische Aktivität. Die entwickelte Hydrogel-Tinte ermöglicht auf Grund der geringen Strangdicken eine ganz neue Dimension für das Bioprinting von biologisch aktiven Materialien.

Die aktuelle Herausforderung beim 3D Bioprinting von funktionellen Bakterien besteht aus dem Gleichgewicht zwischen der Herstellbarkeit des Materials, minimaler Beschädigung während des Druckprozesses und der Aufrechterhaltung der Stabilität der zellulären Aktivität und Funktion. Durch die Gestaltung spezieller Gitterstrukturen konnte der Stoffaustausch mit der Umgebung verbessert und die Effizienz der Biotransformation weiter gesteigert werden. Darüber hinaus könnten mittels 3D-jet Writing verschiedene Zellen kombiniert werden, um eine räumlich differenzierte Kontrolle der zellulären und chemischen Zusammensetzung zu erreichen. Die gezeigte wasserbasierte Tinte ist ein multidimensionaler Ansatz um verschiedene Zellarten und Mikroorganismen innerhalb eines Materialsystems gezielt anzutragen. Die ortsspezifische Kontrolle der bakteriellen Verteilung hat sich kürzlich als interessante Technik zur Untersuchung der bakteriellen Dynamik in Biofilmen erwiesen.^[193] So wurde beispielsweise die 3D-Drucktechnologie eingesetzt, um Bakterien in verschiedenen Kompartimenten zu lokalisieren. Es könnte sich als ideale Umgebung für die Untersuchung der bakteriellen Kommunikation in Biofilmen durch Quorum-Sensing-Mechanismen erweisen.^[194] Das flexible strukturelle Design erleichtert die Anwendung zum Beispiel für den Einsatz zum Recycling oder in der Wasseraufbereitung mit Hilfe von bioaktiven Materialien.^[195]

8 Fazit und Ausblick

Die Nachbildung von biologischen Systemen als Organersatz, zur Heilung von Krankheiten oder zur Medikamentenherstellung kann viele Leben retten. Die Herausforderung ist dabei die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten aus Gerüststruktur, ECM und Zellen und deren Interaktion untereinander. In dieser Arbeit sollten neue Materialsysteme als Tinten für strukturierte 3D Druckverfahren auf Elektrojetting-basis untersucht und optimiert werden. Für jedes neue Materialsystem galt es ein passendes Herstellverfahren zu etablieren, um daraus 3D-Strukturen zu produzieren. Die gewünschten 3D-Gerüststrukturen sollten anschließend hinsichtlich ihrer Auflösung, Architektur und Formstabilität charakterisiert werden und auf ihre Eignung als maßgeschneidertes biologisches System hin untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden drei neue Materialsysteme vorgestellt. Zwei Materialsysteme, auf PAA und PEGDA/PAA Basis, setzen sich dabei aus synthetischen Hydrogelen zusammen. Das dritte Materialsystem ist das natürlich vorkommende Kollagen. Für jedes dieser Materialsysteme wurde anschließend ein Elektrojetting-Prozess so optimiert, dass orientierte Fasern, Scaffolds und dreidimensionale Netze hergestellt werden konnten. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Parametereinstellung, um eine robuste Prozessführung zu gewährleisten. So entstanden smart-actuating Polymerfasern und Scaffolds auf Wasserbasis, die für 4D-Objekte verwendet werden können. Zur Nachahmung der ECM können Kollagennetze im 3D-Mykrometerbereich genau platziert und unterschiedlich orientiert und strukturiert werden. Dadurch kann der Einfluss der ECM Architektur in Zellsystemen untersucht werden. Außerdem wurden direkt biologisch aktive 3D Strukturen mit kontrollierten und definierten Mikroporen gedruckt. Unter anderem wurden so Enzyme in filigranen Mikrostrukturen immobilisiert. Die Enzyme zeigten eine hohe Aktivität auch über einen langen Zeitraum und sind für den Einsatz für industrielle Enzymprozesse geeignet. Außerdem ist das Materialsystem für den direkten Druck von Zellen eignet und eröffnet damit eine ganz neue Dimensionsskalierung des Biodruckes.

Im Detail ist es gelungen, intelligente Fasern herzustellen, die durch elektrohydrodynamisches Co-Jetting produziert werden können. Die Fasern haben einen geringen durchschnittlichen Durchmesser von 5,2 µm und sind sowohl im trockenen Zustand als auch in wässriger Lösung stabil. Durch Stapelung der einzelnen Fasern aufeinander konnten rechteckige Gerüststrukturen mit unterschiedlichen Gittergrößen und einer maximalen Höhe von 150 µm hergestellt werden. Die PAA-Fasern rollen sich auf und bilden Mikrofedern, wenn sie Puffern ausgesetzt werden. Das Formveränderungsverhalten der Fasern ist reversibel und findet wiederholt spontan statt, wenn sie erneut dem Stimulus ausgesetzt werden. Die formgebende Bewegung ist auf das anisotrope Quellverhalten der unterschiedlichen Vernetzungsgrade der Polymerlösungen zurückzuführen. Die Mikrofedern bildeten sich in 31 s bis 217 s, wenn eine ganze Faser aufgerollt wurde. Damit ist die Formverschiebungsbewegung im Vergleich zu den in der Literatur berichteten Formverschiebungsbewegungen sehr viel schneller.^{[153][154]} Das Quellverhalten der einzelnen Kompartimente und die resultierende Aufrollbewegung ist abhängig von der verwendeten Puffersubstanz, dem pH-Wert und der Ionenstärke. Die besten experimentell ermittelten Ergebnisse zeigten sich unter Verwendung 0,1 M Kaliumphosphat bei pH 7,0 und einer Ionenstärke von 0,285 M. Unter suboptimalen Bedingungen verändern die Fasern ihre Form nicht oder rollen sich undefiniert auf. Die Analyse der chemischen Zusammensetzung und die Abstimmung der Orientierung der Kompartimente der bikompartimentalen Fasern durch Bildgebung zeigte, dass die Fasern aus beiden

Polymerlösungen bestehen und dass die Menge der COO-Gruppen durch den Elektrojetprozess zunimmt. Eine Aussage über die Orientierung der Kompartimente in der Mikrofeder konnte bisher nicht getroffen werden. Die Federn mit einem maximalen Durchmesser von 487 µm zeigen nach externer Krafteinwirkung sehr gutes Rückstellverhalten. Außerdem kann durch Beimischung des wärmeempfindlichen Polymers PNIPAAm der Durchmesser der Feder nachträglich temperaturabhängig reduziert werden.

Die Mikrometer großen Strukturen der Federn ermöglicht eine Anordnung von vielen Federn auf kleinstem Raum. Außerdem ist die Stimulation kleinerer Mikrofedern im Vergleich zu Yoshida et al, Raviv et al und Gladman et al. viel schneller.^{[152][153][154]} Diese beiden genannten Vorteile machen die elektrogejetteten Mikrofedern sehr interessant für den Bereich der künstlichen Muskeln und der Soft-Robotik. Darüber hinaus konnten die Fasern zu 3D-Strukturen mit unterschiedlichen Architekturen kombiniert werden. Ausgelöst durch den Stimulus wird dieses 3D-Objekt zu 4D-Objekten in einer völlig neuen Mikrodimension führen. Laut Literatur ist PAA ein Polymer, das durch verschiedene Auslöser stimuliert werden kann, zum Beispiel durch ein elektrisches Feld, das zu einer schnellen Schrumpfung führt.^{[150][149]} Dies bietet die Möglichkeit, die 4D-Objekte in eine fünfte Dimension zu übertragen. Durch die Kombination verschiedener Polymere kann dies auf weitere Reize übertragen werden. Wärme als zweiter Stimulus wurde zum Beispiel bereits in den Experimenten mit PNIPAAm getestet. Ein 3D-Objekt, das durch verschiedene Reize ausgelöst werden kann, hat ein hohes Potenzial in Soft-Robotik-Anwendungen. Da die Quellung der gezeiten PAA-Hydrogelen pH-abhängig ist, wäre ein Einsatz in der Medikamentenverabreichung denkbar. Eine Struktur aus formveränderlichen Fasern könnte für die verzögerte Wirkstofffreisetzung in Organismen verwendet werden. Es würde beispielsweise den Magen mit pH 4 passieren und sich im Darm bei über pH 5 die Struktur ändern und den Wirkstoff freigeben.^[146]

Die Entwicklung, Herstellung und Einbringung von proteinhaltigen ECM Imitaten in Gerüststrukturen beinhaltet zahlreiche Herausforderungen. Im Zweidimensionalen gibt es hier schon viele Fortschritte zu verzeichnen. Der Transfer in die dritte Dimension ist momentan für viele Anwendungen durch die Limitation der Diffusion noch nicht umsetzbar. Hier konnte mittels eigens entwickelter 3D-Netz Jet Station dreidimensionale Proteinnetze aus Kollagen mikrometergenau aufgespannt werden. Die Grundlage der elektrodynamischen Herstelltechnik bildet das Design der Erdung und deren Beeinflussung des elektrischen Feldes. Die Prozessparameter zum erfolgreichen Jetten von Kollagen wurden vorab durch die Herstellung von Membranen untersucht und optimiert. Das direkte Elektrojetting der nanometergrossen Kollagenfasern auf ein PLGA-Gerüst verbessert dabei die Handhabung und die Flexibilität der Membran. Durch die Einstellung der Kollagenkonzentration in der Jetlösung auf 3,5 % (w/v) können dabei gleichmäßige Fasern mit Faserdurchmessern von 260 ± 120 nm angefertigt werden. Durch die zusätzlich variabel einstellbare Porengröße können Membranen für unterschiedliche Einsatzzwecke hergestellt werden. Auch die Stabilität in Wasser wurde durch die Quervernetzung mittels 25 % GDA-Lösung sichergestellt und bildet damit die Voraussetzung zur Kultivierung von Zellen. Hierzu kann die stabile Membran in mikrofluidische Apparate integriert werden. Mikrofluidische Apparate ermöglichen eine kontinuierliche Versorgung der Zellen und gewährleisten somit optimale Kultivierungsbedingungen. Gleichzeitig können sie als multifunktionelle Plattform für gezielte, analytische Untersuchungen der kultivierten Zellen dienen.^[177] Es gibt bereits Beispiele von mikrofluidischen Apparaten, die zur Kultivierung und Untersuchung speziell von Endothelzellen dienen.^[178,179] Eine optimierte, naturgetreue Proteinmembran ist dabei ein wichtiger Bestandteil dieser Apparate, da sie als Verankerungspunkt der Zellen dient. Ebenfalls kann dadurch die genaue Rolle der EZM und speziell der Basalmembran für verschiedenste Zellvorgänge untersucht werden.

Durch die Konstruktion einer punktuellen 3D-Jetting Station mit gedrucktem Probenaufsatz und einer in x-/y-Richtung ansteuerbaren Station, konnte eine gezielte Deposition von Kollagenfasern in Mikrokavitäten verschiedener Arrays und Scaffolds erreicht werden. Um eine möglichst naturgetreue dreidimensionale Nachahmung der EZM zu erreichen, wurden die Prozessparameter auf eine Flussrate von 60 $\mu\text{L}/\text{h}$, einer Spannung von 7,8-9,2 kV, einen Abstand zwischen Nadel und Array von 2,6 mm sowie einen Abstand zwischen Punkterdung und Array von 5,0 mm optimiert. Die Proteinfasern waren über den gesamten Querschnitt als auch über die gesamte Höhe der einzelnen Kavitäten visualisierbar und bildeten 3D-Kollagennetze. Das Anbringen einer doppelten Linienerdung gibt dem Kollagennetz zusätzlich eine Richtungsorientierung direkt beim Jetten vor. So können Gewebearten imitiert werden, welche Beanspruchungen in eine bestimmte Richtung ausgesetzt sind. Zellkultivierungen von Hepatocyten in Mikrokavitäten mit Kollagennetzen zeigen, dass die dreidimensionalen elektrogejetteten Netzstrukturen aus dem natürlichen Polymer Kollagen bestens für die Zellkultur geeignet sind.

Die Integration weitere Proteine ist interessant um deren Einfluss und das Zusammenspiel auf die Zellkultivierung zu erforschen. Hierfür würde Elastin in Frage kommen, da dieses bereits mehrmals gemeinsam mit Kollagen im Bereich des Tissue Engineerings gejettet und ebenfalls im gleichen Lösungsmittel gelöst wurde.^{[182],[183],[184]} Es ist bekannt, dass das Glykoprotein Laminin neben Kollagen einen großen Teil der Basalmembran ausmacht.^[180] Innerhalb dieser Membran ist das Kollagen durch Nidogen und Heparan Sulfate mit dem Laminin Netzwerk verbunden. Die Lamine weisen Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf, wodurch die Zellen direkt mit diesen Proteinen verbunden sind.^[181] Die Verbindung der Kollagennetze mit Laminin, sowie die Wechselwirkungen beider Proteine untereinander und mit den Endothelzellen könnte ein interessantes Objekt weiterer Forschungen sein.

Das 3D-jet Writing bietet die Möglichkeit, mit einer wasserbasierten Jet-Tinte präzise Muster aus mikroskopisch kleinen Polymerfasern zu erzeugen. Die Fasern wurden in freistehenden Gerüsten mit reproduzierbarer Architektur und einstellbaren Porengrößen angeordnet. Aufgrund ausgewählter Materialeigenschaften können die Gerüste bis zum 5,6-fachen ihres Eigengewichts an Wasser aufnehmen, wobei sich ihr Querschnitt nur minimal vergrößert. Die Zugabe von Enzymen während des Produktionsschritts führt zu enzymatisch aktiven Scaffolds mit einer katalytischen Wirkung ohne Ausschwemmen der Enzyme. Weitere Untersuchungen zeigten, dass elektrohydrodynamisch gejettete Scaffolds mit Querschnittsflächen von $2,2 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$, bestehend aus 7,5 % PAA und einem PEGDA-Gehalt von 80 %, die höchste Aktivität aufwiesen. Zusätzlich konnten Simulationsrechnungen die Reaktanten- und Produktverteilung innerhalb der einzelnen Stränge bestimmen, was die experimentellen Ergebnisse untermauert. Die enzymatischen Gerüste sind in einem kontinuierlichen Reaktor über 76 h langzeitaktiv und weisen einen stabilen Umsatz von 50 % auf. In weiteren Untersuchungen kann das Spektrum der biologischen Substrate erweitert werden, um die Eignung der Hydrogelgerüste für Anwendungen in der Diagnostik oder für enzymatische Kaskadenreaktionen zu prüfen. Erste Experimente zeigten, dass aufgrund der verwendeten biokompatiblen Materialien und der guten Penetration kleiner Moleküle im Inneren der Gerüststränge es auch möglich ist, lebende Zellen einzuschließen und zu kultivieren. Diese Arbeit eröffnet somit eine ganz neue Dimensionsskalierung des Biodruckes.

Literaturverzeichnis

- [1] DSO, *Jahresbericht Organspende und Transplantaion in Deutschland*, Frankfurt Main, **2019**.
- [2] R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, **2011**.
- [3] R. Schmitt, *Werkstoffverhalten in biologischen Systemen*, Springer Berlin Heidelberg, **1999**.
- [4] W. W. Minuth, R. Strehl, K. Schumacher, *Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe*, Wiley-VCH, **2012**.
- [5] R. Skalak, *Alan Liss New York* **1988**, 107, 22.
- [6] J. P. Vacanti, R. Langer, *Lancet* **1999**, 354, S32.
- [7] G. F. Muschler, C. Nakamoto, L. G. Griffith, *JBJS* **2004**, 86, 1541.
- [8] P. Bruckner, *Cell Tissue Res.* **2010**, 339, 7.
- [9] A. Steier, A. Muñiz, D. Neale, J. Lahann, *Adv. Mater.* **2019**, 31, 1806898.
- [10] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, 126, 677.
- [11] F. M. Chen, X. Liu, *Prog. Polym. Sci.* **2016**, 53, 86.
- [12] S. V. Murphy, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 773.
- [13] S. W. Cranford, M. J. Buehler, *Biomateriomics*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**.
- [14] S. M. Giannitelli, D. Accoto, M. Trombetta, A. Rainer, *Acta Biomater.* **2014**, 10, 580.
- [15] E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 457.
- [16] S. Mitragotri, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 15.
- [17] S. Pradhan, M. C. Farach-Carson, *Regen. Med.* **2010**, 5, 961.
- [18] H. Järveläinen, A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight, R. Penttinen, H. Ja, **2009**, 61, 198.
- [19] P. Lu, V. M. Weaver, Z. Werb, **2012**, 196, 395.
- [20] J. Kriston-Vizi, H. Flotow, *Cytom. Part A* **2017**, 91, 152.
- [21] R. Ravindran, A. K. Jaiswal, in *Enzym. Fuel Cells*, Materials Research Forum, Millersville, PA, USA, **2019**, S. 51–72.
- [22] M. Bilal, M. Asgher, R. Parra-Saldivar, H. Hu, W. Wang, X. Zhang, H. M. N. Iqbal, *Sci. Total Environ.* **2017**, 576, 646.
- [23] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1289.
- [24] M. Peng, E. Mittmann, L. Wenger, J. Hubbuch, M. K. M. Engqvist, C. M. Niemeyer, K. S. Rabe, *Chem. – A Eur. J.* **2019**, 25, 15998.
- [25] K. S. Rabe, J. Müller, M. Skoupi, C. M. Niemeyer, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, 56, 13574.

- [26] N. J. Burgoyne, R. M. Jackson, in *From Protein Struct. to Funct. with Bioinforma.*, Springer Netherlands, **2009**, S. 167–186.
- [27] R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223.
- [28] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801.
- [29] P. K. Robinson, *Essays Biochem.* **2015**, *59*, 1.
- [30] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczi, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Kemény, L. Poppe, *Green Chem.* **2017**, *19*, 3927.
- [31] P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 266.
- [32] K. F. O'Driscoll, *Methods Enzymol.* **1976**, *44*, 169.
- [33] N. R. Mohamad, N. H. C. Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. A. Wahab, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 205.
- [34] L. Moroni, J. A. Burdick, C. Highley, S. J. Lee, Y. Morimoto, S. Takeuchi, J. J. Yoo, *Nat. Rev. Mater.* **2018**, *3*, 21.
- [35] F. Krujatz, A. Lode, J. Seidel, T. Bley, M. Gelinsky, J. Steingroewer, *N. Biotechnol.* **2017**, *39*, 222.
- [36] S. C. Ligon, R. Liska, J. Stampfl, M. Gurr, R. Mülhaupt, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 10212.
- [37] J. R. Tumbleston, D. Shirvanyants, N. Ermoshkin, R. Janusziewicz, A. R. Johnson, D. Kelly, K. Chen, R. Pinschmidt, J. P. Rolland, A. Ermoshkin, *Science (80-.)* **2015**, aaa2397.
- [38] R. L. Truby, J. A. Lewis, *Nature* **2016**, *540*, 371.
- [39] F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma, *Biomaterials* **2010**, *31*, 6121.
- [40] J. A. Lewis, *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16*, 2193.
- [41] E. Y. Teo, S.-Y. Ong, M. S. Khoon Chong, Z. Zhang, J. Lu, S. Moothala, B. Ho, S.-H. Teoh, *Biomaterials* **2011**, *32*, 279.
- [42] J. Long, H. Gholizadeh, J. Lu, C. Bunt, A. Seyfoddin, D. R. Nogueira-librelotto, C. F. Codevilla, A. Farooqi, C. M. B. Rolim, *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *23*, 433.
- [43] M. A. Mofazzal Jahromi, P. Sahandi Zangabad, S. M. Moosavi Basri, K. Sahandi Zangabad, A. Ghamarypour, A. R. Aref, M. Karimi, M. R. Hamblin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *123*, 33.
- [44] D. B. Kolesky, K. A. Homan, M. A. Skylar-Scott, J. A. Lewis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 3179.
- [45] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, E. H. K. Stelzer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 839.
- [46] M. S. Mano, Z. Jiang, T. James, Y. L. Kong, K. A. Malatesta, W. O. Soboyejo, N. Verma, D. H. Gracias, M. C. McAlpine, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2634.
- [47] G. Taylor, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1969**, *313*, 453.
- [48] M. M. Hohman, M. Shin, G. Rutledge, M. P. Brenner, *Phys. Fluids* **2001**, *13*, 2201.
- [49] Z. Li, C. Wang, Springer, Berlin, Heidelberg, **2013**, S. 15–28.
- [50] Q. P. Pham, U. Sharma, A. G. Mikos, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1197.

- [51] L. S. Carnell, E. J. Siochi, N. M. Holloway, R. M. Stephens, C. Rhim, L. E. Niklason, R. L. Clark, *Macromolecules* **2008**, *41*, 5345.
- [52] P. D. Dalton, D. Klee, M. Möller, *Polymer (Guildf)*. **2005**, *46*, 611.
- [53] B. S. Jha, R. J. Colello, J. R. Bowman, S. A. Sell, K. D. Lee, J. W. Bigbee, G. L. Bowlin, W. N. Chow, B. E. Mathern, D. G. Simpson, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 203.
- [54] D. Zhang, J. Chang, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3283.
- [55] S. Mandal, S. Bhaskar, J. Lahann, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 1638.
- [56] M. S. Onses, E. Sutanto, P. M. Ferreira, A. G. Alleyne, J. A. Rogers, *Small* **2015**, *11*, 4237.
- [57] K. H. Choi, M. Zubair, H. W. Dang, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2014**, *53*, 05HB02.
- [58] J. Wang, Y. Yu, J. Guo, W. Lu, Q. Wei, Y. Zhao, *Adv. Biosyst.* **2020**, *4*, 1900238.
- [59] T. D. Brown, P. D. Dalton, D. W. Hutmacher, *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *56*, 116.
- [60] G. Hochleitner, T. Jüngst, T. D. Brown, K. Hahn, C. Moseke, F. Jakob, P. D. Dalton, J. Groll, *Biofabrication* **2015**, *7*, 035002.
- [61] F. M. Wunner, M.-L. Wille, T. G. Noonan, O. Bas, P. D. Dalton, E. M. De-Juan-Pardo, D. W. Hutmacher, *Adv. Mater.* **2018**, *1706570*, 1706570.
- [62] F. Signori, M.-B. Coltell, S. Bronco, *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 74.
- [63] S. Frokjaer, D. E. Otzen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 298.
- [64] S. N. Jayasinghe, *Adv. Biosyst.* **2017**, *1*, 1700067.
- [65] F.-L. Zhou, P. L. Hubbard, S. J. Eichhorn, G. J. M. Parker, *Polymer (Guildf)*. **2011**, *52*, 3603.
- [66] C. Chang, K. Limkralassiri, L. Lin, *Appl. Phys. Lett.* **2008**, *93*, 123111.
- [67] H. Liu, S. Vijayavenkataraman, D. Wang, L. Jing, J. Sun, K. He, *Int. J. Bioprinting* **2017**, *3*, DOI 10.18063/IJB.2017.01.009.
- [68] J. H. Jordahl, L. Solorio, H. Sun, S. Ramcharan, C. B. Teeple, H. R. Haley, K. J. Lee, T. W. Eyster, G. D. Luker, P. H. Krebsbach, J. Lahann, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1707196.
- [69] S. Jordahl, L. Solorio, D. B. Neale, S. McDermott, J. H. Jordahl, A. Fox, C. Dunlay, A. Xiao, M. Brown, M. Wicha, G. D. Luker, J. Lahann, *Adv. Mater.* **2019**, 1904580.
- [70] A. Steier, B. Schmieg, Y. Irtel von Brenndorff, M. Meier, H. Nirschl, M. Franzreb, J. Lahann, *Macromol. Biosci.* **2020**, *20*, 2000154.
- [71] M. C. George, P. V. Braun, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48*, 8606.
- [72] K. H. Roh, D. C. Martin, J. Lahann, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 759.
- [73] J. Lahann, *Small* **2011**, *7*, 1149.
- [74] S. Bhaskar, J. Lahann, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6650.
- [75] F. M. Andrews, *Plant Physiol.* **1929**, *4*, 281.
- [76] G. M. Whitesides, *Science (80-.)* **2002**, *295*, 2418.

- [77] S. Tibbits, „The emergence of “4D printing”“, **2013**.
- [78] R. M. Erb, J. S. Sander, R. Grisch, A. R. Studart, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1.
- [79] X. Kuang, D. J. Roach, J. Wu, C. M. Hamel, Z. Ding, T. Wang, M. L. Dunn, H. J. Qi, *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, DOI 10.1002/adfm.201805290.
- [80] P. Wang, Y. Sun, X. Shi, H. Shen, H. Ning, H. Liu, *Bio-Design Manuf.* **2021**, *4*, 344.
- [81] L. Zeena, A. Zolfagharian, Y. Sriya, S. Sasikumar, M. Bodaghi, F. Pati, *Adv. Mater. Technologies* **2023**, *8*.
- [82] S. Saska, L. Pilatti, A. Baly, J. A. Shibli, *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*.
- [83] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J. A. Planell, *J. R. Soc. Interface* **2008**, *5*, 1137.
- [84] J. E. Lemons, F. Misch-Dietsh, M. S. McCracken, in *Dent. Implant Prosthetics*, Elsevier, **2015**, S. 66–94.
- [85] A. S. Brydone, D. Meek, S. Maclaine, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.* **2010**, *224*, 1329.
- [86] A. S. Hoffman, C. Engineering, F. J. Schoen, J. E. Lemons, in *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Med.* (Hrsg.: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons), Elsevier, **2013**.
- [87] D. A. Puleo, R. Bizios, Hrsg. , *Biological Interactions on Materials Surfaces*, Springer US, New York, NY, **2009**.
- [88] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 47.
- [89] B. Trappmann, C. S. Chen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 948.
- [90] A. Espíndola-González, A. L. Martínez-Hernández, F. Fernández-Escobar, V. M. Castaño, W. Brostow, T. Datashvili, C. Velasco-Santos, *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 1908.
- [91] R. Sridhar, R. Lakshminarayanan, K. Madhaiyan, V. Amutha Barathi, K. H. C. Lim, S. Ramakrishna, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 790.
- [92] G. C. Ingavle, J. K. Leach, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2014**, *20*, 277.
- [93] P. Sajkiewicz, D. Kołbuk, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 2009.
- [94] X. Liu, P. X. Ma, *Biomaterials* **2009**, *30*, 4094.
- [95] T. M. Freyman, I. V. Yannas, L. J. Gibson, *Prog. Mater. Sci.* **2001**, *46*, 273.
- [96] Z. Ahmed, S. Underwood, R. A. Brown, *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 219.
- [97] J. B. Phillips, V. R. King, Z. Ward, R. A. Porter, J. V. Priestley, R. A. Brown, *Biomaterials* **2004**, *25*, 2769.
- [98] J. Lee, G. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, acsami.8b14088.
- [99] M. D. Shoulders, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929.
- [100] S. Chattopadhyay, R. T. Raines, *Biopolymers* **2014**, *101*, 821.
- [101] P. Bunyaratavej, H.-L. Wang, *J. Periodontol.* **2005**, *72*, 215.
- [102] A. K. Schlegel, H. Möhler, F. Busch, A. Mehl, *Biomaterials* **1997**, *18*, 535.

- [103] K. S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. M. Seo, Y. J. Park, S. D. Hong, S. Roh, J. J. Cho, W. H. Park, B. M. Min, *Biomaterials* **2006**, *27*, 1452.
- [104] J. X. Law, L. L. Liau, A. Saim, Y. Yang, R. Idrus, *Tissue Eng. Regen. Med.* **2017**, *14*, 699.
- [105] L. Jin, T. Wang, M.-L. Zhu, M. K. Leach, Y. I. Naim, J. M. Corey, Z.-Q. Feng, Q. Jiang, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8*, 1.
- [106] S. Khorshidi, A. Solouk, H. Mirzadeh, S. Mazinani, J. M. Lagaron, S. Sharifi, S. Ramakrishna, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *10*, 715.
- [107] A. Di Martino, L. Liverani, A. Rainer, G. Salvatore, M. Trombetta, V. Denaro, *Musculoskelet. Surg.* **2011**, *95*, 69.
- [108] N. Y. Kostina, O. Pop-Georgievski, M. Bachmann, N. Neykova, M. Bruns, J. Michálek, M. Bastmeyer, C. Rodriguez-Emmenegger, *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*, 83.
- [109] S. Mandal, S. Bhaskar, J. Lahann, *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30*, 1638.
- [110] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T. M. Aminabhavi, *J. Control. Release* **2008**, *125*, 193.
- [111] K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y.-S. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4977.
- [112] L. F. Mellor, P. Huebner, S. Cai, M. Mohiti-Asli, M. A. Taylor, J. Spang, R. A. Shirwaiker, E. G. Loba, *Biomed Res. Int.* **2017**, *2017*, 1.
- [113] R. A. Giordano, B. M. Wu, S. W. Borland, L. G. Cima, E. M. Sachs, M. J. Cima, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1997**, *8*, 63.
- [114] A. Pfister, R. Landers, A. Laib, U. Hübner, R. Schmelzeisen, R. Mülhaupt, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2004**, *42*, 624.
- [115] F. M. Wunner, M.-L. Wille, T. G. Noonan, O. Bas, P. D. Dalton, E. M. De-Juan-Pardo, D. W. Hutmacher, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1706570.
- [116] G. M. Gratson, M. Xu, J. A. Lewis, *Nature* **2004**, *428*, 386.
- [117] H. Park, J. R. Robinson, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1987**, *4*, 457.
- [118] J. Torgersen, X. H. Qin, Z. Li, A. Ovsianikov, R. Liska, J. Stampfl, *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23*, 4542.
- [119] T. Jungst, W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, J. Groll, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1496.
- [120] R. F. Pereira, P. J. Bártoolo, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, DOI 10.1002/APP.42458.
- [121] C. A. DeForest, K. S. Anseth, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2012**, *3*, 421.
- [122] B. Richter, V. Hahn, S. Bertels, T. K. Claus, M. Wegener, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, M. Bastmeyer, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1604342.
- [123] J. Makarova, A. Turchinovich, M. Shkurnikov, A. Tonevitsky, *Trends Biochem. Sci.* **2021**, *46*, 640.
- [124] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869.
- [125] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337.

- [126] R. J. Beynon, „Calculator for pH buffers“, can be found under <http://phbuffers.org/BufferCalc/Buffer.html>, **2006**.
- [127] J. H. Jordahl, L. Solorio, H. Sun, S. Ramcharan, C. B. Teeple, H. R. Haley, K. J. Lee, T. W. Eyster, G. D. Luker, P. H. Krebsbach, J. Lahann, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1707196.
- [128] K. S. Weadock, E. J. Miller, L. D. Bellincampi, J. P. Zawadsky, M. G. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 1373.
- [129] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. . Van Luyn, P. B. Van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1995**, *6*, 460.
- [130] T. G. Mezger, *The Rheology Handbook : 4th Edition.*, Vincentz Network, **2014**.
- [131] G. Beaucage, D. W. Schaefer, *J. Non. Cryst. Solids* **1994**, *172–174*, 797.
- [132] G. Beaucage, *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 717.
- [133] G. Beaucage, *J. Appl. Crystallogr.* **1996**, *29*, 134.
- [134] B. Hammouda, *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 716.
- [135] P. W. Schmidt, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 414.
- [136] B. Schmieg, A. Schimek, M. Franzreb, *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 659.
- [137] B. Schmieg, J. Döbber, F. Kirschhöfer, M. Pohl, M. Franzreb, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *6*, 211.
- [138] F. Kazenwadel, E. Biegert, J. Wohlgemuth, H. Wagner, M. Franzreb, *Eng. Life Sci.* **2016**, *16*, 560.
- [139] D. Murzin, T. Salmi, in *Catal. Kinet.*, Elsevier Science, **2005**, S. 341–418.
- [140] T. Saikia, V. Mahto, A. Kumar, *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *52*, 89.
- [141] P. Buckley, P. A. Giguère, *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 397.
- [142] J. Dong, Y. Ozaki, K. Nakashima, *Macromolecules* **1997**, *30*, 1111.
- [143] K.-F. Arndt, A. Richter, S. Ludwig, J. Zimmermann, J. Kressler, D. Kuckling, H.-J. Adler, *Acta Polym.* **1999**, *50*, 383.
- [144] A. B. Pambudi, R. Kurniawati, A. Iryani, D. Hartanto, in *AIP Conf. Proc.*, AIP Publishing LLC AIP Publishing, **2018**, S. 020074.
- [145] J. E. Elliott, M. MacDonald, J. Nie, C. N. Bowman, *Polymer (Guildf.)* **2004**, *45*, 1503.
- [146] E. Jabbari, S. Nozari, *Eur. Polym. J.* **2000**, *36*, 2685.
- [147] Y. Chu, P. P. Varanasi, M. J. McGlade, S. Varanasi, *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *58*, 2161.
- [148] N. A. Peppas, S. L. Wright, *Macromolecules* **1996**, *29*, 8798.
- [149] Qiu, *Psychiatry Clin. Neurosci.* **1998**, *52*, 145.
- [150] D. Buenger, F. Topuz, J. Groll, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1678.
- [151] B. A. Firestone, R. A. Siegel, *J. Appl. Polym. Sci.* **1991**, *43*, 901.

- [152] K. Yoshida, S. Nakajima, R. Kawano, H. Onoe, in *Proc. IEEE Int. Conf. Micro Electro Mech. Syst.*, IEEE, **2017**, S. 837–840.
- [153] D. Raviv, W. Zhao, C. McKnelly, A. Papadopoulou, A. Kadambi, B. Shi, S. Hirsch, D. Dikovsky, M. Zyracki, C. Olguin, R. Raskar, S. Tibbits, *Sci. Rep.* **2014**, 4, DOI 10.1038/srep07422.
- [154] A. Sydney Gladman, E. A. Matsumoto, R. G. Nuzzo, L. Mahadevan, J. A. Lewis, *Nat. Mater.* **2016**, 15, 413.
- [155] S. Tibbits, *Archit. Des.* **2012**, 82, 68.
- [156] K. Cu, A. Steier, M. Klaiber, M. Franzreb, J. Lahann, K. Cu, A. Steier, M. Klaiber, M. Franzreb, J. Lahann, B. Institute, *Adv. Funct. Mater.* **2022**, 32, 2204080.
- [157] S. Chandrasekaran, N. H. Guo, R. G. Rodrigues, J. Kaiser, D. D. Roberts, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 11408.
- [158] S. Ayad, R. Boot-Handford, M. Humphries, K. Kadler, **1998**.
- [159] S. L. Shenoy, W. D. Bates, H. L. Frisch, G. E. Wnek, *Polymer (Guildf.)* **2005**, 46, 3372.
- [160] X. Wang, B. Ding, J. Yu, J. Yang, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, 86, 345.
- [161] N. Davidenko, D. V Bax, C. F. Schuster, R. W. Farndale, S. W. Hamaia, S. M. Best, R. E. Cameron, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2016**, 27, 1.
- [162] S. Torres-Giner, J. V. Gimeno-Alcañiz, M. J. Ocio, J. M. Lagaron, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, 1, 218.
- [163] C. C. Tsai, R. N. Huang, H. W. Sung, H. C. Liang, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 52, 58.
- [164] J. E. Gough, C. A. Scotchford, S. Downes, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, 61, 121.
- [165] D. Rubikon, **o. J.**, 621.
- [166] G. E. Davis, **1992**, 182, 1025.
- [167] E. Gottwald, S. Giselbrecht, R. T.- GIT, U. 2014, *research.utwente.nl o. J.*
- [168] E. Gottwald, S. Giselbrecht, R. Truckenmüller, *analyticalscience.wiley.com o. J.*
- [169] E. Gottwald, H. Lorig, S. Kolb, S. Giselbrecht, R. Truckenmüller, *labor&more* **2016**, 2.
- [170] G. S. Bisht, G. Canton, A. Mirsepassi, L. Kulinsky, S. Oh, D. Dunn-Rankin, M. J. Madou, *Nano Lett.* **2011**, 11, 1831.
- [171] M. Rudisile, *Engineering* **2008**.
- [172] D. Sun, C. Chang, S. Li, L. Lin, *Nano Lett.* **2006**, 6, 839.
- [173] X. Wang, G. Zheng, L. Xu, W. Cheng, B. Xu, Y. Huang, D. Sun, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2012**, 108, 825.
- [174] A. Greiner, J. H. Wendorff, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, 46, 5670.
- [175] Z. Su, J. Li, Q. Li, *Carbon N. Y.* **2012**, 50, 5605.
- [176] A. Castenholz, *Lymphology* **1998**, 31, 101.

- [177] J. L. Editor, *Cell Analysis on Microfluidics*, Springer Singapore, Singapore, **2018**.
- [178] Z. Brzozka, E. Jastrzebska, *Cardiac Cell Culture Technologies*, Springer International Publishing, Cham, **2018**.
- [179] T. Rajabi, R. Ahrens, V. Huck, M. März, H. Gantenbein, S. W. Schneider, H. Schroten, A. E. Guber, *Curr. Dir. Biomed. Eng.* **2015**, 1, 14.
- [180] V. S. LeBleu, B. MacDonald, R. Kalluri, *Exp. Biol. Med.* **2007**, 232, 1121.
- [181] E. Hohenester, P. D. Yurchenco, E. Hohenester, P. D. Yurchenco, **2017**, 6918, 56.
- [182] S. Heydarkhan-Hagvall, K. Schenke-Layland, A. P. Dhanasopon, F. Rofail, H. Smith, B. M. Wu, R. Shemin, R. E. Beygui, W. R. MacLellan, *Biomaterials* **2008**, 29, 2907.
- [183] L. Buttafoco, N. G. Kolkman, P. Engbers-Buijtenhuijs, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, I. Vermes, J. Feijen, *Biomaterials* **2006**, 27, 724.
- [184] E. D. Boland, *Front. Biosci.* **2004**, 9, 1422.
- [185] M. E. Nimni, D. Cheung, B. Strates, M. Kodama, K. Sheikh, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, 21, 741.
- [186] S. J. Rukmani, P. Lin, J. S. Andrew, C. M. Colina, *J. Phys. Chem. B* **2019**, 123, 4129.
- [187] A. Haider, S. Haider, I. K. Kang, *Arab. J. Chem.* **2018**, 11, 1165.
- [188] G. I. Taylor, *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* **1964**, 280, 383.
- [189] J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, N. C. Beck Tan, *Polymer (Guildf.)* **2001**, 42, 261.
- [190] V. Krasňan, R. Stloukal, M. Rosenberg, M. Rebroš, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 100, 2535.
- [191] G. M. Cruise, D. S. Scharp, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1998**, 19, 1287.
- [192] S. M. Evans, A. L. Litzenberger, A. E. Ellenberger, J. E. Maneval, E. L. Jablonski, B. M. Vogel, *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, 35, 322.
- [193] G. Crivello, L. Fracchia, G. Ciardelli, M. Boffito, C. Mattu, *Nanomaterials* **2023**, 13, 904.
- [194] G. Bodelón, V. Montes-García, Verónica López-Puente, E. H. Hill, C. Hamon, M. N. Sanz-Ortiz, C. Rodal-Cedeira, Sergio Costas, S. Celiksoy, I. Pérez-Juste, L. M. Liz-Marzán, *Nat. Mater.* **2016**, 15, 1203.
- [195] Y. Zhao, T. Liu, Y. Wu, Y. Zhao, M., & Zhao, *Biotechnol. Adv.* **2023**, 69.

Publikationen und internationale Vorträge

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

- (1) Beuker, J., **Steier, A.**, Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M., & Hausmann, R. (2016). Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *Amb Express*, 6(1), 1-10.
- (2) Beuker, J., Barth, T., **Steier, A.**, Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M., & Hausmann, R. (2016). High titer heterologous rhamnolipid production. *AMB Express*, 6, 1-7.
- (3) **Steier, A.**, Muñiz, A., Neale, D., & Lahann, J. (2019). Emerging trends in information-driven engineering of complex biological systems. *Advanced Materials*, 31(26), 1806898.
- (4) **Steier, A.**, Schmieg, B., Irtel von Brenndorff, Y., Meier, M., Nirschl, H., Franzreb, M., & Lahann, J. (2020). Enzyme scaffolds with hierarchically defined properties via 3D jet writing. *Macromolecular bioscience*, 20(9), 2000154.
- (5) Cu, K., **Steier, A.**, Klaiber, M., Franzreb, M., & Lahann, J. (2022). Directed Particle Transport via Reconfigurable Fiber Networks. *Advanced Functional Materials*, 32(35), 2204080.

Präsentationen und Vorträge an wissenschaftlichen Konferenzen

- (6) National Research Center of the Helmholtz Association in Karlsruhe 2017; Titel: Advanced Polymers and Biomaterials - Electrohydrodynamic Co-jetting of Particles and Fibers
- (7) Joint Lab “Virtual Materials Design” in the Helmholtz Research Field “Information” across the Helmholtz Programs “Materials Systems Engineering”, “Natural, Artificial and Cognitive Information Processing” and “Engineering Digital Futures” 2017; Titel: Unbiased Modeling of Bioadhesion and Complex Materials
- (8) European Materials Research Society Spring Meeting in Straßburg 2018; Titel: Design of multicompartimental polymeric fiber architectures for drug delivery and tissue engineering
- (9) International Conference on Biofabrication in Columbus (Ohio, USA) 2019; Titel: Design of Various Polymeric Fiber Architectures for Tissue Engineering via 3D Electro Jetting
- (10) The BiolInterFaces in Technology and Medicine program (BIFTM) at Karlsruhe Institute of Technology in Karlsruhe 2019; Titel: 3D Electrojetting

Betreute Abschlussarbeiten

- (1) Samperio Niembro, Enrique: *Optimizing the Process of Growing Metal-Organic Frameworks (MOFs) on the Surface of Electrojetted Polymer Fibers*, Institut für funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2018
- (3) Irtel von Brenndorff, Yannic: *Immobilisierung von Enzymen durch Electrojetting für den Einsatz in kontinuierlichen Reaktoren*, Institut für funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2018
- (2) Röhrs, Dhana: *Entwicklung einer Proteinmembran zur in vitro Imitation von Lymphsystemen mittels Elektrojetting*, Institut für funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2019
- (4) Dangel, Judith: *Modifikation einer elektrojetting-Station zur gezielten Deposition von Proteinstrukturen für die 3D-Zellkultur von Organoiden*, Karlsruher Institut für Technologie, Bachelorarbeit, 2019
- (5) Disela, Roxana Clarissa: *Production of smart-actuating polymer fibers by electrojetting for 4D micro-objects*, Institut für funktionelle Grenzflächen, Karlsruher Institut für Technologie, Masterarbeit, 2019