

**Synthese und Charakterisierung von biologisch-aktiven
Hydrogelen und deren Anwendung in der Stammzellforschung**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Arbeitsgruppe Polymere Hybridsysteme

vorgelegt von

Patrick Bolduan

aus Erfurt

Dortmund, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2014 bis August 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Weberskirch an der TU Dortmund erstellt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tiller

Eingereicht am 07. Februar 2018

Danksagung

Herrn *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* danke ich sehr für die Ermöglichung dieser Arbeit und für das interessante Forschungsthema. Seine Hilfsbereitschaft, sein stetes Interesse und Vertrauen haben bedeutend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn *Prof. Dr. Jörg Tiller* möchte ich für bereitwillige die Übernahme des Korreferats danken.

Außerdem sei allen Mitgliedern des Arbeitskreises, *Hanne Petersen, Henning Sand, Anne-Larissa Kampmann, Omar Sallouh, David Pelzer, Irene Pretzer* und *Andrea Ernst* herzlichst für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre gedankt.

Mein weiterer Dank gilt den zahlreichen Studenten die durch ihre Praktika und Abschlussarbeiten ebenfalls einen großen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Allen voran sind dabei *Florian Pätzold, Max Jopen* und *Nils Stamm* zu nennen.

Für die Ermöglichung der Zellexperimente und die sehr angenehme, kooperative Zusammenarbeit möchte ich mich bei *Prof. Dr. Dennis Schade* und *Dr. Carmen Carrillo-Garcia* bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Fakultät Chemie und Chemische Biologie, *Silvia Lessing, Katja Weber, Andreas Hammer, Andrea Bokelmann, Heidi Auer, Dr. Ljuba Iovkova-Berends* und *Dr. Alexandra Behler*, für Ihre Hilfsbereitschaft und Hilfe bei verwaltungstechnischen Fragestellungen.

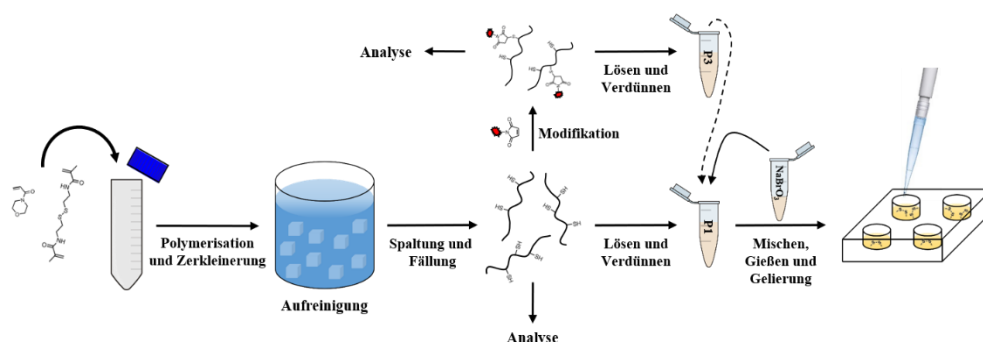
Bei meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung und Hilfe während des gesamten Studiums bedanken. Besonders gedankt sei dabei meinem Vater für die Ermöglichung des Studiums.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Nelli, die mir sehr durch die Tiefpunkte der vergangenen vier Jahre geholfen hat und auch während der Anfertigung dieser Arbeit den einen oder anderen Motivationsschub gegeben hat. Des Weiteren war Sie mir bei der Korrektur dieser Arbeit eine große Hilfe.

Kurzfassung

Aufgrund der hohen Mortalität, verursacht durch den Mangel an Spenderorganen, unheilbarer Krankheiten und nicht-therapierbarer Unfallfolgen, welche mit Gewebeerstörung einhergehen, sind Stammzellen durch ihre Fähigkeit sowohl beschädigtes Gewebe zu regenerieren als auch neues Gewebe zu erschaffen in den Fokus der medizinischen Forschung gerückt. Das Verhalten und Überleben von Stammzellen wird maßgeblich durch ihre Mikroumgebung bestimmt, wobei die extrazelluläre Matrix (EZM) als strukturelles Grundgerüst als einer der wichtigsten Bestandteile zu nennen ist. Daher werden zur Entwicklung geeigneter Therapiemethoden leistungsfähige Materialien benötigt, die in der Lage sind, das Stammzellverhalten zu kontrollieren. Eine Materialklasse, die sich für solche Anwendungen besonders eignet, stellen die Hydrogele dar, da diese mit ihrer hohen Hydrophilie bereits eine der wichtigsten Eigenschaften mit sich bringen. Ein Problem der meisten für diese Anwendungen verwendeten Systeme liegt jedoch in dessen mangelnder Analysierbarkeit bezüglich der Zusammensetzung.

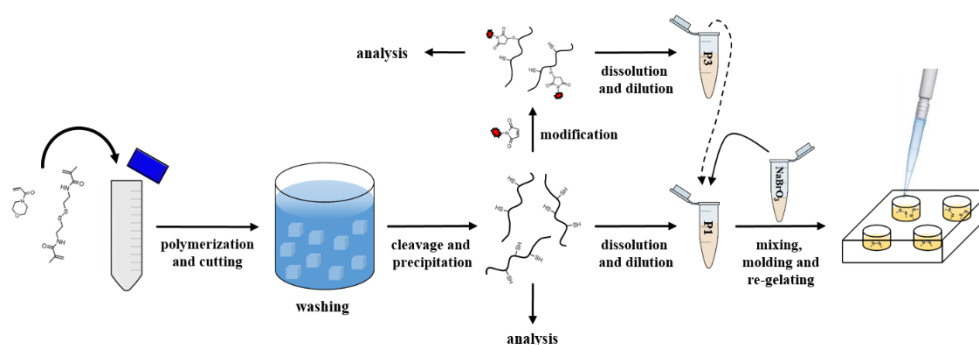
Angesichts dessen wurde in dieser Arbeit ein Hydrogelsystem entwickelt, das alle an solch ein Material gestellten Anforderungen, wie z.B. chemische und mechanische Stabilität, Up-Scaling und Modifizierbarkeit, erfüllt und dabei die Analysierbarkeit der Zusammensetzung gewährleistet. Um dies zu ermöglichen, wurde ein disulfidvernetztes Poly(acryloylmorpholin) über eine *in-situ*-vernetzende Copolymerisation aus Acryloylmorpholin und *N,N'*-Bis(methacryloylcystamin) hergestellt. Die resultierenden Gele können durch die Spaltung der Disulfide in lösliche und somit analysierbare Polymere überführt werden, aus denen außerdem aufgrund der Reversibilität der Thiol-Disulfid-Redoxreaktion Hydrogele hergestellt werden können. Durch die Variation der Copolymerkonzentration ist es des Weiteren möglich, Gele mit E-Moduli von 0,15 – 60 kPa zu erzeugen, wobei durch Anpassung der Menge an Oxidationsmittel die Gelierungszeit eingestellt werden kann. Die Thiolgruppen erlauben außerdem die Anbindung von maleimidmodifizierten Peptidliganden, die für eine biologische Aktivität von entscheidender Bedeutung sind. Außerdem können durch leichte Modifikationen des Systems sowohl die Bioabbaubarkeit sowie die Zugänglichkeit zu 3D-Zellexperimenten adressiert werden. Abschließend konnte in Zellexperimenten mit HEK293-Zellen und mausembryonalen Stammzellen die Zellkompatibilität des entwickelten Hydrogelsystems validiert werden.



Abstract

Owing to the high mortality, caused by the lack of donor organs, incurable diseases and non-treatable consequences of accidents associated with tissue destruction, stem cells have come into focus of medical research because of their ability to regenerate damaged tissue as well as create new tissue. The behavior and survival of stem cells is largely determined by their micro-environment with the extracellular matrix (ECM) as a structural backbone being one of the most important constituents. Hence, the development of appropriate therapies requires high performance materials that are able to control stem cell behavior. Hydrogels are particularly suitable for such applications since they already exhibit a high hydrophilicity, which is one of the most important properties. However, a problem that arises for most of the systems used for these applications is the limited analyzability in composition.

Therefore, in this work a hydrogel system has been developed meeting all the requirements for such materials, such as chemical and mechanical stability, up-scaling and modifiability, while ensuring the analysis of all intermediates and the end product. To address this issue, a disulfide crosslinked poly(acryloylmorpholine) was prepared by using *in-situ* cross-linking copolymerization of acryloylmorpholine and *N,N'*-bis(methacryloyl cystamine). Subsequently, soluble and analyzable copolymers can be obtained by cleavage of the disulfide bonds. Furthermore, these polymers can be used to prepare hydrogels due to the reversibility of the thiol disulfide redox reaction. Gels can be produced with E-moduli of 0.15-60 kPa by varying the copolymer concentration, while gelling time can be adjusted by the amount of oxidizing agent. The thiol groups further allow coupling of maleimide-modified peptide ligands which are crucial for biological activity. In addition, both the biodegradability and the accessibility to 3D-cell experiments can be addressed by minor modifications. Finally, cell compatibility of the developed hydrogel system could be validated using HEK293 cells and mouse embryonic stem cells.



Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Polymere in der Medizin	1
1.2	Geweberegeneration	1
1.2.1	Grundlagen der Geweberegeneration	2
1.2.2	Proliferation und Differenzierung von Stammzellen	4
1.2.3	Potenz von Stammzellen	5
1.2.3.1	Pluripotente Stammzellen	5
1.2.3.1.1	Embryonale Stammzellen	6
1.2.3.1.2	Induziert pluripotente Stammzellen	7
1.2.3.2	Multipotente Stammzellen	7
1.2.4	Stammzellnischen	8
1.2.5	Extrazelluläre Matrix	9
1.3	Hydrogele	10
1.3.1	Klassifizierung von Hydrogelen in der Geweberegeneration	11
1.3.1.1	Herkunft	11
1.3.1.2	Vernetzung	12
1.3.1.2.1	Chemische Hydrogele	12
1.3.1.2.2	Physikalische Hydrogele	15
1.3.2	Charakterisierung von Hydrogelen	16
1.3.2.1	Rheologie und Rheometrie	16
1.3.2.2	Netzwerkparameter	20
2.	Zielsetzung	25
3.	System auf Basis kovalent-vernetzter Hydrogele	27
3.1	Chemische Hydrogele in der Stammzellforschung	27
3.2	Spaltbare Vernetzer	29
3.2.1	Acetale	29
3.2.2	<i>N</i> -Acylhydrazone	30
3.2.3	Disulfide	30
3.3	Design des Hydrogelsystems	31
3.4	Entwicklung des Herstellungsprozesses	33
3.5	Monomerscreening	36
3.6	Synthese und Charakterisierung von P(AMor- <i>co</i> -BMAC)-SH	39
3.6.1	Modifikation der Copolymersynthese	39

3.6.2	Charakterisierung der Copolymere	42
3.6.2.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	42
3.6.2.2	Thiolgehalt via Ellman's	43
3.6.2.3	Ergebnisse.....	44
3.7	Gelierung und Geleigenschaften	45
3.7.1	Das Oxidationsmittel.....	45
3.7.2	Langzeitstabilität	47
3.7.3	Gelierungszeit.....	48
3.7.4	Steifigkeit	51
3.7.4.1	Abhängigkeit von der Copolymerkonzentration	52
3.7.4.2	Abhängigkeit vom Vernetzeranteil.....	54
3.7.5	Transparenz	56
3.8	Funktionalisierung von P(AMor-co-BMAC)-SH	58
3.8.1	Kationische Modifizierung.....	58
3.8.1.1	Synthese von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid.....	60
3.8.1.2	Synthese von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*I).....	60
3.8.1.3	Synthese von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumtriflat	61
3.8.1.4	Synthese und Charakterisierung von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf)	62
3.8.2	RGD-Funktionalisierung	63
3.8.2.1	Integrine und die RGD-Sequenz.....	64
3.8.2.2	Peptidsynthese	65
3.8.2.3	Peptidfunktionalisierung von P2 und P8	68
3.9	Untersuchung der Zytotoxizität.....	73
3.9.1	Zytotoxizitätstest mit HEK293-Zellen	73
3.9.1.1	Sterilisation der Hydrogele	74
3.9.1.2	Einfluss des TMAEA*OTf-Anteils	76
3.9.1.3	Einfluss des Peptidanteils	78
3.9.1.4	Einfluss der Kombination aus TMAEA*OTf und Pep-1	80
3.9.2	Zytotoxizitätstest mit mESCs.....	82
3.9.2.1	Einfluss des TMAEA*OTf-Anteils	82
3.9.2.2	Einfluss des Peptidanteils	84
3.9.2.3	Einfluss der Kombination aus TMAEA*OTf und Pep-1	85
3.9.3	Einfluss der Steifigkeit auf die Zellviabilität von HEK293-Zellen und mESCs	87

3.10	Vernetzung der Copolymere mittels PEG-Diacrylaten	89
3.11	Bioabbaubarkeit.....	94
3.11.1	Synthese eines ester- und thiolmodifizierten P(AMor)-Copolymers	95
3.11.1.1	Polymeranaloger Ansatz.....	95
3.11.1.2	Synthese und Copolymerisation von BMADDP	98
3.11.2	Charakterisierung des esterfunktionalisierten Copolymers P(AMor-co-BMADDP)-SH	100
3.11.3	Untersuchung der Abbaubarkeit.....	100
4.	System auf Basis physikalischer Hydrogele	103
4.1	Physikalische Hydrogele in der Stammzellforschung.....	103
4.2	Supramolekulare Hydrogele.....	106
4.2.1	Allgemeines.....	106
4.2.2	Motive zur Herstellung supramolekularer Gele	106
4.2.2.1	Harnstoffbasierte Hydrogelatoren	107
4.2.2.2	C ₃ -symmetrische Hydrogelatoren und das BTA-Motiv	109
4.3	RAFT-Polymerisation	113
4.3.1	Mechanismus.....	113
4.3.2	Kinetik.....	114
4.4	Design des acrylatbasierten Hydrogelators	115
4.5	Synthese des BTA-Motivs.....	117
4.6	Synthese des α,ω -telechelen HS-P(AMor)-SH	119
4.6.1	Synthese von DTTC-P(AMor)-DTTC	120
4.6.2	Aminolyse von DTTC-P(AMor)-DTTC	124
4.6.3	Immobilisierung des BTA-Motivs	126
4.6.4	Charakterisierung des Hydrogelators	128
5.	Zusammenfassung	131
6.	Experimenteller Teil.....	139
6.1	Allgemeines.....	139
6.2	Vorschriften des kovalent-vernetzten Hydrogelsystems	140
6.2.1	Synthese der P(AMor-co-BMAC)-SH-Copolymere	140
6.2.1.1	<i>N,N'</i> -Bis(methacryloylcystamin) (BMAC, 3)	140
6.2.1.2	Copolymerisation von AMor und BMAC	141
6.2.1.3	Spaltung der <i>in-situ</i> -vernetzten Hydrogele.....	141
6.2.2	Synthese der P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf)-SH-Copolymere.....	142

6.2.2.1	[2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumtriflat (TMAEA*OTf, 11) ..	142
6.2.2.2	Copolymerisation von AMor, BMAC und TMAEA*OTf	143
6.2.2.3	Spaltung der <i>in-situ</i> -vernetzten Hydrogele	143
6.2.3	Charakterisierung der Copolymere	143
6.2.3.1	¹ H-NMR-Spektroskopie	143
6.2.3.2	Ellman's Assay	143
6.2.4	Synthese der peptidfunktionalisierten Polymere	144
6.2.4.1	Maleimidocaprionsäure (MIC, 15)	144
6.2.4.2	Peptidsynthese von MIC-6Ahx-YGRGDS (Pep-1, 16).....	144
6.2.4.3	Funktionalisierung von P2 und P8.....	146
6.2.5	Regelierung	147
6.2.6	Charakterisierung der Geleigenschaften	147
6.2.6.1	Bestimmung des Quellwertes und E-Moduls	147
6.2.6.2	Bestimmung der Gelierungszeit	147
6.2.7	Zelltests	148
6.2.7.1	Präparation und Sterilisation der Zellkulturplatten	148
6.2.7.2	Zellkultur und CellTiter-Glo® Assay.....	148
6.2.8	Synthese der PEGDA-vernetzten Hydrogele	149
6.2.8.1	PEGDA3500 (21)	149
6.2.8.2	Gelierung mit PEGDA.....	149
6.2.9	Synthese der esterfunktionalisierten Hydrogele.....	150
6.2.9.1	Maleimidopropionsäure- <i>N</i> -succinimidat (MIP-NHS, 26).....	150
6.2.9.2	Maleimidopropionsäure (MIP, 28)	151
6.2.9.3	2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (PDE, 31).....	151
6.2.9.4	2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat (MIP-PDE, 27)	152
6.2.9.5	Hydroxyethylmethacrylamid (HEMAm, 35)	153
6.2.9.6	<i>Bis</i> (2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandiyl)propionat (BMADPP, 32)	153
6.2.9.7	Synthese und Charakterisierung von P(AMor- <i>co</i> -BMADPP)-SH	154
6.2.10	Abbauexperimente der P(AMor- <i>co</i> -BMADPP)-Hydrogele.....	154
6.3	Vorschriften des physikalisch-vernetzten Hydrogelsystems.....	155
6.3.1	Synthese des BTA-Motivs	155
6.3.1.1	3,5-Methoxycarbonylbenzoesäure (41)	155

6.3.1.2	Mono- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-1,8-diaminooctan (44)	155
6.3.1.3	3,5-Methoxycarbonylbenzoesäurechlorid (42).....	156
6.3.1.4	3,5-Methoxycarbonyl- <i>tert</i> -butyl-(8-benzamidooctyl)carbammat (45).....	156
6.3.1.5	5-((8-((<i>tert</i> -Butoxycarbonyl)amino)octyl)carbamoyl)isophthalsäure (46)	157
6.3.1.6	<i>tert</i> -Butyl-(8-(3,5- <i>bis</i> (octylcarbamoyl)benzamido)octyl)carbammat (47) .	158
6.3.1.7	1-(8-Aminooctyl)-3,5-dioctylbenzoltricarboxoamid Hydrochlorid (48).	159
6.3.1.8	<i>N</i> ¹ -(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethyl)- <i>N</i> ³ , <i>N</i> ⁵ -dioctylbenzol-1,3,5-tricarboxamid (BTA-Mal, 40).....	160
6.3.2	Synthese von DTTC-P(AMor)-DTTC	161
6.3.2.1	Didodecyl-1,4-phenylen- <i>bis</i> -(methylen)- <i>bis</i> -trithiocarbonat (2C12, 38)	161
6.3.2.2	Didodecyl((ethan-1,2-diyl <i>bis</i> (azandiyl)) <i>bis</i> (2-cyano-5-oxopentan-5,2- diyl)) <i>bis</i> (carbonotrithioat) (EDA-CDP ₂ , 53)	161
6.3.2.3	RAFT-Polymerisation	162
6.3.3	Aminolyse der DTTC-Endgruppen	162
6.3.4	BTA-Funktionalisierung von HS-P(AMor)-SH.....	162
6.3.5	Charakterisierung des Hydrogelators (Frequenztest).....	163
7.	Abkürzungsverzeichnis	165
8.	Literaturverzeichnis	171
9.	Abbildungsverzeichnis	185
9.1	Abbildungen	185
9.2	Schemata	189
9.3	Tabellen	190
10.	Anhang	193
10.1	Graphen	193
10.2	NMR-Spektren Moleküle	193
10.3	NMR-Spektren Polymere	209
11.	Eidesstaatliche Erklärung	217

1. Einleitung

1.1 Polymere in der Medizin

Die Verwendung von Polymeren in der Medizin gewinnt seit vielen Jahren eine immer größere Bedeutung. Zu den modernen Anwendungsgebieten in der Medizin gehören u.a. Einwegartikel (z.B. Spritzen, Blutbeutel etc.), synthetische Implantatmaterialien, Wirkstoffträgersysteme und die Geweberegeneration.^[1] Um Polymere für eine medizinische Anwendung zu etablieren, müssen verschiedene Anforderungen erfüllt werden. Dazu gehören Sicherheitsaspekte, wie die Nicht-Toxizität des Polymers, die eine wichtige Eigenschaft darstellt. Zusätzlich ist eine Sterilisierbarkeit und somit eine gewisse thermische Belastbarkeit des Polymers erforderlich. Des Weiteren ist es wichtig, dass der Werkstoff effektiv bleibt, d.h. seine Funktion im Körper muss über den Anwendungszeitraum gewährleistet sein. Darüber hinaus sollte das Polymer eine leichte Verarbeitung aufweisen. Die beiden Anforderungen, die Nicht-Toxizität und die Funktionalität, werden unter dem Begriff Biokompatibilität zusammengefasst. Diese beschreibt im Allgemeinen die Eigenschaft eines Werkstoffs mit seiner biologischen Umgebung zu interagieren, ohne einen negativen Einfluss auf den Metabolismus des Organismus auszuüben, was z.B. durch die Funktionalisierung der Werkstoffoberfläche oder die Verwendung geeigneter Materialien erreicht werden kann.^[2] Für Anwendungen in der Gewebekonstruktion (engl.: *tissue engineering*) ist die Biokompatibilität von essentieller Bedeutung.

1.2 Geweberegeneration

Obwohl heutzutage die Möglichkeit der Organtransplantationen besteht, können nicht ausreichend Spenderorgane zur Verfügung gestellt werden, wodurch in Deutschland jährlich ca. 10 % der Patienten auf den Wartelisten sterben.^[3]

Da der Bedarf an Spenderorganen durch Allotransplantation, die sogenannte Gewebetransplantation innerhalb der gleichen Spezies, nicht gedeckt werden kann, wird auch auf Gewebe aus Tieren, wie z.B. Herzklappen von Schweinen, zurückgegriffen. Diese Form der Gewebetransplantation zwischen unterschiedlichen Spezies wird als Xenotransplantation bezeichnet.^[4]

Ein Vorteil der Allotransplantation gegenüber der Xenotransplantation liegt in der Möglichkeit komplette Organe zu transplantieren, da diese vor der Transplantation nicht von Antigenen befreit werden müssen.^[5]

Bei beiden Methoden besteht jedoch die Gefahr, dass das transplantierte Gewebe Abstoßungsreaktionen im Körper hervorrufen kann. Zur Reduktion dieses Risikos muss sich der Patient vor und nach der Transplantation meist dauerhaft einer immunsuppressiven Therapie unterziehen.^[6] Des Weiteren können bei Xenografts durch z.B. porcine endogene Retroviren (PERVs) bei Transplantaten aus Schweinen Infektionen hervorgerufen werden.^[7]

1.2.1 Grundlagen der Geweberegeneration

Die Geweberegeneration (engl.: *tissue engineering* (TE)) beruht auf dem Prinzip, dass aus körpereigenen (autologen) Zellen und einem Gerüst (engl.: *scaffold*) ein geeignetes Implantat hergestellt wird, sodass Abstoßungsreaktionen weitestgehend ausgeschlossen werden können (Abb. 1).

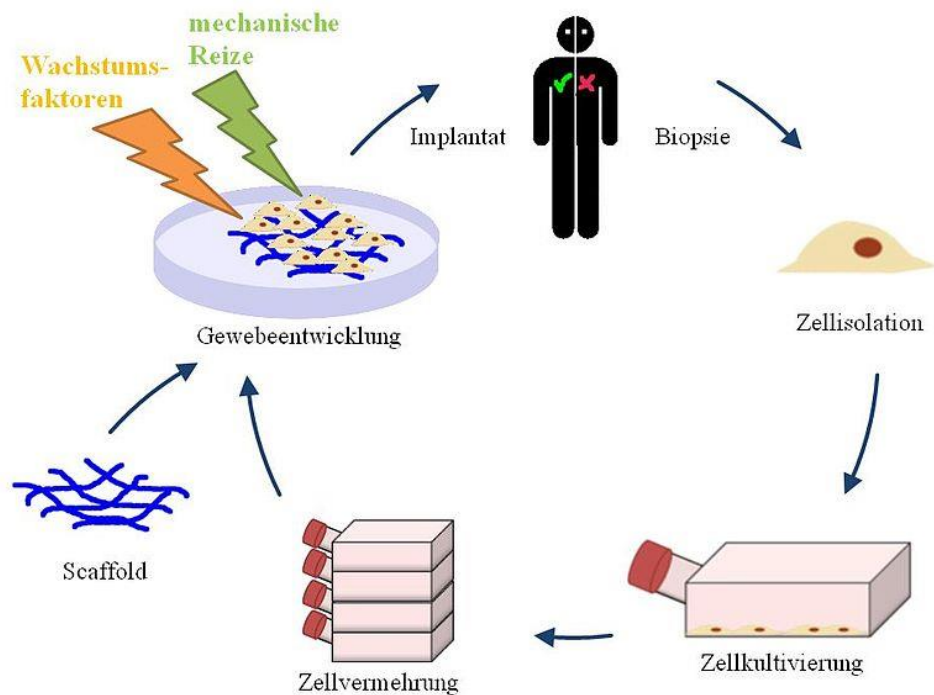


Abb. 1: Konzept der Geweberegeneration.

(https://de.wikipedia.org/wiki/Tissue_Engineering#/media/File:Tissue_engineering_deutsch.jpg)

Dazu werden dem Körper Gewebe entnommen, die benötigten Zellen isoliert und in einem Nährmedium kultiviert. Die Zellen werden danach auf ein Trägermaterial gegeben, wobei durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder durch mechanische Reize und unter Abbau des Trägermaterials die Bildung einer adäquaten, extrazellulären Matrix (EZM) gefördert wird. Wenn das Gewebe die nötige Struktur und Stabilität besitzt, wird dieses dem Patienten implantiert.^[8] TE stellt somit eine vielversprechende Methode dar, um kompatible und maßgeschneiderte Implantate herzustellen. Dabei kann auf eine Vielzahl von Polymeren und bekannten

Herstellungsmethoden zurückgegriffen werden,^[9] wobei die verwendeten Materialien jedoch einer Vielzahl von Anforderungen genügen müssen:^[10]

- 1) Die Biokompatibilität ist das weitaus wichtigste Kriterium für die Anwendung eines Materials in der Geweberegeneration, da hier die Wechselwirkungen mit den Zellen und dem nach der Implantation umgebenden Gewebe und die Toxizität im Vordergrund stehen, wodurch die Biokompatibilität eine absolute Grundvoraussetzung darstellt.
- 2) Die Bioabbaubarkeit spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, da die Zellen während des TE-Prozesses ihre eigene extrazelluläre Matrix aufbauen und von daher die verwendeten *scaffolds* nicht als permanente Implantate gedacht sind. Unter Bioabbaubarkeit wird allgemein die signifikante Änderung der chemischen Struktur eines Materials durch Umwelteinflüsse verstanden,^[11] wobei die Abbauprodukte unter Gesichtspunkten der Biokompatibilität nicht toxisch sein dürfen.
- 3) Die mechanischen Eigenschaften sollten idealerweise denen des zu ersetzenden Gewebes und/oder der ursprünglichen biologischen Umgebung der zu kultivierenden Zellen ähneln. Des Weiteren muss das Material eine ausreichende Stabilität besitzen, damit das Implantat nicht während der Implantation beschädigt wird. Die mechanischen Eigenschaften eines Biomaterials werden über verschiedene physikalische Größen bestimmt, wie z.B. die Steifigkeit, die Härte und die Zähigkeit. Als ein Maß für die Steifigkeit wird in den meisten Fällen das E- bzw. Young-Modul herangezogen, welches den Zusammenhang zwischen Zug und Dehnung bei der Verformung eines festen Materials und somit den Widerstand des Materials gegen diese Verformung beschreibt.^[12]
- 4) Unter der Architektur wird die dreidimensionale makroskopische Struktur eines Biomaterials verstanden, wobei die Porosität eine übergeordnete Rolle spielt, da für eine ausreichende zelluläre Penetration und für den notwendigen Transport von Nährstoffen und Metaboliten eine ausreichende Porosität von großer Bedeutung ist.^[10]
- 5) Die Biofunktionalisierung wird benötigt um bei bioinerten bzw. nicht protein-absorbierenden Materialien eine Bioaktivität zu induzieren. Dafür werden die entsprechenden Materialien in den meisten Fällen mit kurzen Peptidsequenzen modifiziert, wobei diese den bioaktiven Sequenzen von EZM-Proteinen entsprechen.^[13] Diese Funktionalisierungen können dabei über verschiedene Techniken wie nicht-spezifische Adsorption,^[14] photochemische Pfropfung,^[15] selbstassemblierende Monoschichten,^[16] Plasmaabscheidung^[17] oder durch kovalente Anbindung^[18] erreicht werden.
- 6) Der Herstellungsprozess ist ebenfalls von großer Bedeutung, da dieser für eine klinische Anwendung den Richtlinien der „guten Herstellungspraxis“ (engl.: *good manufacturing*

practice; GMP) entsprechen muss. Des Weiteren muss der Prozess, unter kommerziellen Gesichtspunkten, kostengünstig sein und vor allem einen Scale-up ermöglichen, um ausreichende Mengen des Materials produzieren zu können.^[19] Außerdem muss das Material in einer Art und Weise ausgeliefert werden, welches eine direkte medizinische Verarbeitung ermöglicht. Dafür ist es notwendig, dass entsprechende Formulierungen eine gewisse Lagerstabilität ausweisen.

Neben den *scaffolds* sollen jetzt die Zellen als zweite essentielle Komponente des TE betrachtet werden, wobei unterschiedliche Arten von Zellen verwendet werden können. So ist es möglich, durch eine Biopsie Zellen direkt aus dem zu rekonstruierendem Gewebe zu entnehmen. Diese Primärzellen sind jedoch für viele Gewebetypen nicht oder in nicht ausreichender Zahl zugänglich,^[20] da diese Zellen bereits voll differenziert und daher seneszent sind,^[21] was eine eingeschränkte Proliferation zur Folge hat und somit die Kultivierung erschwert wird. Dahingegen zeigen Stamm- und Progenitorzellen vielversprechende Eigenschaften und sollen im nächsten Kapitel näher diskutiert werden.

Stammzellen sind Zellen, die die Fähigkeit aufweisen, sich selbst zu regenerieren und unendlich oft zu teilen.^[22] Neben diesen Haupteigenschaften besitzen Stammzellen noch weitere Merkmale, z.B. die Fähigkeit der asymmetrischen Zellteilung oder das Vorliegen in einer mitotisch ruhenden Form. Aufgrund dieser und weiterer spezieller Merkmale jedes Stammzelltyps ist es schwer, eine allgemein gültige Definition für Stammzellen zu formulieren.^[23]

1.2.2 Proliferation und Differenzierung von Stammzellen

Zellproliferation oder nur Proliferation bezeichnet die Vermehrung von Gewebe und besteht aus Zellteilung und Zellwachstum. Stammzellen sind in der Lage sich sowohl symmetrisch als auch asymmetrisch zu teilen. Die asymmetrische Zellteilung, welche über einen zellintrinsic Mechanismus kontrolliert wird, liefert zwei unterschiedliche Tochterzellen zum einen eine bereits differenzierte Progenitorzelle und zum anderen eine Stammzelle (Abb. 2A). Da aus dieser Variante immer nur eine Stammzelle resultiert, ist es nicht möglich die Stammzellpopulation zu kontrollieren. Eine weitere Möglichkeit der Zellteilung ist die symmetrische Zellteilung, welche zwei identische Tochterzellen, Stamm- oder Progenitorzellen, erzeugt (Abb. 2B). Somit kann sich eine Stammzelle bei einer symmetrischen Zellteilung entweder selbstregenerieren bzw. vermehren oder differenzieren. Welcher Vorgang bevorzugt abläuft, kann mittels verschiedener Faktoren kontrolliert werden und ist vorrangig von ihrer Art und Umgebung abhängig. (Abb. 2C).^[23]

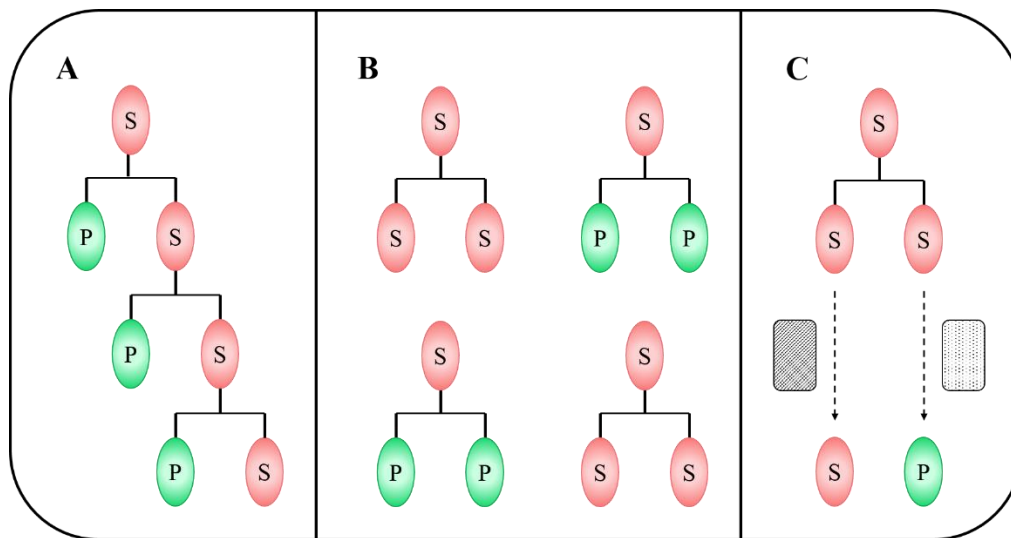


Abb. 2: Mögliche Zellteilungen einer Stammzelle (S: Stammzelle; P: Progenitorzelle)

A: Asymmetrische Zellteilung; B: Symmetrische Zellteilung; C: Kombination aus A und B in Abhängigkeit der lokalen Umgebung.

1.2.3 Potenz von Stammzellen

In der Stammzellbiologie werden Stammzellen unter anderem in Bezug auf ihre Potenz unterschieden. Stammzellen, die in der Lage sind ganze Organismen zu formen, werden als totipotent bezeichnet. Totipotenz wurde bis jetzt nur bei Zygoten (befruchtete Eizellen) und am Meristem (Bildungsgewebe) bei Pflanzen beobachtet. Pluripotente Stammzellen, wie z.B. embryonale Stammzellen, unterscheiden sich von totipotenten Stammzellen in deren Fähigkeit lebende Organismen zu formen, können aber dennoch alle Zelllinien des Körpers ausbilden. Multipotente Stammzellen können verschiedene Zelllinien bilden, welche in der Lage sind ein gesamtes Gewebe auszubilden. Ein Beispiel sind hämatopoetische Stammzellen. Stammzellen, die innerhalb ihres Gewebes zwei oder mehr Zelllinien ausbilden können, werden als oligopotente bezeichnet. Zu dieser Art zählen z.B. neurale Stammzellen. Unipotente Stammzellen sind hingegen lediglich in der Lage eine einzige Zelllinie innerhalb eines Gewebes zu bilden, als Beispiel sind hier die spermatogoniale Stammzellen zu nennen.^[24]

1.2.3.1 Pluripotente Stammzellen

Aufgrund der praktisch unendlichen Selbsterneuerung und der daraus resultierenden unerschöpflichen Quelle an unterschiedlichen Precursor-Zellen, entwickelt sich vor allem die Forschung an pluripotenten Stammzellen in einem rasanten Tempo (Abb. 3).

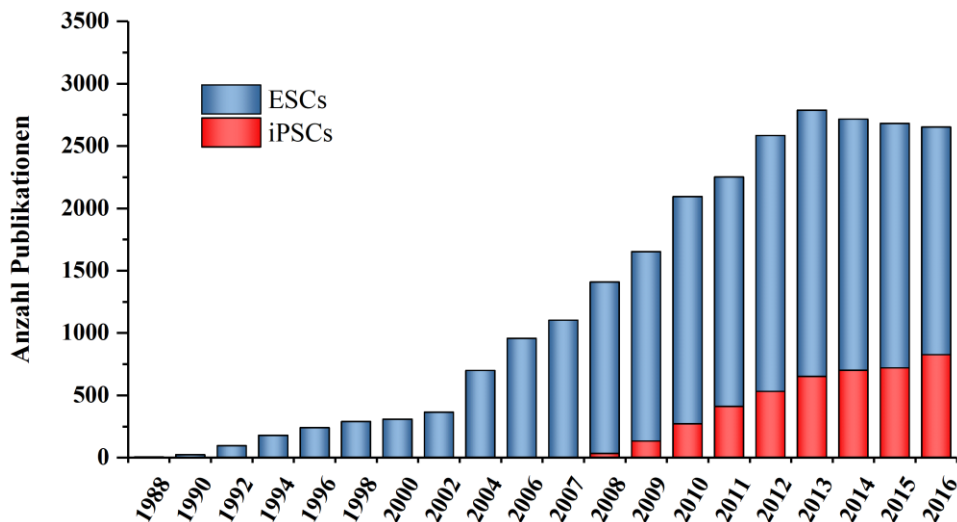


Abb. 3: Publikationen über embryonale (ESCs) bzw. induziert pluripotente Stammzellen (iPSCs) von 1988 – 2016.
(Citation Report Web Of Science)

Dieser Trend wurde vor allem ab 1998 durch die Entwicklung einer Technik zur Isolation und Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) ermöglicht.^[25]

1.2.3.1.1 Embryonale Stammzellen

Stammzellen können generell in embryonale und adulte Stammzellen eingeteilt werden, wobei letztere auch als somatische Stammzellen bezeichnet werden und meist lediglich multipotent sind. Embryonale Stammzellen oder auch frühe Stammzellen sind hingegen pluripotent und können somit die mehr als 220 verschiedenen Zelltypen des menschlichen Körpers bilden.^[26] Aufgrund dieser Fähigkeit werden hESCs ein enormes therapeutisches Potential nachgesagt, wodurch sie in der Lage sein sollten, derzeit unheilbare Krankheiten wie z.B. Diabetes oder Parkinson aber auch die Folgen von z.B. Rückenmarkverletzungen oder Herzinfarkten zu therapieren. Neben dem Einsatz für therapeutische Zwecke können hESCs auch zur Untersuchung der normalen aber auch abnormalen Entwicklung des menschlichen Organismus verwendet werden, weshalb sie auch als Plattform für die Entwicklung und zum Test neuer Therapieansätze dienen können.^[27] hESCs werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen, welche meistens aus überschüssigen Eizellen bei künstlichen Befruchtungen erzeugt werden.^[25] Die isolierte innere Zellmasse wird anschließend auf Fütterzellen (z.B. inaktivierte Fibroblasten) aufgetragen, um so eine humane embryonale Stammzelllinie zu generieren. Ein Problem bei der Verwendung von tierischen Fütterzellen stellen die eingebrachten tierischen Pathogene dar, da diese ein Kontaminationsrisiko darstellen.^[28] Moderne Ansätze umfassen die Verwendung von xenofreien Materialien, wie z.B. Matrigel[®], eine gallertartige Mischung aus extrazellulären Matrixproteinen.^[29] Da der Embryo während der Isolation der inneren

Zellmasse zerstört wird, wurde die Forschung an humanen embryonalen Stammzellen aufgrund von ethischen Aspekten in vielen Ländern reglementiert.^[30]

Eine Möglichkeit humane pluripotente Stammzellen ohne Zerstörung von Embryonen zu generieren, bieten die sogenannten humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs).

1.2.3.1.2 Induziert pluripotente Stammzellen

2006 konnten durch YAMANAKA et al. aus somatischen Mauszellen, z.B. Fibroblasten, durch Zugabe der vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, Klf4 und c-Myc pluripotente Stammzellen mit ähnlichen Eigenschaften wie embryonale Stammzellen generiert werden.^[31] Ein Jahr später konnte diese Technik auf humane Fibroblasten übertragen werden und so hiPSCs hergestellt werden.^[32,33] Obwohl hiPSCs fast identisch zu hESCs sind, weisen sie dennoch Unterschiede bei der Genexpression^[34] und den Methylierungsmustern^[35,36] auf, wobei viele dieser Differenzen noch nicht im Detail verstanden sind.^[37] Des Weiteren stellen die geringe Effizienz der Reprogrammierung und das onkogene Potential der hiPSCs noch große Herausforderungen dieser Methode dar.^[38] Nichtsdestotrotz bieten hiPSCs zahlreiche Möglichkeiten im Bereich der zellbasierten Therapien und patientenbezogene Krankheitsmodelle mit dem Vorteil, dass keine ethischen Richtlinien verletzt werden.^[39]

1.2.3.2 Multipotente Stammzellen

Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen sind adulte Stammzellen (engl.: *adult stem cells* (aSCs)) lediglich multipotent und treten vor allem nach der Geburt auf. Nichtsdestotrotz weisen aSCs ebenfalls ein hohes Selbsterneuerungspotential auf und sind somit maßgeblich an der Regeneration abgestorbener Zellen und beschädigtem Gewebes beteiligt. Daher kommen aSCs in den meisten Gewebetypen vor, wobei sich deren Bezeichnung vom jeweiligen Gewebetyp ableitet. So zählen z.B. hämatopoetische, neurale und mesenchymale Stammzellen zu den aSCs, welche jeweils aus dem entsprechenden Gewebe gewonnen werden können.^[40,41] Lange Zeit wurde angenommen, dass aSCs lediglich innerhalb ihres Gewebetyp differenzieren können. Es konnte jedoch durch neue Studien gezeigt werden, dass aSCs abhängig von ihrer biologischen Umgebung auch Zellen anderer Gewebe bilden können.^[41,42] Generell liegen aSCs im menschlichen Körper in einer bestimmten biologischen Mikroumgebung vor, die allgemein als Stammzellnische bezeichnet wird.^[43] Da diese, wie bereits angedeutet, einen großen Einfluss auf das Stammzellverhalten hat, soll diese im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

1.2.4 Stammzellnischen

Wie bereits erwähnt, sind Stammzellen essentiell für das Wachstum und die Regeneration von vielen Gewebearten. Um die Funktion und das Überleben von Stammzellen zu gewährleisten, sind sie auf Signale und die strukturelle Unterstützung ihrer Mikroumgebung angewiesen. Diese Mikroumgebung wird allgemein als Stammzellnische bezeichnet. Die Hypothese, dass diese existieren, wurde bereits vor über 30 Jahren von SCHOFIELD aufgestellt.^[44] Die Stammzellnische ist ein anatomischer Bereich, der mittels Zelloberflächen- und sekretierter Moleküle die Proliferation, das Schicksal der Tochterzellen und den Schutz der Stammzellen kontrolliert.

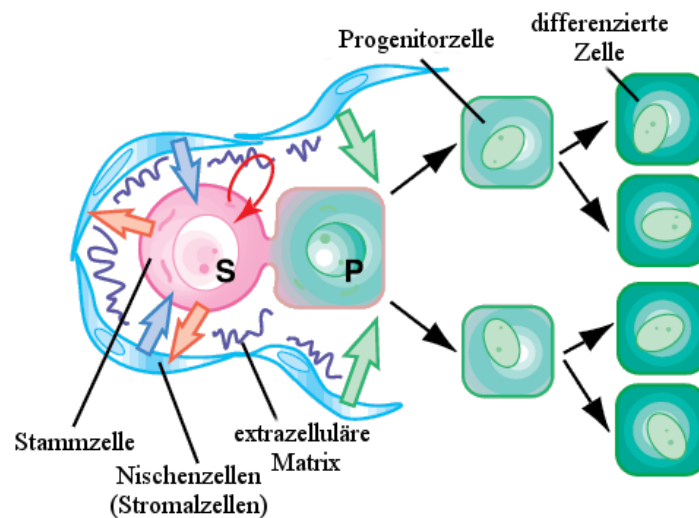


Abb. 4: Schematischer Aufbau einer Stammzellnische.

(From F. M. Watt, B. L. M. Hogan, Science 2000, 287, 1427–1430. Reprinted with permission from AAAS.).

Eine Stammzellnische besitzt einen sehr komplexen Aufbau, der dynamischen Veränderungen unterliegt und auch vom Typ der betrachteten adulten Stammzelle abhängt. Dennoch konnte eine hypothetische „Komponentenliste“ erstellt werden. Diese Bestandteile sind schematisch in Abb. 4 dargestellt, wobei die Stammzelle selbst die wichtigste Komponente einer Stammzellnische darstellt. Des Weiteren besteht eine Nische aus den Stromazellen bzw. Nischenzellen, welche als Hilfszellen (engl.: *support cells*) direkt mit den Stammzellen und allen anderen Zellen (z.B. Progenitorzellen) über Zelloberflächenrezeptoren, *gap junctions* und lösliche Faktoren interagieren. Die Struktur und die Organisation einer Stammzellnische wird durch die EZM bzw. deren Strukturproteine festgelegt,^[45] wobei durch die Adhäsion der einzelnen Zellen an die EZM der strukturelle Zusammenhalt der Stammzellnische gewährleistet wird.

1.2.5 Extrazelluläre Matrix

Für die Anwendung von Stammzellen im Bereich der Geweberegeneration ist die Rekonstruktion der Stammzellnische essentiell, wobei die EZM als strukturelles Grundgerüst im Vordergrund steht. Eine natürliche oder künstliche EZM stellt somit ein geeignetes Trägermaterial für die Geweberekonstruktion dar.

Die EZM ist ein komplexes und dynamisches Gerüst aus Strukturproteinen (Faserproteinen), funktionalen Proteinen, Proteoglykanen und Glykoproteinen, die abhängig vom Gewebe dreidimensional angeordnet sind (Abb. 5). Kollagene gehören hierbei zu der vorherrschenden Proteinfamilie in der EZM und sorgen durch Faserbildung für die Zugfestigkeit, wohingegen Elastin und die Proteoglykane den elastischen Teil der EZM bilden.^[46]

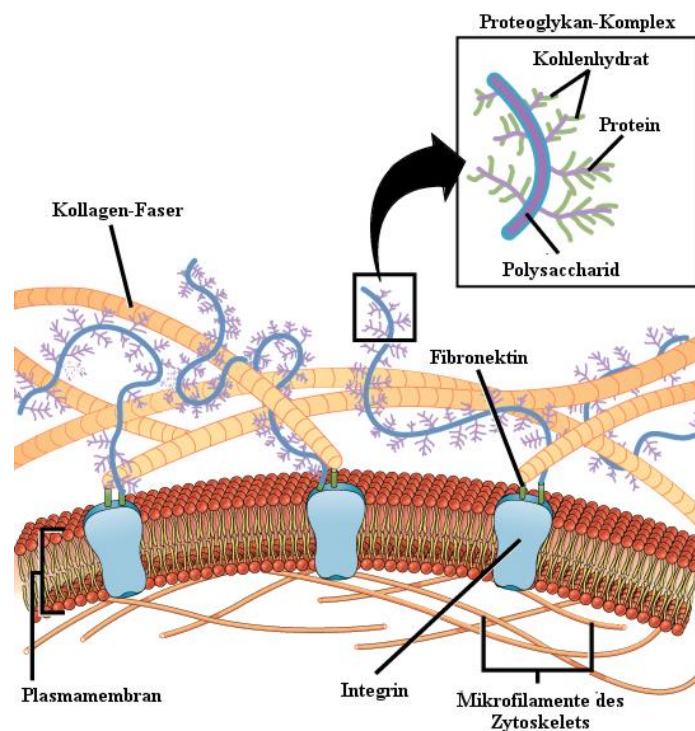


Abb. 5: Schematische Darstellung einer extrazellulären Matrix mit adhärenter Zelle.

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_04_06_01.jpg)

Die meisten Proteine der EZM weisen sowohl strukturelle als auch funktionale Eigenschaften auf. Das prominenteste Beispiel stellt Fibronectin dar, bei dem lange angenommen wurde, dass es eine rein strukturelle Bedeutung hat, jedoch ist dessen Aminosäuresequenz RGD für die Adhäsion vieler verschiedener Zelltypen von großer Bedeutung. Dies geschieht über die Wechselwirkung von RGD mit verschiedenen Transmembranproteinrezeptoren, den sogenannten Integrinen.^[47] Neben dem Fibronectin besitzen noch einige weitere Proteine diese Doppelfunktion, wie z.B. Laminin, Entactin (Nidogen-1) oder Typ I und IV Kollagen.^[48]

Zusätzlich befinden sich in der EZM lösliche Proteine, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine, die in der Lage sind durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren Wachstumsprozesse, Zellmigration, Zellproliferation und Orientierung zu induzieren.^[49]

Für die Synthese einer künstlichen EZM bieten sich Hydrogele an, da diese aufgrund ihrer 3D-Struktur und hydrophilen Eigenschaften ein geeignetes Modell für die natürliche EZM darstellen.

1.3 Hydrogele

Gele sind viskoelastische Materialien, welche aus einem elastischem Netzwerk und einer darin eingeschlossenen Flüssigkeit (Lyogel) bzw. einem eingeschlossenen Gas (Xerogel bzw. Aerogel) bestehen.^[50] In Abb. 6 ist die Klassifizierung von Gelen anhand verschiedener Eigenschaften dargestellt.

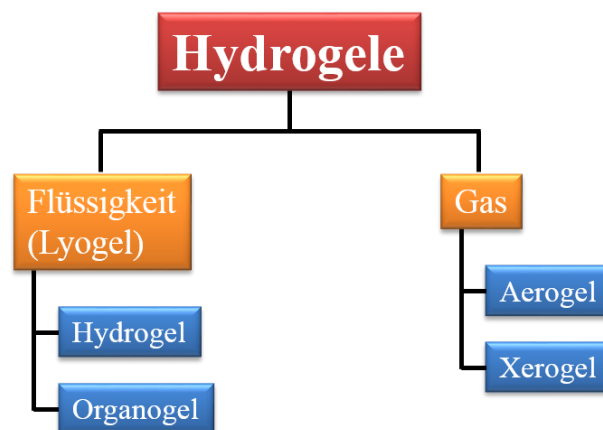


Abb. 6: Klassifizierung von Gelen.

Hydrogele gehören somit zu den Lyogelen und sind in der Lage ein Vielfaches ihres Trockengewichtes an Wasser zu aufnehmen.^[51] Diese hohe Hydrophilie wird insbesondere durch funktionelle Gruppen wie Carboxyl-, Amino-, Amid- und Hydroxylfunktionalitäten entlang der Polymerkette bedingt, wobei diese ebenfalls die Ladung des Hydrogels bestimmen. Anhand dieser und weiterer Eigenschaften, wie Herkunft, Struktur, Zusammensetzung und Beständigkeit, können Hydrogele klassifiziert werden (Abb. 7).

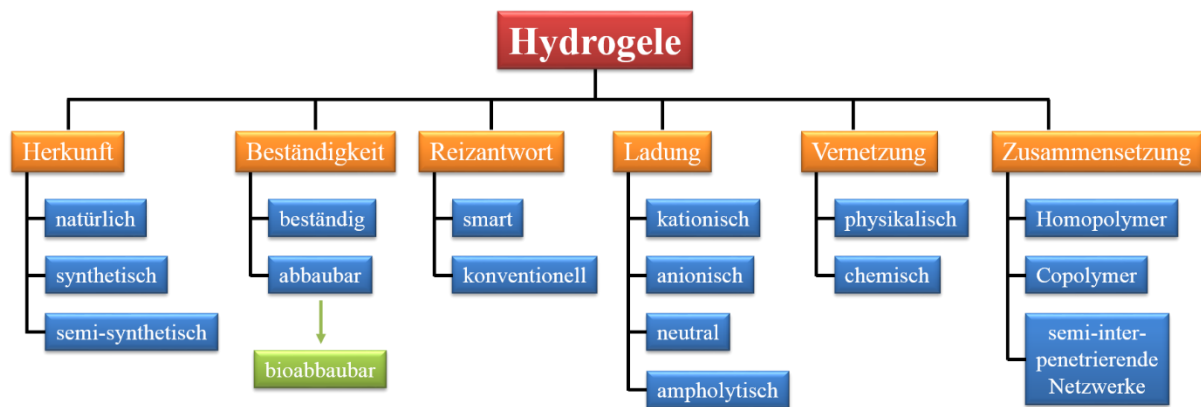


Abb. 7: Klassifizierung von Hydrogelen.

Im Folgenden sollen einige Hydrogelklassen und deren Anwendung im Bereich der Geweberegeneration genauer betrachtet werden.

1.3.1 Klassifizierung von Hydrogelen in der Geweberegeneration

1.3.1.1 Herkunft

Die Polymerketten aus denen Hydrogele bestehen, können sowohl natürlicher, synthetischer aber auch semi-synthetischer Natur sein, wobei die meisten Hydrogelsysteme in der Geweberegeneration bzw. Zellkultur auf Basis natürlicher bzw. semi-synthetischer Polymere sind.^[52,53] Die Bevorzugung von natürlichen Systemen ist vor allem in deren hervorragenden Biokompatibilität und der Möglichkeit des enzymatischen Abbaus natürlicher Polymere begründet, welche daraus resultieren, dass die Biopolymere selbst Bestandteile der EZM sind. Polysaccharide und Faserproteine bilden dabei die beiden Hauptklassen der in der Geweberegeneration verwendeten natürlichen Materialien, da diese in der EZM hauptsächlich für die chemische und physikalische Unterstützung der Stammzelle verantwortlich sind.^[52] So werden heutzutage vor allem Hyaluronsäure,^[54] Kollagen^[55] und Alginat^[56] eingesetzt, welche auch bereits Anwendung in diversen kommerziellen Produkten finden.^[53] Aber auch andere Biopolymere wie Dextran,^[57] Agarose^[58,59] und Matrigel^{®[60,61]} wurden ebenfalls für derartige Applikationen verwendet. Nichtsdestotrotz besitzen Hydrogele natürlichen Ursprungs einige entscheidende Nachteile. So ist eine reproduzierbare Herstellung bzw. konstante chemische Zusammensetzung dieser Biopolymere aufgrund der natürlichen *batch-to-batch*-Variation schwierig, wobei die tierische Quelle ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Weitere Probleme stellen eine eingeschränkte Variation der Materialeigenschaften und mögliche tierische Pathogene dar, da durch letztere Infektionen übertragen werden können. Außerdem weisen Hydrogele auf rein natürlicher Basis oft hohe Abbauraten und dadurch eine geringe mechanische Stabilität auf,^[53,62] da diese meistens lediglich über physikalische Wechselwirkungen miteinander vernetzt sind.^[63]

Von daher werden Biopolymere häufig mittels kleiner Moleküle oder kurzer funktionalisierter Polymere chemisch vernetzt. Diese Art von Systemen werden als semi-synthetisch bezeichnet.^[63–65] Als Alternative zu Biopolymeren werden seit ca. 60 Jahren synthetische Polymere für die Hydrogelsynthese im Bereich der regenerativen Medizin eingesetzt.^[66] Mithilfe dieser Hydrogele ist es möglich die Nachteile, die Biopolymere mit sich bringen, zu umgehen. So können durch kontrollierte Herstellungsprozesse definierte und vor allem reproduzierbare Materialien hergestellt werden. Des Weiteren bietet die Vielfalt an verschiedenen Polymeren schier unendliche Möglichkeiten die Materialeigenschaften auf die jeweiligen Anwendungen anzupassen.^[67] Jedoch besitzen Hydrogele auf Basis synthetischer Polymere im Gegensatz zu Biopolymeren keine biologische Aktivität, weshalb es notwendig ist, diese mit biologisch aktiven Liganden zu modifizieren. Außerdem ist die Bioabbaubarkeit in den meisten Fällen limitiert und aufgrund der Toxizität vieler Monomere müssen synthetische Hydrogele sorgfältig aufgereinigt werden.^[68–70]

1.3.1.2 Vernetzung

Neben der Herkunft der Polymerkette können Hydrogele ebenfalls aufgrund ihrer Vernetzungsart in physikalisch- und chemisch-vernetzte Hydrogele unterteilt werden (Abb. 7).

1.3.1.2.1 Chemische Hydrogele

Chemische Hydrogele zeichnen sich durch eine Vernetzung über kovalente Bindungen aus, wobei diese während der Polymerisation oder polymeranalog erfolgen kann.^[64,71] Dadurch werden chemische Hydrogele in *in-situ* und nachträglich vernetzte Hydrogele unterschieden.

In-situ Vernetzung

Die *in-situ*-Vernetzung stellt die einfachste Methode dar, um polymere Netzwerke bzw. Hydrogele herzustellen. Bei dieser Methode wird der Vernetzer mit den Monomeren oder Makromeren copolymerisiert, wodurch die Vernetzung direkt während der Polymerisation stattfindet.^[72] Von daher sind Hydrogele, die über diese Methode hergestellt werden, immer synthetischer Natur. In Abb. 8 ist die *in-situ*-Vernetzung anhand der Copolymerisation von Acrylaten mit einem bifunktionalen Vernetzer dargestellt.

Das bekannteste Beispiel in der Biomedizin für ein über diese Methode hergestelltes Hydrogel, basiert auf einem Copolymer aus Acrylamid (Am) und Bisacrylamid (BAm), wobei letzteres als Vernetzer fungiert.^[73] Diese Art von Hydrogelen sind ebenfalls für deren Anwendung im Bereich der Gelelektrophorese bekannt und werden analog zu diesen meistens mittels

Ammoniumpersulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylenethyldiamin (TEMED) in wässriger Lösung polymerisiert.^[74] Neben Acrylamid werden auch andere Monomere, wie z.B. *N*-Acryloylglycinamid^[75] oder *N*-Vinyl-2-pyrrolidinon,^[76] zur Herstellung *in-situ*-vernetzter Hydrogele für biomedizinische Anwendungen eingesetzt.

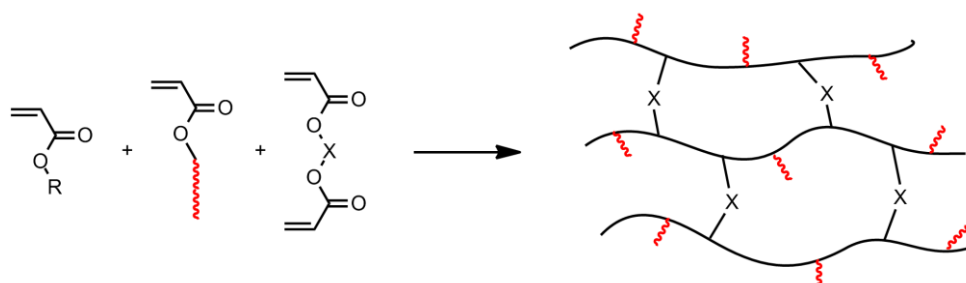


Abb. 8: Darstellung einer *in-situ*-Vernetzung anhand von Polyacrylaten (X: beliebiger *spacer*; roter Rest: beliebige Funktionalität (z.B. Peptide)).

Ein Problem dieser Methode liegt jedoch in der Unlöslichkeit kovalent vernetzter Hydrogele, wodurch lösungsbasierte Charakterisierungsmethoden, wie z.B. GPC oder NMR-Spektroskopie, nicht zur Verfügung stehen. Des Weiteren müssen Funktionalisierungen bereits als Monomere zur Polymerisationslösung hinzugefügt werden, um eine homogene Verteilung zu gewährleisten (Abb. 8). Dies kann jedoch aufgrund der Größe einiger dieser Monomere zu Problemen während der Polymerisation (z.B. Löslichkeitsprobleme^[77]) führen bzw. es kann unter den Polymerisationsbedingungen zu Zersetzungs- und Nebenreaktionen kommen, so dass deren biologische Aktivität verringert wird.^[78] Außerdem werden bei dieser Art der Vernetzung kleine Moleküle, wie z.B. Acrylate, als Monomere eingesetzt, die aufgrund ihrer Toxizität Zellverkapselungen und damit 3D-Zellanwendungen erschweren.^[79] Um diese Probleme zu umgehen, ist es vorteilhaft, die Vernetzung nachträglich durchzuführen.

Nachträgliche Vernetzung

Bei der nachträglichen Vernetzung wird zunächst ein Präpolymer mit funktionellen Gruppen hergestellt, aus welchen anschließend durch die Reaktion mit einem mindestens bifunktionellen Vernetzer das Polymernetzwerk aufgebaut wird (Abb. 9A). Eine weitere Methode um Präpolymere miteinander zu vernetzen, stellt die Reaktionen zwischen zwei komplementär funktionalisierten Polymeren dar (Abb. 9B). Der Vorteil dieser Methode liegt in der Verfügbarkeit der kompletten Polymeranalytik zur Charakterisierung der Präpolymere. Außerdem ist eine Synthese über verschiedene, kontrollierte Polymerisationstechniken möglich. Analog zu den *in-situ*-vernetzten Hydrogele besteht bei dieser Technik das Problem, dass 3D-

Zellanwendungen aufgrund der eingesetzten, meist toxischen Vernetzer erschwert werden,^[72] wenn diese kleiner als 2000 Da sind.^[80]

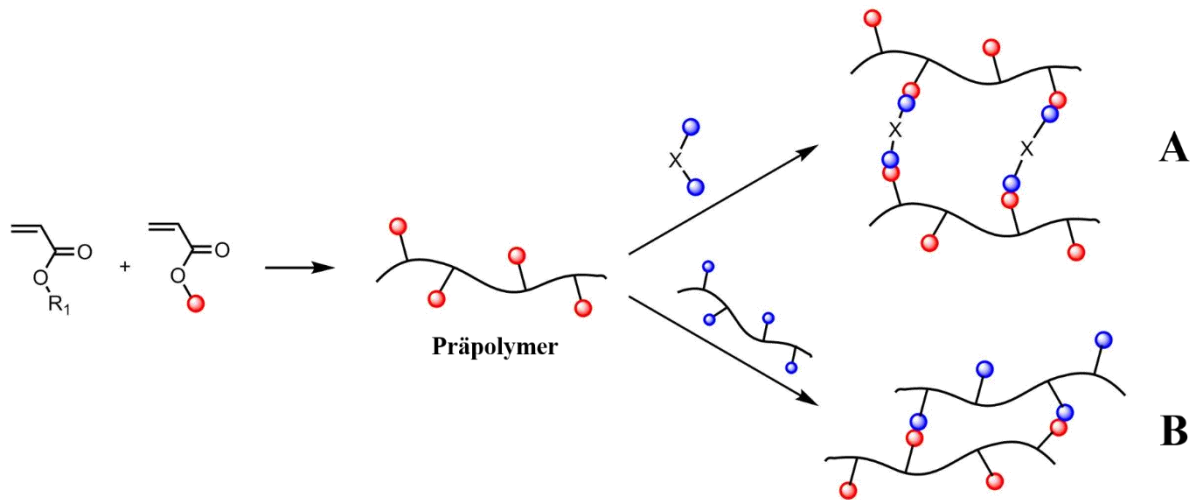


Abb. 9: Darstellung einer nachträglichen Vernetzung anhand eines funktionalisierten Polyacrylats (R₁: Acrylat-Rest; roter Punkt: vernetzbare Gruppe); A: Netzwerkbildung über Reaktion mit bifunktionellem Vernetzer (X: beliebiger *spacer*, blauer Punkt: reaktive Gruppe); B: Netzwerkbildung über Reaktion mit einem komplementär funktionalisiertem Präpolymer.

Wie bereits im vorigen Absatz beschrieben, kann diese Methode verwendet werden, um vor allem natürliche Polymere zu stabilisieren. So werden z.B. zur Variation der Geleigenschaften Kollagene mit Glutaraldehyd^[81] oder Diphenylphosphorylazid^[82] vernetzt. Das Problem der toxischen Vernetzer kann jedoch durch die in Abb. 9B dargestellten Vernetzungsmethode umgangen werden, indem die reaktiven Gruppen des Präpolymers mit denen eines weiteren entsprechend funktionalisiertem Präpolymer umgesetzt werden. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode im Bereich der 3D-Zelleexperimente ist jedoch, dass die Reaktion keine Zugabe von weiteren Kopplungsreagenzien erfordert, keine toxischen Nebenprodukte erzeugt und unter physiologischen Bedingungen abläuft, da ansonsten die Zellen beschädigt werden könnten. Solche bioorthogonalen Reaktionen weisen hohe Selektivitäten auf, liefern hohe Umsätze, laufen bei Raumtemperatur in Wasser ab und produzieren keine oder nicht toxische Nebenprodukte.^[79,83] So werden heutzutage Klick-Reaktionen (Alkin/Azid;^[84] Cyclooctin/Azid^[85,86]), Michael-Additionen (Maleimid/Thiol;^[87] Vinylsulfon/Thiol^[88]), Diels-Alder-Reaktionen (Furan/Maleimid), Disulfidbildung (Thiol/Thiol^[89]), Kondensationen (Amin/Carbonsäure;^[90] Amin/Isocyanat^[91]) und die Staudinger-Ligation (Azid/Triphenylphosphin-Esterderivat^[92,93]) zur Synthese von natürlichen aber auch synthetischen Hydrogelen eingesetzt. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass entsprechende Monomere meistens aufwendig über Mehrstufensynthesen synthetisiert werden müssen.

1.3.1.2.2 Physikalische Hydrogele

Physikalische Hydrogele (Hydrogelatoren) sind über nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, ionische und/oder hydrophobe Interaktionen (z.B. van-der-Waals Kräfte, π - π -stacking), vernetzt. Diese Wechselwirkungen können durch äußere Einflüsse z.B. pH-Wert- oder Temperaturänderungen ausgebildet werden. Im Gegensatz zu chemischen Gelen ist die Vernetzung reversibel und nicht permanent,^[50] wodurch diese über lösungs-basierte Analysemethoden charakterisiert werden können. Des Weiteren wird kein Vernetzer benötigt, wodurch die Integrität der eingebrachten Proteine bzw. Zellen erhalten bleibt.^[94]

Eine bisher gut etablierte Methode zur Herstellung von physikalischen Gelen ist die schnelle Abkühlung einer zuvor erhitzten, übersättigten Lösung eines niedermolekularen Gelators (engl.: *low molecular weight gelator*, LMWG). Bei der Abkühlung der Lösung und der damit einhergehenden Kondensation der Moleküle werden drei Prozesse unterschieden: (A) eine hoch geordnete Aggregation (Kristallisation), (B) eine zufällige Aggregation (amorphes Präzipitat) und (C) ein aus A und B kombinierter Aggregationsprozess (Gel).^[50] Für die Gelbildung von LMWGs in organischen Lösungsmitteln stellt die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen die treibende Kraft dar. Diese Wasserstoffbrücken sind jedoch in Wasser destabilisiert,^[95] so dass der daraus folgende Enthalpieverlust durch einen Entropiegewinn kompensiert werden muss, um eine Gelierung zu ermöglichen. Dieser Zugewinn an Entropie kann durch die Zusammenlagerung hydrophober Gruppen und dem daraus resultierenden hydrophoben Effekt erreicht werden. Hydrophobe Wechselwirkungen haben jedoch den Nachteil, dass sie ungerichtet und schwer zu kontrollieren sind. Aus diesem Grund können hydrophobe Umgebungen genutzt werden, um eine Stabilisierung der Wasserstoffbrücken durch Ausschluss von Wasser und so die Bildung geordneter Strukturen zu ermöglichen.^[96] Gelatoren benötigten Funktionalitäten, die sowohl eine Aggregation als auch eine Solubilisierung ermöglichen. In Wasser gewährleisten die hydrophoben Gruppen die Aggregation, wohingegen die hydrophilen Komponenten zur Löslichkeit beitragen. Moleküle, die sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche enthalten, werden im Allgemeinen als Amphiphile bezeichnet. Grundstrukturen für amphiphile LMWG stellen unter anderen alkylierte Glukonamide,^[97] Salze langkettiger quartärer Amine^[98] oder Lipidstrukturen^[99,100] dar. Neben den LMWG existieren auch zahlreiche thermoresponsive Polymere, welche durch Temperaturänderungen Hydrogele ausbilden können, wobei durch Überschreiten der sogenannten unteren (LCST) bzw. oberen (UCST) kritischen Lösungstemperatur ein Knäuel-Globuli-Übergang stattfindet.^[101,102] Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm) ist der bekannteste Vertreter der thermoresponsiven

Hydrogele^[52] und wurde bereits in zahlreichen biomedizinischen Anwendungen eingesetzt.^[103-105] Neben PNIPAAm wurden z.B. thermoresponsive Copolymere aus Poly(ethylenglykol) (PEG), Poly(propylenoxid) (PPO) und Poly(caprolacton) (PCL) hergestellt.^[106-108] Auf Seiten der natürlichen Hydrogele sind Agarose und Gelatine als Vertreter dieser Polymerklasse zu nennen.^[52,102]

Wie anfangs beschrieben können physikalische Hydrogele ebenfalls über ionische Wechselwirkungen ausgebildet werden. Dazu wird ein wasserlösliches, ionisierbares Polymer mit einem di- oder trivalenten Ion mit entgegengesetzter Ladung vernetzt. Beispiele für ionische Hydrogele stellen mit Calcium vernetzte Alginat^[56] und diverse funktionalisierte Chitosane dar.^[106-108]

1.3.2 Charakterisierung von Hydrogelen

Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, ist die Kontrolle der mechanischen Eigenschaften des eingesetzten Hydrogels von großer Bedeutung, da diese einen Einfluss auf das Stammzellverhalten haben. Von daher ist eine umfassende Charakterisierung der Eigenschaften von Hydrogelen für Biomedizinanwendungen unerlässlich, wofür heutzutage zahlreiche Analysemethoden etabliert sind.^[112] So wird z.B. zur Analyse der chemischen und räumlichen Struktur die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie) verwendet.^[113,114] Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) kann hingegen zur Untersuchung der Oberflächentopografie und Zusammensetzung eingesetzt werden, wobei deren häufigstes Einsatzgebiet die Aufklärung der Netzwerkstruktur darstellt.^[115,116] Eine der wichtigsten Materialkenngrößen für Hydrogele ist das Young- bzw. E-Modul, welches ein Maß für die Steifigkeit bzw. Elastizität darstellt und einen direkten Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von Stammzellen hat.^[117,118] Eine etablierte Methode, um die Geleigenschaften in Form der elastischen und viskosen Anteile zu analysieren, ist die Rheometrie,^[119] welche im folgenden Kapitel näher erläutert werden soll.

1.3.2.1 Rheologie und Rheometrie^[119-121]

Unter Rheologie bzw. Fließkunde wird die Wissenschaft verstanden, welche sich mit dem Verformungs- und Fließverhalten von Materie beschäftigt. Dahingegen stellt die Rheometrie die Lehre der Messung des Fließverhaltens dar. Neben dem Fließverhalten können aber auch Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften und somit über die Geleigenschaften getroffen werden, wobei vor allem Oszillationsmessungen durchgeführt werden.^[121]

Das am häufigsten für Oszillationsmessungen viskoelastischer Materialien verwendete Messsystem ist das Platte-Platte-System, wobei die Probe zwischen zwei planparallelen, kreisförmigen Platten eingebracht wird. Die Vorteile dieses Messsystems liegen in der einfachen Handhabbarkeit, der Möglichkeit durch Aufrauen der Oberfläche die Haftreibung zu erhöhen und der Variabilität des Spaltabstands. Letzteres ermöglicht einen konstanten Druck auf die Probe.^[120] Bei Oszillationsexperimenten wird eine sinusförmige Deformation $\gamma(t)$ mit einer Kreisfrequenz ω auf die Probe ausgeübt, woraus sich folgender Zusammenhang (Gl. 1) zwischen diesen beiden Größen ergibt.

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad \text{Gl. 1}$$

mit $\gamma(t)$: Deformation, γ_0 : Deformationsamplitude, ω : Kreisfrequenz, t : Zeit.

Die Antwort des Systems wird in Form der Schubspannung $\tau(t)$ analog zu Gl. 1 ausgedrückt, jedoch mit dem Unterschied, dass aufgrund einer eventuellen Phasenverschiebung die Gleichung um den Phasenverschiebungswinkel δ erweitert wird (Gl. 2).

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad \text{Gl. 2}$$

mit $\tau(t)$: Schubspannung, τ_0 : Schubspannungsamplitude, δ : Phasenverschiebungswinkel.

Die Phasenverschiebung zwischen der Deformation- und Schubspannungskurve sind anschaulich in Abb. 11 dargestellt, wobei neben der Phasenverschiebung ebenfalls eine Erniedrigung der Amplitude möglich ist. Über den Phasenverschiebungswinkel δ kann nun das Verhalten eines viskoelastischen Materials beschrieben werden, wobei drei Fälle unterschieden werden. Ein ideal elastisches Verhalten liegt bei $\delta = 0$ vor, da hier keine Phasenverschiebung stattfindet und sich so Deformation und Schubspannung in Phase befinden. Dieses Verhalten wird über das sogenannte Hooke-Element (Abb. 10) beschrieben.

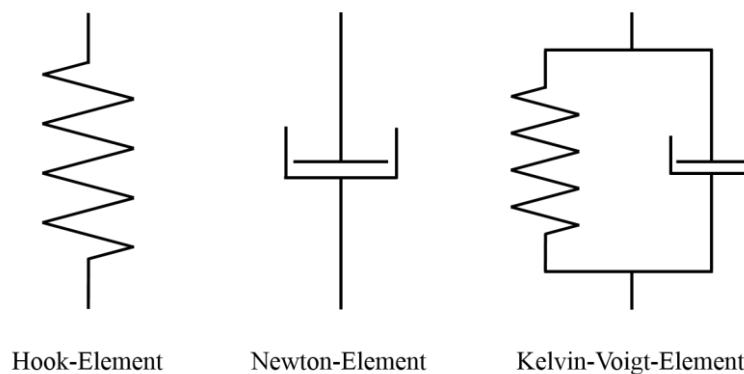


Abb. 10: Schematische Darstellung des Hook-, Newton- und Kelvin-Voigt-Elements.

Der andere Extremfall liegt bei $\delta = \pi/2$ vor, da hier die Schubspannung durch die Phasenverschiebung bei maximaler Deformation gleich null ist, wodurch das Material keinerlei Elastizität aufweist. Solche idealen Flüssigkeiten werden als NEWTON'sche Fluide bezeichnet und über das Newton-Element beschrieben (Abb. 10).

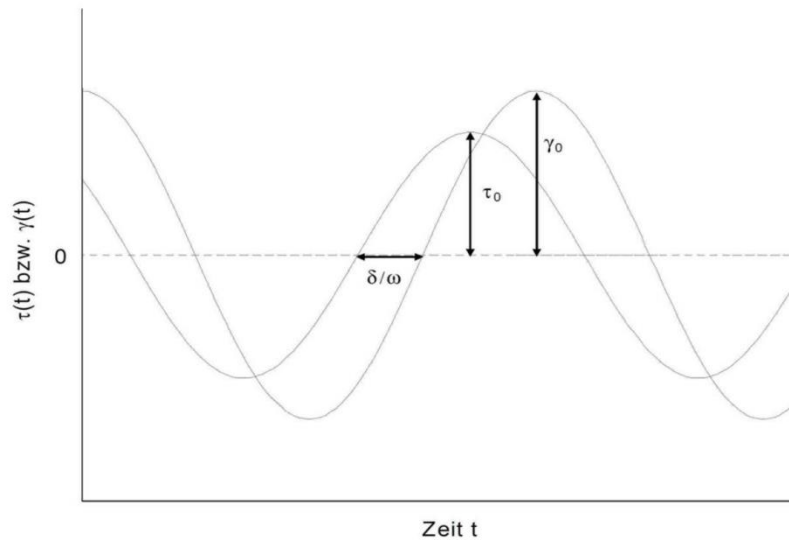


Abb. 11: Darstellung der Deformations- und Schubspannungskurve mit dem Phasenverschiebungswinkel δ .

Der dritte und letzte Fall liegt bei $0 < \delta < \pi/2$ vor und beschreibt ein viskoelastisches Material, welches sowohl elastische als auch viskose Anteile besitzt. Dieses Verhalten wird über das Kelvin-Voigt-Modell beschrieben (Abb. 10), welches sich aus zu einem Hooke-Element parallelgeschalteten Newton-Element zusammensetzt. Somit kann die Gesamtschubspannung $\tau_{ges}(t)$ eines Voigt-Elements durch die Anteile der beiden Elemente beschrieben werden (Gl. 3).

$$\tau_{ges}(t) = \tau_H + \tau_N \quad \text{Gl. 3}$$

mit τ_{ges} : Gesamtschubspannung, τ_H : Schubspannung des Hooke-Elements, τ_N : Schubspannung des Newton-Elements.

Die Beziehung zwischen γ und τ kann beim Hooke-Element über das HOOKE'sche Gesetz mittels des Schubmoduls der Feder hergestellt werden (Gl. 4).

$$\tau_H(t) = G_H \cdot \gamma(t) \quad \text{Gl. 4}$$

mit G_H : Schubmodul der Feder.

Durch Einsetzen von Gl. 1 in Gl. 4 lässt sich der Federanteil in Abhängigkeit der Winkelfunktion beschreiben:

$$\tau_H(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad \text{Gl. 5}$$

Der Schubspannungsanteil des Newton-Elements lässt sich wie folgt darstellen:

$$\tau_N(t) = \eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad \text{Gl. 6}$$

mit η : Viskosität.

Gl. 6 lässt sich aus der Definition der Schubspannung von Newton-Elementen unter Berücksichtigung der Viskosität η und der Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}_N$ herleiten. Die Schergeschwindigkeit ist dabei die erste Ableitung der Deformation.

Durch Einsetzen von Gl. 5 und Gl. 6 in Gl. 3 gilt nun für die Gesamtschubspannung:

$$\tau_{ges}(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + \eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) \quad \text{Gl. 7}$$

Durch Anwenden des Zeigermodells und Einführung des Betrags vom komplexen Schubmoduls kann Gl. 7 wie folgt umgeformt werden:

$$\tau_{ges}(t) = |G^*| \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad \text{Gl. 8}$$

mit $|G^*|$: Betrag des komplexen Schubmoduls.

Der komplexe Schubmodul G^* setzt sich dabei wie folgt zusammen:

$$G^* = G' + i \cdot G'' = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot e^{i \cdot \delta} \quad \text{Gl. 9}$$

mit G^* : komplexer Schubmodul, G' : Speichermodul, G'' : Verlustmodul, τ^* : komplexe Schubspannung, γ^* : komplexe Deformation.

Dabei stellt der Realteil, der Speichermodul G' , die elastische Komponente des Materials dar, wohingegen der Imaginärteil, der Verlustmodul G'' , für die viskosen Anteile steht. Durch Anwenden der EULER'schen Formel und einem nachfolgenden Koeffizientenvergleich lassen sich die einzelnen Anteile G' und G'' in Abhängigkeit der Deformations- bzw. Schubspannungsamplitude und des Phasenverschiebungswinkel δ beschreiben, woraus die für deren Messung relevanten Formeln erhalten werden (Gl. 10; Gl. 11).

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos(\delta) \quad \text{Gl. 10}$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin(\delta) \quad \text{Gl. 11}$$

Eine weitere wichtige Größe ist der Verlustfaktor $\tan(\delta)$, welcher sich aus dem Quotienten von G'' und G' zusammensetzt.

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad \text{Gl. 12}$$

mit $\tan(\delta)$: Verlustfaktor.

Über den Verlustfaktor (Gl. 12) lässt sich einfach abschätzen, ob das Material eher einen viskosen ($1 < \tan(\delta) < \infty$) oder elastischen ($0 < \tan(\delta) < 1$) Charakter aufweist. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Gel nur dann vorliegt, wenn $\tan(\delta)$ kleiner als 1, also G' größer als G'' , ist.

Um eine Vergleichbarkeit zu anderen Messmethoden, welche zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften eingesetzt werden (z.B. Dynamisch-mechanische Analyse), herzustellen, kann aus dem Speichermodul G' der E- bzw. Young-Modul E berechnet werden. Der E-Modul ist dabei über die Poissonzahl oder auch Querkontraktionszahl ν mit G' verbunden (Gl. 13).

$$E = 2G'(1 + \nu) \quad \text{Gl. 13}$$

mit E: E- bzw. Young-Modul; ν : Poissonzahl.

Die Poissonzahl beschreibt allgemein die Volumenänderung, welche bei der Dehnung eines Materials in Längsrichtung, auftreten kann. Da Hydrogele, wie bereits beschrieben, ein gummiähnliches Verhalten aufweisen, bleibt das Volumen während einer Dehnung nahezu konstant. Von daher kann die Poissonzahl näherungsweise auf 0,5 gesetzt werden.^[122,123] Mit dieser Näherung kann Gl. 13 wie folgt vereinfacht werden:

$$E = 3G' \quad \text{Gl. 14}$$

Neben den rheologischen Eigenschaften stellen die sogenannten Netzwerkparameter weitere wichtige Kenngrößen zur Analyse von Hydrogelen dar und sollen daher in nächsten Kapitel genauer diskutiert werden.

1.3.2.2 Netzwerkparameter

Unter den Netzwerkparametern werden in erster Linie die Maschenweite ζ , die mittlere Molmasse zwischen zwei Netzpunkten \overline{M}_c und der Volumenanteil des Hydrogels im gequollenen Zustand $v_{2,s}$ verstanden, wobei Ersteres den Abstand zwischen zwei Netzpunkten beschreibt und von daher auch als Netzkettenlänge bezeichnet wird. Diese ist vor allem für Diffusionsprozesse von großer Bedeutung, da durch Kenntnis der Maschenweite und der Größe des zu diffundierenden Stoffes abgeschätzt werden kann, ob und wie frei dieser durch das Hydrogelnetzwerk diffundiert.^[124]

Eine Möglichkeit zur Berechnung der Netzwerkparameter stellt die Anwendung der Gummielastizitätstheorie auf Hydrogele dar. Diese Annahme kann aufgrund der Ähnlichkeit von Hydrogelen zu kautschukähnlichen Materialien herangezogen werden, welche aus der Eigenschaft, von Hydrogelen bei geringen Deformationen (< 20 %) schnell und vor allem vollständig in ihre Ausgangsposition zurückzukehren (elastische Stressreaktion), resultiert.^[124]

Die Molmasse zwischen zwei Netzpunkten lässt sich nach Herleitung über diverse thermodynamische Betrachtungen wie folgt berechnen:^[122]

$$\tau_0 = \frac{\rho_p RT}{M_c} \cdot \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \quad \text{Gl. 15}$$

mit ρ_p : Polymerdichte, R : universelle Gaskonstante, T : Temperatur, $\overline{M_c}$: mittlere Molmasse zwischen zwei Netzpunkten, $\overline{r_0^2}$: End-zu-End-Abstand des Netzwerkes im entspannten Zustand, r_f^2 : End-zu-End-Abstand der linearen Polymerkette im entspannten Zustand, λ : Deformation.

Gl. 15 stellt einen Zusammenhang zwischen $\overline{M_c}$ und der Schubspannungsamplitude τ_0 her, wodurch $\overline{M_c}$ über rheologische Messungen bestimmt werden kann. Diese Gleichung weist jedoch einige Probleme auf, so ist z.B. der Frontfaktor $\overline{r_0^2}/r_f^2$ oft nicht bekannt, kann jedoch näherungsweise auf 1 gesetzt werden. Des Weiteren gilt Gl. 15 nur für ideale Netzwerke, wo alle Ketten zur Elastizität beitragen und somit auf den elastischen Stress reagieren. Um Netzwerkfehler wie z.B. Kettenenden zu berücksichtigen wird Gl. 15 um einen Term erweitert (Gl. 16).

$$\tau_0 = \frac{\rho_p RT}{M_c} \cdot \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \cdot \left(1 - \frac{2\overline{M_c}}{\overline{M_n}} \right) \quad \text{Gl. 16}$$

mit $\overline{M_n}$: mittlere Molmasse der unvernetzten Polymerkette.

Diese Erweiterung kann jedoch vernachlässigt werden, wenn $\overline{M_n} \gg \overline{M_c}$ ist. Über die Beziehung von G' zu τ_0 (Gl. 17) lässt sich $\overline{M_c}$ in Abhängigkeit zu G' setzen.^[122]

$$\tau_0 = G' \left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2} \right) \quad \text{Gl. 17}$$

$$G' = \frac{\rho_p RT}{M_c} \cdot \frac{\overline{r_0^2}}{r_f^2} \cdot \left(1 - \frac{2\overline{M_c}}{\overline{M_n}} \right) \quad \text{Gl. 18}$$

Da die meisten Hydrogele aus wässrigen Monomer- oder Polymerlösungen hergestellt werden, ist es notwendig, Gl. 18 um einen weiteren Term zu erweitern. Dieser berücksichtigt den

Volumenanteil des Polymernetzwerks im relaxierten Zustand direkt nach der Polymerisation bzw. Vernetzung $v_{2,s}$ und im vollständig gequollenen Zustand $v_{2,r}$.^[125]

$$G' = \frac{\rho_p RT}{M_c} \cdot \frac{\bar{r}_0^2}{r_f^2} \cdot \left(1 - \frac{2\bar{M}_c}{M_n}\right) \cdot \sqrt[3]{\frac{v_{2,s}}{v_{2,r}}} \quad \text{Gl. 19}$$

mit $v_{2,s}$: Volumenanteil des Polymernetzwerks im vollständig gequollenen Zustand, $v_{2,r}$: Volumenanteil des Polymernetzwerks im relaxierten Zustand.

$v_{2,s}$ und $v_{2,r}$ können aus den jeweiligen Quellwertmessungen (Gl. 22), der Polymerdichte sowie der Dichte des Lösungsmittels berechnet werden.

$$v_{2,s} = Q_{V,s}^{-1} = \left[\rho_p \cdot \left(\frac{Q_{m,s}}{\rho_s} + \frac{1}{\rho_p} \right) \right]^{-1} \quad \text{Gl. 20}$$

$$v_{2,r} = Q_{V,r}^{-1} = \left[\rho_p \cdot \left(\frac{Q_{m,r}}{\rho_s} + \frac{1}{\rho_p} \right) \right]^{-1} \quad \text{Gl. 21}$$

$$Q_{m,s} = \frac{m_s - m_t}{m_s} \quad \text{Gl. 22}$$

mit Q_V : volumetrischer Quellwert, Q_m : gravimetrischer Quellwert, ρ_s : Dichte des Lösungsmittels, m_s : Masse im vollständig gequollenen Zustand, m_t : Masse im trockenen Zustand.

Durch Umstellen von Gl. 19 und der zuvor getroffenen Annahme, dass der Frontfaktor gleich 1 gesetzt werden kann, ist es möglich, \bar{M}_c direkt aus dem Speichermodul, der mittleren molaren Masse und den Quelldaten zu berechnen.

$$\bar{M}_c = \left[\left(\frac{G'}{RT\rho_p} \cdot \sqrt[3]{\frac{v_{2,r}}{v_{2,s}}} \right) + \frac{2}{M_n} \right]^{-1} \quad \text{Gl. 23}$$

Wie anfangs beschrieben, ist die Berechnung der Maschenweite zur Abschätzung von Diffusionsprozessen innerhalb des Hydrogels von großer Bedeutung. Diese kann direkt aus dem Volumenanteil des Polymernetzwerks im vollständig gequollenen Zustand und dem End-zu-End-Abstand der freien Polymerkette berechnet werden (Gl. 24).

$$\xi = \frac{1}{\sqrt[3]{v_{2,s}}} \cdot \sqrt{r_0^2} \quad \text{Gl. 24}$$

mit ξ : Maschenweite bzw. Netzkettenlänge.

$v_{2,s}$ kann dabei wie in Gl. 20 gezeigt aus den Quelldaten ermittelt werden, wohingegen $\overline{r_0^2}$ ausgehend von $\overline{M_c}$ über die C-C-Bindungslänge l_c (1,54 Å), des charakteristischen Flory-Verhältnis C_n und der gemittelten Monomermolmasse M_{Mono} berechnet werden kann (Gl. 25).^[126]

$$\sqrt{\overline{r_0^2}} = l_c \cdot \sqrt{\frac{2C_n \cdot \overline{M_c}}{M_{Mono}}} \quad \text{Gl. 25}$$

mit l_c : C-C-Bindungslänge, C_n : charakteristisches Flory-Verhältnis, M_{Mono} : gemittelte Monomermolmasse.

Aus Gl. 24 und Gl. 25 ergibt sich für die Maschenweite folgende Gleichung:

$$\xi = \frac{l_c}{\sqrt[3]{v_{2,s}}} \cdot \sqrt{\frac{2C_n \cdot \overline{M_c}}{M_{Mono}}} \quad \text{Gl. 26}$$

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuen Hydrogelplattform als Trägermaterial für Stammzellen in biomedizinischen Anwendungen unter Berücksichtigung aller Anforderungen, die an ein solches System gestellt werden (Abb. 12).

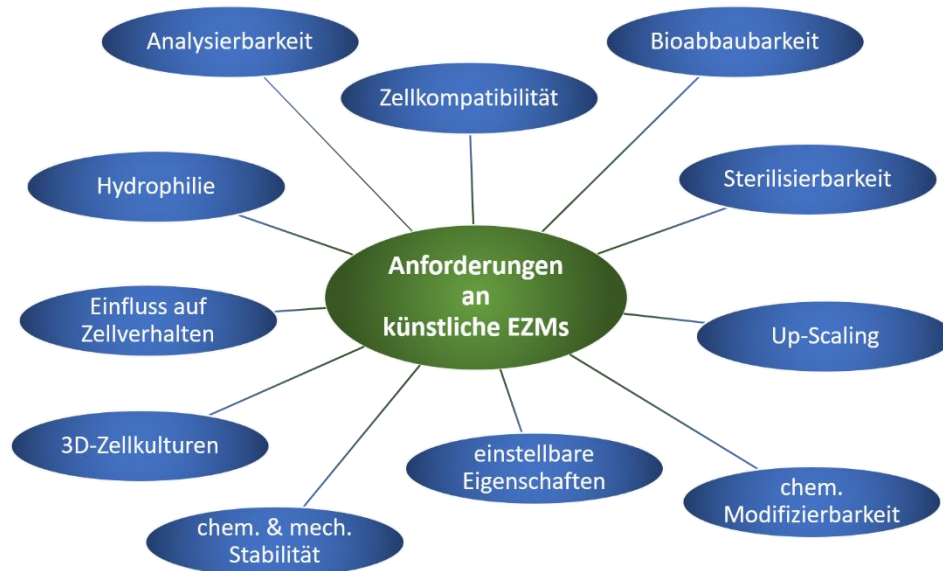


Abb. 12: Anforderungsprofil an künstliche extrazelluläre Matrizen.

Der Fokus des Hydrogelsystems sollte dabei vor allem auf der Analysierbarkeit durch konventionelle Analysemethoden (z.B. $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, GPC) liegen, sodass eine konstante und reproduzierbare Zusammensetzung gewährleistet und ein Parameterscreening ermöglicht wird. Des Weiteren sollten die dazu verwendeten Polymere auf hydrolysestabilen Polyacrylaten bzw. Polyacrylamiden basieren, da diese durch ihre unempfindliche Polymerisation und große Vielfalt an verschiedenen Monomeren bereits viele Vorteile mitbringen.

Die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften und Gelbildung sollte anschließend über rheologische Untersuchungen und Quelltests erfolgen. Des Weiteren sollten aus den gemessenen Werten, wie in Kapitel 1.3.2.2 beschrieben, die entsprechenden Netzwerkparameter bestimmt werden.

Zur Evaluierung der Zytotoxizität sollten Zellexperimente an verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden und der Einfluss mehrerer Parameter, wie z.B. Steifigkeit oder Ligandenkonzentrationen, auf das Zellverhalten untersucht werden.

Abschließend sollte das Hydrogelsystem hinsichtlich Bioabbaubarkeit und der Anwendbarkeit für 3D-Zellapplikationen modifiziert und die Materialeigenschaften ebenfalls über rheologische Messungen analysiert werden.

Zur Realisierung solch eines Materials sollte sowohl ein Ansatz auf Basis chemischer Hydrogele als auch ein physikalisch-vernetztes Hydrogel entwickelt und getestet werden.

3. System auf Basis kovalent-vernetzter Hydrogele

3.1 Chemische Hydrogele in der Stammzellforschung

Wie bereits in Kapitel 1.3.1.2.1 beschrieben, sind chemische Hydrogele über kovalente Bindungen vernetzt und weisen somit eine von äußeren Einflüssen unabhängige mechanische Stabilität auf, sofern sie keine degradierbaren Gruppen enthalten. Von daher werden chemische Hydrogele sowohl auf Basis natürlicher als auch synthetischer Polymere für viele verschiedene Stammzellenanwendungen eingesetzt. Biopolymere werden dabei meistens in semi-synthetischen Ansätzen über synthetische Moleküle vernetzt oder mit polymerisierbaren Gruppen funktionalisiert. Auf diese Weise haben ALSBERG *et al.* Hydrogele aus methacrylatfunktionalisiertem Alginat über eine Photopolymerisation hergestellt, um den Einfluss der mechanischen und biochemischen Eigenschaften auf das Zellverhalten von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) zu untersuchen.^[127] Analog zu diesen Experimenten wurden auch acrylat- bzw. maleimidmodifizierte Kollagen^[128] bzw. Hyaluronsäure^[129] zur Hydrogelsynthese eingesetzt, die jedoch mit einer Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7)-sensitiven Peptidsequenz über eine Michael-Addition vernetzt wurden. SUNG *et al.* entwickelten auf Basis von Gelatine ein injizierbares Hydrogelsystem zum Transport und zur gezielten Differenzierung von hMSCs in Endothelzellen ohne Verwendung von Wachstumsfaktoren. Dabei wurde das Hydrogel durch eine *in-situ* Vernetzung über eine enzymkatalysierte Oxidation der zuvor hydroxyphenylmodifizierten Gelatine in Gegenwart der verwendeten Zellen hergestellt.^[130] Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften haben sich als Alternative zu den natürlichen Hydrogelen zahlreiche Hydrogelsysteme auf Basis synthetischer Polymere etabliert.^[123] Polyethylenglykol stellt dabei das am häufigsten eingesetzte Polymer zur Synthese von vollsynthetischen Hydrogelen für Stammzellenanwendungen dar, wobei dies vor allem in der guten Biokompatibilität, Nicht-Immunogenität, geringen Proteinadsorption und FDA-Zulassung begründet ist.^[70,131] So haben diverse Gruppen ein Hydrogelsystem auf Basis von Poly(ethylenglykol)dimethacrylat (PEGDMA) zur Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Chondrogenese verschiedener embryonalen Stammzellen entwickelt. Dabei wurden die Methacrylatgruppen des PEGDMAs durch Verwendung des Photoinitiators Irgacure® über eine freie radikalische Polymerisation umgesetzt und durch die Bifunktionalität von PEGDMA *in-situ* vernetzt.^[132–134] Des Weiteren wurden PEG-basierte Hydrogelsysteme zum Transport von neuralen Stamm- bzw. Progenitorzellen oder zur Analyse verschiedener Einflüsse auf deren Differenzierungsverhalten synthetisiert. Dazu wurden mitunter die Endgruppen

des PEGs mit Polymilchsäure (PLA), Polyglykolsäure (PGA) oder Poly-L-Lysin (PLL) modifiziert und nachträglich Acrylatfunktionen photovernetzt, wobei über die verschiedenen Endgruppenmodifikationen die biologische Abbaubarkeit gesteuert werden konnte.^[135–137] Neben *in-situ* photovernetzten PEG-Systemen existieren ebenfalls zahlreiche Ansätze, bei denen die Gelierung über eine nachträgliche Vernetzung verläuft. So haben HUBBELL und LUTOLF ein System auf Basis von vinylsulfonmodifiziertem 4-Arm-PEG, welches über eine Michael-Addition mit einem thiol- bzw. aminfunktionalisierten MMP-sensitiven Peptid vernetzt wurde, entwickelt. Des Weiteren können die Vinylsulfonfunktionalitäten zur Immobilisierung von bioaktiven Liganden, wie z.B. RGD-Motiven, verwendet werden.^[138,139] Dieses System wurde z.B. zur Steuerung des Differenzierungsverhalten von Cardioprogenitorzellen eingesetzt.^[140] Ein Nachteil PEG-basierter Systeme stellen jedoch die eingeschränkten Möglichkeiten zur Funktionalisierung dar, da lediglich die Endgruppen funktionalisiert werden können. Aus diesem Grund haben sich Hydrogelsysteme auf Basis von Acrylamid etabliert, welche in den meisten Fällen *in-situ* durch die Copolymerisation mit *Bis*(acrylamid) (Kapitel 1.3.1.2.1) vernetzt werden. Die Vorteile dieses Systems liegen vor allem in der einfachen Herstellung, Aufreinigung und Kontrolle der mechanischen Eigenschaften.^[53,141] Mithilfe solcher Hydrogele haben verschiedene Gruppen das Zellverhalten von z.B. hMSCs oder iPSCs in Abhängigkeit der Steifigkeit untersucht.^[142,143] Neben der Möglichkeit die mechanischen Eigenschaften durch die Anpassung des Monomer/Vernetzer-Verhältnisses einzustellen, können acrylatfunktionalisierte Liganden oder Ladungen durch eine Copolymerisation in das Hydrogel eingebracht werden. Diese Methode wurde in einer Studie von WEBERSKIRCH *et al.* angewandt, bei der der synergistische Effekt von kationischer Ladung und RGD-Funktionalisierung auf das Verhalten von neuronalen Stammzellen (NSCs) untersucht wurde. Dazu wurden drei Hydrogele hergestellt, bei denen Aminoethylmethacrylat (AEMA) als kationische Komponente und eine acrylatfunktionalisierte RGD-Sequenz als bioaktive Komponente mit Acrylamid und Poly(ethylenglykol)-diacrylat (PEGDA) sowohl einzeln als auch in Kombination copolymerisiert wurden.^[144] Am/BAm-Systeme weisen jedoch einige gravierende Nachteile auf. So sind aufgrund der *in-situ* Vernetzung und der Toxizität der Monomere keine 3D-Zellexperimente möglich. Des Weiteren sind die Reaktionen zur Ligandenimmobilisierung limitiert und wegen der Unlöslichkeit der resultierenden Gele wird eine genaue Bestimmung der Polymerzusammensetzung erschwert.^[145]

Der Einsatz von spaltbaren Vernetzern bietet den Vorteil der einfachen Synthese und Aufreinigung der *in-situ* Vernetzung und gewährleistet dabei dennoch eine vollständige Analysierbarkeit.

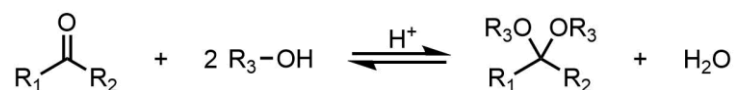
3.2 Spaltbare Vernetzer

Spaltbare Vernetzer zeichnen sich durch eine oder mehrere labile Gruppen zwischen den Netzpunkten aus, welche durch verschiedene Einflüsse, wie z.B. pH-Änderungen oder Redoxumgebungen, gespalten werden können. Dadurch werden die Verbindungen zwischen den Polymerketten aufgelöst, sodass lösliche Polymerketten erhalten werden, welche über Standardanalyseverfahren, wie z.B. NMR-Spektroskopie oder GPC, charakterisiert werden können, jedoch sollten die Reaktionsbedingungen die Polymerstruktur nicht zerstören.

Im Folgenden sollen einige dieser in der Hydrogelsynthese angewandten spaltbaren Vernetzer näher beschrieben werden, wobei nur acrylat- bzw. acrylamidbasierte Vernetzer berücksichtigt werden.

3.2.1 Acetale

FRÉCHET *et al.* entwickelten ein spaltbares Hydrogelsystem zur kontrollierten Freisetzung von Proteinen, wobei die Spaltbarkeit durch den Einsatz eines acetalbasierten Vernetzers ermöglicht wurde.^[146] Acetale zeichnen sich durch zwei Alkoxy- bzw. Aryloxygruppen, die an ein Kohlenstoffatom gebunden sind, aus. Diese werden in den meisten Fällen über eine säurekatalysierte Kondensationsreaktion aus einem Aldehyd und zwei Alkoholen hergestellt (Schema 1).



Schema 1: Allgemeines Reaktionsschema der Acetalbildung aus einem Keton/Aldehyd und zwei Alkoholen.

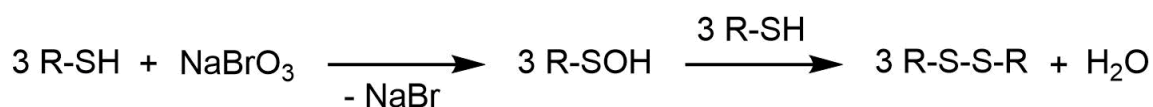
Die Verwendung von Acetalen als spaltbare Vernetzer resultiert aus deren Labilität gegenüber wässrigen Säuren, wohingegen sie unter neutralen und basischen Bedingungen stabil sind. Die Säurelabilität der Acetale wird durch den Substituenten des Aldehyds und die Hydrophilie des gesamten Moleküls bestimmt, da die Reaktivität von der Nucleophilie und der Zugänglichkeit des Carbonylkohlenstoffs abhängt.^[147] Vor diesem Hintergrund haben BULMUS *et al.* gezeigt, dass sowohl die Substitution des Arylrings als auch die Hydrophilie der eingesetzten Alkohole einen Einfluss auf die Halbwertszeiten verschiedener acetalbasierter Diacryloylvernetzer haben.^[148] Bei der Verwendung von Acetalen als spaltbare Vernetzergruppen führt die Freisetzung des Aldehyds jedoch zu einer irreversiblen Spaltung.

3.2.2 *N*-Acylhydrazone

Wie die Acetale, hydrolysieren *N*-Acylhydrazone unter sauren Bedingungen, weshalb sie ebenfalls als spaltbare Vernetzer eingesetzt werden können. Unter *N*-Acylhydrazonen wird das Kondensationsprodukt aus einem Aldehyd bzw. Keton und Acylhydrazinen verstanden. Die Synthese dieser Kondensationsprodukte erfolgt über eine säurekatalysierte Gleichgewichtsreaktion, bei der das Wasser während der Reaktion zur Verschiebung des Gleichgewichtes entfernt wird.^[149] Die Kontrolle dieser Gleichgewichtsreaktion über den pH-Wert ermöglicht eine reversible Spaltung entsprechender Netzpunkte. Von daher werden über *N*-acylhydrazonvernetzte Hydrogele vor allem im Bereich der selbstheilenden Materialien angewandt^[150–152], wobei der Heilungsprozess durch die aus der Dynamik resultierende Spaltung und Neubildung der Netzpunkte gewährleistet wird.^[153] So haben SCHUBERT *et al.* einen bifunktionellen, *N*-acylhydrazonbasierten Vernetzer durch die Kondensation von 4-Formylphenylmethacrylat und Methacryloylhydrazid hergestellt und mit Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) bzw. Triethylenglykolmethylethermethacrylat (TEGMEMA) copolymerisiert. Die daraus hergestellten Hydrogele wurden anschließend auf ihr Selbstheilungsverhalten und die vollständige Wiederherstellung der mechanischen Integrität untersucht.^[152]

3.2.3 Disulfide

Neben den *N*-Acylhydrazonen gibt es zahlreiche weitere Reaktionen, welche der sogenannten dynamischen kovalenten Chemie zuzuordnen sind.^[153] Ein Beispiel für eine Gruppe die bereits in zahlreichen Hydrogelsystemen in Form von spaltbaren Vernetzern zum Einsatz kam, stellen die Disulfide dar.^[154] Als Disulfide werden allgemein chemische Verbindungen bezeichnet, die zwei direkt kovalent gebundene Schwefelatome enthalten. Die Synthese kann zum einen über die Oxidation von zwei Thiolen und zum anderen über eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion erfolgen, wobei beide Reaktionen aufgrund der höheren Nukleophilie des Thiolat-Anions ein basisches Milieu benötigen. Der Mechanismus der oxidativen Disulfidbildung durch z.B. H₂O₂ oder NaBrO₃ verläuft über die Oxidation des zuvor deprotonierten Thiols zur entsprechenden Sulfensäure, welche im nächsten Schritt durch Reaktion mit einem weiteren Thiol unter Wasserfreisetzung zum Disulfid umgesetzt wird (Schema 2).



Schema 2: Oxidation von Thiolen zu Disulfiden mittels Natriumbromat.

HANSEN hat 1976 erstmals ein disulfidvernetztes Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid entwickelt, um Ribonukleinsäuren (RNA) präparativ über eine Gelelektrophorese zu trennen. Das Hydrogel wurde dabei aus Acrylamid und *N,N'*-Bis(acryloylcystamin) (BAC) über eine *in-situ*-vernetzende Copolymerisation hergestellt, wobei BAC in diesem Fall den Disulfidvernetzer darstellt. Die Verwendung von Disulfiden ermöglichte hier die verschiedenen RNA-Fragmente nach erfolgreicher Trennung zerstörungsfrei zurückzugewinnen, indem das Gel durch eine reduktive Spaltung unter milden Bedingungen aufgelöst wurde.^[155] Disulfide haben, genauso wie *N*-Acylhydrazone, den Vorteil, dass ihre Bildung und Spaltung reversibel ist. Im Gegensatz zu *N*-Acylhydrazonen, sind Disulfide jedoch auch in sauren Milieus stabil, weshalb sie in zahlreichen biologischen Umgebungen verwendet werden können. Vor diesem Hintergrund haben HISANO *et al.* dieses System für die Verkapselung von LANGERHANS'schen Inseln eingesetzt und dabei die Reversibilität der Thiol-Disulfid-Reaktion ausgenutzt, um sowohl die Verkapselung als auch die Freisetzung der Zellen zu ermöglichen. Disulfidbasierte Hydrogele können nach der Aufreinigung gespalten und anschließend in Gegenwart von Zellen durch z.B. eine Thiol-Austausch-Reaktion wieder regeliert werden. Dafür haben die Autoren zahlreiche Disulfide und deren zytotoxische Wirkung untersucht.^[156] Diese Vorgehensweise ist notwendig, da die Zellen aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Acrylamids nicht direkt zur Polymerisationslösung hinzugeben werden können. Daher können Zellen bei der Verwendung von nicht reversibel spaltbaren Hydrogelen nicht verkapselt, sondern nach einer Aufreinigung nur oben auf das Gel aufgelegt werden. Basierend auf dieser Arbeit haben ZHU *et al.* und RAVI *et al.* dieses System für ophthalmologische Anwendungen eingesetzt.^[157,158] Dabei konnten RAVI *et al.* die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Gels, wie z.B. die Steifigkeit, durch die Variation der Konzentration der Polymerlösung, die für die Regeliertung eingesetzt wurde, einstellen. PARK und LEE verwendeten BAC als Ersatz für BAM zur Vernetzung von P(NIPAAm), wobei hier die Möglichkeit der reduktiven Spaltung verwendet wurde, um die Analysierbarkeit der Polymere zu erlauben.^[159]

An den genannten Beispielen ist zu sehen, dass sich bei der Verwendung von Disulfidvernetzern die Vorteile der *in-situ* Vernetzung sowie der nachträglichen Vernetzung vereinen lassen, weshalb sie für den Einsatz in biologischen Hydrogelsystemen geeignet sind.

3.3 Design des Hydrogelsystems

Wie bereits beschreiben, soll das zu synthetisierende Hydrogelsystem als Plattform für Zellkulturanwendungen bzw. als Material in der Geweberekonstruktion dienen und dabei alle für diese Materialien aufgestellten Anforderungen erfüllen (Abb. 12).

Dazu wurde ein vollsynthetischer Ansatz basierend auf Polyacrylaten bzw. Polyacrylamiden gewählt, da diese durch ihre Monomervielfalt zahlreiche Möglichkeiten bieten, die Polymerstruktur an die Anforderungen anzupassen. Aufgrund ihrer synthetischen Natur spielen darüber hinaus die Probleme natürlicher Polymere, wie Pathogenübertragung, keine Rolle. Ein weiterer Vorteil von Polyacrylaten ist ihre Herstellung über die freie radikalische Polymerisation (FRP). Die FRP zeichnet sich vor allem durch eine hohe Toleranz gegenüber äußeren Einflüssen aus, wodurch nur auf die Abwesenheit von Sauerstoff und radikalübertragende Lösungsmittel geachtet werden muss. Des Weiteren kann die FRP einfach skaliert und unter milden Bedingungen durchgeführt werden.

Neben den Grundvoraussetzungen, wie Biokompatibilität, Scale-up und chemische bzw. mechanische Stabilität, stand vor allem die Analysierbarkeit der Polymerzusammensetzung im Vordergrund, weshalb es notwendig war, während der Hydrogelsynthese lösliche Polymerketten zu erzeugen. Dies kann, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, durch den Einsatz spaltbarer Vernetzer erreicht werden, wobei für diese Arbeit ein disulfidbasierter Vernetzer verwendet wurde. Diese Wahl ist vor allem in den mit der Reversibilität zusammenhängenden Eigenschaften (Kapitel 3.2.3) begründet. Ein weiterer Vorteil der nach der Spaltung generierten Thiolgruppen ist, dass diese für die benötigte Funktionalisierung mit bioaktiven Liganden verwendet werden können. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, maleimidfunktionalisierte Liganden über eine Michael-Addition zu immobilisieren und den Funktionalisierungsgrad durch die weiterhin vorliegende Löslichkeit der Polymerketten zu bestimmen. Als Vernetzer wurde in dieser Arbeit *N,N'*-Bis(methacryloylcystamin) (BMAC, **3**) verwendet. Das Methacrylamid wurde benutzt, um BMAC über die Methylgruppe eindeutig im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum quantifizieren zu können.

Da das Hydrogelsystem, als Plattformtechnologie, auch Parameterstudien zulassen sollte, durfte das unfunktionalisierte Hydrogel bis auf eine grundlegende Biokompatibilität keinen signifikanten Einfluss auf Zellen haben. Folglich musste aufgrund des bekannten Einfluss von Ladungen auf das Zellverhalten ein neutrales bzw. ungeladenes Monomer als hydrophile Komponente gefunden werden.^[160] Des Weiteren musste das Monomer hydrolysestabil sein, um die chemische und mechanische Stabilität des Hydrogels langfristig gegenüber den Reaktions- und Zellkulturbedingungen zu gewährleisten. Außerdem benötigte das Monomer eine Gruppe, die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein charakteristisches Signal erzeugt, wodurch der entsprechende Anteil quantitativ ermittelt werden kann.

Aus diesen festgelegten Vorgaben ergab sich für das Hydrogel die folgende allgemeine Struktur (Abb. 13).

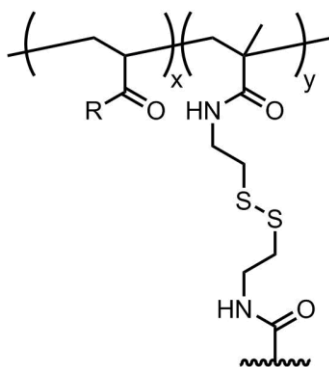
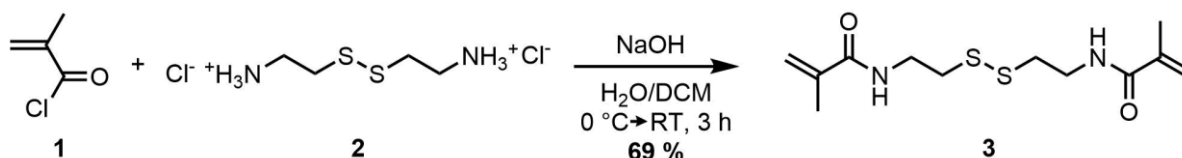


Abb. 13: Allgemeines Design des entwickelten Hydrogelsystems.

Um das für das Hydrogelsystem am besten geeignete hydrophile Comonomer zu finden, wurde nach Entwicklung eines Herstellungsprozesses ein umfangreiches Monomerscreening durchgeführt.

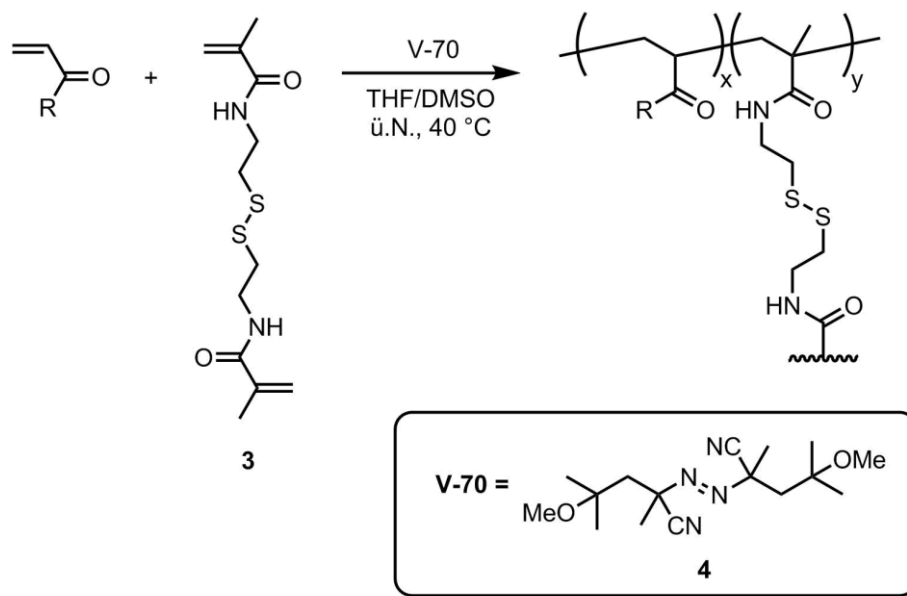
3.4 Entwicklung des Herstellungsprozesses

Die Herstellung der Hydrogele erfolgte basierend auf der von HISANO *et al.* verwendeten Methode,^[156] die jedoch leicht modifiziert wurde. Im ersten Schritt erfolgte die Copolymerisation von BMAC mit dem hydrophilen Monomer, wobei durch die Bifunktionalität von BMAC eine *in-situ* Vernetzung stattfand. Da BMAC nicht kommerziell verfügbar war, musste es zuvor synthetisiert werden. Dazu wurde auf die von ZHANG *et al.* publizierte Methode zur Synthese von BAC zurückgegriffen, bei der Acryloylchlorid mit Cystamin Dihydrochlorid (**2**) in einer Schotten-Baumann-Reaktion umgesetzt wurde.^[161] Diese Reaktion stellt eine einfache Methode zur Synthese von Amiden dar,^[162] wobei die bei der Reaktion als Koppelprodukt entstehende Salzsäure durch Einsatz von wässriger Natronlauge neutralisiert und so eine Protonierung mit einhergehender Inaktivierung des Amins verhindert wird. Des Weiteren werden bei der Synthese von BAC vier Äquivalente an NaOH eingesetzt, um die Nucleophilie des verwendeten Cystamin Dihydrochlorid durch Deprotonierung zu erhöhen. Außerdem kann durch die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel, das hydrophobe BAC, welches während der Reaktion ausfällt, über Filtration und anschließendem Waschen in hoher Reinheit isoliert werden. Anstelle von Acryloylchlorid wurde hier jedoch Methacryloylchlorid (**1**) verwendet (Schema 3), da für das geplante Hydrogel das Methacrylamidderivat benötigt wurde. BMAC konnte über die beschriebene Synthese als weißes Pulver in einer Ausbeute von 69 % isoliert werden.



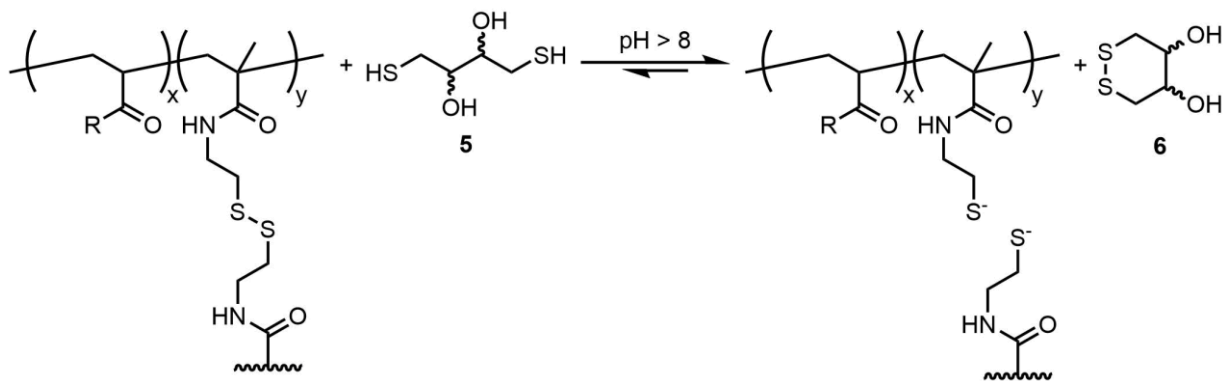
Schema 3: Synthese von BMAC aus Methacryloylchlorid und Cystamin Dihydrochlorid.

Die Copolymerisation von BMAC mit dem hydrophilen Comonomer wurde aufgrund der Unlöslichkeit von BMAC in Wasser in Tetrahydrofuran (THF) bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO) oder in einer Mischung aus beiden Lösungsmitteln durchgeführt. Wegen der Änderung des Lösungsmittels war es nicht möglich, dass ausschließlich wasserlösliche APS/TEMED-Initiatorsystem zu verwenden. Daher wurde auf den Azoinitiator 2,2'-Azo-bis-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70, **4**) zurückgegriffen (Schema 4), da dieser im Gegensatz zu APS/TEMED in THF bzw. DMSO löslich ist und ebenfalls bei Raumtemperatur bzw. Temperaturen um 40 °C verwendet werden kann. Die niedrigen Temperaturen sind notwendig, um eine Verdampfung des Lösungsmittels während der Polymerisation zu vermeiden. Dadurch konnte eine gleichmäßige und reproduzierbare Gelbildung gewährleistet werden.


 Schema 4: Freie radikalische *in-situ*-vernetzende Copolymerisation eines Acrylat- bzw. Acrylamidmonomers und BMAC unter der Verwendung des Azoinitiators V-70.

Nach der Copolymerisation wurde das entstandene Gel in Würfel geschnitten und zur Entfernung von Monomerrückständen in Wasser gequollen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Würfel eine Kantenlänge von 2 – 5 mm aufwiesen, wodurch ein Zusetzen des Filters durch zu kleine Stücke beim Wechseln des Wassers vermieden und dennoch eine ausreichende Diffusion der Rückstände gewährleistet werden konnte. Nach drei Tagen Dialyse wurden die Gelstücke nach Entfernung des Wassers durch die reduktive Spaltung der Disulfidbrücken mittels

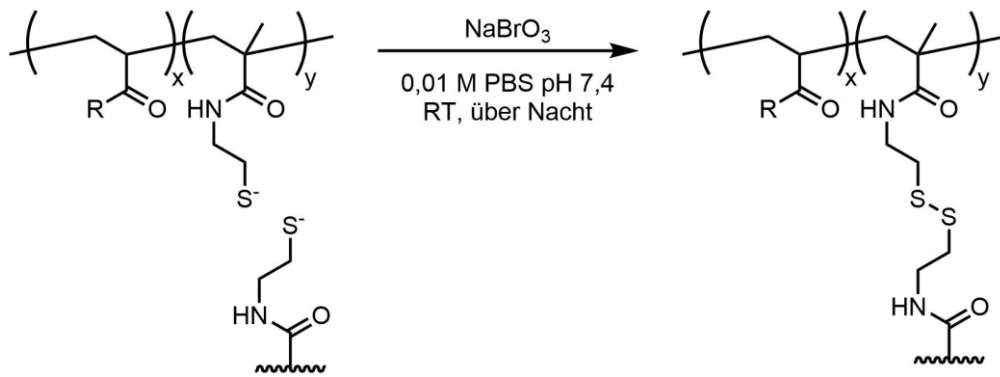
Dithiothreitol (DTT, **5**) verflüssigt, wobei zur Maximierung des Umsatzes fünf Äquivalente an DTT verwendet wurden. DTT wird häufig als Reduktionsmittel zur Spaltung von Disulfidbindungen eingesetzt (Schema 5).^[163] Dabei erfolgt eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion, bei der in diesem Fall die Rückreaktion durch die Bildung des thermodynamisch stabilen Sechsrings (1,2-Dithian-4,5-diol, **6**) verhindert wird und so hohe Umsätze erzielt werden können.^[164,165] Außerdem weist die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion eine sehr starke pH-Abhängigkeit auf, da das Thiolat gegenüber dem Thiol eine 10^{10} -fach höhere Reaktivität besitzt,^[163,165,166] weshalb die Spaltung der Gele bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt wurde.



Schema 5: Reduktive Spaltung eines disulfidhaltigen, acrylatbasierten Hydrogels durch DTT unter basischen Bedingungen.

Nach der Spaltung wurden die löslichen Copolymere lyophilisiert und anschließend zur Entfernung des DTT in einem für das Polymer entsprechenden Fällungsmittel gefällt. Die vollständige Entfernung des Reduktionsmittels war unerlässlich, um spätere Komplikationen bei der Regenerierung bzw. mit den Zellen zu vermeiden.

Wie bereits erwähnt, bieten disulfidvernetzte Systeme aufgrund der Reversibilität der Thiol-Disulfid-Redoxreaktion die Möglichkeit die Copolymere nach der Spaltung der entsprechenden Hydrogele durch Verwendung eines Oxidationsmittels zu regenerieren. Für die Regenerierung der in dieser Arbeit synthetisierten Copolymere wurde Natriumbromat verwendet, da hierbei im Gegensatz zu Wasserstoffperoxid keine Gase entstehen, wodurch die Integrität der resultierenden Gele nicht durch eingeschlossene Gasbläschen beeinflusst wird. Für die Gelbildung wurde das Copolymer mit einer definierten Konzentration in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, engl.: *phosphate buffered saline*) gelöst und anschließend mit einer NaBrO_3 -Lösung versetzt (Schema 6). PBS-Puffer wurde verwendet, da dieser als isotonische Salzlösung dem osmotischen Druck des menschlichen Körpers entspricht.^[167] Die Verwendung einer Copolymerlösung zur Gelbildung bietet des Weiteren die Möglichkeit, die Gele in jede erdenkliche Form zu gießen.



Schema 6: Regelung durch Oxidation der polymergebundenen Thiole durch Natriumbromat.

Nach der Entwicklung des Herstellungsprozesses wurde dieser als Test zur Evaluierung der verschiedenen Monomere verwendet.

3.5 Monomerscreening

Wie bereits in Kapitel 3.3 angedeutet, musste das hydrophile Monomer, welches für das Hydrogelsystem verwendet werden sollte, zahlreichen Anforderungen genügen. So musste es sowohl ladungsfrei als auch hydrolysestabil sein. Des Weiteren war im Monomer eine Gruppe erforderlich, die durch ein eindeutiges Signal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum charakterisiert werden kann. Einen der wichtigsten Aspekte stellt jedoch eine ausreichende Hydrophilie des Monomers dar, da sich die Hydrophilie des Systems durch das Einbringen von Funktionalisierungen nicht signifikant ändern darf, um einen Einfluss auf das Quellverhalten und somit auf die mechanischen Eigenschaften zu verhindern.

Acrylamid hat sich, aufgrund seiner hohen Hydrophilie, niedrigen Kosten und einfachen Handhabbarkeit, als das am häufigsten verwendete Vinylmonomer zur Synthese von biomedizinischen Hydrogelen etabliert. Des Weiteren weisen polyacrylamidbasierte Hydrogele keine Toxizität auf und sind bereits in Form von fertigen Reaktionslösungen kommerziell erhältlich.^[53] Polyacrylamid hat jedoch den entscheidenden Nachteil, dass es unter Zellkulturbedingungen zur Hydrolyse neigt.^[168] Durch die Hydrolyse der Amidgruppen zu Carboxylatgruppen erhöht sich die Hydrophilie des Systems, wodurch das Quellverhalten des Materials und somit auch dessen mechanische Eigenschaften beeinflusst werden.^[169,170] Des Weiteren entstehen durch die Bildung von Polyacrylsäure negative Ladungen. Da das Zellverhalten sowohl von der Festigkeit als auch von der Ladung des eingesetzten Materials abhängt, können damit keine stabilen Zellkulturbedingungen gewährleistet werden. Neben der geringen Hydrolysestabilität weist Acrylamid auch keine Gruppe auf, die ein spezifisches Signal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erzeugt, wodurch eine genaue Quantifizierung der Zusammensetzung

erschwert wird. Infolgedessen wurde Acrylamid bei der Auswahl der Monomere für das Monomerscreening nicht berücksichtigt.

Die für das Screening ausgewählten Monomere waren: Dimethylacrylamid (DMAm), Acryloylmorpholin (AMor), Hydroxyethylacrylat (HEA), Hydroxyethylacrylamid (HEAm), Hydroxymethylacrylamid (HMAm) und Poly(ethylenglykol)methyletheracrylat 480 (PEGMEA480), wobei ausschließlich kommerziell erhältliche Monomere berücksichtigt wurden, um eine einfache und leicht zugängliche Hydrogelsynthese zu ermöglichen. DMAm wurde bereits häufig zur Herstellung von Hydrogelen eingesetzt,^[171,172] jedoch weist es im Gegensatz zu Acrylamid durch sein tertiäres Amid eine wesentlich höhere Hydrolysestabilität auf.^[168] Neben DMAm wurde mit AMor ein weiteres disubstituiertes Acrylamid getestet, welches bereits in Hydrogelen verarbeitet wurde. P(AMor) besitzt neben der Hydrolysestabilität weitere vorteilhafte Eigenschaften für das zu entwickelnde System, wie z.B. seine Ähnlichkeit zu PEG und die gute Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln.^[173,174] HEA, HEAm und HMAm gehören zur Klasse der hydroxyfunktionalisierten Monomere, die vor allem aufgrund der hohen Hydrophilie und Biokompatibilität ihrer entsprechenden Polymere oft für die Synthese von Hydrogelen verwendet werden.^[175,176] Bei PEGMEA480 handelt es sich um ein PEGyliertes Acrylat, bei dem das PEG neun Wiederholungseinheiten und ein methyliertes Kettenende aufweist. Allgemein vereinen PEGylierte Acrylate die Vorteile von PEG, wie z.B. die Biokompatibilität und FDA-Zulassung,^[177] mit der Monomervielfalt der radikalischen Polymerisation. Des Weiteren kann die Hydrophilie des Polymers durch die Kettenlänge der PEG-Seitenkette eingestellt werden, wodurch z.B. Amphiphile hergestellt werden können.^[178]

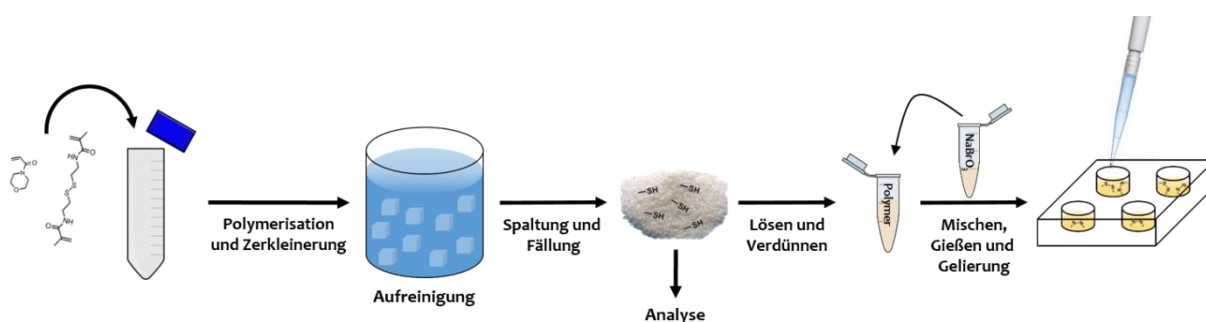


Abb. 14: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.

Nach der Auswahl der Monomere wurden diese auf ihre Eignung für das Hydrogelsystem untersucht, wobei jedes Monomer den in Kapitel 3.4 beschriebenen Herstellungsprozess (Abb. 14) durchlaufen hat. Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Ergebnisse des Monomerscreenings nach den einzelnen Abschnitten des Herstellungsprozesses.

Monomer	AMor	DMAm	HEA	HEAm	HMAm	PEGMEA480
Copolymerisation ^a	+	+	+	+	+	+
Quellung ^b	+	+	+	+	+	+
Spaltung ^c	+	+	+	+	+	-
Fällung	+ ^d	+ ^e	+ ^e	+ ^e	+ ^f	
Ausbeute ^g	81 %	70 %	73 %	87 %	85 %	
Regelierung ^h	+	+	n.l. ⁱ	n.l. ⁱ	n.l. ⁱ	

a) Monomer/BMAC 96/4, Initiator: V-70 (1 mol%), $c(\text{Monomer}) = 1 \text{ M}$ in DMSO, 40 °C, über Nacht; b) Quellung in Wasser für 2-3 Tage; c) 5 eq. DTT (bezogen auf die eingesetzte Menge BMAC), pH = 8; d) Wasser (Lösungsmittel), *iso*-Propanol (Fällungsmittel); e) Methanol (MeOH, Lösungsmittel), Diethylether (Et₂O, Fällungsmittel); f) Wasser (Lösungsmittel), Aceton (Fällungsmittel); g) gravimetrisch bestimmt; h) $c(\text{Polymer}) = 10 \text{ \% (w/v)}$ in PBS (pH = 7,4), 1 eq. NaBrO₃ (bezogen auf theoretische Menge an Thiolen) als Oxidationsmittel.; i) Es ließ sich keine homogene Polymerlösung herstellen (nicht löslich).

Im ersten Schritt wurden die Monomere jeweils mit BMAC in einem Verhältnis von 96/4 (Monomer/BMAC) copolymerisiert, wobei für alle Monomere Gele erhalten werden konnten. Nach der anschließenden Zerkleinerung wurden die Gele auf ihr Quellverhalten in Wasser untersucht, da eine gute Quellung für die Entfernung der Restmonomere und des Lösungsmittels unerlässlich war. Dabei konnte für alle Monomere eine deutliche Erhöhung des Volumens der einzelnen Gelstücke festgestellt werden, wodurch eine ausreichende Aufreinigung gewährleistet war. Im folgenden Schritt wurden die Gelstücke nach der Abtrennung des Dialysewassers mit der entsprechenden Menge einer auf pH 8 eingestellten DTT-Lösung versetzt, um so die Spaltung der Gele zu initiieren. Dabei zeigte sich, dass sich alle Gele bis auf das aus PEGMEA480 hergestellte Gel verflüssigen ließen. Eine mögliche Erklärung für die nicht erfolgte Spaltung bietet die Verunreinigung industriell hergestellter Poly(ethylenglykol)methyletheracrylate durch deren Diacrylatderivate.^[179] Prinzipiell werden PEGMEAs über eine Schotten-Baumann Reaktion aus Acryloylchlorid und Poly(ethylenglykol)monomethylether (PEGME) hergestellt, wobei Letzteres durch die Methylierung einer Hydroxylendgruppe des entsprechenden PEGs synthetisiert wird. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von PEGME und PEG ist es nicht möglich, nichtreagiertes PEG vollständig destillativ abzutrennen, was zur Folge hat, dass in der darauf folgenden Acrylierung neben PEGMEA auch das Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) entsteht. Bei der anschließenden Hydrogelsynthese bildet PEGDA nichtspaltbare Netzpunkte, weshalb das Gel nicht vollständig gespalten bzw. verflüssigt werden kann. Des Weiteren ist es denkbar, dass aufgrund der langen PEG-Seitenketten die Zugänglichkeit der Disulfidgruppen für das DTT durch sterische Hinderung verringert wird. Nach der Spaltung wurden die Copolymere

zur Entfernung des DTTs in einem entsprechenden Lösungsmittel aufgenommen und aus einem geeigneten Fällungsmittel ausgefällt, wobei auf die Löslichkeit von DTT im Fällungsmittel geachtet werden musste. Folglich wurde für die Copolymere mit DMAm, HEA und HEAm ein System aus MeOH und Et₂O, für HMAm Wasser und Aceton und für AMor Wasser und *iso*-Propanol verwendet, wobei Ersteres immer das Lösungsmittel und Letzteres das Fällungsmittel darstellte. Nach der Aufreinigung und Trocknung im Hochvakuum konnten die Copolymere in Ausbeuten von 70 – 87 % isoliert werden. Im letzten Schritt sollten die Copolymere schließlich auf ihre Fähigkeit zur Regelierung untersucht werden. Dafür wurden Polymerlösungen mit einer Konzentration von 10 % (w/v) in 0,01 M PBS-Puffer (pH 7,4) hergestellt. Nach der Zugabe des Puffers zeigten die hydroxylfunktionalisierten Copolymeren eine unmittelbare Quellung, weshalb diese nicht homogen gelöst werden konnten. Eine mögliche Erklärung für dieses Quellverhalten ist, dass hydroxylfunktionalisierte Polyacrylate bzw. Polyacrylamide in wässrigen Medien Netzpunkte über physikalische Wechselwirkungen ausbilden. Diese resultieren aus der Polarität und der Ausbildung von Wasserstoffbrücken.^[180,181] Dahingegen konnten die Copolymere aus AMor und DMAm erfolgreich regeliert werden und wären so als Monomere für das herzustellende Hydrogelsystem geeignet. Als hydrophiles Monomer wurde jedoch AMor ausgewählt, da dessen Copolymer sowohl eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit von über 50 % (w/v) aufwies, als auch durch die Löslichkeit in den meisten organischen Lösungsmitteln eine Vielzahl an möglichen Funktionalsierungen ermöglicht.

3.6 Synthese und Charakterisierung von P(AMor-*co*-BMAC)-SH

Nachdem sich AMor als geeignetes hydrophiles Monomer herausgestellt hatte, wurde der Herstellungsprozess (Kapitel 3.4) für dieses optimiert, um dadurch eine reproduzierbare Synthese des Copolymers P(AMor-*co*-BMAC)-SH zu gewährleisten.

3.6.1 Modifikation der Copolymersynthese

Dazu wurde im ersten Schritt das Lösungsmittel der Copolymerisation angepasst, da DMSO zwar eine homogene Polymerisation ermöglicht, jedoch für die anschließende Dialyse nicht optimal ist. So waren die meisten Gelstücke nach drei Tagen im Inneren noch opak, wodurch von einer unvollständigen Quellung und somit von einer unvollständigen Entfernung der Monomer- und Lösungsmittelrückstände ausgegangen werden konnte. Die unvollständige Quellung lässt sich möglicherweise auf die im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln hohe Viskosität von DMSO zurückführen ($\mu(20\text{ °C}) = 2\text{ cP}$),^[182] wodurch die Diffusion der DMSO-Moleküle aus dem Netzwerk verlangsamt wird.^[183] Des Weiteren sind sowohl DMSO als auch

P(AMor) für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bekannt,^[184,185] sodass sich Wechselwirkungen zwischen dem Polymer, Wasser und DMSO ausbilden könnten, welche ebenfalls die Diffusion beeinträchtigen. Daher wurde mit THF ein Lösungsmittel gewählt, das sowohl eine niedrigere Viskosität ($\mu(20\text{ °C}) = 0,55\text{ cP}$)^[182] als auch eine geringere Neigung zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen aufweist. Die Fähigkeit eines Lösungsmittels zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken kann dabei über den Energiebeitrag der Wasserstoffbrücken des HANSEN-Löslichkeitsparameters abgeschätzt werden.^[186] Ein Problem bei der Verwendung von THF stellte die geringe Löslichkeit von BMAC dar, wodurch keine homogene Polymerisationslösung hergestellt werden konnte, die jedoch zur Gewährleistung einer reproduzierbaren und gleichmäßigen Polymerisation bzw. Monomerverteilung notwendig ist. Aufgrund der sehr guten Löslichkeit von BMAC in DMSO und der Mischbarkeit von THF und DMSO wurde BMAC in einer minimalen Menge DMSO gelöst und anschließend zur restlichen Reaktionslösung gegeben, wodurch eine homogene Lösung erhalten werden konnte. Des Weiteren musste bei der Verwendung von THF darauf geachtet werden, dass nichtstabilisiertes Lösungsmittel verwendet wurde, da bei kommerziell erhältlichem THF Stabilisatoren, wie z.B. Butylhydroxytoluol (BHT), zugesetzt werden, um die Entstehung von Peroxiden bei längerer Lagerung^[187] und so mögliche Explosionen zu vermeiden.^[188] Die Stabilisatoren fungieren dabei als Radikalfänger, welche eine Reaktion mit Sauerstoff zu den entsprechenden Peroxiden verhindern. Diese können jedoch bei einer radikalischen Polymerisation zu Kettenabbruchreaktionen und folglich zu einer breiten Molmassenverteilung führen. Trotz dieser Nachteile erwies sich THF als ideales Lösungsmittel, da bereits nach 6 h in Wasser eine vollständige Transparenz der Gelstücke beobachtet wurde, weshalb von einer vollständigen Quellung ausgegangen werden konnte.

Neben dem Austausch des Reaktionslösungsmittels war es notwendig, die Aufreinigung durch die Fällung des Copolymers nach der Spaltung zu modifizieren, wobei vor allem auf eine vollständige Entfernung von DTT ohne große Ausbeuteverluste geachtet wurde. Die Ausbeuteverluste resultierten dabei in den meisten Fällen aus der Notwendigkeit den Fällungsprozess mehrmals zu wiederholen, um das Polymer in hoher Reinheit zu erhalten. Aus diesem Grund wurde ein System benötigt, welches eine quantitative Fällung des Copolymers bei vollständiger Entfernung von DTT ermöglichte. Zum Fällen von P(AMor-*co*-BMAC)-SH wurde, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, Wasser als Lösungsmittel und *iso*-Propanol (IPA) als Fällungsmittel verwendet, da dadurch ein Austausch des Lösungsmittels für die Fällung nach der reduktiven Spaltung in Wasser nicht erforderlich war. Ein Problem bei diesem System lag in der sehr guten Mischbarkeit von IPA und Wasser, weshalb sehr genau auf deren Verhältnis

geachtet werden musste. Des Weiteren wurde mit kaltem IPA gearbeitet, da dadurch die Ausbeute durch die Reduktion des Löslichkeitsproduktes verbessert werden konnte.

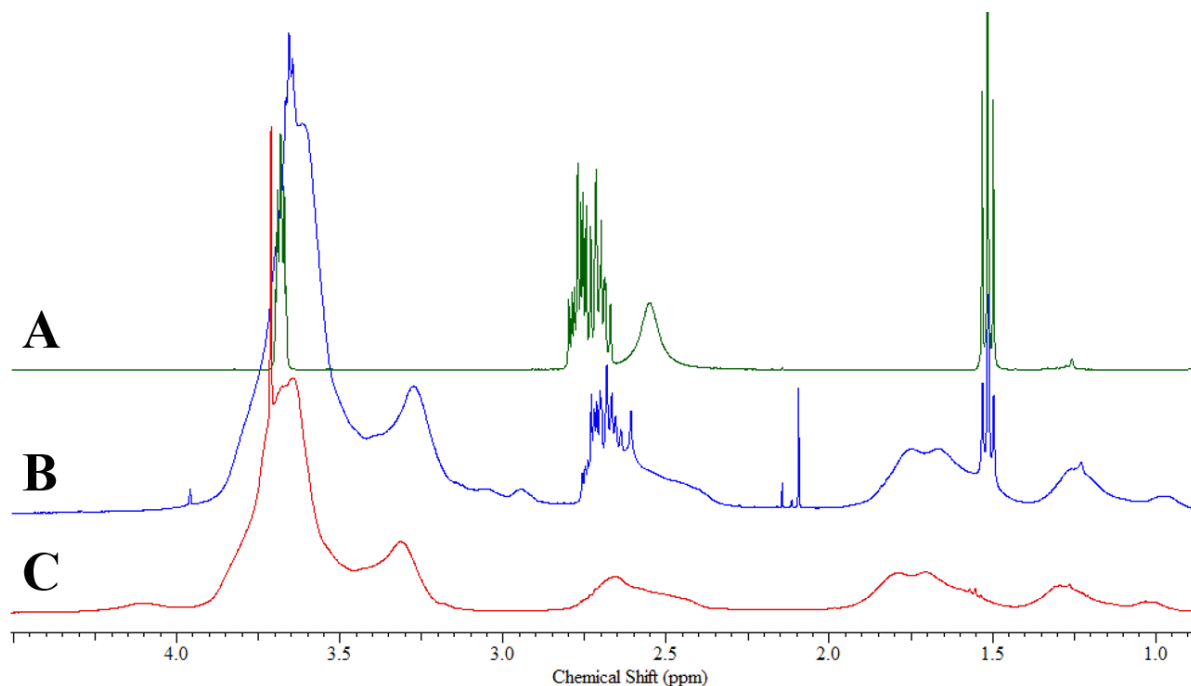


Abb. 15: Gestaffelte Darstellung eines Ausschnitts der ¹H-NMR-Spektren in CDCl₃ von DTT (A), P(AMor-co-BMAC)-SH nach der ersten Fällung in IPA (B) und P(AMor-co-BMAC)-SH nach der zweiten Fällung in Et₂O (C).

Da nach der Fällung in IPA das DTT nicht vollständig entfernt werden konnte, was deutlich anhand der Signale von DTT (1,50 ppm, 2,60 - 2,85 ppm) (Abb. 15A/B) sichtbar ist, musste die Fällung wiederholt werden. Diesmal wurde jedoch aufgrund der guten Löslichkeit von DTT Diethylether als Fällungsmittel verwendet. Dafür musste Wasser durch 1,4-Dioxan als Lösungsmittel ersetzt werden, weil durch die Nichtmischbarkeit von Wasser und Et₂O das Copolymer nicht ausfallen würde. Nach der Fällung in Et₂O konnte P(AMor-co-BMAC)-SH in hoher Reinheit (Abb. 15C) mit Ausbeuten über 80 % erhalten werden. Ein Punkt der beim Ausfällen des thiolmodifizierten Copolymers generell beachtet werden musste, war die Verwendung von entgasten und angesäuerten Lösungsmitteln bzw. Fällungsmitteln. Dadurch lagen die Thiolgruppen im protonierten Zustand vor und eine Oxidation zu Disulfiden durch Luftsauerstoff konnte somit verhindert werden. Dies resultiert aus der quasi nichtvorhandenen Nukleophilie der Thiole im protonierten Zustand und der daraus folgenden Reaktionsträgheit. Aus diesem Grund wurde das Lösungsmittel während der Spaltreaktion zur Entfernung von Sauerstoff permanent mittels eines Argonstroms entgast und die wässrige Copolymerlösung unmittelbar nach der Spaltung angesäuert.

Nachdem die Synthese bezüglich einer hohen Reinheit bei gleichzeitig guten Ausbeuten modifiziert worden war, wurden über diese Route zwei P(AMor-co-BMAC)-SH-Copolymere mit

einem BMAC-Anteil von 4 (**P1**) bzw. 6,5 mol% (**P2**) hergestellt. Dabei stellte Ersteres durch Abwesenheit von Funktionalisierungen das Referenzsystem dar. Das zweite Copolymer wurde zur Synthese funktionalisierter Copolymere hergestellt, da durch den erhöhten BMAC-Anteil nach der Funktionalisierung von 2,5 mol% BMAC wiederum ein Copolymer mit einem BMAC-Anteil von 4 mol% erhalten werden konnte. Dadurch können eventuelle Änderungen der mechanischen Eigenschaften auf die jeweilige Modifikation und nicht auf unterschiedlichen Vernetzeranteile zurückgeführt werden.

3.6.2 Charakterisierung der Copolymere

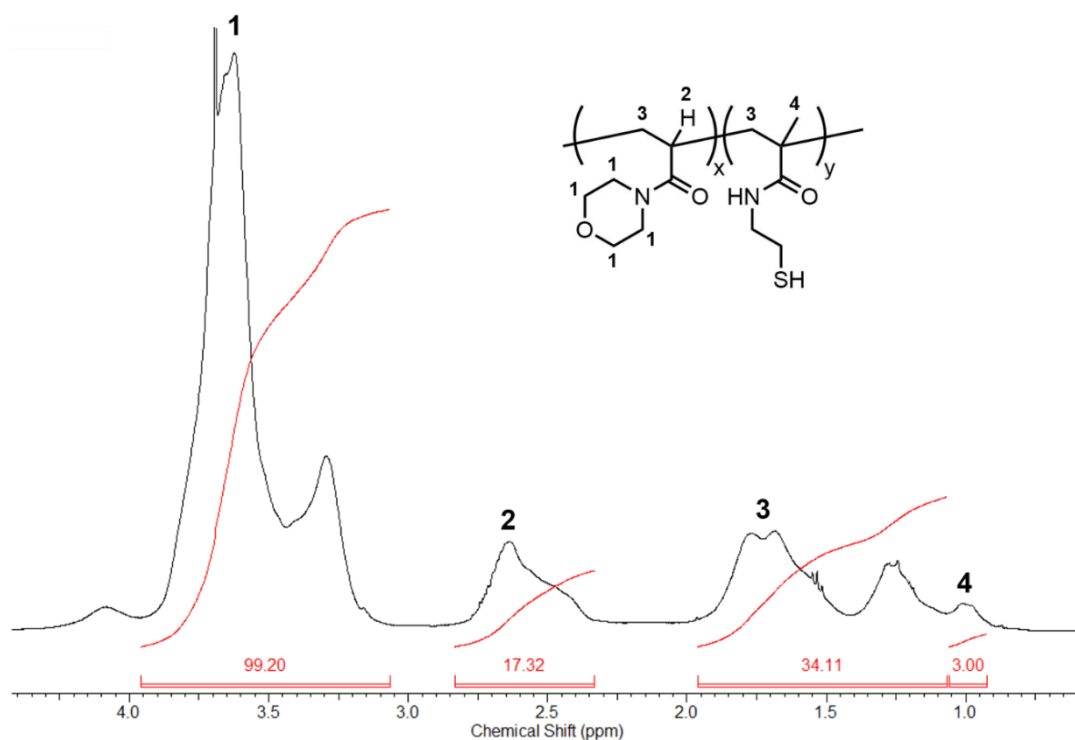
Nach der Synthese der Copolymere galt es diese auf ihre Zusammensetzung und Molmassenverteilung zu analysieren. Die Bestimmung der Molmassenverteilung erfolgte über die GPC, die eine Standardmethode zur Bestimmung von Molmassen bzw. deren Verteilungen darstellt. Die Zusammensetzung wurde dahingegen direkt über ¹H-NMR-Spektroskopie und indirekt über den Thiolgehalt des Copolymers bestimmt, wobei für Letzteres der Ellman's Assay verwendet wurde.

3.6.2.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung der Zusammensetzung über die ¹H-NMR-Spektroskopie erfolgte durch den Vergleich der Integrale der für die einzelnen Monomere signifikanten Signale. Für diesen Zweck wurden die Ringprotonen des Morpholinrings von AMor bei 3,10-3,90 ppm und die Methylgruppe des BMAC bei 0,70-0,89 ppm verwendet (Abb. 16). Dafür wurden die Integrale durch Division der Signalfläche mit der Anzahl der Protonen auf ein Proton normiert (Gl. 27), wobei beachtet werden musste, dass die Methylgruppe aufgrund der Bifunktionalität von BMAC insgesamt sechs Protonen aufweist.

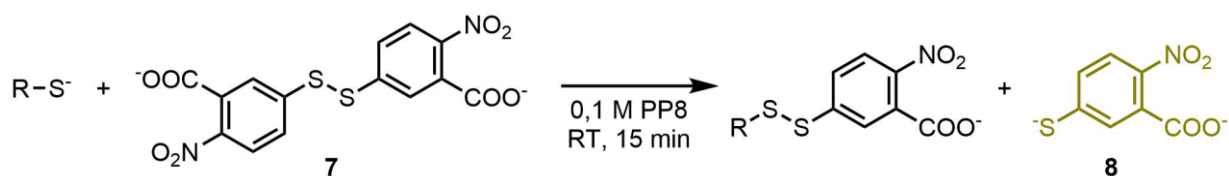
$$I_{i,norm} = \frac{I_i}{N_{prot,i}} \quad \text{Gl. 27}$$

mit $I_{i,norm}$: normierter Integralwert für Gruppe i, I_i : Integralwert für Gruppe i, $N_{prot,i}$: Anzahl der Protonen der Gruppe i.

Abb. 16: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums in CDCl_3 von P1.

3.6.2.2 Thiolgehalt via Ellman's

Wie anfangs beschrieben, wurde die Zusammensetzung neben der direkten Bestimmung über die ^1H -NMR-Spektroskopie indirekt über den Thiolgehalt ermittelt. Dafür wurde der Ellman's Assay verwendet, welcher 1959 von GEORGE ELLMAN entwickelt wurde.^[189] Die Methode von Ellman basiert auf einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, Ellman's Reagenz, **7**) mit den immobilisierten Thiolgruppen. Durch den Austausch entsteht neben einem gemischtem Disulfid das UV-aktive 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^{2-} -Anion, **8**), welches mittels UV/Vis-Spektroskopie quantifiziert werden kann (Schema 7).



Schema 7: Zugrunde liegende Reaktion des Ellman's Assay (PP8: Phosphat-Puffer, pH 8).

Das TNB^{2-} -Anion weist bei 412 nm einen molaren Extinktionskoeffizienten von $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[190] auf, wodurch die untere Nachweisgrenze bei ca. $3 \mu\text{mol/L}$ ^[191] liegt und somit eine sehr genaue Bestimmung des Thiolgehaltes erlaubt wird. Aufgrund der indirekten Bestimmung der Thiolkonzentration muss bei der Verwendung des Ellman's Assays darauf

geachtet werden, dass die Austauschreaktion quantitativ verläuft und eine Oxidation durch Luftsauerstoff vermieden wird. Demzufolge wurde der Assay in dieser Arbeit in einem 0,1 M Phosphat-Puffer bei pH 8 (PP8) durchgeführt, welcher zum Ausschluss von Sauerstoff entgast wurde. Des Weiteren wurde mit 20 min auf eine ausreichende Reaktionszeit geachtet und das DTNB im Überschuss eingesetzt.

Da bei der Austauschreaktion eine zu den Thiolen äquimolare Menge an TNB^{2-} entsteht, kann die Konzentration der immobilisierten Thiole c_{Thiol} direkt aus der Extinktion der TNB^{2-} -Ionen über das LAMBERT-BEER'SCHE Gesetz berechnet werden (Gl. 28).

$$c_{\text{TNB}} = c_{\text{Thiol}} = \frac{E_{\text{TNB}}}{\varepsilon_{412,\text{TNB}} \cdot d} \quad \text{Gl. 28}$$

mit c_{TNB} : Konzentration der TNB^{2-} -Ionen, c_{Thiol} : Konzentration der immobilisierten Thiole, E_{TNB} : gemessene Extinktion der TNB^{2-} -Ionen, $\varepsilon_{412,\text{TNB}}$: molarer Extinktionskoeffizient der TNB^{2-} -Ionen, d : Schichtdicke.

Aus der Thiolkonzentration kann anschließend über die aus der Einwaage bekannte Massenkonzentration die Thiolbeladung des Copolymers berechnet werden (Gl. 29).

$$Y_{P_i} = \frac{\beta_{P_i}}{c_{\text{Thiol}}} \quad \text{Gl. 29}$$

mit Y_{P_i} : Thiolbeladung des Copolymers P_i , β_{P_i} : Massenkonzentration des Copolymers P_i .

Aus dem Vergleich der theoretischen Thiolbeladung mit der aus dem Ellman's Assay ermittelten Thiolbeladung lässt sich der BMAC-Anteil bestimmen.

3.6.2.3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Zusammensetzungsbestimmung der Copolymere **P1** und **P2** sowie die über GPC gemessenen Molmassen bzw. deren Verteilungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Copolymercharakterisierung von P1 und P2.

Copolymer	Verhältnis AMor/BMAC			\overline{M}_n^c [Da]	\mathcal{D}^c
	theoretisch	NMR ^a	Ellman ^b		
P1	96/4	95,9/4,1	96,2/3,8	25600	2,28
P2	93,5/6,5	93,4/6,6	93,8/6,2	33300	2,70

a) bestimmt über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aus dem Verhältnis der normierten Integrale des Morpholinrings von AMor (3.10 - 3.90 ppm) und der Methylgruppe des Polymerrückgrats (0,70 – 0,89 ppm) von BMAC; b) bestimmt über Ellman's Assay; c) bestimmt über GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Laufmittel und PMMA als Kalibrationsstandard.

An den in Tabelle 2 gezeigten Werten ist zu sehen, dass sich die Zusammensetzungen aus den beiden Messmethoden sehr gut deckten, jedoch ist die Bestimmung der Zusammensetzung über die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie gegenüber dem Ellman's Assay als ungenauer anzusehen, weil die Größe der Integrale durch das manuelle Setzen der Integralgrenzen einen Spielraum haben. Durch die gute Übereinstimmung der über beide Methoden ermittelten Zusammensetzung und der Unabhängigkeit beider Messmethoden voneinander konnte von einer präzisen Messung der tatsächlichen Monomerverhältnisse ausgegangen werden, weshalb sich die entwickelte Herstellungsmethode zur Synthese der Copolymere als geeignet erwies. Lediglich die Molmassen sind für Polymere, welche über eine FRP hergestellt wurden, relativ niedrig. Dennoch war der Polymerisationsgrad ausreichend hoch, um die Copolymere über eine Oxidation zu regulieren (Kapitel 3.5). Die Dispersitäten dagegen wiesen mit 2,28 und 2,70 typische Werte für die FRP auf, da diese in der Regel zwischen 2 – 3 liegen.^[192]

3.7 Gelierung und Geleigenschaften

Nachdem ein reproduzierbarer Herstellungsprozess zur Synthese der Copolymere etabliert wurde, galt es nun eine geeignete Methode für die Gelierung zu entwickeln und die entstandenen Gele anschließend zu charakterisieren.

3.7.1 Das Oxidationsmittel

Aufgrund der Toxizität von NaBrO_3 ist die Methode, welche beim Monomerscreening zur Gelierung der Copolymere verwendet wurde (Kapitel 3.5), nicht optimal, da Anwendungen im Bereich der 3D-Zellkultur bzw. Geweberegeneration nicht möglich sind. Diese erfordern ausschließlich nicht-toxische Bestandteile, weil zur Herstellung in den meisten Fällen eine Polymer-Zellmischung verwendet wird. Wie bereits in Kapitel 3.2.3 erwähnt, entwickelten HISANO *et al.* ein disulfidbasiertes Hydrogelsystem zum Einschluss von LANGERHANS'schen Inseln, wobei sie ein Screening von diversen Disulfiden zur Regulierung durchführten. Dabei entdeckten sie, dass 3,3'-Dithiodipropionsäure (DTDS, **33**) praktisch keine Zytotoxizität aufweist und die Gelierung durch Zusatz von DTDS innerhalb von 30 s abläuft.^[156]

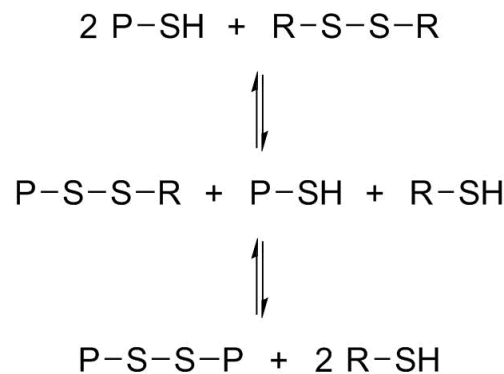
Von daher wurde DTDS ebenfalls zur Gelierung von **P1** eingesetzt, wobei analog zu den Arbeiten von HISANO, YANG und RAVI^[156–158] eine äquimolare Menge an DTDS bezogen auf die Thiolmenge eingesetzt wurde. Dennoch erfolgte nach Zugabe der DTDS-Lösung zu einer 10 % (w/v) **P1**-Lösung keine Gelierung. Als Folge daraus wurde die Polymerkonzentration auf 15 % (w/v) erhöht, was ebenfalls keinen Erfolg brachte. Dies könnte auf die Stöchiometrie der Thiol-Disulfid-Austauschreaktion zurückgeführt werden, da zur Vernetzung zwei

polymergebundene Thiolgruppen (P-SH) eine Disulfidbrücke bilden müssen. Durch den Einsatz von äquimolaren Mengen an DTDS zu P-SH sollten jedoch lediglich gemischte Disulfide entstehen und so keine Vernetzung stattfinden (Schema 8).



Schema 8: Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von polymergebundenen Thiolen (P-SH) mit einer äquimolaren Menge eines niedermolekularen Disulfids (z.B. DTDS).

HISANO *et al.* haben 2011 die Kinetik der Disulfidbildung von polymerimmobilisierten Thiolen untersucht, dabei zeigten sie, dass bei einem Einsatz einer äquimolaren Menge an DTDS lediglich 50 % der P-SH-Gruppen zu P-SS-P-Disulfiden umgesetzt werden.^[193] Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem zweiten Versuch die Menge an DTDS halbiert, um dadurch einen vollständigen Umsatz der Thiole zu P-SS-P-Disulfiden zu erreichen (Schema 9).



Schema 9: Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von polymergebundenen Thiolen (P-SH) mit 0,5 eq. eines niedermolekularen Disulfids (z.B. DTDS).

Aus Schema 9 wird ersichtlich, dass im Gegensatz zur Verwendung von äquimolaren Mengen durch den Einsatz eines halben Äquivalents an DTDS nach der ersten Gleichgewichtsreaktion ein P-SH Molekül als Koppelprodukt übrig bleibt. Dieses kann anschließend in einer zweiten Gleichgewichtsreaktion mit dem gemischten Disulfid reagieren und so das symmetrische Disulfid P-SS-P bilden, wodurch letztendlich ein Vernetzungspunkt entsteht. Nichtsdestotrotz konnte im Gegensatz zur Literatur^[158,193] über diesen Ansatz ebenfalls keine Gelbildung beobachtet werden. Ein Grund dafür, warum die Gelbildung über eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion nicht wie in der Literatur beschrieben funktioniert, könnten die unterschiedlichen Kettenlängen der verwendeten Polymere darstellen. Da die in den Literaturbeispielen benutzten Polyacrylamide mit ca. 200 kDa eine ungefähr zehnmal höhere Molmasse als P1 aufwiesen, könnte der unvollständige Umsatz der P-SH-Gruppen, aufgrund von Verschlaufungen, dennoch zur Herstellung stabiler Gele ausreichen. Dahingegen könnten die Ketten von **P1** zur Ausbildung solcher Verschlaufungen zu kurz sein.

Da die Gelierung mit DTDS über die Thiol-Disulfid-Austauschreaktion trotz der Modifikation keine stabilen Gele lieferte, wurde auf NaBrO_3 als Oxidationsmittel zurückgegriffen, da bei der Verwendung von NaBrO_3 aufgrund der Irreversibilität der Oxidationsreaktion von einem vollständigen Umsatz der P-SH-Gruppen ausgegangen werden kann. Des Weiteren konnte bereits beim Monomerscreening (Kapitel 3.5) gezeigt werden, dass sich mittels NaBrO_3 stabile Hydrogele herstellen lassen, jedoch mit dem Nachteil, dass diese Gele nicht für einen Einsatz in 3D-Zellanwendungen geeignet sind. Nachdem NaBrO_3 als Oxidationsmittel zur Herstellung der Gele ausgewählt wurde, galt es nun die Langzeitstabilität der hergestellten Gele zu verifizieren.

3.7.2 Langzeitstabilität

Aufgrund der hohen Sensitivität von Zellen auf die mechanischen Eigenschaften des zur Kultur eingesetzten Materials ist die Langzeitstabilität eine der wichtigsten Anforderungen, da diese eine Grundvoraussetzung für konstante Zellkulturbedingungen darstellt. Polyacrylate bzw. Polyacrylamide haben den großen Vorteil, dass diese durch ihr stabiles Polymerrückgrat, welches ausschließlich aus C-C-Bindungen besteht, bereits ein hohes Maß an Stabilität mitbringen. Im Gegensatz dazu sind die Seitenketten lediglich über Ester- bzw. Amidbindungen mit dem Polymerrückgrat verknüpft, sodass die Möglichkeit der Hydrolyse besteht. Daher wurden bei der Auswahl der Monomere lediglich Acrylamide ausgewählt, da Amidbindungen von Natur aus hydrolysestabiler sind als Ester. Die Hydrolysestabilität von Estern und Amiden hängt hauptsächlich von der Nukleophilie des Carbonylkohlenstoffs ab. Diese ist bei Amiden aufgrund der geringeren Elektronegativität des Stickstoffs gegenüber dem Sauerstoff bei Estern und der damit verbundenen Delokalisation des freien Elektronenpaares des Amins geringer, wodurch diese wesentlich reaktionsträger sind.^[194] Bei Amiden wird die Nukleophilie des Carbonylkohlenstoffs zusätzlich durch die Anzahl der Substituenten bestimmt, wobei die Stabilität der Amidbindung mit der Anzahl der Substituenten steigt.^[195] Deshalb sollte AMor als tertiäres Amid besonders hydrolysebeständig sein. Die Hydrolyse stellt bei Zellanwendungen ein großes Problem dar, da einerseits der Vernetzer gespalten werden kann und so toxische Spaltprodukte freigesetzt werden können und andererseits sich durch die Entstehung von Acrylsäure die Hydrophilie und somit die mechanischen Eigenschaften ändern. Zur Validierung der Langzeitstabilität wurden zylindrische Gele aus einer 10 % (w/v) **P1**-Lösung hergestellt und die Speichermodule wiederholt über einen Zeitraum von zwei Wochen bei verschiedenen pH-Werten mittels eines Rheometers gemessen, wobei die Proben, um ein Austrocknen zu verhindern, zwischen den Messungen in einer Feuchtigkeitskammer bei 37 °C gelagert wurden. Die

Messungen zeigten sowohl im sauren als auch im basischen Bereich keinen deutlichen Abfall der Steifigkeit, wodurch die Langzeitstabilität der **P1**-Gele bestätigt werden konnte (Abb. 17).

Nachdem die Stabilität von **P1** auch unter Zellkulturbedingungen (0,01 M PBS, pH 7,4, 37 °C) über einen Zeitraum mehrerer Wochen bestätigt werden konnte, wurde nun der Einfluss der NaBrO_3 -Menge auf die Gelierungszeit untersucht.

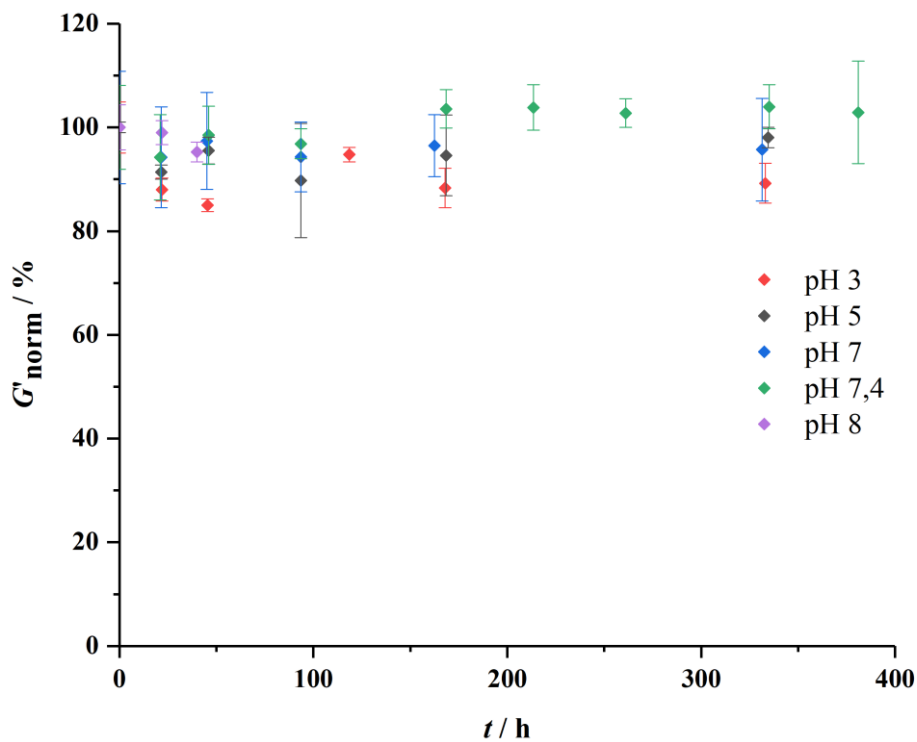


Abb. 17: Langzeitstabilitätsuntersuchungen von 10 % (w/v) P1-Gele bei verschiedenen pH-Werten (gemittelt aus fünf Proben).

3.7.3 Gelierungszeit

Die Kenntnis und die Kontrolle der Gelierungszeit ist für spätere Anwendungen des Gelsystems von großer Bedeutung, da diese die Verarbeitungszeit der jeweiligen Reaktionslösung festlegt. Um die Gelierungszeit möglichst genau zu bestimmen, wurden rheologische Messungen mit einem Kegel-Platte-Messsystem durchgeführt. Das Kegel-Platte-System hat dabei den Vorteil, dass die nach außen zunehmende Umlaufgeschwindigkeit aufgrund des Kegelwinkels und der daraus resultierenden Vergrößerung des Spaltes in Richtung der Außenseiten ausgeglichen wird und so eine konstante Schergeschwindigkeit innerhalb der gesamten Messanordnung gewährleistet wird.^[196] Der Gelpunkt definiert bei rheologischen Messungen den Punkt, ab dem der Speichermodul G' den Verlustmodul G'' übersteigt, sodass die elastischen Anteile die viskosen Anteile überwiegen.^[197]

Rheologische Experimente zur Bestimmung des Gelpunktes sind in der Regel zeitabhängige Oszillationsexperimente bei konstanter Frequenz und Deformation. Daher wurden zur Ermittlung der Gelierungszeiten einer 10 % (w/v)-Lösung von **P1** zeitaufgelöste Messungen von G' und G'' in Abhängigkeit der Menge an NaBrO_3 durchgeführt (Abb. 18). Da die Gelpräparation in den meisten Fällen bei Raumtemperatur erfolgen wird, wurde für die rheologischen Experimente eine Temperatur von 25 °C gewählt. Bei einem Einsatz einer äquimolaren Menge an NaBrO_3 konnte eine Gelierungszeit von ca. 800 s ermittelt werden, wobei zu den aus dem Graphen bestimmten 720 s zusätzlich 80 s für die Probenpräparation addiert wurden.

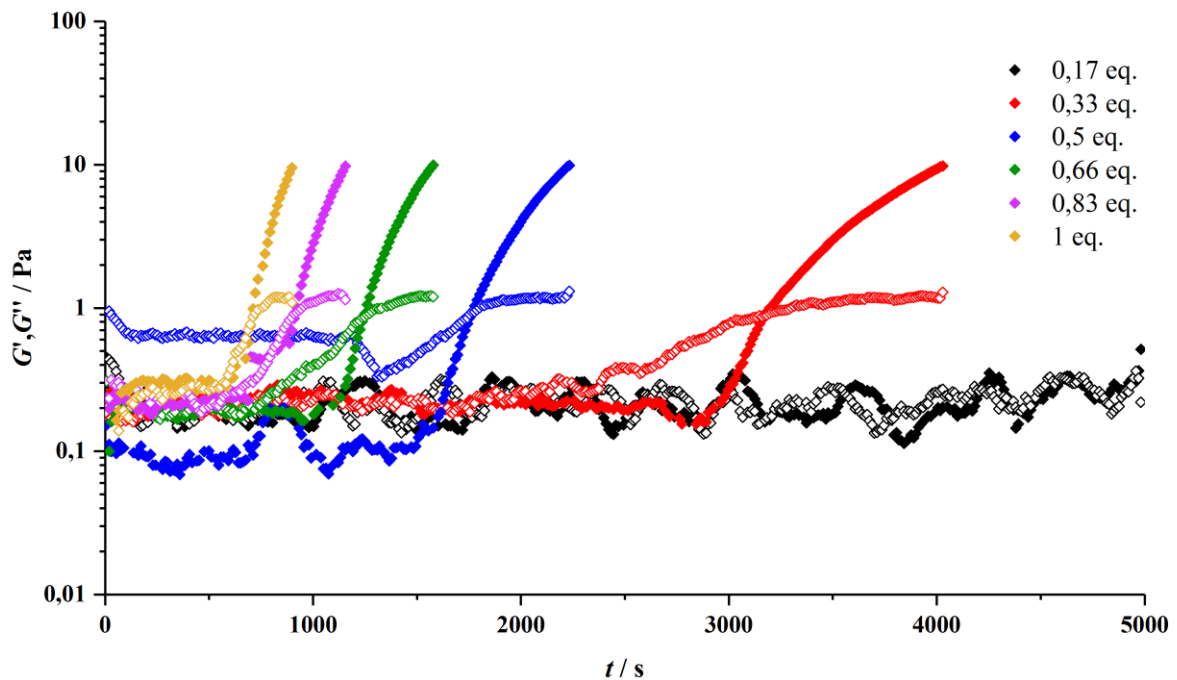
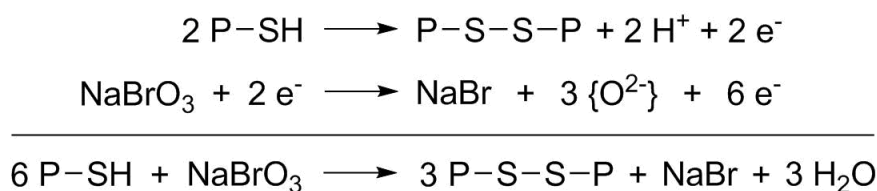


Abb. 18: Rheologische Untersuchung der Gelierungszeit einer 10 % (w/v) P1-Lösung unter Verwendung verschiedener NaBrO_3 -Äquivalente bei 25 °C mit konstanter Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 0,2 %. Die G' -Werte werden durch die ausgefüllten und G'' -Werte durch die unausgefüllten Symbole dargestellt. Des Weiteren wurde eine Glättung der Werte zur besseren Übersicht durchgeführt, wobei der gleitende Durchschnitt verwendet wurde (unbearbeiteter Graph im Anhang).

Da NaBrO_3 während der Oxidation der Thiolgruppen zu NaBr reduziert wird und sich die Oxidationsstufe des Bromatoms dabei von +5 auf -1 ändert, ist NaBrO_3 in der Lage insgesamt sechs P-SH-Gruppen zu drei Disulfidgruppen umzusetzen (Schema 10). Demzufolge entspricht ein Äquivalent an NaBrO_3 drei Elektronenäquivalenten.



Schema 10: Redoxgleichung der Oxidation von P-SH mit NaBrO₃.

Da laut Redoxgleichung nur ein Elektronenäquivalent für den Umsatz zweier Thiolgruppen zu einer Disulfidgruppe benötigt wird, war es möglich unter Erhalt des vollständigen Umsatzes, die Menge an NaBrO₃ zu reduzieren. Aus diesem Grund wurden auch die Gelierungszeiten für 0,17 eq. bis 0,83 eq. an NaBrO₃, stellvertretend für 0,5 bis 2,5 Elektronäquivalente, bei Verwendung der gleichen 10 % (w/v)-igen **P1**-Lösung bestimmt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gelierungszeiten, Quelldaten, Speicher- und E-Moduli von Gelen aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung in Abhängigkeit der NaBrO₃-Äquivalente.

NaBrO ₃ [eq]	NaBrO ₃ [e-eq] ^a	<i>t</i> _{gel} ^b [s]	<i>G</i> ^c [Pa]	<i>E</i> ^d [Pa]	<i>Q</i> _{m,s} ^e
0,165	0,5	-	-	-	-
0,333	1	3300	1024 ± 24	3072 ± 72	10,7 ± 0,3
0,495	1,5	1880	1046 ± 32	3138 ± 96	10,6 ± 0,6
0,666	2	1350	966 ± 30	2898 ± 90	10,7 ± 0,3
0,833	2,5	1010	990 ± 46	2970 ± 96	10,4 ± 0,4
1,00	3	800	1096 ± 74	3288 ± 222	10,0 ± 0,4

Gele wurden in Triplikaten aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen. a) e-eq.: Elektronäquivalent; b) Kegel-Platte-Messsystem, 25 °C, 1 Hz, 0,2 % Deformation; c) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1% Deformation; d) aus Gl. 14.

Dabei wurde, wie zu erwarten, festgestellt, dass zur Gelierung der Polymerlösung mindestens ein Elektronenäquivalent (0,33 eq. NaBrO₃) benötigt wird, da der Einsatz von 0,17 eq NaBrO₃ (0,5 e-eq.) nicht zur Gelbildung führte. Dies stützt ebenfalls die zuvor aufgestellte Vermutung, dass der unvollständige Umsatz von P-SH durch DTDS für eine Gelierung nicht ausreicht.

Da durch die Variation der NaBrO₃-Äquivalente lediglich die Gelierungszeit beeinflusst werden sollte, musste die Unabhängigkeit der mechanischen Eigenschaften von der NaBrO₃-Menge gewährleistet sein. Daher wurden ebenfalls Proben mit unterschiedlichen NaBrO₃-Äquivalenten zur Bestimmung des E-Moduls und der Quelldaten hergestellt. Dafür wurden zylindrische Gele gegossen, welche zur Sicherstellung einer vollständigen Quellung für drei Tage

in 0,01 M PBS-Puffer gelagert wurden. Diese Gele wurden anschließend unter Verwendung eines Platte-Platte-Messsystems vermessen, welches standardmäßig zur Bestimmung des Speichermoduls von Hydrogelen verwendet wird. Aus den für die verschiedenen Gele bestimmten E-Moduli und Quellwerten wird ersichtlich, dass die mechanischen Eigenschaften der Gele nicht von der eingesetzten NaBrO_3 -Menge abhängig sind (Tabelle 3). Daher stellt die Variation der NaBrO_3 -Äquivalente ein geeignetes Mittel dar, um die Gelierungszeit der entsprechenden Anwendung anzupassen. Außerdem konnte die anfänglich aufgestellte Hypothese, dass ein Elektronäquivalent zur Umsetzung der P-SH-Gruppen ausreicht, bestätigt werden. Die Änderung der Gelierungszeit in Abhängigkeit der eingesetzten NaBrO_3 -Äquivalente bei gleichbleibenden E-Modul ist in Abb. 19 nochmals anschaulich dargestellt.

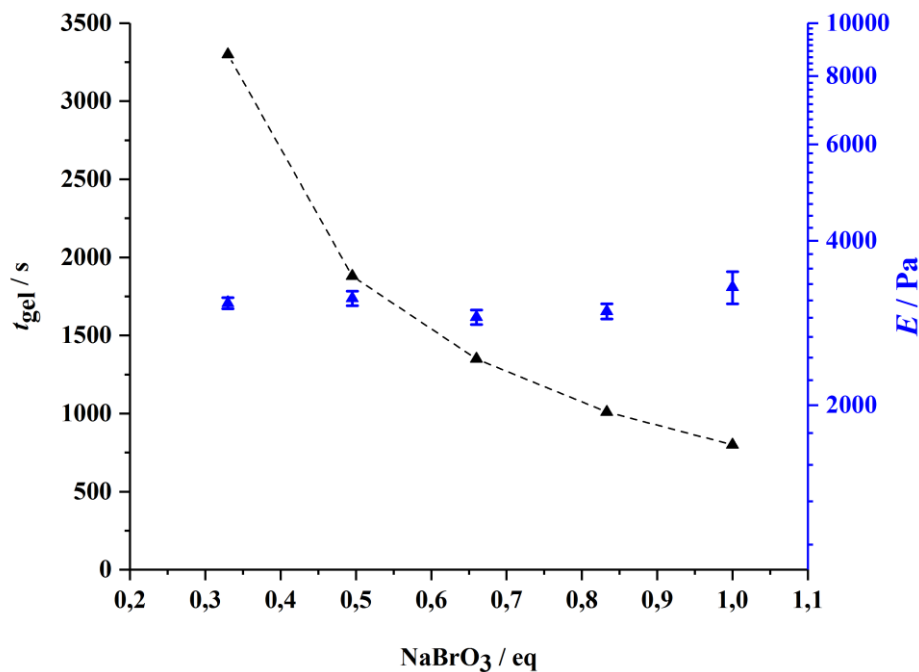


Abb. 19: Graphische Darstellung der Gelierungszeiten und E-Moduli in Abhängigkeit der NaBrO_3 -Äquivalente aus 10 % (w/v) P1-Gelen.

Nachdem eine Methode zur Kontrolle der Verarbeitungszeit der Copolymerlösungen entwickelt werden konnte, sollte im nächsten Schritt eine Möglichkeit zur Einstellung der Steifigkeit gefunden werden. Aufgrund der Abhängigkeit des Stammzellverhaltens von den mechanischen Eigenschaften zählt die Steifigkeit zu den relevantesten Eigenschaften für biomedizinische Hydrogelsysteme.

3.7.4 Steifigkeit

Die Variation der E-Moduli von Hydrogelen, welche aus disulfidmodifizierten Copolymeren hergestellt werden, kann in erster Linie über zwei Methoden ermöglicht werden. So konnten

RAVI *et al.* zeigen, dass die Steifigkeit zum einen über die Konzentration der Copolymerlösung und zum anderen über den Vernetzeranteil kontrolliert werden kann.^[157] Im Folgenden sollen die Einflüsse beider Parameter auf die Steifigkeit der aus P(AMor-co-BMAC) resultierenden Gele untersucht werden.

3.7.4.1 Abhängigkeit von der Copolymerkonzentration

Die Abhängigkeit des E-Moduls von der Konzentration der Copolymerlösung liegt vor allem darin begründet, dass bei der Gelierung eine erhöhte Dichte an Polymerketten innerhalb der Lösung vermehrt zu Verschlaufungen führt, wodurch der Vernetzungsgrad und damit die Steifigkeit steigt. Von daher wurden Copolymerlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt, mit NaBrO₃ reguliert und anschließend rheologisch vermessen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Quellwerte, Speicher-, Verlust- und E-Moduli sowie Maschenweite von Hydrogelen aus P1 in Abhängigkeit der Polymerkonzentration.

P1 [%(w/v)]	NaBrO ₃ [eq]	G^a [Pa]	E^b [Pa]	$Q_{m,s}^c$	\overline{M}_c^d [g/mol]	ξ^e [nm]
6	1	50 ± 6	150 ± 18	25,6 ± 1,3	12797	16,60
8	1	360 ± 24	1080 ± 72	14,8 ± 0,4	12780	13,94
10	1	966 ± 30	2898 ± 90	10,7 ± 0,3	12745	12,58
15	1	4055 ± 251	12165 ± 751	7,1 ± 0,1	12575	11,03
20	0,66	9052 ± 1469	27156 ± 4407	5,6 ± 0,1	12309	10,19
30	0,66	11576 ± 921	34728 ± 2763	3,9 ± 0,1	12179	9,13
40	0,33	19794 ± 2640	59382 ± 7920	2,8 ± 0,1	11773	8,23

Gele wurden in Triplikaten aus P1 in PBS (0,01 M, pH 7,4) hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen.

a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22 ;d) nach Gl. 23; e) nach Gl. 26.

Für die Bestimmung der einzelnen Moduli und Quellwerte wurden, wie im vorigen Kapitel, jeweils drei zylindrische Proben mit einem Durchmesser von ca. 1,5 cm präpariert. Aufgrund der schnellen Gelierung und der damit verbundenen kurzen Verarbeitungszeit bei der Verwendung von Polymerkonzentrationen über 20 %(w/v) musste die NaBrO₃-Menge verringert werden, um eine ausreichende Zeit von mindestens 10 s zum Pipettieren zu gewährleisten. Durch die zuvor gezeigte Unabhängigkeit der Moduli von den NaBrO₃-Äquivalenten konnte diese Anpassung durchgeführt werden. Des Weiteren war eine Mindestpolymerkonzentration von 6 %(w/v) zur Herstellung stabiler und handhabbarer Gele nötig. Im Gegensatz dazu konnten oberhalb von 40 %(w/v) aufgrund der sehr schnellen Gelierung keine zur Vermessung

geeigneten Gele gegossen werden, obwohl **P1** eine Löslichkeit von bis zu 550 mg/mL aufwies. Durch den Einsatz eines Oxidationsmittels, welches eine langsamere Gelierung bei vollständigen Umsatz liefert, sollte es auch möglich sein, Polymerlösungen mit Konzentrationen über 40 % (w/v) zu verarbeiten. Der Vergleich der Redoxpotentiale des Oxidations- und Reduktionsmittels bietet die Möglichkeit, die Reaktionsraten von Redoxreaktionen abzuschätzen.^[198] Die Reaktion von Thiolen zu Disulfiden weist ein Redoxpotential von ca. -0,35 V^[199] auf und stellt somit durch den negativen Wert die Oxidation dar, da das Redoxpotential die Neigung eines Moleküls zur Elektronenabgabe beschreibt. Demzufolge besitzen Moleküle mit einem hohen Redoxpotential eine starke Oxidationskraft, weshalb Bromate mit einem Redoxpotential von 1,42 V^[200] gute Oxidationsmittel sind. Durch den Einsatz eines Oxidationsmittels mit einem niedrigeren Redoxpotential sollte die Reaktion folglich langsamer ablaufen. Ein Beispiel dafür könnten Nitrate mit einem Redoxpotential von 0,96 V sein.^[200] Diese bieten außerdem den Vorteil, dass bei deren Reduktion lediglich Wasser und Stickstoffmonoxid als Produkte entstehen, jedoch müsste dabei auf eine vollständige Entfernung des toxischen Stickstoffmonoxids geachtet werden.

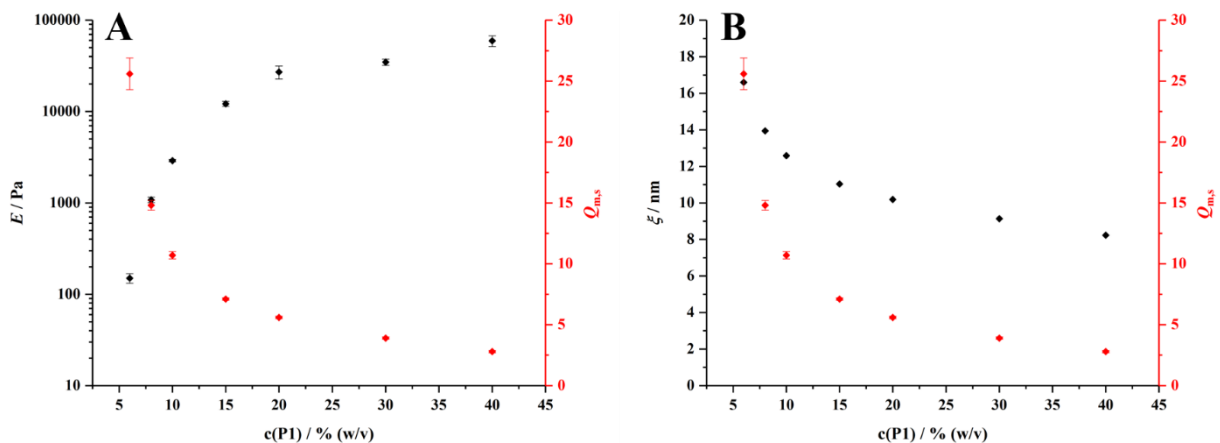


Abb. 20: Auftragungen von E und $Q_{m,s}$ bzw. ζ und $Q_{m,s}$ in Abhängigkeit der P1-Konzentration.

Nichtsdestotrotz ließ sich anhand der Daten in Tabelle 4 die zuvor erwähnte Proportionalität der Moduli zu der Polymerkonzentration bestätigen. Dahingegen nehmen die Quellwerte bei ansteigender Konzentration bzw. Moduli ab (Abb. 20A). Dies lässt sich ebenfalls über die ansteigende Vernetzungsdichte erklären, da durch die Zunahme an Vernetzungspunkten und der damit verbundenen Verkleinerung der Zwischenräume weniger Wasser eingelagert werden kann und so die Quellung abnimmt (Abb. 20B).

Zum Nachweis der Zwischenraumverkleinerung und zur Abschätzung von Diffusionsprozessen, von z.B. Zellnährstoffen, wurde die Maschenweite für die einzelnen Gele berechnet, wobei die in Kapitel 1.3.2.2 erläuterten Gleichungen verwendet wurden. Aus diesem Grund musste

zur Berechnung der Maschenweite zunächst die Molmasse zwischen zwei Netzpunkten \overline{M}_c aus den Quelldaten und den Speichermoduli bestimmt werden. Da für \overline{M}_c der volumetrische Quellwert benötigt wird, welcher sich aus dem gravimetrischen Quellwert und den Dichten des Lösungsmittels sowie des Polymers ergibt, war es notwendig, die Polymerdichte zu ermitteln. Über pyknometrische Messungen^[201] konnte für diese unter Verwendung von Diethylether als Nicht-Lösungsmittel ein Wert von $1,126 \text{ g/cm}^3$ bestimmt werden. Die Berechnung der volumetrischen Quellwerte erfolgte anschließend gemäß Gl. 20 und Gl. 21. Dabei wurden die Quelldaten im relaxierten Zustand unmittelbar nach der Gelierung und vor der vollständigen Quellung in 0,01 M PBS bestimmt. Die Maschenweite ζ wurde schlussendlich über Gl. 26 mit $6,9^{[202]}$ für C_n ermittelt. Wie bereits erwähnt, ist die Maschenweite ein wichtiger Indikator zur Beurteilung von Diffusionsprozessen und von daher vor allem für 3D-Zellanwendungen von großer Bedeutung, da die in den Zellkulturmedien enthaltenen, essentiellen Nährstoffe und die entstehenden Metaboliten in das bzw. aus dem Gel diffundieren müssen. Zellmetaboliten, wie z.B. Riboflavin oder Vitamine; weisen normalerweise einen Radius von 1 - 2 nm auf, wohingegen Nährstoffe, wie z.B. bovines Serumalbumin (BSA), einen Durchmesser von 9 nm besitzen^[203–205]. Deshalb wird eine Maschenweite von mindestens 9 nm benötigt, um einen ungehinderten Transport der Nährstoffe zu gewährleisten. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, weisen Gele aus einer Polymerlösung mit einer Konzentration von maximal 30 % (w/v) eine Maschenweite oberhalb dieses kritischen Wertes auf und sollten somit für 3D-Zellanwendungen geeignet sein, wenn von der Toxizität des NaBrO_3 abgesehen wird.

Generell ließen sich durch die Variation der Polymerkonzentration von 6 bis 40 % (w/v) E-Moduli von 0,15 bis 60 kPa einstellen. Aus diesem Grund können mit dieser Methode die meisten Gewebearten von Säugetieren imitiert werden, da deren Steifigkeiten in einem Bereich von 0,5 bis 100 kPa liegen.^[117]

3.7.4.2 Abhängigkeit vom Vernetzeranteil

Neben der Variation der Copolymerkonzentration, bietet die Änderung des Vernetzeranteils eine weitere Möglichkeit zur Einstellung der Steifigkeit. Um den Einfluss des Vernetzeranteils auf den E-Modul zu analysieren, wurden im Vergleich zu den vorherigen Messungen, in denen ausschließlich **P1** mit einem BMAC-Anteil von 4 mol% verwendet wurde, vier weitere Copolymere mit einem BMAC-Anteil von 2 bis 10 mol% synthetisiert. Dies stellt auch gleichzeitig einen Nachteil im Vergleich zur zuvor beschriebenen Methode dar, da hierbei durch die Herstellung der Polymere zusätzlicher Synthesaufwand betrieben werden muss. Die

entsprechenden Copolymere **P3** - **P6** wurden analog zu der in Kapitel 3.4 und 3.6.1 erwähnten Synthese hergestellt und charakterisiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzungen und GPC-Daten der verschiedenen P(AMor-co-BMAC)-Copolymere mit unterschiedlichen BMAC-Anteilen.

Copolymer	Verhältnis AMor/BMAC			\overline{M}_n^c [Da]	\mathcal{D}^c	Ausbeute ^d
	theoretisch	NMR ^a	Ellman ^b			
P3	98/2	97,4/2,6	96,9/3,1	32600	2,65	64 %
P1	96/4	95,9/4,1	96,2/3,8	25600	2,28	82 %
P4	94/6	94,2/5,8	94/6	34160	3,18	73 %
P5	92/8	92,7/7,3	92,7/7,3	34000	3,66	69 %
P6	90/10	91/9	90,8/9,2	29100	3,58	78 %

a) bestimmt über ¹H-NMR-Spektroskopie aus dem Verhältnis der normierten Integrale des Morpholinrings von AMor (3,10 - 3,90 ppm) und der Methylgruppe des Polymerrückgrats (0,70 – 0,89 ppm) von BMAC; b) bestimmt über Ellman's Assay; c) bestimmt über GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Laufmittel und PMMA als Kalibrationsstandard; d) gravimetrisch nach kompletter Aufreinigung.

Wie zuvor bei der Charakterisierung von **P1** und **P2** (Tabelle 2), ließ sich auch hier eine gute Übereinstimmung der über die ¹H-NMR-Spektroskopie und der über den Ellman's Assay bestimmten Werte feststellen. Dadurch konnten auch in diesem Falle die Zusammensetzungen genau bestimmt werden. Des Weiteren lagen die Molmassen und Dispersitäten im Bereich von **P1**, womit die Variation des BMAC/AMor-Verhältnisses keinen signifikanten Einfluss auf diese Parameter hatte. Es konnten jedoch größere Abweichungen zwischen den theoretischen und gemessenen Zusammensetzungen von **P3** und **P6** festgestellt werden. Dies kann einerseits auf größer werdende Messungenauigkeiten aufgrund des geringen BMAC-Anteils von **P3**, und andererseits auf die zunehmende Vernetzungsdichte und der damit verbundenen erschwerten Monomerdiffusion bei der Polymerisation von **P6** zurückgeführt werden.

Tabelle 6: Quellwerte, Maschenweite, Speicher-, Verlust- und E-Moduli von P(AMor-co-BMAC)-Hydrogelen in Abhängigkeit des BMAC-Anteils.

Copolymer	BMAC-Anteil [mol%]	NaBrO ₃ [eq]	G^a [Pa]	E^b [Pa]	$Q_{m,s}^c$	\bar{M}_c^d [g/mol]	ξ^e [nm]
P3	2	1	387 ± 20	1161 ± 60	16,8 ± 0,5	16251	16,50
P1	4	1	966 ± 30	2898 ± 90	10,7 ± 0,3	12745	12,58
P4	6	0,66	1191 ± 28	3573 ± 84	6,7 ± 0,3	16972	12,47
P5	8	0,33	--- ^f	--- ^f	--- ^f	--- ^f	--- ^f
P6	10	0,33	--- ^f	--- ^f	--- ^f	--- ^f	--- ^f

Gele wurden in Triplikaten aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen.

a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22 ;d) nach Gl. 23; e) nach Gl.

26; f) aufgrund zu schneller Gelierungszeit keine Probenpräparation möglich.

Um den Einfluss des BMAC-Anteils auf die Moduli und die Maschenweite zu untersuchen, wurden wiederum drei Gelproben aus einer 10 % (w/v)-Lösung des entsprechenden Copolymer in einer zylindrischen Form mit zuvor verwendeten Maßen hergestellt (Tabelle 6). Dabei konnten ab einem BMAC-Anteil von 8 mol% keine Proben präpariert werden, da selbst beim Einsatz von 0,33 eq. an NaBrO₃ die Gelierungslösung wegen der kurzen Verarbeitungszeit von weniger als 5 s nicht pipettiert und somit keine gleichmäßigen, reproduzierbaren Proben zur Vermessung hergestellt werden konnten. Für die Proben mit einem BMAC-Anteil von 2 und 6 mol% (**P3**, **P4**) konnten hingegen, analog zu den im vorherigen Kapitel hergestellten Gele, die verschiedenen Parameter ermittelt werden, wobei die Werte für einen Vernetzeranteil von 4 mol% (**P1**) aus Tabelle 4 entnommen wurden. Auch in diesem Fall konnte ein Anstieg der Moduli mit zunehmendem BMAC-Anteil bei gleichzeitigem Sinken der Quellwerte bzw. Maschenweiten beobachtet werden, was ebenfalls durch eine ansteigende Vernetzungsdichte erklärt werden kann. Dennoch wies diese Methode nur ein geringes Potential zur Variation der Steifigkeit auf, da durch die mangelnde Verarbeitbarkeit der Copolymerlösungen mit einem BMAC-Anteil über 6 mol% lediglich ein maximaler E-Modul von 3500 Pa erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurde diese Variante zur Kontrolle der Festigkeiten nicht weiterverfolgt.

3.7.5 Transparenz

Neben den mechanischen Eigenschaften spielen auch die optischen Eigenschaften bei Hydrogelen für biomedizinische Anwendungen eine wichtige Rolle. Die Transparenz nimmt dabei eine übergeordnete Rolle ein, da in der Zellkultur vor allem Durchlichtmikroskope zur

Untersuchung der Zellen eingesetzt werden. Da Zellen meistens mit fluoreszenzbasierten Assays untersucht werden, dürfen die Hydrogele des Weiteren keine Absorption im entsprechenden Spektralbereich aufweisen. Zur Validierung der Transparenz wurden Fotografien der Gele angefertigt, wohingegen die Durchlässigkeit über Transmissionsmessungen analysiert wurde.



Abb. 21: Fotografie eines 10 % (w/v) P1-Gels in 0,01 M PBS nach der Gelierung (links) und nach der Quellung (rechts).

In Abb. 21, die eine typische Probe zur Analyse der Moduli und Quellwerte zeigt, ist die hervorragende Transparenz eines 10 % (w/v) **P1**-Gels sowohl im voll gequollenen Zustand als auch direkt nach der Gelierung zusehen. Dieser optische Eindruck wird durch die Transmissionsmessungen bestätigt, bei denen die Gele über den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts (380 – 780 nm) eine Lichtdurchlässigkeit von über 80 % bei einer Dicke von 2 mm zeigten (Abb. 22). Bei Gelen ab einer Konzentration von 15 % (w/v) konnte eine Reduktion der Transmission beobachtet werden, wobei diese mit ca. 10 % relativ gering ausfiel. Dahingegen zeigte sich unterhalb von 350 nm bis zu einer vollständigen Absorption ab ca. 250 nm eine schlagartige Abnahme der Transmission, was sich zur einen Seite durch die Absorption der Disulfidbindungen von 230 bis 260 nm^[206] und zur anderen Seite durch die Absorption der Amidgruppen zwischen 190 und 210 nm erklären lässt.^[207]

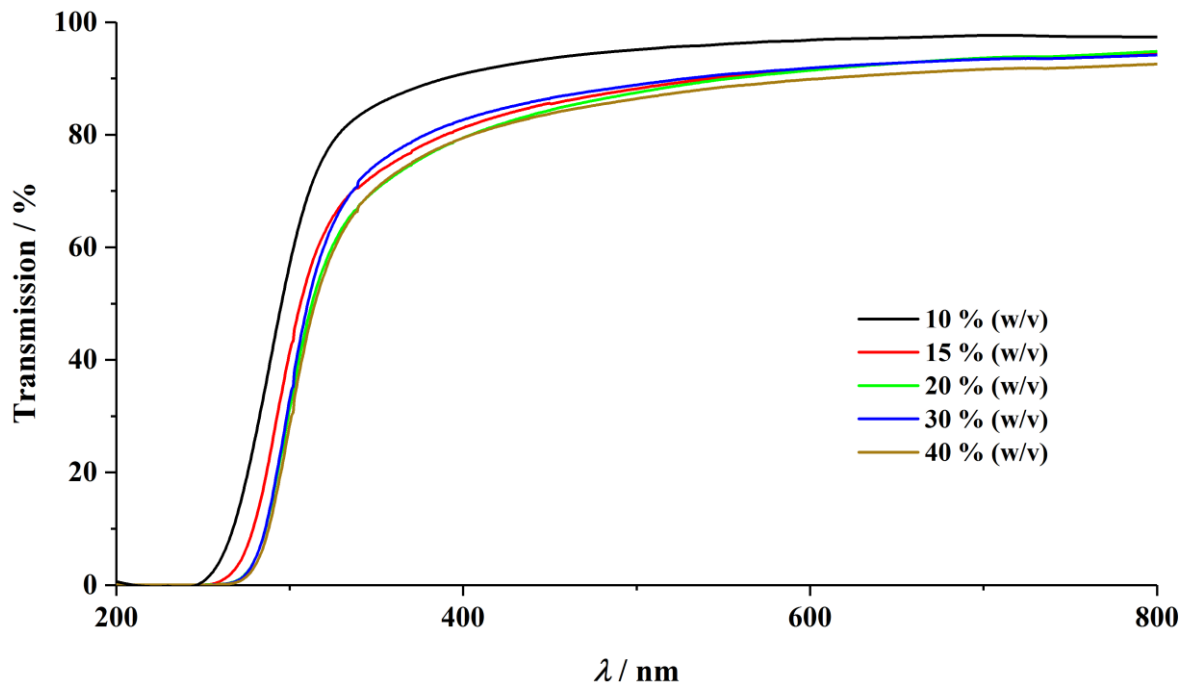


Abb. 22: Transmissionsmessungen von Gelen aus P1-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

3.8 Funktionalisierung von P(AMor-co-BMAC)-SH

Neben der Kontrolle der mechanischen und optischen Eigenschaften spielt die chemische Modifikation der Gele ebenfalls eine sehr große Rolle, da synthetische Polymere von Natur aus keine bioaktive Wirkung mit sich bringen, sodass keine Steuerung des Zellverhaltens ohne Zusatz externer Stoffe möglich ist.

3.8.1 Kationische Modifizierung

Eine Möglichkeit, Einfluss auf das Zellverhalten und dabei vor allem auf die Zelladhäsion zu nehmen, bietet die Modifikation der Copolymere mit kationischen Ladungen. Die Zelladhäsion stellt bei den meisten Säugetierzellen einen essentiellen Prozess dar, da sie ein wichtiger Bestandteil der Signalstimulation zur Regulierung der Zelldifferenzierung, des Zellzyklus und des Zellüberlebens ist.^[208] Dabei werden mit den Zell-Zell-, Rezeptor-Liganden- und elektrostatischen Wechselwirkungen drei verschiedene Interaktionen unterschieden.^[209] Letztere können durch den Einsatz kationischer Gruppen angesprochen werden. Die elektrostatische Anziehung zwischen Zellen und kationischen Polymeren, wie z.B. PLL oder Poly(ethylenimin) (PEI), beruht dabei auf der Wechselwirkung der positiven geladenen Polymere mit der Glykokalyx der Zelle, die sich aus kovalent an die Zellmembran gebundenen, negativgeladenen Polysacchariden zusammensetzt.^[210,211]

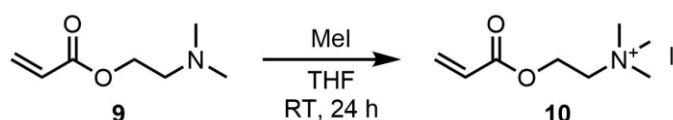
Die Einführung von kationischen Gruppen in das zuvor synthetisierte P(AMor-co-BMAC)-SH Hydrogelsystem ist prinzipiell über zwei Ansätze denkbar. Der erste Weg würde über eine polymeranaloge Immobilisierung eines entsprechenden Maleimids oder Acrylats an die Thiolgruppen führen, wohingegen die zweite Route die direkte Copolymerisation eines kationischen Monomers beinhaltet. Um bei späteren Zelltests einen möglichst großen Spielraum zur Variation der Menge an kationischen Gruppen zu gewährleisten, wurde ein Gehalt von 10 mol% angestrebt. Bei der Verwendung der ersten Methode würde dies bedeuten, dass ein Copolymer mit einem BMAC-Gehalt von 9 mol% hergestellt werden müsste, um nach der Funktionalisierung wiederum ein Copolymer mit einem BMAC-Anteil von 4 mol% zu erhalten. Jedoch zeigte sich bereits in Kapitel 3.7.4.2, dass einerseits die Wasserlöslichkeit von P(AMor-co-BMAC)-SH-Copolymeren mit solch hohen Vernetzeranteilen problematisch war und andererseits die Abweichungen der theoretischen von der realen Zusammensetzung mit ansteigendem BMAC-Anteil zunahm. Des Weiteren müsste eine quantitative Funktionalisierung gewährleistet werden, um einen zu hohen Restanteil an BMAC zu verhindern. Daher wurde auf die zweite Methode zurückgegriffen, bei der ein kationisches Monomer mit AMor und BMAC copolymerisiert wird. Die meisten verwendeten, kationischen Vinylmonomere basieren auf acrylatfunktionalisierten Alkylaminen, da ihre Basizität eine einfache Protonierung erlaubt. So wurden z.B. Aminoethylacrylat (AEA) und Dimethylaminoethylacrylat (DMAEA, **9**), aber auch Trimethylaminoethylacrylat TMAEA bzw. deren Methacrylat- oder Acrylamid-derivate zur Beeinflussung der Zelladhäsion eingesetzt.^[144,212,213]

Zur Funktionalisierung des Hydrogelsystems wurde TMAEA als kationisches Monomer ausgewählt, da AEA und DMAEA zwei entscheidende Nachteile aufweisen. Zum einen ist die Protonierung und somit die kationische Ladung vom pH-Wert abhängig, sodass die Ausbildung einer konstant geladenen Oberfläche erschwert wird. Zum anderen sind beide Monomere relativ hydrolyselabil, da bei AEA die Aminogruppe den Carbonylkohlenstoff angreifen und so sich das stabilere Acrylamid ausbilden kann.^[214] Die Dimethylaminogruppe von DMAEA wird hingegen von dem freien Elektronenpaar an den Carbonylsauerstoff koordiniert, wodurch die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoff erhöht wird und die Reaktivität gegenüber Hydroxidionen steigt.^[215] Im Gegensatz dazu weist TMAEA ein quartäres Amin auf, welches eine permanente und dadurch pH-unabhängige positive Ladung. Des Weiteren weist TMAEA keine Nukleophilie bzw. freie Elektronenpaare auf, die die Elektrophilie des Carbonylkohlenstoff beeinflussen können. Da TMAEA kommerziell nur mit Chlorid als Gegenion (TMAEA*Cl) und als wässrige Lösung erhältlich ist, wurde TMAEA mit Iodid als Gegenion synthetisiert, da die

Entfernung des Inhibitors der kommerziellen TMAEA*Cl-Lösung nicht möglich und die Verwendung von Methylchlorid als Methylierungsreagenz nicht praktikabel war.

3.8.1.1 Synthese von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid

Die Synthese von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA*I, **10**) wurde basierend auf der Vorschrift von SALEHI *et al.* durchgeführt.^[216] Dabei wurde Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) gegen dessen Acrylatderivat DMAEA ausgetauscht, um eine Überlappung der Methylgruppe des Methacrylats mit der Methylgruppe von BMAC im ¹H-NMR-Spektrum zu vermeiden. Die TMAEA*I-Synthese erfolgte über die Umsetzung von DMAEA (**9**) mit Methyljodid (Schema 11). Durch den Einsatz von THF als Lösungsmittel und die Änderung der Hydrophilie nach der Quarternisierung konnte das Produkt einfach abfiltriert werden. Dadurch konnte TMAEA*I als Reinstoff mit einer Ausbeute von 90 % in Form eines weißen Pulvers erhalten werden.



Schema 11: Synthese von TMAEA*I.

3.8.1.2 Synthese von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*I)

Nachdem TMAEA*I erfolgreich mit einer hohen Ausbeute und Reinheit synthetisiert werden konnte, wurde dieses in einer Copolymerisation mit AMor und BMAC eingesetzt und das resultierende Copolymer analysiert (Abb. 23).

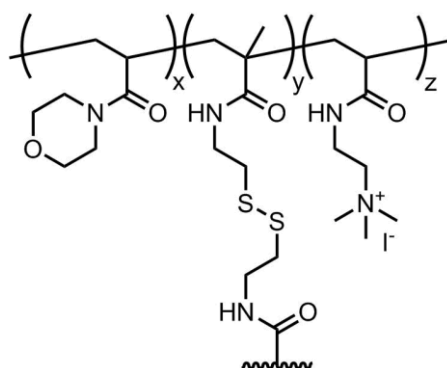
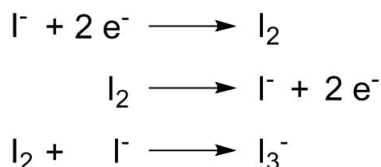


Abb. 23: Polymerstruktur von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*I).

Die Synthese von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*I) mit einem TMAEA*I-Anteil von 10 mol% lieferte eine Ausbeute von 85 % und erfolgte dabei analog zu der von **P1**, jedoch konnte eine starke Gelbbraunfärbung des Polymers beobachtet werden. Des Weiteren bildete sich beim Versuch das Copolymer für die Reglierung zu lösen direkt nach Zugabe des

0,01 M PBS-Puffers ein gelartiger Feststoff aus. Diese unmittelbare Gelierung und die beobachtete starke Färbung lassen sich möglicherweise über die Redoxreaktion von Iod bzw. Iodid erklären, welche aufgrund des zugleich vorliegenden Thiol-Disulfid-Redoxsystems stattfinden kann. Dabei wird das freiliegende Iodid durch einen möglichen Gegenionenaustausch zu Iod oxidiert, welches sich mit einem weiteren Iodidion zu dem gelbbraunen Triiodid (I_3^-) zusammenlagert.

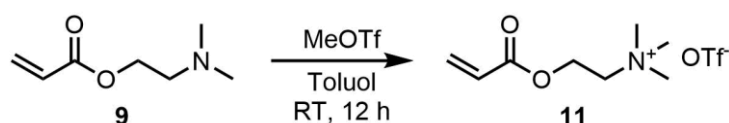


Schema 12: Redoxreaktion von Iod/Iodid und die Bildung von Triiodid.

Der Gegenionenaustausch kann während der Ansäuerung des Fällungsmittels mit Trifluoressigsäure (TFA) stattgefunden haben, da das Trifluoracetat-Anion hier im Vergleich zum Iodid im großen Überschuss vorlag. Demzufolge musste ein anderes Methylierungsreagenz zur Synthese gefunden werden, dass ein stärkeres und unreaktives Gegenion mit sich bringt.

3.8.1.3 Synthese von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumtriflat

Um die Problematik des Anionenaustausches zu umgehen, wurde Methyltriflat (MeOTf), als eines der stärksten Methylierungsreagenzien, gewählt. Außerdem sind die entstehenden Triflatsalze gegenüber Oxidation und Reduktion stabil.^[217] Die Synthese von TMAEA*OTf (**11**) wurde zunächst analog zur der von TMAEA*I durchgeführt (Schema 13).



Schema 13: Synthese von TMAEA*OTf.

Nach der Mischung von MeOTf und THF konnte jedoch zunächst eine Blasenbildung und eine anschließende Schwarzfärbung sowie eine Erhöhung der Viskosität der Lösung beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt sich durch die Bildung von Poly(tetrahydrofuran) erklären, da das aus MeOTf freiwerdende Methylkation die Polymerisation von THF über einen kationisch ringöffnenden Mechanismus initiieren kann.^[218] Aus diesem Grund wurde THF durch Toluol ersetzt, das inert gegenüber MeOTf ist, aber dennoch eine Phasentrennung nach der Quarternisierung ermöglicht. Nachdem Lösungsmittelwechsel konnte TMAEA*OTf mit einer hohen Reinheit und quantitativen Ausbeute als hochviskose, gelbliche Flüssigkeit erhalten werden.

3.8.1.4 Synthese und Charakterisierung von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf)

Nachdem TMAEA*OTf erfolgreich synthetisiert werden konnte, wurde dieses in der Herstellung von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf) eingesetzt. Analog zu **P1** und **P2**, wurden zwei Copolymere mit unterschiedlichen BMAC-Anteilen synthetisiert und charakterisiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Polymeranalytik der TMAEA*OTf funktionalisierten Copolymere P7 und P8.

Copolymer	Monomeranteil [mol%]			\overline{M}_n^b [Da]	\mathcal{D}^b	Y_{Thiol}^c [mmol/g]
	AMor	BMAC ^a	TMAEA			
P7	82,3 (86)	4,3 (4)	12,9 (10)	26400	2,56	0,458 (0,489)
P8	80,5 (83,5)	6,7 (6,5)	12,8 (10)	23200	2,47	0,911 (0,777)

In Klammern theoretische Verhältnisse; a) aus ¹H-NMR und Ellman's Assay gemittelter BMAC-Anteil; b) bestimmt über GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Laufmittel und PMMA als Kalibrationsstandard; c) bestimmt über Ellman's Assay (in Klammern theoretische Thiolbeladung).

Durch den Einsatz von mehr als zwei Monomeren in diesen Copolymeren war eine Bestimmung der Zusammensetzung über den Ellman's Assay nicht mehr möglich, jedoch konnte weiterhin der BMAC-Anteil ermittelt werden.

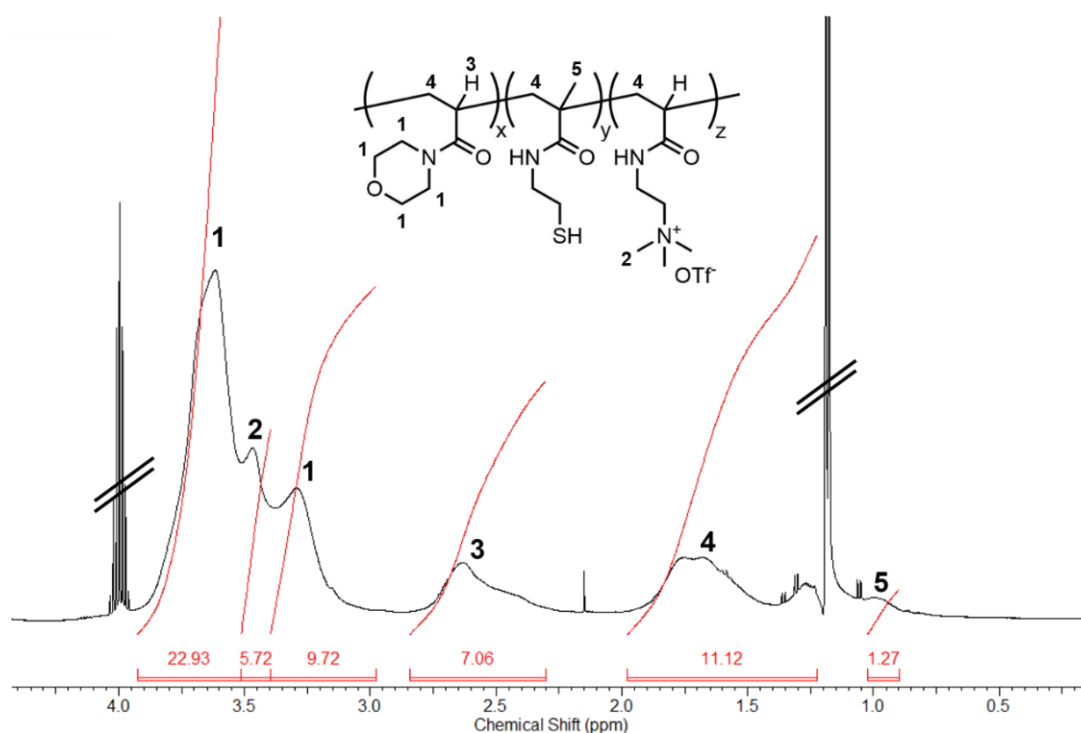


Abb. 24: Ausschnitt des ¹H-NMR-Spektrums in CDCl₃ von P7.

Die Charakterisierung der Zusammensetzung erfolgte daher ausschließlich über das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Für TMAEA*OTf wurde das aus den aminegebundenen Methylgruppen resultierende Signal (3,38 – 3,52 ppm) zur Bestimmung der Zusammensetzung verwendet (Abb. 24).

Nachdem mit sehr guter Übereinstimmung zu den theoretischen Werten die Zusammensetzung der Copolymere ermittelt werden konnte, wurden Gele aus einer 10 % (w/v) **P7**-Lösung zur Analyse des Einflusses von TMAEA*OTf auf die Steifigkeit und das Quellverhalten hergestellt. Um bei späteren Zelltests eventuelle Effekte auf die jeweiligen Funktionalisierungen zurückführen zu können, waren gleichbleibende mechanische Eigenschaften nach der Funktionalisierung von großer Bedeutung.

Tabelle 8: Moduli und Quellwerte in Abhängigkeit des TMAEA-Anteils.

Polymer	TMAEA [mol%]	G^{a} [Pa]	E^{b} [Pa]	$Q_{\text{m,s}}^{\text{c}}$
P1	0	966 ± 30	2898 ± 90	$10,7 \pm 0,3$
P7	12,8	753 ± 32	2259 ± 96	$11,0 \pm 0,4$

Gele wurden in Triplikaten aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen.

a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22.

Anhand der in Tabelle 8 dargestellten Werte ließ sich die Unabhängigkeit der mechanischen Eigenschaften von TMAEA*OTf verifizieren. Daher wies AMor eine ausreichende Hydrophilie zur Kompensation des Einflusses von TMAEA*OTf auf, weshalb das Hydrogelsystem P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf) geeignet ist, um den Effekt von positiven Ladungen auf das Zellverhalten zu untersuchen.

3.8.2 RGD-Funktionalisierung

Da kationische Ladungen lediglich die Zelladhäsion fördern, sind weitere Funktionalisierungen notwendig, um zusätzlich einen Einfluss auf die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen nehmen zu können. Wie bereits in Kapitel 1.2.5 und 1.3.1 erwähnt, ist das am häufigsten zur Biofunktionalisierung von Hydrogelen eingesetzte Motiv die vom Fibronectin abgeleitete Peptidsequenz RGD.^[219] Die biologische Aktivität dieser Sequenz beruht vor allem auf der Wechselwirkung mit Integrinen, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben werden sollen.

3.8.2.1 Integrine und die RGD-Sequenz

Integrine sind in nahezu allen menschlichen Zelltypen vorhandene, heterodimere Transmembranproteine, die heutzutage die am besten erforschte und wichtigste Klasse der Zelladhäsionsrezeptoren einer Zelle darstellen. Sie setzen sich aus einer α und β -Untereinheit zusammen, welche jeweils aus einer längeren, extrazellulären und einer kürzeren, zytosolischen Domäne, die über eine transmembrane Helix verbunden sind, bestehen. Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die die Integrinfamilie mit 24 Subtypen ausmachen.^[220,221] Der Subtyp bestimmt vor allem die Ligandenspezifität bei der Zelladhäsion an die EZM, welche über die Wechselwirkung der Integrine mit EZM-Proteinen, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin oder Laminin, erfolgt. Die Affinität von Integrinen gegenüber ihren Liganden kann dabei aus einer intrazellulär regulierten Rezeptoraktivierung resultieren, die als „Inside-out“-Signalgebung bezeichnet wird oder umgekehrt führt die Anbindung eines Liganden an das Integrin bei der „Outside-in“-Signalgebung zu einer intrazellulären Aktivierung der Rezeptoren. Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung in den Integrinen, sodass sich die transmembranen Helices trennen und eine Clusterbildung zu Oligomeren ermöglicht wird.^[222] Aufgrund dieser beiden Mechanismen werden Integrine auch als bidirektionale Signalmaschinen bezeichnet und können dadurch Prozesse, wie die Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose, steuern.^[223]

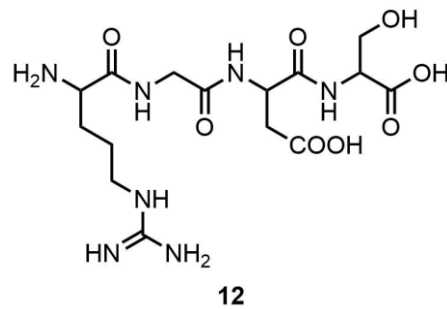


Abb. 25: Tetrapeptid RGDS.

1984 entdeckten PIERSCHBACHER und RUOSLAHITI das Tetrapeptid RGDS (**12**, Abb. 25) als die minimale Sequenz in Fibronectin, die für die Bindung von Zellen verantwortlich ist. Dabei erwiesen sich Arg, Gly und Asp sich als für die biologische Aktivität essentielle Aminosäuren, wohingegen Serin ohne Verlust der Bindungsaffinität ersetzt werden konnte.^[47] Die Bindungsaffinität bzw. Subtypspezifität ist dabei vor allem von der Anwesenheit komplementärer oder synergistischer Domänen, der flankierenden Aminosäure und der Konformation bzw. räumlichen Präsentation des Bindungsmotivs abhängig. Bei RGD-Peptiden sind vor allem Letztere von übergeordneter Bedeutung, da die eingesetzten Bindungsmotive meistens keine

synergistischen Domänen enthalten. Die Bedeutung von RGD-Peptiden zur Funktionalisierung von synthetischen Hydrogelen beruht vor allem auf dessen ubiquitären Verteilung im menschlichen Körper und der Fähigkeit 11 der 24 Integrine zu binden.^[219] Aus diesem Grund wurde zur Biofunktionalisierung der Copolymere ein RGD-Peptid synthetisiert.

3.8.2.2 Peptidsynthese

MIC-6Ahx-GRGDSW

Zur Funktionalisierung der Hydrogele sollte die RGD-basierte Sequenz MIC-6Ahx-GRGDSW (**13**, Abb. 26) synthetisiert werden. Dabei wurden Serin und Glycin als flankierende Aminosäure der natürlichen RGD-Sequenz des Fibronektins zur Erhöhung der Bindungsaffinität eingeführt. Serin spielt dabei eine zentrale Rolle, da die biologische Aktivität in Abwesenheit dieser Aminosäure komplett verloren geht.^[224] Dahingegen wurde Tryptophan der Sequenz hinzugefügt, um sowohl eine Quantifizierung der immobilisierten Peptide über die ¹H-NMR-Spektroskopie als auch über die UV/Vis-Spektroskopie zu ermöglichen. Des Weiteren wurde 6-Aminohexansäure (6Ahx, **14**) als *spacer* zur Gewährleistung der Flexibilität des Bindungsmotivs eingesetzt, wohingegen Maleimidocaprinsäure (MIC, **15**) eine Doppelfunktion einnimmt, indem es zum einen als *spacer* und zum anderen als Linker fungiert.^[219]

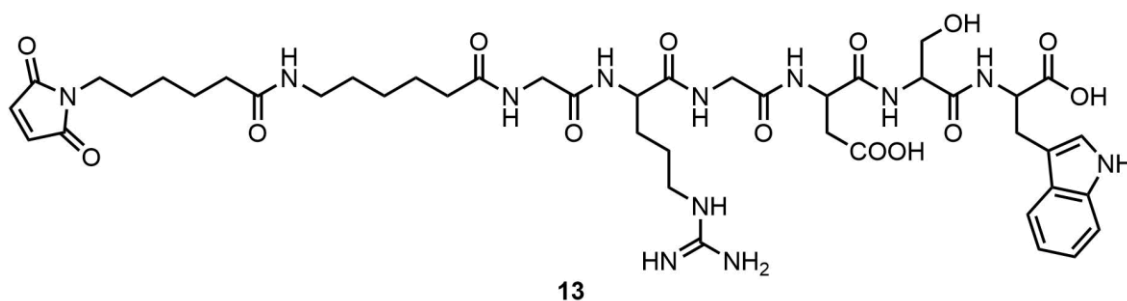
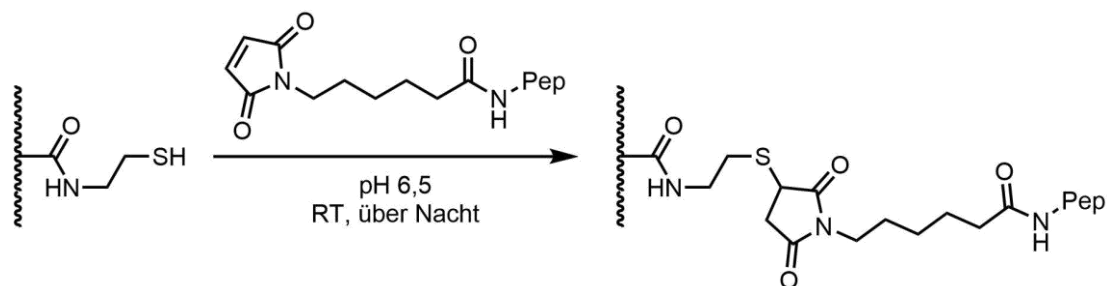


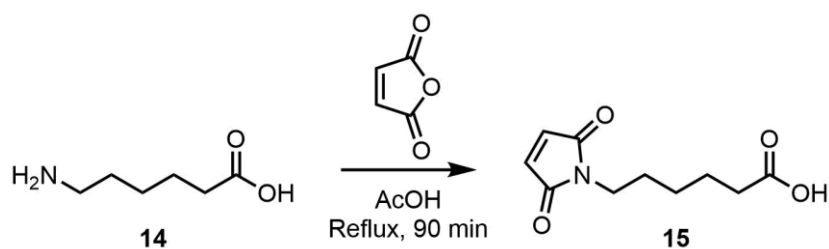
Abb. 26: Struktur von MIC-6Ahx-GRGDSW.

Die Anbindung des Motivs sollte über eine Michael-Addition durch Reaktion der Maleimidgruppe des MICs mit den polymergebundenen Thiolgruppen erfolgen (Schema 14).



Schema 14: Peptidfunktionalisierung der polymergebundenen Thiolgruppen über eine Thiol-Michael-Klickreaktion.

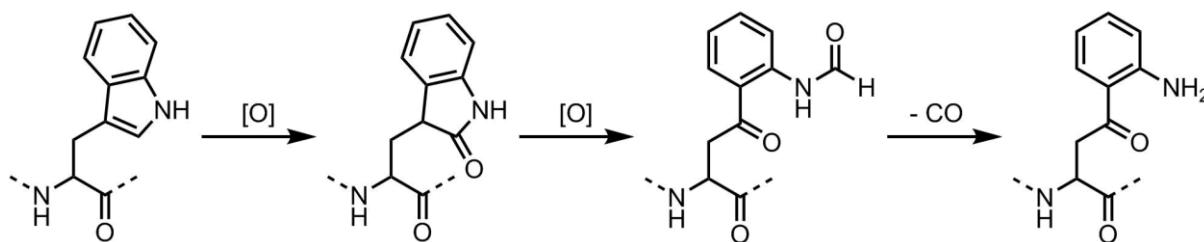
Das Peptid wurde über die 1963 von MERRIFIELD entwickelte Peptidfestphasensynthese hergestellt.^[225] Hierbei wird das Peptid an einer festen Phase durch eine Kopplung der jeweiligen Aminosäuren sequentiell aufgebaut, wobei konventionelle Amidkopplungsreagenzien, wie z.B. Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), verwendet werden können. Als Festphase wurde hier das 2-Chlorotriethylchlorid-Harz (2-CTC), ein funktionalisiertes, leichtvernetztes Polystyrolnetzwerk, eingesetzt. Im ersten Schritt wurde das Harz mit Tryptophan (Trp) beladen, wobei Fmoc-Trp mit diesem in Gegenwart von Diisopropylethylamin (DIPEA) umgesetzt wurde. Zuvor wurde das Harz jedoch mittels Acetylchlorid für eine möglichst hohe Beladung reaktiviert,^[226] da aufgrund der hohen Reaktivität der Chloridgruppen gegenüber Wasser Hydroxylgruppen entstehen können, die eine Immobilisierung der Aminosäure verhindern. Aus diesem Grund wurde bei der Beladung unter inerten Bedingungen gearbeitet, wodurch eine Beladung von 0,7 mmol/g bei einer Kopplungseffizienz von 41 % erzielt wurde. Die Beladung konnte über eine Fmoc-Bestimmung ermittelt werden, da bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Dibenzofulven freigesetzt wird und dieses über UV/Vis-Messungen bei einer Wellenlänge von 301 nm quantifiziert werden kann. Nach der piperidinvermittelten Abspaltung der Fmoc-Gruppe von Trp wurde Serin, dessen Seitengruppe durch Boc geschützt war, als nächste Aminosäure eingesetzt. Die Verwendung von säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen in Gegenwart der *N*-terminalen, basenlabilen Fmoc-Gruppe stellt eine orthogonale Schutzgruppenstrategie dar. Dadurch wird die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen während der Entfernung der Fmoc-Gruppe durch Piperidin verhindert und Nebenreaktionen bei weiteren Kopplungsschritten vermieden. Zur Kopplung des Serins und der weiteren Aminosäuren wurde 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) zur Aktivierung der Carbonsäuregruppe verwendet, da es durch die milden Reaktionsbedingungen, die geringe Racemisierungsneigung und die hohe Löslichkeit der Koppelprodukte zahlreiche Vorteile bietet.^[227,228] Des Weiteren wurde 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) als Promotor in der Amidkopplung eingesetzt, um die Ausbeute zu verbessern und die Reaktion zu beschleunigen.^[229] Anschließend wurden die restlichen Aminosäuren Asparaginsäure, Glycin, Arginin, Glycin, 6-Aminohexansäure sowie die Maleimidocaprinsäure gekoppelt, wobei Letzteres zuvor über die von CHRISTMANN *et al.* publizierte Methode synthetisiert worden war.^[230] Bei dieser wird Maleinsäure mit 6-Aminohexansäure in Essigsäure (AcOH) umgesetzt, wobei die Reaktion nach 90 min gestoppt (Schema 15) wird. Daraus resultiert zwar eine geringere Ausbeute, aber im Gegenzug wird durch die verkürzte Reaktionszeit die Bildung von Nebenprodukten, wie z.B. dem Addukt aus dem entstehenden MIC und AcOH, vermieden und das Produkt kann über Umkristallisation aufgereinigt werden.



Schema 15: Synthese von MIC.

Nachdem die Kopplung aller Aminosäuren abgeschlossen worden war, wurde das Peptid mittels einer Mischung aus TFA, Phenol und Triisopropylsilan (TIPS) vom Harz abgespalten. Neben der Abspaltung der C-terminalen Carbonsäure werden durch TFA auch jegliche Seitenkettenfunktionalitäten entschützt. TIPS und Phenol hingegen fungieren als Abfangreagenzien (engl.: *scavenger*) und verhindern Nebenreaktionen der Seitenketten mit entstehenden Carbokationen.^[231,232] Nach der Freisetzung des Peptids vom Harz wurde die peptidhaltige Spatlösung in kaltem Diethylether gefällt, wodurch die Spaltprodukte der Schutzgruppen vom Rohpeptid abgetrennt wurden. Da Fehlsequenzen bei der Festphasensynthese nicht vermieden werden können, musste das Rohpeptid über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: *high performance liquid chromatography*) aufgereinigt werden. Während der Aufreinigung wurde die Auftrennung des Peptids bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt, da der Indolring des Trp bei dieser Wellenlänge die maximale Absorption aufweist.^[233] Auf diese Weise konnten bereits alle Sequenzen ohne Trp abgetrennt werden. Nichtsdestotrotz konnten nach der Aufreinigung lediglich 10 mg isoliert werden, was einer Ausbeute von 1,5 % entsprach. Zur Überprüfung der Reinheit und der Richtigkeit der Sequenz wurde das isolierte Peptid über Massenspektrometrie analysiert. Die Masse des Peptids bzw. dessen Fragmente konnte jedoch nicht gefunden werden.

Die sehr niedrige Ausbeute und die fehlerhaften Massen könnten auf die Verwendung von Trp als C-terminale Aminosäure zurückgeführt werden, da dessen Indolring zum einen nach der Abspaltung des Peptids mit TFA irreversibel wieder an das Harz binden kann und zum anderen nicht stabil gegenüber Luftoxidation ist. Die irreversible Anbindung erfolgt dabei über eine Reaktion des Amins im Indolring mit dem am Harz entstehenden Carbokation.^[234] Im Gegensatz dazu erfolgt die oxidative Zersetzung über die Umsetzung von Tryptophan zum Oxindolylalanin, welches wiederum durch eine weitere Oxidation mit einhergehender Öffnung des Lactons zum *N*-Formylkynurenin reagieren kann. Durch die Freisetzung von Kohlenmonoxid unter Entstehung eines Amins wird schlussendlich Kynurenin gebildet (Schema 16), das bei 280 nm keine UV-Aktivität mehr aufweist.^[233,235]



Schema 16: Oxidation von Tryptophan zu Kynurenin.

MIC-6Ahx-YGRGDS

Aus diesen Gründen wurde in einem weiteren Peptid Trp gegen Tyrosin (Tyr) ersetzt, da Tyr weniger luftempfindlich ist, wodurch sowohl die Synthese vereinfacht als auch die Lagerstabilität erhöht wurde. Trotzdem bietet Tyr die Möglichkeit die Kopplungseffizienz über UV/Vis- und ¹H-NMR-Spektroskopie zu quantifizieren. Dennoch kann auch Tyr über die Hydroxylgruppe des Phenylrings nach der Abspaltung irreversibel an das Harz binden, weshalb diese Aminosäure zwischen 6-Ahx und Gly eingebaut wurde und so folgende Sequenz resultiert: MIC-6Ahx-YGRGDS (**Pep-1**, **16**, Abb. 27).

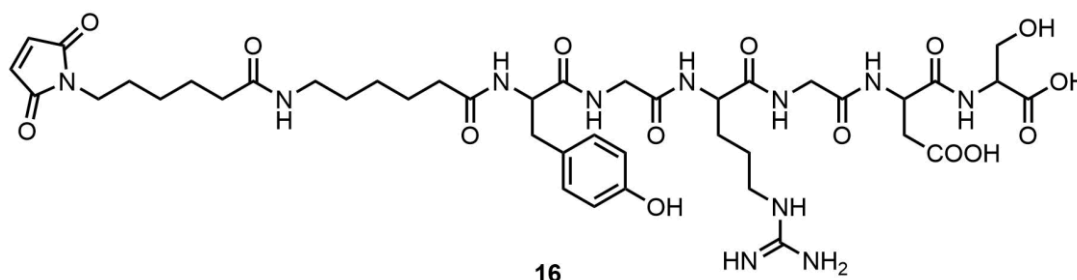


Abb. 27: Struktur von MIC-6Ahx-YGRGDS (Pep-1).

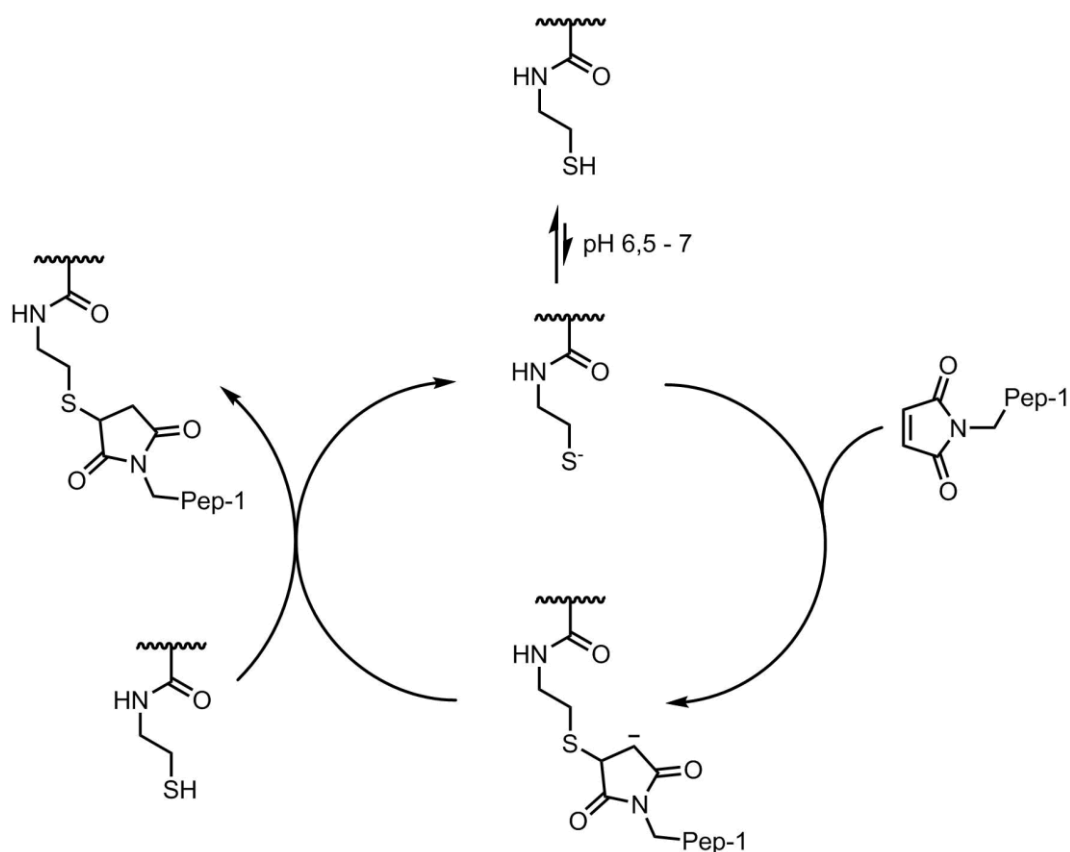
Pep-1 wurde analog zu der für MIC-6Ahx-GRGDSW dargestellten Methode hergestellt und konnte mit einer Ausbeute von 93 % (ausgehend von 2 g Harz mit einer Beladung von 0,95 mmol/g) isoliert werden, wobei in diesem Fall die Reinheit über die Massenspektrometrie verifiziert werden konnte.

3.8.2.3 Peptidfunktionalisierung von P2 und P8

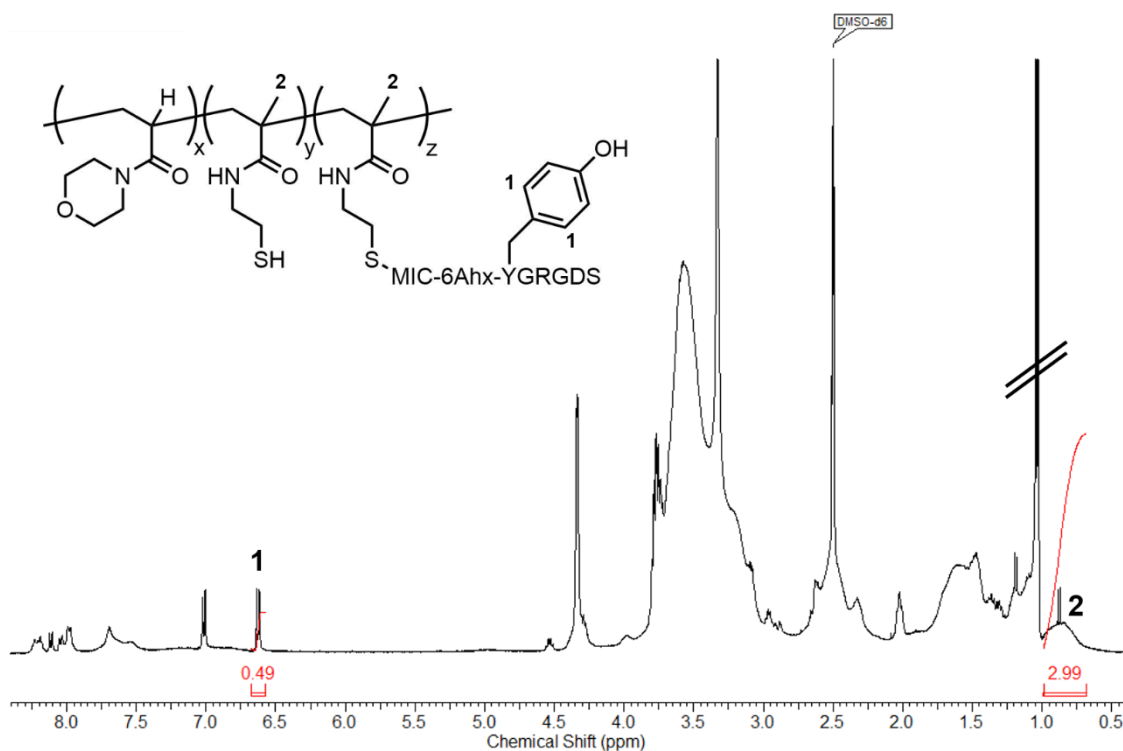
Nach der erfolgreichen Synthese von **Pep-1** wurde dieses nun zur polymeranalogen Funktionalisierung eingesetzt. Dazu wurden die zuvor synthetisierten Polymere **P2** und **P8** verwendet, die einen BMAC von 6,5 mol% aufwiesen. Der erhöhte Vernetzeranteil war erforderlich, da die Kopplung von **Pep-1** an die P-SH über eine Michael-Addition erfolgen sollte, wodurch diese verbraucht werden und nicht mehr zur Gelbildung zur Verfügung stehen. Um Abweichungen bezüglich der mechanischen Eigenschaften durch unterschiedliche Vernetzeranteile zu

vermeiden, wurde der BMAC-Anteil um 2,5 mol% gegenüber **P1** und **P7** erhöht. Somit kann auch nach der Funktionalisierung ein BMAC-Anteil von 4 mol% gewährleistet werden.

Die zur Peptidimmobilisierung eingesetzte Michael-Addition bezeichnet allgemein die Addition eines Nucleophils (Michael-Donor) an den β -Kohlenstoff einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung (Michael-Akzeptor), woraus das sogenannte Michael-Addukt entsteht.^[236] Bei der zur Peptidfunktionalisierung angewandten Reaktion handelte es sich im Detail um die Thiol-Michael-Klickreaktion, bei der der Michael-Donor ein Thiolat und der Michael-Akzeptor eine durch eine elektronenziehende Gruppe aktivierte Doppelbindung ist. Genauer wurde als Michael-Akzeptor eine Maleimidgruppe verwendet, da diese vor allem für ihre besonders hohe Reaktivität und Selektivität gegenüber Thiolen bekannt ist. Der Mechanismus der Thiol-Michael-Klickreaktion verläuft im ersten Schritt über eine Deprotonierung des Thiols zum Thiolat, welches anschließend über einen nukleophilen Angriff an die Doppelbindung des Maleimids unter Bildung eines Carbanion bzw. Enolats bindet. Das Carbanion wird daraufhin durch Abstraktion des Protons eines weiteren Thiols protoniert, wodurch das Michael-Addukt und ein Thiolatanion entsteht, welches wiederum ein Maleimid angreift. Demzufolge wird lediglich ein Katalysator, z.B. eine Base, zur anfänglichen Bildung des Thiolatanions benötigt (Schema 17).^[237] Aus diesem Grund wird die Thiol-Michael-Klickreaktion, wenn sie in wässrigen Medien angewendet wird, unter pH-Kontrolle durchgeführt, wobei ein pH-Wert von 6,5 - 7 durch die labile Schwefel-Wasserstoff-Bindung bereits zur Erzeugung von Thiolationen ausreicht. Dieser pH-Bereich gewährleistet außerdem die Selektivität des Maleimids gegenüber dem Thiol, da durch höhere pH-Werte die Reaktivität anderer Gruppen, z.B. Aminen, in Bezug auf das Maleimid erhöht wird und auch die Hydrolysestabilität des Maleimids sinkt.^[238] Die Vorteile der Thiol-Michael-Klickreaktion liegen vor allem darin, dass keine weiteren toxischen Reagenzien benötigt werden. Dadurch wird zum einen die Aufreinigung erleichtert und zum anderen kann diese Reaktion auch in Gegenwart von Zellen angewendet werden, weshalb sie den bioorthogonalen Reaktionen zugeordnet werden kann.^[83]

Schema 17: Mechanismus der Thiol-Michael-Klickreaktion nach Xi *et al.*^[237]

P2 und **P8** wurden jeweils mit einem BMAC-Anteil von 6,5 mol% synthetisiert, sodass 2,5 mol% BMAC für die Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Aufgrund der Bifunktionalität von BMAC resultieren aus 2,5 mol% BMAC 5 mol% an freien Thiolgruppen pro Polymerkette, die zur Peptidimmobilisierung verwendet werden können. Daher wurde eine zu 2,5 mol% BMAC äquivalente Menge an Peptid eingesetzt. Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrades erfolgte zum einen über die ¹H-NMR Spektroskopie und zum anderen über den Vergleich der Thiolbeladung unmittelbar vor und nach der Funktionalisierung. Der über die ¹H-NMR Spektroskopie-ermittelte Funktionalisierungsgrad wurde dabei über die Differenz des unfunktionalisierten BMAC-Anteil vor und nach der Reaktion ermittelt, wobei Letzterer aus der Differenz der auf ein Proton normierten Integrale der Signale der Methylgruppe in BMAC und des Aromaten von Tyrosin (6,63 ppm) bestimmt wurde. Über das ¹H-NMR-Spektrum ließ sich außerdem durch die Abwesenheit des Signals der Doppelbindung im Maleimid die Reinheit der funktionalisierten Polymere verifizieren (Abb. 28). Die Aufreinigung wurde, analog zu **P1-P8**, durch Ausfällen aus IPA und Et₂O durchgeführt wurde.

Abb. 28: ^1H -NMR-Spektrum in DMSO-d_6 von P2-RGD.

Zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrades über den Thiolgehalt wurde dieser unmittelbar vor und nach der Reaktion über ein Ellman's Assay bestimmt und aus der Differenz dieser Werte der Peptidanteil abgeleitet. Um eine Reduzierung des Thiolanteils durch Reoxidationsreaktionen mittels Luftsauerstoff, wodurch der Funktionalisierungsgrad beeinflusst werden würde, zu vermeiden, wurde der Assay in entgastem PP8 durchgeführt. Des Weiteren wurde zur Gewährleistung der Thiolektivität bei einem pH-Wert von 6,5 gearbeitet, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit der Thioloxydation durch die wesentlich geringere Reaktivität von Thiolen im Vergleich zu Thiolaten minimiert werden konnte.

Tabelle 9: BMAC-Anteile vor und nach der Funktionalisierung mit Pep-1.

Polymer	Prä-polymer	BMAC-Anteil vor Funktionalisierung [mol%]			BMAC-Anteil nach Funktionalisierung [mol%]			resultierender Pep-1-Anteil [mol%]
		NMR	Ellman	Ø	NMR	Ellman	Ø	
P2-RGD	P2	6,6	6,2	6,4	4,5	3,7	4,1	4,6
P8-RGD	P8	5,6	7,8	6,7	3,4	5,1	4,15	4,9

Wie zuvor beschrieben, ließ sich aus dem Vergleich der freien Thiolektivitäten vor und nach der Peptidimmobilisierung der Funktionalisierungsgrad ableiten (Tabelle 9). Dabei konnten Peptidanteile von 4,6 mol% für **P2-RGD** bzw. 4,9 mol% für **P8-RGD** ermittelt werden,

wobei diese Werte durch die Bifunktionalität von BMAC aus der doppelten Differenz der beiden gemittelten BMAC-Anteile berechnet wurden. Es ergaben sich somit Kopplungseffizienzen von 92 % (**P2-RGD**) bzw. 98 % (**P8-RGD**), weshalb die Thiol-Michael-Klickreaktion mit den eingesetzten Reaktionsparametern sehr gut zur Immobilisierung von Peptiden an P(AMor-co-BMAC) bzw. deren TMAEA*OTf-Derivate geeignet ist. Neben der Bestimmung des Funktionalisierungsgrades wurden auch die mechanischen Eigenschaften analysiert (Tabelle 10). Analog zu dem TMAEA*OTf-funktionalisiertem Copolymer **P7** wäre es dabei von Vorteil, wenn die Steifigkeiten und Quellwerte nach der Funktionalisierung ähnlich zu denen der **P1**-Gele wären, damit in späteren Parameterstudien Einflüsse durch unterschiedliche mechanische Eigenschaften ausgeschlossen werden können.

Tabelle 10: Steifigkeit und Quellwerte von P2-RGD.

Polymer	Pep-1 [mol%]	G^a [Pa]	E^b [Pa]	$Q_{m,s}^c$
P1	0	966 ± 30	2898 ± 90	$10,7 \pm 0,3$
P2-RGD	4,6	1580 ± 83	4740 ± 249	$12,2 \pm 0,1$

Gele wurden in Triplikaten aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen.

a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22.

Der Vergleich der E-Moduli und Quellwerte von 10 % (w/v) Gelen aus **P1** und **P2-RGD** zeigte, dass bei P2-RGD sowohl der E-Modul als auch der Quellwert über denen von **P1** lagen. Die höhere Steifigkeit lässt sich über den leicht erhöhten BMAC-Anteil von 4,1 mol% erklären, der aus der unvollständigen Funktionalisierung von **Pep-1** resultiert. Jedoch stellte der gleichzeitige Anstieg von E und $Q_{m,s}$ auf den ersten Blick einen Gegensatz dar, da diese sich normalerweise antiproportional zueinander verhalten. Im diesem Falle kann die Zunahme des Quellwertes möglicherweise durch die Erhöhung der Hydrophilie durch die Immobilisierung von **Pep-1** erklärt werden, wodurch mehr Wasser in das Hydrogelnetzwerk eingelagert werden kann. Mit einem Unterschied von ca. 500 Pa kann die Abweichung der Speichermodule jedoch als vernachlässigbar eingeschätzt werden und sollte makroskopisch keinen Einfluss auf das Zellverhalten haben. Nichtsdestotrotz sollte in Zukunft der BMAC-Anteil von **P2** an den maximalen Umsatz der Thiol-Michael-Klickreaktion angepasst werden, um Abweichungen der Steifigkeit zu vermeiden.

3.9 Untersuchung der Zytotoxizität

Nachdem mit **P1**, **P7**, **P2-RGD** und **P8-RGD** Polymere mit unterschiedlichen Funktionalitäten, wie kationische Gruppen oder RGD-Liganden sowie deren Kombination, synthetisiert und charakterisiert werden konnten, wurden diese auf die Zellkompatibilität der resultierenden Hydrogele untersucht. Hierfür wurden zunächst humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293-Zellen) zur Entwicklung eines allgemeinen Protokolls für die Zelltests verwendet, wobei vor allem die Etablierung einer geeigneten Sterilisationsmethode im Vordergrund stand. Im Anschluss sollte die Zytotoxizität der Hydrogele auf mausembryonale Stammzellen (mESCs) untersucht werden, da diese ohne ethische Konflikte als Modellsystem für humane Stammzellen zur Optimierung der Kulturbedingungen verwendet werden können.^[239] Außerdem konnte dabei durch den Einsatz der Modularität des Systems der Einfluss der unterschiedlichen Funktionalitäten analysiert werden. Diese Modularität bzw. dieses Baukastensystem wird durch die Reversibilität der Thiol/Disulfid-Reaktion ermöglicht, sodass die Zusammensetzung durch Mischen der jeweiligen gespaltenen Copolymere variiert werden kann. Theoretisch können ausgehend von **P2** bzw. **P8** zahlreiche bioaktive Motive immobilisiert werden, wodurch eine Polymerbibliothek aufgebaut werden kann. Diese erlaubt wiederum eine einfache Anpassung der Gelzusammensetzung an die gewünschte Anwendung.

3.9.1 Zytotoxizitätstest mit HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293-Zellen) wurden 1973 von VAN DER EB und GRAHAM entdeckt^[240] und zählen hinter HeLa-Zellen zu den am häufigsten eingesetzten Zellen in zellbiologischen Studien, was insbesondere auf die einfache Kultivierung, das schnelle Wachstum und die Robustheit dieser Zelllinie zurückgeführt werden kann.^[241,242]

Bevor die Zelltests durchgeführt werden konnten, musste zunächst eine brauchbare Methode zur Gelpräparation entwickelt werden, wobei vor allem auf eine sterile Herstellung der Gele geachtet werden musste. Die Gelierung der Hydrogele erfolgte analog zu den vorhergehenden Experimenten durch Mischung einer 10 % (w/v) Copolymerlösung in 0,01 M PBS (pH 7,4) mit 1 eq. NaBrO₃. Für die Methodenentwicklung wurde ausschließlich **P1** verwendet. Durch den Einsatz von NaBrO₃ ist es, wie bereits beschrieben, aufgrund der Toxizität nicht möglich, Zellen dreidimensional zu verkapseln, weshalb ausschließlich 2D-Zellexperimente durchgeführt werden konnten. Obwohl Zellen in der Natur eine dreidimensionale Mikroumgebung aufweisen,^[243] stellten die 2D-Zellexperimente ein geeignetes Modell zur Analyse der verschiedenen Einflüsse auf das Zellverhalten dar. Die Vorteile dieser Experimente liegen vor allem in der

Kosteneffizienz und einfachen Durchführung, da das Material vor der Zellapplikation präpariert und sterilisiert werden kann. Des Weiteren spielen dabei physikalische Parameter, wie z.B. Diffusion, sowie Unregelmäßigkeiten innerhalb des Materials eine unterordnete Rolle.^[244] Zur Vermeidung der toxischen Einflüsse von NaBrO_3 wurden sämtliche Proben zuvor sorgfältig mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. Nichtsdestotrotz mussten die Gele aufgrund des unsterilen Herstellungsprozesses der Copolymere zusätzlich sterilisiert werden.

3.9.1.1 Sterilisation der Hydrogele

In der Literatur wurden bereits zahlreiche Methoden zur Sterilisation von Materialien für den Einsatz in Zellapplikation beschrieben, wobei vor allem physikalische und chemische Prozesse, wie Autoklavieren oder Hitze bzw. die Behandlung mit Ethylenoxid oder Wasserstoffperoxid, verwendet wurden.^[245] Die meisten dieser Methoden können jedoch aufgrund des hohen Wassergehaltes von Hydrogelen nicht angewendet werden, da diese sowohl die mechanischen als auch physikalischen Eigenschaften der Gele beeinflussen, toxische Rückstände erzeugen oder das Material im schlimmsten Falle zerstören können. Somit musste eine Sterilisationsmethode gefunden werden, die den Erhalt der chemischen und mechanischen Eigenschaften sowie der biologischen Aktivität der Gele garantiert. Für die Sterilisation fertiger Hydrogele oder Präpolymere werden heutzutage grundsätzlich zwei Ansätze verfolgt. Die Sterilisation der Präpolymere kann sowohl über die Behandlung der Polymere an sich als auch durch den Einsatz steriler Monomere erreicht werden. Für die in dieser Arbeit synthetisierten Polymere konnte Letzteres jedoch nicht verwendet werden, da dies einen sterilen Herstellungsprozess voraussetzt. Die Sterilisation der Präpolymere wird zum einen in getrockneter Form durch z.B. Autoklavieren oder Bestrahlung mit Gamma-Strahlen und zum anderen durch Sterilfiltration einer entsprechenden Polymerlösung erreicht.^[246] Aufgrund der erhöhten Reaktivität der Thiolgruppen der gespaltenen Copolymere bei hohen Temperaturen konnte die Sterilisation der getrockneten Polymere ebenfalls nicht durchgeführt werden, da durch die Oxidation der Thiole unlösliche Polymernetzwerke entstehen würden. Der Versuch eine 10 % (w/v)-ige **P1**-Lösung über einen Filter mit einer Porengröße von $0,2 \mu\text{m}$ sterilzufiltrieren schlug ebenfalls fehl, was höchstwahrscheinlich an der zu hohen Viskosität der Polymerlösung lag, aber auch ein Zusetzen des Filters durch Adsorption des Polymers an der Filtermembran war denkbar.^[245] Nachdem keine Methode zur Sterilisation der Präpolymere zum Erfolg geführt hat, sollte nun eine Möglichkeit zur Sterilisation der fertigen Hydrogele gefunden werden. Dafür wurde die Behandlung der Gele mit einer 70 %-igen Ethanollösung sowie deren Bestrahlung mit UV-Licht untersucht. Die Desinfektionswirkung von Ethanol beruht dabei auf der Möglichkeit, die

Struktur und damit die Funktion von Proteinen durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Hydroxylgruppe des Alkohols und dem Peptid- bzw. Proteinrückgrat zu zerstören.^[247] Die Sterilisation mittels UV-Strahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm, da bei dieser Wellenlänge die Absorption der DNA-Basen am größten ist. Durch die so eingebrachte Energie werden die Wechselwirkungen der Nukleobasen untereinander gestört. Aus der daraus folgenden photochemischen Reaktion können die Nukleobasen Pyrimidindimere ausbilden, was in einer Inaktivierung von z.B. Bakterien und Viren resultiert.^[248] Um die Wirkung der Sterilisationstechniken zu untersuchen, wurden drei Gele aus einer 10 % (w/v)-igen **P1**-Lösung hergestellt und in Gegenwart von HEK293-Zellen und sterilem DMEM-Medium über vier Tage beobachtet. Dafür wurde das erste Gel für 15 min mit UV-Strahlung und das Zweite für 30 min mit einer 70 % (v/v)-igen EtOH behandelt, wohingegen die dritte Probe als Kontrolle unbehandelt blieb. Um Kontaminationen während der Präparation der Gele zu vermeiden, wurde **P1** in sterilem PBS-Puffer (0,01 M, pH 7,4) gelöst und die NaBrO₃-Lösung (2 M in 0,01 M PBS-Puffer) sterilfiltriert.

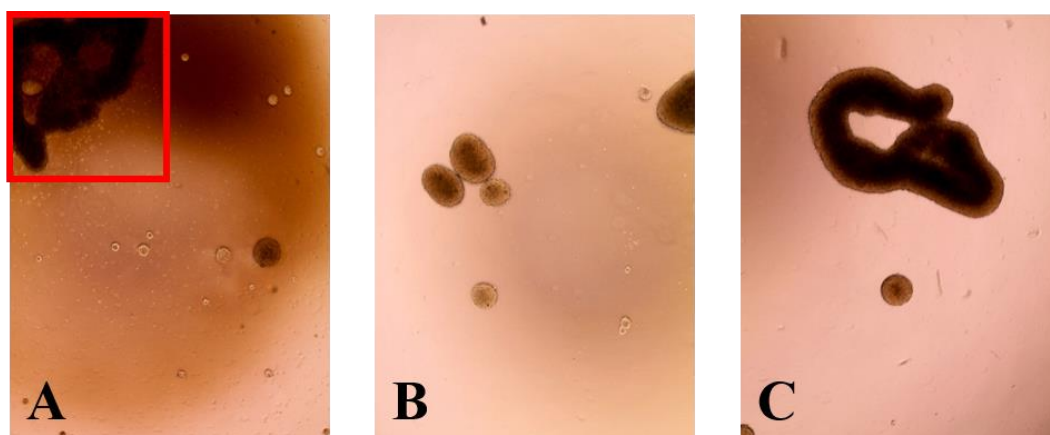


Abb. 29: Mikroskopieaufnahmen der HEK293-Zellen auf unterschiedlich behandelten 10 % (w/v) P1-Gelen nach vier Tagen in DMEM; A) unbehandelte Probe (roter Kasten zeigt Kontamination an), B) Probe für 30 min mit EtOH behandelt, C) Probe für 15 min mit UV-Licht bestrahlt (254 nm).

Nach vier Tagen konnte bei der unbehandelten Probe eine Kontamination festgestellt werden (Abb. 29A, roter Kasten), wohingegen auf den beiden behandelten Proben neben einer Aggregation der HEK293-Zellen keine weiteren Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, weshalb die Sterilisation durch UV-Strahlung und EtOH als erfolgreich angesehen werden konnte (Abb. 29B/C). Dennoch wurde für weitere Experimente die Bestrahlung mit UV-Licht bevorzugt, da die Ethanolbehandlung zum einen durch die längere Einwirkzeit und einzelnen Pipettierschritte zeitintensiver und aufwendiger ist und zum anderen kann durch die wasserziehende Wirkung von EtOH die Oberflächentopografie des Gels beeinflusst werden kann.

Nachdem eine geeignete Methode zur Sterilisation der Hydrogele entwickelt werden konnte, galt es nun den Einfluss der verschiedenen funktionalen Gruppen auf das Überleben von HEK293-Zellen zu analysieren.

3.9.1.2 Einfluss des TMAEA*OTf-Anteils

Zunächst wurde der Einfluss der kationischen Ladungen untersucht. Dafür wurden Gele mit fünf verschiedenen TMAEA*OTf-Anteilen im Bereich von 0 – 10 mol% durch Mischen von **P1** und **P7** hergestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Mischverhältnisse von P1 und P7 zur Variation des TMAEA*OTf-Anteils.

Gel	TMAEA [mol%]	P1	P7
G1	0	1	0
G2	2,5	0,8	0,2
G3	5	0,6	0,4
G4	7,5	0,4	0,6
G5	10	0,2	0,8

Die Gele wurden dafür in Duplikaten in eine 96-well Mikrotiterplatte gegossen, wobei 90 μ L Polymerlösung eingesetzt wurden, um eine vollständige Bedeckung der Kammern (Höhe des Gels ca. 1 – 2 mm) zu gewährleisten. Nach einer zwölfstündigen Gelierungszeit wurden die Proben über die zuvor entwickelte UV-Methode sterilisiert und für 3 – 4 Tage zur Entfernung des restlichen NaBrO₃ mit sterilem PBS-Puffer (0,01 M, pH 7,4) gewaschen, wobei dreimal täglich ein Pufferwechsel erfolgte. Nach Zugabe der HEK293-Zellen (10000 Zellen) in DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) wurden diese für einen Tag bei 37 °C und 5 % CO₂ auf den Gelen kultiviert. Nach Aspiration des Mediums und Trypsinierung der Zellen wurde die Anzahl der lebenden Zellen relativ zur Kontrollkultur (Zellkulturplastik) über den CellTiter-Glo[®] Assay bestimmt, welchem die enzymkatalysierte Umsetzung von Luziferin (**17**) zum lumineszierenden Oxyluziferin (**18**) zu Grunde liegt (Schema 18).



Schema 18: Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin unter Verwendung von ATP und Sauerstoff (AMP: Adenosinmonophosphat; PP_i: Diphosphate).

Da für die durch das Enzym Luziferase katalysierte Reaktion äquimolare Mengen an Adenosintri-phosphat (ATP) benötigt werden, kann eine direkte Beziehung zu der Anzahl an lebenden Zellen hergestellt werden, da ausschließlich metabolisch-aktive Zellen ATP produzieren.^[249]

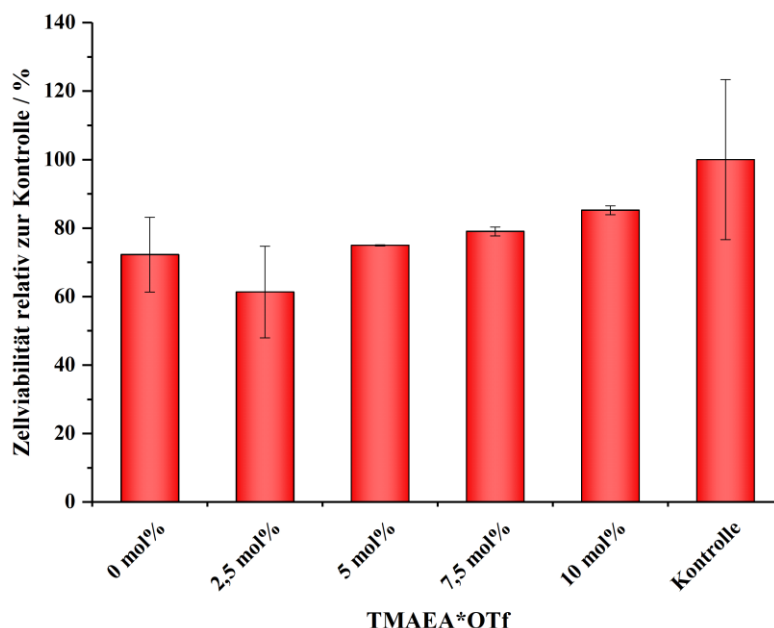


Abb. 30: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils (Kontrolle Zellkulturplastik).

Die Ergebnisse des CellTiter-Glo[®] Assays von **G1 - G5** (Abb. 30) zeigen eine leicht ansteigende Zellviabilität mit höher werdenden TMAEA*OTf-Anteilen. Da der Assay durch die Aspiration des Mediums nur adhärenente Zellen detektiert, kann die erhöhte Zellzahl auf die zunehmende Zelladhäsion zurückgeführt werden. Diese resultiert aus den vermehrten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Oberfläche der HEK293-Zellen und der Geloberfläche mit steigendem TMAEA*OTf-Anteil, welcher eine zunehmende Ladungsdichte zur Folge hat.^[241] Dennoch lagen die Zellviabilitäten für alle Gele mit 60 – 80 % unterhalb des Wertes der Kontrolle. Diese Beobachtung deutet jedoch nicht zwangsläufig auf eine toxische Wirkung der Hydrogele auf die Zellen hin, da die geringeren Zellzahlen auch aus einer langsameren Proliferation resultieren können. Aus diesem Grund sollten in Zukunft LIVE/DEAD Assays durchgeführt werden, bei denen sowohl lebende als auch bereits abgestorbene Zellen detektiert werden^[250] und so präzisere Aussagen über die Zytotoxizität der Gele getroffen werden können.

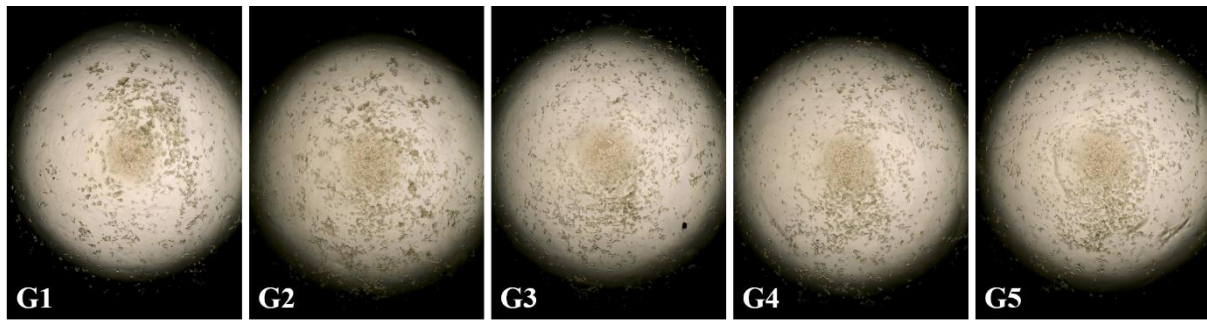


Abb. 31: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1 – G5 mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.

Anhand der Mikroskopieaufnahmen der Gele (Abb. 31) ließen sich mit Variation des TMAEA*OTf-Anteils keine großen Unterschiede in Bezug auf die Zellverteilung und Transparenz feststellen. Lediglich bei **G1** wiesen die Zellen eine leicht höhere Neigung zur Agglomeratbildung auf, was durch die mangelnde Zelladhäsion aufgrund der fehlenden kationischen Ladung verursacht werden könnte.

3.9.1.3 Einfluss des Peptidanteils

Neben Ladungen haben auch Peptide einen Einfluss auf die Zellviabilität, welcher in diesem Kapitel untersucht werden soll. Dazu wurden analog zu den zuvor gezeigten Experimenten Zelltests durchgeführt, wobei hier durch Verwendung von **P1** und **P2-RGD** der Peptidanteil in einem Bereich von 0,1 – 2 mol% variiert wurde (Tabelle 12).

Tabelle 12: Mischverhältnisse von P1 und P2-RGD zur Variation des Peptidanteils.

Gel	Pep-1 [mol%]	P1	P2-RGD
G1	0	1	0
G6	0,1	0,98	0,02
G7	0,5	0,9	0,1
G8	1	0,8	0,2
G9	2	0,6	0,4

Die Ergebnisse aus dem CellTiter-Glo[®] Assay zeigten für die peptidfunktionalisierten Gele Zellviabilitäten zwischen 40 – 60 %, jedoch ohne einen klar erkennbaren Trend (Abb. 32). Dies lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit von RGD-Funktionalisierungen keinen Einfluss auf die Zellviabilität hat bzw. der Beitrag zur Zelladhäsion sehr gering ist, was auch durch die im Vergleich zu den geladenen Gelen im Schnitt 20 % niedrigere Viabilität deutlich wird. KUSCHEL *et al.* konnten ein ähnliches Verhalten für HEK293-Zellen feststellen, indem sie die

relative Anzahl der adhärenen Zellen auf mit verschiedenen Proteinen beschichteten Gelen und kationischem PLL verglichen.^[251] Diese Daten deuten darauf hin, dass die elektrostatischen Interaktionen im Vergleich zu der RGD-Integrin-Wechselwirkung einen größeren Einfluss auf die Zelladhäsion besitzt. Diese These deckt sich mit den Beobachtungen von GEIGER und ADDADI, welche die Zelladhäsion ausgehend von einer initialen Wechselwirkung der hyaluronsäurereichen Glykokalyx bzw. perizellulären Matrix mit der positiv geladenen Oberfläche und der folgenden Ausbildung von Protein-Integrin-Interaktionen als einen mehrstufigen Prozess beschrieben.^[252]

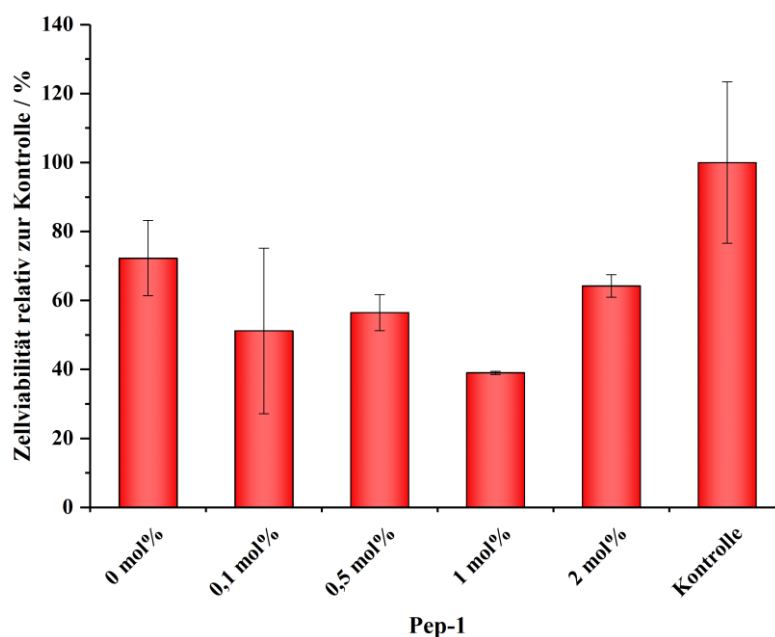


Abb. 32: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Peptidanteils (Kontrolle Zellkulturplastik).

Die Mikroskopieaufnahmen der HEK293-Zellen (Abb. 33) zeigten analog zu denen der kationischen Gele keine oder eine sehr geringe Neigung zur Aggregatbildung.

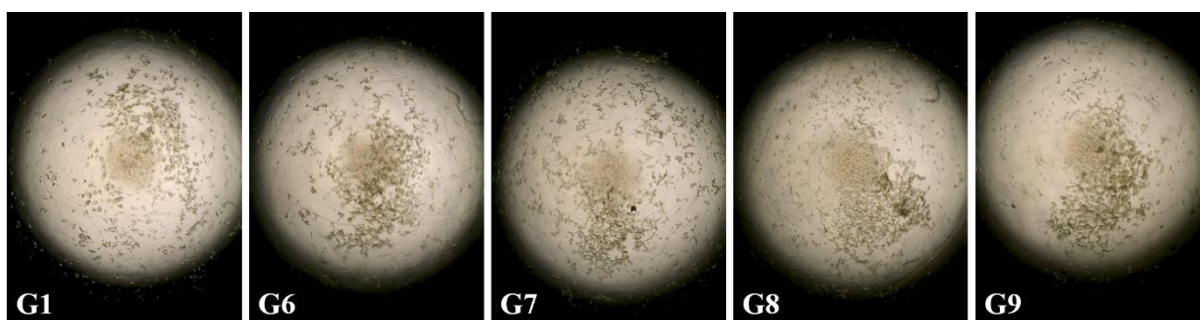


Abb. 33: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1, G6 – G9 mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.

3.9.1.4 Einfluss der Kombination aus TMAEA*OTf und Pep-1

Nachdem sowohl die Einflüsse von kationischen Gruppen als auch von **Pep-1** einzeln untersucht wurden, galt es nun die Zelltests auf Gelen mit beiden Funktionalisierungen zur Ermittlung möglicher Synergien durchzuführen. Dazu wurde zur Gelsynthese neben den zuvor verwendeten **P1**, **P7** und **P2-RGD** auch **P8-RGD** eingesetzt. Um später eventuelle Effekte möglichst genau auf den einzelnen Parameter zurückführen zu können, wurde sowohl der TMAEA*OTf-Anteil (0 – 10 mol%) bei konstantem Pep-1-Anteil (2 mol%) als auch der Pep-1-Anteil (0 – 2 mol%) bei gleichbleibendem TMAEA*OTf-Anteil (10 mol%) variiert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Mischverhältnisse der Copolymere zur Variation des Peptidanteils bei konstantem TMAEA*OTf-Anteil bzw. des TMAEA*OTf bei gleichbleibendem Peptidanteil.

Gel	TMAEA [mol%]	Pep-1 [mol%]	P1	P7	P2-RGD	P8-RGD
G9	0	2	0,6	-	0,4	-
G10	2,5	2	0,48	0,12	0,32	0,08
G11	5	2	0,36	0,24	0,24	0,16
G12	7,5	2	0,24	0,36	0,16	0,24
G13	10	2	0,12	0,48	0,08	0,32
G14	10	0,1	0,196	0,784	0,004	0,016
G15	10	0,5	0,18	0,72	0,02	0,08
G16	10	1	0,16	0,64	0,04	0,16

Die Kombination von verschiedenen TMAEA*OTf-Anteilen bei konstanten 2 mol% **Pep-1** zeigte im Vergleich zu den nicht-peptidfunktionalisierten Gelen keinen positiven Einfluss auf die Zellviabilität (Abb. 34A). Im Gegenteil konnte durch die Abnahme der Werte um bis zu 40 % nach Einbringen von Pep-1 ein eher negativer Effekt festgestellt werden. Nichtsdestotrotz wurde durch den Anstieg der Viabilität bei zunehmenden TMAEA*OTf-Anteil ein ähnlicher Trend verglichen zu den Daten der nicht-peptidhaltigen Gelen festgestellt. Für einen Anteil von 2,5 mol% TMAEA*OTf konnten jedoch aufgrund von Kontaminationen keine verlässlichen Ergebnisse erhalten werden.

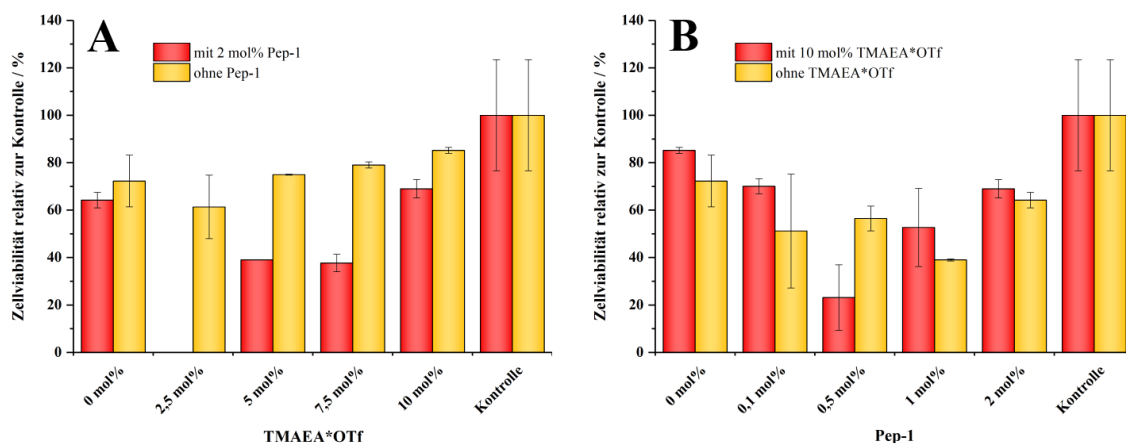


Abb. 34: A) Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils mit und ohne 2 mol% Pep-1; B) Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Peptidanteils mit und ohne 10 mol% TMAEA*OTf (Kontrolle Zellkulturplastik).

Im Gegensatz dazu konnte durch das Einbringen von TMAEA*OTf in peptidhaltige Gele eine Erhöhung der Zellviabilität von bis zu 20 % erreicht werden (Abb. 34B), was die zuvor aufgestellte These, dass der initiale Prozess der Zelladhäsion primär durch die elektrostatischen Wechselwirkungen gesteuert wird, bekräftigen konnte. Dennoch sollten die Ergebnisse und Aussagen der Zellexperimente in weiteren Versuchen validiert werden, da die dargestellten Zellexperimente nur einmal in Duplikaten durchgeführt wurden.

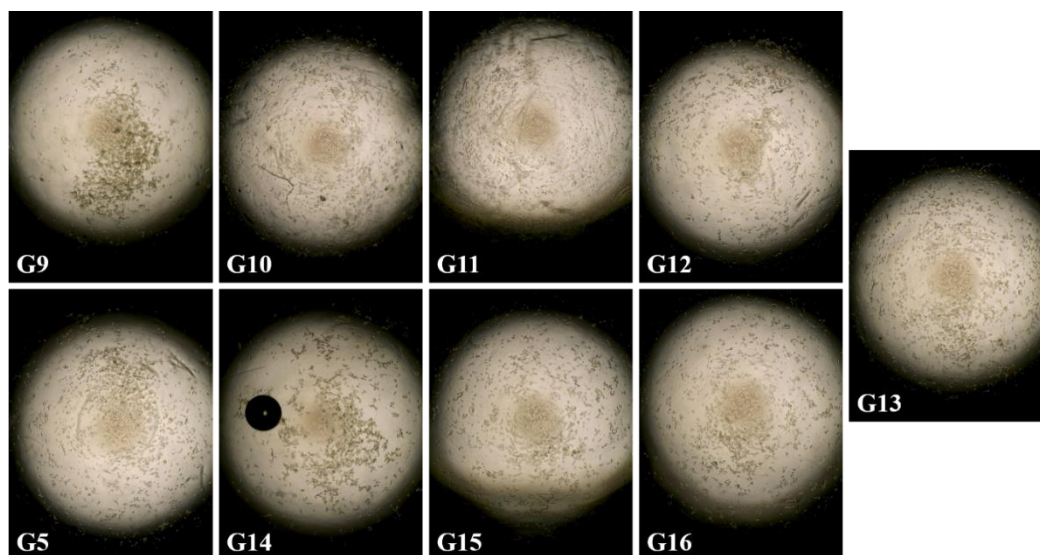


Abb. 35: Mikroskopieaufnahmen der Gele mit den jeweiligen Kombinationen der Pep-1- und TMAEA*OTf-Funktionalisierungen mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.

Die Mikroskopieaufnahmen der verschiedenen Gele (Abb. 35) zeigen bis auf das ausschließlich peptidfunktionalisierte **G9** vereinzelte Zellen und eine homogene Zellverteilung. Dieser Effekt wird durch die vorangegangenen Betrachtungen höchstwahrscheinlich von

TMAEA*OTf hervorgerufen, was auch bei einem Vergleich mit **G9** deutlich wird, auf dem sich vermehrt Zellagglomerate bildeten.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Variation des Peptidanteils und des TMAEA*OTf-Anteils über einen modularen Ansatz möglich war und auf diese Weise deren Einflüsse auf die Zellviabilität von HEK293-Zellen untersucht werden konnten, galt es nun diese Effekte an Stammzellen zu untersuchen.

3.9.2 Zytotoxizitätstest mit mESCs

Für die folgenden Zelltests wurden mausembryonale Stammzellen (mESCs) eingesetzt, da diese aufgrund ihrer Pluripotenz, analog zu hESCs, in jeden Zelltyp differenzieren können. mESCs bieten jedoch den Vorteil der einfacheren Zugänglichkeit, da keinerlei ethische Konflikte vorliegen.^[253] Demzufolge stellen mESCs ein sehr gutes Modell zur Untersuchung der Einflüsse der einzelnen Gelparameter und Funktionalitäten dar. Für diese Zelltests wurden die gleichen Protokolle zur Gelpräparation, Sterilisation und Bestimmung der Zellviabilität, wie zuvor bei den Experimenten mit den HEK293-Zellen, eingesetzt. Um jedoch genauere Aussagen über den Einfluss der Funktionalisierungen auf die Zelladhäsion treffen zu können, wurde die Anzahl der lebenden Zellen sowohl vor als auch nach der finalen Aspiration des Mediums bestimmt. Analog zu den HEK293-Zellen wurde zunächst der Einfluss der kationischen Ladung untersucht.

3.9.2.1 Einfluss des TMAEA*OTf-Anteils

Für die Variation des TMAEA*OTf-Anteils wurden die gleichen Copolymere und Mischverhältnisse, wie bei den vorigen Experimenten mit HEK293-Zellen, verwendet (Tabelle 11). Die Zelltests lieferten für die verschiedenen Gele Zellviabilitäten von ca. 60 % (Abb. 36) und waren somit im Vergleich zu denen der HEK293-Zellen um 10 – 20 % verringert (Abb. 30). Dies deutet drauf hin, dass die mESCs eine vergleichsweise höhere Materialabhängigkeit als die HEK293-Zellen aufwiesen, welche aus einem Vergleich der Zellviabilitäten von **G1** ersichtlich wird. So lieferte **G1** für die HEK293-Zellen nach der Aspiration eine Zellviabilität von 72 %, wohingegen für die mESCs lediglich 11 % erreicht werden konnten. Bei dem Vergleich der Zellviabilitäten vor und nach der Aspiration des Mediums zeigte sich außerdem eine deutliche Abhängigkeit vom TMAEA*OTf-Anteil, denn durch das Einbringen von kationischen Ladungen konnte eine Zellviabilität von mindestens 27 % bei einem Anteil von 10 mol% TMAEA*OTf erreicht werden. Im Gegensatz zu den HEK293-Zellen zeigte sich durch die Abnahme der Zellzahlen mit steigendem TMAEA*OTf-Anteil ein gegensätzlicher Trend. Dieses

Verhalten lässt sich möglicherweise durch die eingeschränkte Migration und der damit verbundenen reduzierten Proliferation der Zellen erklären, die aus der durch die erhöhte TMAEA*OTf-Dichte vermehrt auftretenden elektrostatischen Wechselwirkungen resultiert.^[254]

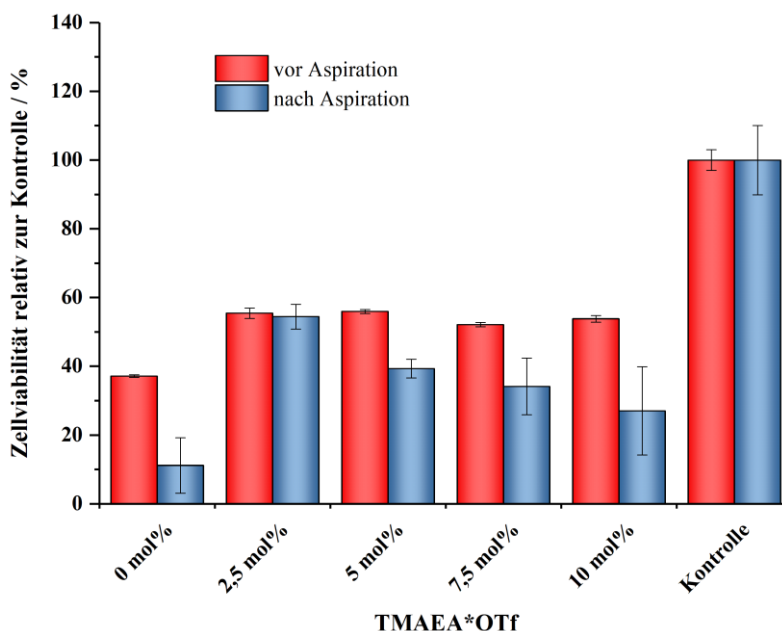


Abb. 36: Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils (Kontrolle Zellkulturplastik).

Nachdem der Einfluss von TMAEA*OTf auf die Zellviabilitäten analysiert worden war, sollte dieser auch in Bezug auf die Zellverteilung untersucht werden. Hierfür wurden, analog zu den HEK293-Zellen, Mikroskopieaufnahmen der Zellkulturen angefertigt (Abb. 37). Bei dem un-funktionalisierten **G1** konnte eine starke Ausbildung von Zellaggregaten festgestellt werden, was sich durch das Fehlen adhäsionsfördernder Gruppen erklären lässt. Des Weiteren kann die Ausbildung der Zellaggregate eine zusätzliche Erklärung für die geringe Zellviabilität bei **G1** liefern, da das produzierte ATP von den Zellen innerhalb des Aggregats nicht durch den CellTiter-Glo[®] Assay detektiert werden kann, wodurch die Anzahl der lebenden Zellen geringer ausfällt. Dahingegen wiesen die Gele **G2 - G5** analog zu den HEK293-Zellen homogene Zellverteilungen auf.

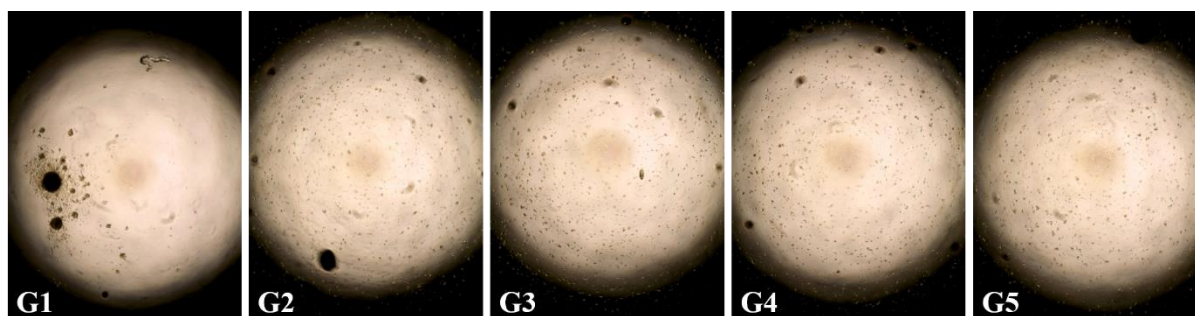


Abb. 37: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1 – G5 mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.

3.9.2.2 Einfluss des Peptidanteils

Entsprechend zu den HEK293-Zellen wurde für die mESCs ebenfalls der Einfluss des Peptidanteils von **Pep-1** untersucht, wobei die Zellviabilität auch hier vor und nach der Aspiration des Mediums ermittelt wurde. Zur Herstellung der Gele wurden die in Tabelle 12 gezeigten Copolymere in den entsprechenden Mischverhältnissen eingesetzt.

Im Vergleich zu den Tests mit variierendem TMAEA*OTf-Anteil (Abb. 36) konnten durch die Variation des Peptidanteils lediglich Zellviabilitäten von höchstens 45 % vor bzw. 32 % nach Aspiration erreicht werden (Abb. 38). Es zeigte sich jedoch wieder, dass die Funktionalisierung des Gels einen Einfluss auf die Zellviabilität bzw. Zelladhäsion hat. So wiesen alle Gele vor der Aspiration ähnliche Zellviabilitäten auf, wohingegen nach der Aspiration erst nach dem Einsatz von mindestens 1 mol% **Pep-1** ein deutlicher Anstieg der Zellviabilität und somit der Zelladhäsion verzeichnet werden konnte. Da die Werte für **G6** und **G7** sehr ähnlich zu denen von **G1** waren, kann davon ausgegangen werden, dass Peptidkonzentrationen unter 1 mol% das Zellverhalten nicht beeinflussen. Mit 32 % liegt der höchste ermittelte Wert nach der Aspiration dennoch mehr als 20 % unterhalb der Werte, die mit der TMAEA*OTf-Funktionalisierung erreicht wurden. Daher ist zur Förderung der Zelladhäsion die Einführung kationischer Ladungen gegenüber der mit viel Synthesaufwand verbundenen Peptidfunktionalisierung zu bevorzugen. Des Weiteren konnte durch die ermittelten Werte ebenfalls die These der initialen Zelladhäsion durch elektrostatische Wechselwirkungen bekräftigt werden.

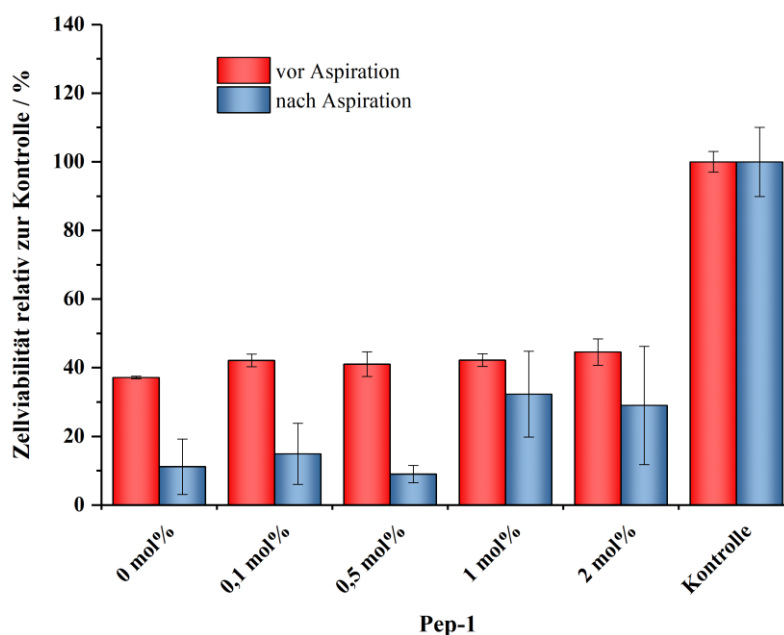


Abb. 38: Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des Peptidanteils (Kontrolle Zellkulturplastik).

Die Mikroskopieaufnahmen der peptidmodifizierten Gele zeigten eine vermehrte Agglomeratbildung der mESCs (Abb. 39). Dieses Verhalten lässt sich analog zu den niedrigen Zellviabilitäten über die geringe Oberflächenadhäsion erklären, da mESCs auf unfunktionalisierten Polyacrylamidgelen generell zur Agglomeratbildung neigen.^[255]

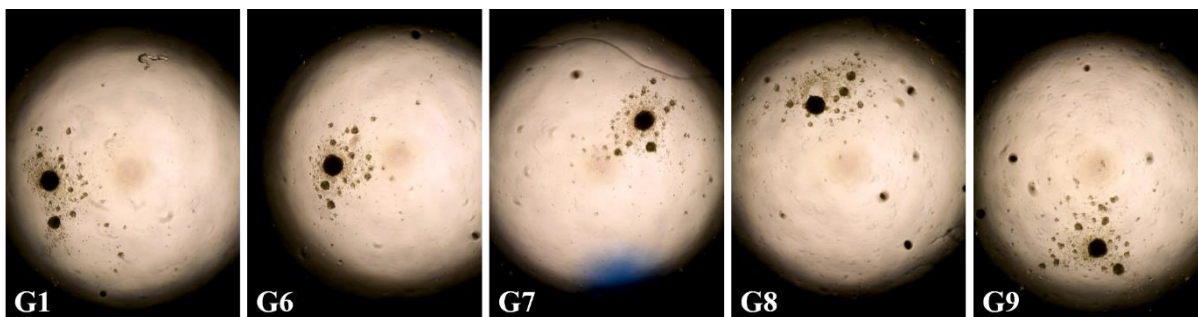


Abb. 39: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1, G6 – G9 mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.

3.9.2.3 Einfluss der Kombination aus TMAEA*OTf und Pep-1

Nachdem sowohl der Einfluss der kationischen Gruppen als auch der des Peptidanteils analysiert wurde, sollten nun, analog zu den HEK293-Zellexperimenten, die jeweiligen Kombinationen der beiden Funktionalitäten untersucht werden. Dafür wurden wieder die in Tabelle 13 dargestellten Copolymere in den entsprechenden Mischverhältnissen eingesetzt.

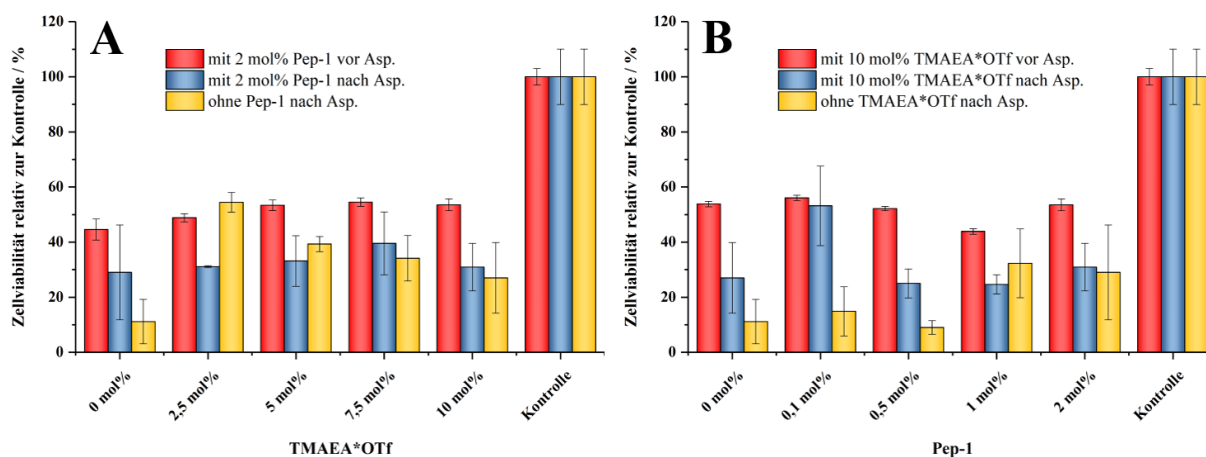


Abb. 40: A) Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils mit und ohne 2 mol% Pep-1; B) Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des Peptidanteils mit und ohne 10 mol% TMAEA*OTf (Kontrolle Zellkulturplastik).

Durch die gemessenen Zellviabilitäten (Abb. 40) konnten die zuvor ermittelten Effekte der einzelnen Funktionalisierungen bestätigt werden. So wurden, analog zu den vorherigen Experimenten, ähnliche Zellviabilitäten vor der Aspiration erhalten. Nach Aspiration zeigten die Werte für TMAEA*OTf bei konstanten 2 mol% **Pep-1** (Abb. 40A), dass das Einbringen des Peptids keine deutliche Verbesserung zu den nicht-peptidfunktionalisierten Gelen

hervorbrachte, was sich mit den Ergebnissen aus Abb. 38 deckt. Im Gegensatz dazu konnte durch die Funktionalisierung der peptidhaltigen Gele mit 10 mol% TMAEA*OTf (Abb. 40B) die Zellviabilität für die Gele mit 0,1 bzw. 0,5 mol% **Pep-1** deutlich erhöht werden, wobei sich die Werte ab einem Peptidanteil von 1 mol% an die zuvor ermittelten Zellviabilitäten ohne TMAEA*OTf angleichen. Dies lässt sich analog zu den Gelen mit einem höheren TMAEA*OTf-Gehalt über die höhere Dichte an adhäsionsfördernden Gruppen und der daraus folgenden geringeren Proliferation erklären.

Durch die Mikroskopieaufnahmen (Abb. 41) konnten die einzelnen Einflüsse der Funktionalisierungen bestätigt werden. Es zeigte sich zum Beispiel, dass die Zellen durch das Einbringen von TMAEA*OTf in die peptidhaltigen Gele eher vereinzelt vorlagen, wohingegen die Agglomeratbildung mit fallendem TMAEA*OTf-Anteil zunahm. Im Gegensatz dazu konnte durch die Funktionalisierung der TMAEA*OTf-haltigen Gele mit **Pep-1** keine Änderung der Agglomeratbildung beobachtet werden.

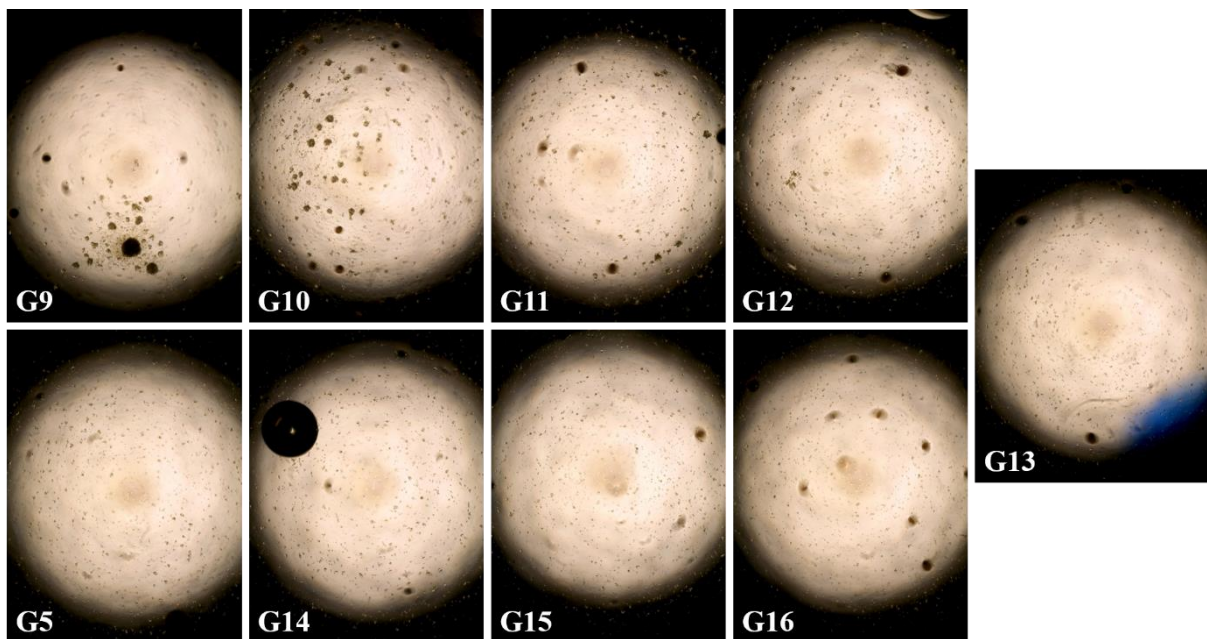


Abb. 41: Mikroskopieaufnahmen der Gele mit den jeweiligen Kombinationen der Pep-1- und TMAEA*OTf-Funktionalisierungen mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.

Nachdem der Einfluss der verschiedenen Funktionalisierungen auf HEK293-Zellen und auf mESCs analysiert wurde, wurde abschließend der Beitrag der Steifigkeit auf die Zellviabilitäten der beiden Zelllinien untersucht.

3.9.3 Einfluss der Steifigkeit auf die Zellviabilität von HEK293-Zellen und mESCs

Die Abhängigkeit des Zellverhaltens von den mechanischen Eigenschaften des eingesetzten Materials resultiert vor allem aus der großen Vielfalt an verschiedenen menschlichen Geweben. Beispielsweise treten Gewebe auf, die Steifigkeiten von wenigen Pa (z.B. Fettgewebe, Hirngewebe)^[256,257] bis hin zu mehreren hundert MPa (z.B. Gewebe der Achillessehne)^[258] aufweisen. ENGLER *et al.* zeigten 2007, dass die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in drei verschiedene Zelllinien durch die Nachahmung der jeweiligen Steifigkeiten gesteuert werden konnte. Infolgedessen bildeten die mesenchymalen Stammzellen auf einem dem Hirngewebe entsprechenden Substrat mit einem E-Modul von 0,1 – 1 kPa neuronale Zellen, wohingegen auf festeren Substraten Muskelfaserzellen bzw. Osteoblasten erzeugt werden konnten.^[259]

Dieser Effekt resultiert dabei vorwiegend aus der durch die fokalen Adhäsionspunkte und Substratsteifigkeit resultierenden Kraft, welche eine Deformation der Zelle herruft. Auf weichen Materialien kann die Zelle mittels der fokalen Adhäsionspunkte und des Kontraktionsapparates das Gel selbst kontrahieren, sodass wenige Aktinfasern, welche maßgeblich die mechanischen Eigenschaften der Zelle bestimmen, vorhanden sind und die Zelle demzufolge selbst eine geringere Steifigkeit aufweist (Abb. 42A). Wenn jedoch ein steiferes Material verwendet wird, kann die Kontraktion des Gels durch die Zelle nicht mehr erfolgen, wodurch die Zelle selbst gespreitet wird und sich folglich die Anzahl und Dicke der Aktinfasern erhöht. Dies hat zur Folge, dass die Zelle selbst steifer wird (Abb. 42B).^[118]

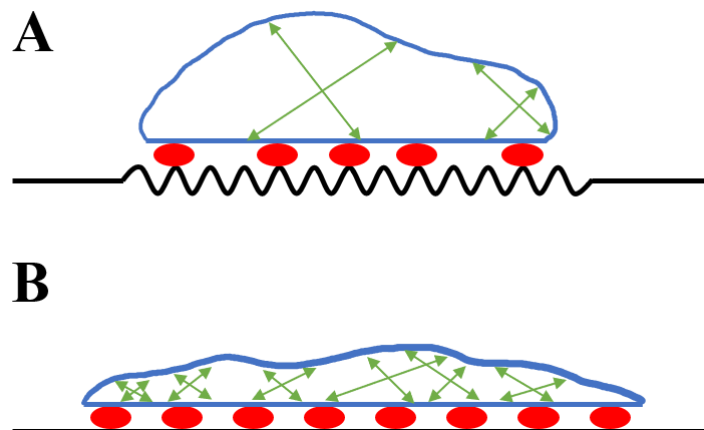


Abb. 42: Schematische Übersicht einer weichen Zelle auf einem weichen Substrat (A) einer steifen Zelle auf einem steifen Substrat (B). (schwarze Linie: Substrat, rote Kreise: fokale Adhäsionspunkte, blaue Linie: Zelle, grüne Pfeile: Aktinfasern).

Der Einfluss der Steifigkeit auf die Zellviabilitäten wurde, analog zu den vorigen Zellexperimenten, nach einem Tag Kultivierung über den CellTiter-Glo[®] Assay bestimmt, wobei sowohl HEK293-Zellen als auch mESCs verwendet wurden. Die Variation der Steifigkeit erfolgte

dabei über die in Kapitel 3.7.4 beschriebene Methode, bei der die Konzentration der Copolymerlösung zur Einstellung der Steifigkeit angepasst wurde (Tabelle 4). Die Zellviabilitäten lagen für die HEK293-Zellen bei maximal 80 %, wohingegen für die mESCs 58 % vor bzw. 54 % nach Aspiration erreicht wurden (Abb. 43). Aus den Daten ließ sich für die HEK293-Zellen jedoch kein klarer Trend erkennen, da sowohl die weichen Gele (10 % (w/v)) als auch die steifsten Gele (30 % (w/v)) höhere Werte lieferten als die Gele mit der mittleren Steifigkeit (20 % (w/v)). Dahingegen zeigten sich bei den mESCs vor Aspiration des Mediums mit 54 % bzw. 58 % ähnliche Zellviabilitäten für die weichen bzw. mittleren Gele, während für das 30 % (w/v)-Gel lediglich ein Wert von 37 % erreicht werden konnte. Letztere wiesen mit 11 % auch die geringste Viabilität nach der Aspiration des Mediums auf. Die geringeren Werte lassen sich möglicherweise durch Überreste von NaBrO_3 erklären, da im Vergleich zu den 10 % (w/v)-Gelen die doppelte Menge eingesetzt wurde. Nichtsdestotrotz konnten für die 20 % (w/v)-Gele sowohl vor als auch nach der Aspiration mit 58 % bzw. 54 % ähnliche Viabilitäten erzielt werden, was für eine vollständige Adhäsion der mESCs spricht.

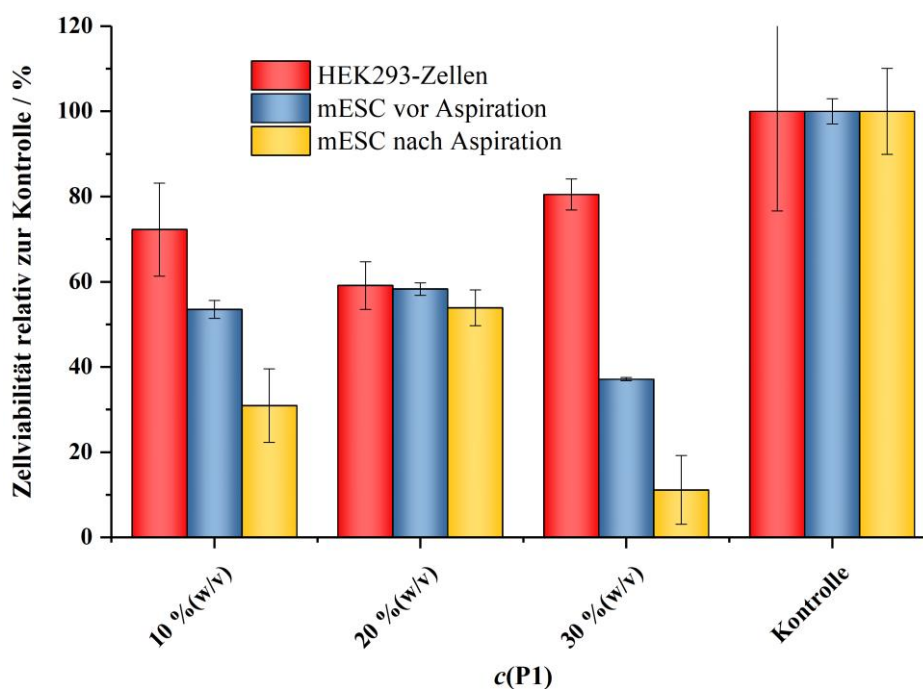


Abb. 43: Zellviabilitäten von HEK293-Zellen und mESCs in Abhängigkeit der Festigkeit (Kontrolle Zellkulturplastik).

Die Zellverteilungen auf den Gelen wurden über Mikroskopieaufnahmen der einzelnen Gele analysiert (Abb. 44). Dabei zeigte sich mit ansteigender Steifigkeit der Gele vor allem für die HEK293-Zellen eine zunehmende Neigung zur Agglomeratbildung, die jedoch keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilitäten hatte (Abb. 43). Dahingegen konnte für die mESCs keine Änderung der Zellverteilung festgestellt werden, wobei die mESCs auf den unfunktionalisierten Gelen aufgrund der mangelnden Zelladhäsion generell zur Agglomeratbildung neigen.

Zusammenfassend konnte ein deutlicher Effekt der Funktionalitäten und Steifigkeit auf die unterschiedlichen Zelllinien festgestellt werden, wobei dieser bei den mESCs deutlich stärker zur Geltung kam als bei den HEK293-Zellen. Dennoch müssen die Zellexperimente zur Verstärkung der Aussagekraft wiederholt werden, da die Anzahl der Proben hier zu gering war und somit sehr große Fehlerbalken auftraten. Des Weiteren konnten mit dem bestehenden System lediglich zweidimensionale Zellexperimente durchgeführt werden, wodurch das Zellverhalten ebenfalls beeinträchtigt wird. Daher wurde eine Methode entwickelt, um die hergestellten Polymere ohne den Einsatz toxischer Reagenzien zu vernetzen. Diese soll nun im folgenden Kapitel näher erläutert und diskutiert werden.

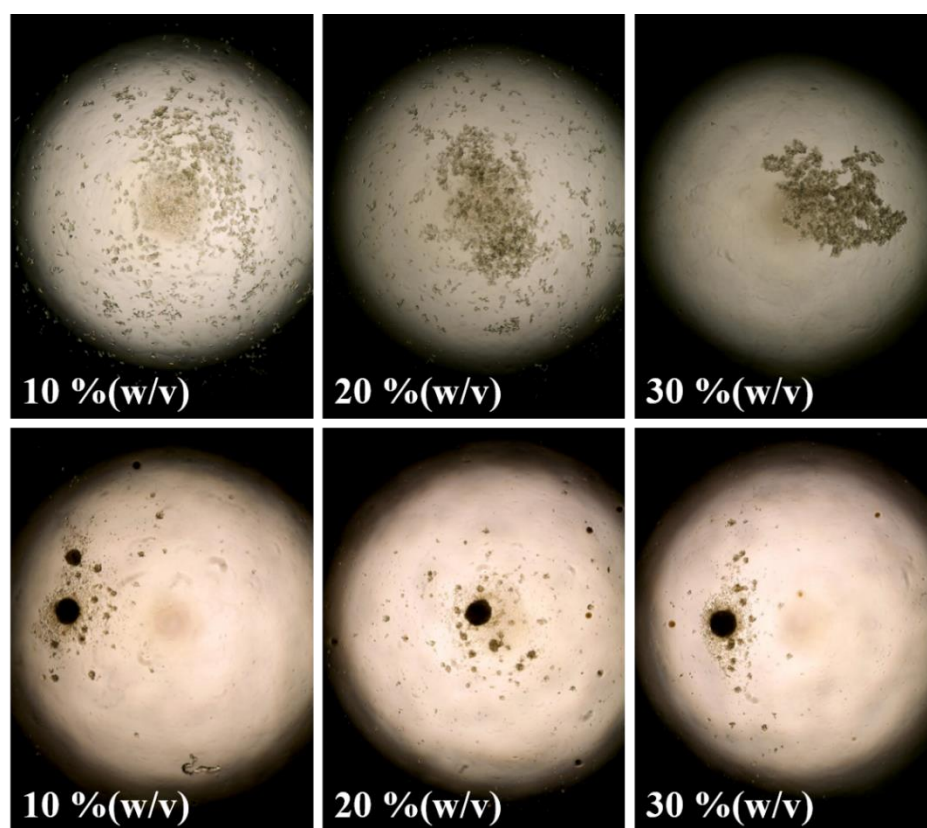


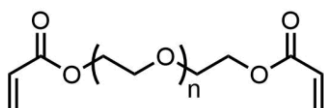
Abb. 44: Mikroskopieaufnahmen von HEK293-Zellen (oben) und mESCs (unten) auf Gelen mit unterschiedlichen Festigkeiten nach einem Tag Kultivierung.

3.10 Vernetzung der Copolymere mittels PEG-Diacrylaten

Eine Möglichkeit zur kovalenten Vernetzung von thiolmodifizierten Polymeren ist der Einsatz von Poly(ethylenglykol)diacrylaten (PEGDA), die analog zur Peptidfunktionalisierung (Kapitel 3.8.2.3) über Thiol-Michael-Klickreaktion an das Polymer gebunden werden können. Der Vorteil von bifunktionalen, PEG-basierten Michael-Akzeptoren liegt insbesondere in der hohen Biokompatibilität von PEG. Dadurch weist der Vernetzter ab einer Kettenlänge von mindestens neun Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten trotz der Acrylatgruppen keine Toxizität auf.^[260]

Generell wird für Moleküle mit einer Molmasse von über 1000 g/mol angenommen, dass diese aufgrund ihrer Größe nicht von Zellen aufgenommen werden können und somit keinen toxischen Effekt besitzen.^[261] Obwohl die Reaktivität von Acrylaten gegenüber Thiolen im Vergleich zu Maleimiden geringer ist,^[262] werden Acrylatderivate dennoch aufgrund der leichteren und günstigeren Synthese häufig als Vernetzer eingesetzt. So werden PEGs mittels Acryloylchlorid in einer Schotten-Baumann-Reaktion mit Acrylatgruppen endgruppenfunktionalisiert, wohingegen die entsprechenden maleimidfunktionalisierten Derivate häufig Mehrstufensynthesen erfordern.

In der Literatur wurden bereits zahlreiche Anwendungen beschrieben, bei denen PEGDAs zur Vernetzung von Polymeren verwendet wurden.^[263,264] Eines der bekanntesten Beispiele stellt das kommerziell unter dem Namen Extralink[®] erhältliche PEGDA3400 dar, welches in den meisten Fällen zur Vernetzung von thiolmodifizierten Biopolymeren (z.B. Hyaluronate) in Gegenwart von Zellen verwendet wird.^[265] Die Zellverkapselung wird dabei neben dem nicht-toxischen Vernetzer durch die Bioorthogonalität der eingesetzten Thiol-Michael-Klickreaktion ermöglicht. Ein weiterer Vorteil dieser Reaktion liegt darin, dass keine zusätzlichen Reagenzien benötigt werden und keine Nebenprodukte entstehen. Aus diesem Grund wurde dieses System zur Vernetzung der P(AMor-co-BMAC)-SH-Copolymere verwendet, um 3D-Zellexperimente zu ermöglichen. Dazu wurden analog zu den Experimenten aus Kapitel 3.7.4.1 Hydrogele aus **P1**-Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration hergestellt, wobei PEGDAs mit verschiedenen Kettenlängen eingesetzt wurden (Abb. 45).



- 19:** PEGDA575: n = 9
20: PEGDA1000: n = 19
21: PEGDA3500: n = 76

Abb. 45: Die zur Vernetzung von P1 eingesetzten PEGDAs, wobei die ungefähre Molmasse der einzelnen Moleküle durch die Zahl in der jeweiligen PEGDA-Abkürzung beschrieben wird.

PEGDA3500 (**21**) musste zunächst aus PEG3400 (**22**) und Acryloylchlorid (**23**) synthetisiert werden (Schema 19), da dieses im Gegensatz zu PEGDA575 (**19**) und PEGDA1000 (**20**) nicht kommerziell erhältlich war. Die Synthese von PEGDA3500 wurde, analog zu der Herstellung von BMAC, über eine Schotten-Baumann-Reaktion durchgeführt, wobei als nichtnukleophile Base Triethylamin (TEA) verwendet wurde. Dies war erforderlich, da Hydroxylgruppen im Vergleich zu Aminen wesentlich reaktionsträger sind und durch den Einsatz von NaOH Acryloylchlorid wahrscheinlich hydrolysiert werden würde.

wodurch die Anzahl an Netzpunkten und folglich die Netzwerkdicke zunimmt.^[266] Zudem konnten für die Quellwerte der PEGDA1000- und PEGDA3500-Gele ähnliche Werte beobachtet werden, obwohl sich die E-Moduli um bis zu eine Größenordnung unterscheiden. Dies kann möglicherweise auf die mit zunehmender Kettenlänge ansteigende Hydrophilie und auf die daraus folgende erhöhte Hydratisierung von PEG zurückgeführt werden. Des Weiteren konnten für PEGDA3500 bei einer **P1**-Konzentration von 20 % (w/v) keine stabilen Gele erhalten werden, da hohe Konzentrationen zu einer schnellen Gelierung und dadurch sehr kurzen Verarbeitungszeit führen. Bei einer **P1**-Konzentration von 7,5 % (w/v) konnte für PEGDA575 ebenfalls keine Gelbildung beobachtet werden, was möglicherweise durch eine geringe Vernetzung verursacht wurde. Diese kann aus dem Einsatz von äquimolaren Mengen an Thiolen und PEGDA resultieren, da durch die Bifunktionalität von BMAC ein Verhältnis von Acrylat zu Thiol von 2:1 vorliegt und so die Möglichkeit besteht, dass einige PEGDA-Moleküle nur einseitig gebunden werden. Daher wurden die Experimente wiederholt, wobei zur Gewährleistung eines Verhältnisses von Acrylat zu Thiol von 1:1 lediglich 0,5 Äquivalente von PEGDA bezogen auf die Thioldmenge eingesetzt wurden.

Tabelle 15: Geleigenschaften der mit 0,5 eq. PEGDA-vernetzten P1-Gele in Abhängigkeit der Copolymerkonzentration und der PEG-Kettenlänge des Vernetzers.

PEGDA	c(P1) [%(w/v)]	G^a [Pa]	E^b [Pa]	Q^c
575	7,5	52 ± 2	156 ± 6	$17,6 \pm 1,1$
	10	704 ± 117	2112 ± 351	$10,5 \pm 0,4$
	15	3523 ± 112	10569 ± 336	$6,5 \pm 0,1$
	20	7697 ± 1409	23091 ± 4227	$4,8 \pm 0,1$
1000	7,5	876 ± 59	2628 ± 177	$9,8 \pm 0,1$
	10	2772 ± 249	8316 ± 747	$7,1 \pm 0,1$
	15	7183 ± 115	21549 ± 345	$5,1 \pm 0,2$
	20	14722 ± 3875	44166 ± 11625	$3,7 \pm 0,1$
3500	7,5	6782 ± 425	20346 ± 1275	$6,6 \pm 0,1$
	10	12882 ± 1203	38646 ± 3609	$5,5 \pm 0,1$
	15	27948 ± 4737	83844 ± 14211	$4,3 \pm 0,2$
	20	45975 ± 5961	137925 ± 17883	$3,7 \pm 0,1$

Gele wurden in Triplikaten aus P1 in PBS (0,01 M, pH 7,4) mit 0,5 eq. PEGDA hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen. a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22.

Durch den Einsatz von 0,5 Äquivalenten an PEGDA konnten diesmal für alle Konditionen Gele erhalten werden, wobei für die Gele mit PEGDA575 höhere E-Moduli beobachtet wurden. Dies bestätigt die zuvor aufgestellte These, dass die Verwendung von einem Äquivalent PEGDA zu einer unvollständigen Vernetzung führt. Für PEGDA1000 und PEGDA3500 wurden hingegen niedrigere E-Moduli gemessen, was ebenfalls durch eine unvollständige Vernetzung erklärt werden kann. Diese könnte eine Folge aus der schnell ansteigenden Viskosität der jeweiligen Gelierungslösungen sein, die eine geringere Beweglichkeit des Vernetzers bewirkt, wodurch die Vernetzungsreaktion verlangsamt oder im schlimmsten Falle verhindert wird. Folglich wären wahrscheinlich 0,7 – 0,8 Äquivalente PEGDA eine optimale Menge, um eine vollständige Vernetzung zu erhalten.

Nach der erfolgreichen Gelierung wurde die Zytotoxizität der jeweiligen Gele anhand von HEK293-Zellen untersucht. Die Zellexperimente wurden, analog zu den Tests aus den vorherigen Kapiteln, durchgeführt, wobei zur Herstellung vergleichbarer Gele ein Äquivalent PEGDA zur Gelierung eingesetzt wurde.

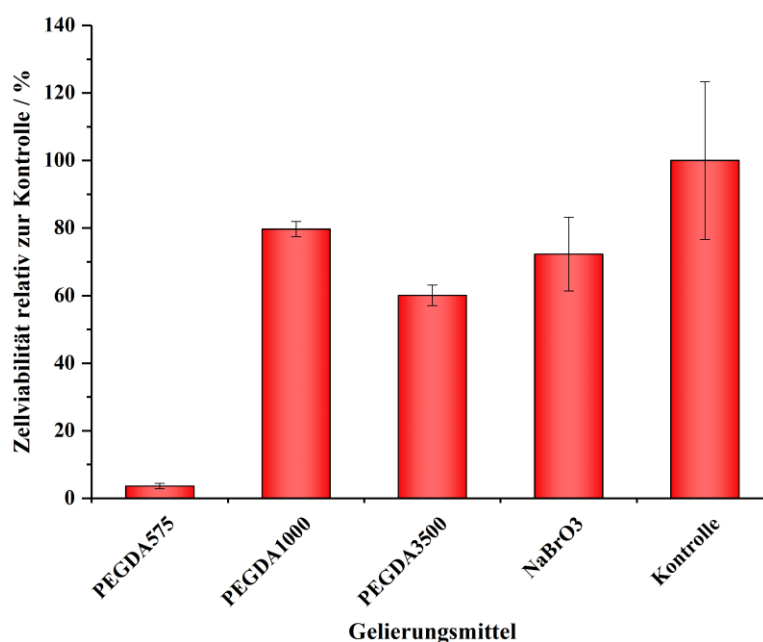


Abb. 46: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Gelierungsmittels. (Duplikate aus einer 10 % (w/v)-igen P1-Lösung in PBS (0,01 M, pH 7,4) mit 1 eq. des entsprechenden Gelierungsmittels (Kontrolle Zellkulturplastik).

Die Zellexperimente ergaben für die unterschiedlichen PEGDAs zu denen mit NaBrO₃ vergleichbare Zellviabilitäten (Abb. 46). Lediglich bei PEGDA575 konnte eine toxische Wirkung auf die HEK293-Zellen festgestellt werden, die jedoch höchstwahrscheinlich aus nicht abreagierten PEGDA575-Molekülen resultierte. Da bei PEGDA1000 bzw. PEGDA3500 ebenfalls Restmoleküle vorliegen sollten, kann folglich die anfangs aufgestellte These, dass Moleküle

mit einer Molmasse über 1000 g/mol nicht toxisch sind, bekräftigt werden. Demzufolge sollten sowohl PEGDA1000 als auch PEGDA3500 als Vernetzer für 3D-Zellexperimente geeignet sein. Des Weiteren bietet die Verwendung von PEGDA neben der größeren Variationsmöglichkeit der Steifigkeit (0,15 – 140 kPa) auch den Vorteil, dass generell weniger Polymer benötigt wird, um zu NaBrO_3 vergleichbare E-Moduli zu erreichen.

Nachdem mit der Anwendbarkeit für 3D-Zellexperimente eine weitere wichtige Eigenschaft adressiert werden konnte, sollte abschließend das Hydrogelsystem in Bezug auf die Bioabbaubarkeit modifiziert werden.

3.11 Bioabbaubarkeit

Unter Bioabbaubarkeit wird allgemein der Verlust der mechanischen und chemischen Eigenschaften durch eine Zersetzung des Materials in niedermolekulare Bestandteile verstanden. Dabei können sowohl biotische Reaktionen durch z.B. Mikroorganismen unter aeroben oder auch anaeroben Bedingungen als auch abiotische Reaktion, wie z.B. Oxidation und Hydrolyse, ablaufen. Dabei muss vor allem auf die Entstehung toxischer Spaltprodukte geachtet werden, da diese die Biokompatibilität beeinträchtigen können.^[267] Die häufigste und wichtigste Abbaureaktion bei Polymeren ist die Hydrolyse, worüber vor allem Polysaccharide, Fette, Gelatine aber auch Proteine durch die Spaltung der Ester-, Amid- und glykosidischen Bindungen abgebaut werden. Die Spaltung erfolgt in biologischen Systemen in den meisten Fällen enzymkatalysiert durch Hydrolasen, welche in Zellen produziert und in das umgebende Milieu abgegeben werden.^[268] Deshalb besitzen die meisten synthetischen, bioabbaubaren Polymere ein Polymerrückgrat, welches Carbonylgruppen, wie z.B. Ester, Amide, Anhydride, Urethane, etc., enthält.^[269] Den Großteil bilden hierbei die Polyester, deren bekannteste und am besten erforschte Vertreter Polyglykolsäure (PGA, engl.: *poly(glycolic acid)*) und Polylaktide (PLA, engl.: *poly(lactic acid)*) darstellen, die bereits in zahlreichen medizinischen Anwendungen eingesetzt werden.^[270] So werden sie z.B. als Knochenschrauben, Nahtmaterial aber auch in der Geweberegeneration verwendet.^[271–273]

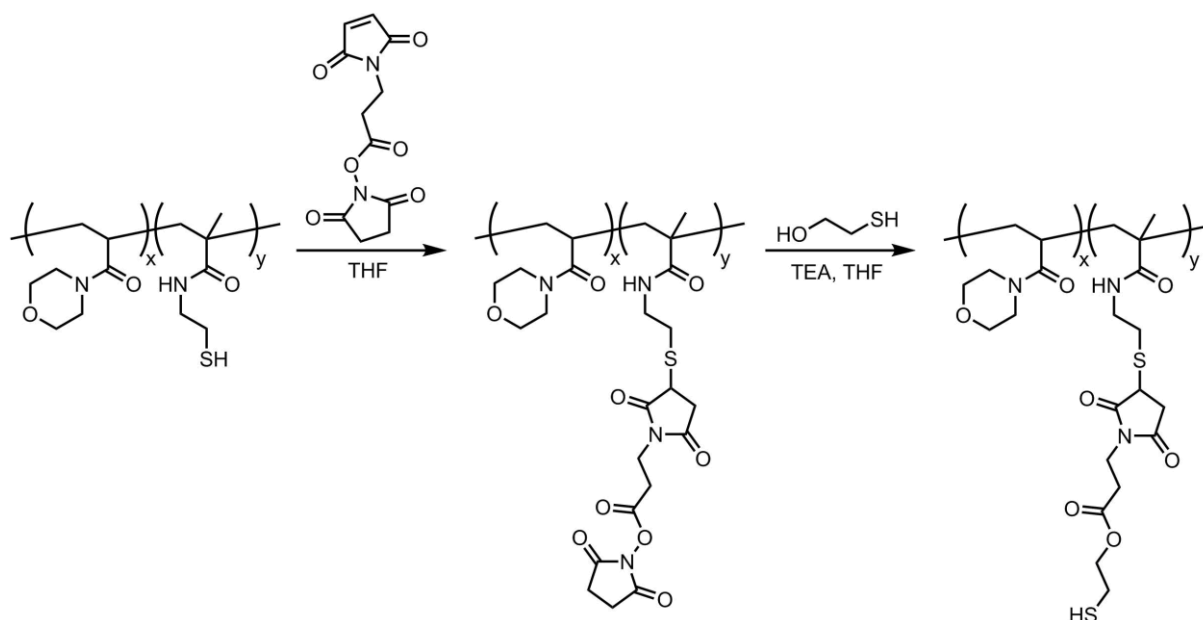
Vinylpolymere, wie das in der Arbeit eingesetzte P(AMor-co-BMAC), haben jedoch den Nachteil, dass sie aufgrund ihres C-C-Polymerrückgrats gegenüber der Degradierung in biologischen Systemen stabil sind.^[274] Daher wird bei Vinylpolymeren für biomedizinische Anwendungen versucht, die Bioresorption zu verhindern, indem durch die Spaltung dieser in Polymerfragmente mit einer maximalen Molmasse von ca. 40 – 50 kDa eine Unterschreitung des Limits der Nierenschwelle erreicht und so eine Ausscheidung ermöglicht wird.^[275] Da die für die

synthetisierten Copolymere gemessenen Molmassen bei maximal 33 kDa lagen, sollte eine Spaltung der Netzpunkte und die daraus folgende Zerstörung der Netzwerkstruktur ausreichen, um in diesem Falle eine Bioresorption zu verhindern. Um eine Spaltung der Netzpunkte zu ermöglichen, sollte die vernetzende Seitenkette mit einer Estergruppe funktionalisiert werden, wobei wiederum eine terminale Thiolgruppe entstehen sollte, um die Gelierung weiterhin zu gewährleisten. Dazu sollte zunächst eine polymeranaloge Funktionalisierung der vorhandenen Thiolgruppen von **P1** durchgeführt werden (Schema 20).

Die folgenden Ergebnisse wurden während der Bachelorarbeit von David Mroß erarbeitet.

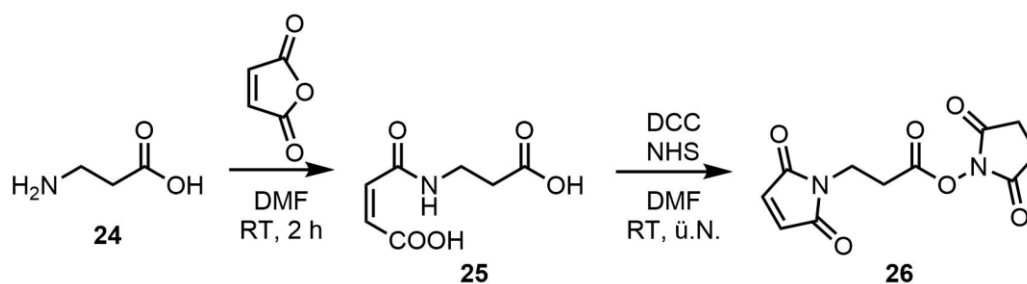
3.11.1 Synthese eines ester- und thiolmodifizierten P(AMor)-Copolymers

3.11.1.1 Polymeranaloger Ansatz



Schema 20: Ester-Funktionalisierung von **P1** mittels Maleimidopropionsäure-*N*-succinimidat (MIP-NHS) und Mercaptoethanol.

Zur polymeranalogen Esterfunktionalisierung sollte **P1** im ersten Schritt mit dem zuvor zu synthetisierenden Maleimidopropionsäure-*N*-succinimidat (MIP-NHS, **26**) in einer Thiol-Michael-Klickreaktion umgesetzt werden, um über den NHS-Aktivester eine reaktive Gruppe einzuführen. Diese sollte im nächsten Schritt die Möglichkeit bieten, Mercaptoethanol (ME, **30**) ohne den Einsatz von weiteren Kopplungsreagenzien zu immobilisieren und dadurch sowohl die Estergruppe als auch das terminale Thiol einzuführen. Die Synthese von MIP-NHS erfolgte über zwei Stufen aus β -Alanin, Maleinsäureanhydrid, *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und dem Kopplungsreagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Schema 21).^[276]



Schema 21: Syntheschema der Herstellung von MIP-NHS aus β -Alanin, Maleinsäure und NHS mittels DCC.

Dafür wurden zunächst äquimolare Mengen an β -Alanin (**24**) und Maleinsäureanhydrid in DMF umgesetzt, wobei sich durch Ringöffnung des Anhydrids das *N*-(3-Carboxyacryloyl)- β -alanin (**25**) bildete. Letzteres wurde ohne weitere Aufarbeitung direkt mit NHS und DCC zur Reaktion gebracht, um das gewünschte MIP-NHS zu erhalten. Der Einsatz von 2,1 eq DCC bei lediglich 1,2 eq. NHS lässt vermuten, dass zunächst nach zu voriger Aktivierung durch DCC die Carboxygruppe der Maleinsäure durch NHS in einen Aktivester überführt wird, wodurch die Bildung des Maleimids durch einen Ringschluss ermöglicht wird. Das dadurch freiwerdende NHS reagiert anschließend mit der ebenfalls zuvor durch DCC aktivierten Carboxygruppe des β -Alanins unter Freisetzung von Wasser und Dicyclohexylharnstoff zum gewünschten MIP-NHS (**26**).

Nachdem MIP-NHS mit einer Ausbeute von 61 % erfolgreich synthetisiert worden war, wurde dieses anschließend mit **P1** umgesetzt. Zur Gewährleistung einer möglichst vollständigen Reaktion, wurde mit einem zweifachen Überschuss an MIP-NHS gearbeitet, wobei zur Deprotonierung der Thiole Triethylamin hinzugefügt wurde. Des Weiteren wurden entgaste Lösungsmittel eingesetzt, um eine Oxidation der Thiole unter den vorliegenden basischen Bedingungen zu verhindern. Nach Aufreinigung durch Ausfällen konnten 48 % an funktionalisiertem Polymer (**P1-NHS**) isoliert werden. Diese geringe Ausbeute kann möglicherweise auf den notwendigen Einsatz von Ethylacetat als Fällungsmittel zurückgeführt werden, welches aufgrund der Unlöslichkeit von MIP-NHS in dem sonst bei der Herstellung der Copolymeren eingesetztem Diethylether verwendet werden musste. Die anschließende Bestimmung des Funktionalisierungsgrades erfolgte über den Ellman's Assay, jedoch konnte keine Absorption bei 412 nm gemessen werden, weshalb von einem vollständigen Umsatz aller Thiolgruppen ausgegangen werden konnte. Im Anschluss wurde im zweiten Schritt **P1-NHS** mit zwei Äquivalenten ME umgesetzt, um sowohl den Ester in die Seitenkette einzuführen als auch die terminale Thiolgruppe zu erzeugen. Zur Verhinderung der Oxidation der Thiolgruppen von ME wurde auch hier in entgasten Lösungsmitteln gearbeitet. Nachdem das überschüssige ME durch Ausfällen des Polymers entfernt wurde, wurde zur Bestimmung des

Funktionalisierungsgrades ein Ellman's Assay durchgeführt. Da trotz verlängerter Inkubationszeit der Ellman's Assay negativ war, wurde von einer nicht erfolgten Reaktion ausgegangen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die zu geringe Reaktivität der Hydroxylgruppe gegenüber NHS-Estern^[277] in Kombination mit einer evtl. zu kurzen Reaktionszeit sein. Da die Bildung des Esters ohne den Einsatz von Kopplungsreagenzien nicht realisiert werden konnte, wurde von einer polymeranalogen Veresterung abgesehen.

Daher wurde beim nächsten Ansatz ein Ester synthetisiert, welcher sowohl ein endständiges Maleimid als auch ein endständiges Thiol enthielt (Abb. 47).

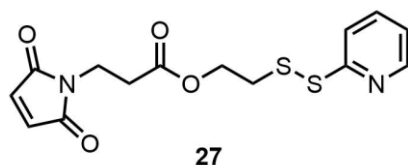
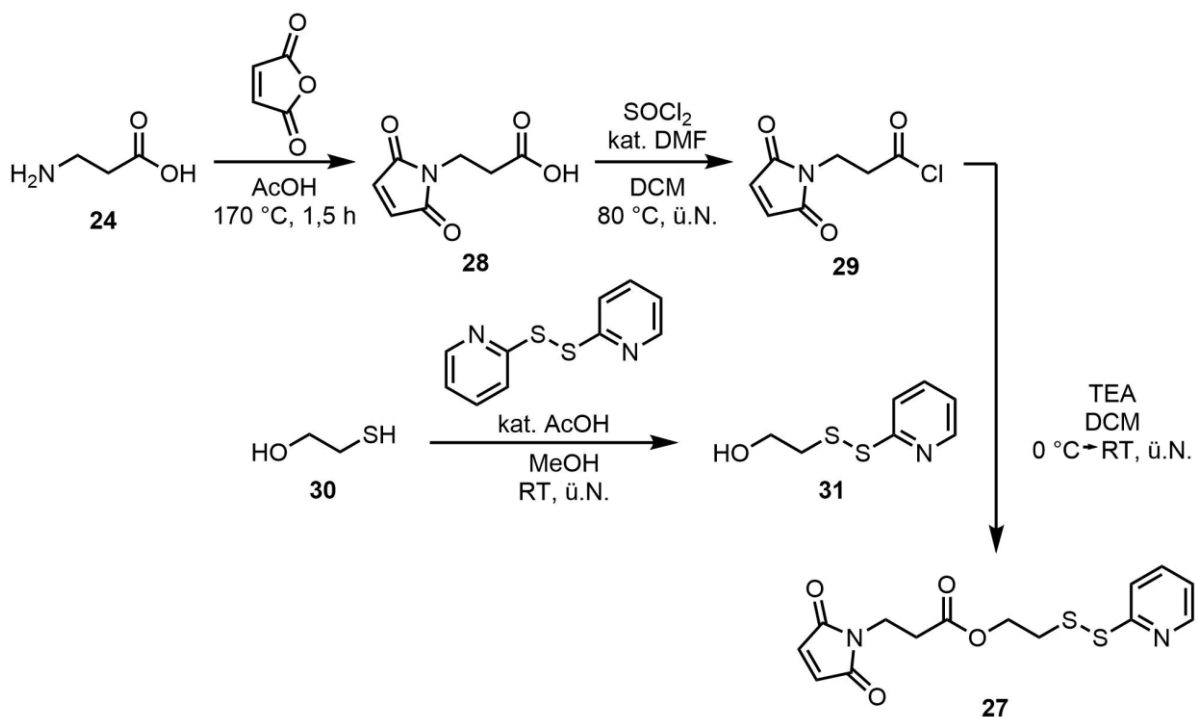


Abb. 47: 2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl ethyl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat.

Da das gemeinsame Vorliegen eines Maleimids und eines Thiols im gleichen Molekül zu einer Polymerisation führen würde, wurde die Thiolgruppe über ein Pyridyldisulfid geschützt. Außerdem kann zum einen durch die UV-Aktivität des Pyridylrings der Funktionalisierungsgrad bestimmt und zum anderen die Reaktivität gegenüber Thiolen erhöht werden, wodurch bei der späteren Gelierung der Polymere kein Oxidationsmittel nötig sein sollte.



Schema 22: Konvergente Synthese von MIP-DPE.

Die Herstellung von 2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat (MIP-PDE, **27**) erfolgte über eine konvergente Syntheseroute (Schema 22), bei der das zuvor synthetisierte Maleimidopropionsäurechlorid (MIP-Cl, **29**) und 2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (PDE, **31**) in einer Schotten-Baumann-Reaktion umgesetzt wurden. MIP-Cl wurde dabei über zwei Stufen ausgehend von β -Alanin (**24**) synthetisiert. Dafür wurde zunächst Maleimidopropionsäure (MIP, **28**) analog zu MIC aus β -Alanin und Maleinsäure mit einer Ausbeute von 32 % hergestellt, wobei der Ringschluss über eine säurekatalysierte Amidierung bei hohen Temperaturen erfolgte. Im nächsten Schritt wurde die Carboxygruppe mittels Thionylchlorid und einer katalytischen Menge DMF in das für die Schotten-Baumann-Reaktion erforderliche Säurechlorid überführt und ohne Aufarbeitung direkt eingesetzt. Parallel dazu wurde PDE über eine säurekatalysierte Thiol-Disulfid-Austauschreaktion aus Mercaptoethanol (**30**) und Aldrithiol mit einer Ausbeute von 62 % synthetisiert.^[278] Anschließend wurden MIP-Cl und PDE unter Verwendung von TEA als Base umgesetzt, wobei eine Ausbeute von 42 % über zwei Stufen ausgehend von MIP erreicht wurde. Nach der erfolgreichen Synthese mit einer Gesamtausbeute von 14 % über drei Stufen wurde MIP-PDE zur Funktionalisierung von **P1** eingesetzt. Dafür wurde MIP-PDE mit **P1** in Gegenwart von TEA und DMF als Lösungsmittel umgesetzt, wobei eine unmittelbare Gelierung eintrat. Die Gelierung von **P1** lässt sich durch die zuvor erwähnte erhöhte Reaktivität von Pyridyldisulfiden gegenüber Thiolen erklären, da die gleichzeitige Reaktion der Maleimidgruppe und des Pyridyldisulfids mit den polymergebundenen Thiolgruppen eine Vernetzung verursacht. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz ebenfalls verworfen. Da sowohl die polymeranaloge Veresterung von **P1** als auch dessen Funktionalisierung mit einem zuvor synthetisierten thiolmodifizierten Ester nicht erfolgreich waren, wurde von weiteren polymeranalogen Ansätzen abgesehen und die Esterfunktionalisierung über den Einsatz eines estermodifizierten Disulfidvernetzers untersucht.

3.11.1.2 Synthese und Copolymerisation von BMADDP

Das Design des esterfunktionalisierten Vernetzers erfolgte anhand von BMAC, um Effekte auf die mechanischen Eigenschaften durch zu große Änderungen der Kettenlänge bzw. Hydrophilie zu minimieren. Deshalb wurde mit *Bis*(2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandioldipropionat (BMADDP, **32**, Abb. 48) ein Vernetzer gewählt, der sich lediglich durch zwei Propionsäureester-einheiten von BMAC unterscheidet.

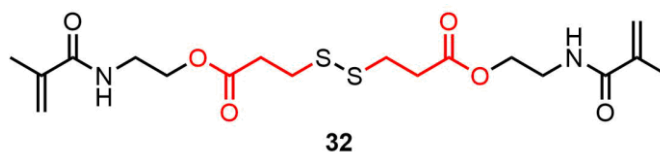
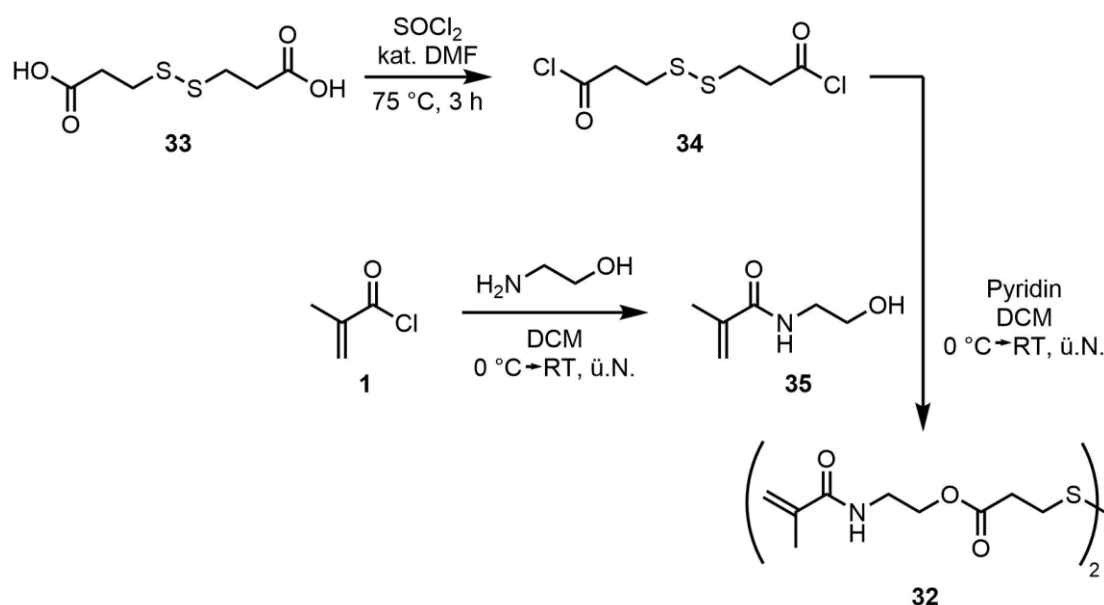


Abb. 48: Bis(2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandiyldipropionat (BMADDP, rot: Propionsäureeinheit).

Die Synthese von BMADDP erfolgte über eine konvergente Route aus Dithiodipropionsäurechlorid (DTDS-Cl, **34**) und Hydroxyethylmethacrylamid (HEMAm, **35**) (Schema 23). Ersteres wurde, analog zur Synthese von MIP-Cl, über eine Umsetzung der entsprechenden Carbonsäure, in diesem Falle DTDS (**33**), mit Thionylchlorid und einer katalytischen Menge DMF zum Säurechlorid hergestellt.



Schema 23: Konvergente Synthese von BMADDP.

Die Herstellung von HEMA erfolgte über eine Schotten-Baumann-Reaktion aus Methacryloylchlorid und Ethanolamin, wobei durch den Einsatz von zwei Äquivalenten Ethanolamin dieses gleichzeitig als Base diente. Des Weiteren ist durch die höhere Nukleophilie von Aminogruppen im Vergleich zu Hydroxylgruppen keine Schützung letzterer erforderlich. Nachdem HEMA mit einer Ausbeute von 61 % erfolgreich synthetisiert worden konnte, wurde dieses in einer zweiten Schotten-Baumann-Reaktion in Gegenwart von Pyridin mit DTDS-Cl zum gewünschten BMADDP umgesetzt, wobei eine Ausbeute von 84 % über zwei Stufen ausgehend von DTDS erreicht werden konnte. Die Synthese des ester- und thiolmodifizierten Copolymers P(AMor-*co*-BMADDP)-SH (**P9**) mit einem BMADDP-Anteil von 4 mol% erfolgte analog zu den bereits hergestellten Copolymeren über eine *in-situ*-vernetzende Copolymerisation von AMor und BMADDP gefolgt von einer reduktiven Spaltung mittels DTT.

3.11.2 Charakterisierung des esterfunktionalisierten Copolymers P(AMor-co-BMADDP)-SH

Die Charakterisierung der Zusammensetzung und Molmasse erfolgte wie zuvor über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Ellman's Assay und GPC, wobei zu den vorigen Copolymeren ähnliche Werte erhalten wurden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Charakterisierung des esterfunktionalisierten Copolymers P9.

Copolymer	Verhältnis AMor/BMAC			\overline{M}_n^c [Da]	D^c
	theoretisch	NMR ^a	Ellman ^b		
P7	96/4	29500	2,74	26400	2,56

a) bestimmt über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie aus dem Verhältnis der normierten Integrale des Morpholinrings von AMor (3.10-3.90 ppm) und der Methylgruppe des Polymerrückgrats (0.70-0.89 ppm) von BMAC; b) bestimmt über Ellman's Assay; c) bestimmt über GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Laufmittel und PMMA als Kalibrationsstandard.

Des Weiteren wurden mit der Steifigkeit und Quellung die mechanischen Eigenschaften untersucht. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit zu **P1** wurden Gele aus einer 10 % (w/v)-igen Copolymerlösung von **P9** hergestellt und rheologisch vermessen (Tabelle 17).

Tabelle 17: Moduli und Quellwerte von 10 % (w/v) P9 im Vergleich zu P1.

Polymer	$G^{\prime a}$ [Pa]	E^b [Pa]	$Q_{m,s}^c$
P1	966 ± 30	2898 ± 90	$10,7 \pm 0,3$
P9	735 ± 21	2205 ± 63	$9,0 \pm 0,4$

Gele wurden in Triplikaten aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung hergestellt und für 3 Tage in PBS (0,01 M, pH 7,4) gequollen.

a) Platte-Platte-Messsystem, 37 °C, 1 Hz, 1 % Deformation; b) aus Gl. 14; c) nach Gl. 22.

Die Ergebnisse der rheologischen Untersuchung von **P9** zeigten im Vergleich zu **P1** leicht verringerte Werte. Dies kann vor allem aus dem geringeren Anteil an BMADDP in **P9** mit durchschnittlich 3,7 mol% im Vergleich zu BMAC in **P1** mit 4 mol% resultieren.

3.11.3 Untersuchung der Abbaubarkeit

Nachdem mit **P9** ein sowohl ester- als auch thiolmodifiziertes Copolymer, das zu dem eine hohe Ähnlichkeit zu **P1** aufwies, synthetisiert und charakterisiert worden war, galt es nun dessen Abbaubarkeit bei verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Dafür wurden 10 % (w/v) Gele aus **P9** präpariert, welche anschließend in verschiedene Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten gelegt wurden. Die eingesetzten Puffersysteme für die entsprechenden pH-Werte sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: Puffersysteme der Abbauntersuchungen.

Puffersystem	pH-Wert
NaOAc/AcOH	3
NaOAc/AcOH	5
K_2HPO_4/KH_2PO_4	7
PBS	7,4
K_2HPO_4/KH_2PO_4	8
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	9

Alle Puffer wurden mit einer Konzentration von 0,01 M hergestellt, um eine Vergleichbarkeit zu PBS herzustellen.

Da die aus dem Abbau resultierende Auflösung der Netzpunkte zu einer Abnahme der mechanischen Stabilität führt, dient deren Analyse in Form des Speichermoduls als Maß für die Abbaureaktion. Daher wurden die Gele über einen Zeitraum von maximal 23 Tagen in verschiedenen Zeitintervallen rheologisch vermessen (Abb. 49), wobei die Speichermoduli zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der einzelnen pH-Werte untereinander auf den jeweiligen Startwert normiert wurden.

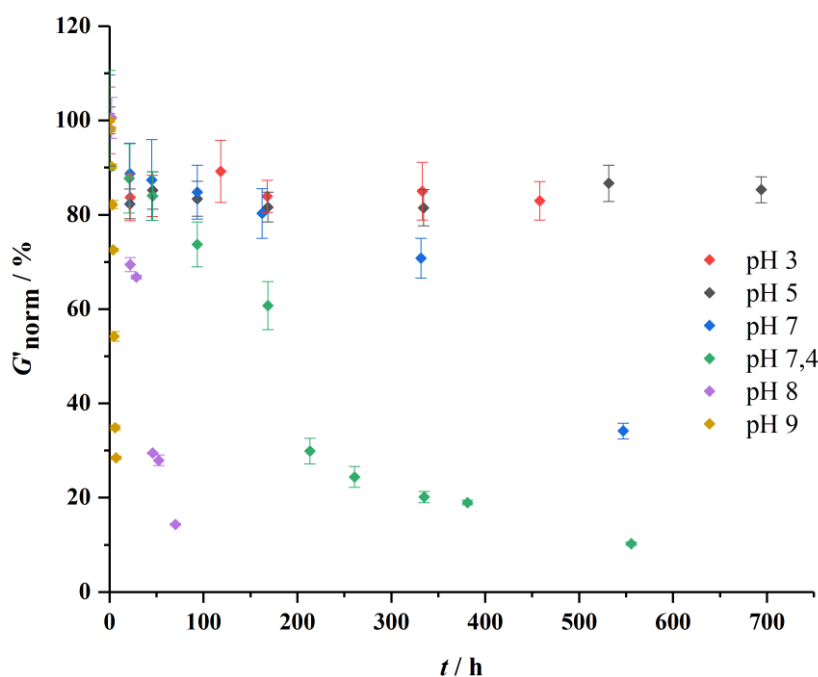


Abb. 49: Abbauxperimente von 10 % (w/v) P9-Gelen bei verschiedenen pH-Werten (gemittelt aus fünf Proben).

Wie in Abb. 49 zu sehen ist, konnte durch die Messung des Speichermoduls als Funktion der die Zeit eine pH-Abhängigkeit des Abbaus festgestellt werden. Mit steigendem pH-Wert zeigte sich eine Erhöhung der Abbaurate, wobei erst ab einem pH-Wert oberhalb von 7 ein Abbau verzeichnet werden konnte. Die Beschleunigung der Abbaureaktion resultiert aus der

steigenden Konzentration von Hydroxidionen mit zunehmenden pH-Wert, was eine Beschleunigung der Esterhydrolyse zur Folge hat. Dahingegen konnte für die pH-Werte unterhalb von 7 keine sichtbare Veränderung der Steifigkeit festgestellt werden, obwohl Ester sowohl basisch als auch sauer gespalten werden können. Damit die Esterhydrolyse jedoch im saurem Milieu ablaufen kann, müssen konzentrierte Säuren oder erhöhte Temperaturen verwendet werden, da im Gegensatz zur basischen Esterhydrolyse mit Wasser ein relativ schwaches Nukleophil eingesetzt wird.^[279] Durch die Variation des pH-Wertes konnte folglich die Abbauphase der **P9**-basierten Gele von wenigen Stunden bis zu mehr als einer Woche eingestellt werden. Für den für Zellanwendungen interessanten pH-Wert 7,4 zeigte sich nach einer Woche eine Abnahme von 50 %, wohingegen nach drei Wochen der vollständige Abbau des Gels verzeichnet werden konnte.

Ein Maß zur Beschreibung der Abbaugeschwindigkeit ist die gemittelte Abbaurate, welche den Mittelwerte aus den Abbauraten der einzelnen Zeitintervalle darstellt. Um auch hier eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde mit prozentualen Werten gearbeitet. Durch die Berechnung der gemittelten Abbauraten konnten die zuvor aus Abb. 49 ermittelten Trends bestätigt werden. So konnten durch die Variation des pH-Wertes gemittelte Abbauraten von bis zu 11,6 %/h bei einem pH-Wert von 9 erreicht werden (Tabelle 19).

Tabelle 19: Gemittelte Abbauraten in Abhängigkeit des pH-Wertes.

pH-Wert	gemittelte Abbaurate [%/h]
pH 3	0,007
pH 5	0,012
pH 7	0,080
pH 7,4	0,184
pH 8	0,804
pH 9	11,616

Nachdem neben der in den vorigen Kapiteln gezeigten Eigenschaften auch die Bioabbaubarkeit adressiert werden konnte, kann das P(AMor-co-BMAC)-Hydrogelsystem als ein für biomedizinische Anwendungen geeignetes System angesehen werden, da es alle in Abb. 12 gezeigten Anforderungen erfüllt und zusätzlich eine hohe Modularität aufweist.

4. System auf Basis physikalischer Hydrogele

Die Ergebnisse in diesem Kapitel wurden zum großen Teil in verschiedenen Praktika und den Bachelorarbeiten von Max Jopen und Nils Stamm erarbeitet.

Nachdem eine Hydrogelplattform für biomedizinische Anwendungen auf Basis von chemisch-vernetzten Netzwerken entwickelt werden konnte, sollte nun Gleiches für ein physikalisch-vernetztes System versucht werden.

4.1 Physikalische Hydrogele in der Stammzellforschung

Wie bereits in Kapitel 1.3.1.2 beschrieben, sind physikalische Hydrogele lediglich über nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken, ionische und/oder hydrophobe Interaktionen (z.B. van-der-Waals Kräfte, π - π -stacking), reversibel vernetzt.^[72] Des Weiteren wird kein zusätzlicher und evtl. toxischer Vernetzer zur Gelierung benötigt, wodurch 3D-Zellexperimente ermöglicht werden.^[50] Aus diesem Grund wurden physikalisch-vernetzte Hydrogele bereits in zahlreichen biomedizinischen Anwendungen eingesetzt, wobei auch hier, analog zu den chemischen Gelen, die verwendeten Polymere sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs sein können.

Den prominentesten Vertreter der natürlichen, physikalischen Hydrogele stellen die Alginat dar, was nicht zuletzt durch die breite Verfügbarkeit, die exzellente Biokompatibilität und die einfache Vernetzung bedingt wird.^[56] Die Ausbildung der Netzpunkte erfolgt bei Alginaten über ionische Wechselwirkungen, wobei diese durch die Zugabe divalenter Kationen (z.B.: Ca^{2+}) über die Carbonsäuregruppen der Guluronsäureblöcke entstehen. Dabei schließen sich jeweils ein homopolymerer Guluronsäureblock zweier Polymerketten um die Kationen und bilden in einer Art „Eierschachtel“ (Eierschachtelmodell) die Netzpunkte aus.^[280] Aufgrund dieser milden Vernetzungsmethode und der durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (ETDA) einfachen Zellrückgewinnung haben sich Ca^{2+} -vernetzte Alginat als ein Standardsystem zur dreidimensionalen Verkapslung von Stammzellen etabliert. Sie wurden bereits zur gezielten Differenzierung von mESCs als auch hESCs in osteogene, chondrogene, endoderme und neurale Zellen eingesetzt.^[281–285] Neben Alginaten werden auch Kollagene häufig als Trägermaterialien für Stammzellenanwendungen verwendet. Kollagene gehören zu den Strukturproteinen und stellen den am häufigsten in natürlichen Gewebe vorkommenden organischen Bestandteil dar.^[286] Die Gelierung von Kollagen erfolgt vorrangig bei höheren Temperaturen über eine Konformationsänderung der Zufallsknäuel in Tripelhelices, wobei

diese maßgeblich durch die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Proteinsträngen ermöglicht wird.^[287] So werden Kollagene vor allem in ihrer denaturierten Form, die allgemein als Gelatinen bekannt sind, für biomedizinische Anwendungen eingesetzt.^[53] Die Vorteile reichen dabei von einer ausgezeichneten Biokompatibilität über die nativen viskoelastischen Eigenschaften bis hin zur fehlenden Notwendigkeit der Biofunktionalisierung, da Kollagene bereits eine zelladhäsionsfördernde Wirkung aufweisen. Aus diesen Gründen wurden sie bereits für zahlreiche Stammzellanwendungen eingesetzt. So konnten KUO und TUAN unter Verwendung von Kollagen-Typ I-Hydrogelen die Differenzierung von hMSCs zu Tendozyten steuern, welche anschließend zur Regeneration von Sehngewebe benutzt werden können.^[288] NÖTH *et al.* zeigten hingegen unter Einsatz des gleichen Hydrogelsystems und Zelltyps die Erzeugung chondrogener Zellen, welche anschließend mit dem Hydrogel über eine autologe Chondrozyten-Transplantation zur Behandlung von Knorpelschäden verwendet werden können.^[289,290] Des Weiteren zählt mit Matrigel® ein Biomaterial zu den kollagenbasierten Hydrogelen, welches durch die Förderung der Differenzierung und Proliferation von einer Vielzahl verschiedener Stammzellen breite Anwendung in der Zellkultur findet.^[291] Dennoch weisen, analog zu den chemischen Hydrogelen, auch physikalische Hydrogele auf Basis natürlicher Polymere Nachteile, wie die *batch-to-batch*-Variation oder Pathogenübertragung, auf, wodurch ebenfalls zahlreiche vollsynthetische Ansätze existieren. Wie bereits in Kapitel 1.3.1.2 angedeutet, basiert der Großteil der artifiziellen, physikalischen Hydrogele auf thermoresponsiven Materialien, wobei vor allem P(NIPAAm) eingesetzt wird. Die Gelierung von thermoresponsiven Polymeren folgt mit Überschreiten der LCST aus einer Abnahme der Löslichkeit, die durch eine generelle Änderung der Hydrophilie der Polymerketten bedingt wird. Diese ist wiederum die Folge aus der Zunahme der negativen freien Energie, wodurch die Wasser-Polymer-Assoziation nicht länger bevorzugt ist und so Polymeraggregate unter Freisetzung von Wasser ausgebildet werden. Dieser Prozess wird allgemein als der hydrophobe Effekt bezeichnet.^[292,293] Der Vorteil von P(NIPAAm) besteht darin, dass es einen sehr scharfen Phasenübergang bei 32 °C in reinem Wasser aufweist. Dieser kann jedoch zum einen durch die Copolymerisation mit hydrophileren oder hydrophoberen Monomeren und zum anderen durch den Einsatz von Salzen oder pH-Wertänderungen verschoben werden, wodurch die LCST sehr gut an die für die Anwendung benötigten Anforderungen angepasst werden kann.^[102,294] So ist ein P(NIPAAm-co-PEG)-Copolymer ein Hauptbestandteil des kommerziell erhältlichen Mebiol®-Gels, welches als Trägermaterial für 2D und 3D-Zellkulturen für viele verschiedene Arten von Stammzellen eingesetzt wird.^[295-297] LEI und SCHAFFER verwendeten zum Beispiel dieses System zur Expansion von hESCs und hiPSCs über einen Zeitraum von 280 Tagen,

womit sie eine Expansionsrate von bis zu 10^{72} erreichen konnten.^[298] PARK *et al.* verwendeten ein Copolymer aus NIPAAm und Acrylsäure (AA) zur Steuerung der Chondrogenese von hMSCs, wodurch sie die Regeneration von hyalinen Knorpelgewebe in Mäusen und Hasen erreichten.^[299] Neben den P(NIPAAm)-Copolymeren stellen die amphiphilen Blockcopolymere eine weitere bedeutende Polymerklasse zur Herstellung physikalischer Hydrogele dar, wobei die sogenannten Pluronics[®] zu den wichtigsten Vertretern dieser Klasse gehören. Pluronics[®] sind kommerziell erhältliche ABA-Blockcopolymere, die sich aus zwei hydrophilen PEG-Blöcken (A) und einem hydrophoben PPO-Block (B) zusammensetzen. Die Besonderheit dieses Systems besteht darin, dass die Geleigenschaften durch das Verhältnis der beiden Blöcke sehr fein eingestellt werden können und darüber hinaus eine FDA-Zulassung für pharmazeutische und medizinische Applikationen existiert.^[300,301] Die Gelierung basiert dabei analog zu P(NIPAAm) auf einer durch den hydrophoben Effekt bedingten Assoziation der hydrophoben Bereiche, wobei die Konzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (cmc, engl.: *critical micelle concentration*) liegen muss.^[302] Die Anwendungsgebiete von Pluronics[®] reichen von Wirkstofftransportsystemen über biologische Reaktionsmodifikatoren bis hin zu pharmazeutischen Komponenten. Des Weiteren können sie auch für Stammzellapplikationen eingesetzt werden. So wurde vor allem Pluronic[®] F127, ein PEG-PPO-PEG-Copolymer mit einem PEG-Anteil von ca. 70 % und einer Molmasse von 12,6 kDa, für die Verkapselung von MSCs zur Regeneration von schlecht vaskularisierten Geweben, wie z.B. Knorpel-, Sehnen-, Drüsen- oder auch Knochen- und Fettgewebe, eingesetzt.^[303–305] DOĞAN *et al.* untersuchten den Einfluss verschiedener Pluronics[®] auf das Verhalten von humanen Zahnkeimstammzellen (hTGSCs, engl.: *human tooth germ stem cells*), wobei sich Pluronic[®] F68 als geeignetes Material zur Steuerung der Differenzierung in osteogene, chondrogene und adipogene Zellen herausstellte.

Nichtsdestotrotz muss bei der Verwendung physikalischer Hydrogele für Zellapplikationen generell darauf geachtet werden, dass die zur Gelierung benötigten externen Trigger, wie Änderungen des pH-Wertes, Temperatur oder Ionenstärke, die Integrität der verwendeten Zellen nicht beschädigen.^[306] Des Weiteren weisen nicht-kovalent vernetzte Hydrogele durch die temporären bzw. dynamischen Netzpunkte in den meisten Fällen geringe Steifigkeiten auf, wodurch sie in einigen Ansätzen nachträglich chemisch vernetzt werden.^[307] Dies hat jedoch wiederum zur Folge, dass niedermolekulare, toxische Vernetzer in das System eingebracht werden.

Eine Möglichkeit zur Überwindung der schwachen mechanischen Stabilität ist der Einsatz von LMWG-endgruppenmodifizierten, α,ω -telechelen Polymeren. LMWGs sind in diesem Fall Motive, die supramolekulare Strukturen aufbauen und so stabile aber dennoch nicht-kovalente Netzpunkte ausbilden. Ein Beispiel dafür zeigte TRISTAN MES in seiner Doktorarbeit, in der er PEG an beiden Endgruppen mit einem 1,3,5-Benzoltricarboxamid (BTA) modifizierte und so Gele herstellen konnte, die einen E-Modul von bis zu 120 kPa aufwiesen.^[308] BTAs gehören zur Klasse der supramolekularen Hydrogelatoren, die im nächsten Kapitel näher erläutert werden sollen.

4.2 Supramolekulare Hydrogele

4.2.1 Allgemeines

Die supramolekulare Chemie wird allgemein als „die Chemie jenseits des Moleküls“ bezeichnet und basiert auf dem Design von Molekülen bzw. Motiven, die in der Lage sind, spezifische, gerichtete, anpassbare, reversible, nicht-kovalente Wechselwirkungen auszubilden. Dabei werden auf Wasserstoffbrückenbindungen, Metallchelation, hydrophobe Wechselwirkungen, π - π -Wechselwirkungen oder van-der-Waals-Interaktionen zurückgegriffen.^[309] Analog zu den zuvor beschriebenen physikalischen Hydrogelen würde die Verwendung einzelner Wechselwirkungen zu schwach vernetzten und labilen Gelen führen. Im Gegensatz dazu ermöglichen jedoch die Orientierung und Summe der Interaktionen supramolekularer Gele mechanische Eigenschaften, die denen von chemischen Gelen gleichen.^[310] Durch das variable Design der Motive können über den Aufbau modularer Systeme die chemischen und mechanischen Eigenschaften an die jeweilige Anwendung angepasst werden.

4.2.2 Motive zur Herstellung supramolekularer Gele

Wie in Kapitel 1.3.1.2 beschrieben, verläuft die Gelierung von supramolekularen Hydrogelen über eine Aggregation bei einer gleichzeitigen Solubilisierung, weshalb diese Gruppen enthalten müssen, die beide Prozesse gewährleisten. Da als Medium wässrige Lösungen eingesetzt werden sollen, muss der Hydrogelator somit eine hydrophile Gruppe für die Solubilisierung und eine hydrophobe Gruppe für die Aggregation aufweisen. Solche Moleküle, die parallel sowohl polare als auch unpolare Gruppen enthalten, werden allgemein als Amphiphile bezeichnet. Die beiden wichtigsten Vertreter sind die konventionellen Amphiphile und die Bolaamphiphile.^[95]

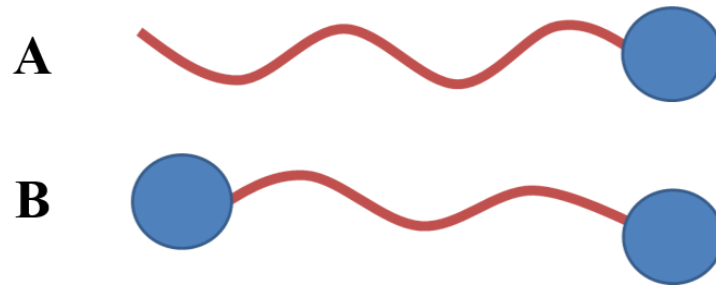


Abb. 50: Schematische Darstellung eines (A) konventionellen Amphiphils und eines (B) Bolaamphiphils (blau: polare Kopfgruppe; rot: hydrophober Schwanz).

Die konventionellen Amphiphile (Abb. 50A) zeichnen sich dabei durch eine polare Kopfgruppe und eine oder zwei hydrophobe Ketten aus. Bolaamphiphile (Abb. 50B) unterscheiden sich von den konventionellen Amphiphilen durch eine weitere hydrophile Kopfgruppe, wobei die Bezeichnung aus der Ähnlichkeit zu einer Bola resultiert.^[311]

Obwohl bereits zahlreiche Hydrogelatoren entwickelt wurden, ist es heutzutage dennoch nicht möglich, die Fähigkeit der Gelierung ausschließlich aufgrund der molekularen Struktur vorherzusagen, was vor allem aus ungenauen Beurteilungen der Wechselwirkungen zwischen Wasser und dem Hydrogelator resultiert. Dennoch haben sich einige Motive etabliert, welche zumindest eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Gelbildung aufweisen. Dabei muss jedoch grundlegend darauf geachtet werden, dass zum einen mehrere physikalische Interaktionen ausgebildet werden können und zum anderen, dass diese eine gewisse Orientierung und Spezifität aufweisen.^[312] Folglich weisen vor allem Harnstoff-, Pyridin-, Polyolverbindungen und Moleküle auf Basis einer C_3 -Symmetrie eine hohe Neigung zur Gelbildung auf, wobei die Substitutionsmuster von entscheidender Bedeutung sind. Im Folgenden sollen die harnstoffbasierten und C_3 -symmetrischen Hydrogelatoren näher erläutert werden, da diese mit zu den am häufigsten eingesetzten Motiven zählen.

4.2.2.1 Harnstoffbasierte Hydrogelatoren

Harnstoffe zeichnen sich durch eine mit zwei Aminen substituierte Carbonylgruppe aus, wodurch zur einen Seite durch den Sauerstoff ein Wasserstoffbrückenakzeptor und zur anderen Seite mit den Aminen zwei Wasserstoffbrückendonoren vorliegen. Die Wechselwirkungen dieser beiden Funktionalitäten, welche in einem sechsgliedrigen Ring resultieren, stellen somit die Schlüsselinteraktion dar. Des Weiteren bilden sich durch die Anordnung der einzelnen Gruppen zueinander ausschließlich unidirektionale Wechselwirkungen aus, woraus schlussendlich die Bildung supramolekularer Strukturen ermöglicht wird (Abb. 51).^[313] Harnstoffe besitzen

außerdem den Vorteil, dass diese durch die Addition eines Amins an ein Isocyanat hergestellt werden können und somit die Substituenten relativ einfach angepasst werden können.

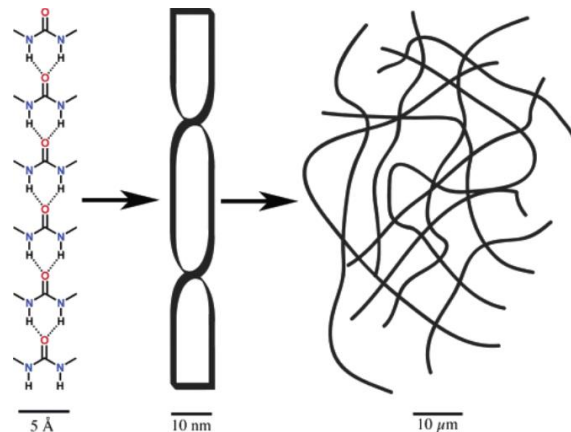


Abb. 51: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur eines harnstoffbasierten LMWGs. (Reprinted with permission from L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201–1218. Copyright (2004) American Chemical Society.)

Da, wie zuvor beschrieben, die Orientierung der physikalischen Interaktionen von essentieller Bedeutung für die Stabilität des Hydrogels ist, kann diese mit der Einführung weiterer Harnstoffgruppen oder durch den Einsatz komplementärer Wasserstoffbrücken noch weiter erhöht werden. Infolgedessen haben ZHAO *et al.* Gelatoren auf Basis von Harnstoff-*N,N'*-dicarbonsäuren synthetisiert.^[314] Aufgrund der spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen der Harnstoffgruppe und Carbonsäuren konnten durch die Orientierung der Wechselwirkungen in unterschiedliche Richtungen netzartige Strukturen aufgebaut werden (Abb. 52).

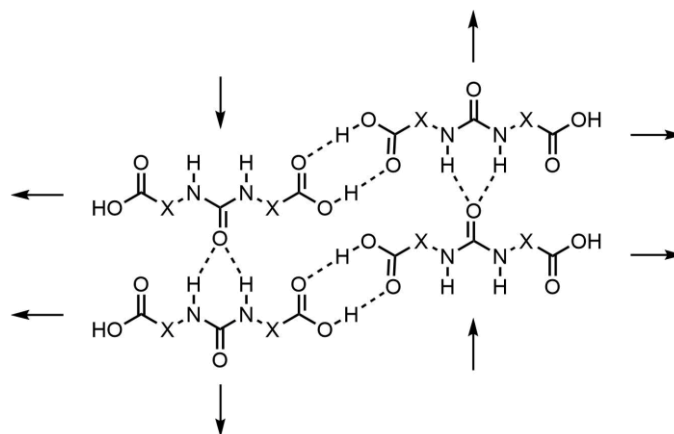


Abb. 52: Darstellung der komplementären Wasserstoffbrückenbindungen von Harnstoff-*N,N'*-dicarbonsäuren.

1997 publizierten SIBESMA *et al.* mit 2-Ureido-6[1H]-pyrimidinonen (UPy) ein Motiv, dass vier nebeneinanderliegende, komplementäre Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann, wobei durch die vorliegende Tautomerie die Bildung zwei verschiedener Dimere möglich ist. Zur Herstellung von supramolekularen Polymeren wird jedoch ein bifunktionelles UPy-Derivat benötigt, da UPy lediglich Dimere ausbilden kann (Abb. 53).^[315]

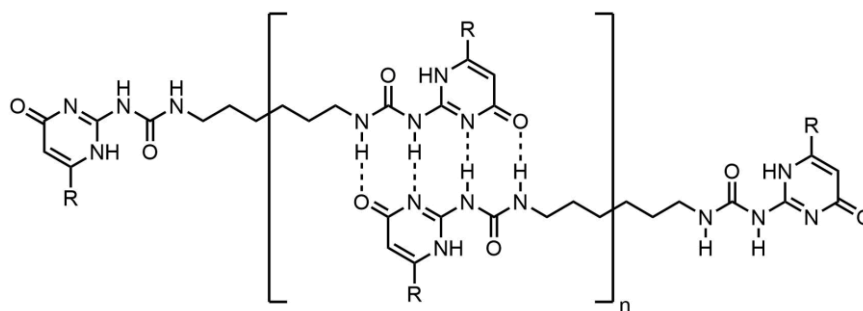
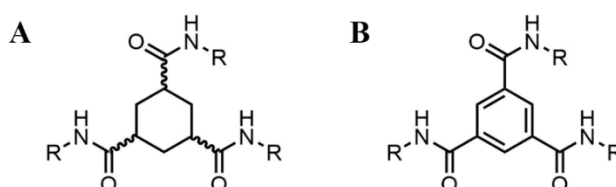


Abb. 53: Struktur eines Polymers basierend auf einem bifunktionalen UPy-Derivat.

Neben dem Harnstoffmotiv stellen die Motive auf Basis von C_3 -symmetrischen Molekülen, mit den 1,3,5-Benzoltricarboxamiden als wichtigsten Vertretern, eine weitere wichtige LMWG-Klasse zur Synthese von synthetischen, physikalischen Hydrogelen dar.

4.2.2.2 C_3 -symmetrische Hydrogelatoren und das BTA-Motiv

Als C_3 -symmetrisch werden Moleküle bezeichnet, die eine dreizählige Drehachse aufweisen und somit durch Drehungen um 120° in sich selbst überführt werden können.^[316] Bei der Synthese von Hydrogelatoren werden darunter in erster Linie die Triamidderivate der 1,3,5-Cyclohexantricarbonsäure (CycTA, Abb. 54A) bzw. der 1,3,5-Benzoltricarbonsäure (BTA, Abb. 54B) verstanden.

Abb. 54: Strukturen der C_3 -symmetrischen Hydrogelatormotive CycTA (A) und BTA (B).

Die Gelierung von CycTAs erfolgt über die Ausbildung zweier kooperativer physikalischer Wechselwirkungen. So können die Amidgruppen durch ihre Anordnung intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden, welche durch die gleichzeitige Aggregation der meist langkettigen Alkylseitengruppen über hydrophobe Wechselwirkungen zusätzlich stabilisiert werden.^[317] Dabei ist jedoch zu beachten, dass das *cis*-Diastereomer verwendet werden muss, um eine hohe Orientierung der Wasserstoffbrücken und daraus folgend eine hohe Stabilität des Gels zu erhalten. BTA-Motive hingegen weisen durch ihren zentralen Benzolring keine Stereozentren auf, wodurch bei deren Verwendung nicht auf hohe Diastereomerenreinheiten geachtet werden müssen.^[318] Des Weiteren werden hier durch π - π -stacking des zentralen Benzolrings insgesamt drei kooperative physikalische Wechselwirkungen zur Gelbildung verwendet (Abb. 55), womit die Netzpunkte zusätzlich stabilisiert werden.

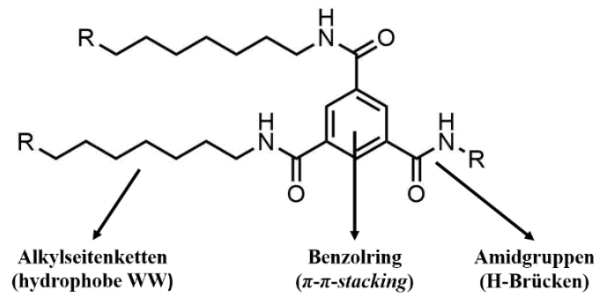


Abb. 55: Kooperative Wechselwirkungen des BTA-Motivs. (WW: Wechselwirkungen, H-Brücken: Wasserstoffbrücken)

Durch diese Wechselwirkungen bilden sowohl BTA- als auch CycTA-Motive supramolekulare Helices aus, indem sich die einzelnen Moleküle wie Wirbel einer Wirbelsäule übereinanderlegen und so langkettige Fasern entstehen (Abb. 56). Die Ausbildung der helikalen Struktur kann außerdem durch den Einsatz chiraler Seitenketten unterstützt werden, um so eine optimale Packung der einzelnen Moleküle zu erreichen.^[319]

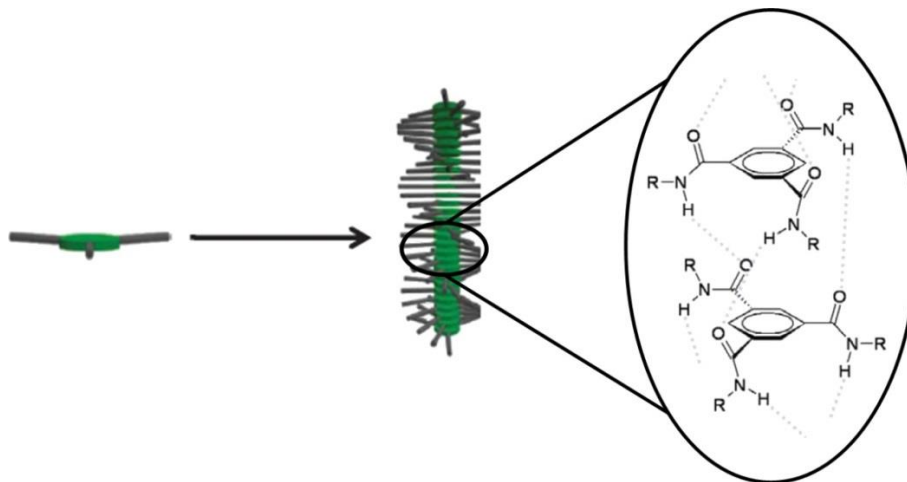


Abb. 56: Aggregation und Darstellung der Wasserbrückenbindungen von BTA-Motiven.^[308]

Ein Problem stellt die aus der C_3 -Symmetrie und den Alkylseitenketten folgende Hydrophobizität solcher Moleküle dar, wodurch diese unlöslich in Wasser sind und somit keine Hydrogele ausbilden können. Eine Möglichkeit die Hydrophilie drastisch zu erhöhen, bietet der Einsatz hydrophiler Polymere, wie z.B. PEG, als Ergänzung zu den Alkylseitenketten. Dabei muss jedoch darauf geachtet werden, dass sich das BTA- bzw. CycTA-Motiv selbst in einem hydrophoben Raum befindet, da Wassermoleküle die Wasserstoffbrücken destabilisieren. Diese hydrophobe Umgebung kann durch den Einsatz langkettiger Alkylspacer oder hydrophober Aminosäuren, wie z.B. Phenylalanin, realisiert werden (Abb. 57).

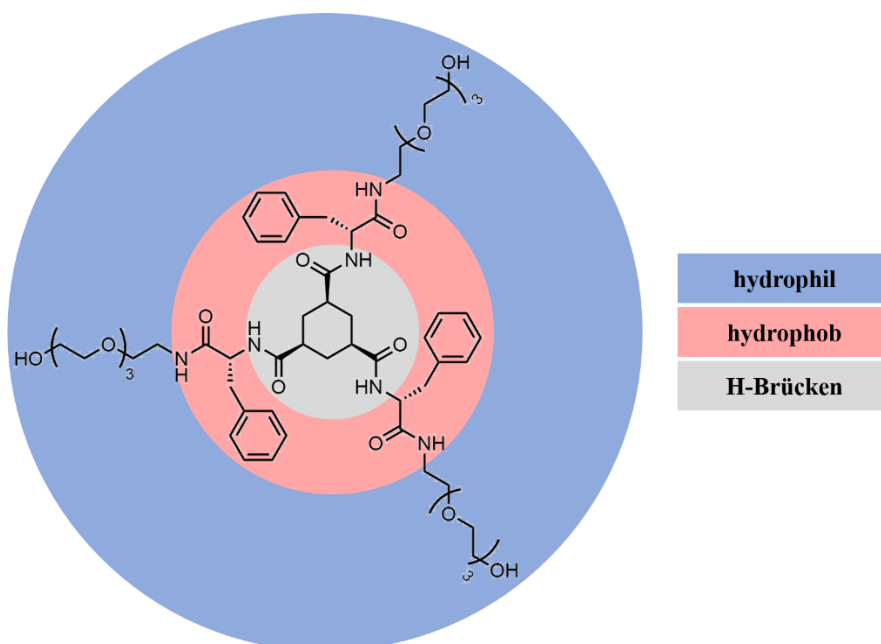


Abb. 57: Darstellung der verschiedenen Bereiche eines PEG-funktionalisierten LMWG auf Basis eines CycTA-Motivs.

Eine weitere Variante zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit von BTA-Motiven ist deren Einsatz als Endgruppenfunktionalisierung von α,ω -telechelen, hydrophilen Polymeren, wobei dadurch ebenfalls die Vernetzung solcher Polymere ermöglicht wird. Wie bereits erwähnt, synthetisierte TRISTAN MES in seiner Doktorarbeit ein PEG, das an beiden Endgruppen mit einem BTA-Motiv funktionalisiert wurde (Abb. 58) und dadurch Hydrogele mit E-Moduli von bis zu 120 kPa erhalten werden konnten.^[308]

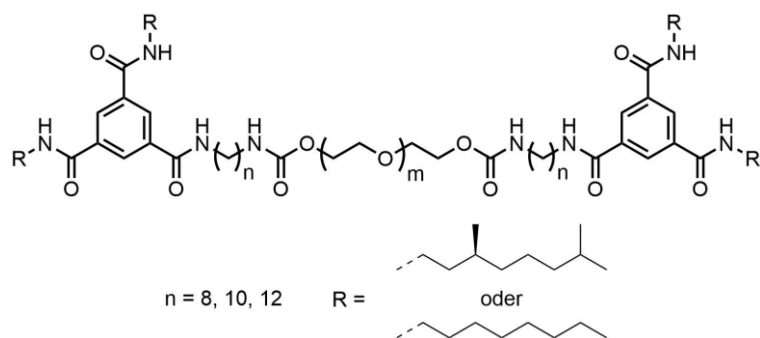


Abb. 58: Struktur der PEG-basierten und mit BTA-funktionalisierten inversen Bolaamphiphile nach TRISTAN MES.

Wie in Abb. 58 zu sehen ist, weist das BTA-modifizierte PEG eine „inverse“ Bolastruktur auf, da in diesem Fall hydrophobe Endgruppen vorliegen und die Kette den hydrophilen Teil darstellt. Die Gelierung erfolgt bei diesem Hydrogelator maßgeblich über die Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen BTA-Motiven. Außerdem wurden chirale Seitenketten verwendet, um eine möglichst dichtgepackte und stabile Helix zu erzeugen. Des Weiteren wurden Diaminoalkylspacer zur Erzeugung des hydrophoben Raums eingeführt, wobei gezeigt werden konnte, dass die kritische Gelierungskonzentration

(*cgc*, engl.: *critical gelation concentration*) mit zunehmender Alkylkettenlänge abnimmt. Bei der Gelierung des Hydrogelators entstehen durch dessen Bolaform zunächst blumenartige Mizellen, welche durch Erhöhung der Konzentration über die Ausbildung von Brücken und Verschlaufungen vernetzen (Abb. 59).

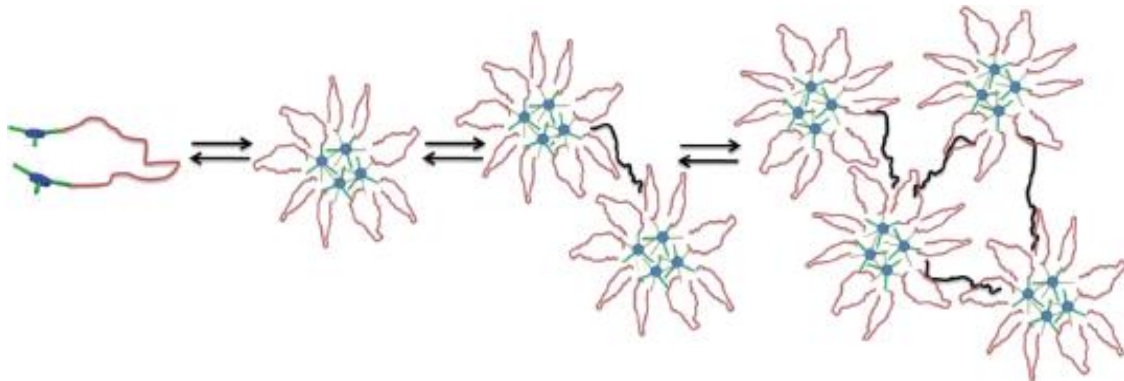


Abb. 59: Aggregation und Gelbildung der BTA-PEG-Hydrogelatoren in wässriger Lösung. (Sicht von oben).^[308]

Nichtsdestotrotz weist dieses System für die Anwendung als Stammzellkulturmedium bzw. Material zur Geweberegeneration aufgrund der limitierten Modifizierbarkeit von PEG einen entscheidenden Nachteil auf, da als Folge dessen keine zellresponsiven Liganden eingeführt werden können und somit das Hydrogel keine biologische Aktivität aufweist. Analog zu den chemischen Hydrogelen bieten sich hierfür die Polyacrylate bzw. Polyacrylamide aufgrund ihrer Vielfalt an Monomeren an. Des Weiteren können die erforderlichen definierten Endgruppen und Polymerstrukturen über kontrollierte, radikalische Polymerisationstechniken (CRP, engl.: *controlled radical polymerization*), wie z.B. der reversiblen Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (RAFT-Polymerisation, engl.: *reversible addition-fragmentation chain transfer*), gewährleistet werden. Die RAFT-Polymerisation zeichnet sich dabei im Gegensatz zu den anderen CRP-Techniken, wie der Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP, engl.: *atom transfer radical polymerization*) und der Nitroxid-vermittelten Polymerisation (NMP, engl.: *nitroxide-mediated polymerization*) durch eine Vielfalt an Endgruppenfunktionalisierungen, einsetzbaren Monomeren und Unempfindlichkeit gegenüber Wasser aus.

4.3 RAFT-Polymerisation

Die RAFT-Polymerisation läuft im Gegensatz zur freien radikalischen Polymerisation (FRP) kontrolliert ab und wird verwendet, um einheitliche Polymere mit enger Molmassenverteilung herzustellen, welche typischerweise unter 1,3 liegt. Außerdem lassen sich mittels der RAFT-Polymerisation Blockcopolymere aufbauen, die mit der FRP nicht zugänglich sind.^[320]

4.3.1 Mechanismus

Um diesen kontrollierten Ablauf zu gewährleisten, wird das Polymerradikal mittels eines RAFT-Reagenzes, z.B. (4-Cyanopentansäure)dithiobenzoat (CTP, **36**) (Abb. 60), in eine schlafende Spezies überführt und somit die Konzentration an freien Radikalen gering gehalten.

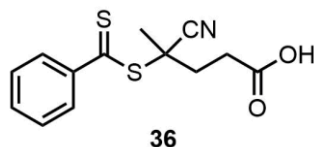
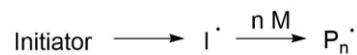


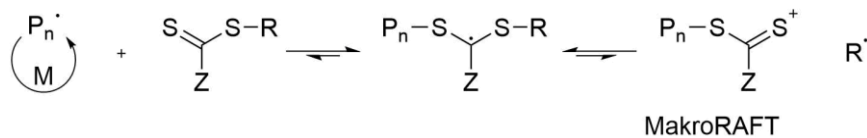
Abb. 60: RAFT-Reagenz: (4-Cyanopentansäure)dithiobenzoat.

Vorteil dieser Methode gegenüber anderen kontrollierten radikalischen Polymerisationstechniken ist, dass herkömmliche Azoinitiatoren verwendet werden können. Die Start- und Wachstumsreaktion laufen somit analog zu denen der FRP ab. Die wesentlichen Schlüssel-schritte stellen das Vor- und Hauptgleichgewicht dar. Beim Vorgleichgewicht wird das entstandene Polymerradikal vom RAFT-Reagenz abgefangen, wodurch dieses selbst in ein Radikal überführt wird. Dieses kann nun unter Entstehung der MakroRAFT-Spezies den Rest R• abspalten. Der freigesetzte Rest ist wiederum in der Lage eine Polymerisation zu initiieren. Im Hauptgleichgewicht bindet das MakroRAFT ein weiteres Polymerradikal, wodurch die sogenannte schlafende Spezies entsteht. Diese steht im Gleichgewicht mit dem MakroRAFT und den einzelnen freien Polymerradikalen, die weiter polymerisieren können. Analog zur FRP kann die Rekombination zweier Radikale zum Kettenabbruch führen (Schema 24).^[321]

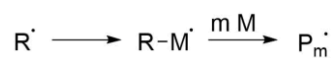
Initiation:



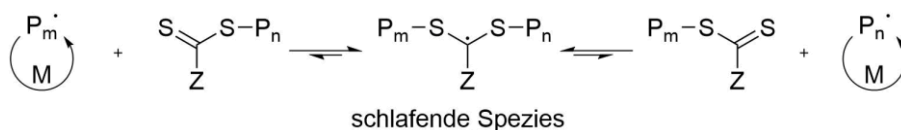
Vorgleichgewicht (engl.: *reversible chain transfer*):



Reinitiation:



Hauptgleichgewicht (engl.: *chain equilibration*):



Abbruch durch Rekombination:



Schema 24: Mechanismus der RAFT-Polymerisation.

4.3.2 Kinetik

Bei der RAFT-Polymerisation wird angenommen, dass es sich um eine kontrollierte radikalische Polymerisation handelt, die jedoch viele Eigenschaften einer lebenden Polymerisation aufweist. Daher wird angenommen, dass die Initiierung schnell und vollständig erfolgt, wodurch die Konzentration der aktiven Polymerketten während der gesamten Reaktion konstant bleibt. Daraus folgt, dass die Bruttoreaktionsgeschwindigkeit v_{Brutto} proportional zu dem Produkt der Konzentration der aktiven Polymerketten, der Monomerkonzentration und der Geschwindigkeitskonstante des Wachstums ist (Gl. 30).

$$v_{\text{Brutto}} \approx v_w = \frac{-d[\text{M}]}{dt} = k_w [\text{P}^\cdot] [\text{M}] \quad \text{Gl. 30}$$

mit v_{Brutto} : Bruttoreaktionsgeschwindigkeit, v_w : Wachstumsgeschwindigkeit, $[\text{M}]$: Monomerkonzentration, k_w : Geschwindigkeitskonstante des Wachstums, $[\text{P}^\cdot]$: Konzentration der aktiven Polymerketten.

Da angenommen wird, dass alle Initiator-moleküle sehr schnell zerfallen und die Konzentration der aktiven Polymerketten somit konstant bleibt, kann die Anfangskonzentration des Initiators mit der Konzentration der aktiven Polymerketten gleichgesetzt werden (Gl. 31).

$$v_w = k_w [P \cdot] [M] = k_w [I]_0 [M] \quad \text{Gl. 31}$$

mit $[I]_0$: Anfangskonzentration des Initiators.

Durch Integration von Gl. 31 wird ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung erhalten (Gl. 32).

$$\ln \frac{[M]_0}{[M]_t} = k_w [I]_0 t \quad \text{Gl. 32}$$

mit $[M]_0$: Anfangsmonomerkonzentration, $[M]_t$: Konzentration des Monomers zum Zeitpunkt t .

Die Steigung m der Auftragung von $\ln([M]_0/[M]_t)$ gegen t liefert die Geschwindigkeitskonstante der RAFT-Polymerisation k_R (Gl. 33).

$$m = k_w [I]_0 = k_R \quad \text{Gl. 33}$$

mit k_R : Geschwindigkeitskonstante der RAFT-Polymerisation.

Die theoretische Molmasse kann aus dem Monomerverbrauch und der Anfangskonzentration des RAFT-Reagenz berechnet werden (Gl. 34).^[320]

$$\overline{M}_{n,theo} = \frac{X \cdot [M]_0}{[RAFT]_0} \cdot M_{Mono} + M_{RAFT} \quad \text{Gl. 34}$$

mit $\overline{M}_{n,theo}$: theoretische Molmasse, X : Umsatz des Monomers, $[RAFT]_0$: Anfangskonzentration des RAFT-Reagenz, M_{Mono} : molare Masse des Monomers, M_{RAFT} : molare Masse des RAFT-Reagenz.

4.4 Design des acrylatbasierten Hydrogelators

Das Design des acrylatbasierten Hydrogelators wurde eng an das von MES gezeigte Polymer angelehnt, PEG wurde jedoch gegen P(AMor) ausgetauscht und die Kopplung des BTA-Motivs an das Polymer erfolgte über einen Thioether anstelle einer Urethanbindung (Abb. 61). Zur Synthese des Hydrogelators wurde eine konvergente Synthesestrategie angewendet, um die Anzahl an polymeranalogen Reaktionsschritten so gering wie möglich zu halten. Dafür wurde ein retrosynthetischer Schnitt an der Thioetherbindung des Polymers und des *spacers* durchgeführt, wobei der Hydrogelator in ein α,ω -telecheles P(AMor) mit terminalen Thiolgruppen und das mit einem C_8 -Spacer und MIP-Linker modifizierte BTA-Motiv (BTA-Mal, **40**) gespalten wurde. Das thiolmodifizierte P(AMor) wurde über eine RAFT-Polymerisation von AMor mit

1,1'-Azobis(cyclohexan-1-carbonitril) (V-40) in Gegenwart des RAFT-Reagenzes Didodecyl-1,4-phenylbis(methylen)bis(trithiocarbonat) (2C12, **38**), welches zuvor aus 1,4-Dibromoxylen (**37**) synthetisiert wurde, hergestellt und die Endgruppen über eine Aminolyse in die gewünschten Thiole überführt. Die Synthese des BTA-Motivs N^1 -(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethyl)- N^3,N^5 -dioctylbenzol-1,3,5-tricarboxamid (BTA-Mal, **40**) wurde ausgehend von 1,3,5-Tris(methoxycarbonyl)benzol (**39**) durchgeführt. Abschließend wurde BTA-Mal über eine Thiol-Michael-Klickreaktion an das Polymer immobilisiert.

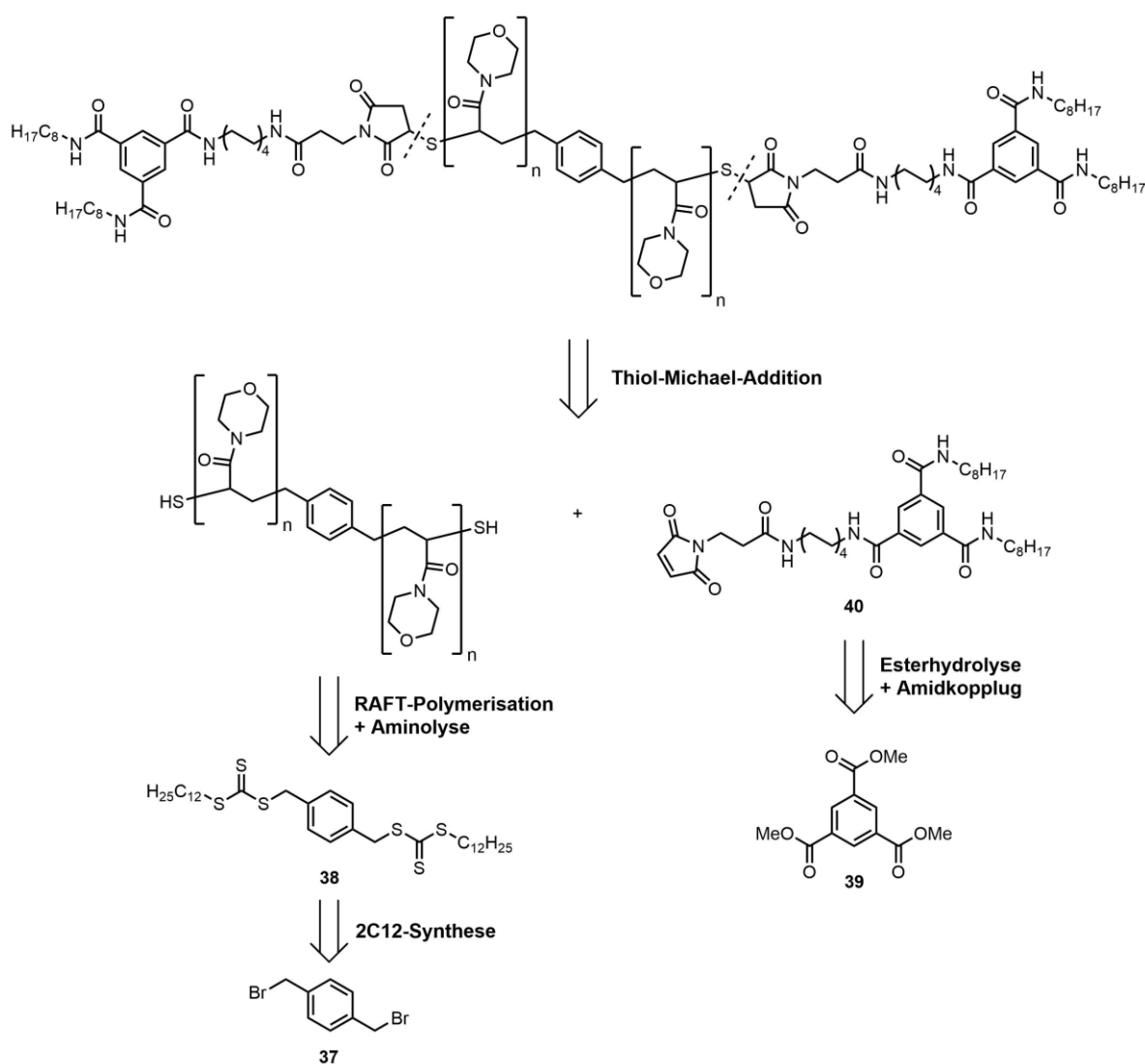
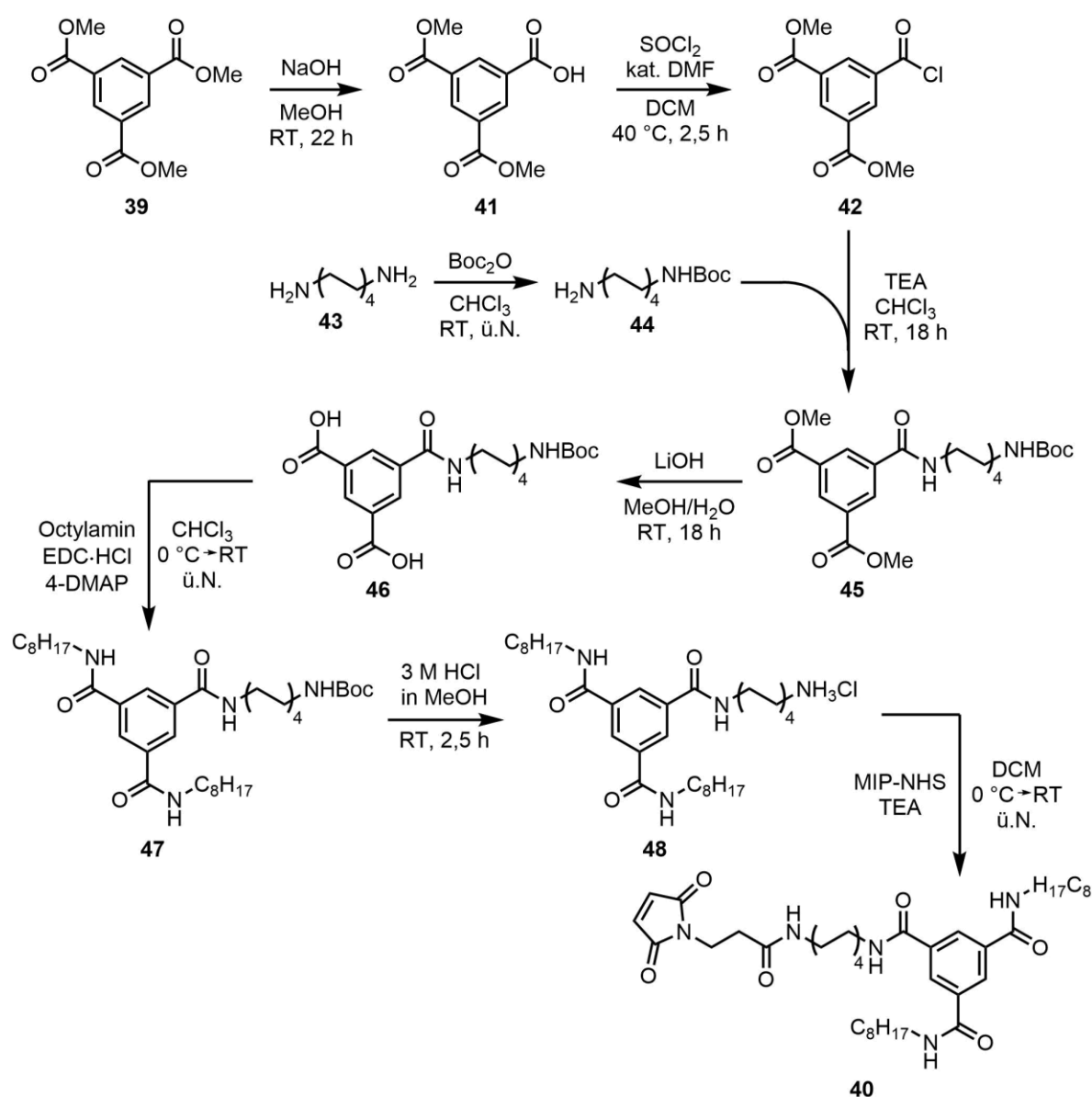


Abb. 61: Design und retrosynthetische Betrachtung des BTA-Hydrogelators.

Die Wahl des zur Synthese des hydrophilen Polymers verwendeten Monomers AMor und der zur BTA-Funktionalisierung eingesetzten Thiol-Michael-Addition basierte auf den sehr guten Ergebnissen der Synthese und Peptidimmobilisierung bei den chemisch-vernetzten Hydrogelen.

4.5 Synthese des BTA-Motivs

Als Ausgangsstoff für die BTA-Synthese wurde 1,3,5-*Tris*(methoxycarbonyl)benzol (**39**) verwendet, das über eine siebenstufige Synthese zum gewünschten BTA-Motiv BTA-Mal (**40**) umgesetzt werden sollte (Schema 25).



Schema 25: Syntheseroute zur Herstellung des BTA-Motivs BTA-Mal.

Im ersten Schritt wurde zunächst eine Methoxygruppe von **39** hydrolysiert, um zunächst den Diaminooctanspacer einführen zu können. Dafür wurde **39** mit einem Unterschuss an NaOH

(0,91 eq.) umgesetzt, wodurch zwar mit einer geringeren Ausbeute gerechnet werden musste, aber dafür die selektive Hydrolyse einer Methoxygruppe gewährleistet und so eine aufwendige Abtrennung der Di- und Tricarbonsäure verhindert werden konnte. Nach der Aufreinigung durch Umkristallisation konnte 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäure (**41**) mit einer Ausbeute von 55 % als Reinstoff isoliert werden. Bevor die Kopplung des Diaminooktanspacers erfolgen konnte, musste dieser zur Verhinderung einer Dimerisierung und späteren Nebenreaktion bei den weiteren Amidkopplungen einseitig geschützt werden. Dafür wurde die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe ausgewählt, da diese durch ihre Basenstabilität gegenüber den Bedingungen der folgenden Reaktionen stabil ist. Für die Schützung wurde Diaminooktan (DAO, **43**) mit Di-*tert*-butyldicarbonat (Boc_2O) umgesetzt, wobei zur Gewährleistung der einseitigen Schützung mit einem Verhältnis von 2:1 (DAO: Boc_2O) gearbeitet wurde. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde Mono-*tert*-butoxycarbonyl-1,8-diaminooctan (**44**) mit einer Ausbeute von 75 % erhalten. In den nächsten beiden Schritten wurde nun der hydrophobe C_8 -Spacer über eine Schotten-Baumann-Reaktion eingeführt, indem zunächst **41** in sein Säurechlorid 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäurechlorid (**42**) überführt wurde. Dazu wurde **41** mit einem 1,5-fachen Überschuss an Thionylchlorid und einer katalytischen Menge DMF unter Siedehitze umgesetzt. Zur Vermeidung der Hydrolyse des Säurechlorids wurde dieses nach Abtrennung des Lösungsmittels und überschüssigem Thionylchlorid direkt ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde **42** mit einem leichten Überschuss an **44** unter Verwendung von TEA als Base umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte 3,5-Methoxycarbonyl-*tert*-butyl(8-benzamidooctyl)carbammat (**45**) mit einer Ausbeute von 94 % über beide Stufen erhalten werden. Im Anschluss an die Einführung des C_8 -Spacers wurden die hydrophoben Octylaminseitenketten über die zwei verbleibenden Methoxygruppen angebunden. Dazu wurden diese zunächst mit einem Überschuss an Lithiumhydroxid hydrolysiert, wodurch nach Umkristallisation 5-((8-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)octyl)-carbamoyl)isophthalsäure (**46**) mit einer Ausbeute von 80 % erhalten werden konnte. Anschließend wurde Octylamin über eine 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) vermittelte Amidkopplung an **46** gebunden, wobei zur Erhöhung des Umsatzes ein 20 mol%-iger Überschuss pro Carboxylgruppe an Octylamin eingesetzt wurde. *tert*-Butyl-(8-(3,5-*bis*(octylcarbamoyl)-benzamido)octyl)carbammat (**47**) konnte nach Aufreinigung mit einer Ausbeute von 93 % isoliert werden. Nachdem sowohl der C_8 -Spacer als auch die C_8 -Seitenketten eingeführt wurden, musste zum Schluss noch der MIP-Linker immobilisiert werden. Dafür wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe des Spacers entfernt, wobei, um eine Zersetzung des Moleküls zu verhindern, eine 3 M HCl in MeOH anstelle

von TFA eingesetzt wurde. Nachdem das primäre Amin des Spacer quantitativ entschützt werden konnte, wurde das zuvor in Kapitel 3.11.1.1 synthetisierte MIP-NHS (**26**) mit der freien Aminogruppe unter der Verwendung von TEA als Base umgesetzt. Dabei konnte BTA-Mal (**40**) nach säulenchromatographischer Aufreinigung in hoher Reinheit mit einer Ausbeute von 47 % erhalten werden (Abb. 62).

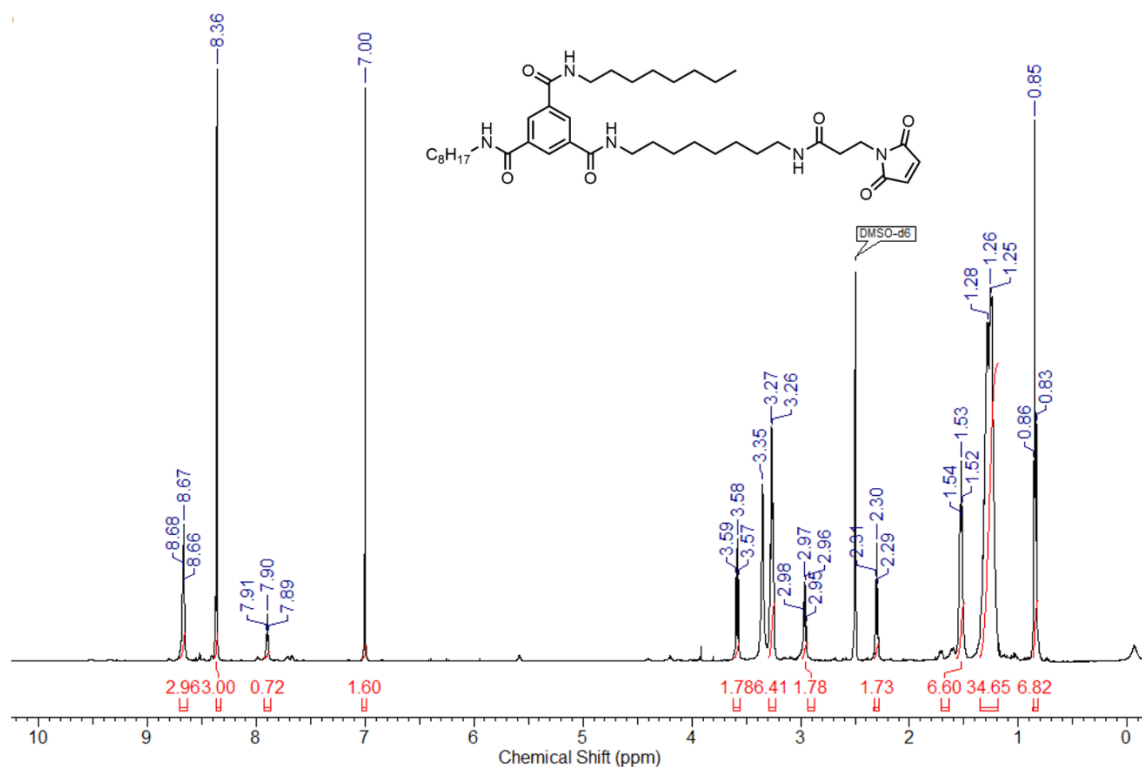
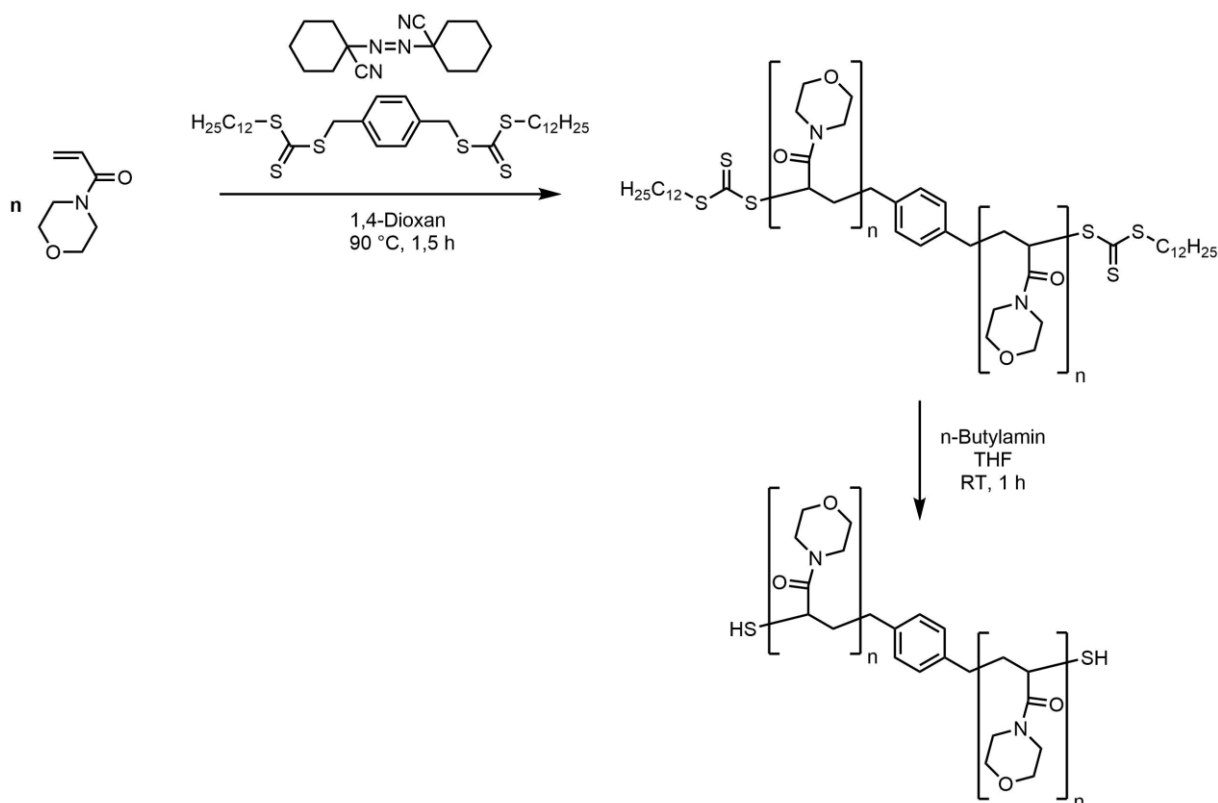


Abb. 62: ¹H-NMR-Spektrum in DMSO-d₆ von BTA-Mal.

Nachdem das BTA-Mal mit einer Gesamtausbeute von 18 % über sieben Stufen erfolgreich synthetisiert werden konnte, wurde nun eine Syntheseroute für das α,ω -telechelen HS-P(AMor)-SH entwickelt.

4.6 Synthese des α,ω -telechelen HS-P(AMor)-SH

Wie bereits beschrieben, sollte die Synthese des α,ω -telechelen HS-P(AMor)-SH über eine RAFT-Polymerisation erfolgen, weil mit dieser Technik die erforderlichen Endgruppen generiert werden konnten. Zum Aufbau der bolaamphiphilen Struktur wurde eine Thiolgruppe auf beiden Seiten des Polymers benötigt. Aus diesem Grund wurde für die Synthese das symmetrische, bifunktionelle RAFT-Reagenz 2C12 verwendet, da dessen vorhandene Dodecyltrithiocarbonatendgruppen (DTTC-Endgruppe) mittels einer Aminolyse in die gewünschten Thiolgruppen überführt werden können (Schema 26).

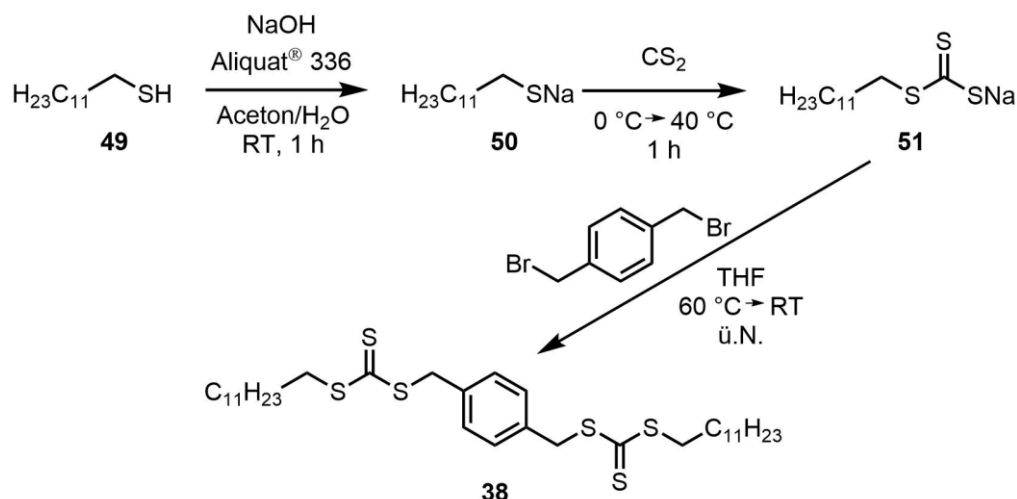
Schema 26: Syntheseroute zur Herstellung des α,ω -telechelen P(AMor).

4.6.1 Synthese von DTTC-P(AMor)-DTTC

Die Synthese des DTTC-endgruppenfunktionalisierten P(AMor)s erfolgte über die durch das RAFT-Reagenz 2C12-vermittelte Polymerisation von AMor in Gegenwart des Initiators V-40. 2C12 wurde als RAFT-Reagenz ausgewählt, da durch die Polymerisation, ausgehend vom zentralen Xylen, die beiden Polymerketten kovalent und stabil miteinander verbunden sind. Des Weiteren konnten bereits mit diesem RAFT-Reagenz in einigen Studien sehr gute Ergebnisse bezüglich der Endgruppenfunktionalisierung erreicht werden. So haben HERFURTH *et al.* 2C12 zur Herstellung von thermoresponsiven Poly(dimethylacrylamid)en verwendet und konnten dabei Endgruppenfunktionalisierungsgrade von bis zu 90 % erreichen.^[322] Außerdem wurde mit V-40 ein Initiator gewählt, der bei einer Polymerisationstemperatur von 90 °C eine ähnliche Zerfallsrate wie der Standardinitiator Azo-*bis*-(isobutyronitril) (AIBN) bei 70 °C aufweist. Die hohe Polymerisationstemperatur ist durch die relativ langsame Polymerisationsrate von Benzyl- bzw. in diesem Fall Xylenradikalen notwendig. Da 2C12 nicht kommerziell erhältlich ist, wurde dieses zunächst synthetisiert.

Die Synthese erfolgte über eine von DEGANI *et al.* publizierte Methode zur Herstellung von RAFT-Reagenzien^[323] mittels Kohlenstoffdisulfid, Dodecanthiol (**49**) und α,α' -Dibromxylen (**37**) (Schema 27). Im ersten Schritt wurde zunächst das Dodecanthiol mittels einer

wässrigen NaOH-Lösung in Anwesenheit des Phasentransferkatalysators Aliquat[®] 336 deprotoniert und das entstandene Thiolat (**50**) mit Kohlenstoffdisulfid abgefangen. Die Entstehung des Trithiocarbonatanions (**51**) konnte dabei über eine intensive Gelbfärbung unmittelbar nach der Zugabe von CS₂ festgestellt werden. Nach Erhitzen der Lösung und Zugabe von α,α' -Dibromxylen konnte nach Aufreinigung durch Umkristallisation 2C12 mit einer Ausbeute von 45 % erhalten werden.



Schema 27: Synthese von 2C12.

Nachdem 2C12 erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde dieses in der RAFT-Polymerisation von AMor eingesetzt. Dafür wurde ein Verhältnis von 2C12 zu V-40 von 5:1 verwendet, da dieses eine gute Kontrolle bei einer gleichzeitig hohen Polymerisationsrate gewährleistet. Des Weiteren wurde eine theoretische Molmasse von 20000 Da angestrebt, was einem Polymerisationsgrad von 142 Wiederholungseinheiten entspricht. Die Wahl dieser Molmasse war darin begründet, eine Vergleichbarkeit zu dem System von MES herzustellen, da dieser in seiner Dissertation ein PEG mit einer Molmasse von ebenfalls 20000 Da verwendet hat. Außerdem wurde zur Sicherstellung eines möglichst vollständigen Umsatzes eine Reaktionszeit von 22 h gewählt und die Lösungsmittel wurden zur Vermeidung von Inhibitionsreaktionen durch Luft-sauerstoff sorgfältig entgast. Die Aufreinigung des Polymers erfolgte anschließend durch Ausfällen der Polymerisationslösung in Et₂O und lieferte das rückstandsfreie Polymer mit einer Ausbeute von 88 %. Die folgende GPC-Analyse ergab eine Molmasse von 15600 Da bei einer Dispersität von 1,07. Mögliche Erklärungen für die niedrige Molmasse sind zum einen die generelle Abweichung von GPC-Messungen, um bis zu 20 %, und zum anderen die Verwendung von Poly(methylmethacrylat) (P(MMA)) als Standard, wobei vor allem Letzteres durch die unterschiedliche Polarität von P(MMA) und P(AMor) einen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis haben kann. Die Dispersität weist mit 1,07 einen für RAFT-Polymerisationen

typischen Wert auf, welche in der Regel zwischen 1,05 und 1,35 liegen.^[324] Zur Bestimmung des Endgruppenfunktionalisierungsgrades (Gl. 35) wurde die Molmasse \overline{M}_n^{UV} , die über UV/Vis-spektroskopische Endgruppenanalyse bestimmt wurde, mit der aus der Umsatzbestimmung theoretisch erreichbaren Molmasse $\overline{M}_{n,theo}$ (Gl. 34) verglichen. Die Berechnung von \overline{M}_n^{UV} erfolgte dabei über die aus dem LAMBERT-BEER'SCHEN Gesetz ermittelte Stoffmenge der DTTC-Endgruppen und der dafür eingesetzten Masse an Polymer (Gl. 36). Der molare Extinktionskoeffizient von 2C12 wurde mit $33845 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ über eine Konzentrationsreihe in THF bestimmt.

$$Z_{DTTC} [\%] = \frac{\overline{M}_{n,theo}}{\overline{M}_n^{UV}} \quad \text{Gl. 35}$$

$$\overline{M}_n^{UV} = \frac{m_{Poly}}{n_{DTTC}} = \frac{\epsilon_{2C12,309} \cdot d \cdot c_{Poly}}{E_{309}} \quad \text{Gl. 36}$$

mit \overline{M}_n^{UV} : über UV/Vis-spektroskopische Endgruppenanalyse bestimmte Molmasse, m_{poly} : Masse des Polymers, n_{DTTC} : Stoffmenge der DTTC-Endgruppen, $\epsilon_{309,2C12}$: molarer Extinktionskoeffizient von 2C12 bei 309 nm, d: Schichtdicke, β_{poly} : Massenkonzentration des Polymers, E_{309} : gemessene Extinktion bei 309 nm, Z_{DTTC} : Endgruppenfunktionalisierungsgrad von DTTC.

Die Bestimmung des Umsatzes zur Ermittlung von $\overline{M}_{n,theo}$ erfolgte hierbei mittels der ^1H -NMR-Spektroskopie über den Einsatz von 1,3,5-Trioxan als internen Standard.

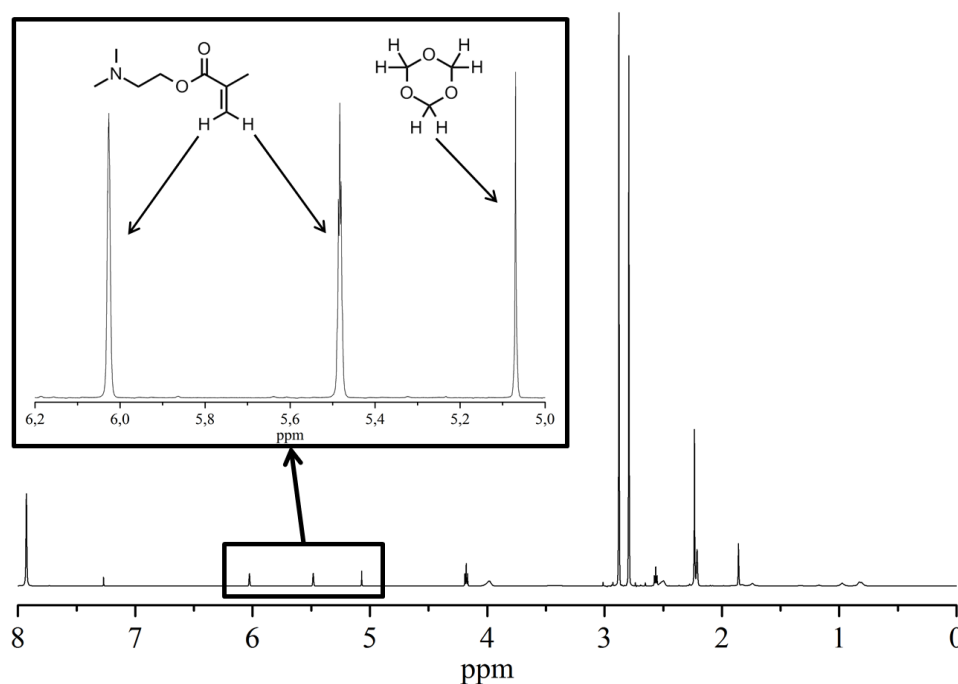


Abb. 63: ^1H -NMR-Spektrum in CDCl_3 einer DMAEMA-Polymerisationslösung nach 6 h mit 1,3,5-Trioxan als internen Standard.

In Abb. 63 ist das Prinzip anhand einer RAFT-Polymerisation von DMAEMA dargestellt. Dabei wird das Verhältnis der Signalflächen eines Protons der Doppelbindung der Methacrylatgruppe (5,48 ppm oder 6,03 ppm) und der 1,3,5-Trioxan-Protonen (5,07 ppm) gebildet. Über Gl. 37 kann aus den Verhältnissen der Integrale zu bestimmten Zeitpunkten während der Reaktion und zum Startpunkt ($t = 0$) der Umsatz des Monomers berechnet werden.

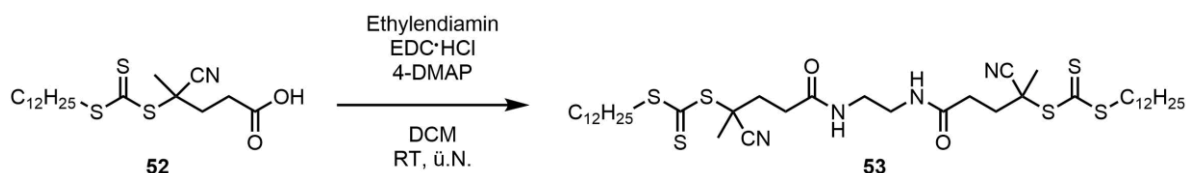
$$Umsatz = 1 - \frac{\left(\frac{I_{6,03}}{I_{5,07}} \right)_t}{\left(\frac{I_{6,03}}{I_{5,07}} \right)_{t=0}} \quad \text{Gl. 37}$$

mit $I_{5,07}$: Integral des Signals bei 5,07 ppm (1,3,5-Trioxan), $I_{6,03}$: Integral des Signals bei 6,03 ppm (Methacrylat).

Durch den Verbrauch der Acrylatfunktionalitäten während der Polymerisation nimmt die Integralfläche des entsprechenden Signals ab, wohingegen die Signale des chemisch inerten 1,3,5-Trioxans konstant bleiben, wodurch letztendlich der Umsatz ansteigt.

Da in dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Polymerisationslösung von DTTC-P(AMor)-DTTC nach 22 h keine Signale für die Protonen der Acrylamidgruppen detektiert werden konnten, ergab sich somit ein Umsatz von 100 %, was wiederum eine theoretisch erreichbare Molmasse von 20000 Da zur Folge hatte. Über die UV/Vis-spektroskopische Endgruppenanalyse konnte eine leicht höhere Molmasse von 22750 Da bestimmt werden, woraus sich letztendlich ein Endgruppenfunktionalisierungsgrad von 88 % ergab. Trotz des hohen Funktionalisierungsgrades wurde ein alternatives RAFT-Reagenz entwickelt, das bei niedrigeren Polymerisationstemperaturen eingesetzt werden kann, um die unerwünschten Abbruchreaktionen bei hohen Temperaturen zu vermeiden, durch die die Anzahl der RAFT-Endgruppen sinkt. Aus diesem Grunde sollte eine Steigerung des Z_{DTTC} -Wertes bei Verwendung niedrigerer Polymerisationstemperaturen möglich sein.

Ein häufig zur RAFT-Polymerisation eingesetztes RAFT-Reagenz ist Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentansäure (CDP, **52**), welches als Z-Gruppe ebenfalls ein Dodecanthiol aufweist. Als R-Gruppe dient hingegen die im Gegensatz zur Benzylgruppe reaktivere 4-Cyanopentansäure, wobei die erhöhte Reaktivität durch das Vorliegen eines tertiären Radikals und der starken elektronenziehenden Wirkung der Cyanogruppe begründet ist.^[325] Dadurch ist es möglich, CDP in Kombination mit AIBN bei Temperaturen von 60 – 70 °C einzusetzen. Da CDP jedoch nur eine Trithiocarbonatgruppe aufweist, wurde es mittels Ethylendiamin dimerisiert (Schema 28).

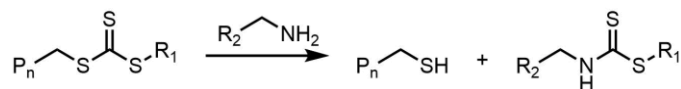
Schema 28: Synthese von EDA-CDP₂.

Die Synthese von Didodecyl((ethan-1,2-diylbis(azandiyl))bis(2-cyano-5-oxopentan-5,2-diyl))bis(carbonotrithioat) (EDA-CDP₂, **53**) erfolgte über eine EDC·HCl-vermittelte beidseitige Amidkopplung von Ethylendiamin mit dem kommerziell erhältlichen CDP (**52**), wobei nach säulenchromatographischer Aufreinigung EDA-CDP₂ mit einer Ausbeute von 25 % erhalten wurde.

Nachdem EDA-CDP₂ erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde dieses nun in der RAFT-Polymerisation von AMor eingesetzt, wobei der Initiator durch AIBN ersetzt und die Polymerisationstemperatur auf 70 °C abgesenkt wurde. Die einzelnen Verhältnisse zwischen Monomer, RAFT-Reagenz und Initiator sowie das Lösungsmittel 1,4-Dioxan und der Aufreinigungsprozess blieben jedoch gleich. Die GPC-Analyse des EDA-CDP₂-Polymers ergab mit einer mittleren Molmasse von 16600 Da und einer Dispersität von 1,12 zu 2C12 ähnliche Werte. Des Weiteren konnte bei einer Ausbeute von 85 % ebenfalls ein Umsatz von 100 % erreicht werden, wodurch sich auch hier eine theoretisch erreichbare Molmasse von 20000 Da ergab. Im Gegensatz zu 2C12 konnte jedoch durch den Einsatz von EDA-CDP₂ ein Z_{DTTC} -Wert von 100 % erreicht werden, wobei mit 19152 L mol⁻¹ cm⁻¹ der zuvor ermittelte molare Extinktionskoeffizient von EDA-CDP₂ für die Berechnung von $\overline{M}_n^{\text{UV}}$ verwendet wurde. Durch die sehr gute Ausbeute und sehr hohe Endgruppenfunktionalisierung ist EDA-CDP₂ somit hervorragend zur Synthese des DTTC-endgruppenfunktionalisierten P(AMor) geeignet.

4.6.2 Aminolyse von DTTC-P(AMor)-DTTC

Nachdem die Herstellung von DTTC-P(AMor)-DTTC erfolgreich realisiert werden konnte, mussten die DTTC-Endgruppen zu den erforderlichen Thiolgruppen umgesetzt werden. Eine gängige Methode, um Trithiocarbonate in Thiolgruppen zu überführen, stellt die Aminolyse mit primären Aminen dar. Das Amin greift dabei nukleophil am Thiocarbonylkohlenstoff an, wodurch das Trithiocarbonat in ein Dithiocarbamat und das gewünschte Thiol (Schema 29) gespalten wird.^[321] Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei maßgeblich von der Nukleophilie des Amins bestimmt. Des Weiteren werden stets große Überschüsse von bis zu 20 eq. Amin verwendet, um eine vollständige Abspaltung der Endgruppe zu gewährleisten.



Schema 29: Umsetzung von polymergebundenen Trithiocarbonaten zu Thiolen.

Ein häufig zur Aminolyse eingesetztes Amin ist *n*-Butylamin, weshalb dieses in dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurde. Wie bei den chemischen Gelen, musste hier aufgrund der Freisetzung der Thiole in entgasten Lösungen und unter einer Schutzgasatmosphäre gearbeitet werden, um eine Oxidation der Thiole zu Disulfiden und so die Bildung hochmolekularer Kopplungsprodukte zu vermeiden.^[326] Neben *n*-Butylamin wurde auch Hydrazin als Nukleophil für die Aminolyse getestet, da dieses neben der wesentlich höheren Nukleophilität auch reduktive Eigenschaften aufweist, wodurch zum einen kleinere Mengen benötigt werden und zum anderen die Reaktion unter nicht-inerten Bedingungen durchgeführt werden kann.^[327] Zum Vergleich der beiden Substanzen wurden kinetische Untersuchungen der Aminolyse von DTTC-P(AMor)-DTTC durchgeführt. Da Trithiocarbonate neben der starken Absorptionsbande bei 309 nm eine weitere durch einen $n \rightarrow \pi$ -Übergang hervorgerufene schwächere Absorptionsbande bei 433 nm aufweisen, kann die Aminolyse für höhere Konzentrationen bei dieser Wellenlänge sehr gut UV/Vis-spektroskopisch verfolgt werden (Abb. 64).^[328]

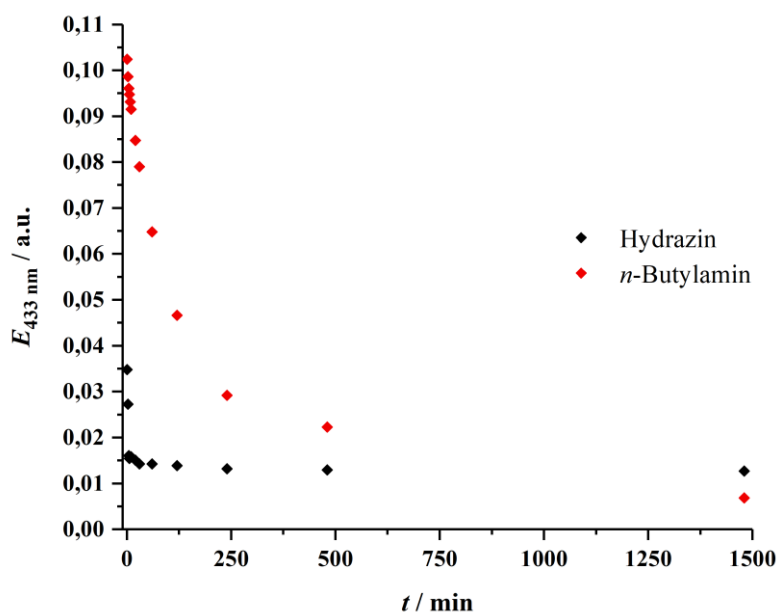


Abb. 64: Auftragung der Extinktion bei 433 nm gegen die Zeit zur kinetischen Untersuchung der Aminolyse von DTTC-P(AMor)-DTTC mit Hydrazin (2,5 eq.) und *n*-Butylamin (20 eq.).

Aus Abb. 64 wird sehr gut deutlich, dass die Aminolyse mit Hydrazin gegenüber *n*-Butylamin um ein vielfaches schneller abläuft, obwohl von Letzterem die achtfache Menge eingesetzt wurde. So konnte für Hydrazin bereits nach 5 min keine weitere Änderung der Extinktion beobachtet werden, wohingegen die Reaktion bei der Verwendung von *n*-Butylamin erst nach ca.

25 h beendet war und somit ca. 300-mal langsamer abläuft. Obwohl Hydrazin gegenüber *n*-Butylamin zahlreiche Vorteile aufweist, wurde dennoch *n*-Butylamin für die Aminolyse eingesetzt, was vor allem an der schwierigen Entfernung des überschüssigen Hydrazins lag. Diese ist jedoch durch die spätere Verwendung von Maleimiden notwendig, da Hydrazin bzw. Amine unter basischen Bedingungen bevorzugt mit diesen reagieren, wodurch die Thiolselektivität der Maleimidgruppe verloren geht. Somit wurde die Abspaltung der DTTC-Endgruppen über die Umsetzung mit 20 eq. *n*-Butylamin realisiert, wobei zur Gewährleistung eines vollständigen Umsatzes die Reaktionszeit mindestens 24 h betrug und entgaste Lösungsmittel zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen eingesetzt wurden. Die vollständige Umsetzung der DTTC-Endgruppen konnte über den Vergleich der Extinktion bei 309 nm vor und nach der Reaktion und über die Entfärbung des Polymers validiert werden (Abb. 65).

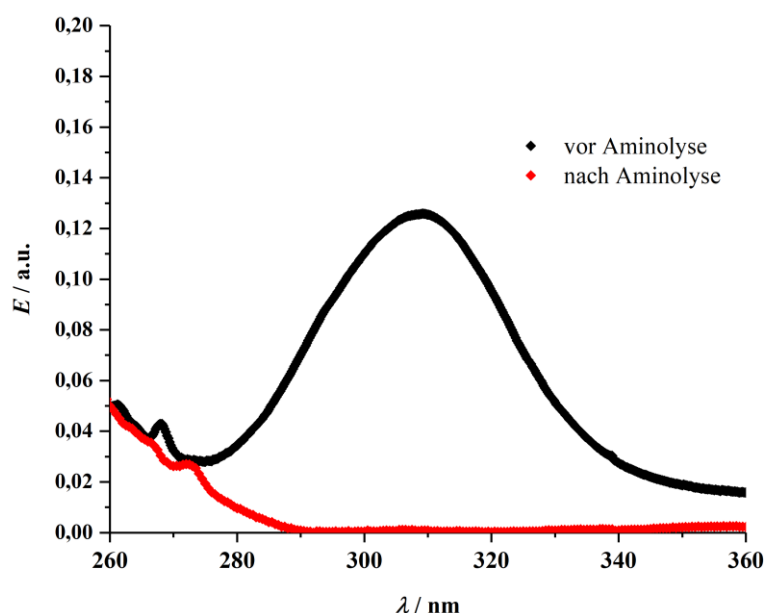


Abb. 65: UV/Vis-Spektren des α,ω -telechelen P(AMor) vor und nach der Aminolyse.

4.6.3 Immobilisierung des BTA-Motivs

Nachdem sowohl das BTA-Motiv (BTA-Mal) als auch das hydrophile, thiolendgruppenmodifizierte Polymer (HS-P(AMor)-SH) erfolgreich synthetisiert werden konnten, mussten diese nun zum Abschluss der Hydrogelatorsynthese miteinander gekoppelt werden. Wie zuvor bereits angedeutet, wurde dafür durch die sehr guten Erfahrungen bei den chemischen Gelen die Thiol-Michael-Klickreaktion eingesetzt, da diese ohne den Zusatz weiterer Kopplungsreagenzien, selektiv und quantitativ abläuft, wodurch zum einen die Aufreinigung erleichtert und zum anderen die Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen minimiert wird. Da BTA-Mal in Wasser unlöslich ist, musste die Reaktion in DMF durchgeführt werden, wodurch der Einsatz von TEA als nicht-nukleophile Base zur Deprotonierung der Thiolgruppen notwendig war. Des Weiteren wurde

zur Gewährleistung der Umsetzung aller Thiolgruppen ein zehnfacher Überschuss an BTA-Mal eingesetzt und eine Reaktionszeit von drei Tagen gewählt. Außerdem wurde zur Vermeidung von Oxidationsreaktionen das Lösungsmittel sorgfältig entgast, die Reaktion unter einer Schutzgasatmosphäre durchgeführt und Tri-*n*-butylphosphin als nicht-thiolhaltiges Reduktionsmittel hinzugegeben. Nach Aufreinigung durch mehrfaches Ausfällen in Diethylether konnte der Hydrogelator BTA-P(AMor)-BTA mit einer Ausbeute von 97 % isoliert werden. Des Weiteren konnte die rückstandsfreie Entfernung des überschüssigen BTA-Mal über das ^1H -NMR-Spektrum bestätigt werden.

Da das BTA-Motiv keine UV-aktiven Gruppen enthielt, erfolgte die Bestimmung des Endgruppenfunktionalisierungsgrades über die ^1H -NMR-Spektroskopie (Abb. 66).

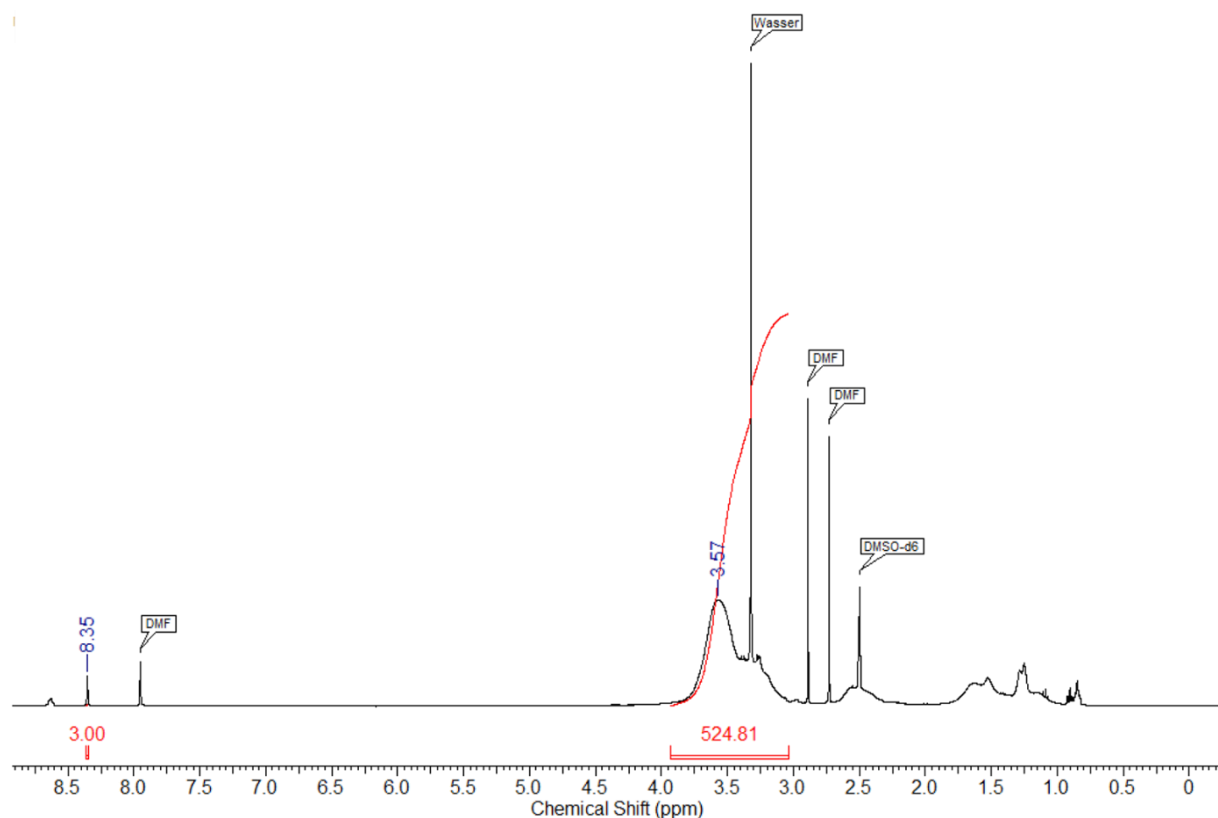


Abb. 66: ^1H -NMR-Spektrum in DMSO-d_6 von BTA-P(AMor)-BTA.

Dafür wurde das Verhältnis der Signalintegrale der Aromatenprotonen von BTA-Mal (8,35 ppm) und den Protonen des Morpholinrings (3,04 – 3,93 ppm) ermittelt, um auf diese Weise den Polymerisationsgrad (DP, engl.: *degree of polymerization*) und daraus folgend die Molmasse zu bestimmen. Dabei muss beachtet werden, dass aufgrund des Vorliegens von zwei Endgruppen der ermittelte DP mit zwei multipliziert werden muss. Aus der Analyse der Endgruppen ergab sich eine Molmasse von ca. 18500 Da. Durch den Vergleich mit der theoretisch erreichbaren Molmasse von 19440 Da, die sich aus den anfänglich bestimmten 20000 Da

abzüglich der Molmasse der beiden abgespaltenen DTTC-Gruppen zusammensetzt, konnte somit ein Funktionalisierungsgrad von 105 % erreicht werden. Der zu hohe Wert lässt sich über die Ungenauigkeiten bei der Prozessierung des NMR-Spektrums erklären, da sich die Integrale durch eine Basislinienkorrektur erhöhen bzw. verringern können. Nichtsdestotrotz ist der Fehler mit 5 % als sehr gering einzuschätzen, wodurch von einer vollständigen Funktionalisierung des Polymers mit BTA-Mal ausgegangen werden kann. Im Folgenden sollte der Hydrogelator nun bezüglich seiner Geleigenschaften untersucht werden.

4.6.4 Charakterisierung des Hydrogelators

Die Charakterisierung der Geleigenschaften erfolgte zum einen mit dem *tube inversion test* (TIT) über einen visuellen Test und zum anderen über rheologische Messungen. Beim TIT werden Polymerlösungen mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt und in ein Glasröhrchen gegeben. Anschließend werden diese über ihren externen Trigger geliert, welcher in diesem Falle eine Temperaturänderung darstellte. Dafür wurden die verschiedenen Lösungen (20, 40, 50 % (w/v)) mehrmals auf 70 °C erhitzt und abgekühlt. Durch dieses Tempern sollte eine möglichst gleichmäßige Ausbildung der physikalischen Wechselwirkungen zum Erhalt stabiler Gele erreicht werden. Nach der Gelierung wurden die Gläser umgedreht und das Fließverhalten der Polymerlösungen beobachtet. Da bei Gelen die elastischen Anteile die viskosen Anteile überwiegen ($G' > G''$), weisen diese eine unendliche Viskosität auf und sollten somit nicht fließen.^[329] Die geringste Konzentration bei der kein Fließen festgestellt werden kann, stellt letztendlich die kritische Gelbildungskonzentration (cgc) dar.

Für die eingesetzten Polymerlösungen von BTA-P(AMor)-BTA konnte bei allen Konzentrationen ein Fließen beobachtet werden, wodurch von einer nicht-erfolgreichen Gelierung ausgegangen werden musste. Dies lässt sich möglicherweise darüber erklären, dass zu keinem Zeitpunkt eine klare homogene Polymerlösung erhalten werden konnte, da zum einen eine Temperatur von mindestens 70 °C zur Aggregation der BTA-Motive benötigt wird, aber zum anderen P(AMor) oberhalb seiner LCST von ca. 50 °C anfängt aus der Lösung auszufallen und somit eine gleichmäßige Ausbildung der physikalischen Wechselwirkungen verhindert wird. Nichtsdestotrotz wurde die 20 % (w/v)-ige Polymerlösung rheologisch untersucht, wobei ein Kegel-Platte-Messsystem eingesetzt wurde. Ein häufiges zur Bestimmung der Geleigenschaften physikalischer Hydrogele eingesetztes Experiment ist der Frequenztest, bei dem bei konstanter Temperatur und Deformation die Scherrate schrittweise erhöht und dabei das Verhalten der Moduli beobachtet wird. Für den vorliegenden Hydrogelator wurde ein Frequenztest bei einer Temperatur von 25 °C und einer Deformation von 1 % durchgeführt, wobei die

Frequenz von 0,1 bis 100 Hz variiert wurde. Des Weiteren wurde zur Analyse der Reversibilität sowohl bei zunehmender als auch bei abnehmender Frequenz gemessen (Abb. 67).

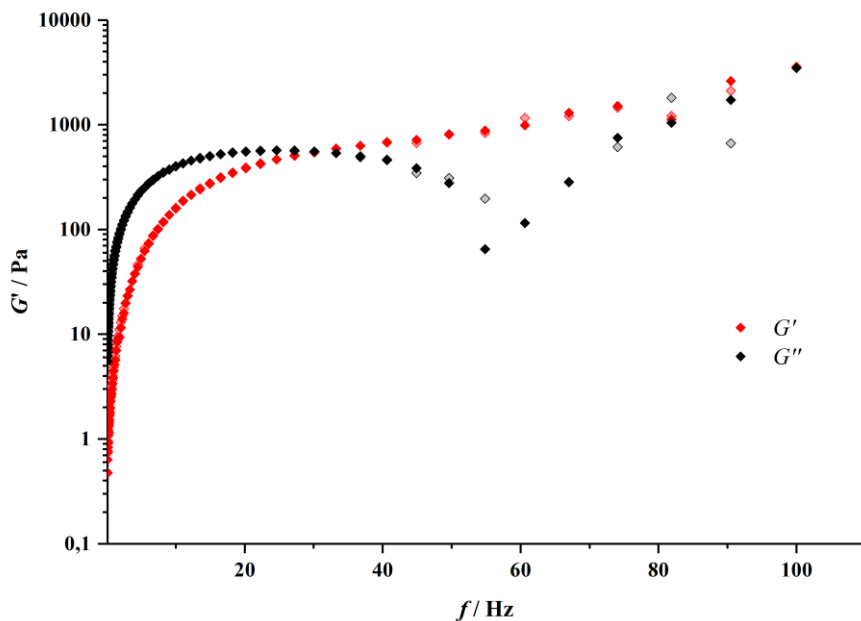


Abb. 67: Rheologische Untersuchung einer 20 % (w/v)-igen BTA-P(AMor)-BTA-Lösung bei zu- (ausgefüllt) und abnehmender (transparent) Frequenz (25 °C, 1 % Deformation).

Die frequenzabhängige Messung bestätigt zunächst das Ergebnis des TIT, da bei geringeren Scherraten die viskosen Anteile die elastischen Anteile überwiegen ($G'' > G'$), wodurch lediglich eine hochviskose Lösung aber kein Gel vorliegt. Mit Erhöhung der Frequenz konnte auch ein Ansteigen der Moduli verzeichnet werden, wobei bei 30 Hz durch den Schnittpunkt von G' und G'' der Gelpunkt festgestellt werden konnte und somit eine scherinduzierte Gelierung vorlag. Mit weiterer Frequenzzunahme stieg auch die Differenz zwischen G' und G'' , jedoch konnte durch die anschließende Messung bei abnehmender Frequenz gezeigt werden, dass dieser Gelzustand nur temporär und vollständig reversibel ist. Somit war es nicht möglich den Hydrogelator ohne Ausübung einer Scherung zu gelieren.

5. Zusammenfassung

Trotz moderner Transplantationstechniken und zahlreicher Kampagnen zum Thema Organ- spende sterben alleine in Deutschland jährlich mehr als 10000 Menschen, die auf den Wartelisten für Spenderorgane stehen, da Organe nicht in ausreichender Zahl zur Verfügung gestellt werden können. Des Weiteren existieren heutzutage immer noch sehr viele unheilbare Erkrankungen und nicht-therapierbare Unfallfolgen, die ebenfalls eine große Anzahl an Menschenleben fordern. Für beide Probleme können Stammzellen einen Lösungsansatz darstellen, da diese durch ihre einzigartigen Eigenschaften in der Lage sind, sowohl beschädigtes Gewebe zu regenerieren als auch neues Gewebe zu erschaffen.^[330] Diese Eigenschaften umfassen die Möglichkeit der Selbstregeneration und Differenzierung, die durch die Fähigkeit der symmetrischen und asymmetrischen Zellteilung hervorgerufen werden. Die Art der Zellteilung wird dabei maßgeblich von der biologischen Mikroumgebung der Stammzelle kontrolliert, wobei die extrazelluläre Matrix (EZM) als strukturelles Grundgerüst einen sehr wichtigen Einfluss auf das Stammzellverhalten hat und essentiell für das Überleben der Stammzelle ist. Somit werden für stammzelltherapeutische Ansätze leistungsfähige Biomaterialien als künstliche EZMs benötigt, die die Differenzierung und das Überleben der Stammzellen kontrollieren bzw. gewährleisten können und den zahlreichen Anforderungen entsprechen (Abb. 68). Hydrogele stellen dafür eine interessante Materialklasse dar, da diese bereits einige der notwendigen Eigenschaften mitbringen.



Abb. 68: Anforderungsprofil von künstlichen EZMs.

Die meisten für solche Anwendungen eingesetzten Hydrogele basieren dabei auf natürlichen Polymeren, die jedoch, z.B. durch mögliche Pathogenübertragung, einige entscheidende Nachteile aufweisen.

Daher sollte in dieser Arbeit ein vollsynthetisches Hydrogelsystem entwickelt werden, welches eine Plattform für stammzellbasierte Anwendungen bietet und dabei alle zuvor beschriebenen Anforderungen erfüllt. Allem voran stand in dieser Arbeit die Analysierbarkeit des Systems im Vordergrund. Dafür wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt, indem sowohl ein System auf Basis kovalent-vernetzter Hydrogele als auch ein Hydrogel, das über physikalische Wechselwirkungen vernetzt ist, entwickelt werden sollte.

Eine Problematik die chemische Gele mit sich bringen, ist deren Unlöslichkeit nach erfolgter Vernetzung, wodurch die Bestimmung der exakten Zusammensetzung durch lösungsmittelbasierte Analysemethoden, wie die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, erschwert werden. Vor diesem Hintergrund entwickelte HANSEN durch die Verwendung von *Bis*(acryloylcystamin) (BAC) als Vernetzer ein disulfidvernetztes Poly(acrylamid)-Hydrogel, welches aufgrund der Reversibilität der Thiol-Disulfid-Reaktion nach der Gelbildung gespalten werden kann.^[155] Des Weiteren können die reaktivgespaltenen Polymere durch eine Oxidation der Thiole wieder regeneriert werden.^[157] Da Polyacrylamide jedoch nicht hydrolysestabil sind und somit keine stabilen Geleigenschaften garantiert werden können, konnte dieses nicht für das herzustellende Hydrogelsystem verwendet.

Deshalb wurde im Zuge der Entwicklung des chemischen Hydrogels in Kapitel 3 zunächst ein Monomerscreening durchgeführt, wobei sich Acryloylmorpholin als geeignetes Monomer herausstellte. Im Folgenden wurde der Herstellungsprozess dahingehend optimiert, dass dieser sowohl einfach durchzuführen als auch reproduzierbar und skalierbar war (Abb. 69).

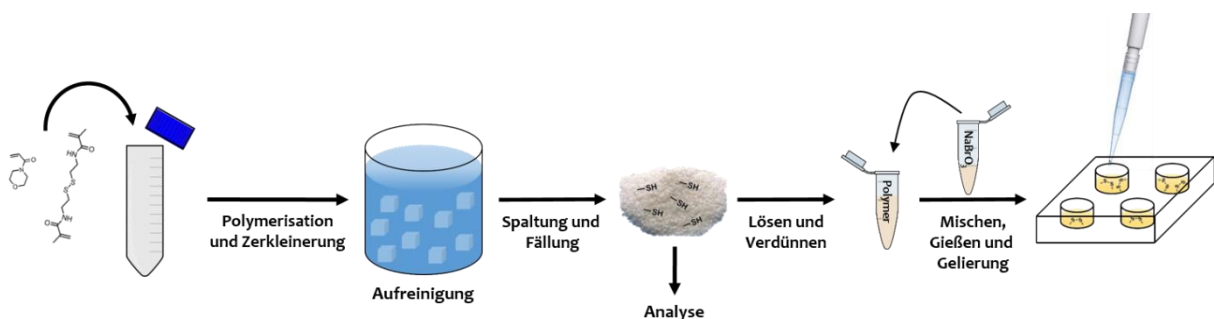


Abb. 69: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.

Nachdem die zunächst hergestellten Hydrogele verflüssigt worden waren und so lösliche Copolymere erzeugt werden konnten, wurden dessen Molmassen, deren Verteilung und die

Zusammensetzung analysiert, wobei eine sehr gute Übereinstimmung der theoretischen und ermittelten Zusammensetzung erreicht werden konnte. Im Anschluss daran wurden die Copolymere mittels NaBrO_3 regeliert und die entstandenen Hydrogele auf ihre Geleigenschaften untersucht. Zunächst wurde durch rheologische Messungen über einen Zeitraum von drei Wochen die Langzeitstabilität unter Zellkulturbedingungen validiert. Im Anschluss daran konnte gezeigt werden, dass durch die Variation der NaBrO_3 -Konzentration die Gelierungs- bzw. Verarbeitungszeit von ca. 10 min bis zu einer Stunde eingestellt werden konnte, ohne dabei die Steifigkeit des Hydrogels zu beeinflussen. Die Steifigkeit ließ sich hingegen durch die Anpassung der Copolymerkonzentration oder über den Vernetzeranteil kontrollieren, wodurch E-Moduli von 0,15 – 60 kPa erhalten wurden. Somit sollten die meisten Gewebearten von Säugtieren imitiert werden können, da deren Steifigkeiten in einem Bereich von 0,5 bis 100 kPa liegen.^[117] Anschließend wurden die optischen Eigenschaften in Form von Transparenz und Lichtdurchlässigkeit analysiert, wobei ebenfalls sehr gute Resultate erzielt werden konnten

Eine weitere wichtige Anforderung an Materialien, die in der Stammzellforschung eingesetzt werden, ist die Modifizierbarkeit mit bioaktiven Liganden und kationischen Gruppen. Diese Eigenschaft ist vor allem für vollsynthetische Hydrogele essentiell, da diese von Natur aus keinerlei biologische Aktivität aufweisen.^[68] Die Funktionalisierung des Hydrogels mit kationischen Gruppen wurde über die Copolymerisation von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumtriflat (TMAEA*OTf) mit AMor und BMAC realisiert. Dabei konnte ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung der theoretischen mit den ermittelten Zusammensetzungen erzielt werden. Im Anschluss daran sollten die Copolymere mit einem RGD-haltigen Peptid funktionalisiert werden, da diese bekannt sind einen positiven Einfluss auf das Zellverhalten auszuüben.^[219] Im Gegensatz zur TMAEA*OTf-Copolymerisation wurde hierbei auf einen polymeranalogen Ansatz zurückgegriffen, bei dem ein Teil der polymergebundenen Thiolgruppen mit einem maleimidfunktionalisierten RGD-Peptid in einer Thiol-Michael-Klickreaktion umgesetzt wurden. Dafür wurde zunächst das Peptid mit der Sequenz MIC-6Ahx-YGRGDS über die Fmoc-basierte Peptidfestphasensynthese hergestellt. Des Weiteren wurden Copolymere mit einem erhöhten Vernetzeranteil hergestellt, um den Verbrauch der Thiolgruppen durch die Immobilisierung des Peptids zu kompensieren. Die anschließende Peptidfunktionalisierung der Thiolgruppen konnte mit Kopplungseffizienzen von bis zu 98 % ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden, wodurch Copolymere mit einem RGD-Anteil von bis zu 4,9 mol% erhalten wurden.

Nachdem sowohl die Einstellbarkeit der mechanischen und chemischen Eigenschaften sowie deren Modifizierbarkeit für das Hydrogelsystem gezeigt werden konnten, wurden die biologischen Eigenschaften in Form von Zellkompatibilitätsexperimenten an HEK293-Zellen und mausembryonalen Stammzellen (mESCs) untersucht. Dafür musste jedoch zunächst eine geeignete Sterilisationsmethode entwickelt werden. Nach der Testung einiger verschiedener Methoden stellte sich eine 15-minütige UV-Bestrahlung als geeignet heraus, da diese sowohl effizient als auch zerstörungsfrei war. Im Anschluss daran wurde zunächst die Zellkompatibilität mittels HEK293-Zellen analysiert. Dazu wurden durch CellTiter-Glo[®] Assays die Zellviabilitäten in Abhängigkeit der Gelzusammensetzungen untersucht. Die Gelzusammensetzungen konnten aufgrund der Modularität des Systems durch Mischen der unterschiedlich funktionalisierten Copolymere variiert werden. Als Resultat der Zellexperimente konnten leicht erhöhte Zellviabilitäten bei dem Einsatz des kationischen TMAEA*OTf verzeichnet werden, dennoch ist der Einfluss der verschiedenen Funktionalisierungen auf die Zellviabilitäten der HEK293-Zellen insgesamt als gering einzuschätzen. Da das entwickelte Hydrogelsystem vor allem für Stammzellenanwendungen eingesetzt werden soll, wurden dafür stellvertretend mit mESCs die gleichen Zellexperimente durchgeführt. Dabei konnte im Gegensatz zu den HEK293-Zellen eine deutliche Abhängigkeit der Zellviabilitäten von den jeweiligen Funktionalitäten festgestellt werden. Vor allem TMAEA*OTf zeigte hier eine sehr positive Wirkung auf die Zellen und konnte die Zellviabilität der mESCs um bis zu 40 % steigern.

Zum Abschluss von Kapitel 3 wurden mit der Bioabbaubarkeit und der Ermöglichung von 3D-Zellanwendungen die letzten beiden ausstehenden Anforderungen adressiert. Um eine Anwendbarkeit in 3D-Zellexperimenten zu ermöglichen, war es aufgrund der Toxizität von NaBrO₃ notwendig, eine alternative Vernetzungsreaktion zu entwickeln. Durch die guten Erfahrungen mit der Thiol-Michael-Klickreaktion wurde dafür auf Poly(ethylenglykol)diacrylate (PEGDA) zurückgegriffen, die bereits zahlreich zur Vernetzung von thiolethylfunktionalisierten Polymeren eingesetzt wurden.^[263,264] So konnten durch den Einsatz von PEGDAs mit verschiedenen PEG-Kettenlängen erfolgreich Gele erhalten werden, welche E-Moduli von 0,15 kPa bis 140 kPa aufwiesen. Im Anschluss daran wurden die so hergestellten Hydrogele ebenfalls auf ihre Zellkompatibilität untersucht. Dabei konnte eine erhöhte Toxizität bei den PEGDA575-basierten Gelen festgestellt werden, wohingegen die PEGDA1000- bzw. PEGDA3500-Gele ähnliche Viabilitäten wie NaBrO₃ lieferten. Im letzten Unterkapitel wurde eine Methode zur Ermöglichung einer biologischen Abbaubarkeit des Hydrogels entwickelt, was in diesem Fall eine Verhinderung der Bioresorption durch die Erzeugung kurzer Polymerketten bedeutete, da Polyacrylate bzw. Polyacrylamide aufgrund ihres stabilen C-C-

Polymerrückgrates nicht vollständig abgebaut werden können. Um dies zu ermöglichen, sollten Esterfunktionalitäten in den Vernetzer eingebaut werden. Nachdem ein polymeranaloger Ansatz auf Basis der zuvor synthetisierten P(AMor-*co*-BMAC)-SH-Copolymere nicht erfolgreich war, wurde der ester- und disulfidmodifizierte Vernetzer *Bis*(2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandiylpropionat (BMADDP) entwickelt und mit AMor copolymerisiert, wobei wiederum übereinstimmende Zusammensetzungen erreicht werden konnten. Im Anschluss daran wurden die aus diesem Copolymer hergestellten Gele bezüglich ihrer Abbauraten bei verschiedenen pH-Werten untersucht. Aus den Ergebnissen wurde eine deutliche Zunahme der Abbauraten mit steigendem pH-Wert festgestellt, wobei Werte von 0,007 %/h bis hin zu 11,6 %/h gemessen werden konnten.

Nachdem die Hydrogelplattform auf Basis von chemisch-vernetzten Netzwerken entwickelt werden konnte, wurde in Kapitel 4 versucht, einen Hydrogelator zu synthetisieren, der ebenfalls allen Anforderungen entspricht. Nicht-kovalent vernetzte Hydrogele haben den Vorteil, dass diese für die Gelbildung keine evtl. toxischen Vernetzer benötigen. Das Design des in dieser Arbeit entwickelten Hydrogelators war an ein von MES *et al.* publiziertes physikalisches Hydrogel angelehnt, welches sich aus einem PEG mit 1,3,5-Benzoltricarboxamidendgruppen (BTA) zusammensetzt.^[308] Die Netzpunkte entstehen in diesem System durch die Aggregation der BTA-Motive, wobei diese durch die Verwendung von drei verschiedenen physikalischen Wechselwirkungen stabile helikale Strukturen ausbilden können.

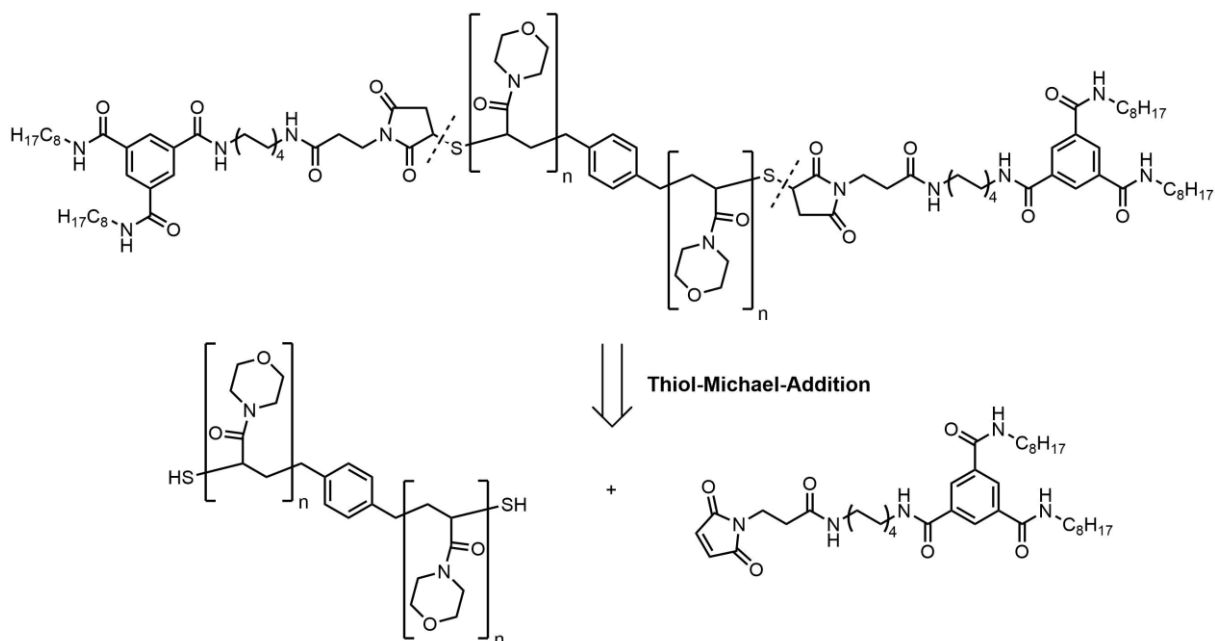


Abb. 70: Design des in dieser Arbeit hergestellten Hydrogelators.

Um jedoch eine Funktionalisierbarkeit des Systems zu ermöglichen, sollte das ursprünglich verwendete PEG-Polymer gegen ein α,ω -telecheles Poly(acryloylmorpholin), das endständige Thiolgruppen trägt, ausgetauscht werden. Die Anbindung des BTA-Motivs sollte anschließend über eine Thiol-Michael-Klickreaktion erfolgen, wofür zunächst ein maleimidfunktionalisiertes BTA-Motiv synthetisiert wurde (Abb. 70).

Das Motiv konnte ausgehend von 1,3,5-*Tris*(methoxycarbonyl)benzol über selektive Hydrolysen und verschiedene Amidkopplungsreaktionen erfolgreich hergestellt werden, wobei eine Gesamtausbeute von 18 % über sieben Stufen erreicht wurde. Im Anschluss daran wurde eine Synthese für das α,ω -telechele P(AMor) entwickelt, bei der auf die RAFT-Polymerisation als kontrollierte radikalische Polymerisationsmethode zur Gewährleistung der definierten Endgruppen zurückgegriffen wurde. Um die Anzahl an polymeranalogen Reaktion so gering wie möglich zu halten, wurde dafür mit EDA-CDP₂ (Abb. 71) ein bifunktionelles RAFT-Reagenz mit zwei Dodecyltrithiocarbonatendgruppen (DTTC-Endgruppen) hergestellt, welche nach erfolgter Polymerisation durch eine Aminolyse in die erforderlichen Thiolgruppen überführt werden können.

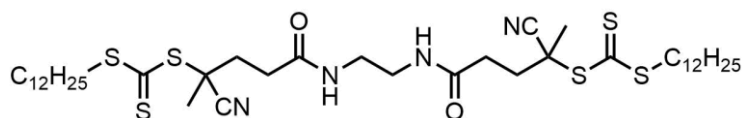


Abb. 71: EDA-CDP₂.

Die Synthese von EDA-CDP₂ erfolgte ausgehend von α,α' -Dibromxylen und erzielte eine Ausbeute von 25 %. Nach der erfolgreichen Herstellung des RAFT-Reagenzes wurde dieses zur Polymerisation von AMor eingesetzt, wobei P(AMor) mit einem Endgruppenfunktionalisierungsgrad von 100 % erhalten werden konnte. Durch die anschließende Abspaltung der Endgruppen mittels *n*-Butylamin wurden die DTTC-Gruppen quantitativ in Thiole überführt. Zum Abschluss der Hydrogelatorsynthese konnte das BTA-Motiv bei einem vollständigen Umsatz aller Thiolgruppen und mit einer Ausbeute von 97 % an HS-P(AMor)-SH immobilisiert werden und so die Hydrogelatorsynthese mit einer Gesamtausbeute 73 % ausgehend von der RAFT-Polymerisation von P(AMor) erfolgreich abgeschlossen werden.

Nachdem die Synthese des Hydrogelators etabliert werden konnte, sollten die kritische Gelierungskonzentration und die Geleigenschaften der entstehenden Hydrogele untersucht werden. Dafür wurden *tube inversion tests* mit verschiedenen Polymerkonzentrationen durchgeführt. Es konnte jedoch bei keiner Konzentration eine Gelbildung beobachtet werden, was höchstwahrscheinlich auf die LCST von P(AMor) bei 50 °C und der zur Aggregation der BTA-Motive

erforderlichen Temperatur von 70 °C zurückzuführen ist. Dennoch wurde zur rheologischen Untersuchung von BTA-P(AMor)-BTA ein Frequenztest an einer 20 %(w/v)-igen Polymerlösung durchgeführt, bei dem eine scherinduzierte Gelierung bei einer Frequenz von 30 Hz beobachtet werden konnte.

Obwohl über den Ansatz der physikalischen Vernetzung keine Hydrogele erhalten werden konnten, ist die Arbeit dennoch als erfolgreich anzusehen, da das zuvor beschriebene Hydrogelsystem, welches über kovalente Bindungen vernetzt wurde, alle an ein Material für zellbasierte Anwendungen gestellte Anforderungen erfüllt. Zusätzlich weist dieses System eine Modularität auf, wodurch in Zukunft der Aufbau einer Polymerbibliothek angestrebt werden sollte, um mit geringem Synthesaufwand maßgeschneiderte Hydrogele für die unterschiedlichsten Anwendungen herstellen zu können.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden an FT-NMR-Geräten der Firma BRUKER der Typen AVANCE-III HD (400 MHz und 600 MHz), DPX-300 (300 MHz), DRX-400 (400 MHz) und DRX-500 (500 Hz) und einem FT-NMR-Geräten der Firma AGILENT DD2 (500 MHz) bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Aufnahmen der NMR-Spektren bei 200 MHz wurde ein Mercury-Gerät der Firma VARIAN verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm ACD LABS 12.0 1D NMR Processor.

Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in *parts per million* (ppm) und die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Für die Angabe der Signalmultiplizitäten wurden die folgenden Abkürzungen verwendet:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, sxt = Sextett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, m = Multiplet, br. = breit.

Gelpermeationschromatographie

Die Molmassen und Dispersitäten wasserlöslicher Polymere wurden mit einem GPC-System der Firma PSS bestimmt. Diese bestand aus einem 1260 Infinity HPLC-System der Firma AGILENT TECHNOLOGIES, das mit drei Säulen der Firma PSS (NOVEMA Max 30 Å und 2 x NOVEMA Max 1000 Å) bestückt war. Als Eluent wurde 0,1 M NaNO₃ in bidestilliertem Wasser mit 0,01 % (w/v) TFA verwendet. Zur Kalibrierung wurde ein Pullulan-Kalibrierkit der Firma PSS verwendet.

Die Molmassen und PDIs DMF-löslicher Polymere wurden mit einer selbstgebauten GPC bestimmt. Als Eluent diente DMF (HPLC-Grade) + 5 g/L LiBr. Es wurde über zwei Säulen (PSS GRAM analytical 1000 Å und PSS GRAM analytical 30 Å) gemessen. Zur Kalibrierung wurde ein PMMA-Kalibrierkit der Firma PSS verwendet.

Für die Messungen wurden Proben mit einer Konzentration von 1-3 mg/mL angesetzt. Die Proben wurden vor der Messung mittels 0,2 µm Polypropylen-Spritzenvorsatzfilter (wasserlösliche Proben) bzw. 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter (DMF-lösliche Polymere) filtriert.

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Messungen und Transmissionsmessungen wurden mit einem UV/Vis-Spektrometer UV-6300PC der Firma VWR aufgenommen.

Rheologie

Die rheologischen Untersuchungen wurden mit einem Gemini advanced Rheometer der Firma BOHLIN INSTRUMENTS durchgeführt. Dabei wurde für das Platte-Platte-Messsystem eine Plattegeometrie (MALVERN INSTRUMENTS) mit 20 mm Durchmesser verwendet, wohingegen für das Kegel-Platte-System eine Kegelgeometrie mit einem Durchmesser von 40 mm und einem Winkel von 4° (MALVERN INSTRUMENTS) eingesetzt wurde.

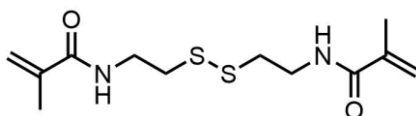
RP-HPLC

Die Aufreinigung des Peptids erfolgte mithilfe eines RP-HPLC-Systems der Firma KNAUER. Zur Aufreinigung wurde eine Vorsäule Eurosphere II 300-10 C18A und eine Säule Eurosphere II 100-10 C18 der Firma KNAUER eingesetzt. Als Eluent wurde ein Gradient aus H₂O und MeCN (+ je 0,1 % TFA) mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 mL/min verwendet.

6.2 Vorschriften des kovalent-vernetzten Hydrogelsystems

6.2.1 Synthese der P(AMor-co-BMAC)-SH-Copolymere

6.2.1.1 *N,N'*-Bis(methacryloylcystamin) (BMAC, 3)



12,44 g Cystamin Dihydrochlorid (55,24 mmol, 1 eq.) und 8,84 g NaOH (220,98 mmol, 4 eq.) wurden in 190 mL bidestilliertem Wasser (15 mL/g Cystamin) vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde eine Lösung aus 9,01 mL frisch destilliertem Methacryloylchlorid (10 g, 110,46 mmol, 2 eq.) in 10 mL DCM tropfenweise hinzugeben und die Reaktionslösung für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der entstandene Feststoff abfiltriert, sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. BMAC konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 19,09 g (69 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6,71$ (br. s, 2H, NH), 5,77 (s, 2H, HHCCCH₃), 5,37 (s, 2H, HHCCCH₃), 3,64 (q, $^3J = 5,2$ Hz, 4H, NHCH₂), 2,89 (t, $^3J = 6,4$ Hz, 4H, CH₂S), 1,97 ppm (s, 6H, CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 168,8$ (2C, CO), 139,4 (2C, HHCCCH₃), 120,3 (2C, HHCCCH₃), 38,7 (2C, NHCH₂), 37,6 (2C, CH₂S), 18,6 ppm (2C, CH₃).

6.2.1.2 Copolymerisation von AMor und BMAC

Die Synthese der Copolymere **P1-P6** wird exemplarisch an **P1** (96/4, AMor/BMAC) dargestellt. Die eingesetzten Mengen von **P2-P6** sind in Tabelle 20 gezeigt. 5,49 g 4-Acryloylmorpholin (38,88 mmol, 24 eq.) und 467,24 mg BMAC (1,62 mmol, 1 eq.) wurden in einem Zentrifugenröhrchen (50 mL, VWR) vorlegt, in 22,11 mL unstabilisiertem THF ([M] = 1,5 M) gelöst und für 20 min im Argonstrom entgast. Im Anschluss wurden 124,91 mg V-40 (0,41 mmol, 0,25 eq) zur Polymerisationslösung gegeben und für 12 h im Heizschrank bei 42 °C gelagert. Anschließend wurde das resultierende Gel in kleine Stücke (max. 4 x 4 mm) geschnitten und für zwei Tage in Wasser gequollen, wobei das Wasser dreimal täglich gewechselt wurde.

6.2.1.3 Spaltung der *in-situ*-vernetzten Hydrogele

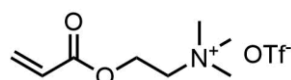
Die gequollenen Hydrogelstücke wurden sorgfältig filtriert, mit Wasser gespült und in einen Rundkolben überführt. Anschließend wurde DTT (5 eq. bezogen auf die eingesetzte Menge BMAC) in 2-5 mL Wasser gelöst und mit 2 M NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Nach Zugabe der Spalllösung wurde das Reaktionsgemisch unter einem permanenten Argonstrom solange gerührt, bis eine klare Lösung beobachtet werden konnte. Im Anschluss wurde die Lösung mittels 5 M HCl auf einen pH-Wert von 4 eingestellt und unlösliche Bestandteile über Filtration (Glasfaserfilter) entfernt. Danach wurde die Polymerlösung in einem 20-fachen Überschuss entgasten und angesäuerten *iso*-Propanol gefällt und im Vakuum getrocknet. Der Fällungsschritt wurde mit 1,4-Dioxan als Lösungsmittel und Diethylether als Fällungsmittel wiederholt. Abschließend wurde das Copolymer im Hochvakuum getrocknet und über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, Ellman's Assay und GPC analysiert.

Tabelle 20: Einwaagen zur Synthese von P2-P6.

Polymer	AMor/BMAC	m_{AMor}	m_{BMAC}	$m_{\text{V-40}}$	V_{THF}	m_{DTT}
P1	96/4	5,49 g	467,24 mg	124,91 mg	22,11 mL	1,25 g
P2	93,5/6,5	6,93 g	984,23 mg	162,92 mg	28,82 mL	2,63 g
P3	98/2	2,08 g	86,53 mg	46,26 mg	8,15 mL	231,38 mg
P4	94/6	1,99 g	259,58 mg	46,26 mg	8,23 mL	694,12 mg
P5	92/8	1,95 g	346,10 mg	46,26 mg	8,26 mL	925,50 mg
P6	90/10	1,91	432,63 mg	46,26 mg	8,30 mL	1,16 g

6.2.2 Synthese der P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*OTf)-SH-Copolymere

6.2.2.1 [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumtriflat (TMAEA*OTf, 11)



2,13 mL frisch destilliertes Dimethylaminoethylacrylat (2 g, 13,97 mmol, 1 eq.) wurden in 4 mL trockenem Toluol vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Im Anschluss wurde eine Lösung aus 1,76 mL Methyltriflat (2,64 g, 16,06 mmol, 1,15 eq.) in 3 mL trockenem Toluol langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden die Phasen getrennt und die Produktphase mit Toluol gewaschen. Nach der Trocknung im Hochvakuum konnte TMAEA*OTf als braune, hochviskose Flüssigkeit erhalten werden.

Ausbeute: 4,29 g (quantitativ)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ = 6,40 (dd, ³J = 1,5 Hz, ²J = 10 Hz, 1H, COCHCH₂), 6,22 (dd, ³J = 10 Hz, ²J = 20 Hz, 1H, COCHCHH), 6,04 (dd, ³J = 5 Hz; ²J = 10 Hz, 1H, COCHCHH), 4,58 – 4,52 ppm (m, 2H, OCH₂), 3,14 (s, 9H, N(CH₃)₃), 3,71 (p, ³J = 0,2 Hz, 2H, NCH₂),.

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆): δ = 164,9 (3C, CHCO), 132,5 (COCHCH₂), 127,9 (COCHCH₂), 63,8 (CH₂N(CH₃)₃), 58,1 (COCH₂), 52,9 ppm (3C, N(CH₃)₃).

6.2.2.2 Copolymerisation von AMor, BMAC und TMAEA*OTf

Die Synthese von **P7** und **P8** wurde (Tabelle 21) analog zu der in Kapitel 6.2.1.2 beschriebenen Prozedur mit kleinen Änderungen durchgeführt, indem TMAEA*OTf vor der Zugabe von AMor und BMAC in einem Siebteil der Gesamtlösungsmittelmenge DMSO gelöst wurde.

6.2.2.3 Spaltung der *in-situ*-vernetzten Hydrogele

Die Spaltung erfolgte, analog zu der in Kapitel 6.2.1.3 beschriebenen Vorschrift.

Tabelle 21: Einwaagen zur Synthese von P2-P6.

Polymer	AMor/BMAC /TMAEA	m_{AMor}	m_{BMAC}	m_{TMAEA}	$m_{\text{V-40}}$	$V_{\text{THF/DMSO}}^{\text{a}}$	m_{DTT}
P7	86/4/10	1,82 g	173,05 mg	460,92 mg	46,26 mg	8,38 mL	462,75 mg
P8	83,5/6,5/10	3,54 g	562,24 mg	921,84 mg	92,53 mg	16,85 mL	1,50 g

a) Verhältnis DMSO/THF 1:7.

6.2.3 Charakterisierung der Copolymere

6.2.3.1 ¹H-NMR-Spektroskopie

Die Bestimmung der Zusammensetzung der löslichen Copolymere über die ¹H-NMR-Spektroskopie erfolgte über den Vergleich der auf ein Proton normierten Integrale der für die Monomere charakteristischen Signale (Tabelle 22) nach Gl. 27.

Tabelle 22: Charakteristische Signale der einzelnen Monomere.

Monomer	Gruppe	Protonenanzahl	Bereich [ppm]
AMor	Morpholinring	8	3,10 - 3,90
BMAC	Methylgruppe Rückgrat	3	0,70 – 0,89
TMAEA*OTf	Methylgruppen Amin	9	3,38 – 3,52

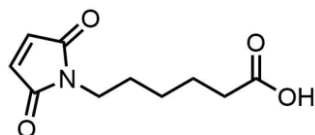
6.2.3.2 Ellman's Assay

Die Bestimmung der Thiolbeladung der Copolymere über den Ellman's Assay erfolgte über ein bereits publiziertes Protokoll.^[189] Dabei wurden in Triplikaten 125 μL einer Polymerstammlösung (1 mg/mL in entgastem 0,1 M PP8) mit 25 μL Ellman's-Lösung (DTNB, 4 mg/mL in 0,1 M PP8) gemischt und mit 1,25 mL entgastem 0,1 M PP8 aufgefüllt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurde die Extinktion der Probelösungen bei 412 nm gemessen und die

Thiolbeladung unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von $14150 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ berechnet.

6.2.4 Synthese der peptidfunktionalisierten Polymere

6.2.4.1 Maleimidocaprionsäure (MIC, 15)



Die Synthese von MIC erfolgte nach der Vorschrift von CHRISTMANN *et al.*^[230] mit leichten Modifikationen. Zunächst wurden 10 g Maleinsäureanhydrid (101,98 mmol, 1 eq.) und 13,51 g 6-Aminohexansäure (103,00 mmol, 1,01 eq) in 75 mL Eisessig gelöst und für 90 min zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel destillativ entfernt, wobei zur vollständigen Entfernung 4 x 25 mL Toluol eingesetzt wurde. Der Rückstand wurde in 100 mL Wasser aufgenommen und mit 3 x 100 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das entstandene Rohprodukt wurde aus EtOAc umkristallisiert und die Mutterlauge nach Filtration nochmals eingeeengt und filtriert. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde MIC als crèmefarbenes Pulver erhalten.

Ausbeute: 10,55 g (49 %)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 6,69$ (s, 2H, HCCH), 3,53 (t, $^3J = 7,3$ Hz, 2H, NCH_2), 2,35 (t, $^3J = 7,5$ Hz, 2H, CH_2CO), 1,57 - 1,71 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1,30 - 1,42 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): $\delta = 179,4$ (COOH), 170,9 (2C, NCO), 134,0 (2C, HCCH), 37,5 (NCH_2), 33,7 (CH_2CO), 28,2 (NCH_2CH_2), 26,1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 24,0 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$).

6.2.4.2 Peptidsynthese von MIC-6Ahx-YGRGDS (Pep-1, 16)

Beladung des 2-Chlortritylchlorid-Harzes (2-CTC)

2 g 2-CTC (1,7 mmol/g) wurden zunächst nach einem literaturbekannten Protokoll reaktiviert.^[331] Dabei wurde das Harz in einem ausgeheizten Peptidsynthesegefäß unter Argon vorgelegt, für 5 min in 10 mL DMF (5 mL/g Harz) gequollen und mit 3 x 20 mL DCM (10 mL/g Harz) gewaschen. Im Anschluss daran wurden 0,34 mL frisch destilliertes

Thionylchlorid (0,1 mL/mmol Harz) in 20 mL DCM (10 mL/g Harz) zugegeben und für 1 h geschwenkt. Danach wurde das Harz filtriert und mit 2 x 20 mL DMF (10 mL/g Harz) und 3 x 20 mL DCM (10 mL/g Harz) gewaschen.

Zur Beladung mit Serin wurden 3,68 g Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH (10,20 mmol, 3 eq.) in 20 mL trockenem DCM (10 mL/g Harz) gelöst und zum Harz gegeben. Anschließend wurden 2,72 mL DIPEA (15,99 mmol, 5 eq.) zur Reaktionslösung gegeben. Nach 5 min Schwenken wurden wiederum 1,36 mL DIPEA (7,99 mmol, 2,5 eq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für 1 h geschwenkt. Danach wurden 1,6 mL MeOH (0,8 mL/g Harz) hinzugegeben und für 15 min geschwenkt. Nach der Filtration des Harzes wurde dieses mit 3 x 20 mL DCM (10 mL/g Harz), 2 x 20 mL DMF (10 mL/g Harz), 2 x 20 mL DCM (10 mL/g Harz) und 3 x 20 mL MeOH (10 mL/g Harz) für je 1 min gewaschen. Nach der Trocknung des Harzes im Hochvakuum wurde die Beladung über die Fmoc-Abspaltung bestimmt. Dafür wurden 5 - 10 mg des Harzes in einem Eppendorfgefäß mit 1 mL einer 20 % (v/v) Piperidin/DMF-Lösung überschichtet und für 20 min geschwenkt. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert und 100 µL des Überstandes mit 10 mL DMF verdünnt. Im Anschluss wurde die Extinktion der erhaltenen Lösung bei 301 nm gemessen und die Beladung über das LAMBERT-BEER'SCHE-Gesetz berechnet, wobei eine Beladung von 0,95 mmol/g erreicht werden konnte.

Kopplung der Aminosäuren

Das trockene Harz wurde zunächst in 5 x 20 mL DCM (10 mL/g Harz, 1 min) und 5 x 20 mL DMF (10 mL/g Harz, 1 min) gequollen. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe durch Zugabe von 20 mL einer Spaltlösung (50 (v/v)% Piperidin in DMF/DCM 1:1, 10 mL/g Harz) entfernt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde das Harz filtriert und mit 2 x 20 mL DMF (10 mL/g Harz, 1 min) gewaschen. Die Kopplung der Aminosäure (AS) erfolgte durch die Zugabe von 3 eq. der Fmoc- und Seitenketten-geschützten AS (Tabelle 23), welche zuvor in 10 mL DMF gelöst wurde. Des Weiteren wurden 3 eq. HBTU als Feststoff hinzugeben und mit 5,7 mL DMF suspendiert. Anschließend wurden 6 eq. DIPEA, 3 eq HOBt und 11,4 mL DMF hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 1 h geschwenkt. Im Anschluss wurde das Harz filtriert und mit 5 x 40 mL DMF (20 mL/g Harz, 1 min) und 5 x 40 mL DCM (20 mL/g Harz, 1 min) gewaschen. Danach wurde das Harz für die nächste Entschützung mit 2 x 20 mL DMF (10 mL/g Harz, 1 min) konditioniert oder im Hochvakuum getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 23: Einwaagen der einzelnen Aminosäuren

Aminosäure	Einwaage
MIC	1,21 g
Fmoc-6-Ahx-OH	2,02 g
Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH	2,62 g
Fmoc-Gly-OH	1,70 g
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	3,70 g
Fmoc-Gly-OH	1,70 g
Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	2,35 g

Abspaltung vom Harz und Aufreinigung

Nachdem die Kopplung aller Aminosäuren abgeschlossen wurde, erfolgte die Abspaltung und simultane Entschützung der AS-Seitenketten des Peptids. Dazu wurde das getrocknete Harz mit 20 mL (10 mL/g Harz) einer Spaltlösung bestehend aus TFA, Phenol, TIPS und Wasser (88:5:2:5) versetzt und für 2 h geschwenkt. Anschließend wurde die TFA-Peptid-Mischung abfiltriert und das Harz mit 2 – 4 mL TFA gespült. Die vereinigten TFA-Phasen wurden in -20 °C kaltem Et₂O gefällt und für 10 min bei -78 °C gelagert. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert, der Überstand verworfen und der zurückbleibende Feststoff drei Mal mit -20 °C kaltem Et₂O gewaschen. Der Rückstand wurde im Hochvakuum getrocknet, über eine präparative RP-HPLC aufgereinigt und abschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 1,70 g (93 %)

LCMS (ESI): m/z berechnet für C₄₂H₆₁N₁₁O₁₅ ([H⁺]) 960,4349 gefunden 960,5413.

6.2.4.3 Funktionalisierung von P2 und P8

Zur Peptidfunktionalisierung wurden 2,5 mol% (0,332 mmol/g) des Gesamtanteils an BMAC der Copolymere **P2** oder **P8** mit **Pep-1** umgesetzt. Dazu wurden 500 mg **P2** (0,166 mmol SH) in 2,5 mL Milli-Q-Wasser gelöst, mit einer 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 6,5 – 7 eingestellt und mit Argon entgast. Anschließend wurden 159,1 mg **Pep-1** (0,166 mmol) in 0,83 mL entgastem Milli-Q-Wasser gelöst und zur Copolymerlösung hinzugegeben. Nach 24-stündigem Rühren konnte **P2-RGD** nach Ausfällen in angesäuertem, entgastem IPA erhalten werden.

Ausbeute: 573,42 mg (87 %)

6.2.5 Regelung

Es wurde eine Copolymerlösung in 0,01 M PBS (pH 7,4) mit der entsprechenden Konzentration hergestellt, wobei zunächst nicht die komplette Menge an PBS verwendet wurde. Nachdem der pH-Wert der Copolymerlösung auf 7,4 eingestellt wurde, wurde die restliche Menge an PBS hinzugegeben. Anschließend wurde das erforderliche Volumen einer 2 M NaBrO₃-Lösung (0,33 eq – 1 eq. bezogen auf die Thiolmenge) hinzugefügt und schnell verarbeitet. Nach kurzem, intensivem Vermischen (Vortex) wurde die Lösung in die gewünschte Form pipettiert und abgedeckt für mindestens 12 h regeliert. Im Anschluss daran wurden die Gele vorsichtig aus der Form gelöst und für 2 – 3 Tage in 0,01 M PBS (pH 7,4) gelagert.

6.2.6 Charakterisierung der Geleigenschaften

Die Proben wurden in Triplikaten in einer zylindrischen Form (20 x 2 mm) nach der in Kapitel 6.2.5 beschriebenen Vorschrift hergestellt.

6.2.6.1 Bestimmung des Quellwertes und E-Moduls

Die zuvor hergestellten Proben wurden nach der vollständigen Quellung gewogen und der Quellwert über Gl. 22 berechnet. Dieselben Proben wurden anschließend bei einer Frequenz von 1 Hz, 1 % Deformation und einer Temperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 3 min mittels des Platte-Platte-Systems rheologisch vermessen.

6.2.6.2 Bestimmung der Gelierungszeit

Es wurden 5,3 mL einer 12 % (w/v)-igen **P1**-Copolymerlösung (636 mg in 5,3 mL 0,01 M PBS) hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Copolymerlösung durch Zugabe von 0,01 M PBS auf eine Konzentration von 10 % (w/v) gebracht und mit der entsprechenden Menge einer 2 M NaBrO₃-Lösung vermischt (Tabelle 24). Im Anschluss wurden 1,15 mL der jeweiligen Gelierungslösung auf das Rheometer aufgegeben und bei 25 °C vermessen. Für die Messungen wurde das Kegel-Platte-Messsystem bei einer Deformation von 0,2 % und einer Frequenz von 1 Hz eingesetzt. Der Gelierungspunkt wurde aus dem Schnittpunkt von G' und G'' ermittelt.

Tabelle 24: Zusammensetzungen der Gelierungslösungen für die kinetischen Untersuchungen.

NaBrO ₃ [eq.] ^a	P1-Lösung ^b [μL]	2 M NaBrO ₃ [μL]	PBS [μL]
0,165	1041,7	5,6	202,7
0,33	1041,7	11,2	197,1
0,495	1041,7	16,8	191,5
0,66	1041,7	22,4	185,9
0,83	1041,7	28,2	180,1
1	1041,7	34,0	174,3

a) Äquivalente bezogen auf die Thiolmenge, b) 12 % (w/v).

6.2.7 Zelltests

6.2.7.1 Präparation und Sterilisation der Zellkulturplatten

Es wurden 10 % (w/v)-ige Stammlösungen der einzelnen Copolymere hergestellt und in den entsprechenden Verhältnissen zur Einstellung der einzelnen Anteile gemischt. Nach der Zugabe von NaBrO₃ (2 M in 0,01 M PBS, pH 7,4, 1 eq. bezogen auf die Thiolmenge) wurden nach intensiver Mischung jeweils 90 μL der Gelierungslösung pro *well* (96-well-Platte) pipettiert und die Platten über Nacht steril gelagert. Nach erfolgter Gelierung wurden die Gele mittels einer UV-Lampe (254 nm, 15 min) sterilisiert und anschließend über 3 Tage mit sterilem PBS-Puffer (0,01 M, pH 7,4) gewaschen.

6.2.7.2 Zellkultur und CellTiter-Glo® Assay

HEK293-Zellen

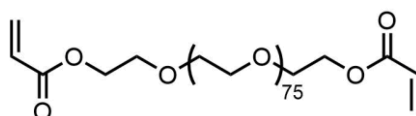
Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte über 24 h bei einer Temperatur von 37 °C und einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre. Dafür wurden 10000 HEK293-Zellen in sterilem DMEM + 10 % fetalem Kälberserum (FBS) auf die zuvor präparierten Gele gegeben und für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurde der ATP-Gehalt über den CellTiter-Glo® Assay ermittelt. Dabei wurden nach der Aspiration des Mediums die Zellen lysiert und 20 μL des Zelllysats in eine 384-well-Platte transferiert. Danach wurden jeweils 20 μL des CellTiter-Glo®-Reagenzes dazugegeben und die Platte für 15 – 20 min inkubiert. Nach Zentrifugation wurde über die Lumineszenz die Zellviabilität bestimmt.

mESCs-Zellen

Die Experimente mit den mESCs wurden analog zu denen der HEK293-Zellen durchgeführt, jedoch wurden dem Zellmedium zusätzlich Glutamax (1 %), nicht-essentielle Aminosäuren (1%), Penicillin-Streptomycin (1 %) und β -Mercaptoethanol (0,1 nM) hinzugefügt. Des Weiteren wurden die Zellviabilitäten sowohl vor als auch nach der Aspiration des Mediums bestimmt.

6.2.8 Synthese der PEGDA-vernetzten Hydrogele

6.2.8.1 PEGDA3500 (21)



0,96 mL frisch destilliertes Acryloylchlorid (1,06 g, 11,73 mmol, 4 eq.) wurden in 20 mL trockenem DCM vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 10 g PEG3400 (2,93 mmol, 1 eq.) und 1,63 mL TEA (1,19 g, 11,73 mmol, 4 eq.) in 40 mL trockenem DCM gelöst und langsam hinzuge tropft. Nach 24-stündigem Rühren wurde die Reaktionslösung über basischem Aluminiumoxid filtriert und das Filtrat auf das halbe Volumen eingeeengt. Danach wurde der Rückstand in kaltem Et₂O gefällt und zentrifugiert. Nach der Trocknung im Hochvakuum bei 40 °C konnte PEGDA3500 als weißer Feststoff erhalten werden.

Ausbeute: 10,30 g (quantitativ)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6,45 - 6,41 (m, 2H, COCHCH₂), 6,20 - 6,12 (m, 2H, COCHCHH), 5,87 - 5,81 (m, 2H, COCHCHH), 4,35 - 4,29 (m, 4H, COOCH₂), 3,76 - 3,73 (m, 4H, COOCH₂CH₂), 3,69 - 3,58 ppm (m, 300H, O(CH₂)₂O).

6.2.8.2 Gelierung mit PEGDA

Die Präparation der PEGDA-Gele erfolgte gemäß der in Kapitel 6.2.5 beschriebenen Vorschrift. Es wurde eine 36 % (w/v)-ige **P1**-Lösung als PolymerstammLösung eingesetzt. Die jeweiligen verwendeten Mengen sind in Tabelle 25 dargestellt.

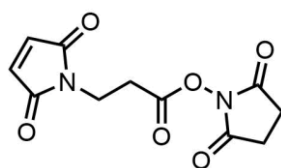
Tabelle 25: Eingesetzte Mengen zur Herstellung von drei 0,5 mL-PEGDA-Gelen.

PEGDA	c_{P1}^c [%(w/v)]	P1-Lösung [μ L]	PEGDA ^d [μ L]	PBS ^d [μ L]	PEGDA ^e [μ L]	PBS ^e [μ L]
575 ^a	7,5	333,3	130,6	1136,1	65,3	1201,4
	10	444,4	174,1	981,5	87,0	1068,5
	15	666,7	261,1	672,2	130,6	802,8
	20	888,9	348,2	363,0	174,1	537,0
1000 ^a	7,5	333,3	130,6	1136,1	65,3	1201,4
	10	444,4	174,1	981,5	87,0	1068,5
	15	666,7	261,1	672,2	130,6	802,8
	20	888,9	348,2	363,0	174,1	537,0
3500 ^b	7,5	333,3	261,1	1005,5	130,6	1136,1
	10	444,4	348,2	807,4	174,1	981,5
	15	666,7	522,2	411,1	261,1	672,2
	20	888,9	696,3	14,8	348,2	363,0

a) Konzentration PEGDA-Stammlösung = 0,5 M, b) Konzentration PEGDA-Stammlösung = 0,25 M, c) Konzentration P1-Stammlösung = 36 %(w/v), d) 1 eq. PEGDA bezogen auf Thiolmenge; e) 0,5 eq. PEGDA bezogen auf Thiolmenge.

6.2.9 Synthese der esterfunktionalisierten Hydrogele

6.2.9.1 Maleimidopropionsäure-*N*-succinimidat (MIP-NHS, 26)



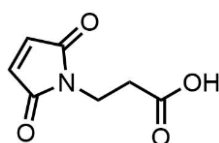
5,50 g Maleinsäureanhydrid (56,12 mmol, 1 eq.) wurden in 30 mL DMF gelöst, mit 5,00 g β -Alanin (56,12 mmol, 1 eq.) versetzt und die Reaktionslösung für 2 h gerührt. Im Anschluss wurde das Gemisch auf 0 °C abgekühlt und 4,20 g *N*-Hydroxysuccinimid (69,03 mmol, 1,23 eq.) und 21,52 g EDC·HCl (112,24 mmol, 2 eq.) hinzugegeben. Nach 5 min wurde das Eisbad entfernt und über Nacht gerührt. Danach wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat auf Eis gegossen. Der ausgefallene Feststoff wurde ebenfalls abfiltriert. Die Feststoffe wurden vereint in DCM aufgenommen und mit 1 M HCl (3 x 30 mL) gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde MIP-NHS als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,57 g (26 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,73$ (s, 2H, HCCH), 3,92 (t, ³J = 6,9 Hz, 2H, NCH₂), 3,01 (t, ³J = 7 Hz, 2H, CH₂CO), 2,82 ppm (s, 4H, COCH₂CH₂CO).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 170,6$ (2C, CHCON), 170,0 (2C, CH₂CON), 166,8 (CH₂COO), 134,7 (2C, HCCH), 32,7 (NCH₂), 29,0 (CH₂COO), 25,4 ppm (2C, COCH₂CH₂CO).

6.2.9.2 Maleimidopropionsäure (MIP, 28)



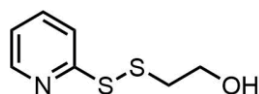
Die Synthese wurde mit 9,18 g β -Alanin (102 mmol, 1 eq.) analog zu der in Kapitel 6.2.4.1 beschriebenen Vorschrift durchgeführt.

Ausbeute: 5,56 g (32 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 6,73$ (s, 2H, HCCH), 3,84 (t, ³J = 7,2 Hz, 2H, NCH₂), 2,71 ppm (t, ³J = 7,3 Hz, 2H, CH₂CO).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): $\delta = 176,5$ (CH₂COO), 170,3 (2C, CHCON), 134,2 (2C, HCCH), 33,2 (NCH₂), 32,5 ppm (CH₂COO).

6.2.9.3 2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol (PDE, 31)



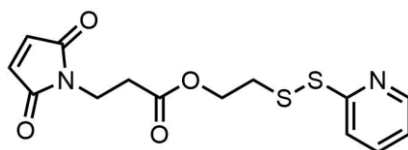
2 g Aldrithiol (9,08 mmol, 1 eq.) wurden in 20 mL MeOH gelöst und mit 1,2 mL Essigsäure versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus 317 μ L β -Mercaptoethanol (354,7 mg, 4,54 mmol, 0,5 eq.) in 8 mL MeOH tropfenweise hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/Ethylacetat=3:2; $R_f = 0,21$).

Ausbeute: 566 mg (67 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8,46 – 8,42 (m, 1H, NCH), 7,85 – 7,79 (m, 2H, CCHCH), 7,25 – 7,21 (m, 1H, NCHCH), 5,02 (t, ³*J* = 5,5 Hz, 1H, OH), 3,62 (q, ³*J* = 6,5 Hz 2H, CH₂OH), 2,91 ppm (t, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, SCH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 159,5 (NCS), 149,5 (NCH), 137,8 (CCHCH), 121,1 (NCHCH), 119,3 (CCH), 59,1 (CH₂OH), 41,2 ppm (SCH₂).

6.2.9.4 2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl-ethyl-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat (MIP-PDE, 27)

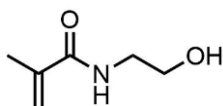


500 mg MIP (2,96 mmol, 1 eq.) wurden in 15 mL DCM vorgelegt, mit 1,72 mL frisch destilliertem Thionylchlorid (2,81 g, 23,65 mmol, 8 eq.) und einem Tropfen DMF versetzt und über Nacht zum Rückfluss erhitzt. Im Anschluss wurde das überschüssige Thionylchlorid im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 3 mL trockenem DCM aufgenommen. Zu diesem Gemisch wurde bei 0 °C eine Lösung aus 549 mg PDE (2,93 mmol, 1,1 eq.) und 406 μ L Triethylamin (296,5 mg, 2,93 mmol, 1,1 eq.) in 5 mL DCM tropfenweise hinzugegeben, die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Danach wurde das Reaktionsgemisch nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (2 x 10 mL), 1 M HCl-Lösung (3 x 10 mL) sowie Wasser (1x 10 mL) gewaschen und die organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer sowie im Hochvakuum entfernt worden war, konnte MIP-PDE als schwarzes hochviskoses Öl erhalten werden.

Ausbeute: 376 mg (42 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8,52 – 8,47 (m, 1H, NCH), 7,74 – 7,67 (m, 2H, CCHCH), 7,18 – 7,12 (m, 1H, NCHCH), 6,71 (s, 2H, HCCH), 4,34 (t, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, NCH₂), 3,82 (t, ³*J* = 7,1 Hz, 2H, OCH₂), 3,05 (t, ³*J* = 6,4 Hz, 2H, SCH₂), 2,63 ppm (t, ³*J* = 6,8 Hz, 2H, COCH₂).

6.2.9.5 Hydroxyethylmethacrylamid (HEMAm, 35)



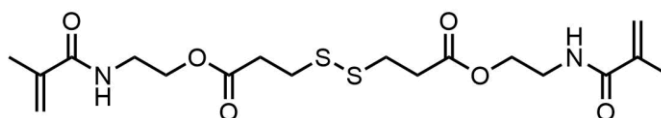
6,42 mL frisch destilliertes Methacryloylchlorid (7 g, 66,96 mmol, 1 eq.) wurden in 70 mL DCM gelöst und zu einer Lösung aus 8,02 mL Ethanolamin (8,18 g, 133,93 mmol, 2 eq.) in 130 mL DCM bei 0 °C hinzugeetropt. Nach zweistündigem Rühren wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht weitergerührt. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der ölige Rückstand wurde zu einer Suspension aus basischem Aluminiumoxid in 100 mL DCM hinzugefügt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach dem Abfiltrieren des Aluminiumoxids wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer sowie am Hochvakuum entfernt. HEMA_m wurde als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: 5,28 g (61 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6,69 (br. s, 1H, NH), 5,73 (s, 1H, CH₃CHH), 5,36 – 5,32 (m, 1H, CH₃CHH), 3,72 (t, ³J = 1 Hz, 2H, CH₂OH), 3,66 (br. s, 1H, OH), 3,45 (q, ³J = 5,2 Hz, 2H, NHCH₂), 1,98 – 1,91 ppm (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 169,6 (CO), 139,4 (CH₂CCH₃), 120,3 (CCH₂), 61,8 (CH₂OH), 42,5 (NHCH₂), 18,5 ppm (CH₃).

6.2.9.6 Bis(2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandiylpropionat (BMADPP, 32)



4,07 g 3,3'-Dithiopropionsäure (19,36 mmol, 1 eq.) wurden mit 7,02 mL frisch destilliertem Thionylchlorid (11,51 g, 96,78 mmol, 5 eq.) und einem Tropfen DMF für 3 h zum Rückfluss (75 °C) erhitzt. Anschließend wurde das Thionylchlorid im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 40 mL trockenem DCM aufgenommen. Diese Lösung wurde dann tropfenweise zu einem gekühlten Gemisch (0 °C) aus 5,25 g HEMA_m (40,62 mmol, 2,1 eq.) und 4,67 mL Pyridin (4,59 g, 58,02 mmol, 3 eq.) in 100 mL trockenem DCM hinzugegeben. Nach der vollständigen Zugabe wurde das Eisbad entfernt und über Nacht gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (3 x 90 mL), 1 M HCl-Lösung (3 x 90 mL)

sowie mit VE-Wasser (2 x 90 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde BMADPP als brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7,24 g (84 %)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6,37 (br. s, 2H, NH), 5,71 (s, 2H, CH₃CHH), 5,35 (s, 2H, CH₃CHH), 4,25 (t, ³J = 1 Hz, 4H, OCH₂), 3,59 (q, ³J = 5,5 Hz, 4H, NHCH₂), 2,93 (t, ³J = 1 Hz, 4H, SCH₂), 2,76 (t, ³J = 7 Hz, 4H, COCH₂), 1,96 ppm (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171,8 (2C, COO), 168,5 (2C, CONH), 139,6 (2C, CH₃CCH₂), 120,0 (2C, CH₃CCH₂), 63,5 (2C, OCH₂), 38,9 (2C, NHCH₂), 33,9 (2C, COCH₂), 33,1 (2C, SCH₂), 18,6 ppm (2C, CH₃).

6.2.9.7 Synthese und Charakterisierung von P(AMor-co-BMADPP)-SH

P(AMor-co-BMADPP)-SH wurde entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 6.2.1 durch die Copolymerisation von AMor und BMADPP hergestellt. Und analog zu den P(AMor-co-BMAC)-Copolymeren charakterisiert.

6.2.10 Abbauxperimente der P(AMor-co-BMADPP)-Hydrogele

Es wurden zur Untersuchung des Abbaus bei den einzelnen pH-Werten jeweils drei Gelproben (Kapitel 6.2.5) hergestellt und im jeweiligen Puffer (Tabelle 26) gelagert. Im Anschluss wurden in bestimmten Abständen der Speichermodul und der Quellwert der Proben bestimmt.

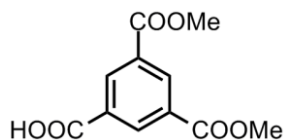
Tabelle 26: Zusammensetzungen der Pufferlösungen.

Puffersystem	pH	Zusammensetzung	
NaOAc/AcOH	5	64 mL 0,01 M NaOAc	36 mL 0,01 M AcOH
PP8 ^b	8	94 mL 0,01 M K ₂ HPO ₄	6 mL 0,01 M KH ₂ PO ₄
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	9	10 mL 0,01 M Na ₂ CO ₃	90 mL 0,01 M NaHCO ₃

6.3 Vorschriften des physikalisch-vernetzten Hydrogelsystems

6.3.1 Synthese des BTA-Motivs

6.3.1.1 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäure (41)



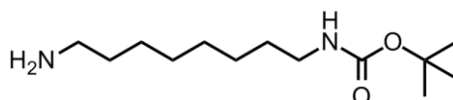
In einem 1 L Einhalskolben wurden 7 g 1,3,5-*Tris*(methoxycarbonyl)benzol (27,75 mmol, 1 eq.) in 700 mL MeOH suspendiert. Anschließend wurden 25,12 mL einer 1 M NaOH-Lösung (25,12 mmol, 0,91 eq.) hinzugegeben und 22 h gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde das MeOH entfernt und der Rückstand in 1 L gesättigter NaHCO₃-Lösung aufgenommen und mit 500 mL DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit konz. HCl auf pH 2 (ca. 120 mL) eingestellt und zwei Mal mit je 500 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und der entstehende Feststoff getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus siedendem Wasser (50 mL/g) umkristallisiert und anschließend im Hochvakuum getrocknet. 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäure (22) wurde als weißer, feinpulvriger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,17 g (55 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 11,43 (br. s, 1H, COOH), 8,93 (s, 3H, CH), 4,01 ppm (s, 6H, CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 170,3 (COOH), 165,2 (2C, COOCH₃), 135,4 (CHCCOOCH₃), 135,1 (2C, CHCCOOH), 131,4 (2C, CHCCOOCH₃), 130,3 (CHCCOOH), 53,2 ppm (3C, CH₃).

6.3.1.2 Mono-*tert*-butoxycarbonyl-1,8-diaminooctan (44)



In einem 100 mL Einhalskolben wurden 1,32 g Diaminooctan (9,16 mmol, 1 eq.) in 40 mL CHCl₃ vorgelegt. Anschließend wurde eine Lösung aus 1 g Boc₂O (0,5 eq., 4,58 mmol) in 10 mL CHCl₃ langsam dazugetropft und über Nacht gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel

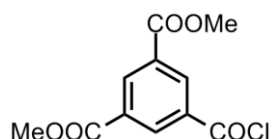
entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt. Dazu wurde ein Gradient von $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95:5 nach $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ 89:10:1 verwendet. Das Mono-*tert*-butoxycarbonyl-1,8-diaminooctan wurde als farbloser bis leicht gelblicher Feststoff erhalten.

Ausbeute: 844 mg (75 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 4,56 (br. s, 1H, NH), 3,08 (t, 3J = 6,5 Hz, 2H, CH_2NH), 2,73 - 2,67 (m, 2H, NH_2CH_2), 1,96 (br. s, 2H, NH_2) 1,55 - 1,35 (m, 13H, CH_3 ; $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 1,35 - 1,26 ppm (m, 8H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2$).

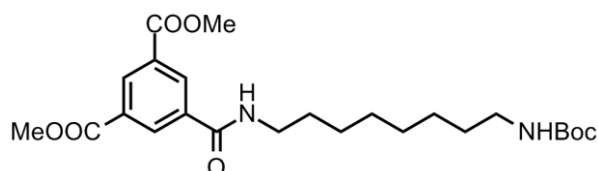
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ = 78,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42,0 (NH_2CH_2), 40,6 (CH_2NH), 30,0 ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 29,3 (2C, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 28,4 (3C, CH_3), 26,7 ppm (2C, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$).

6.3.1.3 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäurechlorid (42)



In einen 250 mL SCHLENK-Kolben mit Rückflusskühler wurden 3,5 g 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäure (14,69 mmol, 1 eq.) in 50 mL trockenem DCM unter Schutzgasatmosphäre vorgelegt. Anschließend wurden 1,89 mL Thionylchlorid (3,1 g ,22,04 mmol, 1,5 eq.) und 10 Tropfen DMF dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2,5 h zum Rückfluss erhitzt. Danach wurde das Lösungsmittel und der Überschuss an Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung und Analytik direkt eingesetzt. 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäurechlorid entsteht als leicht gelblicher Feststoff.

6.3.1.4 3,5-Methoxycarbonyl-*tert*-butyl-(8-benzamidoctyl)carbammat (45)



In einen 250 mL SCHLENK-Kolben mit Tropftrichter wurden 3,77 g 3,5-Methoxycarbonylbenzoesäurechlorid (14,69 mmol, 1 eq.) in 50 mL trockenem CHCl_3 vorgelegt. Es wurde eine Lösung aus 4,31 g Mono-*tert*-butoxycarbonyl-1,8-diaminooctan (17,63 mmol, 1,2 eq.) und 4,07 mL Triethylamin (2,95 g, 29,38 mmol, 2 eq.) in 100 mL trockenem CHCl_3 über 30 min

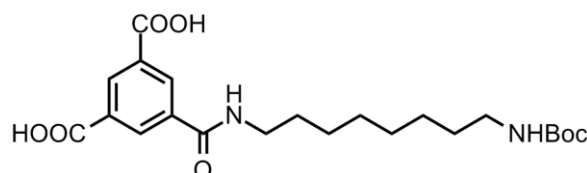
hinzugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für 18 h gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CHCl₃/MeOH 95:5). 3,5-Methoxycarbonyl-*tert*-butyl-(8-benzamidoctyl)carbammat wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 6,44 g (94 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8,76 (t, ⁴*J* = 1,6 Hz, 1H, CHCCOOCH₃), 8,60 (d, ⁴*J* = 1,5 Hz, 2H, CHCCONH), 6,49 (br. s, 1H, CCONH), 4,54 (br. s, 1H, NHCOO), 3,96 (s, 6H, COOCH₃), 3,50 - 3,43 (m, 2H, CCONHCH₂), 3,08 (t, ³*J* = 7,1 Hz, 2H, CH₂NHCOO), 1,63 (quin, ³*J* = 7,1 Hz, 2H, CCONHCH₂CH₂), 1,50 - 1,26 ppm (m, 19H, C(CH₃)₃; CH₂CH₂NHCOO; CH₂(CH₂)₄CH₂CH₂NHCOO).

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 165,5 (4C, CO), 135,7 (COOCCHCOO), 133,0 (CCONH), 132,0 (2C, CHCCONH), 131,1 (2C, CCOOCH₃), 52,6 (2C, COOCH₃), 40,3 (2C, CCONHCH₂; CH₂NHCOO), 29,5 (CCONHCH₂CH₂), 29,1 (CH₂CH₂NHCOO), 28,4 (3C, C(CH₃)₃), 26,8 (2C, CH₂CH₂CH₂NHCOO; CCONHCH₂CH₂CH₂), 26,6 ppm (2C, CCONHCH₂CH₂CH₂(CH₂)₂).

6.3.1.5 5-((8-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)octyl)carbamoyl)isophthalsäure (46)



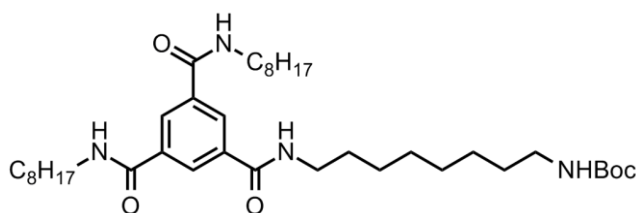
In einen 1 L Einhalskolben wurden 5 g 3,5-Methoxycarbonyl-*tert*-butyl-(8-benzamidoctyl)carbammat (10,76 mmol, 1 eq.) in 750 mL MeOH vorgelegt. Anschließend wurden 1,03 g Lithiumhydroxid (43,05 mmol, 4 eq.) und 12,5 mL H₂O dazugegeben und die Reaktionsmischung für 18 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in 800 mL H₂O aufgenommen. Die wässrige Phase wurde solange mit 1 M HCl versetzt, bis ein pH von 2 erreicht wurde. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, getrocknet und anschließend in 250 mL MeOH aufgenommen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde aus EtOAc umkristallisiert. 5-((8-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)octyl)carbamoyl)isophthalsäure (**26**) entstand als farbloser Feststoff.

Ausbeute: 3,77 g (80 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ = 13,40 (br. s, 2H, COOH), 8,63 (d, ⁴J = 1,5 Hz, 2H, CHCCONH), 8,57 (t, ⁴J = 1,5 Hz, 1H, CHCCOOH), 6,74 (t, ³J = 5,8 Hz, 1H, CCONH), 3,26 (q, ³J = 6,8 Hz, 2H, CCONHCH₂), 2,87 (q, ³J = 6,5 Hz, 2H, CH₂NHCOO), 1,53 (quin, ³J = 6,8 Hz, 2H, CCONHCH₂CH₂), 1,42 – 1,15 ppm (m, 19 H, C(CH₃)₃; CH₂CH₂NHCOO; CH₂(CH₂)₄CH₂CH₂NHCOO).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 101 MHz): δ = 166,3 (2C, COOH), 164,4 (CCONH), 155,6 (NHCOO), 135,5 (CCOOH), 131,9 (2C, CCONH; COOHCCHCCOOH), 131,6 (2C, COOHCCHCCONH), 77,3 (C(CH₃)₃), 29,5 (2C, CCONHCH₂, CH₂NHCOO), 29,0 (CCONHCH₂CH₂), 28,8 (CH₂CH₂NHCOO), 28,3 (CH₃), 26,5 (2C, CH₂CH₂CH₂NHCOO; CCONHCH₂CH₂CH₂), 26,3 ppm (2C, CCONHCH₂CH₂CH₂(CH₂)₂).

6.3.1.6 *tert*-Butyl-(8-(3,5-bis(octylcarbamoyl)benzamido)octyl)carbammat (47)



In einen 250 mL SCHLENK-Kolben wurden 3 g 5-((8-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)octyl)-carbamoyl)isophthalsäure (6,87 mmol, 1 eq.), 2,52 g 4-Dimethylaminopyridin (20,62 mmol, 3 eq.) und 2,73 mL Octylamin (2,13 g, 16,49 mmol, 2,4 eq.) in 150 mL trockenem CHCl₃ unter einer Schutzgasatmosphäre vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Reaktionsmischung wurde eine Lösung aus 3,95 g 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDC·HCl) (20,62 mmol, 3 eq.) in 40 mL trockenem CHCl₃ gegeben und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in 300 mL CHCl₃ aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 300 mL HCl (pH 2), 300 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit 300 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CHCl₃/MeOH 9:1). *tert*-Butyl(8-(3,5-bis(octylcarbamoyl)benzamido)octyl)-carbammat wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,12 g (93 %)

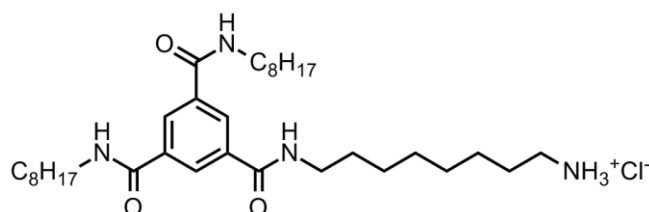
¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ = 8,21 (br. s, 3H, CH), 7,20 (br. s, 3H, CCONH), 3,39 (q, ³J = 5,9 Hz, 6H, CCONHCH₂), 3,06 (t, ³J = 7,0 Hz, 2H, CH₂NHCOO), 1,66 – 1,51 (m, 6H,

CCONHCH₂CH₂; CH₂CH₂NHCOO), 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,39 - 1,18 (m, 28H,

CCONHCH₂CH₂(CH₂)₄; CH₂CH₃), 0,87 ppm (t, ³J = 6,9 Hz, 6H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100MHz): δ = 166,1 (3C, CCONH), 135,1 (3C, CCONH), 128,0 (3C, CH), 40,4 (CH₂NHCOO), 40,2 (3C, CCONHCH₂), 31,8 (3C, CCONHCH₂CH₂), 29,3 (4C, CCONHCH₂CH₂CH₂; CH₂CH₂NHCOO) 28,4 (3C, C(CH₃)₃), 27,0 (CH₂CH₂CH₂NHCOO), 22,6 (10C, CCONHCH₂CH₂CH₂(CH₂)₂; CH₂CH₂CH₃), 14,1 ppm (2C, CH₂CH₃).

6.3.1.7 1-(8-Aminoctyl)-3,5-dioctylbenzoltricarboxamid Hydrochlorid (48)



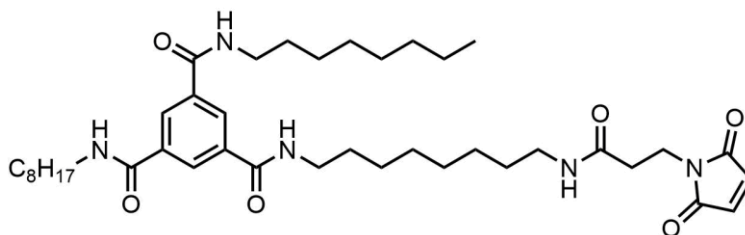
In einem 250 mL Einhalskolben wurden 1 g *tert*-Butyl(8-(3,5-*bis*(octylcarbamoyl)-benzamido)octyl)carbamate (1,52 mmol) mit 150 mL 3 M HCl in MeOH versetzt und für 2,5 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Hochvakuum getrocknet. 1-(8-Aminoctyl)-3,5-dioctylbenzoltricarboxamid Hydrochlorid entstand als farbloser Feststoff.

Ausbeute: quantitativ

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 8,88 - 8,71 (m, 3H, NH₃), 8,48 (s, 3H, CH), 7,92 (br. s, 3H, CONH), 3,36 - 3,16 (m, 6H, CONHCH₂), 2,74 (sxt, ³J = 7,6 Hz, 2H, CH₂NH₃), 1,63 - 1,45 (m, 8H, CONHCH₂CH₂; CH₂CH₂NH₃), 1,39 - 1,15 (m, 28H, CONHCH₂CH₂(CH₂)₄; CH₂CH₃), 0,84 ppm (t, ³J = 6,8 Hz, 6H, CH₃).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 166,3 (3C, CCONH), 134,9 (3C, CCONH), 128,3 (3C, CH), 40,4 (4C, CONHCH₂; CH₂NH₃), 31,2 (3C, CONHCH₂CH₂), 29,3 - 26,7 (4C, CONHCH₂CH₂CH₂; CH₂CH₂NH₃); CH₂CH₂CH₂NH₃), 22,9 (10C, CH₂CH₂CH₃; CCONHCH₂CH₂CH₂(CH₂)₂), 14,1 ppm (2C, CH₂CH₃).

6.3.1.8 N^1 -(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethyl)- N^3,N^5 -dioctylbenzol-1,3,5-tricarboxamid (BTA-Mal, 40)



Unter Argon wurden 89,6 mg MIP-NHS (336,53 μmol , 1 eq.) und 200 mg 1-(8-Aminooctyl)-3,5-dioctylbenzoltricarboxamid Hydrochlorid (336,53 μmol , 1 eq.) in 4 mL DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 186,6 μL Triethylamin (136,2 mg, 1,35 mmol, 4 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 2 h bei 0 °C gerührt. Danach wurde das Eisbad entfernt die Reaktionslösung bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Im Anschluss wurde 4 mL einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung hinzugegeben und erneut für 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Trennung der Phasen wurde die organische Phase mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 2 M HCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (Laufmittel: CHCl_3 :MeOH 10:1) wurde BTA-Mal als brauner Feststoff erhalten.

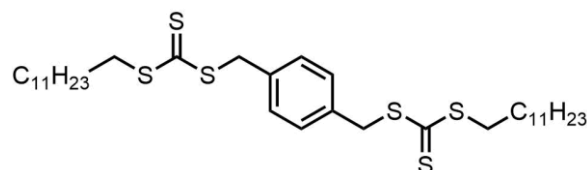
Ausbeute: 113 mg (47 %)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 8,64 (t, 3J = 5 Hz, 3H, CCONH), 8,36 (s, 3H, $\text{CH}_{\text{Benzol}}$), 7,88 (t, 3J = 5 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 7,00 (s, 2H, HCCH), 3,59 (t, 3J = 10 Hz, 2H, CH_2NCO), 3,28 (q, 4J = 5 Hz, 6H, CONH CH_2), 2,98 (q, 4J = 5 Hz, 2H, $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2,31 (t, 3J = 10 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 1,54 (m, 8H, CCONH CH_2CH_2), 1,25 (m, 30H, CCONH $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4$; CH_2CH_3 ; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 0,85 ppm (t, 3J = 10 Hz, 6H, CH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 170,7 (2C, NCOCH), 169,1 ($\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 165,4 (3C, CCONH), 135,0 (2C, HCCH), 134,5 (3C, CCONH), 128,3 (3C, CCHC), 45,5 (CH_2NCO), 34,1 (3C, CONH CH_2CH_2), 31,2 - 26,4 (4C, CONH $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2$), 22,6 (10C, CCONH $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2$; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14,4 ppm (2C, CH_2CH_3).

6.3.2 Synthese von DTTC-P(AMor)-DTTC

6.3.2.1 Didodecyl-1,4-phenylen-bis-(methylen)-bis-trithiocarbonat (2C12, 38)

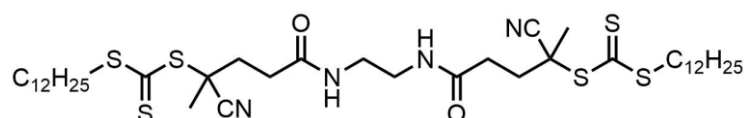


4,85 g Kaliumphosphat (22,85 mmol, 2 eq.) wurden in 80 mL Aceton vorgelegt, mit 5,44 mL Dodekanthiol (5,22 g, 22,85 mmol, 2 eq.) versetzt und für 20 min gerührt. Anschließend wurden 2 g α,α' -Dichloro-*p*-xylo (11,43 mmol, 1 eq.) hinzugegeben und erneut für 30 min gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand aus Ethylacetat umkristallisiert. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde 2C12 als feiner gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 3,56 g (47 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7,28 (s, 4H, CH), 4,58 (s, 4H, SCH_2C), 3,36 (t, 3J = 4 Hz, 4 H, SCH_2CH_2), 1,70 (quin, 3J = 4 Hz, 4H, SCH_2CH_2), 1,42 – 1,35 (m, 4H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,35 - 1,25 (m, 3J = 8 Hz, 32H, $\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8$), 0,88 ppm (t, J = 8 Hz, 6H, CH_3).

6.3.2.2 Didodecyl((ethan-1,2-diylbis(azandiyl))bis(2-cyano-5-oxopentan-5,2-diyl))bis(carbonotrithioat) (EDA-CDP₂, 53)



Es wurden 75 mg Ethylendiamin (83,3 μL , 1,25 mmol, 1 eq.) und 396 mg 4-DMAP (3,24 mmol, 2,6 eq.) unter Argon in 20 mL trockenem DCM vorgelegt und mit 1,01 g Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentansäure (2,5 mmol, 2 eq.) und 622 mg EDC·HCl (3,24 mmol, 2,6 eq.) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung über Nacht bei RT gerührt. Die nun klare Lösung wurde nacheinander mit 1 M HCl (3 x 30 mL), VE-Wasser (3 x 30 mL), gesättigter NaHCO_3 -Lösung (3 x 30 mL), sowie gesättigter NaCl-Lösung (3 x 30 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM + 10% MeOH) wurde EDA-CDP₂ als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 265 mg (25 %)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6,35 (br. s, 2H, NH), 3,42 (br. s, 4H, NHCH₂), 3,33 (t, ³J = 8 Hz, 4H, SCH₂), 2,51 – 2,46 (m, 4H, SCCH₂), 1,91 (s, 6H, SCCH₃), 1,71 - 1,66 (m, 8H, SCH₂CH₂CH₂), 1,44 - 1,35 (m, 4H, SCH₂CH₂CH₂CH₂), 1,32 – 1,26 (m, 32H, SCH₂CH₂CH₂(CH₂)₈), 0,88 ppm (t, ³J = 8 Hz, 6H, CH₂CH₃).

6.3.2.3 RAFT-Polymerisation

Zur Synthese des Polymers wurden 62,4 mg des RAFT-Reagenzes EDA-CDP₂ (0,075 mmol, 7 eq.) in 3,81 mL 1,4-Dioxan in einem SCHLENK-Rohr vorgelegt und 1,28 mL AMor (10,18 mmol, 950 eq.), sowie 11,39 mg 1,3,5-Trioxan (0,127 mmol, 11,5 eq) hinzugegeben. Anschließend wurden 1,80 mg des Initiators AIBN (0,011 mmol, 1 eq.) hinzugefügt und die Lösung mittels vier *freeze-pump-thaw*-Zyklen entgast. Nach dem Entgasen wurden 100 μ L der Reaktionslösung für die Umsatzbestimmung entnommen und die restliche Lösung für 22 h bei 70 °C gerührt. Nach 22 h wurde die Reaktion durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff beendet, erneut 100 μ L für die Umsatzbestimmung entnommen, das Polymer zweimal aus kaltem Et₂O gefällt, zentrifugiert und das Lösungsmittel dekantiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknung im Hochvakuum wurde DTTC-P(AMor)-DTTC als leicht gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,23 g (85 %)

6.3.3 Aminolyse der DTTC-Endgruppen

1 g DTTC-P(AMor)-DTTC wurden in 1,4-Dioxan (ca. 8 mL/g) gelöst, 198 μ L *n*-Butylamin (146,5 mg, 2 μ mol, 40 eq.) hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Das Polymer wurde durch wiederholtes Fällern aus kaltem, angesäuerten Diethylether aufgereinigt und anschließend getrocknet. HS-P(AMor)-SH wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 868 mg (89 %)

6.3.4 BTA-Funktionalisierung von HS-P(AMor)-SH

500 mg HS-P(AMor)-SH (0,025 mmol, 1eq) und 10,4 μ L TEA (7,59 mg, 0,075 mmol, 3 eq.) wurden in 10 mL entgastem DMF unter Argon vorgelegt. Anschließend wurden 177 mg BTA-Mal (0,25 mmol, 10 eq.) in 2 mL entgastem DMF gelöst und zusammen mit 61,7 μ L Tri-*n*-butylphosphin (50,6 mg, 0,25 mmol, 10 eq.) zur vorgelegten Reaktionslösung gegeben. Im Anschluss wurde das Gemisch für drei Tage bei RT gerührt. Das Polymer wurde zweimal aus kaltem Diethylether ausgefällt, zentrifugiert und das Lösungsmittel abdekantiert. Nach

Entfernen des Lösungsmittels und Trocknung im Hochvakuum wurde BTA-P(AMor)-BTA als orangefarbener Feststoff erhalten.

Ausbeute: 487 mg (97 %)

6.3.5 Charakterisierung des Hydrogelators (Frequenztest)

Es wurden 1,3 mL einer 20 % (w/v)-igen Lösung aus BTA-P(AMor)-BTA in Wasser hergestellt und auf 80 °C erhitzt. Anschließend wurden 1,15 mL der heißen Lösung auf das vorgeheizte Rheometer (Kegel-Platte) gegeben, ein Spalt von 150 µm eingestellt, die Lösung rapide auf 25 °C abgekühlt und vermessen. Dabei wurde eine Deformation von 1 % und ein Frequenzbereich von 0,1 bis 100 Hz eingesetzt.

7. Abkürzungsverzeichnis

2C12	Didodecyl-1,4-phenylbis(methylen)bistrithiocarbonat
2-CTC	2-Chlorotriylchlorid-Harz
6Ahx	6-Aminohexansäure
AA	Acrylsäure
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
AEA	Aminoethylacrylat
AEMA	Aminoethylmethacrylat
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
Am	Acrylamid
AMor	Acryloylmorpholin
APS	Ammoniumpersulfat
aSCs	adulte Stammzellen (engl.: <i>adult stem cells</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
ATRP	Atomtransferradikalpolymerisation (engl.: <i>atom transfer radical polymerization</i>)
BAC	<i>N,N'</i> -Bis(acryloylcystamin)
BAm	<i>Bis</i> (acrylamid)
BMAC	<i>N,N'</i> -Bis(methacryloylcystamin)
BMADDP	<i>Bis</i> (2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandioldipropionat
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BSA	bovines Serumalbumin
BTA	1,3,5-Benzoltricarbonsäure
BTA-Mal	<i>N</i> ¹ -(2-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanamido)ethyl)- <i>N</i> ³ , <i>N</i> ⁵ -dioctylbenzol-1,3,5-tricarboxamid
CDP	Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentansäure
cgc	kritische Gelierungskonzentration (engl. <i>critical gelation concentration</i>)
cmc	kritische Mizellbildungskonzentration (eng.: <i>critical micelle concentration</i>)
CRP	kontrollierte radikalische Polymerisation (engl.: <i>controlled radical polymerization</i>)
CTP	(4-Cyanopentansäure)dithiobenzoat
CycTA	1,3,5-Cyclohexantricarbonsäure
DAO	Diaminooktan
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAEA	Dimethylaminoethylacrylat

DMAm	Dimethylacrylamid
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTDS	3,3'-Dithiodipropionsäure
DTDS-Cl	Dithiodipropionsäurechlorid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, Ellman's Reagenz
DTT	Dithiothreitol
DTTC	Dodecyltrithiocarbonat
EDA-CDP ₂	Didodecyl((ethan-1,2-diylbis(azandiyl))bis(2-cyano-5-oxopentan-5,2-diyl))bis(carbonotrithioat)
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
e-eq.	Elektronenäquivalente
Et ₂ O	Diethylether
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
FRP	freie radikalische Polymerisation
FRP	freie radikalische Polymerisation
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GMP	gute Herstellungspraxis (engl.: <i>good manufacturing practice</i>)
GPC	Gelpermeationschromatographie
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HEA	Hydroxyethylacrylat
HEAm	Hydroxyethylacrylamid
HEK293	humane embryonale Nierenzellen 293 (engl.: <i>human embryonic kidney cells 293</i>)
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEMAm	Hydroxyethylmethacrylamid
hESCs	humane embryonale Stammzellen
hiPSCs	humane induziert pluripotente Stammzellen
HMAm	Hydroxymethylacrylamid
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
hTGSCs	humanen Zahnkeimstammzellen (eng.: <i>human tooth germ stem cells</i>)
IPA	<i>iso</i> -Propanol
LCST	untere kritische Lösungstemperatur (engl.: <i>lower critical solution temperature</i>)

LMWG	engl.: <i>low molecular weight gelator</i>
ME	Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
MeOTf	Methyltriflat
mESCs	mausembryonale Stammzellen (engl.: <i>mouse embryonic stem cells</i>)
MIC	Maleimidocaprionsäure
MIP	Maleimidopropionsäure
MIP-Cl	Maleimidopropionsäurechlorid
MIP-NHS	Maleimidopropionsäure- <i>N</i> -succinimidat
MIP-PDE	2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat
MMP7	Matrix-Metalloproteinase
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	Nitroxid-vermittelten Polymerisation (engl.: <i>nitroxide-mediated polymerization</i>)
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NSCs	neurale Stammzellen
P(AMor)	Poly(acryloylmorpholin)
P(MMA)	Poly(methylmethacrylat)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCL	Poly(caprolacton)
PDE	2-(2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethanol
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEGDA	Poly(ethylenglykol)diacrylat
PEGDMA	Poly(ethylenglykol)dimethacrylat
PEGME	Poly(ethylenglykol)methylether
PEGMEA480	Poly(ethylenglykol)methyletheracrylat 480
PEI	Poly(ethylenimin)
PERVs	porcine endogene Retroviren
PGA	Polyglykolsäure
PGA	Poly(glykolsäure) (engl.: <i>poly(glycolic acid)</i>)
PLA	Polymilchsäure
PLA	Polylaktide (engl.: <i>poly(lactic acid)</i>)
PLL	Poly-L-lysin
PNIPAAm	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
PP8	Phosphat-Puffer bei pH 8
PPO	Poly(propylenoxid)
P-SH	polymergebundene Thiolgruppen

RAFT	reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation (engl.: <i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäuren
TE	Geweberekonstruktion (engl.: <i>tissue engineering</i>)
TEA	Triethylamin
TEGMEMMA	Triethylenglykolmethylethermethacrylat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TIT	engl.: <i>tube Inversion test</i>
TMAEA	Trimethylaminoethylacrylat
TMAEA*Cl	[2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumchlorid
TNB ²⁻	2-Nitro-5-thiobenzoat
UCST	obere kritische Lösungstemperatur (engl.: <i>upper critical solution temperature</i>)
UPy	2-Ureido-6[1H]-pyrimidinon
UV/Vis	ultraviolettes und sichtbares Licht
V-40	1,1'-Azobis(cyclohexan-1-carbonitril)
V-70	2,2'-Azo-bis-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)
C_n	charakteristisches Flory-Verhältnis
c_{Thiol}	Konzentration der immobilisierten Thiole
c_{TNB}	Konzentration der TNB ²⁻ -Ionen
d	Schichtdicke
D	Dispersität
DP	Polymerisationsgrad (engl.: <i>degree of polymerization</i>)
E	E- bzw. Young-Modul
E_{309}	gemessene Extinktion bei 309 nm
E_{TNB}	gemessene Extinktion der TNB ²⁻ -Ionen
G^*	komplexes Schubmodul
$ G^* $	Betrag des komplexen Schubmoduls
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
G_H	Schubmodul der Feder
$[I]_0$	Anfangskonzentration des Initiators
I_i	Integralwert für Gruppe i

$I_{i,norm}$	normierter Integralwert für Gruppe i
k_R	Geschwindigkeitskonstante der RAFT-Polymerisation
k_w	Geschwindigkeitskonstante des Wachstums
l_c	C-C-Bindungslänge
[M]	Monomerkonzentration
[M] ₀	Anfangsmonomerkonzentration
[M] _t	Konzentration des Monomers zum Zeitpunkt t
M_{Mono}	gemittelte Monomermolmasse
\overline{M}_n	mittlere Molmasse der unvernetzten Polymerkette
\overline{M}_n^{UV}	UV/Vis-spektroskopische Endgruppenanalyse bestimmte Molmasse
$\overline{M}_{n,theo}$	theoretische Molmasse
m_{Poly}	Masse des Polymers
M_{RAFT}	molare Masse des RAFT-Reagenz
m_S	Masse im vollständig gequollenen Zustand
m_t	Masse im trockenen Zustand
n_{DTTC}	Stoffmenge der DTTC-Endgruppen
$N_{prot,i}$	Anzahl der Protonen der Gruppe i
[P·]	Konzentration der aktiven Polymerketten
Q_m	gravimetrischer Quellwert
Q_v	volumetrischer Quellwert
R	universelle Gaskonstante
\overline{r}_0^2	End-zu-End-Abstand des Netzwerkes im entspannten Zustand
\overline{r}_f^2	End-zu-End-Abstand der linearen Polymerkette im entspannten Zustand
[RAFT] ₀	Anfangskonzentration des RAFT-Reagenz
t	Zeit
T	Temperatur
tan(δ)	Verlustfaktor
v_{Brutto}	Bruttoreaktionsgeschwindigkeit
v_w	Wachstumsgeschwindigkeit
X	Umsatz des Monomers
Y_{Pi}	Thiolbeladung des Copolymers P _i
Z_{DTTC}	Endgruppenfunktionalisierungsgrad von DTTC
β_{Pi}	Massenkonzentration des Copolymers P _i
β_{Poly}	Massenkonzentration des Polymers
$\gamma(t)$	Deformation

γ^*	komplexe Deformation
γ_0	Deformationsamplitude
$\dot{\gamma}_N$	Schergeschwindigkeit
δ	Phasenverschiebungswinkel
$\epsilon_{309;2C12}$	molarer Extinktionskoeffizient von 2C12 bei 309 nm
$\epsilon_{412,TNB}$	molarer Extinktionskoeffizient der TNB ²⁻ -Ionen
η	Viskosität
λ	Deformation
ν	Poissonzahl
$\nu_{2,r}$	Volumenanteil des Polymernetzwerks im relaxierten Zustand
$\nu_{2,s}$	Volumenanteil des Hydrogels im gequollenen Zustand
ζ	Maschenweite bzw. Netzkettenlänge
ρ_P	Polymerdichte
ρ_S	Dichte des Lösungsmittels
τ_0	Schubspannungsamplitude
$\tau(t)$	Schubspannung
τ^*	komplexe Schubspannung
τ_{ges}	Gesamtschubspannung
τ_H	Schubspannung des Hooke-Elements
τ_N	Schubspannung des Newton-Elements
ω	Kreisfrequenz
2C12	Didodecyl-1,4-phenylbis(methylen)bis(trithiocarbonat)

8. Literaturverzeichnis

- [1] D. J. Lyman, *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **1973**, 2, 319–333.
- [2] D. F. Williams, *Biomaterials* **2008**, 29, 2941–2953.
- [3] Eurotransplant International Foundation, *Annual Report*, **2015**.
- [4] F. H. Bach, *Annu. Rev. Med.* **1998**, 49, 301–310.
- [5] J. L. Platt, G. M. Vercellotti, A. P. Dalmaso, A. J. Matas, R. M. Bolman, J. S. Najarian, F. H. Bach, *Immunol. Today* **1990**, 11, 450–456.
- [6] G. Herold, *Innere Medizin*, **2013**.
- [7] F. H. Bach, J. A. Fishman, N. Daniels, J. Proimos, B. Anderson, C. B. Carpenter, L. Forrow, S. C. Robson, H. V. Fineberg, *Nat. Med.* **1998**, 4, 141–144.
- [8] R. Langer, J. P. Vacanti, *Science* **1993**, 260, 920–926.
- [9] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. S. Kumar, *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, 2011, 1–19.
- [10] F. J. O’Brien, *Mater. Today* **2011**, 14, 88–95.
- [11] D. Goldberg, *J. Environ. Polym. Degrad.* **1995**, 3, 61–67.
- [12] S. Pal, in *Des. Artif. Hum. Joints Organs*, Springer US, Boston, MA, **2014**, pp. 23–40.
- [13] E. S. Place, N. D. Evans, M. M. Stevens, *Nat. Mater.* **2009**, 8, 457–470.
- [14] X. Liu, Y. Won, P. X. Ma, *Biomaterials* **2006**, 27, 3980–3987.
- [15] T.-W. Chung, Y.-F. Lu, S.-S. Wang, Y.-S. Lin, S.-H. Chu, *Biomaterials* **2002**, 23, 4803–4809.
- [16] N. Faucheux, R. Schweiss, K. Lützwow, C. Werner, T. Groth, *Biomaterials* **2004**, 25, 2721–2730.
- [17] M. Salim, G. Mishra, G. J. S. Fowler, B. O’Sullivan, P. C. Wright, S. L. McArthur, *Lab Chip* **2007**, 7, 523–525.
- [18] M. H. Lee, C. S. Adams, D. Boettiger, W. F. DeGrado, I. M. Shapiro, R. J. Composto, P. Ducheyne, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, 81A, 150–160.
- [19] S. J. Hollister, *Biofabrication* **2009**, 1, 12001.
- [20] E. Lavik, R. Langer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 65, 1–8.
- [21] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie Der Zelle*, Wiley-VCH Verlag, **2011**.
- [22] R. Tannishtha, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman, *Nature* **2001**, 414, 105–111.
- [23] S. J. Morrison, N. M. Shah, D. J. Anderson, *Cell* **1997**, 88, 287–298.

- [24] A. Smith, *Nature* **2006**, *441*, 1060.
- [25] J. A. et. al. Thomson, *Science* **1998**, *282*, 1145–1147.
- [26] S. Avasthi, R. N. S. Ms, A. S. Ms, *Internet J. Med. Updat.* **2008**, *3*, 22–30.
- [27] P. H. Lerou, G. Q. Daley, *Blood Rev.* **2005**, *19*, 321–331.
- [28] F. Cobo, J. M. Navarro, M. I. Herrera, A. Vivo, D. Porcel, C. Hernández, M. Jurado, J. García-Castro, P. Menendez, *Cloning Stem Cells* **2008**, *10*, 65–74.
- [29] C. Xu, M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J. D. Gold, M. K. Carpenter, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 971–974.
- [30] P. M. Wiedemann, J. Simon, S. Schick Tanz, C. Tannert, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 927–31.
- [31] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
- [32] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
- [33] J. Yu, M. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, et al., *Science* **2007**, *318*, 1917–20.
- [34] K. H. Narsinh, J. Plews, J. C. Wu, *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 635–638.
- [35] A. Doi, I.-H. Park, B. Wen, P. Murakami, M. J. Aryee, R. Irizarry, B. Herb, C. Ladd-Acosta, J. Rho, S. Loewer, et al., *Nat. Genet.* **2009**, *41*, 1350–1353.
- [36] J. Deng, R. Shoemaker, B. Xie, A. Gore, E. M. LeProust, J. Antosiewicz-Bourget, D. Egli, N. Maherali, I.-H. Park, J. Yu, et al., *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 353–60.
- [37] M. C. Puri, A. Nagy, *Stem Cells* **2012**, *30*, 10–14.
- [38] F. Romeo, F. Costanzo, M. Agostini, *Aging* **2012**, *4*, 878–86.
- [39] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, S. Yamanaka, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *16*, 115–130.
- [40] H. E. Young, A. C. Black, *Anat. Rec.* **2004**, *276A*, 75–102.
- [41] C. M. Verfaillie, *Trends Cell Biol.* **2002**, *12*, 502–508.
- [42] M. Körbling, Z. Estrov, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 570–582.
- [43] F. Ferraro, C. Lo Celso, D. Scadden, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *695*, 155–168.
- [44] R. Schofield, C. Blood, *Blood Cells* **1978**, *4*, 7–25.
- [45] D. L. Jones, A. J. Wagers, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 11–21.
- [46] E. D. Hay, *Cell Biology of the Extracellular Matrix*, Springer US, New York, **1991**.
- [47] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [48] R. P. Mecham, J. A. McDonald, *Receptors for Extracellular Matrix*, Academic Press Inc, **1991**.
- [49] S. F. Badylak, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2002**, *13*, 377–383.
- [50] N. M. Sangeetha, U. Maitra, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 821–836.

-
- [51] R. A. Meyers, *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH, New York, **1995**.
- [52] J. A. Hunt, R. Chen, T. van Veen, N. Bryan, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5319.
- [53] S. R. Caliari, J. A. Burdick, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 405–14.
- [54] M. N. Collins, C. Birkinshaw, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92*, 1262–1279.
- [55] R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials* **2010**, *3*, 1863–1887.
- [56] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126.
- [57] G. Peng, J. Wang, F. Yang, S. Zhang, J. Hou, W. Xing, X. Lu, C. Liu, *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *127*, 577–584.
- [58] A. Jain, R. J. McKeon, S. M. Brady-Kalnay, R. V. Bellamkonda, *PLoS One* **2011**, *6*, e16135.
- [59] B. C. Martin, E. J. Minner, S. L. Wiseman, R. L. Klank, R. J. Gilbert, *J. Neural Eng.* **2008**, *5*, 221–231.
- [60] B.-J. Kang, H.-H. Ryu, S.-S. Park, Y. Kim, H.-M. Woo, W. H. Kim, O.-K. Kweon, *J. Vet. Med. Sci.* **2012**, *74*, 827–836.
- [61] L. N. Novikova, A. Mosahebi, M. Wiberg, G. Terenghi, J. O. Kellerth, L. N. Novikov, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2006**, *77*, 242–252.
- [62] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487–492.
- [63] G. D. Nicodemus, S. J. Bryant, *Tissue Eng. Part B. Rev.* **2008**, *14*, 149–65.
- [64] I. Mironi-Harpaz, O. Kossover, E. Ivanir, D. Seliktar, in *Biomim. Approaches Biomater. Dev.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2012**, pp. 503–513.
- [65] O. D. Krishna, K. L. Kiick, *Biopolymers* **2010**, *94*, 32–48.
- [66] O. Wichterle, D. Lím, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [67] J. Zhu, R. E. Marchant, *Expert Rev. Med. Devices* **2011**, *8*, 607–626.
- [68] R. Birla, in *Introd. to Tissue Eng. Appl. Challenges*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2014**, pp. 84–129.
- [69] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1880.
- [70] J. Zhu, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4639–4656.
- [71] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267.
- [72] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 3–12.
- [73] R. J. Pelham, Y. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 13661–13665.
- [74] A. Chrambach, D. Rodbard, *Science* **1971**, *172*, 440–451.
- [75] F. Liu, J. Seuring, S. Agarwal, *Macromol. Chem. Phys.* **2014**, *215*, 1466–1472.
-

- [76] K. L. Shantha, D. R. K. Harding, *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *84*, 2597–2604.
- [77] N. M. O'Brien-Simpson, N. J. Ede, L. E. Brown, J. Swan, D. C. Jackson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1183–1188.
- [78] D. C. Jackson, N. M. O'Brien-Simpson, L. E. Brown, W. Zeng, J. Ede, Nicholas, E. R. Brandt, M. F. Good, *Polymers Incorporating Peptides for Stimulation of Immune Response*, **1998**, WO/1998/034968.
- [79] X. Bi, A. Liang, in *Emerg. Concepts Anal. Appl. Hydrogels*, InTech, **2016**.
- [80] C. R. Nuttelman, M. A. Rice, A. E. Rydholm, C. N. Salinas, D. N. Shah, K. S. Anseth, *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 167–179.
- [81] I. Rault, V. Frei, D. Herbage, N. Abdul-Malak, A. Huc, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1996**, *7*, 215–221.
- [82] B. Chevally, N. Abdul-Malak, D. Herbage, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 448–459.
- [83] M. A. Azagarsamy, K. S. Anseth, *ACS Macro Lett.* **2013**, *2*, 5–9.
- [84] V. X. Truong, M. P. Ablett, H. T. J. Gilbert, J. Bowen, S. M. Richardson, J. A. Hoyland, A. P. Dove, *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 167–175.
- [85] J. A. Codelli, J. M. Baskin, N. J. Agard, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486–11493.
- [86] A. Uliniuc, M. Popa, T. Hamaide, M. Dobromir, *Cellul. Chem. Technol.* **2012**, *46*, 1–11.
- [87] X. Bi, A. Liang, Y. Tan, P. Maturavongsadit, A. Higginbotham, T. Gado, A. Gramling, H. Bahn, Q. Wang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2016**, *27*, 743–57.
- [88] X. Bi, J. Amie Luckanagul, A. Allen, M. Ramaboli, E. Campbell, D. West, P. Maturavongsadit, K. Brummett, Q. Wang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2015**, *26*, 669–682.
- [89] M. Fan, Y. Ma, Z. Zhang, J. Mao, H. Tan, X. Hu, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *56*, 311–317.
- [90] X. Zhang, S. Malhotra, M. Molina, R. Haag, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1948–1973.
- [91] V. Vijayakumar, K. Subramanian, *Saudi Pharm. J.* **2014**, *22*, 43–51.
- [92] K. K. Hall, K. M. Gattás-Asfura, C. L. Stabler, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 614–624.
- [93] O. Sallouh, R. Weberskirch, *Polymer* **2016**, *86*, 189–196.
- [94] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 13–36.
- [95] L. A. Estroff, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1201–1218.
- [96] H. Fenniri, P. Mathivanan, K. L. Vidale, D. M. Sherman, K. Hallenga, K. V Wood, J. G. Stowell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3854–3855.
- [97] J. Köning, C. Böttcher, H. Winkler, E. Zeitler, Y. Talmon, J. H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 693–700.

-
- [98] Y. Sakaiguchi, T. Shikata, H. Urakami, A. Tamura, H. Hirata, *Microscopy* **1987**, *36*, 168–176.
- [99] H. Yanagawa, Y. Ogawa, H. Furuta, K. Tsuno, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4567–4570.
- [100] N. Nakashima, S. Asakuma, J.-M. Kim, T. Kunitake, *Chem. Lett.* **1984**, *13*, 1709–1712.
- [101] C. Wu, X. Wang, *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80*, 4092–4094.
- [102] L. Klouda, A. G. Mikos, *Eurpoean J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 34–45.
- [103] R. Liu, M. Fraylich, B. R. Saunders, *Colloid Polym. Sci.* **2009**, *287*, 627–643.
- [104] S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, *J. Artif. Organs* **2005**, *7*, 181–186.
- [105] H. Tan, C. M. Ramirez, N. Miljkovic, H. Li, J. P. Rubin, K. G. Marra, *Biomaterials* **2009**, *30*, 6844–6853.
- [106] C. Y. Gong, S. Shi, P. W. Dong, B. Kan, M. L. Gou, X. H. Wang, X. Y. Li, F. Luo, X. Zhao, Y. Q. Wei, et al., *Int. J. Pharm.* **2009**, *365*, 89–99.
- [107] W. S. Shim, J. H. Kim, H. Park, K. Kim, I. Chan Kwon, D. S. Lee, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5178–5185.
- [108] B. K. Lau, Q. Wang, W. Sun, L. Li, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2004**, *42*, 2014–2025.
- [109] K. E. Crompton, J. D. Goud, R. V. Bellamkonda, T. R. Gengenbach, D. I. Finkelstein, M. K. Horne, J. S. Forsythe, *Biomaterials* **2007**, *28*, 441–449.
- [110] J. S. Patil, M. V. Kamalapur, S. C. Marapur, D. V. Kadam, *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2010**, *5*, 241–248.
- [111] J. Berger, M. Reist, J. M. Mayer, O. Felt, N. A. Peppas, R. Gurny, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19–34.
- [112] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, G. O. Phillips, in *Prog. Mol. Environ. Bioeng. - From Anal. Model. to Technol. Appl.* (Ed.: A.B.T.-P. in M. and E.B.-F.A. and M. to T.A. Carpi), InTech, Rijeka, **2011**, pp. 117–150.
- [113] H. S. Mansur, R. L. Oréface, A. A. P. Mansur, *Polymer* **2004**, *45*, 7193–7202.
- [114] H. S. Mansur, C. M. Sadahira, A. N. Souza, A. A. P. Mansur, *Mater. Sci. Eng. C* **2008**, *28*, 539–548.
- [115] K. Aikawa, K. Matsumoto, H. Uda, S. Tanaka, H. Shimamura, Y. Aramaki, S. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.* **1998**, *167*, 97–104.
- [116] S. H. Kim, C. C. Chu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 517–527.
- [117] I. Levental, P. C. Georges, P. A. Janmey, *Soft Matter* **2007**, *3*, 299–306.
- [118] P. A. Janmey, R. T. Miller, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 9–18.
- [119] R. M. Christensen, *Theory of Viscoelasticity : An Introduction*, Academic Press, **1982**.
-

- [120] G. Meichsner, T. Mezger, J. Schröder, *Lackeigenschaften Messen Und Steuern : Rheologie - Grenzflächen - Kolloide*, Vincentz, **2003**.
- [121] W. Heinz, *Rheologie Und Rheometrie Mit Rotationsviskosimetern*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1965**.
- [122] K. S. Anseth, C. N. Bowman, L. Brannon-Peppas, *Biomaterials* **1996**, *17*, 1647–1657.
- [123] S. M. Willerth, S. E. Sakiyama-Elbert, in *StemBook*, Harvard Stem Cell Institute, **2008**.
- [124] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27–46.
- [125] N. A. Peppas, E. W. Merrill, *J. Appl. Polym. Sci.* **1977**, *21*, 1763–1770.
- [126] T. Canal, N. A. Peppas, *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23*, 1183–1193.
- [127] O. Jeon, D. S. Alt, S. W. Linderman, E. Alsberg, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 6366–6372.
- [128] P. A. Parmar, L. W. Chow, J. P. St-Pierre, C. M. Horejs, Y. Y. Peng, J. A. Werkmeister, J. A. M. Ramshaw, M. M. Stevens, *Biomaterials* **2015**, *54*, 213–225.
- [129] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 458–465.
- [130] S. H. Lee, Y. Lee, Y. W. Chun, S. W. Crowder, P. P. Young, K. D. Park, H.-J. Sung, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 6771–6781.
- [131] J. F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, *39*, 893–896.
- [132] A. N. Buxton, J. Zhu, R. Marchant, J. L. West, J. U. Yoo, B. Johnstone, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 2549–2560.
- [133] N. S. Hwang, M. S. Kim, S. Sampattavanich, J. H. Baek, Z. Zhang, J. Elisseeff, *Stem Cells* **2006**, *24*, 284–291.
- [134] C. N. Salinas, B. B. Cole, A. M. Kasko, K. S. Anseth, *Tissue Eng.* **2007**, *13*, 1025–1034.
- [135] M. J. Mahoney, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2265–2274.
- [136] M. J. Mahoney, K. S. Anseth, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *81A*, 269–278.
- [137] S. Royce Hynes, L. M. McGregor, M. Ford Rauch, E. B. Lavik, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 1017–1030.
- [138] M. P. Lutolf, J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields, J. A. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 5413–5418.
- [139] M. P. Lutolf, G. P. Raeber, A. H. Zisch, N. Tirelli, J. A. Hubbell, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 888–892.
- [140] T. P. Kraehenbuehl, P. Zammaretti, A. J. Van der Vlies, R. G. Schoenmakers, M. P. Lutolf, M. E. Jaconi, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2757–2766.
- [141] J. R. Tse, A. J. Engler, J. R. Tse, A. J. Engler, in *Curr. Protoc. Cell Biol.*, John Wiley &

- Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2010**, p. 10.16.1-10.16.16.
- [142] J. Lee, A. A. Abdeen, D. Zhang, K. A. Kilian, *Biomaterials* **2013**, *34*, 8140–8148.
- [143] S. Musah, S. A. Morin, P. J. Wrighton, D. B. Zwick, S. Jin, L. L. Kiessling, *ACS Nano* **2012**, *6*, 10168–10177.
- [144] M. Sallouh, M. Jarocki, O. Sallouh, P. Degen, A. Faissner, R. Weberskirch, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600178.
- [145] C. E. Kadow, P. C. Georges, P. A. Janmey, K. A. Beningo, *Methods Cell Biol.* **2007**, *83*, 29–46.
- [146] N. Murthy, Y. X. Thng, S. Schuck, M. C. Xu, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12398–12399.
- [147] H. Fife, L. K. Jao, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1492–1495.
- [148] V. Bulmus, Y. Chan, Q. Nguyen, H. L. Tran, *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 446–455.
- [149] M. Sugiura, S. Kobayashi, *Angew. Chemie* **2005**, *117*, 5306–5317.
- [150] G. Deng, C. Tang, F. Li, H. Jiang, Y. Chen, *Macromolecules* **2010**, *43*, 1191–1194.
- [151] N. Roy, E. Buhler, J.-M. Lehn, *Polym. Int.* **2014**, *63*, 1400–1405.
- [152] N. Kuhl, S. Bode, R. K. Bose, J. Vitz, A. Seifert, S. Hoepfener, S. J. Garcia, S. Spange, S. Van Der Zwaag, M. D. Hager, et al., *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 3295–3301.
- [153] Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman, W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6634–6654.
- [154] B. Gyarmati, Á. Némethy, A. Szilágyi, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 1268–1286.
- [155] J. N. Hansen, *Anal. Biochem.* **1976**, *76*, 37–44.
- [156] N. Hisano, N. Morikawa, H. Iwata, Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 115–123.
- [157] H. A. Aliyar, P. D. Hamilton, N. Ravi, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 204–211.
- [158] G. Niu, Y. Yang, H. Zhang, J. Yang, L. Song, M. Kashima, Z. Yang, H. Cao, Y. Zheng, S. Zhu, et al., *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1056–1063.
- [159] H. Lee, T. G. Park, *Polym. J.* **1998**, *30*, 976–980.
- [160] J. H. Lee, H. W. Jung, I.-K. Kang, H. B. Lee, *Biomaterials* **1994**, *15*, 705–711.
- [161] W. Yang, C.-Y. Pan, M.-D. Luo, H.-B. Zhang, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1840–1846.
- [162] Z. Wang, in *Compr. Org. Name React. Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2010**, pp. 2536–2539.
- [163] J. C. Lukesh, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4057–4059.
- [164] W. W. Cleland, *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482.
- [165] J. R. Winther, C. Thorpe, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 838–846.
- [166] P. Nagy, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1623–41.

- [167] M. M. Bashor, in *Methods Enzymol.*, Elsevier, **1979**, pp. 119–131.
- [168] E. Simò-Alfonso, C. Gelfi, R. Sebastiano, A. Citterio, P. G. Righetti, *Electrophoresis* **1996**, *17*, 732–737.
- [169] M. Y. Kizilay, O. Okay, *Polymer* **2003**, *44*, 5239–5250.
- [170] A. K. Denisin, B. L. Pruitt, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 21893–21902.
- [171] M. P. Mullarney, T. A. P. Seery, R. A. Weiss, *Polymer* **2006**, *47*, 3845–3855.
- [172] M. P. Algi, O. Okay, *Eur. Polym. J.* **2014**, *59*, 113–121.
- [173] Y. S. Jo, A. J. Van Der Vlies, J. Gantz, S. Antonijevic, D. Demurtas, D. Velluto, J. A. Hubbell, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1140–1150.
- [174] E. Ranucci, G. Spagnoli, L. Sartore, P. Ferruti, P. Caliceti, O. Schiavon, F. M. Veronese, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 3469–3479.
- [175] J.-P. Montheard, M. Chatzopoulos, D. Chappard, *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **1992**, *32*, 1–34.
- [176] D. G. Pedley, P. J. Skelly, B. J. Tighe, *Br. Polym. J.* **1980**, *12*, 99–110.
- [177] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347–60.
- [178] J. F. Lutz, A. Hoth, *Macromolecules* **2006**, *39*, 893–896.
- [179] P. J. Roth, K. T. Wiss, R. Zentel, P. Theato, *Macromolecules* **2008**, *41*, 8513–8519.
- [180] M. S. Jhon, J. D. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, *7*, 509–522.
- [181] M. Szycher, *High Performance Biomaterials : A Comprehensive Guide to Medical and Pharmaceutical Applications*, Technomic Pub. Co, Basel, **1991**.
- [182] I. Smallwood, *Handbook of Organic Solvent Properties*, Elsevier Ltd., Oxford, **1996**.
- [183] H. J. Mencer, Z. Gomzi, *Eur. Polym. J.* **1994**, *30*, 33–36.
- [184] H. Efe, M. Bicen, M. V. Kahraman, N. Kayaman-Apohan, *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 814–820.
- [185] I. A. Borin, M. S. Skaf, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *296*, 125–130.
- [186] M. Belmares, M. Blanco, W. A. Goddard, R. B. Ross, G. Caldwell, S.-H. Chou, J. Pham, P. M. Olofson, C. Thomas, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1814–1826.
- [187] K. Watanabe, N. Yamagiwa, Y. Torisawa, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 251–258.
- [188] J. D. Vargo, K. L. Olson, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 672–675.
- [189] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
- [190] C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 266–276.
- [191] O. Erel, S. Neselioglu, *Clin. Biochem.* **2014**, *47*, 326–332.
- [192] K. Matyjaszewski, T. P. Davis, *Handbook of Radical Polymerization*, Wiley-Interscience, **2002**.

-
- [193] N. Hisano, H. Iwata, Y. Teramura, H. Chen, Y. Ikada, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49*, 671–679.
- [194] P. V. Attwood, M. J. Piggott, X. L. Zu, P. G. Besant, *Amino Acids* **2007**, *32*, 145–156.
- [195] V. Theodorou, G. Paraskevopoulos, K. Skobridis, *Arkivoc* **2015**, *2015*, 101–112.
- [196] S. B. Ross-Murphy, *Polym. Gels Networks* **1994**, *2*, 229–237.
- [197] C.-Y. M. Tung, P. J. Dynes, *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27*, 569–574.
- [198] T. E. Meyer, C. T. Przysiecki, J. A. Watkins, A. Bhattacharyya, R. P. Simonsen, M. A. Cusanovich, G. Tollin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 6740–6744.
- [199] A. Mirzahosseini, B. Noszál, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37596.
- [200] W. M. Haynes, D. R. Lide, T. J. Bruno, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, FL., **2016**.
- [201] S. W. Hughes, *Phys. Educ.* **2005**, *40*, 468–474.
- [202] N. A. Peppas, H. J. Moynihan, L. M. Lucht, *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, *19*, 397–411.
- [203] W. L. Stoppel, J. C. White, S. D. Horava, S. R. Bhatia, S. C. Roberts, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3988–3998.
- [204] U. Böhme, U. Scheler, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *435*, 342–345.
- [205] H. S. Shin, S. Y. Kim, Y. M. Lee, K. H. Lee, S. J. Kim, C. E. Rogers, *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *69*, 479–486.
- [206] N. A. Rosenthal, G. Oster, *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4445–4448.
- [207] E. B. Nielsen, J. A. Schellman, *J. Phys. Chem.* **1967**, *71*, 2297–2304.
- [208] A. A. Khalili, M. R. Ahmad, *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18149–84.
- [209] G. Chen, in *Cationic Polym. Regen. Med.*, **2014**, pp. 583–591.
- [210] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. Van Zandvoort, M. G. A. Oude Egbrink, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2007**, *454*, 345–359.
- [211] A. Blau, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18*, 481–492.
- [212] A. G. Karakeçili, M. Gümüşderelioglu, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2002**, *13*, 185–196.
- [213] P. . van Wachem, A. . Hogt, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. . Detmers, W. . van Aken, *Biomaterials* **1987**, *8*, 323–328.
- [214] K. L. Thompson, E. S. Read, S. P. Armes, *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93*, 1460–1466.
- [215] P. van de Wetering, N. J. Zuidam, M. J. van Steenberg, O. A. G. J. van der Houwen, W. J. M. Underberg, W. E. Hennink, *Macromolecules* **1998**, *31*, 8063–8068.
- [216] R. Salehi, S. Rasouli, H. Hamishehkar, *Int. J. Pharm.* **2015**, *487*, 274–284.
- [217] P. J. Stang, M. R. White, *Aldrichimica Acta* **1983**, *16*, 15–22.
- [218] A. Guo, F. Yang, R. Yu, Y. Wu, *Chinese J. Polym. Sci.* **2015**, *33*, 23–35.
-

- [219] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [220] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311–340.
- [221] X. Dong, L. Z. Mi, J. Zhu, W. Wang, P. Hu, B. H. Luo, T. A. Springer, *Biochemistry* **2012**, *51*, 8814–8828.
- [222] S. J. Shattil, C. Kim, M. H. Ginsberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 288–300.
- [223] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. G. Kapp, H. Kessler, *Angew. Chemie* **2016**, *128*, 7162–7183.
- [224] K. M. Yamada, D. W. Kennedy, *J. Cell. Biochem.* **1985**, *28*, 99–104.
- [225] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [226] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- [227] S. Adam, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 571–574.
- [228] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927–1930.
- [229] B. Lygo, G. Pelletier, B. Lygo, G. Pelletier, in *Encycl. Reagents Org. Synth.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, **2013**.
- [230] R. M. De Figueiredo, P. Oczipka, R. Fröhlich, M. Christmann, *Synthesis* **2008**, 1316–1318.
- [231] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. Lou Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739–2742.
- [232] D. S. KING, C. G. FIELDS, G. B. FIELDS, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 255–266.
- [233] W. G. Lesniak, A. Jyoti, M. K. Mishra, N. Louissaint, R. Romero, D. C. Chugani, S. Kannan, R. M. Kannan, *Anal. Biochem.* **2013**, *443*, 222–231.
- [234] P. Rovero, S. Pegoraro, S. Viganò, F. Bonelli, A. Triolo, *Let. Pept. Sci.* **1994**, *1*, 149–155.
- [235] J. Puddick, M. Prinsep, S. Wood, C. Miles, F. Rise, S. Cary, D. Hamilton, A. Wilkins, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3025–3045.
- [236] C. F. Nising, S. Bräse, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1218–1228.
- [237] W. Xi, C. Wang, C. J. Kloxin, C. N. Bowman, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 811–814.
- [238] W. Lin, L. Yuan, Z. Cao, Y. Feng, L. Long, *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 5096–5103.
- [239] M. P. Storm, C. B. Orchard, H. K. Bone, J. B. Chaudhuri, M. J. Welham, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 683–95.
- [240] W. C. Russell, F. L. Graham, J. Smiley, R. Nairn, *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59–72.
- [241] P. Thomas, T. G. Smart, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2005**, *51*, 187–200.
- [242] H. Hauser, R. Wagner, *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*, Walter De

-
- Gruyter GmbH & Co KG, **2014**.
- [243] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 655–663.
- [244] M. C. Cushing, K. S. Anseth, *Science* **2007**, *316*, 1133–1134.
- [245] A. Fraise, J.-Y. Maillard, S. Sattar, A. Russell, *Russel, Hugoe & Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, Wiley-Blackwell, **2013**.
- [246] S. S. Karajanagi, R. Yoganathan, R. Mammucari, H. Park, J. Cox, S. M. Zeitels, R. Langer, N. R. Foster, *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 1716–1725.
- [247] G. E. McDonnell, *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*, ASM Press, Washington, **2007**.
- [248] T. P. Coohill, J. L. Sagripanti, *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 1084–1090.
- [249] R. Hannah, M. Beck, R. Moravec, T. Riss, *Cell Notes* **2001**, 11–13.
- [250] S. Zhou, Z. Cui, J. Urban, *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 513–518.
- [251] C. Kuschel, H. Steuer, A. N. Maurer, B. Kanzok, R. Stoop, B. Angres, *Biotechniques* **2006**, *40*, 523–531.
- [252] M. Cohen, D. Joester, B. Geiger, L. Addadi, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1393–1399.
- [253] M. Evans, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 680–686.
- [254] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4353–4364.
- [255] D. Lü, C. Luo, C. Zhang, Z. Li, M. Long, *Biomaterials* **2014**, *35*, 3945–3955.
- [256] K. Miller, K. Chinzei, G. Orsengo, P. Bednarz, *J. Biomech.* **2000**, *33*, 1369–1376.
- [257] P. S. Wellman, R. D. Howe, E. Dalton, K. A. Kern, *Tech. Report. Harvard BioRobotics Lab.* **1999**, 1–15.
- [258] D. Lambertz, C. Pérot, M. I. Almeida-Silveira, F. Goubel, *Eur. J. Appl. Physiol.* **2000**, *81*, 252–257.
- [259] A. J. Engler, H. L. Sweeney, D. E. Discher, J. E. Schwarzbauer, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **2007**, *7*, 335.
- [260] D. A. Herold, K. Keil, D. E. Bruns, *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 73–76.
- [261] S. D. Dimitrov, N. C. Dimitrova, J. D. Walker, G. D. Veith, O. G. Mekenyan, *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 58–68.
- [262] J. L. Vanderhooft, B. K. Mann, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2883–2889.
- [263] X. Z. Shu, Y. Liu, F. Palumbo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* **2003**, *24*, 3825–3834.
- [264] S. Duflo, S. L. Thibeault, W. Li, X. Z. Shu, G. D. Prestwich, *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2171–2180.
- [265] G. D. Prestwich, I. E. Erickson, T. I. Zarembinski, M. West, W. P. Tew, *Acta Biomater.*
-

- 2012, 8, 4200–4207.
- [266] P. C. Powell, A. J. Ingen Housz, *Engineering with Polymers*, CRC Press, **1998**.
- [267] X.-L. Wang, K.-K. Yang, Y.-Z. Wang, *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **2003**, *43*, 385–409.
- [268] B. Schink, P. H. Janssen, J. Frings, *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *103*, 311–316.
- [269] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, N. Gadegaard, *Eur. Cells Mater.* **2003**, *5*, 1–16.
- [270] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 237–280.
- [271] J. A. Abate, P. D. Fadale, M. J. Hulstyn, W. R. Walsh, *Arthroscopy* **1998**, *14*, 278–84.
- [272] B. D. Ulery, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys.* **2011**, *49*, 832–864.
- [273] R. C. Thomson, M. J. Yaszemski, J. M. Powers, A. G. Mikos, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1996**, *7*, 23–38.
- [274] V. Delplace, J. Nicolas, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 771–784.
- [275] G. Pasut, F. M. Veronese, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 933–961.
- [276] H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hogley, M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3400–3406.
- [277] A. Gao, X. Yang, C. Zhang, G. Long, J. Pu, Y. Yuan, H. Liu, Y. Li, F. Liao, *Chem. Cent. J.* **2012**, *6*, 142.
- [278] G. N. Grover, J. Lee, N. M. Matsumoto, H. D. Maynard, *Macromolecules* **2012**, *45*, 4958–4965.
- [279] K. Yates, *Acc. Chem. Res.* **1971**, *4*, 136–144.
- [280] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, D. Thom, *FEBS Lett.* **1973**, *32*, 195–198.
- [281] M. Chayosumrit, B. Tuch, K. Sidhu, *Biomaterials* **2010**, *31*, 505–514.
- [282] A. B. Yeatts, J. P. Fisher, *Tissue Eng. Part C Methods* **2011**, *17*, 337–348.
- [283] E. Coates, J. P. Fisher, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2012**, *6*, 179–192.
- [284] L. Li, A. E. Davidovich, J. M. Schloss, U. Chippada, R. R. Schloss, N. A. Langrana, M. L. Yarmush, *Biomaterials* **2011**, *32*, 4489–4497.
- [285] A. Bozza, E. E. Coates, T. Incitti, K. M. Ferlin, A. Messina, E. Menna, Y. Bozzi, J. P. Fisher, S. Casarosa, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4636–4645.
- [286] M. D. Shoulders, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 929–958.
- [287] J. Bella, H. M. Berman, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 734–742.
- [288] C. K. Kuo, R. S. Tuan, *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 1615–1627.
- [289] U. Nöth, L. Rackwitz, A. Heymer, M. Weber, B. Baumann, A. Steinert, N. Schütze, F.

- Jakob, J. Eulert, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, 83A, 626–635.
- [290] A. Heymer, D. Haddad, M. Weber, U. Gbureck, P. M. Jakob, J. Eulert, U. Nöth, *Biomaterials* **2008**, 29, 1473–1483.
- [291] H. K. Kleinman, G. R. Martin, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, 15, 378–386.
- [292] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 521–533.
- [293] H. G. Schild, *Prog. Polym. Sci.* **1992**, 17, 163–249.
- [294] H. Feil, H. Bae, J. A. N. Feijen, S. W. Kim 'j, *Macromolecules* **1993**, 26, 2496–2500.
- [295] G. Sitalakshmi, B. Sudha, H. N. Madhavan, S. Vinay, S. Krishnakumar, Y. Mori, H. Yoshioka, S. Abraham, *Tissue Eng. Part A* **2009**, 15, 407–415.
- [296] B. Sudha, H. N. Madhavan, G. Sitalakshmi, J. Malathi, S. Krishnakumar, Y. Mori, H. Yoshioka, S. Abraham, *Indian J Med Res* **2006**, 124, 655–664.
- [297] K. Kataoka, N. ho Huh, *J. Stem Cells Regen. Med.* **2010**, 6, 10–14.
- [298] Y. Lei, D. V Schaffer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, 110, E5039–E5048.
- [299] J. S. Park, D. G. Woo, H. N. Yang, H. J. Lim, K. M. Park, K. Na, K. H. Park, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, 92, 988–996.
- [300] S. R. Croy, G. S. Kwon, *J. Control. Release* **2004**, 95, 161–171.
- [301] A. Pitto-Barry, N. P. E. Barry, *Polym. Chem.* **2014**, 5, 3291–3297.
- [302] A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, *J. Control. Release* **2002**, 82, 189–212.
- [303] H. Yu, X. Yang, J. Cheng, X. Wang, S. G. Shen, *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2011**, 69, e558–e564.
- [304] J.-M. Brunet-Maheu, J. C. Fernandes, C. A. De Lacerda, Q. Shi, M. Benderdour, P. Lavigne, *J. Biomater. Appl.* **2009**, 24, 275–287.
- [305] J. W. Huang, W. J. Chen, S. K. Liao, C. Y. Yang, S. S. Lin, C. C. Wu, *Chang Gung Med J* **2006**, 29, 363–372.
- [306] L. M. Marquardt, S. C. Heilshorn, *Curr. stem cell reports* **2016**, 2, 207–220.
- [307] J. P. Fisher, A. G. Mikos, J. D. Bronzino, D. R. Peterson, *Tissue Engineering : Principles and Practices*, CRC Press, **2012**.
- [308] T. Mes, Hydrogen Bonding Induced Order in Supramolecular Polymers, TU Eindhoven, **2011**.
- [309] M. J. Webber, E. A. Appel, E. W. Meijer, R. Langer, *Nat. Mater.* **2015**, 15, 13–26.
- [310] T. F. A. De Greef, M. M. J. Smulders, M. Wolffs, A. P. H. J. Schenning, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 5687–5754.
- [311] G. H. Escamilla, G. R. Newkome, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1994**, 33, 1937–1940.
- [312] X. Du, J. Zhou, J. Shi, B. Xu, *Chem. Rev.* **2015**, 115, 13165–13307.

- [313] J. W. Steed, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3686–3699.
- [314] X. Zhao, Y. L. Chang, F. W. Fowler, J. W. Lauher, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6627–6634.
- [315] R. P. Sijbesma, *Science* **1997**, *278*, 1601–1604.
- [316] S. E. Gibson, M. P. Castaldi, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 4718–4720.
- [317] K. Hanabusa, A. Kawakami, M. Kimura, H. Shirai, *Chem. Lett.* **1997**, *26*, 191–192.
- [318] J. Van Esch, F. Schoonbeek, M. De Loos, H. Kooijman, A. L. Speck, R. M. Kellogg, B. L. Feringa, *Chem. - A Eur. J.* **1999**, *5*, 937–950.
- [319] A. J. Wilson, J. van Gestel, R. P. Sijbesma, E. W. Meijer, *Chem. Commun.* **2006**, *0*, 4404–4406.
- [320] T. Junkers, T. M. Lovestead, C. Barner-Kowollik, in *Handb. RAFT Polym.*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**, pp. 105–149.
- [321] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.* **2012**, *65*, 985–1076.
- [322] C. Herfurth, P. Malo de Molina, C. Wieland, S. Rogers, M. Gradzielski, A. Laschewsky, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1606–1617.
- [323] I. Degani, R. Fochi, A. Gatti, V. Regondi, *Synthesis* **1986**, *11*, 894–899.
- [324] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken, in *Polym. Synth. Eig. Und Anwendungen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 43–96.
- [325] D. J. Keddie, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **2012**, *45*, 5321–5342.
- [326] H. Willcock, R. K. O'Reilly, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 149–157.
- [327] W. Shen, Q. Qiu, Y. Wang, M. Miao, B. Li, T. Zhang, A. Cao, Z. An, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 1444–1448.
- [328] Y. Shi, G. Liu, H. Gao, L. Lu, Y. Cai, *Macromolecules* **2009**, *42*, 3917–3926.
- [329] H. H. Winter, F. Chambon, *J. Rheol.* **1986**, *30*, 367–382.
- [330] R. S. Mahla, *Int. J. Cell Biol.* **2016**, *2016*, 1–24.
- [331] M. Harre, K. Nickisch, U. Tilstam, *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 111–114.

9. Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abb. 1: Konzept der Geweberekonstruktion. (https://de.wikipedia.org/wiki/Tissue_Engineering#/media/File:Tissue_engineering_deutsch.jpg).....	2
Abb. 2: Mögliche Zellteilungen einer Stammzelle (S: Stammzelle; P: Progenitorzelle) A: Asymmetrische Zellteilung; B: Symmetrische Zellteilung; C: Kombination aus A und B in Abhängigkeit der lokalen Umgebung.....	5
Abb. 3: Publikationen über embryonale (ESCs) bzw. induziert pluripotente Stammzellen (iPSCs) von 1988 – 2016. (Citation Report Web Of Science).....	6
Abb. 4: Schematischer Aufbau einer Stammzellnische. (From F. M. Watt, B. L. M. Hogan, Science 2000, 287, 1427–1430. Reprinted with permission from AAAS.).....	8
Abb. 5: Schematische Darstellung einer extrazellulären Matrix mit adhärenter Zelle. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Figure_04_06_01.jpg).....	9
Abb. 6: Klassifizierung von Gelen.....	10
Abb. 7: Klassifizierung von Hydrogelen.....	11
Abb. 8: Darstellung einer <i>in-situ</i> -Vernetzung anhand von Polyacrylaten (X: beliebiger <i>spacer</i> ; roter Rest: beliebige Funktionalität (z.B. Peptide)).....	13
Abb. 9: Darstellung einer nachträglichen Vernetzung anhand eines funktionalisierten Polyacrylats (R ₁ : Acrylat-Rest; roter Punkt: vernetzbare Gruppe); A: Netzwirkbildung über Reaktion mit bifunktionellem Vernetzer (X: beliebiger <i>spacer</i> , blauer Punkt: reaktive Gruppe); B: Netzwirkbildung über Reaktion mit einem komplementär funktionalisierten Präpolymer.....	14
Abb. 10: Schematische Darstellung des Hook-, Newton- und Kelvin-Voigt-Elements.....	17
Abb. 11: Darstellung der Deformations- und Schubspannungskurve mit dem Phasenverschiebungswinkel δ	18
Abb. 12: Anforderungsprofil an künstliche extrazelluläre Matrizen.....	25
Abb. 13: Allgemeines Design des entwickelten Hydrogelsystems.....	33
Abb. 14: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.....	37
Abb. 15: Gestaffelte Darstellung eines Ausschnitts der ¹ H-NMR-Spektren in CDCl ₃ von DTT (A), P(AMor-co-BMAC)-SH nach der ersten Fällung in IPA (B) und P(AMor-co-BMAC)-SH nach der zweiten Fällung in Et ₂ O (C).....	41
Abb. 16: Ausschnitt des ¹ H-NMR-Spektrums in CDCl ₃ von P1.....	43

Abb. 17: Langzeitstabilitätsuntersuchungen von 10 %(w/v) P1-Gelen bei verschiedenen pH-Werten (gemittelt aus fünf Proben).	48
Abb. 18: Rheologische Untersuchung der Gelierungszeit einer 10 %(w/v) P1-Lösung unter Verwendung verschiedener NaBrO ₃ -Äquivalente bei 25 °C mit konstanter Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 0,2 %. Die G' -Werte werden durch die ausgefüllten und G'' -Werte durch die unausgefüllten Symbole dargestellt. Des Weiteren wurde eine Glättung der Werte zur besseren Übersicht durchgeführt, wobei der gleitende Durchschnitt verwendet wurde (unbearbeiteter Graph im Anhang).	49
Abb. 19: Graphische Darstellung der Gelierungszeiten und E-Moduli in Abhängigkeit der NaBrO ₃ -Äquivalente aus 10 %(w/v) P1-Gelen.....	51
Abb. 20: Auftragungen von E und $Q_{m,s}$ bzw. ζ und $Q_{m,s}$ in Abhängigkeit der P1-Konzentration.	53
Abb. 21: Fotografie eines 10 %(w/v) P1-Gels in 0,01 M PBS nach der Gelierung (links) und nach der Quellung (rechts).	57
Abb. 22: Transmissionsmessungen von Gelen aus P1-Lösungen verschiedener Konzentrationen.	58
Abb. 23: Polymerstruktur von P(AMor-co-BMAC-co-TMAEA*I).	60
Abb. 24: Ausschnitt des ¹ H-NMR-Spektrums in CDCl ₃ von P7.	62
Abb. 25: Tetrapeptid RGDS.....	64
Abb. 26: Struktur von MIC-6Ahx-GRGDSW.	65
Abb. 27: Struktur von MIC-6Ahx-YGRGDS (Pep-1).	68
Abb. 28: ¹ H-NMR-Spektrum in DMSO-d ₆ von P2-RGD.	71
Abb. 29: Mikroskopieaufnahmen der HEK293-Zellen auf unterschiedlich behandelten 10 %(w/v) P1-Gelen nach vier Tagen in DMEM; A) unbehandelte Probe (roter Kasten zeigt Kontamination an), B) Probe für 30 min mit EtOH behandelt, C) Probe für 15 min mit UV-Licht bestrahlt (254 nm).	75
Abb. 30: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils (Kontrolle Zellkulturplastik).	77
Abb. 31: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1 – G5 mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.	78
Abb. 32: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Peptidanteils (Kontrolle Zellkulturplastik).	79
Abb. 33: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1, G6 – G9 mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.	79

Abb. 34: A) Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils mit und ohne 2 mol% Pep-1; B) Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Peptidanteils mit und ohne 10 mol% TMAEA*OTf (Kontrolle Zellkulturplastik).	81
Abb. 35: Mikroskopieaufnahmen der Gele mit den jeweiligen Kombinationen der Pep-1- und TMAEA*OTf-Funktionalisierungen mit HEK293-Zellen nach einem Tag Kultivierung.....	81
Abb. 36: Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils (Kontrolle Zellkulturplastik).	83
Abb. 37: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1 – G5 mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.	83
Abb. 38: Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des Peptidanteils (Kontrolle Zellkulturplastik).	84
Abb. 39: Mikroskopieaufnahmen der Gele G1, G6 – G9 mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.	85
Abb. 40: A) Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des TMAEA*OTf-Anteils mit und ohne 2 mol% Pep-1; B) Zellviabilität von mESCs in Abhängigkeit des Peptidanteils mit und ohne 10 mol% TMAEA*OTf (Kontrolle Zellkulturplastik).	85
Abb. 41: Mikroskopieaufnahmen der Gele mit den jeweiligen Kombinationen der Pep-1- und TMAEA*OTf-Funktionalisierungen mit mESCs nach einem Tag Kultivierung.	86
Abb. 42: Schematische Übersicht einer weichen Zelle auf einem weichen Substrat (A) einer steifen Zelle auf einem steifen Substrat (B). (schwarze Linie: Substrat, rote Kreise: fokale Adhäsionspunkte, blaue Linie: Zelle, grüne Pfeile: Aktinfasern).	87
Abb. 43: Zellviabilitäten von HEK293-Zellen und mESCs in Abhängigkeit der Festigkeit (Kontrolle Zellkulturplastik).	88
Abb. 44: Mikroskopieaufnahmen von HEK293-Zellen (oben) und mESCs (unten) auf Gelen mit unterschiedlichen Festigkeiten nach einem Tag Kultivierung.	89
Abb. 45: Die zur Vernetzung von P1 eingesetzten PEGDAs, wobei die ungefähre Molmasse der einzelnen Moleküle durch die Zahl in der jeweiligen PEGDA-Abkürzung beschrieben wird.	90
Abb. 46: Zellviabilität von HEK293-Zellen in Abhängigkeit des Gelierungsmittels. (Duplikate aus einer 10 % (w/v)-igen P1-Lösung in PBS (0,01 M, pH 7,4) mit 1 eq. des entsprechenden Gelierungsmittels (Kontrolle Zellkulturplastik).	93
Abb. 47: 2-(Pyridin-2-yl)disulfanyl)ethyl-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoat.	97

Abb. 48: <i>Bis</i> (2-methacrylamidoethyl)-3,3'-disulfandioldipropionat (BMADDP, rot: Propionsäureeinheit).....	99
Abb. 49: Abbauxperimente von 10 % (w/v) P9-Gelen bei verschiedenen pH-Werten (gemittelt aus fünf Proben).	101
Abb. 50: Schematische Darstellung eines (A) konventionellen Amphiphils und eines (B) Bolaamphiphils (blau: polare Kopfgruppe; rot: hydrophober Schwanz).	107
Abb. 51: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur eines harnstoffbasierten LMWGs. (Reprinted with permission from L. A. Estroff, A. D. Hamilton, <i>Chem. Rev.</i> 2004 , <i>104</i> , 1201–1218. Copyright (2004) American Chemical Society.).....	108
Abb. 52: Darstellung der komplementären Wasserstoffbrückenbindungen von Harnstoff- <i>N,N'</i> -dicarbonsäuren.	108
Abb. 53: Struktur eines Polymers basierend auf einem bifunktionalen UPy-Derivat.	109
Abb. 54: Strukturen der C_3 -symmetrischen Hydrogelatormotive CycTA (A) und BTA (B). 109	
Abb. 55: Kooperative Wechselwirkungen des BTA-Motivs. (WW: Wechselwirkungen, H-Brücken: Wasserstoffbrücken).....	110
Abb. 56: Aggregation und Darstellung der Wasserbrückenbindungen von BTA-Motiven. ^[309]	110
Abb. 57: Darstellung der verschiedenen Bereiche eines PEG-funktionalisierten LMWG auf Basis eines CycTA-Motivs.....	111
Abb. 58: Struktur der PEG-basierten und mit BTA-funktionalisierten inversen Bolaamphiphile nach TRISTAN MES.	111
Abb. 59: Aggregation und Gelbildung der BTA-PEG-Hydrogelatoren in wässriger Lösung. (Sicht von oben). ^[309]	112
Abb. 60: RAFT-Reagenz: (4-Cyanopentansäure)dithiobenzoat.	113
Abb. 61: Design und retrosynthetische Betrachtung des BTA-Hydrogelators.	116
Abb. 62: ¹ H-NMR-Spektrum in DMSO- <i>d</i> ₆ von BTA-Mal.	119
Abb. 63: ¹ H-NMR-Spektrum in CDCl ₃ einer DMAEMA-Polymerisationslösung nach 6 h mit 1,3,5-Trioxan als internen Standard.	122
Abb. 64: Auftragung der Extinktion bei 433 nm gegen die Zeit zur kinetischen Untersuchung der Aminolyse von DTTC-P(AMor)-DTTC mit Hydrazin (2,5 eq.) und <i>n</i> -Butylamin (20 eq.).	125
Abb. 65: UV/Vis-Spektren des α,ω -telechelen P(AMor) vor und nach der Aminolyse.....	126
Abb. 66: ¹ H-NMR-Spektrum in DMSO- <i>d</i> ₆ von BTA-P(AMor)-BTA.....	127

Abb. 67: Rheologische Untersuchung einer 20 % (w/v)-igen BTA-P(AMor)-BTA-Lösung bei zu- (ausgefüllt) und abnehmender (transparent) Frequenz (25 °C, 1 % Deformation).....	129
Abb. 68: Anforderungsprofil von künstlichen EZMs.	131
Abb. 69: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses.	132
Abb. 70: Design des in dieser Arbeit hergestellten Hydrogelators.	135
Abb. 71: EDA-CDP ₂	136

9.2 Schemata

Schema 1: Allgemeines Reaktionsschema der Acetalbildung aus einem Keton/Aldehyd und zwei Alkoholen.	29
Schema 2: Oxidation von Thiolen zu Disulfiden mittels Natriumbromat.....	30
Schema 3: Synthese von BMAC aus Methacryloylchlorid und Cystamin Dihydrochlorid.....	34
Schema 4: Freie radikalische <i>in-situ</i> -vernetzende Copolymerisation eines Acrylat- bzw. Acrylamidmonomers und BMAC unter der Verwendung des Azoinitiators V-70.....	34
Schema 5: Reduktive Spaltung eines disulfidhaltigen, acrylatbasierten Hydrogels durch DTT unter basischen Bedingungen.....	35
Schema 6: Regelung durch Oxidation der polymergebundenen Thiole durch Natriumbromat.	36
Schema 7: Zugrunde liegende Reaktion des Ellman's Assay (PP8: Phosphat-Puffer, pH 8)..	43
Schema 8: Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von polymergebundenen Thiolen (P-SH) mit einer äquimolaren Menge eines niedermolekularen Disulfids (z.B. DTDS).	46
Schema 9: Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von polymergebundenen Thiolen (P-SH) mit 0,5 eq. eines niedermolekularen Disulfids (z.B. DTDS).....	46
Schema 10: Redoxgleichung der Oxidation von P-SH mit NaBrO ₃	50
Schema 11: Synthese von TMAEA*I.	60
Schema 12: Redoxreaktion von Iod/Iodid und die Bildung von Triiodid.....	61
Schema 13: Synthese von TMAEA*OTf.....	61
Schema 14: Peptidfunktionalisierung der polymergebundenen Thiolgruppen über eine Thiol-Michael-Klickreaktion.	65
Schema 15: Synthese von MIC.	67
Schema 16: Oxidation von Tryptophan zu Kynurenin.....	68
Schema 17: Mechanismus der Thiol-Michael-Klickreaktion nach XI <i>et al.</i> ^[238]	70
Schema 18: Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin unter Verwendung von ATP und Sauerstoff (AMP: Adenosinmonophosphat; PP _i : Diphosphate).....	76

Schema 19: Synthese von PEGDA3500 (DCM: Dichlormethan).	91
Schema 20: Ester-Funktionalisierung von P1 mittels Maleimidopropionsäure- <i>N</i> -succinimidat (MIP-NHS) und Mercaptoethanol.....	95
Schema 21: Syntheschema der Herstellung von MIP-NHS aus β -Alanin, Maleinsäure und NHS mittels DCC.....	96
Schema 22: Konvergente Synthese von MIP-DPE.....	97
Schema 23: Konvergente Synthese von BMADDP.....	99
Schema 24: Mechanismus der RAFT-Polymerisation.....	114
Schema 25: Syntheseroute zur Herstellung des BTA-Motivs BTA-Mal.....	117
Schema 26: Syntheseroute zur Herstellung des α,ω -telechelen P(AMor).	120
Schema 27: Synthese von 2C12.....	121
Schema 28: Synthese von EDA-CDP ₂	124
Schema 29: Umsetzung von polymergebundenen Trithiocarbonaten zu Thiolen.	125

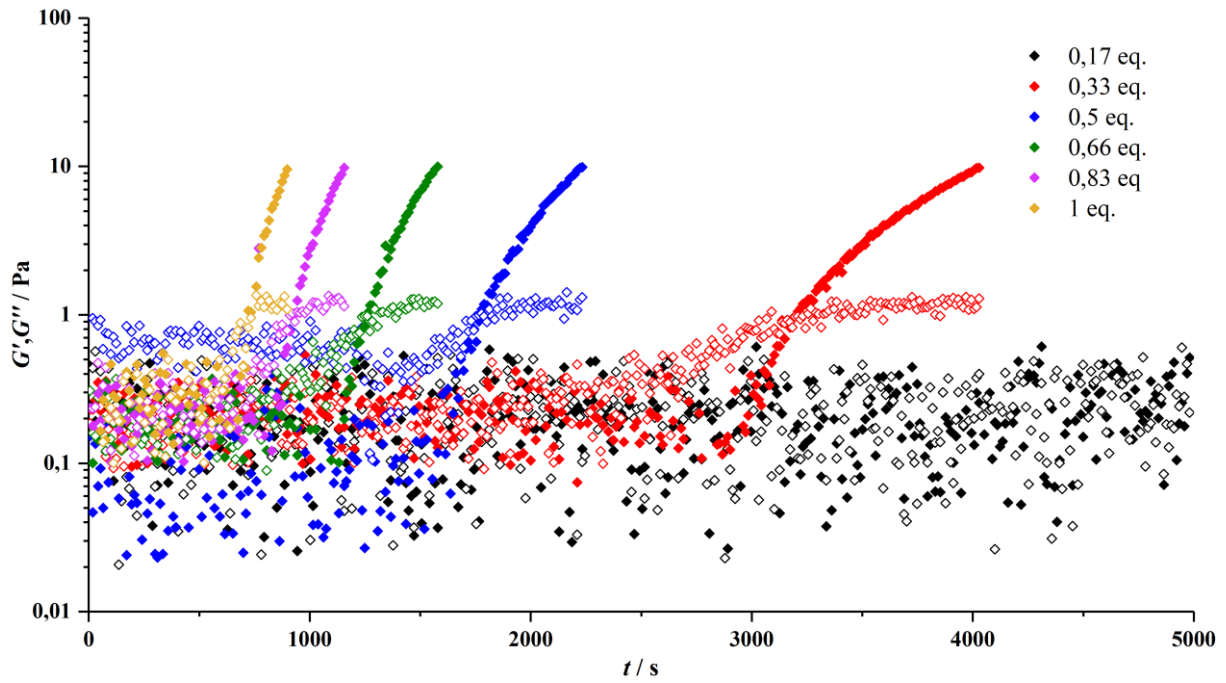
9.3 Tabellen

Tabelle 1: Ergebnisse des Monomerscreenings nach den einzelnen Abschnitten des Herstellungsprozesses.....	38
Tabelle 2: Copolymercharakterisierung von P1 und P2.....	44
Tabelle 3: Gelierungszeiten, Quelldaten, Speicher- und E-Moduli von Gelen aus einer 10 % (w/v) P1-Lösung in Abhängigkeit der NaBrO ₃ -Äquivalente.....	50
Tabelle 4: Quellwerte, Speicher-, Verlust- und E-Moduli sowie Maschenweite von Hydrogelen aus P1 in Abhängigkeit der Polymerkonzentration.....	52
Tabelle 5: Zusammensetzungen und GPC-Daten der verschiedenen P(AMor- <i>co</i> -BMAC)-Copolymere mit unterschiedlichen BMAC-Anteilen.....	55
Tabelle 6: Quellwerte, Maschenweite, Speicher-, Verlust- und E-Moduli von P(AMor- <i>co</i> -BMAC)-Hydrogelen in Abhängigkeit des BMAC-Anteils.....	56
Tabelle 7: Polymeranalytik der TMAEA*OTf funktionalisierten Copolymere P7 und P8.....	62
Tabelle 8: Moduli und Quellwerte in Abhängigkeit des TMAEA-Anteils.....	63
Tabelle 9: BMAC-Anteile vor und nach der Funktionalisierung mit Pep-1.....	71
Tabelle 10: Steifigkeit und Quellwerte von P2-RGD.....	72
Tabelle 11: Mischverhältnisse von P1 und P7 zur Variation des TMAEA*OTf-Anteils.....	76
Tabelle 12: Mischverhältnisse von P1 und P2-RGD zur Variation des Peptidanteils.....	78
Tabelle 13: Mischverhältnisse der Copolymere zur Variation des Peptidanteils bei konstantem TMAEA*OTf-Anteil bzw. des TMAEA*OTf bei gleichbleibendem Peptidanteil.....	80

Tabelle 14: Geleigenschaften der mit 1 eq. PEGDA-vernetzten P1-Gele in Abhängigkeit der Copolymerkonzentration und der PEG-Kettenlänge des Vernetzers.	91
Tabelle 15: Geleigenschaften der mit 0,5 eq. PEGDA-vernetzten P1-Gele in Abhängigkeit der Copolymerkonzentration und der PEG-Kettenlänge des Vernetzers.	92
Tabelle 16: Charakterisierung des esterfunktionalisierten Copolymers P9.	100
Tabelle 17: Moduli und Quellwerte von 10 % (w/v) P9 im Vergleich zu P1.	100
Tabelle 18: Puffersysteme der Abbauuntersuchungen.	101
Tabelle 19: Gemittelte Abbauraten in Abhängigkeit des pH-Wertes.	102
Tabelle 20: Einwaagen zur Synthese von P2-P6.	142
Tabelle 21: Einwaagen zur Synthese von P2-P6.	143
Tabelle 22: Charakteristische Signale der einzelnen Monomere.	143
Tabelle 23: Einwaagen der einzelnen Aminosäuren.	146
Tabelle 24: Zusammensetzungen der Gelierungslösungen für die kinetischen Untersuchungen.	148
Tabelle 25: Eingesetzte Mengen zur Herstellung von drei 0,5 mL-PEGDA-Gelen.	150
Tabelle 26: Zusammensetzungen der Pufferlösungen.	154

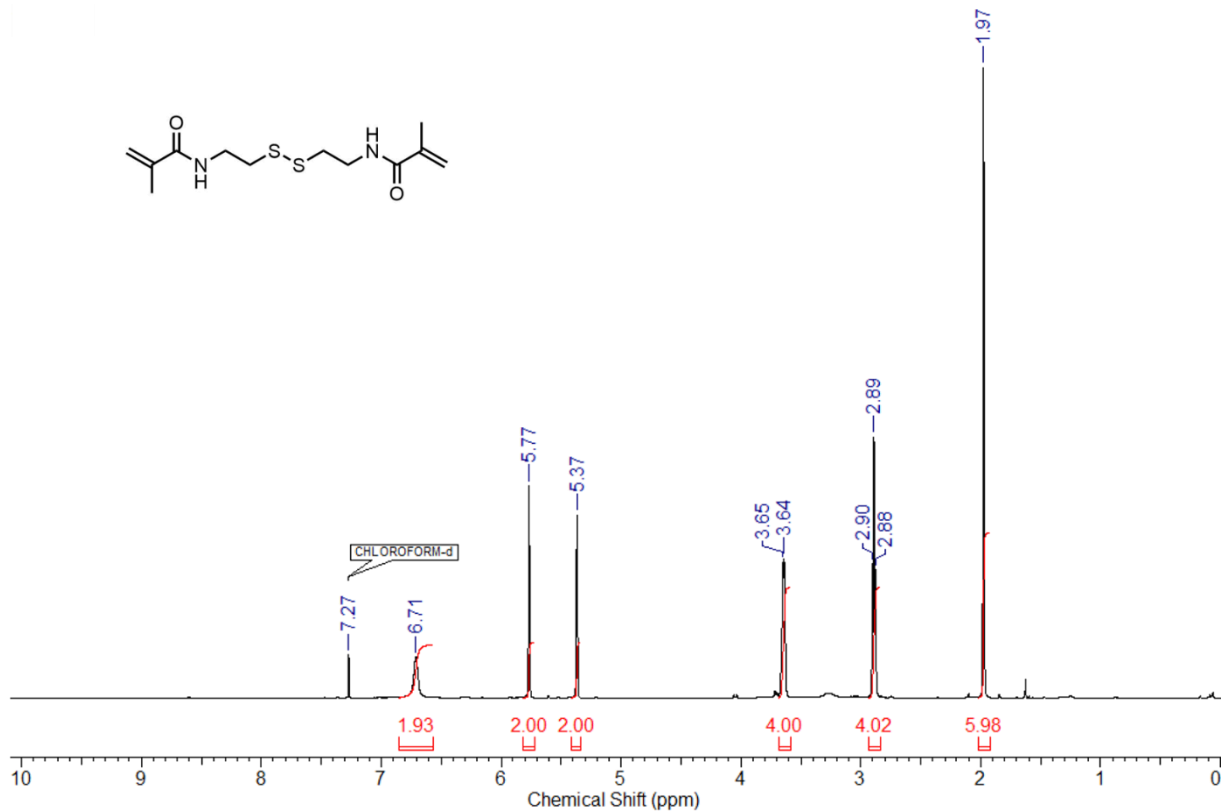
10. Anhang

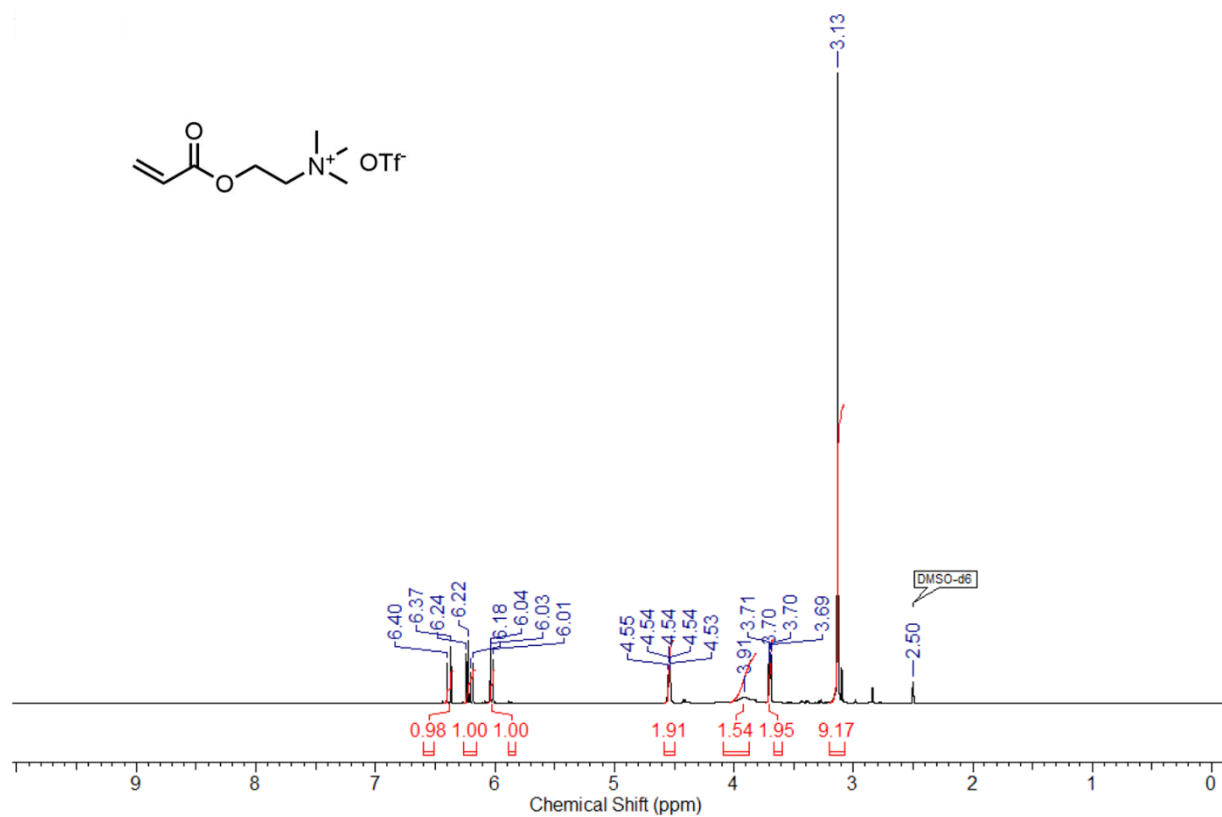
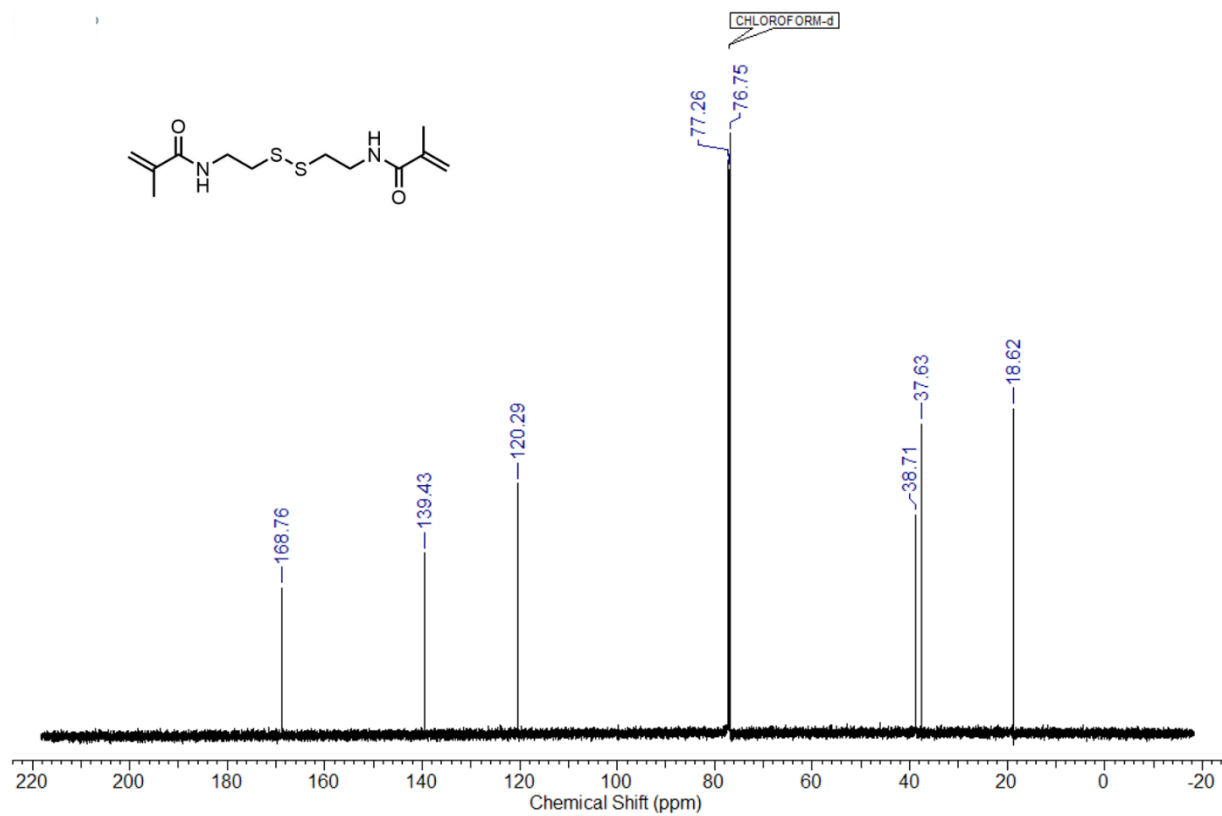
10.1 Graphen

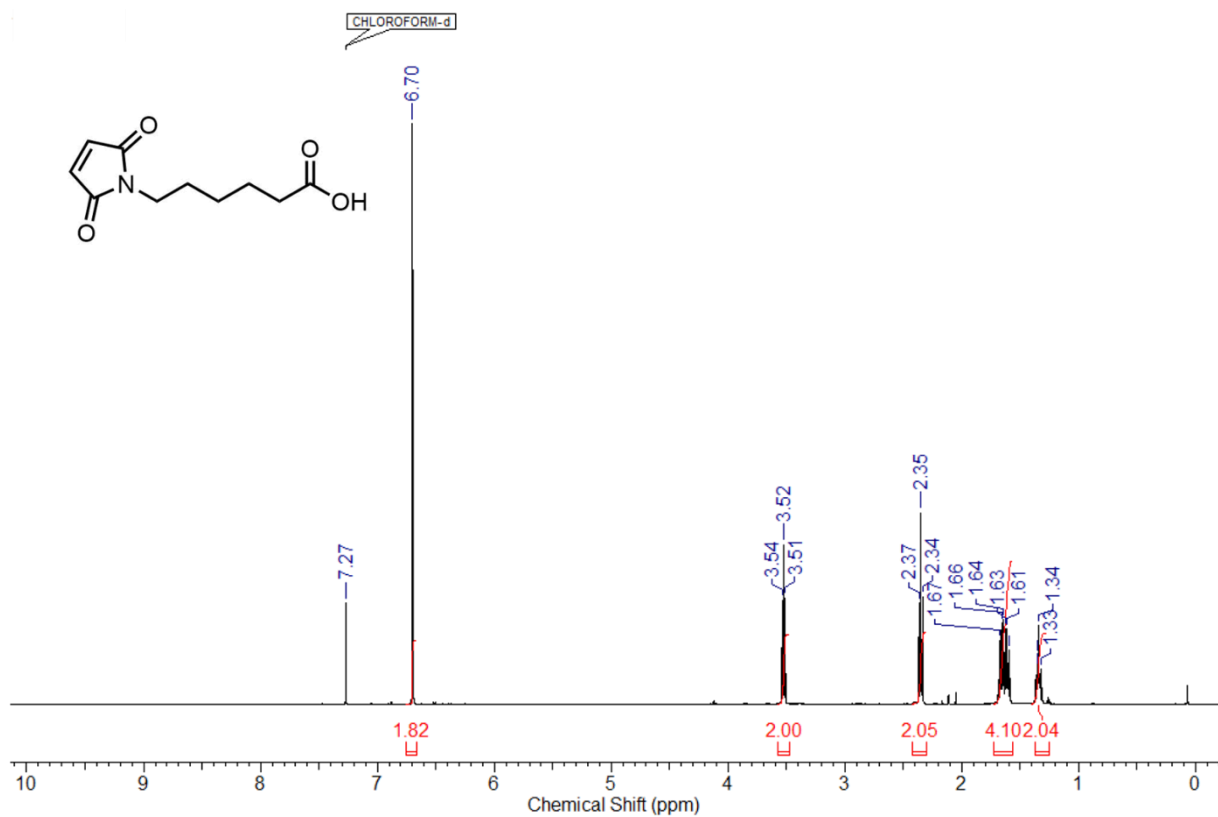
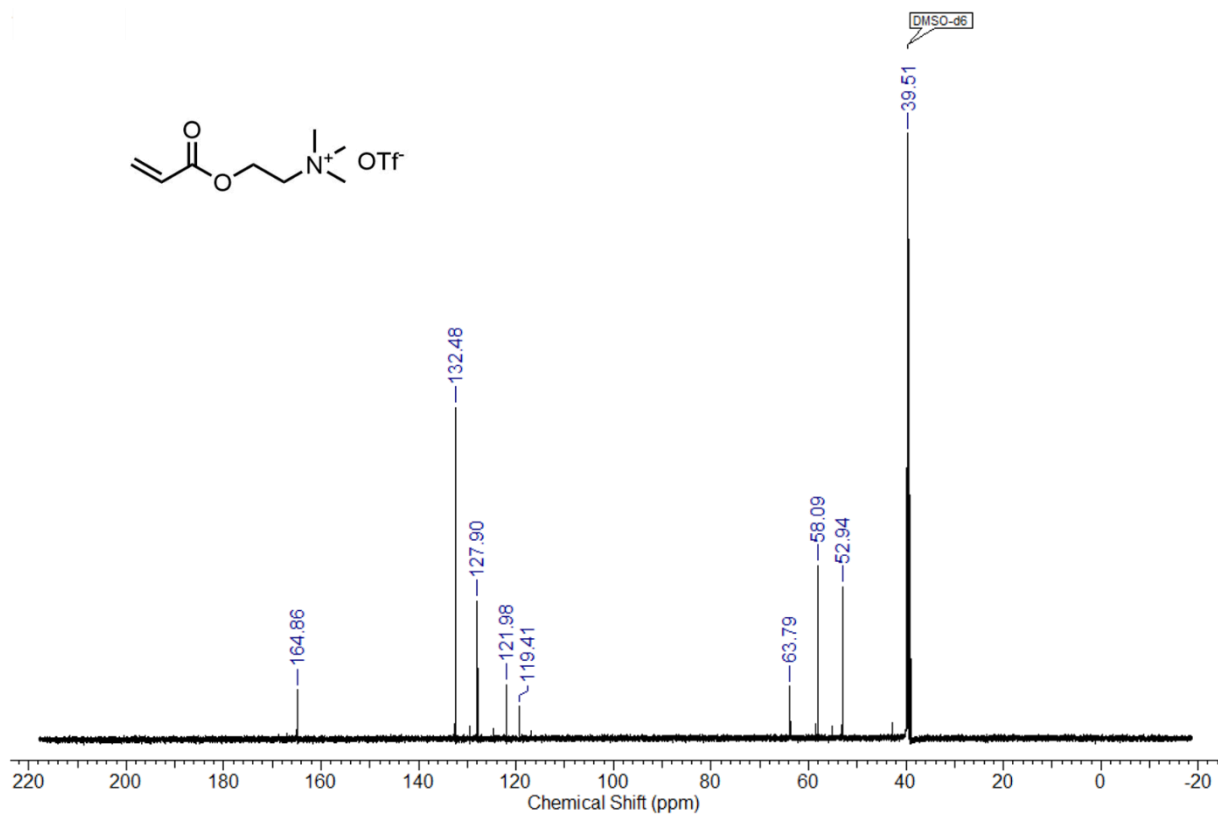


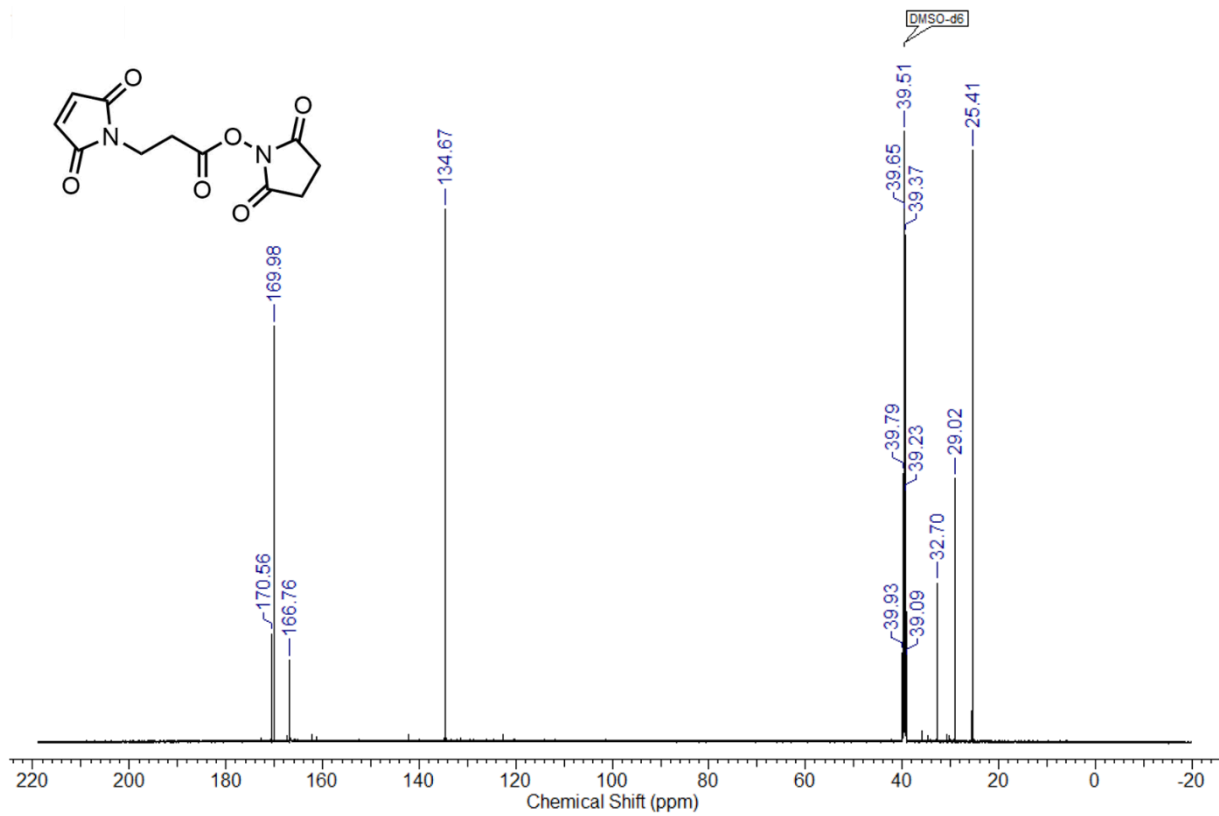
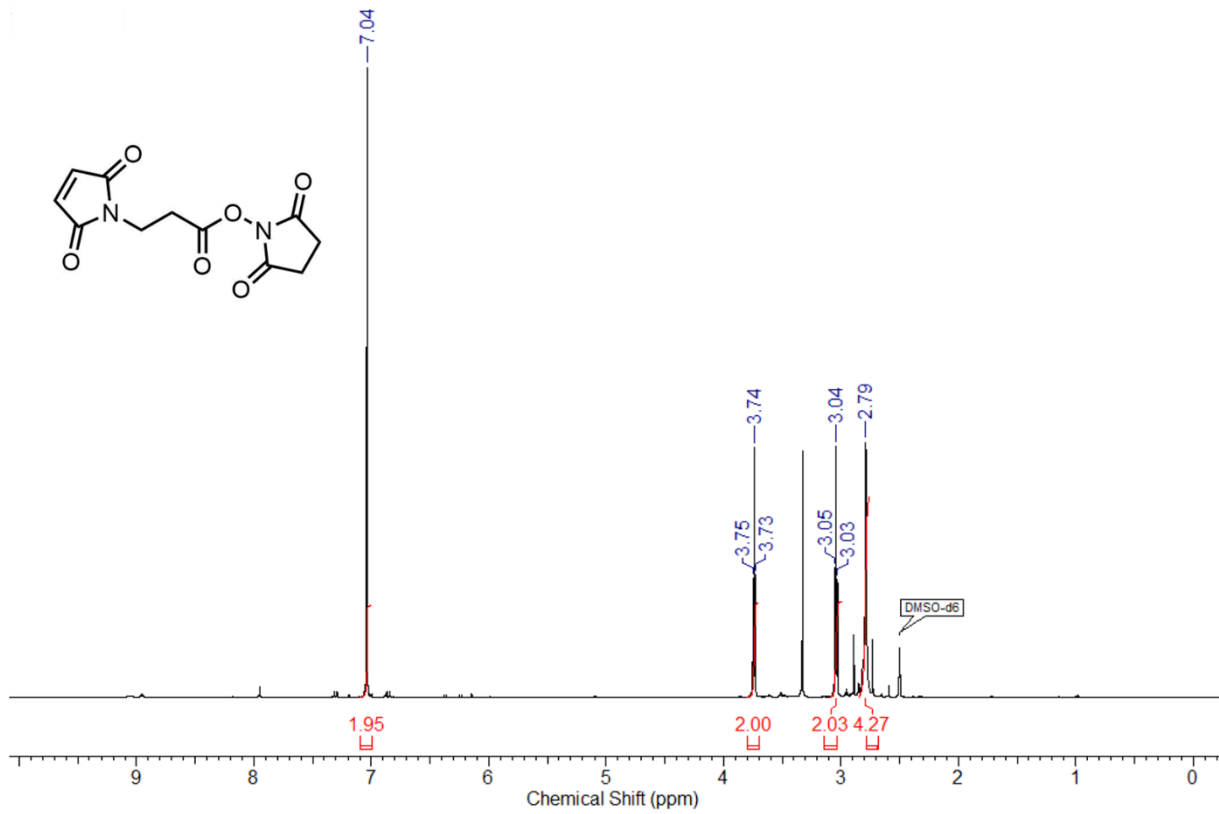
Unbearbeitete Version von Abb. 18.

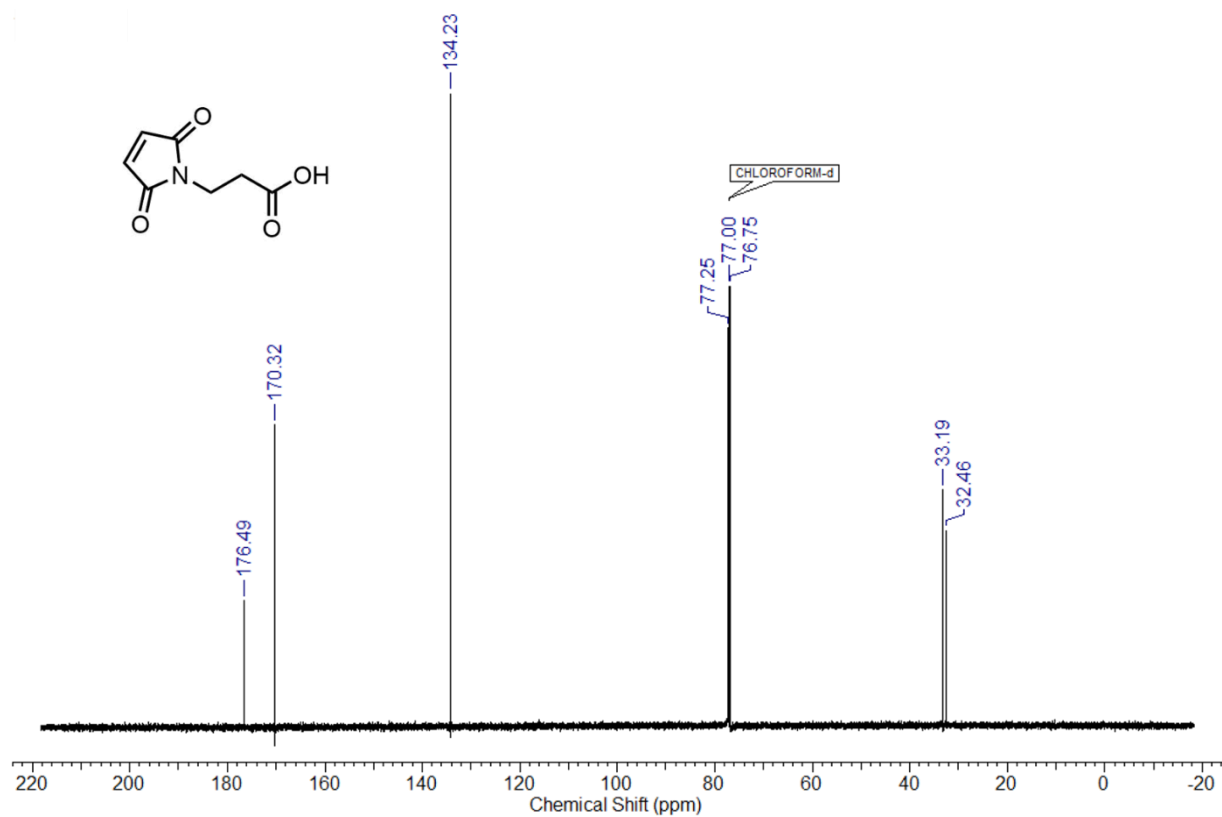
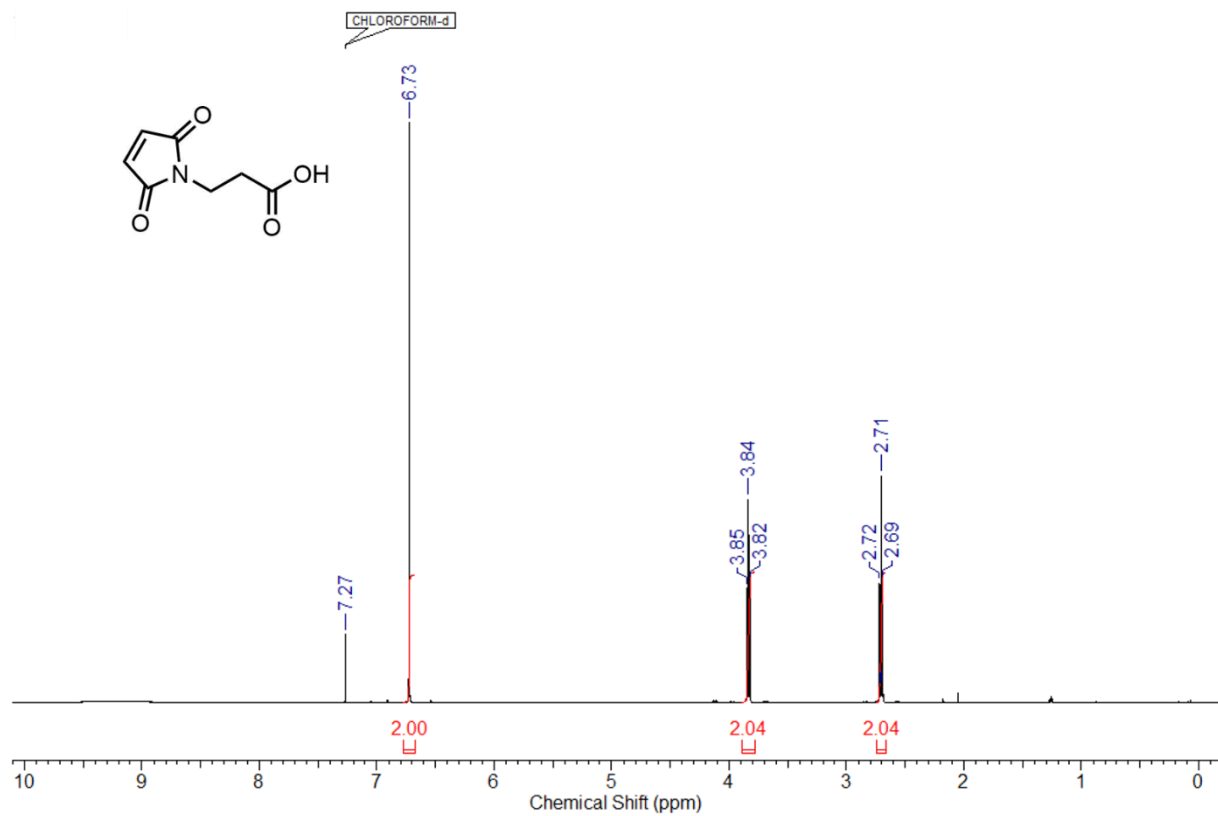
10.2 NMR-Spektren Moleküle

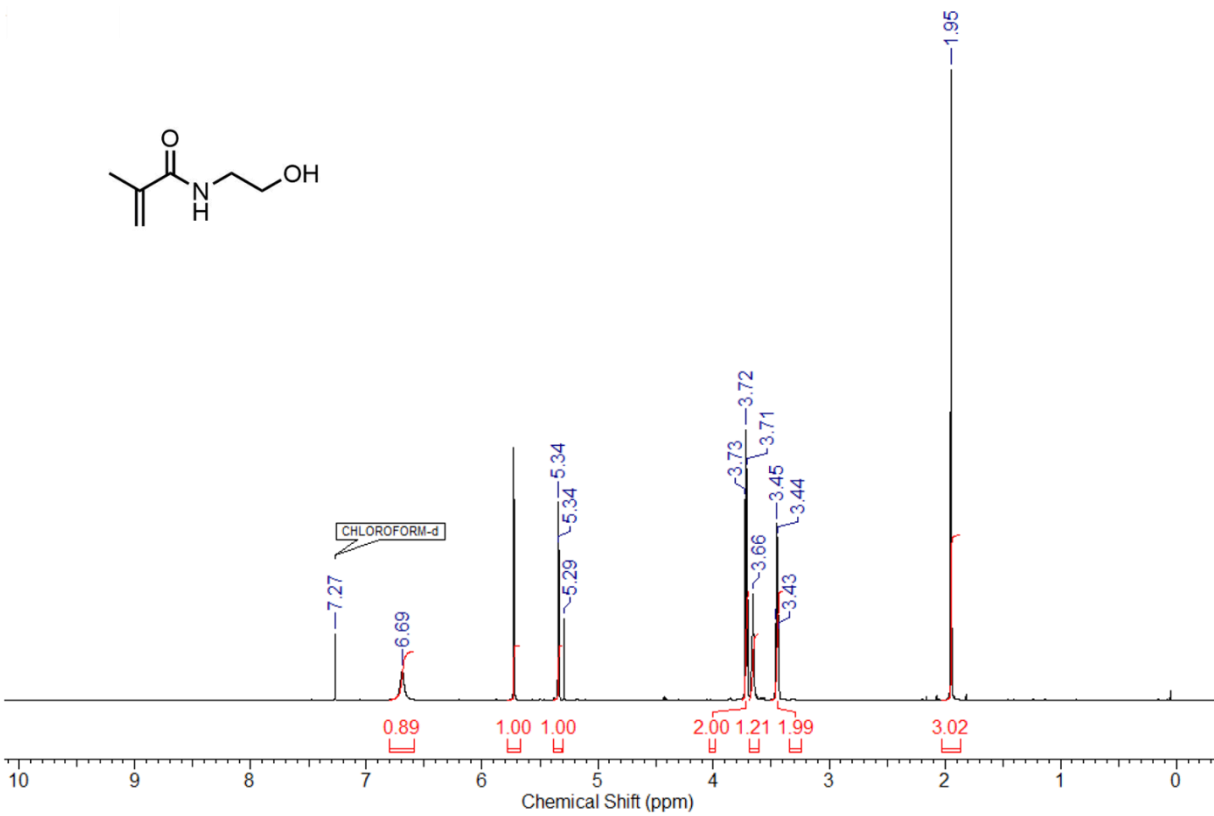
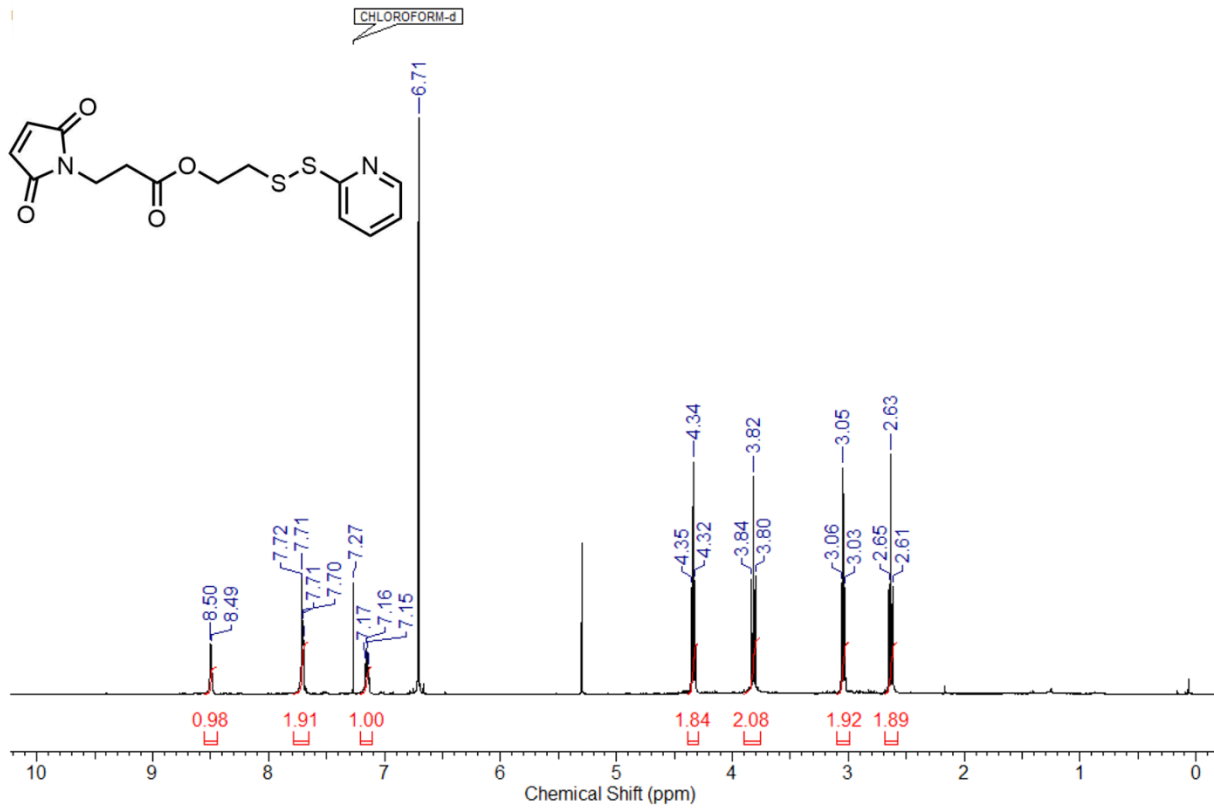


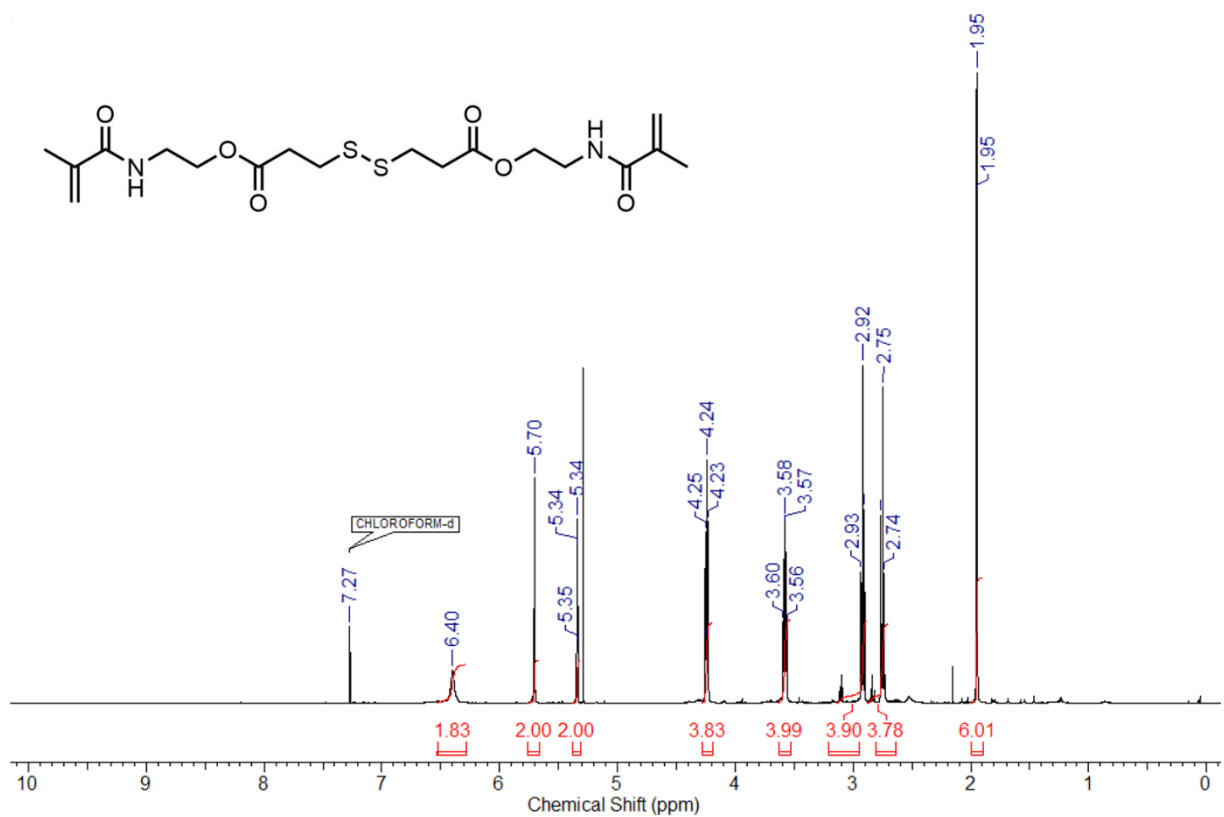
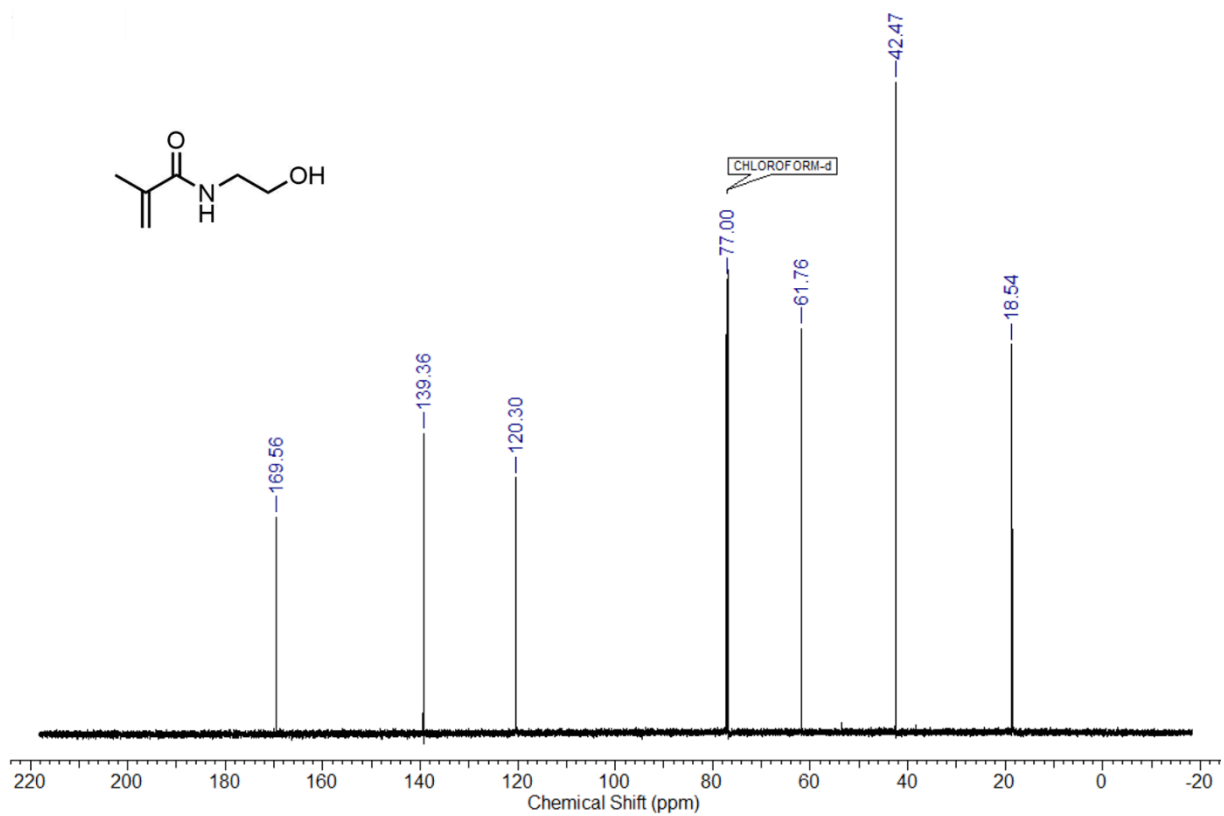


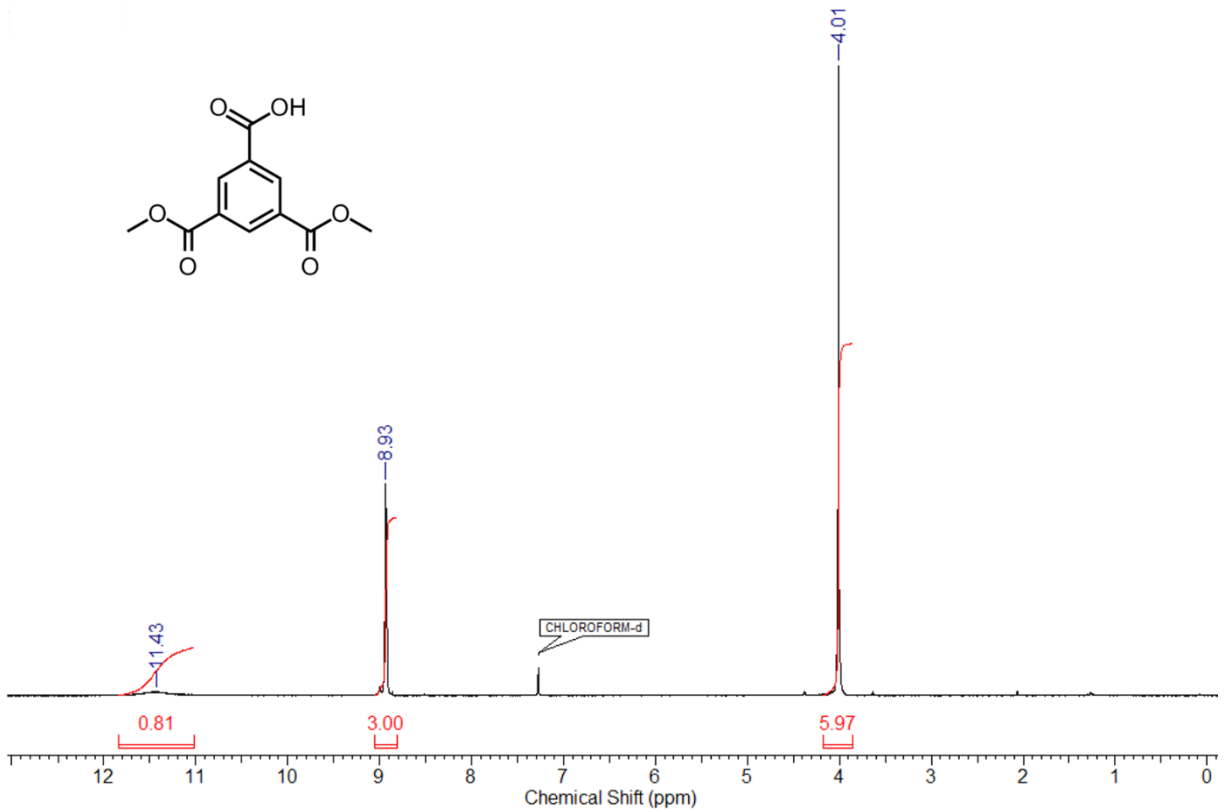
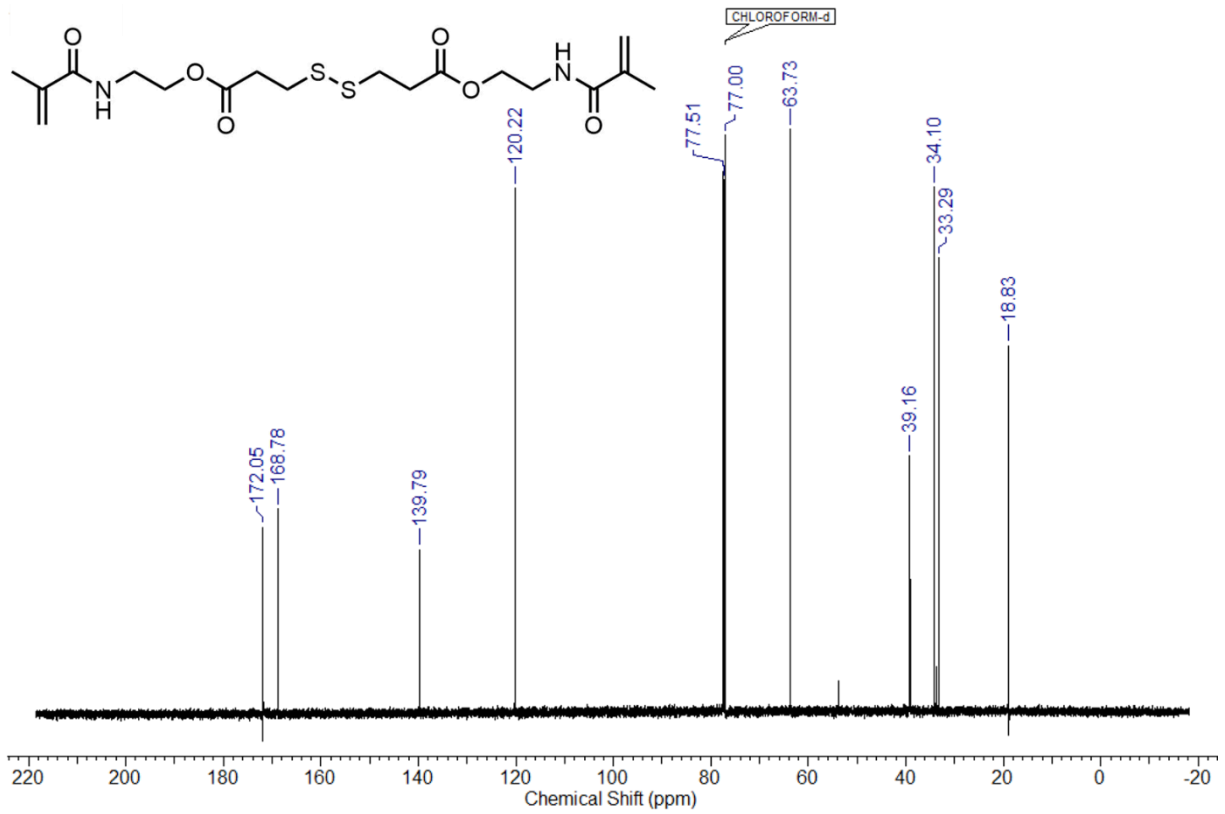


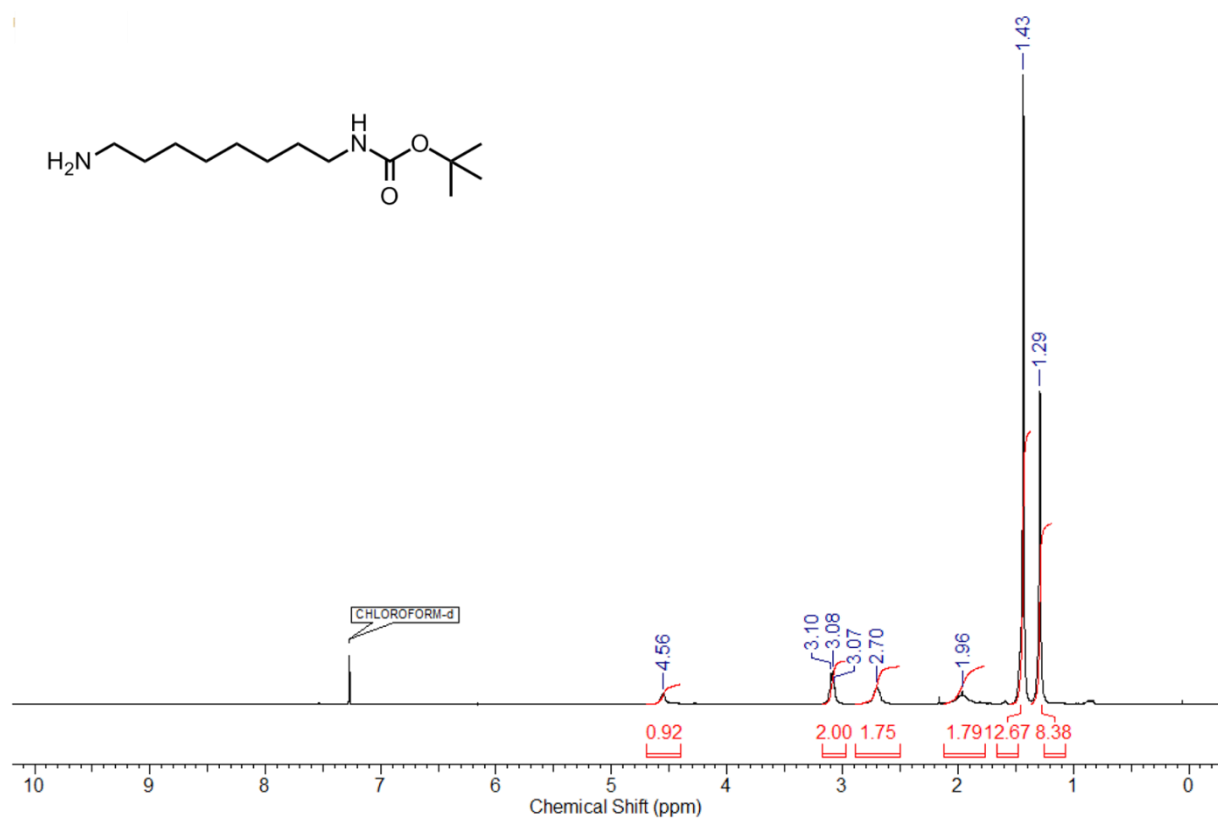
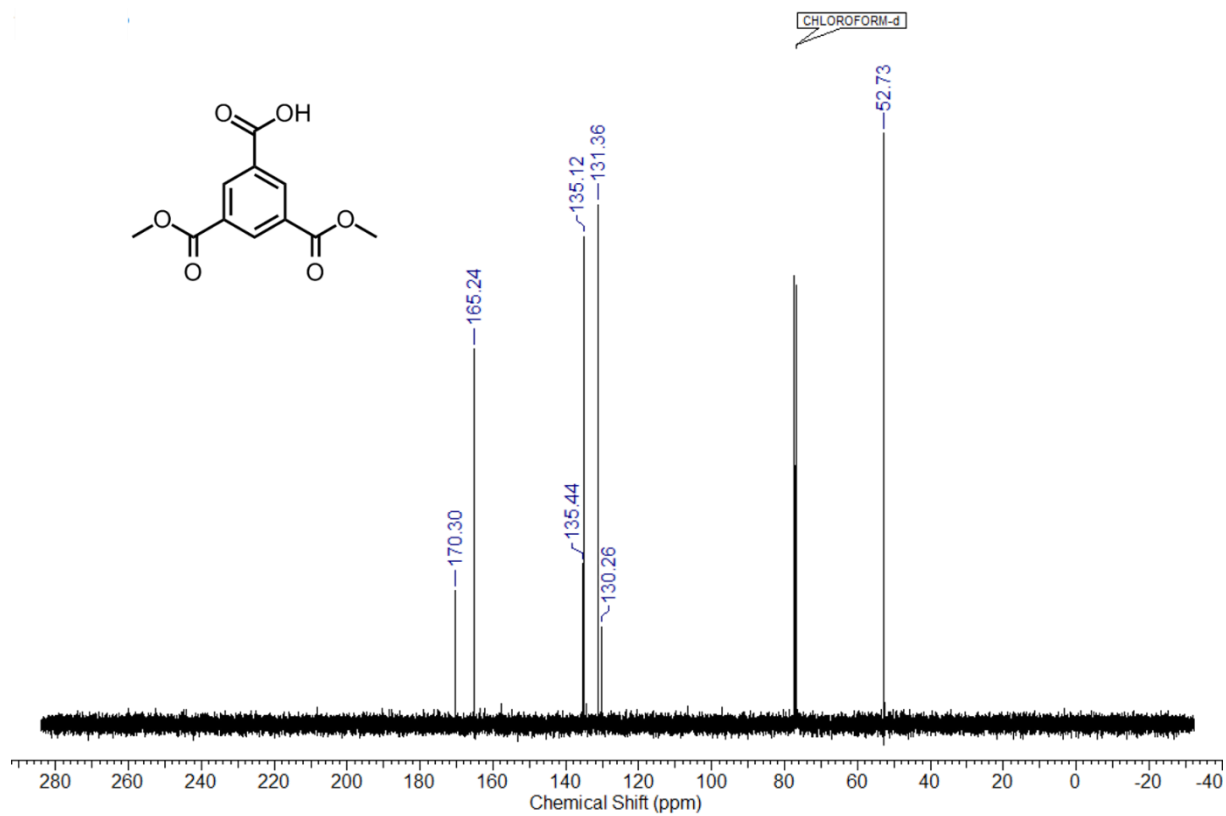


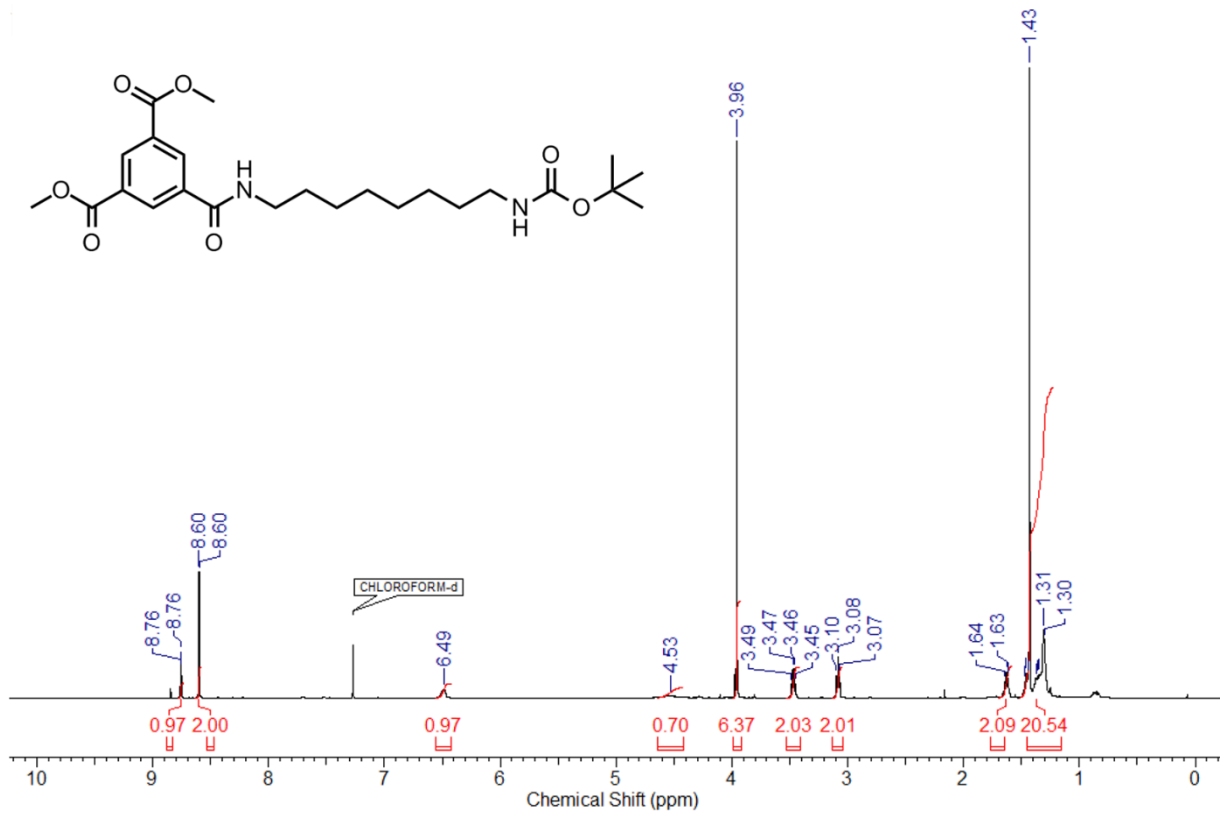
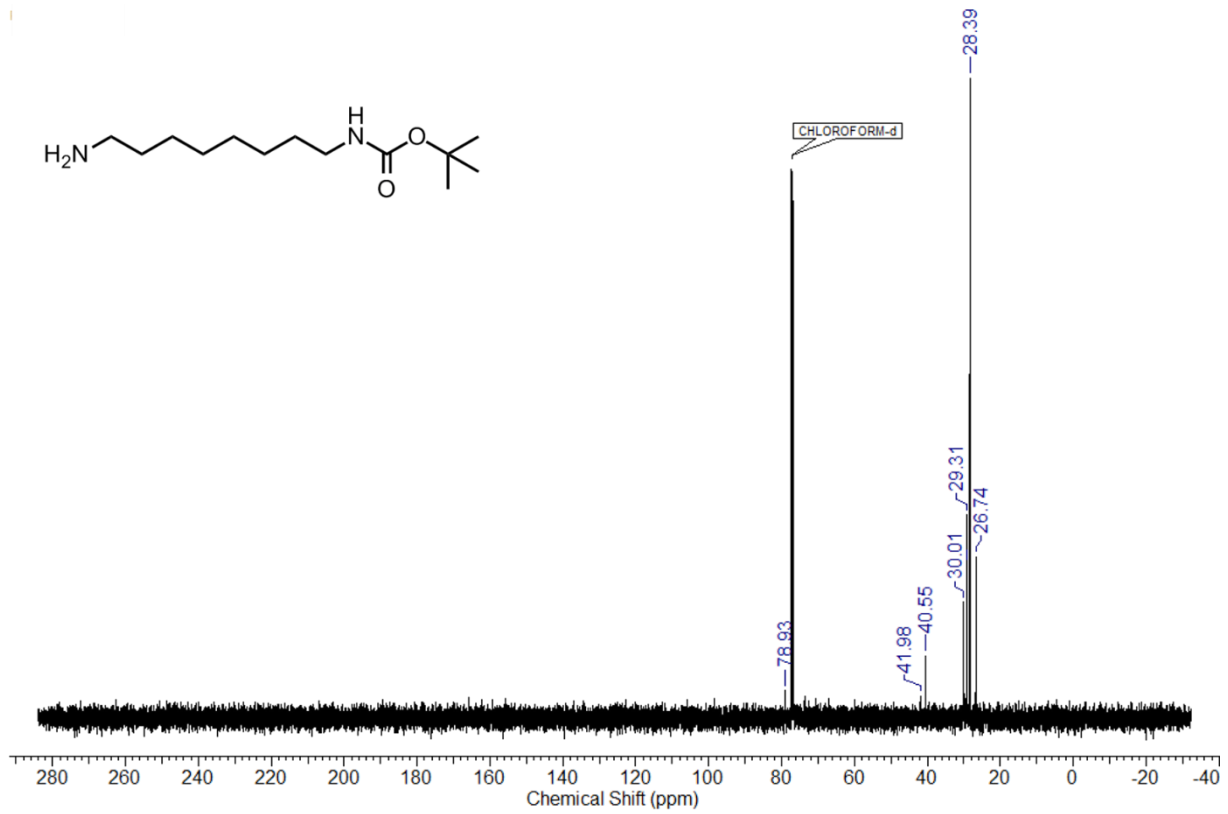


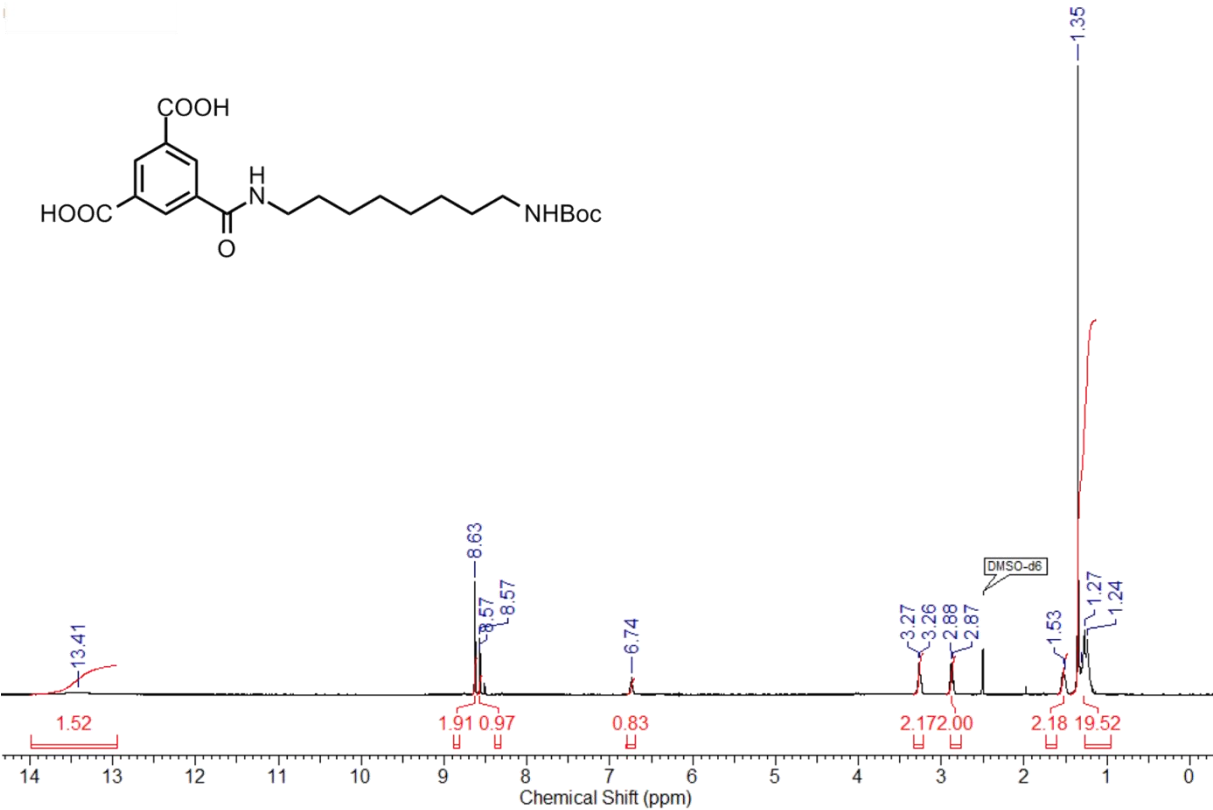
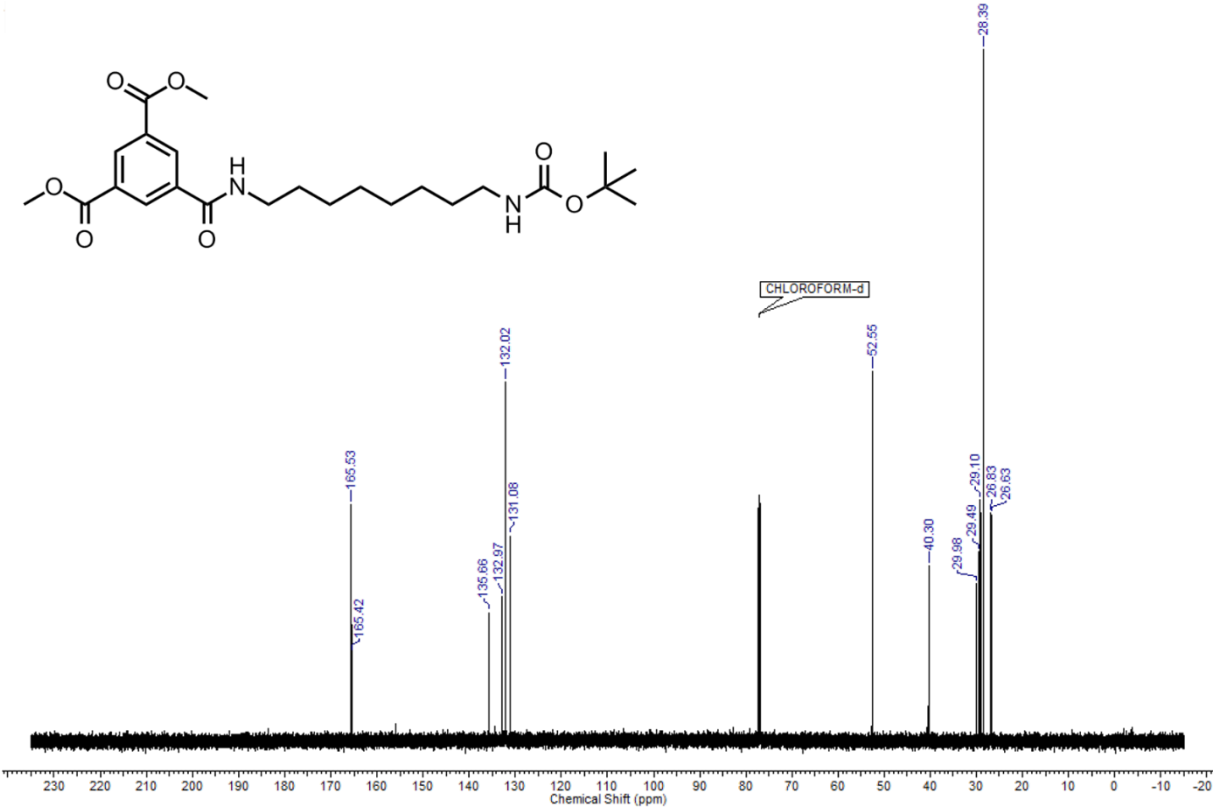


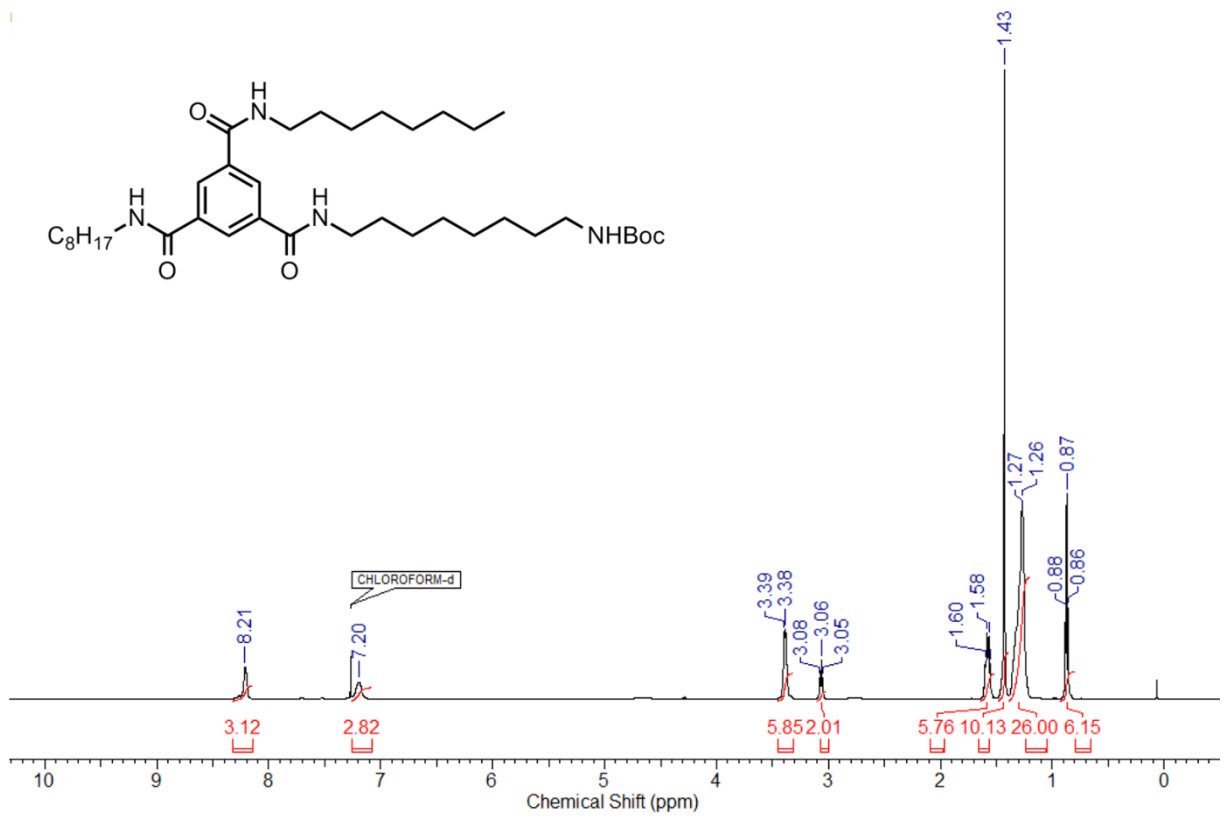
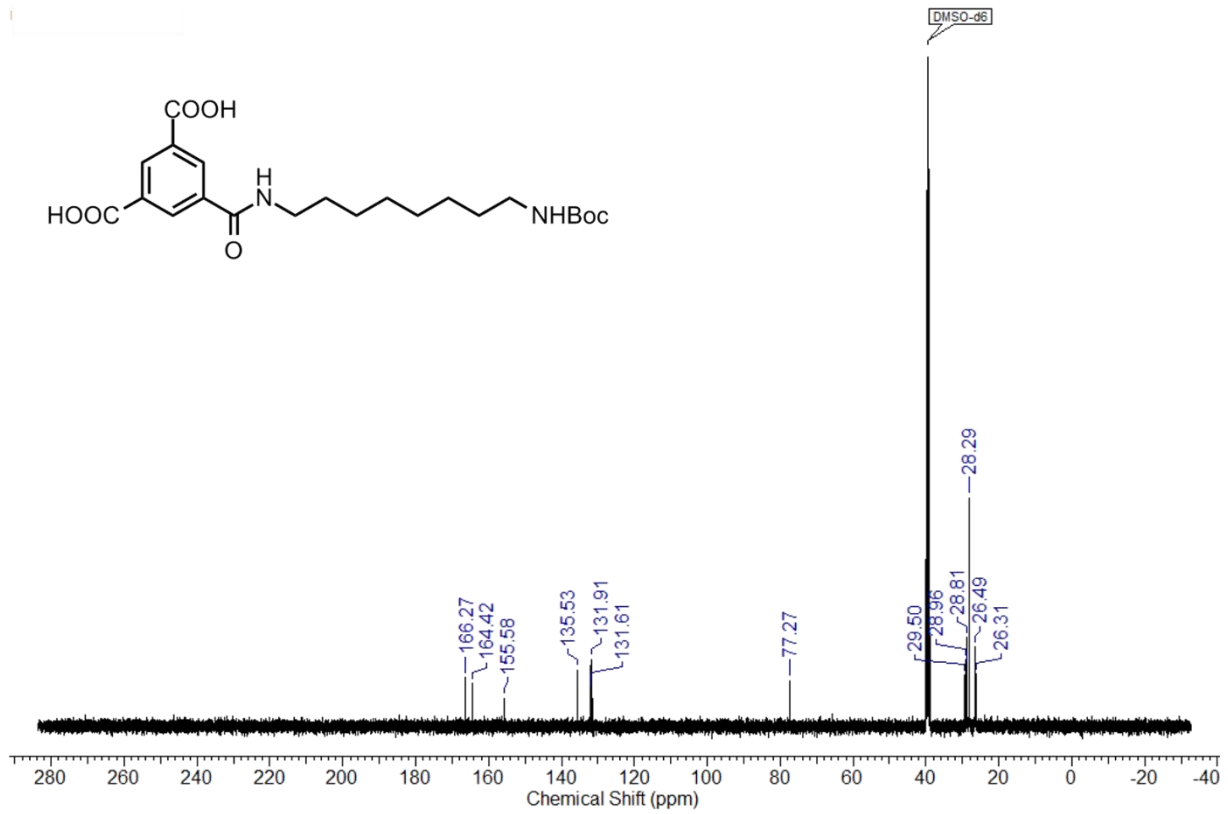


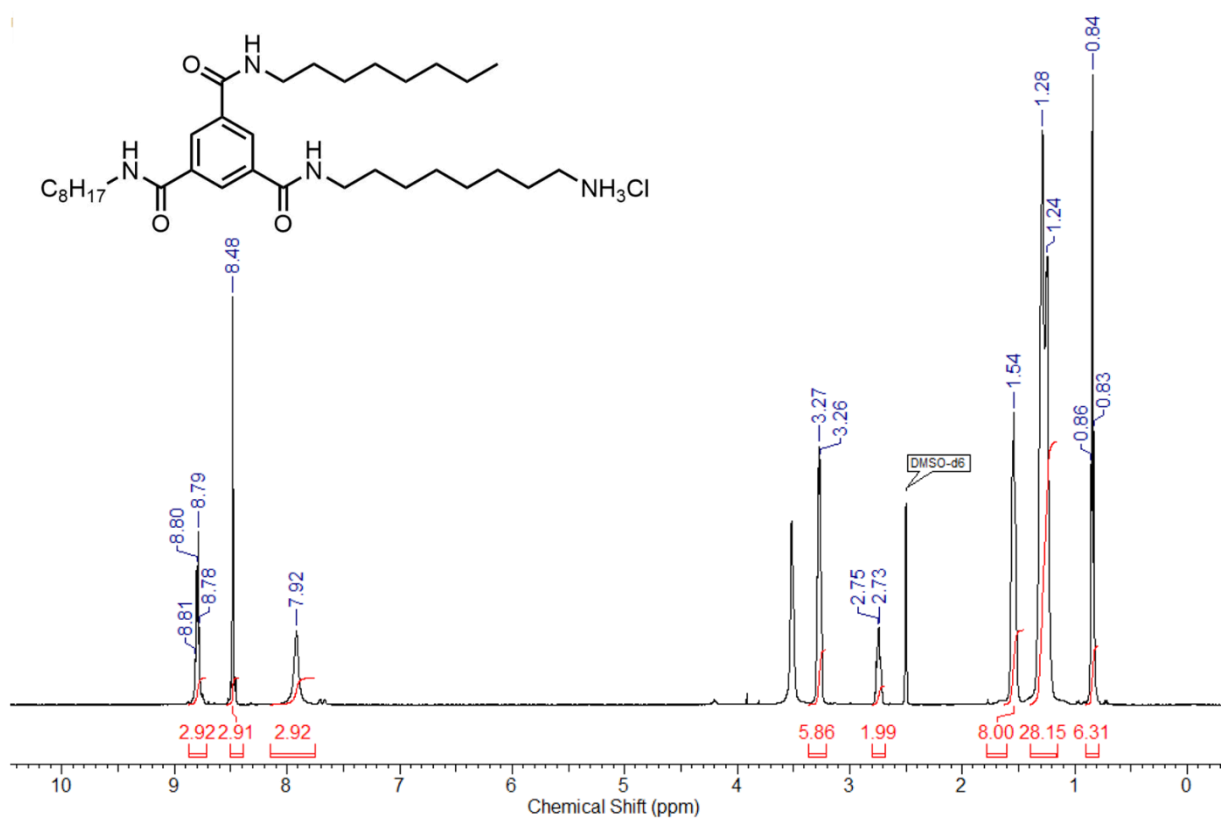
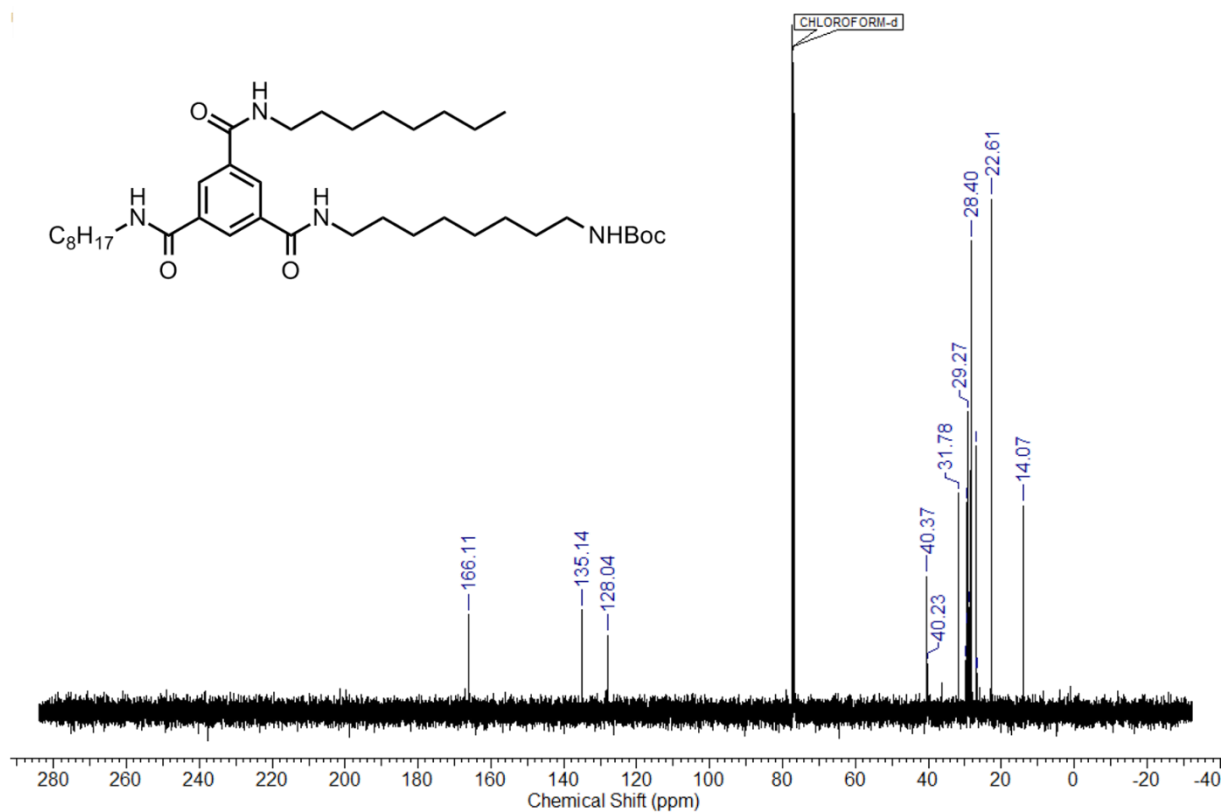


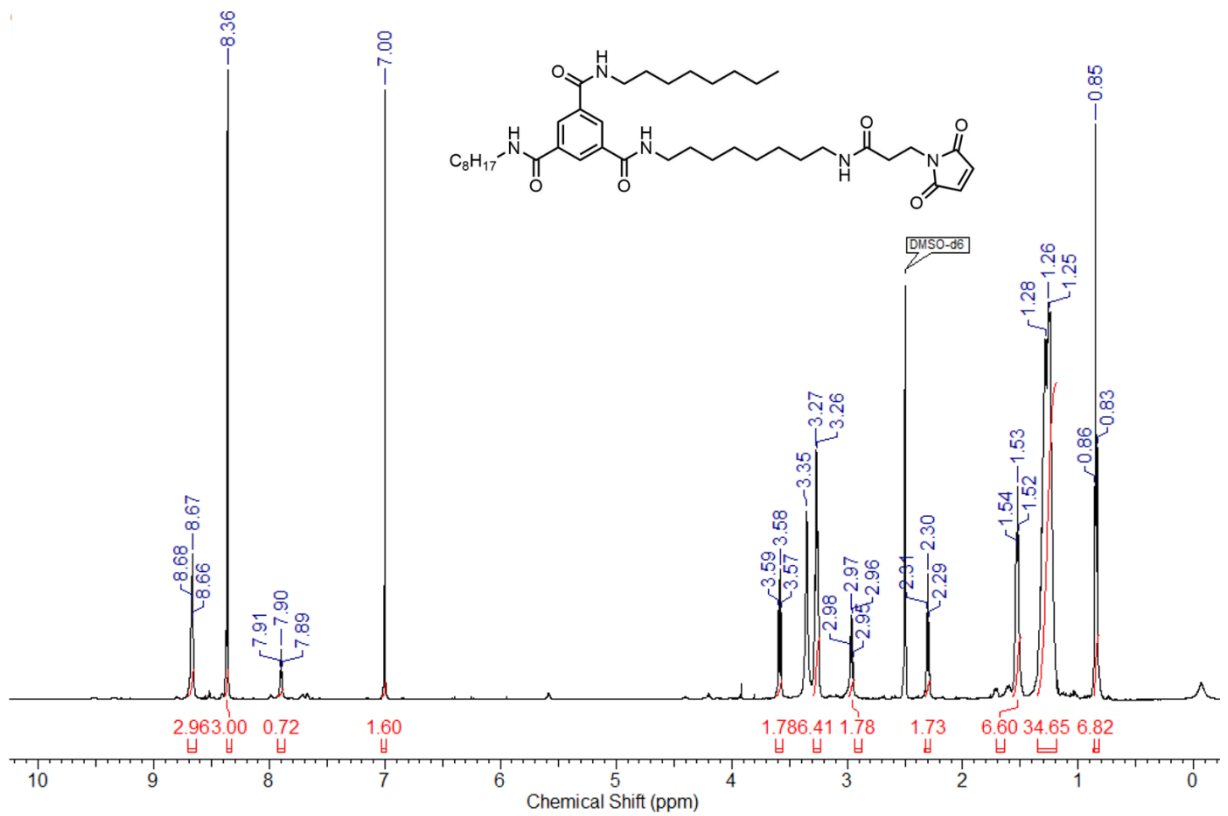
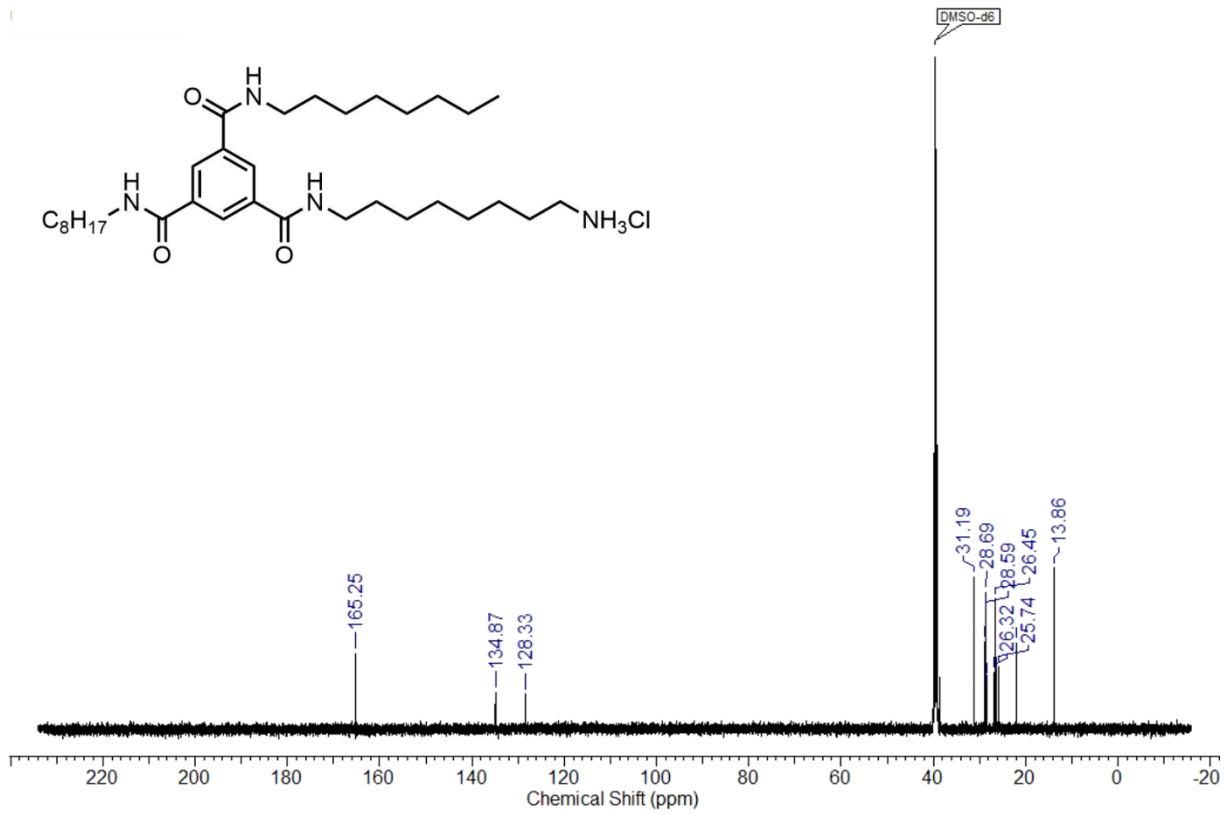


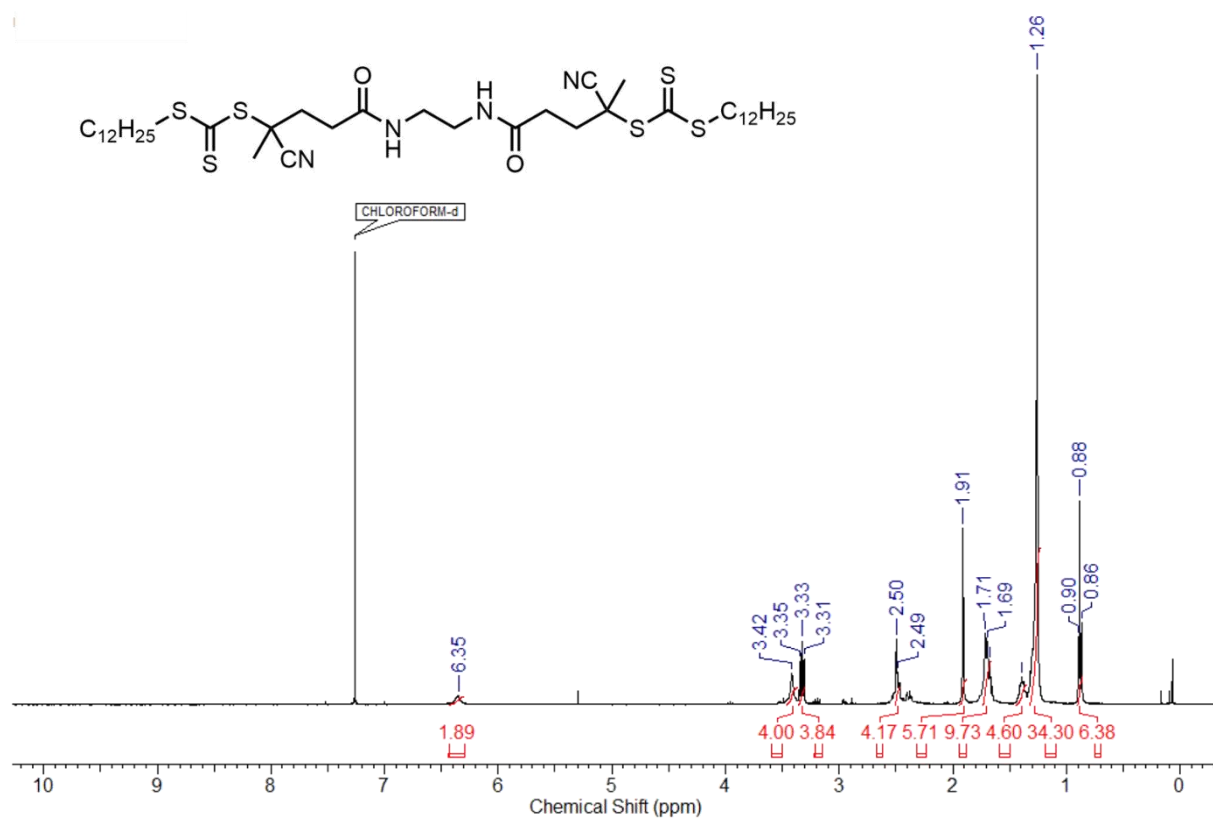
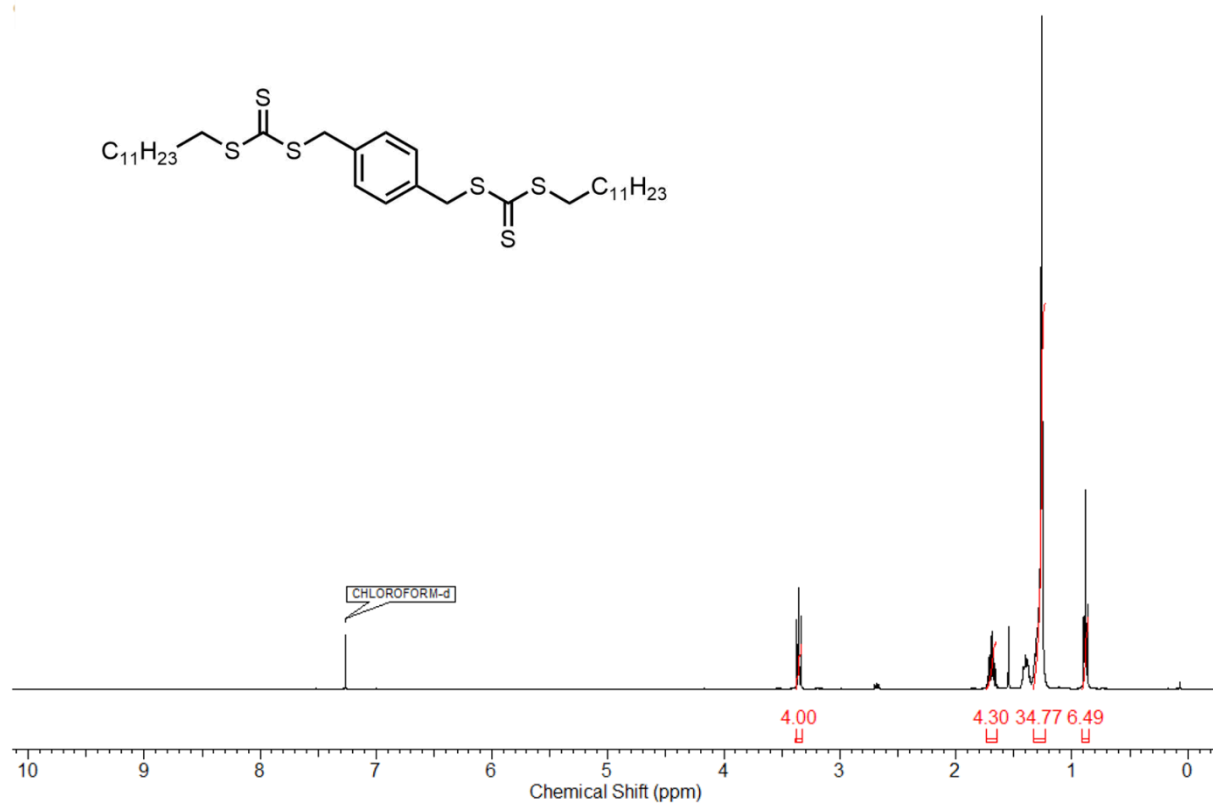




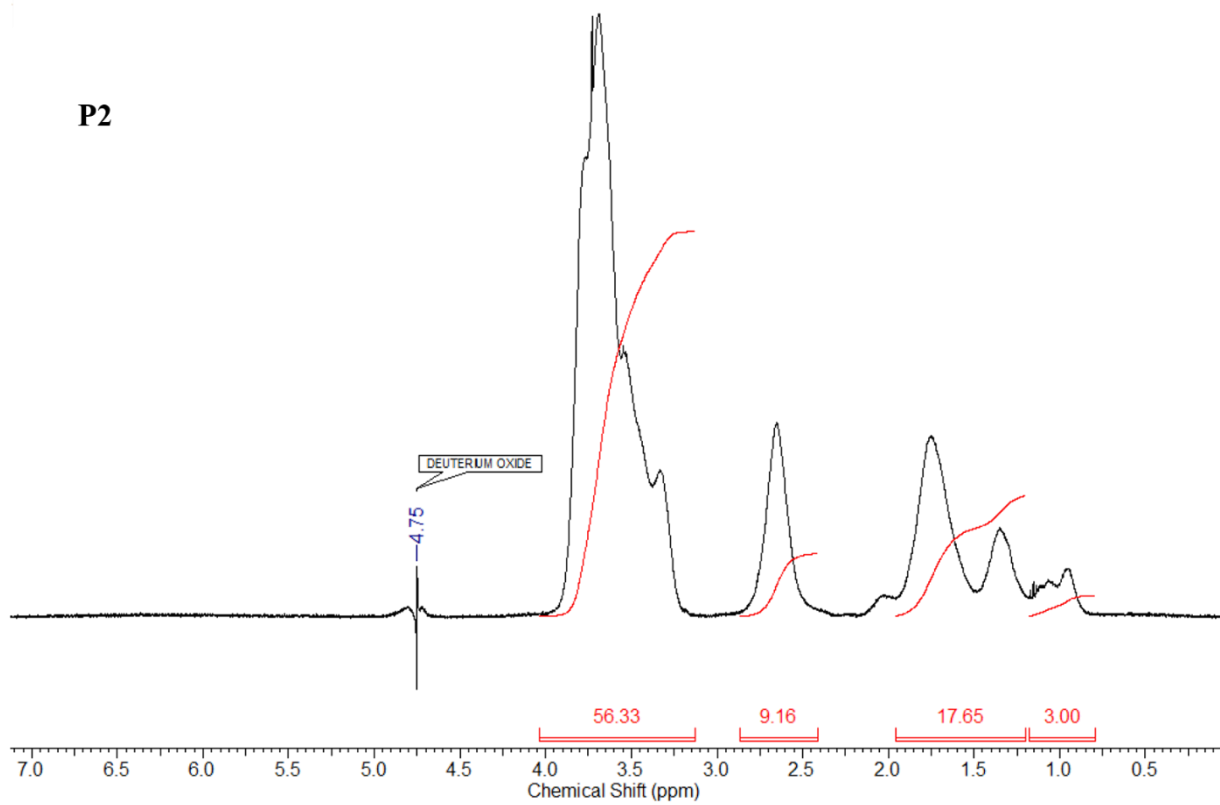
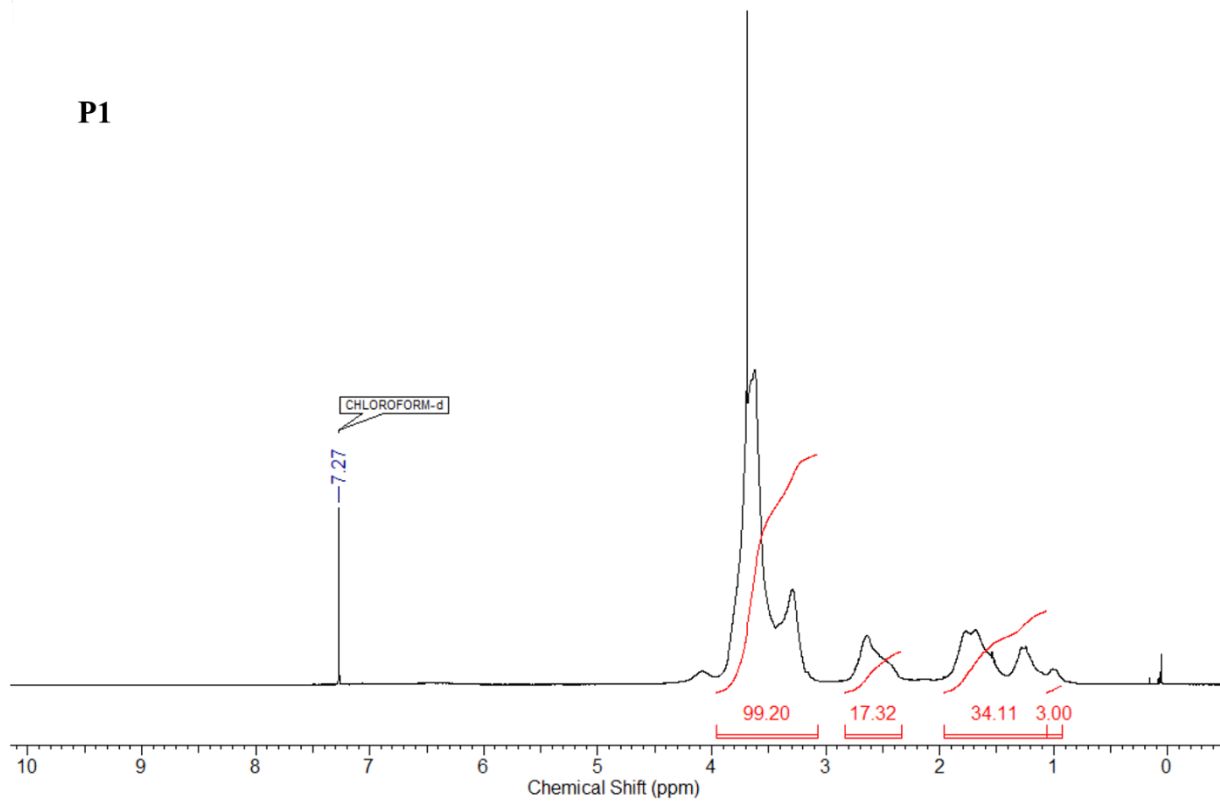


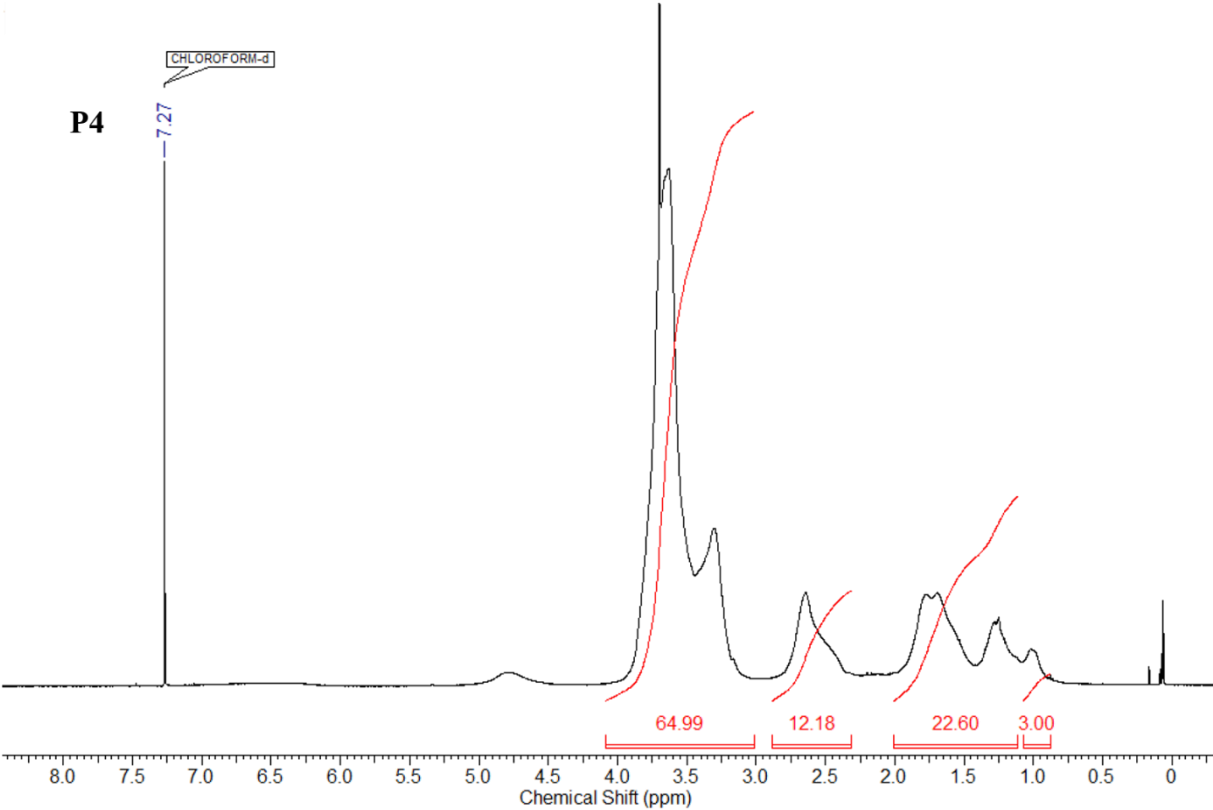
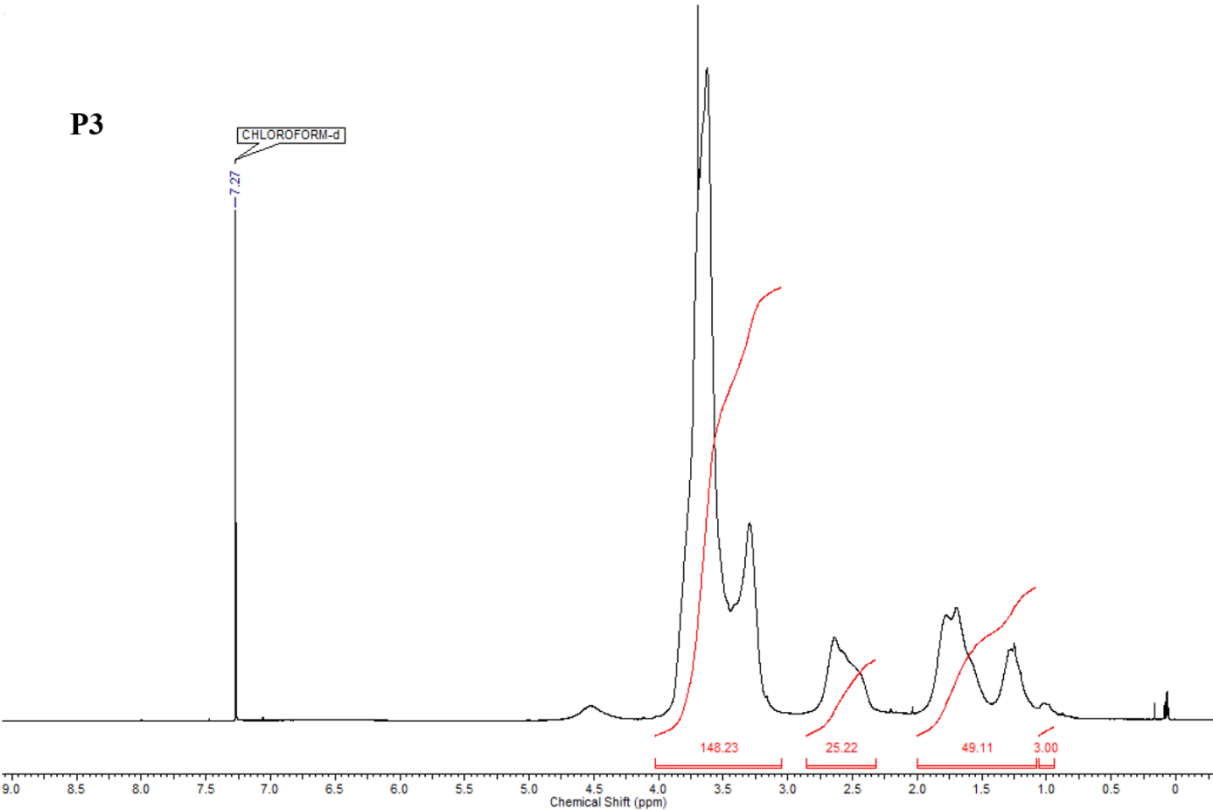


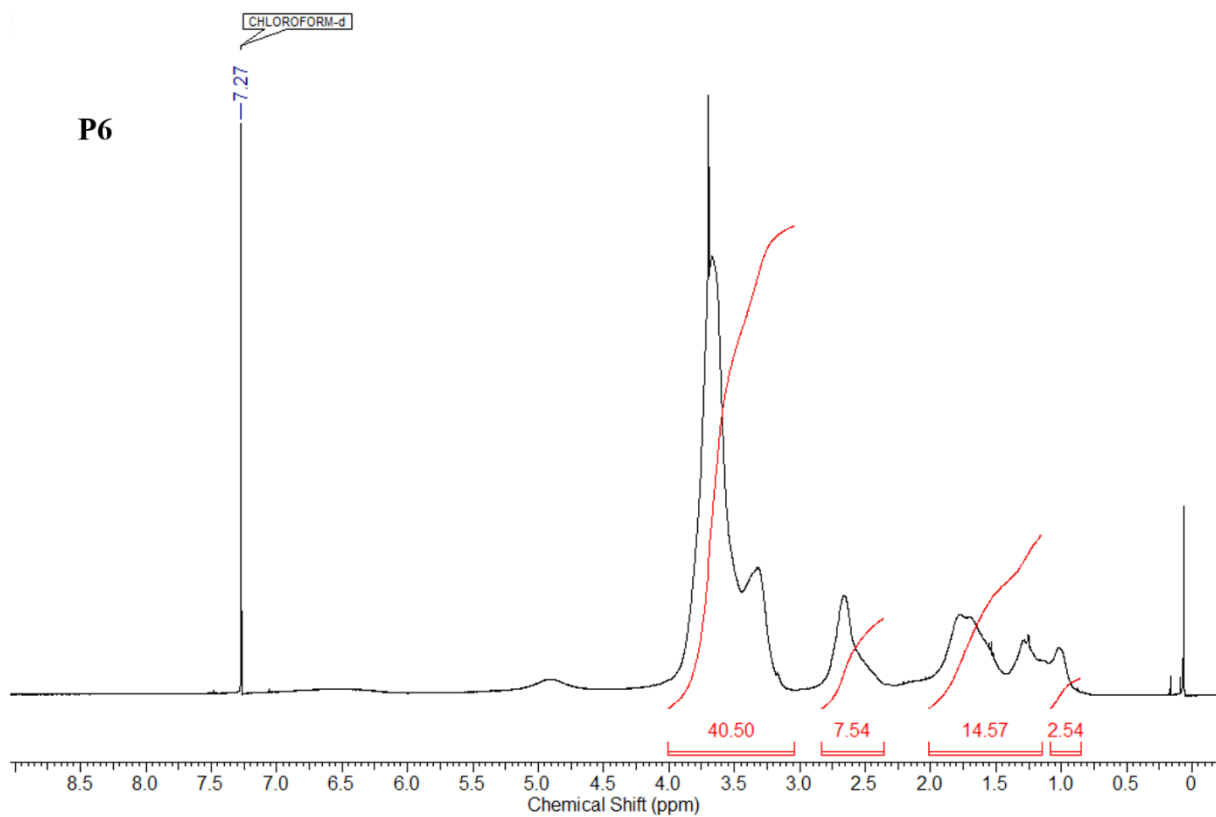
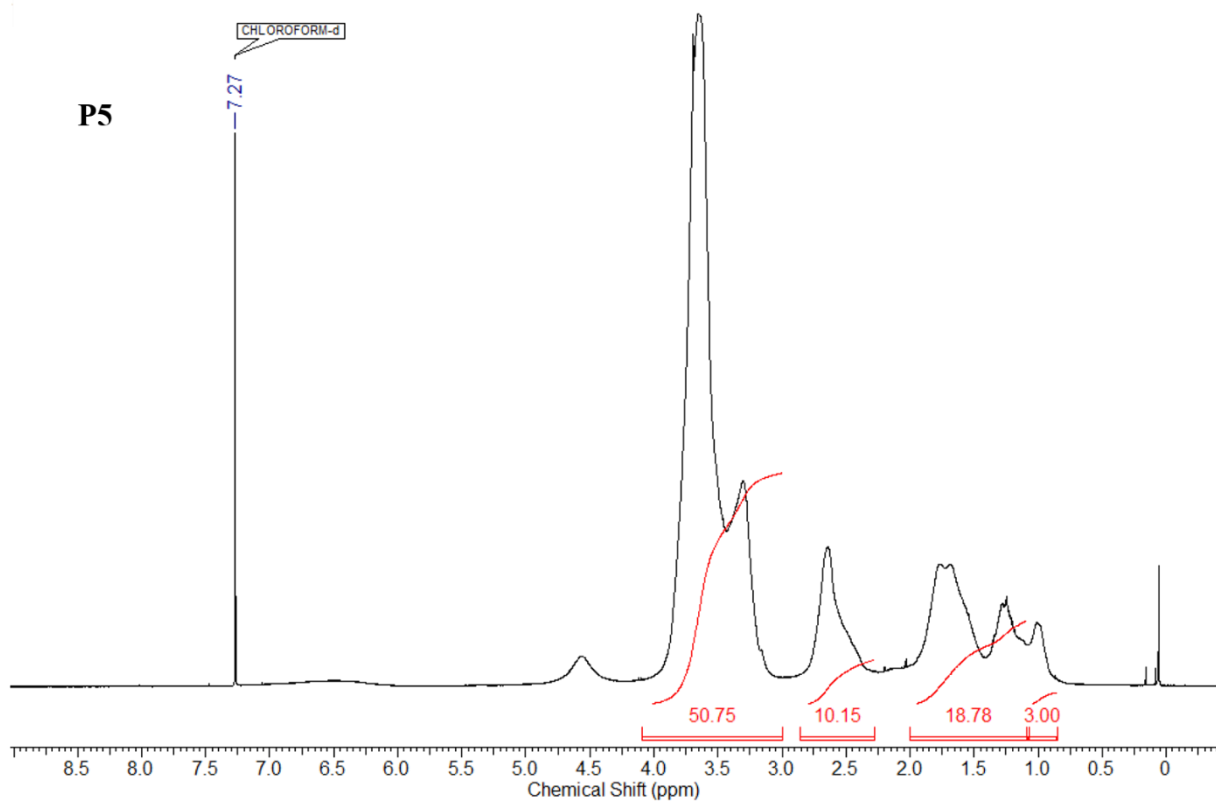


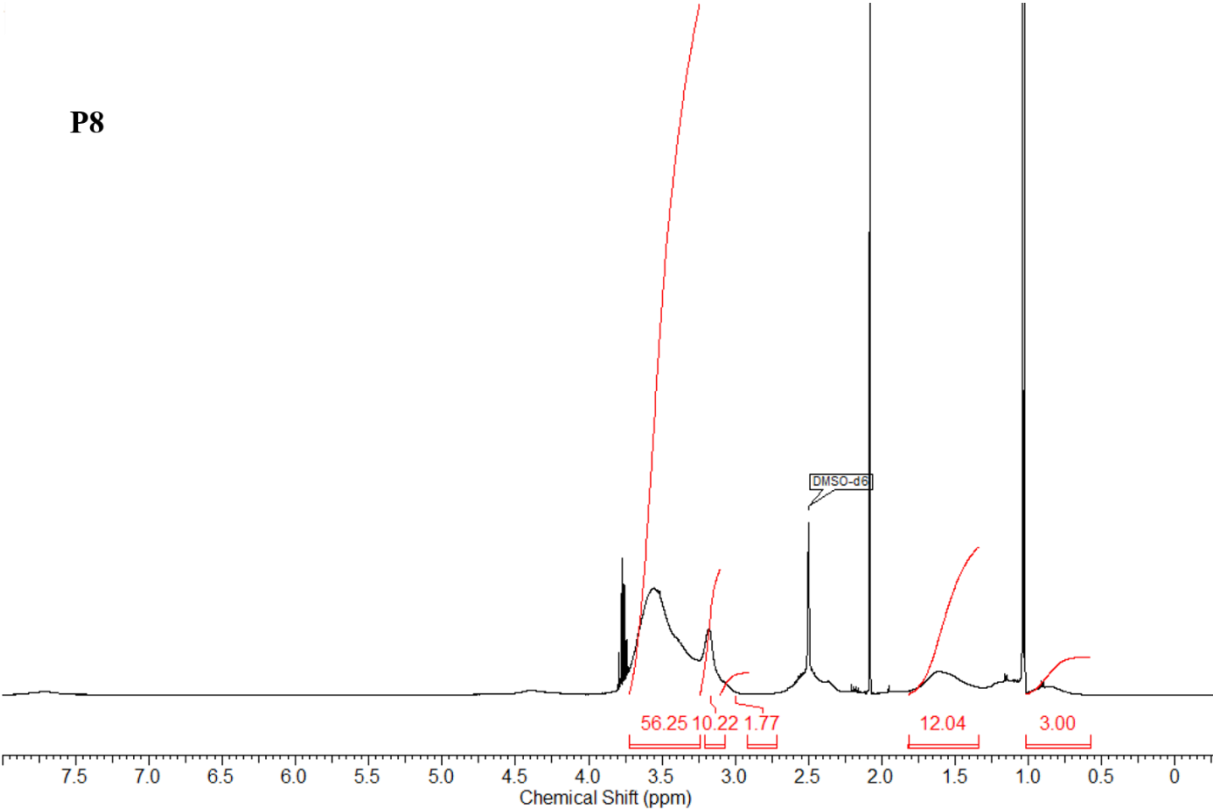
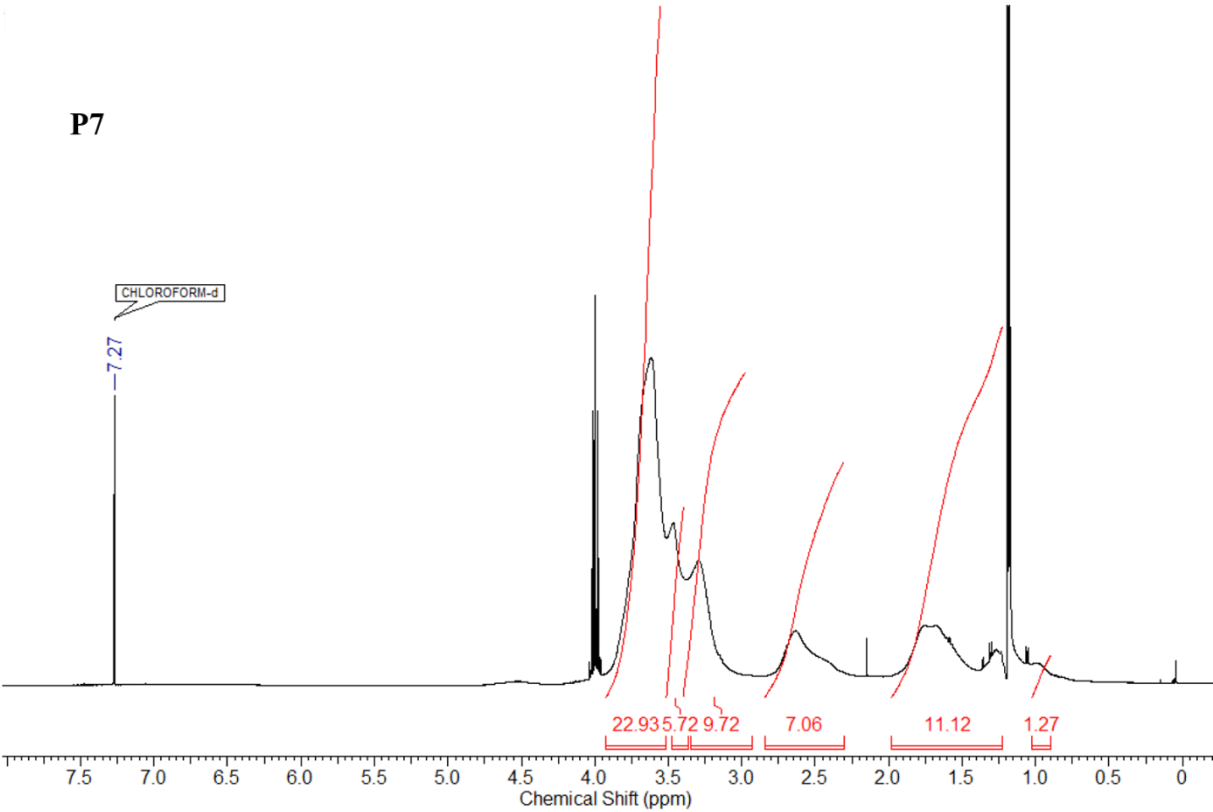


10.3 NMR-Spektren Polymere

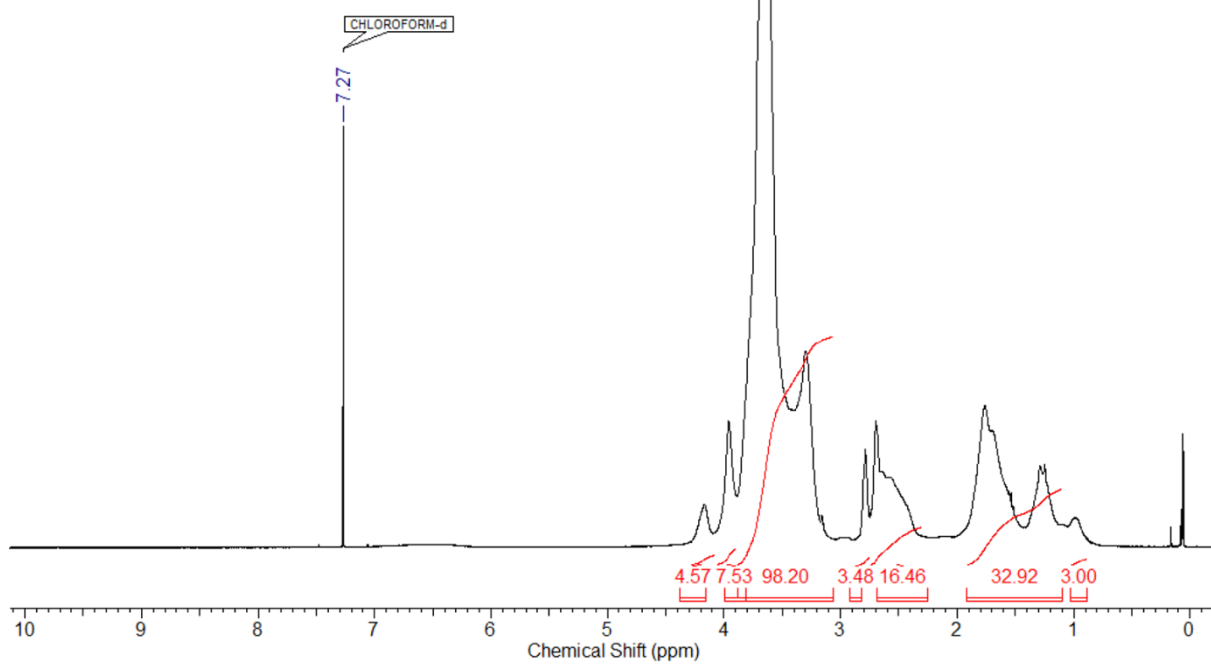




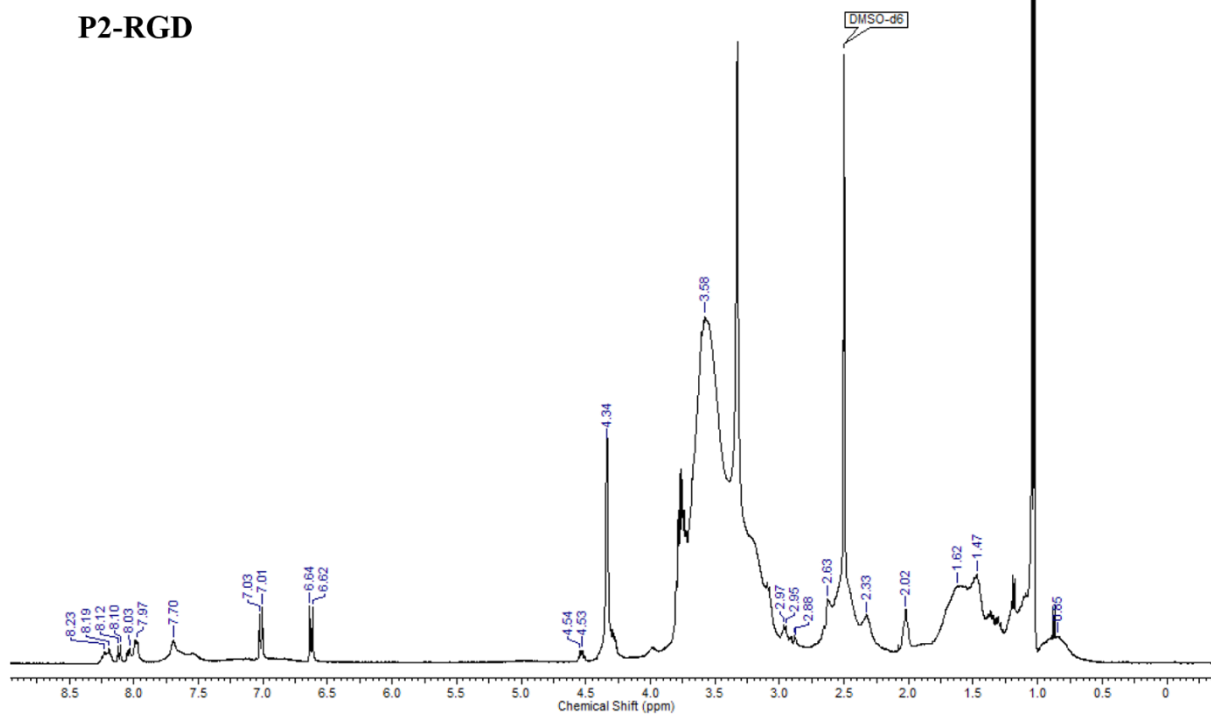


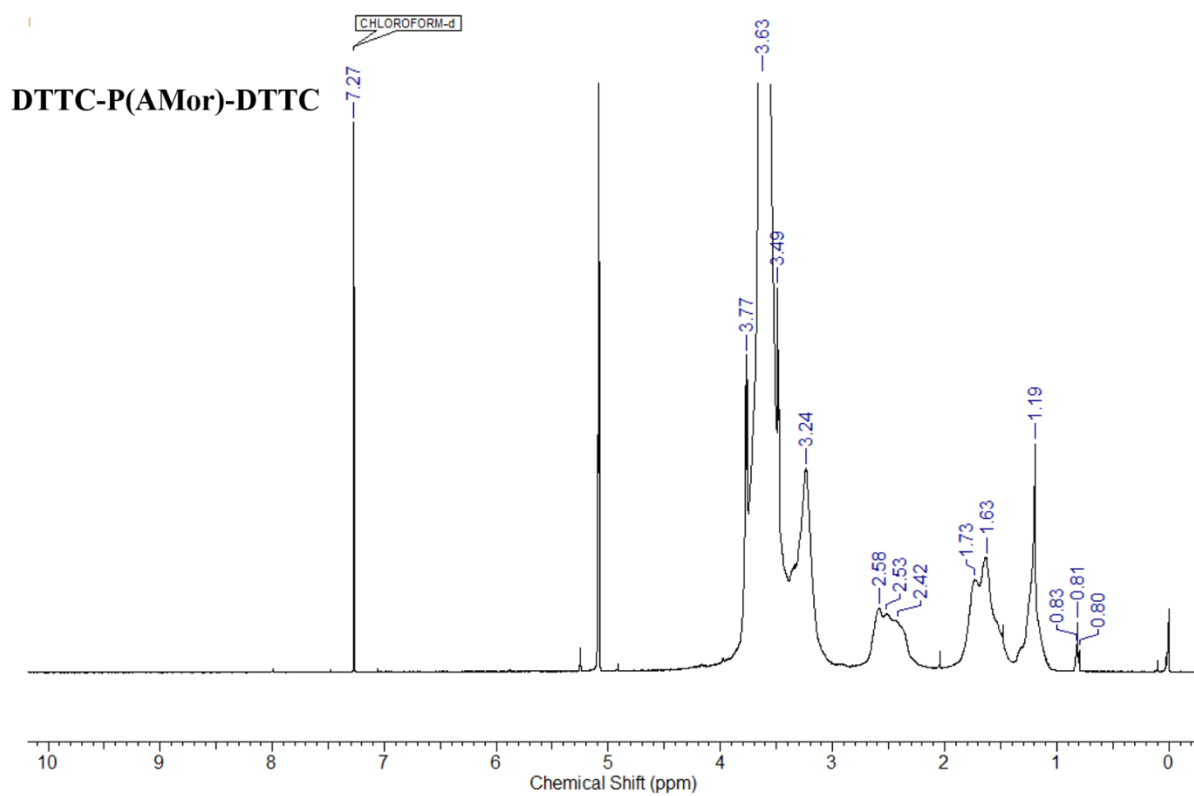
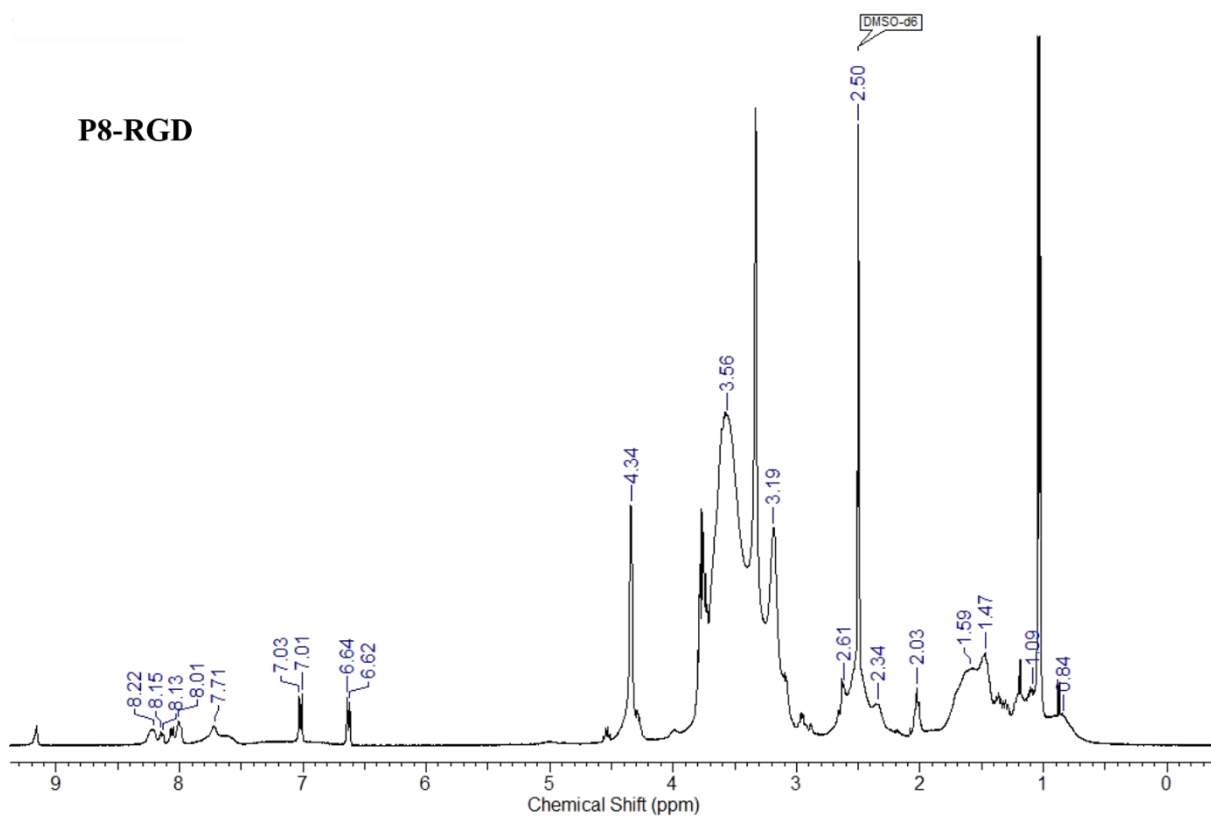


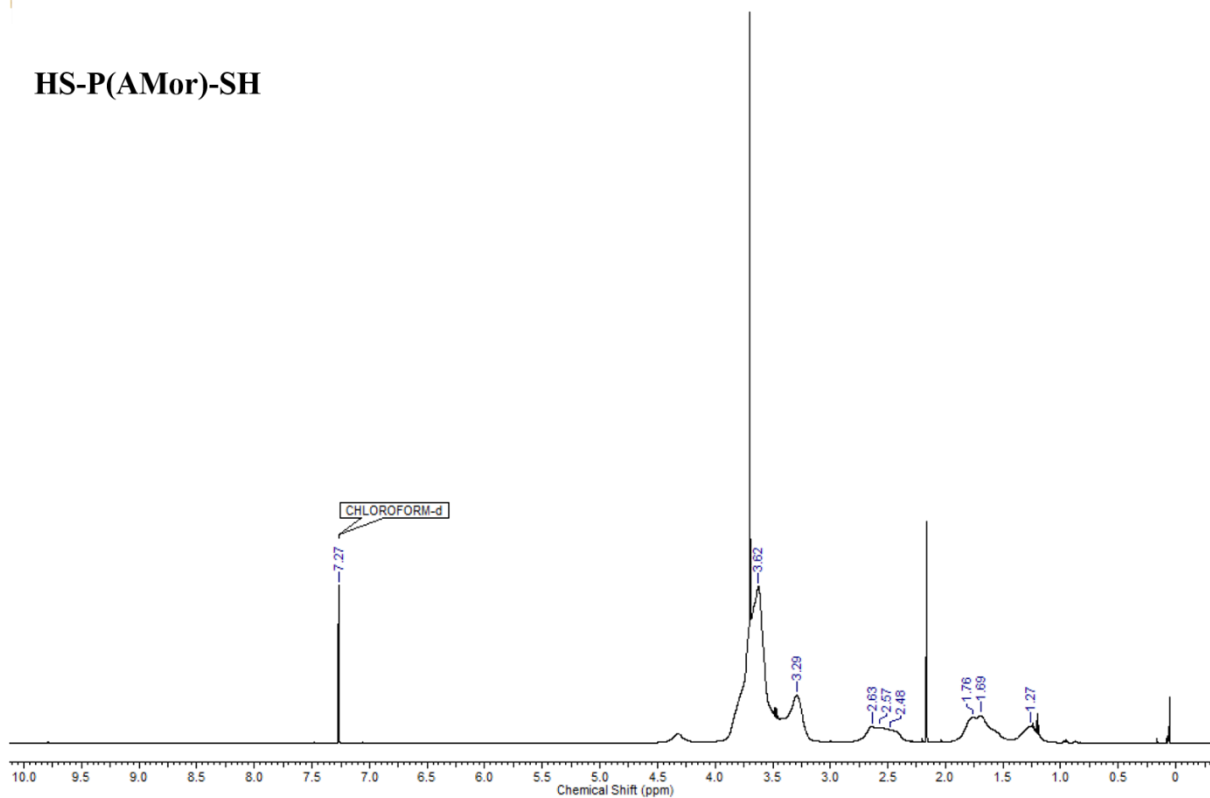
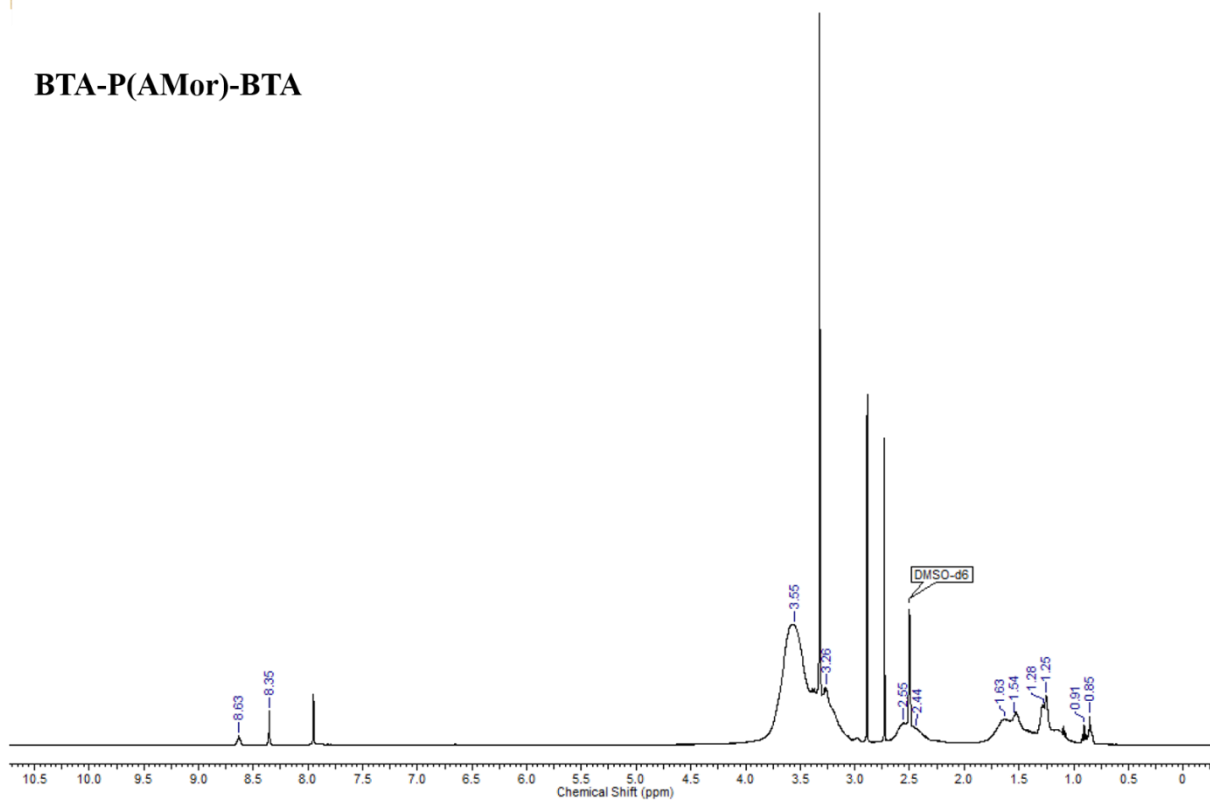
P9



P2-RGD





HS-P(AMor)-SH**BTA-P(AMor)-BTA**

11. Eidesstaatliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Bolduan, Patrick

Name, Vorname
(Surname, first name)

128998

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Synthese und Charakterisierung von biologisch-aktiven Hydrogelen und deren

Anwendung in der Stammzellforschung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)