

Synthese und Charakterisierung  
von Biohybridpolymeren als künstliche Matrix  
für die Kultivierung von neuronalen Stammzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

im Fachbereich Chemie und Chemische Biologie

(Dr. rer. nat.)

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**Muhammad Sallouh**

aus Damaskus

Dortmund, den 5. April 2018



---

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2010 bis Oktober 2013 im Arbeitskreis *Polymer Hybrid Systems* der Fakultät Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund.

**Erstgutachter**

» Prof. Dr. rer. nat. Ralf Weberskirch

**Zweitgutachter**

» Prof. Dr. rer. nat. Jörg C. Tiller





---

*Widmung*

*Meiner Frau ...*



---

## *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. Ralf Weberskirch möchte ich für die Möglichkeit danken, dass ich unter seiner Leitung meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Ebenfalls möchte ich Ihm für das sehr interessante Forschungsthema, das er mir anvertraut hat, danken, sowie für sein Engagement und seine Unterstützung.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich mich bei Prof. Dr. Jörg Tiller bedanken.

Prof. Dr. Andreas Faissner, Dr. Nicole Brösicke und Marvin Jarocki danke ich für die Zellexperimente und die fruchtbare Zusammenarbeit an zwei Publikationen.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Publikation des  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Papers bedanke ich mich bei Dr. Wolf Hiller.

Prof. Dr. Heinz Rehage und Dr. Patrick Degen danke ich für den Zugang zu dem Rheologielaor und die Unterstützung bei der Auswertung.

Ich möchte mich bei Chantal Martin und der HRMS-Abteilung für die schnelle Messung der Proben bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Silvia Lessing, Andreas Hammer und Heidi Auer für die freundliche und herausragend professionelle Arbeitsatmosphäre.

Natürlich sei allen ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises Weberskirch und besonders Omar Sallouh, Ipek Ipekoglu, Selahaddin Sezgin, Loana Arns, Dominik Bernhagen, Nico Zammarelli, Dr. Nadine Engelhardt und Dr. Andrea Ernst für die besondere Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors gedankt.

Für die Finanzierung meines Forschungsvorhabens danke ich dem Mercator Research Center Ruhr (MERCUR).

I would like to thank Prof. Daniel Kahneman for indirect support and his ingenuity and his advice.

Mein herzlicher Dank gehört meinen Eltern, Geschwistern, Schwiegereltern und natürlich meiner Frau Karin Wüste-Sallouh für die Unterstützung durch Höhen und Tiefen.



---

## ***Publikationen***

- Muhammad Sallouh †, Marvin Jarocki §, Omar Sallouh, Patrick Degen, Andreas Faissner \* †, Ralf Weberskirch\* †  
The Synergistic Effect of Cationic Moieties and GRGDSF-Peptides in Hydrogels on Neural Stem Cell Behavior. *Macromol. Biosci.* **2017**, 1600178.
- Muhammad Sallouh, Patrick Degen, Wolf Hiller,\* Ralf Weberskirch\*,  
<sup>1</sup>H HR-MAS NMR Spectroscopy as a Simple Tool to Characterize Peptide –Functionalized Hydrogels as a Function of Cross Linker Density, *Polymer* **56**, **2015**: 141-146.
- N. Brösicke, Muhammad Sallouh, L.- M. Prior, R. Weberskirch, A. Faissner\*  
Extracellular Matrix Glycoprotein-Derived Synthetic Peptides Differentially Modulate Glioma and Sarcoma Cell Migration *Cellular and molecular neurobiology* **35.5 (2015)**: 741-753.

## ***Vorträge und Poster***

- Herstellung und Charakterisierung einer synthetischen EZM als neurale Stammzellnische, Tag der Chemie an der TU-Dortmund, **2012**, (Poster); **2013**, (Vortrag).
- Synthesis and Characterization of Biohybrid Polymers to Mimic the Natural Stem Cell Niche, Tag der Chemie an der TU-Dortmund, **2014**, (Poster).

## ***Preisverleihungen***

Vortragspreis des 6. Tags der Chemie an der TU-Dortmund, 2013.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Theoretischer Teil</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1. Stammzellen . . . . .	4
1.1.1. Neurale Stammzellen (NSZ) . . . . .	5
1.2. Von der natürlichen zur synthetischen EZM als neurale Stammzellnische .	7
1.2.1. Natürliche neurale Stammzellnische . . . . .	7
1.2.2. Extrazelluläre Matrix (EZM) . . . . .	7
1.2.2.1. Kollagen . . . . .	9
1.2.2.2. Laminin . . . . .	9
1.2.2.3. Tenascin . . . . .	10
1.2.2.4. Fibronectin . . . . .	11
1.2.3. Extrazelluläre Matrix (EZM) der neuronalen Stammzellnische . . .	13
1.2.4. Mimetika neuraler Stammzellnischen auf Basis natürlicher und synthetischer Polymere . . . . .	13
1.2.4.1. Natürliche Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen . . . . .	15
1.2.4.2. Synthetische Materialien als künstliche EZM für neura- le Stammzellen . . . . .	18

1.3. Hydrogel . . . . .	21
1.3.1. Definition von Hydrogelen . . . . .	21
1.3.2. Klassifizierung von Hydrogelen . . . . .	21
1.3.2.1. Physikalisch vernetzte Hydrogele . . . . .	23
1.3.2.2. Chemisch vernetzte Hydrogele . . . . .	23
1.3.3. Hydrogel-Charakterisierung . . . . .	28
1.3.3.1. Netzwerkparameter . . . . .	28
1.3.3.2. Rheologie. Dynamisches Oszillationsexperiment . . . . .	30
1.3.3.3. Quellung . . . . .	33
1.3.3.4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie . . . . .	33
1.4. Radikalische Polymerisation . . . . .	35
1.4.1. Mechanismus . . . . .	35
1.4.1.1. Radikalquellen . . . . .	36
1.4.1.2. Startreaktion . . . . .	36
1.4.1.3. Wachstumsreaktion . . . . .	37
1.4.1.4. Abbruchreaktion . . . . .	37
1.5. Kontrollierte radikalische Polymerisation . . . . .	38
1.5.1. RAFT-Polymerisation . . . . .	41
1.5.1.1. RAFT-Mechanismus . . . . .	41
1.5.1.2. RAFT-Reagenz-Design . . . . .	44
1.5.1.3. RAFT-Reaktionsbedingungen . . . . .	45
<b>II. Zielsetzung</b>	<b>47</b>
<b>2. Ziel dieser Arbeit</b>	<b>49</b>



<b>III. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>51</b>
<b>3. RAFT-Polymerisation</b>	<b>53</b>
3.1. RAFT-Polymerisation via APS/TEMED-System . . . . .	53
3.1.1. Einleitung . . . . .	53
3.1.2. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	55
3.1.2.1. Einfluss der Temperatur . . . . .	55
3.1.2.2. Polymerisation von Polyacrylamid . . . . .	58
3.1.2.3. Polymerisation von Poly-AEMA . . . . .	61
3.1.2.4. Einfluss des pH-Werts auf die Polymerisation . . . . .	61
3.1.3. Zusammenfassung . . . . .	61
<b>4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie</b>	<b>63</b>
4.1. <sup>1</sup> H-HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen . . . . .	63
4.1.1. Einleitung . . . . .	63
4.1.2. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	65
4.1.2.1. Rheologische Charakterisierung . . . . .	65
4.1.2.2. Quellungsexperimente . . . . .	69
4.1.2.3. NMR-Messungen . . . . .	70
4.1.3. Zusammenfassung . . . . .	78
<b>5. Biohybridhydrogel-Zelleexperimente</b>	<b>79</b>
5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten . . . . .	79
5.1.1. Einleitung . . . . .	79
5.1.2. Ergebnisse und Diskussion . . . . .	82
5.1.2.1. Peptidsynthese . . . . .	82

5.1.2.2.	Peptidbioaktivität und ihr Einfluss auf das Zellverhalten	83
5.1.2.3.	Herstellung des Peptidmonomers . . . . .	86
5.1.2.4.	Hydrogelsynthese und Charakterisierung . . . . .	88
5.1.2.5.	Kultivierung Maus-embryonaler neuraler Stammzellen	91
5.1.2.6.	<i>In-vitro</i> -Analyse der Adhäsion von Maus-embryonalen neuralen Stammzellen auf Biohybridhydrogel . . . . .	92
5.1.2.7.	<i>In-vitro</i> -Analyse des Proliferationsverhaltens von em- bryonalen NSZ auf Biohybridhydrogel . . . . .	98
5.1.2.8.	<i>In-vitro</i> -Analyse des Differenzierungsverhaltens von em- bryonalen NSZ auf Biohybridhydrogel . . . . .	100
5.1.2.9.	Diskussion der Proliferation und Differenzierung em- bryonaler NSZ . . . . .	103
5.1.3.	Zusammenfassung . . . . .	105
<b>IV.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>V.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>115</b>
<b>7.</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>117</b>
7.1.	Reagenzien, Lösungsmittel und Analytikgeräte . . . . .	117
7.2.	Materialien . . . . .	120
7.3.	Herstellung der Polymere P-02 bis P-11 . . . . .	121
7.4.	Peptidsynthese . . . . .	122
7.5.	Herstellung der Peptidsequenz Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF (PM) . . .	125
7.6.	Herstellung der Biohybridhydrogele G1 bis G6 . . . . .	129

7.7. Reduktive Verflüssigung der monomerfreien Gele G1 bis G6 . . . . .	129
7.8. Herstellung der Biohybridhydrogele G7 bis G15 . . . . .	130
7.9. Hydrogelcharakterisierung . . . . .	130
7.9.1. Rheologische Messungen . . . . .	130
7.9.2. <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie . . . . .	132
7.9.3. <sup>1</sup> H HR-MAS-NMR-Spektroskopie . . . . .	132
7.9.4. Zeta-Potential . . . . .	132
7.9.5. Zelleexperimente . . . . .	133
<b>VI. Erklärung</b>	<b>135</b>
<b>Anhang</b>	<b>171</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Acrylamid
<b>AAs</b>	Acrylsäure
<b>AEMA</b>	2-Aminoethylmethacrylat Hydrochlorid
<b>AM</b>	Acrylamid
<b>AN</b>	Acrylnitril
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATRP</b>	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
<b>BAC</b>	<i>N,N</i> -bis(acryloyl)-cystamin
<b>COSY</b>	<i>correlation spectroscopy</i>
<b>CRP</b>	kontrollierte radikalische Polymerisation
<b>CSA</b>	<i>chemical shift anisotropy</i>
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DIPEA</b>	Diisopropylethylamin
<b>DTDP</b>	3-(2-Carboxyethylsulfanyl)propansäure
<b>DTT</b>	D,L-Dithiothreitol
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
$G'$	Speichermodul
$G''$	Verlustmodul

<b>HBTU</b>	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> - tetramethyluronium hexafluorophosphat
<b>HMBC</b>	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazol
<b>HPMAM</b>	Hydroxypropylmethacrylamid
<b>HSQC</b>	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IUPAC</b>	Internationale Union für reine und angewandte Chemie
<b>LVR</b>	linear viskoelastische Region
<b>MA</b>	Methylacrylat
<b>MAA</b>	Methacrylsäure
<b>MMA</b>	Methacrylsäuremethylester
<b>NMP</b>	Nitroxide mediated Polymerisation
<b>NMR</b>	Kernspinresonanzspektroskopie
<b>NSZ</b>	Neurale Stammzellen
<b>NVC</b>	N-vinylcarbazol
<b>NVP</b>	Vinylpyrrolidon
<b>PDMS</b>	Poly(dimethylsiloxan)
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PLL</b>	Polylysin

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>PM</b>	Peptidmonomer
<b>PRE</b>	<i>persistent radical effect</i>
<b>RAFT</b>	<i>Reversible addition–fragmentation chain transfer</i>
<b>s</b>	Sekunde
<b>St</b>	Styrol
<b>TOCSY</b>	<i>total correlated spectroscopy</i>
<b>V</b>	Vernetzer
<b>VAc</b>	Vinylacetat
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## **Zusammenfassung**

Die Entwicklung neuer Materialien für die Kultivierung von Stammzellen gehört zu den großen Herausforderungen in der Stammzelltherapie. Als Vorbild für derartige Substrate dient die Stammzellnische, eine dreidimensionale Mikroumgebung, in der sich adulte Stammzellen während ihrer Lebenszeit in einem Ruhezustand befinden, bis externe Signale dazu führen, dass sie beginnen, sich zu teilen und zu differenzieren. Die wichtigste Komponente dieser Stammzellnische ist deren extrazelluläre Matrix. Diese besteht aus verschiedenen Proteinen und Polysacchariden und ist verantwortlich für die mechanische Stabilität der Stammzellnische. Zusammen mit löslichen Proteinen erhalten so die adulten Stammzellen wichtige Signale, die das Überleben der Zellen garantieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Biohybridhydrogele hergestellt und der Einfluss von kationischer Ladung und von RGD-Peptiden auf das Verhalten Maus-embryonaler neuraler Stammzellen untersucht. Hierbei konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Kombination aus kationischer Ladung und RGD-Peptid synergistisch auf die Adhäsion neuraler Stammzellen wirken. Die initiale Wechselwirkung zwischen den Stammzellen und dem Substrat findet über nicht-spezifische, elektrostatische Wechselwirkungen statt, während die spezifische Integrin-RGD-Wechselwirkung erst auf einer sehr kurzen Distanz von ca. 20-30 nm wirkt und daher zu einem späteren Zeitpunkt der Zell-Substrat-Wechselwirkung stattfindet. Diese Erkenntnisse können wichtig sein, wenn es um die Entwicklung neuer Substrate für die zweidimensionale Stammzellkultivierung geht und zeigt, wie wichtig neben den gut dokumentierten Integrin-Rezeptorwechselwirkungen die elektrostatische Wechselwirkung kationischer Substrate mit Stammzellen ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie eine hervorragende Methode darstellt, Polymernetzwerke qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Als Modellpolymere wurden Polymernetzwerke mit Disulfidvernetzern eingesetzt und mit unterschiedlichem Vernetzungsgrad hergestellt. Deren Zusammensetzung

wurde einerseits mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nach der Disulfidspaltung untersucht und mit den Ergebnissen der  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie der Polymernetzwerke im gequollenen Zustand verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie sehr gute Ergebnisse lieferte, vergleichbar mit denen der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bzgl. der Polymerzusammensetzung, wenn es sich um leicht vernetzte (1-2 mol% Vernetzer), gut quellbare Polymernetzwerke handelt.



## **Abstract**

The development of new materials for the cultivation of stem cells is one of the great challenges in stem cell research. The stem cell niche, that represents the three dimensional microenvironment of adult stem cells could serve as a prototype for such substrates since stem cells rest there in a quiescent state during their lifetime until external signals trigger cell division and differentiation. The most important component of the stem cell niche is the extracellular matrix (ECM). It is composed of different proteins and polysaccharide and provides mechanical stability of the niche. Together with soluble proteins adult stem cells receive all important signals that guarantee cell survival.

In this dissertation several biohybrid hydrogels were synthesized to study the influence of cationic charges and RGD-peptides on the behavior of mouse embryonic stem cells. It could be shown for the first time that a combination of cationic charges and RGD-peptide acts synergistically on the adhesion of neural stem cells. The initial interaction between the stem cells and cationic substrate is based on non-specific, electrostatic interaction followed by specific RGD-integrin interaction that can only become active when the cell is already within a distance of 20-30 nm to the substrate. These results could be important for the development of new substrates for the two-dimensional stem cell cultivation and demonstrates the importance of electronic interactions of cationic substrates with stem cells beyond the well documented integrin-receptor interaction. Furthermore, it could be shown that the  $^1\text{H}$  HR MAS NMR spectroscopy is an excellent method to characterize polymer networks qualitatively and quantitatively. As a model polymer polymer networks with disulfide cross linker were synthesized with different cross linker densities. These polymer networks were analyzed by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy after disulfide cleavage and compared with those results obtained by  $^1\text{H}$  HR MAS NMR spectroscopy of the swollen gels. The results demonstrate that the  $^1\text{H}$  HR MAS NMR is an excellent tool to analyze crosslinked polymer gels at low cross linker concentration (1-2 mol%).



# **Teil I.**

## **Theoretischer Teil**



# 1. Einleitung

Die Menschheit hat in ihrem Kampf gegen Krankheiten, Alterungsprozesse und Organschäden große Hoffnungen in die Stammzelltherapie gesetzt. Diese Therapie könnte die Lösung für schwere Erkrankungen wie Parkinson, Multiple Sklerose, Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Organschäden oder -versagen sowie Rückenmarksschädigungen sein.<sup>1</sup> Obwohl die Anwendung der klinischen Stammzelltherapie durchaus viel Hoffnung verspricht, gibt es bis heute nur sehr wenige klinisch zugelassene Stammzelltherapien. Die Stammzellforschung begann in den 1950er Jahren mit der Knochenmarkstransplantation, die auch heute noch durchgeführt wird bei Leukemie-Patienten und für die E. Donnell Thomas 1990 den Nobelpreis erhielt. Ihr Erfolgsgeheimnis besteht darin, dass die Stammzellen nicht isoliert werden, sondern mit ihrer natürlichen Umgebung (Knochenmark = Stammzellen und Stammzellnische) transplantiert. Zuletzt wurden drei Stammzellpräparate, die hauptsächlich pluripotente Stammzellen verwenden, klinisch zugelassen: Hearticellgram-AMI<sup>®</sup> (FCB PharmiCell) bei akutem Herzinfarkt, Cupistem<sup>®</sup> (Medipost) bei Morbus Crohn und Cartistem<sup>®</sup> (Anterogen) bei Knorpelverlust.<sup>1</sup> Durch die Regularien und Richtlinien zu ethischen Fragen in Bezug auf die Verwendung von embryonalen Stammzellen wird die Forschung in westlichen Ländern – aus Sicht der Wissenschaft – stark begrenzt. Asiatische Länder haben daher einen deutlichen Vorsprung in der Stammzellforschung und ihrer klinischen Anwendung.<sup>2-4</sup>

## 1.1. Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zelltypen, die sowohl die Fähigkeit besitzen, sich durch Replikation selbst zu erneuern (symmetrische Proliferation), als auch sich in biologisch geeigneter Umgebung (Stammzellnische) zu Zellen mit unterschiedlichen Spezialisierungen zu differenzieren (asymmetrische Proliferation). Da die Differenzierungsfähigkeit bei Stammzellen unterschiedlich ausgeprägt ist, werden sie in zwei Hauptgruppen eingeteilt, totipotente und pluripotente Stammzellen. Aus totipotenten Stammzellen kann ein vollständiger Organismus entstehen. Diese Eigenschaft wird embryonalen Zellen bis zum 8-Zell-Stadium der Morula zugesprochen.<sup>5</sup> Im Gegensatz zu totipotenten Stammzellen sind pluripotente Stammzellen nicht mehr fähig, einen kompletten Organismus zu erschaffen, weil sie kein extraembryonales Gewebe bilden können. Wegen ihrer Pluripotenz und ihres Replikationspotenzials sind diese Stammzellen für den Einsatz als Zellmaterial für *Ex-vivo*- oder *In-vivo*-Zelltherapien jedoch sehr vielversprechend. Um eine erfolgreiche Stammzelltherapie durchführen zu können, müssen einige Hürden überwunden werden:

- Adulte Stammzellen sind im menschlichen Körper nur in sehr geringer Konzentration vorhanden. Für eine Therapie müssen sie vermehrt werden und gelagert werden können.
- Werden heutzutage Stammzellen verabreicht, geschieht dies in Form einer Zellsuspension. Aufgrund von auftretenden Scherkräften sterben jedoch 60 – 90 % der Zellen ab.<sup>6</sup> Werden die Zellen dagegen in eine dreidimensionale Matrix verpackt, lässt sich ihr Überleben deutlich verbessern.

Das Interesse an Materialien, die die Stammzelltherapie unterstützen können und zugleich kostengünstig, gut charakterisierbar und definiert in der Zusammensetzung sind, ist die Motivation dieser Arbeit.

### 1.1.1. Neurale Stammzellen (NSZ)

Neurale Stammzellen (NSZ) sind sich selbst erneuernde Zellen, die in bestimmten Regionen des sich entwickelnden und adulten zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren vorkommen, z. B. beim Menschen in der Zone des Hippocampus und im Riechkolben.<sup>7</sup> NSZ sind in der Lage, sich in mindestens drei Zelllinien zu differenzieren: Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten. Diese drei Zellarten stellen die Hauptbestandteile des zentralen Nervensystems dar (siehe Abbildung 1.1, Seite 6).

Wegen ihrer einzigartigen Funktion sind Neuronen die wichtigsten Bauelemente des zentralen Nervensystem (ZNS). Sie sind spezialisierte Zellen, die Signale wahrnehmen, weiterleiten und bearbeiten können. Zu diesem Zweck weisen sie strukturelle und funktionelle Besonderheiten auf. Dem Zellkörper (Soma) entspringt ein Fortsatz, der sich in das Nervengewebe zieht und dort in zwei Formen auffächert: in baumartige Verzweigungsfelder (Dendriten) und in einen langen Zellfortsatz (Axon), der am Terminalbereich erneut eine wurzelartige Form aufweist.<sup>8</sup>

Gliazellen (Astrocyten, Oligodendrocyten) haben hauptsächlich die Funktion, Neuronen zu schützen, zu isolieren und zu ernähren. Die meisten Gliazellen sind Astrozyten, welche mit einem Abstand von 20 nm den Bereich zwischen den Neuronen ausfüllen. Die Astrozyten erfüllen viele wichtige Aufgaben, darunter die Versorgung der Nervenzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, den Abtransport von Zellabfallprodukten wie CO<sub>2</sub> sowie die Beseitigung von Ionenüberschüssen (K<sup>+</sup> und Ca<sup>++</sup>). Sie dienen zudem als Energie- und Nährstoffspeicher. Die Oligodendrozyten ummanteln die Axone der Nervenzellen und schützen die elektrischen Signale gegen Störungen durch benachbarte Axone. Eine Oligodendrozytzelle ist in der Lage, mehrere Neuronen gleichzeitig zu umhüllen und zu schützen. Neurale Stammzellen sind wie alle pluripotenten Stammzellen nur in der Lage, eine asymmetrische Teilung in einer geeigneten Nische durchzuführen. Diese Stammzellnische besteht aus zellulären und nichtzellulären Komponenten.

# 1. Einleitung

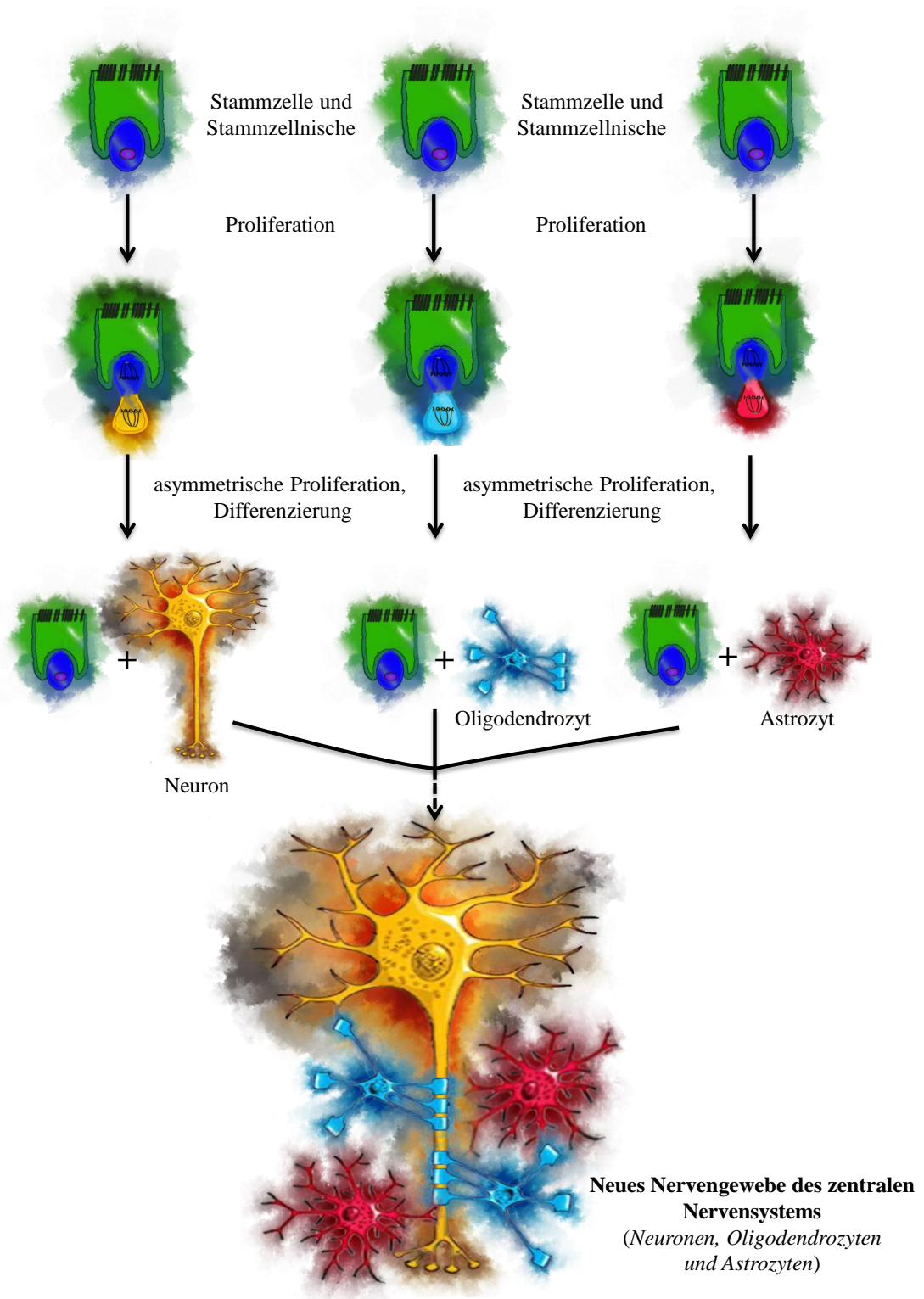


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung der Differenzierung von neuralen Stammzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie schematische Darstellung der Funktion der Astrozyten und Oligodendrozyten.



## **1.2. Von der natürlichen zur synthetischen EZM als neurale Stammzellnische**

### **1.2.1. Natürliche neurale Stammzellnische**

Nach der embryonalen Entwicklung übernehmen die neuronalen Stammzellen die Aufgabe, neue Zellen des Nervensystems zu produzieren. Die Zone, in der sich diese Stammzellen befinden, wird als neurale Stammzellnische bezeichnet. Die Stammzellnische spielt eine sehr wichtige und kritische Rolle bei der Übertragung von Signalen der Mikroumgebung und der Zell-Zell-Wechselwirkung und kontrolliert u.a. die Proliferation und Differenzierung der Stammzellen zu Nervenzellen.<sup>9</sup> Den Beweis für die Existenz der neuronalen Stammzellnische lieferten Doetsch *et al.*<sup>10</sup> sowie Herrera *et al.*<sup>11</sup> Sie transplantierten Stammzellen in einen Stammzellnischenbereich eines Nagetiers, wo sie dann proliferierten, migrierten und differenzierten. Transplantierten sie die neuronalen Stammzellen hingegen in eine Region ohne Stammzellnische im Gehirn des Nagetiers, zeigte sich keine Proliferation: Die Zellen differenzierten ausschließlich in Gliazellen. Neuronale Stammzellen bzw. neurale Stammzellnischen des adulten Gehirns befinden sich im Bereich des Hippocampus und des Riechkolbens.<sup>9,12</sup> Die Stammzellnische beinhaltet zelluläre Komponenten, lösliche Faktoren (z. B. Wachstumsfaktoren) und die extrazelluläre Matrix (extrazelluläre Matrix (EZM)).<sup>13</sup>

### **1.2.2. Extrazelluläre Matrix (EZM)**

Viele Faktoren haben einen Einfluss auf die zellulären Prozesse. Ein entscheidender Faktor ist die Existenz einer unlöslichen Umgebung, die geeignete mechanische und biochemische Eigenschaften aufweist. Dies gibt der EZM eine maßgebliche Bedeutung für die Zellidentität, Zelladhäsion, Zellmigration, -proliferation und Zelldifferenzierung.<sup>14,15</sup> In den letzten Jahren wurden in der Stammzelltherapie adulte Stammzellen isoliert und

## 1. Einleitung

---

direkt ohne Trägermaterial implantiert. Jedoch brachte dies nur bescheidene Erfolge, da aufgrund der fehlenden Stammzellnische nur ein kleiner Anteil der Stammzellen nach der Implantation überlebte.<sup>16</sup> Die EZM besteht aus den zwei Hauptkomponenten Glykosaminoglykane (z. B. Hyaluronsäure, Heparin und Chondroitin) und Faserproteine (z. B. Kollagene und Elastin), daneben aus Glykoproteinen, zu denen das Fibronectin und Laminine gehören.<sup>17</sup> Lange Zeit wurde der EZM die Funktion als Wasserspeicher und Zellträger (Leim) zugeschrieben. Sie spielt jedoch eine weit größere Rolle in den zellulären Prozessen als nur die eines passiven Substrats. Sie interagiert mit den umgebenden Zellen und beeinflusst diese über dynamische Wechselwirkungen, beispielsweise durch Rezeptoren und die Abgabe von Wachstumsfaktoren, und sie unterstützt auch die Zell-Zell-Wechselwirkung<sup>18,19</sup> (Abbildung 1.2).

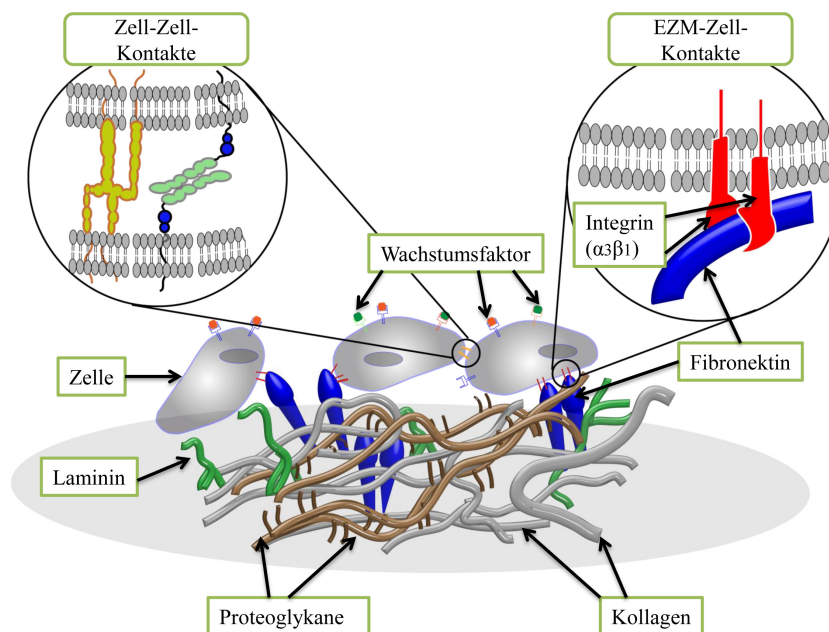


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der EZM.

Die meisten untersuchten EZM-Komponenten sind sogenannte Faserproteine (wie z. B. Kollagen und Elastin) und Glykoproteine (wie z. B. Fibronectin und Laminin).<sup>20</sup> Diese Komponenten sind neben Polysacchariden die Hauptbestandteile der EZM.

### 1.2.2.1. Kollagen

Die 28 derzeit bekannten Kollagentypen sind für die gewebe-mechanische Stabilität und für den Wassergehalt des Gewebes verantwortlich. Kollagene machen 25 % der gesamten Proteinmasse bei Säugetieren aus und verleihen dem Gewebe eine besondere Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Belastung, wie sie in Knorpel, Sehnen, Knochen und der Haut gebraucht wird. Je nach Typ befinden sich die Kollagene spezifisch in verschiedenen Geweben. Zum Beispiel sind die Kollagentypen XIII und XVIII Transmembranproteine, während die Typen I, II, III, V und XI eine mechanisch sehr stabile Tripelhelixstruktur aufweisen. Auch die Kollagentypen IV, VII und X sind in der Lage, ein Netzwerk auszubilden, z. B. die Basalmembran.<sup>21,22</sup> Da gemäß der Literatur die Peptidsequenzen (GTPGPQGIAGQRGVV<sup>23</sup> und MNYYSNS<sup>24</sup>), die aus Kollagentyp I und IV abgeleitet sind, die Differenzierung der Stammzellen unterstützen, wurden diese beiden Peptidsequenzen im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und in das Biohybridhydrogel eingebaut.

### 1.2.2.2. Laminin

Einer der Hauptbestandteile der EZM in der Basalmembran ist das Laminin.<sup>25,26</sup> Laminin weist eine besondere dreidimensionale Struktur auf, die aus drei Proteinketten besteht. Bisher wurden fünf  $\alpha$ -Ketten, drei  $\beta$ -Ketten und drei  $\gamma$ -Ketten nachgewiesen. Diese drei Proteinketten sind durch Disulfidbrücken verbunden und bilden ein kreuzförmiges Glykoprotein<sup>25</sup> (siehe Abbildung 1.3). Da Laminine Bindungsstellen für Zellrezeptoren aufweisen und einen bedeutenden Einfluss auf das Zellverhalten (Adhäsion, Migration und Proliferation) haben, wurde in dieser Arbeit ein Laminin-basiertes Peptid (IKVAV)<sup>27</sup> hergestellt und in ein Biohybridhydrogel eingebaut, um den Einfluss dieser Lamininpeptidsequenz auf das Verhalten von Stammzellen zu studieren.

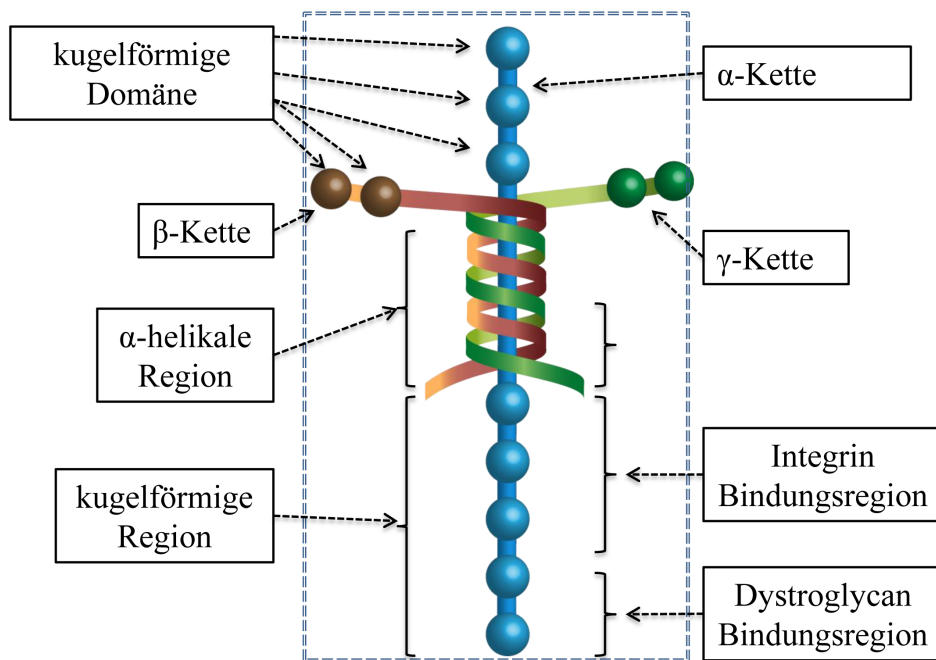


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung des kreuzförmigen Glykoproteins Laminin (grün =  $\gamma$ -Kette, braun-bordeaux =  $\beta$ -Kette und blau =  $\alpha$ -Kette).

### 1.2.2.3. Tenascin

Zur Tenascinfamilie gehören vier Mitglieder: Tenascin-R, Tenascin-X, Tenascin-Y und Tenascin-C,<sup>28</sup> die alle eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen. Tenascin-C wurde von Erickson und Taylor elektronenspektroskopisch untersucht und erwies sich als sechsarbiges hexabrachionförmiges Glykoprotein (siehe Abbildung 1.4).<sup>29</sup> Da Tenascin-C eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS und beim Wachstum von Axonen spielt,<sup>30</sup> wurde in dieser Arbeit aus der FNIII-Domäne D-5 Tenascin-C die von Prof. Feistner untersuchte Peptidsequenz (VWSRAPTA) hergestellt und in einen Biohybridhydrogel eingebaut. In der Literatur wird berichtet, dass Tenascin-C nicht nur ein wichtiger Faktor für das Wachstum des ZNS ist,<sup>31</sup> sondern auch eine große Rolle bei der Gewebereparatur nach einer Verletzung spielt.<sup>32</sup> In entwickelten Organen wurde eine sehr geringe bis gar keine Tenascin-C-Expression festgestellt. Jedoch wurde Tenascin-C im adulten ZNS, z. B. im Hippocampus, aktiv exprimiert, was es zu einem sehr interessanten Protein für die neurale Stammzellforschung macht.

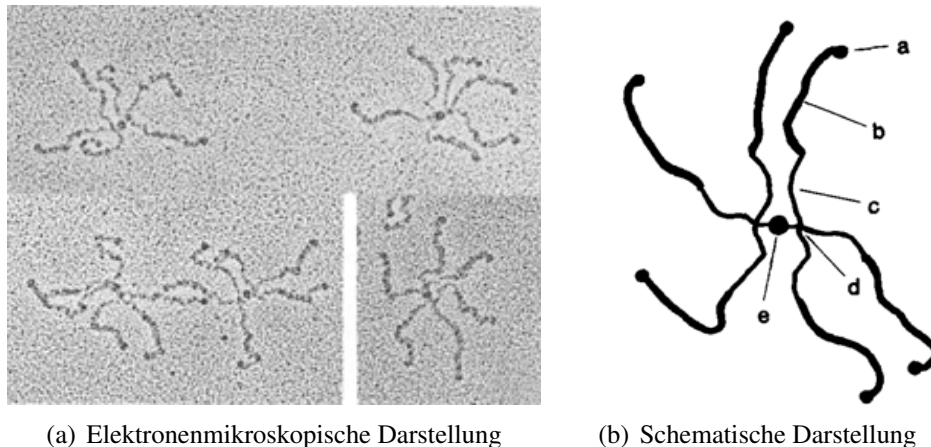


Abbildung 1.4.: (a) Elektromikroskopische Aufnahme von humanen Tenascin-C-Hexabrachionen. (b) Schematische Darstellung eines humanen Tenascin-C-Hexabrachions, a = Terminalgebilde, b = dickeres distales Segment, c = dünneres inneres Segment (die drei Segmente bilden jeweils eine „T-Verbindung“), d = Zwei Arme erstrecken sich kollinear in entgegengesetzter Richtung; der dritte Arm erstreckt sich senkrecht; jedes dieser Trimere wird durch eine kurze Verbindung zu einem zentralen Verbindungspunkt gebündelt. e = Verbindungspunkt.<sup>29</sup>

#### 1.2.2.4. Fibronektin

Fibronektin ist nicht nur in funktioneller, sondern auch in struktureller Hinsicht das am meisten untersuchte und vielseitigste EZM-Protein. Zwei stabförmige  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten, die miteinander am C-Terminal durch Disulfidbrücken verbunden sind, formen die Fibronektinstruktur<sup>33</sup> (siehe Abbildung 1.5 (a)). Jede Fibronektinpolypeptidkette ( $\sim 230$  kDa) ist aus einer Vielzahl von Domänen (ca. 40–90 Aminosäuren) zusammengesetzt, die in drei Strukturtypen (I, II und III) unterteilt sind. Jede Domäne ist über bewegliche Segmente mit der anderen Domäne verbunden,<sup>21</sup> was Fibronektin mit seinen verschiedenen Binderegionen auszeichnet, darunter Fibrin, Heparin und Kollagen sowie eine Zellbindungsregion (siehe Abbildung 1.5 (a)). Fibronektin Domäne-Typ III ist auch in anderen EZM-Proteinen zu finden und hat keine Disulfidbrücke.<sup>34</sup> Da Fibronektin in fast allen Lebewesen – sogar in primitiven multizellulären Organismen – vorkommt, wird angenommen, dass es ein essenzielles Protein in der evolutionären Entwicklung des biologischen

## 1. Einleitung

Systems ist.<sup>35</sup> Die Bindung an die Zelloberflächenrezeptoren ist wohl die wichtigste und bekannteste Funktion des Fibronektins. Die Bindung erfolgt durch das RGD-Motiv,<sup>36</sup> das sich in der Fibronektin-Domäne-Typ III befindet (siehe Abbildung 1.5 (b)). Dieses Motiv besteht aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure (im Dreibuchstabencode RGD).<sup>37</sup> Das RGD-Motiv bindet an die Integrin-Zelloberflächenrezeptoren, z. B.  $\alpha_V\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ ,<sup>38,39</sup> und fördert so die Zelladhäsion.

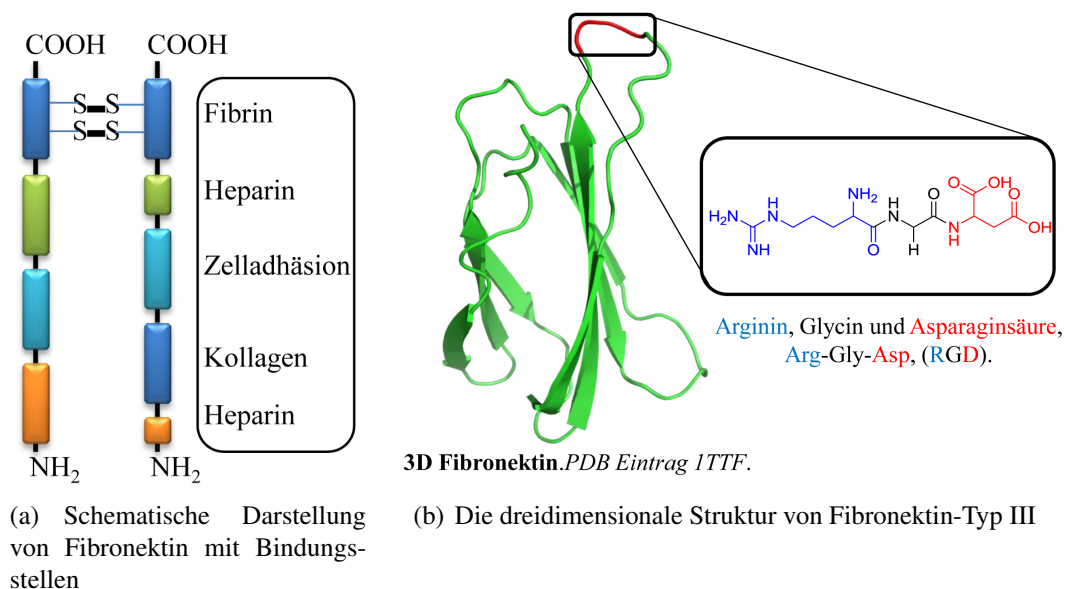


Abbildung 1.5.: (a) Schematische Darstellung von Fibronektin  $\alpha$ -,  $\beta$ -Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Im Kasten: Fibrinbindungsstellen. (b) Dreidimensionale Struktur der 10. Domäne Typ III von Fibronektin (PDB Eintrag 1TTF); die rote Schleife stellt die RGD-Peptidsequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp) dar.

Fibronektin kann löslich, z. B. im Blut, oder unlöslich vorkommen, wie in der EZM.<sup>21</sup> In dieser Arbeit wurde die Peptidsequenz (6Ahx)<sub>2</sub>GRGDSF<sup>40</sup> hergestellt und in ein Biohybridhydrogel eingebaut, um das neurale Stammzellverhalten zu studieren. In den Kapiteln 4.2.1 und 6 wird ausführlich die Herstellung RGD-modifizierter Hydrogele und deren Einfluss auf das Verhalten neuraler Stammzellen beschrieben.

### **1.2.3. Extrazelluläre Matrix (EZM) der neuralen Stammzellnische**

Die EZM der Stammzellnische weist eine spezielle Struktur auf, die für die Erhaltung und Verankerung der Stammzellen in der Nische essenziell ist. Wie bereits erwähnt, machen die Glykoproteine und die Proteoglykane die Hauptbestandteile der EZM aus. Auch in der extrazellulären Matrix (EZM) der neuralen Stammzellnische spielen die Glykoproteine bzw. die faserbildenden Proteine eine große Rolle. Dazu gehören verschiedene Kollagen, die sich im ZNS gewöhnlich neben den Endfüßchen der Gliazelle und in der Basalmembran der Blutgefäße befinden, ebenso wie der klassische Baustein der Basalmembran, das Laminin.<sup>41</sup> Ein weiterer Bestandteil der EZM der neuralen Stammzellnische sind die anti-adhäsiven Glykoproteine, wie z. B. das Tenascin. Es wurde ein Strukturfunktionsmodell für Tenascin-C entwickelt und festgestellt, dass Tenascin-C eine Rolle bei der Stimulation des Axonwachstums spielt. Durch gezieltes Entfernen von EZM-Komponenten lässt sich noch einmal zeigen, wie essenziell jeder einzelne Bestandteil ist. Während die Laminine und Fibronectin essenziell für die Entwicklung der embryonalen Stammzellen sind, zeigen Knock-out-Experimente, dass die Tenascin-C-Familie wichtig für eine gesunde genetische Entwicklung ist.<sup>42</sup> Besonders zeigt die jüngere Forschung die Beziehung zwischen Tenascin und der Entwicklung neuraler Zellen auf. Diese Forschung zeigt, dass die gesunde Entwicklung neuraler Zellen von der Anwesenheit von Mitgliedern der Tenascin-C-Familie abhängt.<sup>43</sup>

### **1.2.4. Mimetika neuraler Stammzellnischen auf Basis natürlicher und synthetischer Polymere**

Wie bereits erläutert, ist das Interesse an der Stammzellforschung in den letzten Jahren stark gestiegen. Die Notwendigkeit, Stammzellen zu steuern, zu manipulieren und gezielt zu differenzieren, unterstützt den Bedarf nach einem vertieften Verständnis der Rolle der künstlichen EZM. Anfänglich kamen konventionelle Zellkulturtechnologien als

## 1. Einleitung

---

Ergänzung des herkömmlichen löslichen Mediums zum Einsatz, um das Verhalten der Stammzellen zu kontrollieren, wodurch sich jedoch nur wenige Erfolge erzielen ließen. Die Herausforderung besteht darin, ein Material zu finden, das gewebetypische Mikromilieus von Stammzellen imitiert, den Zellen räumliche Freiheit gewährleistet und gleichzeitig die Zellfunktionen unterstützt. Einer der entscheidenden Faktoren ist die Festigkeit des Materials. Die natürliche Stammzellnische kann je nach Herkunft ganz unterschiedliche Festigkeiten aufweisen. Das natürliche Gehirngewebe ist z. B. mit einer Elastizität von  $\sim 500 \text{ Pa}$ <sup>44</sup> ein sehr weiches Gewebe, während Muskel- bzw. Knochengewebe mit einer Elastizität von  $\sim 10^4 \text{ Pa}$  bzw.  $\sim 10^{10}$  deutlich härtere mechanische Eigenschaften aufweist.<sup>45–47</sup>

In der Literatur finden sich viele Studien, die biologische Materialien, synthetische Materialien und Hybridmaterialien als Modelle für künstliche Stammzellnischen untersucht haben. Diese Materialien weisen je nach Herkunft sowie ihren mechanischen und biologischen Eigenschaften zahlreiche Vorteile und Nachteile auf. In der neuronalen Stammzellforschung werden viele verschiedene Materialien in der Hoffnung getestet, eine natürliche neurale Stammzellnische zu imitieren. Zu den natürlichen Materialien, die als neurale Stammzellnischen untersucht worden sind, gehören Kollagen,<sup>48–50</sup> Hyaluronsäure (HA),<sup>50</sup> Agarose,<sup>50</sup> Alginat,<sup>48</sup> Chitosan,<sup>50</sup> Methylcellulose (MC), Xyloglucan, Matrigel, auf Fibrin PolySia basierende Hydrogele und Peptid-Hydrogele.<sup>44</sup> Als synthetische Materialien sind Polyethylenglykol<sup>48,51,52</sup> und Polyacrylamid<sup>51,53</sup> eingesetzt worden.<sup>44</sup> Die physikalischen und biochemischen Eigenschaften dieser Materialien, einschließlich Festigkeit und Morphologie, können das Zellverhalten stark beeinflussen, beispielsweise Lebensfähigkeit, Adhäsion, Neuritenwachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration.<sup>19</sup>

Viele natürliche Bestandteile der EZM wie Proteine, Peptide, Polysaccharide und Glycosaminoglycane sind als künstliche EZM für neurale Stammzellen verwendet worden.<sup>44</sup> Die natürlichen Materialien genießen wichtige Vorteile. Mit ihrer Biokompatibilität und



Abbaubarkeit durch natürlich vorkommende Enzyme kann fast keines der synthetischen Materialien konkurrieren.<sup>54</sup> Allerdings ist die geringe Stabilität und die begrenzte Variationsmöglichkeit der mechanischen Eigenschaften von Nachteil.<sup>55,56</sup> Schließlich ist die Reinigung der aus Lebewesen entnommenen Materialien nicht einfach. Die sehr wahrscheinlichen Verunreinigungen durch restliche Bestandteile können zum Beispiel zu Immunreaktionen führen. Trotz dieser Nachteile haben die EZM-Bestandteile, insbesondere die Polysaccharide, eine bedeutende Rolle in der heutigen Stammzellforschung.

#### 1.2.4.1. Natürliche Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen

Connor *et al.* stellten fest, dass die von Ratten isolierten neuronalen Vorläuferzellen sich schneller auf 2D **Kollagen** Typ I Gel vermehren und in Neuronen und Astrozyten differenzieren.<sup>57</sup> Miyazaki *et al.* und Hiraoka *et al.* fügten Zelladhäsionsmoleküle (von Laminin abgeleitete Peptide) hinzu, um die Adhäsionsfähigkeiten der neuronalen Zellen auf dem Kollagen-Gel zu verbessern.<sup>58,59</sup> Als die Festigkeit des Kollagen-Gels durch Genipin als Vernetzer variiert wurde, wurde entdeckt, dass Neuriten deutlich länger und schneller wuchsen.<sup>60</sup> Neben dem Kollagen wurden noch andere EZM-Proteine, wie z. B. Laminin und Fibrin, als künstliche Stammzellnische angesetzt. Ju *et al.* studierten das Wachstum von Maus- und Rattenneuronen in **Fibrin**, das aus verschiedenen Spezies (z. B. Rind, Mensch und Lachs) entnommen wurde. Interessanterweise entdeckte die Forschergruppe, dass die Hydrogele mit Lachs-Fibrin den höchsten Grad an Neuritenwachstum aufwiesen.<sup>61</sup> Das native Fibrin-Hydrogel wurde von Schense *et al.* mit bioaktiven Peptidsequenzen, z. B. RGD, IKVAV, und YIGSR, ausgerüstet. Dies gelang enzymatisch während der Fibrin-Vernetzung durch einen Fibrin-stabilisierenden Faktor, Faktor XIII.<sup>62</sup>

Neben den natürlichen EZM-Proteinen wurde auch die Anwendung von natürlichen Polysacchariden in der Stammzellforschung intensiv verfolgt.

Martin *et al.* setzten das thermoreversible **Agarose-Methylcellulose**-Hydrogel-Gemisch in der Stammzellenforschung ein. Dieses thermoreversible Hydrogel hat den Vorteil, sich

## 1. Einleitung

---

bei physiologischen Temperaturen zu verfestigen, was erlaubt, die Zellen mit löslichen Methylcellulose zu mischen, während sich nach der Applikation im Patienten bei 37 °C ein physikalisch stabiles Gel ausbildet.<sup>63</sup> Die Modifizierung der **Agarose** bringt viele Vorteile mit sich und verbessert z. B. die Adhäsionsfähigkeiten des Gels. Luo und Shoichet *et al.* bauten die bekannte adhäsionfördernde Peptidsequenz GRGDS ins Agarose-Gel ein, was zur Verbesserung der Zelladhäsion und Zellmigration sowie zum Neuritenwachstum führte.<sup>64</sup> Eine weitere Modifizierung von Agarose-Gel mit der GRGDS-Sequenz führte Aizawa *et al.* durch. Das Gel wurde auch mit dem Wachstumsfaktor-AA (PDGF-AA *Platelet-derived growth factor*) aufgerüstet. Sie stellten fest, dass dieses modifizierte Agarose-Gel eine deutliche Differenzierungsneigung der neuronalen Stammzellen speziell zur Oligodendrozyten-Linie unterstützt.<sup>65</sup>

Ein weiteres natürliches Polysaccharid mit interessanten Merkmalen ist **Chitosan**. Chitosan ist ein natürliches Polymer, das durch die alkalische oder enzymatische Deacetylierung von Chitin hergestellt werden kann. Der Grad der resultierenden Deacetylierung kann variieren: Sie kann vollständig oder teilweise durchgeführt werden. Dies hat nicht nur auf die Kettenlänge des Polymers bzw. die Löslichkeit und Viskosität Einfluss, sondern auch auf die positive Ladungsdichte, die einen starken Einfluss auf die Zelladhäsion sowie viele andere Zelleigenschaften hat. Um die Chitosan-Wasserlöslichkeit zu verbessern, können z. B. die Amingruppen des Chitosans mit Methacrylsäureanhydrid umgesetzt werden. Chitosan-Methacrylamid wurde von Yu *et al.* mit Peptidsequenzen, z. B. YIGSR und IKVAV, modifiziert. Dieses modifizierte Chitosan zeigte eine deutliche Verbesserung beim Neuritenwachstum und der neuronalen Zelladhäsion.<sup>66</sup>

In der Tabelle 1.1 wurden die obengenannten natürlichen Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen zusammengefasst.

## 1.2. Von der natürlichen zur synthetischen EZM als neurale Stammzellnische

Tabelle 1.1.: Natürliche Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen.

Hydrogel	Festigkeit (pa)	2D/3D	Getestete Zelltypen	Additive	Referenzen
Kollagen	60–400	2D	Neurale Vorläuferzellen (Ratten)	ohne Additive	[57]
	150–400	2D/3D	Neurale Vorläuferzellen (Ratten)	PPFLMLLLKGSTR-Peptid	[58–60]
	2–20	3D	Embryonale Spinalganglionzellen (Huhn)	RGD und cRGD	[67]
Fibrin	250–2100	3D	Embryonale Spinalganglionzellen (Huhn)	RGD, IKVAV, und YIGSR	[62]
	125–2150	2D	Embryonale Zellen bei E17–E19 (Ratten)	ohne Additive	[68]
Agarose	5–130	3D	Spinalganglionzellen	ohne Additive	[69]
	10–20	3D	Spinalganglionzellen (Huhn)	GRGDS	[64]
	k.A.	2D	NSPCs (erwachsene Ratten)	PDGF-AA-Wachstumsfaktor	[65]
Chitosan	1000–30000	2D	NPCs (erwachsene Ratte)	ohne Additive	[45]
	k.A.	2D	Neuronen des SCG (Ratten)	Methacrylamid, YIGSR, IKVAV	[66]

### 1.2.4.2. Synthetische Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen

Synthetische Hydrogele haben einige bemerkenswerte Vorteile gegenüber natürlichen Hydrogelen, und zwar ihre einstellbaren mechanischen Eigenschaften sowie die einfache Kontrolle der Gerüststruktur und chemischen Zusammensetzung. Allerdings reichen synthetische Hydrogele allein meist nicht aus, um natürliches Gewebe zu ersetzen, weshalb sie mit natürlichen Liganden, wie z. B. Peptiden, funktionalisiert werden.<sup>70</sup>

**Polyacrylamid-Hydrogele.** **NeuroGel™** ist ein literaturbekanntes synthetisches und biokompatibles Hydrogel, das von Dr. Woerly entwickelt wurde. Das Gel ist ein Poly[N-2-(hydroxypropyl)methacrylamid] (PHPMA), das mit der RGD-Peptidsequenz (Arg-Gly-Asp) ausgerüstet ist. Es wird für ein vielversprechendes Gerüstmaterial gehalten, das die Genesung des verletzten Rückenmarks fördern soll.<sup>71,72</sup> Ein weiteres Polyacrylamid-Hydrogel für die Stammzellforschung wurde von Healy *et al.* entwickelt. Das Hydrogel ist ein Polymernetzwerk bestehend aus Polyacrylamid und Polyethylenglycol (PEG), das mit bioaktiven Peptidsequenzen, wie RGD und IKVAV (Ile-Lys-Val-Ala-Val), funktionalisiert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass RGD in einer Konzentration von  $> 5,3 \text{ pmol/cm}^2$  die Zellselbsterneuerung und Differenzierung von neuronalen Stammzellen fördert.<sup>73</sup> Die mechanischen Eigenschaften dieser Hydrogele können leicht durch Variationen der Konzentration des Vernetzeranteils eingestellt werden. Diese Veränderungen der mechanischen Eigenschaften erlauben es, den Einfluss der Gelfestigkeit auf das Stammzellverhalten zu studieren.<sup>74,75</sup> Interessanterweise zeigen die Ergebnisse, dass adulte neurale Stammzellen von Ratten, die auf festen Gelen mit einem Elastizitätsmodul von 1–10 kPa kultiviert wurden, eine Differenzierungsneigung zu Gliazellen (Oligodendrozyten und Astrozyten) hervorbrachten. Dagegen differenzierten adulte neurale Stammzellen von Ratten, die auf weicheren Gelen mit einem Elastizitätsmodul von 100–500 Pa kultiviert wurden, hauptsächlich zu Neuronen.<sup>75</sup> Obwohl es viele Vorteile und gute Eigenschaften der Polyacrylamid-Hydrogele gibt, wie z. B. die einfache Herstellung, die einfache Variation

der mechanischen Eigenschaften sowie die Möglichkeit, bioaktive Liganden im Gel kovalent zu binden, weisen sie auch große Nachteile auf. Die *in-situ* Polymerisation kann nicht angewendet werden, da Restmonomere, wie zum Beispiel Acrylamid, toxisch sind und vorher entfernt werden müssen.<sup>76</sup>

Aufgrund seiner Hydrophilie und seiner Biokompatibilität ist **Polyethylenglycol (PEG)** sehr häufig in der Literatur zur Stammzellforschung zu finden.<sup>77,78</sup> Um die Bioabbaubarkeit des PEG zu verbessern, wurden von Mahoney *et al.* weitere Modifikationen durchgeführt, nämlich eine Copolymerisation von PEG-, Poly-milchsäure-Hydrogel und Polyglycolsäure-Hydrogel.<sup>79</sup> Eine weitere Modifikation mit Peptiden oder Proteinen im PEG ist ebenfalls möglich. Zum Beispiel bauten Freudenberg *et al.* das RGD-Peptid kovalent und einen weiteren Wachstumsfaktor (FGF-2) nicht kovalent in das sternförmige PEG-Hydrogel ein. In 2D *In-vitro*-Studien wurde beobachtet, dass die aus Mäuseföten entnommenen neuronalen Stammzellen auf diesem Gel sehr gut haften können. Aufgrund der langsamen Freisetzung des FGF-2 wurde die Differenzierung der Zellen komplett verhindert. Die Zellen blieben in einem undifferenzierten Zustand, obwohl ein zusätzliches Differenzierungsmedium hinzugegeben wurde.<sup>80</sup> Der Einfluss der PEG-Hydrogelfestigkeit auf das Zellverhalten wurde von Hynes *et al.* untersucht. Sie erstellten eine Bibliothek von PEG-Hydrogelen mit Polylysin (PLL), indem das Verhältnis von PEG zu PLL variiert wurde, was einen direkten Einfluss auf die Festigkeit und den Quellungsgrad des Hydrogels hat. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen auf dem Hydrogel bis zu 17 Tage überlebten. Zudem ergab sich, dass die Migration und die Differenzierung der Zellen durch die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels stark beeinflusst wurden.<sup>52</sup> Ein zusätzlicher Faktor, der die Ergebnisse signifikant beeinflusst, ist die kationische Ladungsdichte des Hydrogels, die durch PLL erzeugt wird. Dieser Faktor wird in Kapitel 5.1 ausführlicher beschrieben.

In Tabelle 1.2 wurden die Merkmale der oben genannten synthetischen Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen zusammengefasst.

## 1. Einleitung

Tabelle 1.2.: Synthetische Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen.

Hydrogel	Festigkeit $G'$ (pa)	2D/3D	getestete Zelltypen	Additive	Ref.
Polyacrylamid	10–10000	2D	adulte neurale Stammzellen (Ratte)	RGD	[75 ]
	10–10 <sup>4</sup>	2D	PC12 Zellen	Fibronectin	[81 ]
	200–9000	2D	embryonale Stammzellen (Ratten)	Fibrin	[68 ]
	94000	2D	NSZ-Zellen (adulte Ratten)	RGD, IKVAV	[73 ]
PEG	25000–135000	2D	PC 12 Zellen	RGD, IKVAV, und YIGSR	[82 ]
	100–20000	3D	neurale Progenitorzellen (Maus)	PLL	[52 ]
	100–4500	2D	NSZ (Maus)	RGD, FGF-2-Wachstumsfaktor	[80 ]

Wie gezeigt wurde, sind **Hydrogele** aufgrund ihrer Eigenschaften unersetzliche Materialien in der Stammzellforschung.

## 1.3. Hydrogel

### 1.3.1. Definition von Hydrogelen

Da Gele gleichzeitig Festkörpereigenschaften und Eigenschaften von Flüssigkeiten aufweisen, ist eine Definition des Materialzustands schwierig. Sie besitzen strukturelle Integrität und fließen nicht. Für Moleküle, die signifikant kleiner als die Gelporen sind, besitzen Gele das Transportvermögen von Flüssigkeiten. Gele, die im Wasser aufquellen – auch Hydrogele genannt –, besitzen hydrophile Polymerkomponenten, welche mittels kovalenter oder nicht kovalenter (physikalischer) Bindungen vernetzt sind.<sup>83,84</sup> Die Vernetzungsart bzw. die Vernetzungsdichte ist für die räumliche und mechanische Stabilität verantwortlich, während der hohe Flüssigkeitsanteil zu den fluidähnlichen Transporteigenschaften führt. Diese besondere Kombination von verschiedenen physikalischen Eigenschaften macht Hydrogele zu einem sehr guten Kandidaten für viele Anwendungen (siehe Abbildung 1.6). Eine sehr verbreitete und bekannte Verwendungsweise von Hydrogelen ist der Einsatz als superabsorbierende Materialien, da ein Hydrogel das 100- bis 1000-Fache seines Trockengewichts an Wasser aufnehmen kann.<sup>85</sup> Weitere Hydrogelanwendungen gewinnen in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung, z. B. der Einsatz als chemische/biologische Sensoren,<sup>86</sup> bei der chemisch-biologischen Trennung<sup>87</sup> und als Mikroreaktoren.<sup>88</sup> Nicht zuletzt hat Hydrogel in der Medizin als künstliches Gewebe in der Geweberegeneration<sup>89,90</sup> und bei der Freisetzung von Medikamentenwirkstoffen<sup>91</sup> große Bedeutung gewonnen.

### 1.3.2. Klassifizierung von Hydrogelen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Hydrogele zu klassifizieren. In dieser Arbeit werden sie nach ihrer Vernetzungsart eingeteilt und im Folgenden erklärt.

## 1. Einleitung

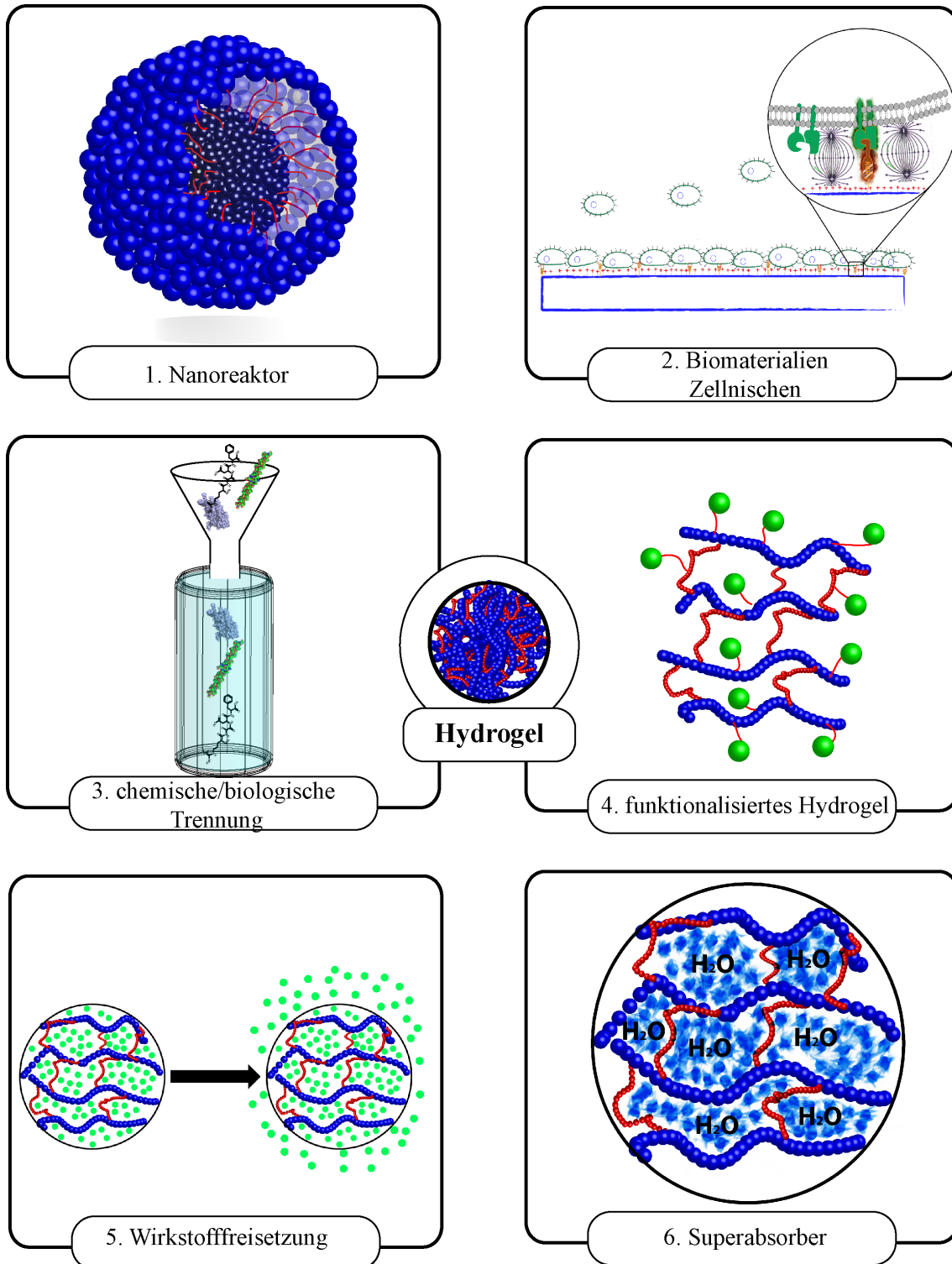


Abbildung 1.6.: Beispiele für die Verwendung von Hydrogelen: 1. Nanoreaktor, 2. Biomaterialien, Zellnischen, 3. Chemische/biologische Trennung, 4. Funktionalisiertes Hydrogel, 5. Wirkstofffreisetzung, 6. Superabsorber.



### 1.3.2.1. Physikalisch vernetzte Hydrogele

Zu den physikalisch vernetzten Hydrogelen gehören sowohl synthetische als auch natürliche Hydrogele. Die stabile dreidimensionale Struktur kann dabei wieder in eine Polymerlösung umgewandelt werden. Dieser Phasenübergang zählt zu den Vorteilen dieser Hydrogelvernetzungsart. Sie wird dementsprechend häufig als Verkapselungsmaterial von Proteinen,<sup>92</sup> Zellen<sup>93</sup> und Wirkstoffen<sup>94</sup> verwendet, die dann durch die Auflösung der Hydrogelstruktur freigesetzt werden. Die physikalische Vernetzung besteht meist aus hydrophoben Wechselwirkungen, Wasserstoffbindungen oder ionischen Wechselwirkungen. Das bekannteste physikalisch vernetzte Hydrogel ist das Alginat, das aus einem Polysaccharid (Mannuronsäure und Gluconsäure) besteht, das mit Calciumionen vernetzt werden kann.<sup>95</sup> Die Auflösung dieses Hydrogels kann durch die Zugabe eines chelatisierenden Reagens erfolgen, das die Calciumionen bindet. Hydrogele dieser Art können auch synthetisch hergestellt werden. Ein bekanntes Beispiel ist die Mischung von zwei Polymeren. Beispielsweise bilden Poly(acrylsäure) und Poly(methacrylsäure) Wasserstoffbindungen mit Poly(ethylenglycol) aus. Die entstehenden Bindungskräfte geben dem Hydrogel eine gewisse mechanische Stabilität. Die Wasserstoffbindungen entstehen zwischen dem Wasserstoffakzeptor – in diesem Fall dem Sauerstoff des Poly(ethylenglycols) – und der Carboxygruppe der Polysäuren, wobei die Säuren protoniert vorliegen müssen, weshalb die Bildung von Hydrogelen dieser Art pH-abhängig ist.<sup>96,97</sup> Besteht das Blockpolymer aus hydrophilen und hydrophoben Teilen, kann ein physikalisches Hydrogel<sup>98</sup> entstehen, wie z. B. der Triblock-Copolymer PEG–PLGA–PEG.<sup>99</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich chemisch vernetzte Hydrogele hergestellt.

### 1.3.2.2. Chemisch vernetzte Hydrogele

Im chemisch vernetzten Gel sind die Vernetzungsstellen kovalent. Diese Art von Gel weist eine höhere mechanische Stabilität auf als physikalisch vernetztes Hydrogel. Che-

## 1. Einleitung

---

misch vernetzte Hydrogele können durch zwei Vernetzungsstrategien hergestellt werden: Gelbildung durch *In-situ*-Polymerisation und durch die **nachträgliche Vernetzung** von Präpolymeren (Abbildung 1.7).

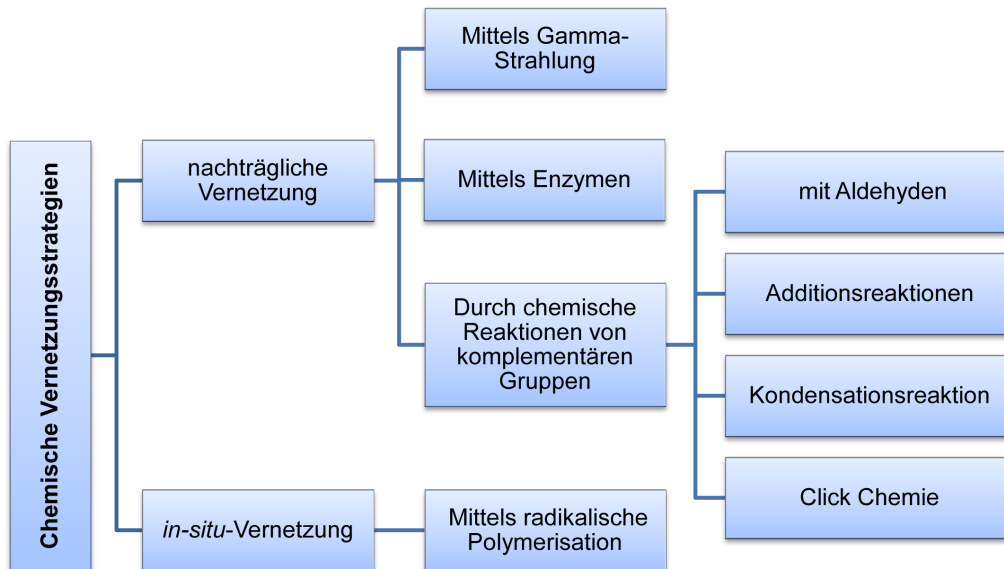


Abbildung 1.7.: Vernetzungsstrategien der chemisch vernetzten Hydrogele.

Eine sehr verbreitete Strategie, um dieses dreidimensionale Netzwerk herzustellen, ist die Eintopf-Polymerisation (*In-situ*-Vernetzung), wobei die Monomere und der Vernetzer zusammen polymerisiert werden. Im Allgemeinen basiert diese Strategie auf der Verwendung von mono-funktionellen Monomeren zusammen mit di- oder tri-funktionellen Vernetzermomeren. Diese Strategie wurde bereits zur Herstellung einer Vielzahl von unterschiedlichen Hydrogelen für die Gewebekonstruktion verwendet. So wurde z. B. PEG-Diacrylate von Lee *et al.* als Vernetzer eingesetzt, um N-methacrylierte L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) Monomere mittels freier radikalischer Polymerisation zu gelieren.<sup>100</sup>

Die Vernetzung kann auch nachträglich erfolgen. Dies erfolgt hauptsächlich durch drei nachträgliche Vernetzungsmethoden: durch Gammastrahlung,<sup>101</sup> die Verwendung von Enzymen<sup>102,103</sup> oder durch chemische Reaktionen von komplementären Gruppen<sup>102</sup> (Abbildung 1.7).<sup>104</sup>

Bei der ersten nachträglichen Vernetzungsmethode wird Gammastrahlung zur Vernetzung von wasserlöslichen Polymeren verwendet. Die Strahlung ist in der Lage, die C-H-Bindung zu spalten, was freie Radikale auf dem Polymerrückgrat erzeugt. Darüber hinaus führt die Radiolyse von Wasser zur Bildung von Hydroxylradikalen, die die Polymerketten angreifen können, was zu zusätzlichen Radikalenzentren führt. Die Rekombination der Makroradikalketten führt zu einem Polymernetzwerk.<sup>101</sup>

Eine weitere nachträgliche Vernetzungsmethode ist die Verwendung von Enzymen, um die Polymernetzwerke herzustellen.<sup>102</sup> Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von Transglutaminase, um Glutaminylgruppen, funktionalisierte PEG-Moleküle und Polylysin-co-phenylalanin zu vernetzen.<sup>103</sup>

Die zweite Möglichkeit ist die chemische Reaktion von komplementären Gruppen.<sup>102</sup> Eine dieser möglichen Reaktionen ist die Vernetzung mit Aldehyden. So lassen sich z. B. wasserlösliche Polymere, die Hydroxyfunktionen besitzen (z. B. Polyvinylalkohol), mit Glutaraldehyd als Vernetzungsreagenz zu Hydrogelen umsetzen.<sup>105</sup>

Die dritte Möglichkeit, ein Netzwerk nachträglich mittels chemischer Reaktion von komplementären Gruppen zu schaffen, stellt die Additionsreaktion dar. Beispielsweise können Polysaccharide mittels 1,6-Hexamethylen-diisocyanat,<sup>102</sup> Divinylsulfon<sup>106</sup> oder 1,6-Hexandibromid<sup>107</sup> vernetzt werden.

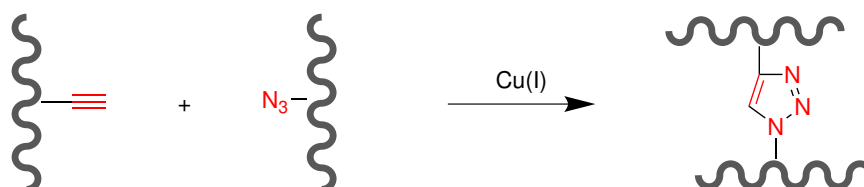
Eine weitere Möglichkeit zur Vernetzung von Polymeren ist die Verwendung von Kondensationsreaktionen zwischen Hydroxy- oder Aminogruppen mit Carbonsäuren oder deren Derivaten.<sup>102</sup> Für die Herstellung der Amidbindung bieten sich viele Kupplungsreagenzien an. Eine der bekanntesten Reagenzien dafür ist N,N (3-dimethylaminopropyl) N-ethylcarbodiimid (EDC), das die Vernetzung von Gelatin zu Hydrogelen ermöglicht.<sup>108</sup>

Um das Hydrogel mit biologischen Eigenschaften auszurüsten, soll es bioaktive Liganden enthalten oder in der Lage sein, lebende Zellen, Proteine oder Medikamentenwirkstoffen zu verkapseln. Dies zeigt den großen Bedarf, eine bioorthogonale Vernetzungsreaktion zu finden, die die biologischen Liganden durch die Vernetzungsreaktion unversehrt

## 1. Einleitung

---

lässt. Die Staudinger-Reaktion,<sup>109</sup> [4+1] Cycloaddition<sup>110</sup> und Click-Chemie lassen sich als gute Beispiele in diesem Bereich anführen;<sup>111</sup> z. B. wurde Hyaluronsäure-Hydrogel mittels Kupfer (I)-katalysierter Cycloaddition vernetzt (Schema 1.1). Dieses Gel wurde als Wirkstoffverkapselungsgel und als künstliche Zellnische verwendet.<sup>112</sup>



Schema 1.1: Nachträgliche Vernetzung. Click-Chemie (Kupfer (I)-Katalysator).

Yang *et al* verwendeten Kupfer-katalysierte Click-Chemie, um ein mit RGD funktionalisiertes Hydrogel herzustellen. Die Festigkeit des Gels wurde von 2 bis 18.8 kPa variiert.<sup>113</sup> Die Gelbildung dauert 2 bis 3 min, wobei dies von der Temperatur sowie der Konzentration des Polymers und des Katalysators abhängig ist. Die Kupfer-katalysierte Click-Chemie (nachträgliche Vernetzungsreaktion) zeigt viele Vorteile, darunter Bioorthogonalität, Effizienz, Selektivität und relativ schnelle Reaktionsgeschwindigkeit. Eine schwerwiegende Einschränkung der Kupfer-katalysierten Reaktion in der biomedizinischen Anwendung ist die Toxizität der Kupferionen bzw. der Sauerstoffradikale, die durch diese Kupferionen erzeugt werden können.



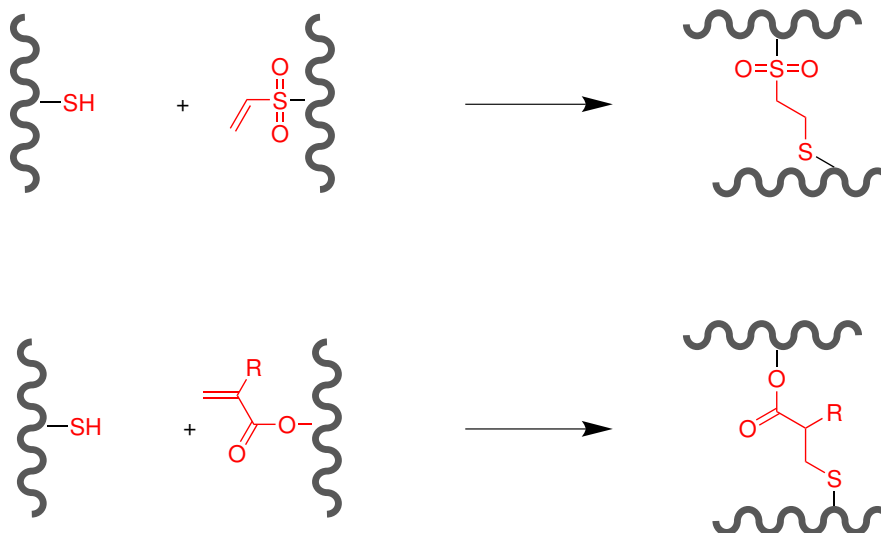
Schema 1.2: Nachträgliche Vernetzung. Click-Chemie (Kupfer(I)-frei).

Diese können schwere strukturelle Schäden (Oxidation) von Biomolekülen (Proteinen, Nucleinsäuren, Polysacchariden, Lipiden etc.) verursachen.<sup>114</sup> Daher wurde eine Kupfer-

freie Click-Chemie-Reaktion weiterentwickelt (Schema 1.2).

In den vergangenen Jahren wurden Hydrogele mithilfe der spannungskatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) entwickelt. Die Ringspannung der Cyclooctin-Moleküle ermöglicht eine schnelle Reaktion mit Aziden.<sup>115,116</sup> Anseth *et al.* haben 2009 ein enzymatisch abbaubares Hydrogel durch eine spannungskatalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) zwischen 4-Arm-PEG-Tetraziden und difluoriertem Cyclooctin (DIFO)/Alken-funktionalisiertem Peptid, (GPA GOLGI) Sequenz unter physiologischen Bedingungen hergestellt und erfolgreich 3T3-Zellen eingekapselt.<sup>117</sup> Diese Art von Click-Chemie-Vernetzungsreaktion hat den Vorteil, kupferfrei und bioorthogonal zu sein. Der größte Nachteil besteht in der schwierigen, mehrstufigen cyclooctin-Synthese sowie der geringen Ausbeute. Dies macht die Herstellung großer Mengen an Hydrogel sehr aufwendig und unökonomisch.

Die Thiol-Michael-Addition ist wegen der schnellen Reaktionszeit, der hohen Selektivität und des einfachen Zugangs zu Edukten in der Literatur als nachträgliche Vernetzungsmethode eines Hydrogels weit verbreitet. Die Reaktion erfolgt mittels Zugabe eines Thiols an eine Doppelbindung in Acrylat, Vinylsulfon oder Maleimid<sup>118,119</sup> (Schema 1.3).



Schema 1.3: Nachträgliche Vernetzung. Thiol-Michael-Addition.

## 1. Einleitung

---

Hubbell und Lutolf *et al.* waren die ersten, die die Michael-Addition als nachträgliche Vernetzungsreaktion anwendeten.<sup>120</sup> Die Hydrogele wurden aus PEG-Multiacrylat und PEG-Dithiol oder thiolhaltigen Peptiden hergestellt. Die Gelbildungsreaktionsgeschwindigkeit kann durch einen basischen Katalysator kontrolliert werden.<sup>121</sup> Die Liste der nachträglichen Vernetzungsreaktionen ist lang und kann hier nicht vollständig dargestellt werden. Die Reaktionen, die für diese Arbeit relevant und literaturbekannt sind, wurden bereits oben beschrieben.

In dieser Arbeit wurden die freie radikalische Polymerisation und die kontrollierte radikalische Polymerisation angewendet, mit dem Ziel, das Biohybridhydrogel herzustellen. Die Vernetzungen erfolgten mittels der zwei Vernetzungsstrategien (*In-situ*- und **nachträgliche Vernetzung**).

### 1.3.3. Hydrogel-Charakterisierung

Die hergestellten Hydrogele wurden in dieser Arbeit sowohl chemisch als auch physikalisch charakterisiert. Die chemische Charakterisierung der Polymere wurde durch die Standardanalysemethoden (IR, UV, GPC und NMR) durchgeführt. Da die chemisch vernetzten Polymere (Hydrogel) unlöslich sind, fordert ihre Charakterisierung im Vergleich zu unvernetzten Polymeren spezielle Methoden. Netzwerke können durch verschiedene Parameter beschrieben werden, darunter Netzwerkparameter, Festigkeit und die chemische Zusammensetzung.

#### 1.3.3.1. Netzwerkparameter

Die Netzwerkparameter Verhängungsmolekulargewicht  $M_e$  (Molmasse zwischen zwei Netzpunkten), Netzpunktdichte  $\nu_e$  und Netzpunktabstand  $\xi$  lassen sich aus der Theorie der Gummielastizität errechnen.<sup>122</sup>

$$G'_p = \left(1 - \frac{2}{f}\right) \cdot v_e \cdot R \cdot T = \frac{(f-2)}{2} \cdot n_e \cdot R \cdot T = \frac{(f-2)}{2} \frac{C}{M_e} \cdot R \cdot T \quad (1.1)$$

- $f$  Funktionalität des Vernetzers  
 $v_e$  Zahl der elastisch wirksamen Ketten pro Volumeneinheit  
 $n_e$  Zahl der elastisch wirksamen Verhängungspunkte pro Volumeneinheit  
 $C$  totale Monomerkonzentration  
 $G'_p$  Plateaubereich des Speichermoduls

Die Netzwerkparameter sind das Verhängungsmolekulargewicht  $M_e$  (Molmasse zwischen zwei Netzpunkten), die Netzpunktdichte  $v_e$  und der Netzpunktabstand  $\xi$ .

$$M_e^* = \frac{\rho \cdot R \cdot T}{G'_p} \quad (1.2)$$

$$v_e = \frac{G'_p \cdot N_A}{R \cdot T} \quad (1.3)$$

$$\xi = (\sqrt[3]{v_e})^{-1} \quad (1.4)$$

- $M_e^*$  Verhängungsmolekulargewicht  
 $v_e$  Netzpunktdichte  
 $\xi$  Netzpunktabstand

Die theoretische Abschätzung der Maschenweite des gequollenen Gels ist ein wichtiges Kriterium und liefert Informationen über das Netzwerk, insbesondere für die Vorhersage, ob Signal-Proteine, z. B. ein Wachstumsfaktor im 3D-Zellexperiment, in ein derartiges Gelnetzwerk eindringen kann und ob das Protein einen Zugang zu den Zellen hat oder nicht. Da der errechnete Wert der Maschenweite ein Mittelwert ist, sind kleinere und größere Maschen nicht auszuschließen, weshalb kleinere oder größere Proteine teilweise

## 1. Einleitung

eindringen können.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich 2D-Zellexperimente durchgeführt. Die Zellen und die benötigten Proteine (Serum) wurden auf das Gel gebracht. Daher steht bei dieser Arbeit die Errechnung der Netzwerkparameter nicht im Mittelpunkt, sondern die entscheidenden Hydrogelmerkmale sind hier die Festigkeit, der Quellungsgrad und die chemische Zusammensetzung des Hydrogels.

### 1.3.3.2. Rheologie. Dynamisches Oszillationsexperiment

Um Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften der erzeugten Hydrogele treffen zu können, bietet sich u. a. das Oszillationsexperiment<sup>123,124</sup> aus der Rheologie an.

Das Hydrogel wird zwischen zwei Platten positioniert und es wird eine sinusförmige Deformation  $\gamma$  mit einer Kreisfrequenz  $\omega$  ausgeübt (Gleichung 1.5, Abbildung 1.8).

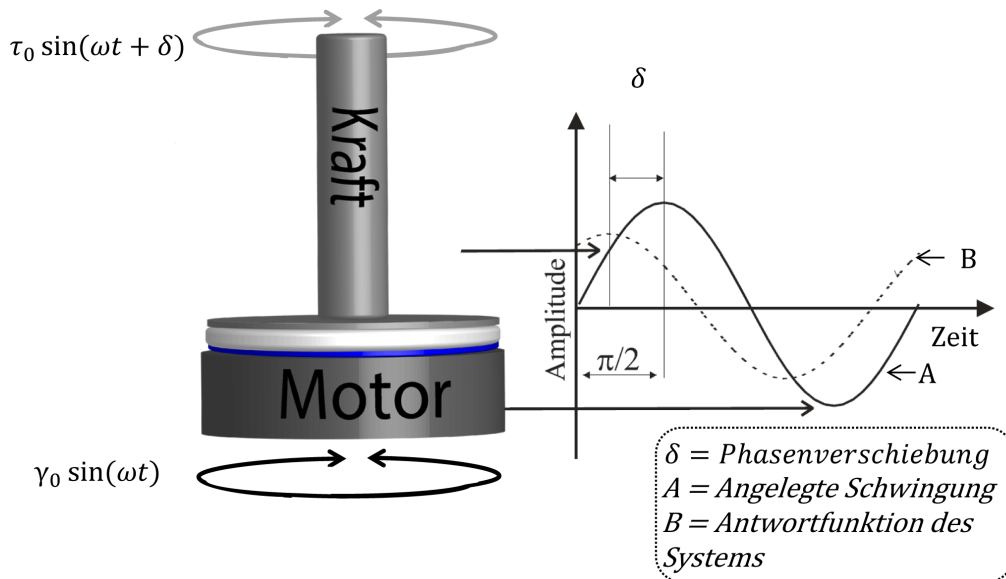


Abbildung 1.8.: Oszillationsexperiment. Amplitudenreduzierung und Phasenverschiebung bei einer sinusförmigen Deformation  $\gamma$  einer viskoelastischen Probe.

$$\gamma = \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (1.5)$$



Die Phasenverzögerung  $\delta$  ist materialabhängig und wird durch die gemessene Spannung mittels Messplatte festgestellt (Gleichung 1.6).

$$\sigma = \sigma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (1.6)$$

Das Verhalten ideal-elastischer Körper bei Ausübung einer Deformation wird durch das Hooke'sche Gesetz beschrieben ( $\sigma$  = Schubspannung [Pa],  $G$  = Schub- bzw. Schermodul [MPa oder GPa],  $\gamma$  = Deformation) (siehe Gleichung 1.7).

$$\sigma = G \cdot \gamma \quad (1.7)$$

Für eine viskoelastische Probe liegt die Phasendifferenz bei  $0 < \delta < \pi/2$ . In diesem Fall wird ein komplexes Schubmodul  $G^*$  benötigt (Gleichung 1.8).

$$\sigma = G^* \cdot \gamma \quad (1.8)$$

Dies lässt sich durch Speichermodul ( $G'$ ) und Verlustmodul ( $G''$ ) berechnen (Gleichung 1.9).

$$G^* = G' + iG'' \quad (1.9)$$

$G'$  und  $G''$  können aus den experimentellen Daten berechnet werden (siehe Gleichung 1.10 und 1.11).

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot \cos \delta \quad (1.10)$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cdot \sin \delta \quad (1.11)$$

Der Verlustfaktor  $\tan \delta$  errechnet sich aus der Gleichung 1.12.

## 1. Einleitung

---

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (1.12)$$

Die komplexe Schwingungsviskosität  $\eta^*$  kann durch die Kreisfrequenz  $\omega$  errechnet werden (Gleichung 1.13 und 1.14).

$$\eta^* = \frac{G^*}{i \cdot \omega} \quad (1.13)$$

$$|\eta^*| = \frac{\sqrt{G'^2 + G''^2}}{\omega} \quad (1.14)$$

Die logarithmische Darstellung des Speicher- und des Verlustmoduls in Abhängigkeit von der Kreisfrequenz bietet die Möglichkeit, die vorliegende Materialstruktur zu identifizieren und klassifizieren.

Im Bereich der so genannten Fließzone liegen die Werte von  $G''$  oberhalb der Werte von  $G'$  (Abbildung 1.9 a). Dies ist bei einer sehr verdünnten Polymerlösung der Fall, wobei die Polymerketten aneinander abgleiten und die eingebrachte Energie dissipiert.

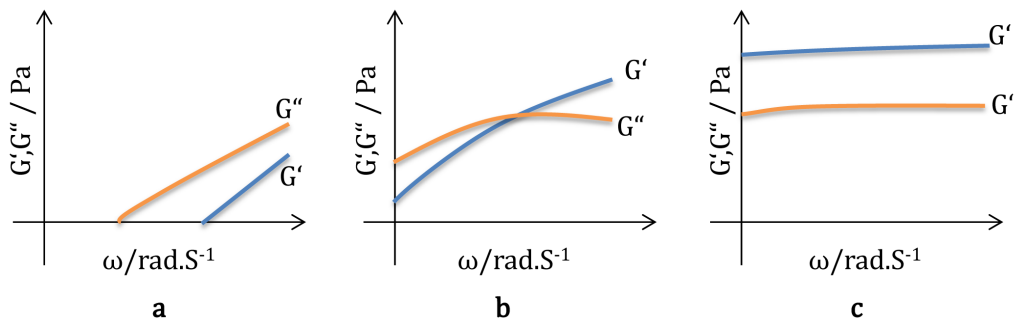


Abbildung 1.9.: Verlauf von  $G'$  und  $G''$  als Funktion der Kreisfrequenz, a) Fließzone, b) Übergangszone, c) Plateauzone.

Ist die Probe eine hochkonzentrierte Polymerlösung oder ein physikalisch vernetztes Gel, zeichnet sich ein Schnittpunkt des Verlustmoduls  $G''$  und des Speichermoduls  $G'$  ab. Steigt die Drehfrequenz, münden  $G'$  und  $G''$  in den Plateaubereich (Abbildung 1.9 b). Bei kovalent vernetzten Polymeren (chemisch vernetzten Gelen) tritt keine Fließzone auf.

Vielmehr weist das Material dann schon bei kleinen Frequenzen einen Plateaubereich von  $G'$  und  $G''$  auf, und  $G''$  bleibt unterhalb des Plateaubereichs von  $G'$  (siehe Abbildung 1.9 c).

### 1.3.3.3. Quellung

Ein wichtiges Merkmal von Hydrogelen ist ihre Fähigkeit, Wasser aufzunehmen. Die Zugabe von Lösungsmittel (Wasser) zu einem vernetzten Polymer ergibt eine homogene Phase und führt durch die Lösungsmittelzugabe zur Volumenvergrößerung. Diese homogene Phase ist keine viskose Flüssigkeit, sondern hat die Eigenschaft eines viskoelastischen Körpers.<sup>125</sup> Da die vernetzten Polymerketten nicht uneingeschränkt voneinander entfernt sein können, wird bei weiterer Zugabe des Quellmittels ein Punkt erreicht, an dem zwei Phasen entstehen. Die erste Phase ist das gequollene Gel, die zweite Phase ist das reine flüssige Quellmittel. Dieser Punkt wird als Quellungsgrad bezeichnet und wird durch die Gleichung 1.15 berechnet.

$$Q = \frac{\text{Gewicht des gequollenen Hydrogels} - \text{Gewicht des getrockneten Hydrogels}}{\text{Gewicht des getrockneten Hydrogels}} \quad (1.15)$$

Neben der physikalischen Charakterisierung des Biohybridhydrogels wurde in dieser Arbeit auch seine chemische Zusammensetzung durch die HR-MAS-NMR-Spektroskopie analysiert.

### 1.3.3.4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere biochemische Anwendungen untersucht, wobei die HR-MAS-Spektroskopie als eine neue analytische Methode zur Charakterisierung der peptidfunktionalisierten Hydrogele in Abhängigkeit von der Gelfestigkeit bzw. der Vernetzerkonzentration verwendet wurde. Ein Teil dieser Arbeit wurde 2015 publiziert.<sup>126</sup>

**Theorie und historische Bedeutung**<sup>127</sup> : Obwohl die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) bereits im Jahr 1945<sup>128,129</sup> erfunden wurde, hat diese Methode zur Strukturaufklärung und zur molekularen Erkennung in der Chemie erst zwanzig Jahre später an Bedeutung gewonnen. Mitte der 1960er-Jahre wurde die NMR zu einer unverzichtbaren analytischen Methode in jedem Chemielabor. Diese analytische Methode ist aber leider aufgrund der anisotropen Wechselwirkungen (z. B. Zeeman-, dipolare, Elektronenspin- und Quadrupolwechselwirkungen) auf lösliche Proben begrenzt. Feststoffe müssen zunächst gelöst oder geschmolzen werden, da die Moleküle in der flüssigen Phase die anisotrope Wechselwirkung durch stochastische Molekularbewegung ausmitteln. Ein gutes Beispiel dafür ist das Wassermolekül, das nur  $10^{-11}$  Sekunde (s) für eine komplette Neuorientierung braucht,<sup>127</sup> während Feststoffe im Gegensatz dazu keine Bewegung auf molekularer Ebene aufweisen. Daher liefert die NMR-Messung eines Feststoffs statt einer scharfen Spektrallinie ein breites Signal, das die meisten Informationen verbirgt, die für den Chemiker interessant sind. Zum Beispiel ist die Signalbreite des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums von Wasser ca. 0,1 Hertz (Hz), während die Signalbreite einer statischen Probe von Eis ca. 100 kHz breit ist, d. h. eine Millionen Mal breiter. Dieses Problem wurde von *Andrew et al.*<sup>130</sup> und *Lowe*<sup>131</sup> bearbeitet. Unabhängig voneinander entwickelten sie eine Methode (Magic-Angle-Spinning (MAS), engl. für Rotation im magischen Winkel), bei der die fehlende molekulare Mobilität in Feststoffen durch eine makroskopische Rotation der Probe ausgeglichen wird.

Hierbei wird die Probe mit hoher Drehgeschwindigkeit (bis zu 70 kHz) um eine Achse rotiert, die in einem magischen Winkel ( $\Theta = 54,74^\circ$ ) zu einem externen Magnetfeld steht (Abbildung 1.10). Bei diesem Winkel verschwinden die bipolaren Wechselwirkungen zwischen zwei benachbarten Protonen, die auf einer Verbindungslinie mit dem äußeren Magnetfeld stehen. Durch die hohe Drehgeschwindigkeit der Probe um diese Achse werden alle dipolaren Wechselwirkungen der Protonen in der Probe somit auf null reduziert, was es ermöglicht, noch feinere Wechselwirkungen zu beobachten.<sup>132</sup>

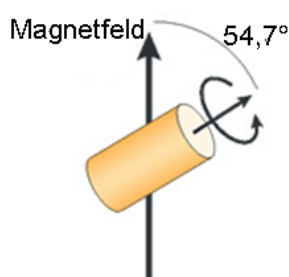


Abbildung 1.10.: Schematische Darstellung einer Messprobe im magischen Winkel.

In der modernen Literatur wurde viel über diese Methode berichtet. Die Anwendungsbereiche der HR-MAS-Spektroskopie haben sich enorm erweitert – gerade auch in der biologischen und biomedizinischen Forschung. Viele natürliche Gewebe, darunter Gehirn, Leber, Nieren und Muskulatur, sind mit Hilfe der HR-MAS-Spektroskopie untersucht worden.<sup>133–135</sup>

## 1.4. Radikalische Polymerisation

Die **Internationale Union für reine und angewandte Chemie (IUPAC)** definiert die radikalische Polymerisation als eine Kettenpolymerisation, in der die kinetischen Ketten-träger Radikale sind.<sup>136</sup> Die radikalische Polymerisation ist mit Abstand das meist angewendete Polymerisationsverfahren weltweit. Die Verfügbarkeit vieler Monomere sowie die einfache Technologie lassen diese Art von Polymerisation nicht nur eine führende Stellung einnehmen, sondern auch die am besten untersuchte sein. In der Regel verlaufen alle Kettenwachstumsreaktionen in drei Schritten: Start, Wachstum und Abbruch.

### 1.4.1. Mechanismus

Um die radikalische Polymerisation zu starten, werden freie Radikale als Starter (Initiatoren) gebraucht. Diese freien Radikale können durch energiereiche  $\gamma$ - oder  $\beta$ -Strahlung oder bei einer fotochemischen Zersetzung einer fotoreaktiven Verbindung entstehen, aber

## 1. Einleitung

---

auch beim thermischen Zerfall von Peroxiden oder Azoverbindungen. Die Strukturvor-  
aussetzungen des Monomers sind eine oder mehrere C=C-Doppelbindungen. Das freie  
Radikal wird daran addiert, sodass ein neues verlängertes Radikal gebildet wird. Die  
zweite Stufe der freien radikalischen Polymerisation (**Kettenwachstum**) erfolgt, wenn  
sich weitere Monomere an das neue verlängerte Radikal addieren können. Neue Mono-  
mere werden weiter an das neu verlängerte Radikal addiert, bis sich zwei Radikale tref-  
fen (**Kombination**), was aus den beiden Radikalen eine kovalente Bindung macht und  
weitere Reaktionen an dieser Stelle unterbindet. Weitere Abbruchreaktionen sind die **Dis-  
proportionierung** und die **Übertragungsreaktion**, bei der das Radikal auf eine andere  
Verbindung übertragen wird.<sup>137</sup>

### 1.4.1.1. Radikalquellen

Die freien Radikale können durch energiereiche  $\gamma$ - oder  $\beta$ -Strahlung, bei der fotochemi-  
schen Zersetzung einer fotoreaktiven Verbindung oder auch beim Zerfall von Peroxiden  
oder Azoverbindungen entstehen. In der Regel braucht der Zerfallsprozess eines Initiators  
eine gewisse Energie in Form von Strahlung oder thermischer Energie.

Neben den Azoverbindungen, darunter Dibenzoylperoxid (DBO) oder Azobisisobuty-  
ronitril (AIBN), ist das Ammoniumpersulfat (APS)/(TEMED)-System eine sehr verbrei-  
tete Radikalquelle. Ein großer Vorteil dieses Initiators ist die Wasserlöslichkeit sowie die  
Möglichkeit, die Polymerisation bei Raumtemperatur durchzuführen. Dieses System wur-  
de im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Biohybridhydrogele herzustellen.

### 1.4.1.2. Startreaktion

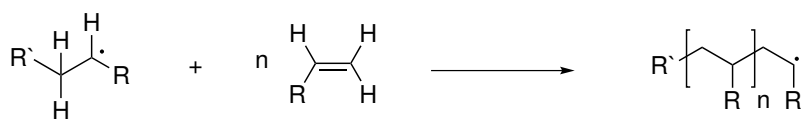
Die radikalische Polymerisation wird durch Addition eines Radikals  $R^\cdot$  an ein Monomer  
gestartet. Die Addition erfolgt aus sterischen Gründen und geringer Aktivierungsenergie  
durch Anti-Markovnikov-Addition (Schema 1.4).



Schema 1.4: Start der radikalischen Polymerisation.

### 1.4.1.3. Wachstumsreaktion

Die Addition weiterer Monomere an das entstehende Radikal wird als Wachstumsreaktion bezeichnet (Schema 1.5).



Schema 1.5: Kettenwachstum der radikalischen Polymerisation.

### 1.4.1.4. Abbruchreaktion

Durch die Rekombination oder Disproportionierung erfolgt ein Kettenabbruch, wobei bei der Rekombination zwei Radikale aufeinandertreffen, was somit das Molekulargewicht erhöht (Schema 1.6).



Schema 1.6: Rekombination der radikalischen Polymerisation.

Bei der Disproportionierung jedoch bleibt das Molekulargewicht erhalten, da nur ein Wasserstoffradikal von einer Kette auf die nächste übertragen wird (Schema 1.7).

Die freie radikalische Polymerisation hat den großen Nachteil, dass eine gezielte Steuerung der Polymerstruktur, z. B. die Herstellung von Blockcopolymeren oder Kettenendfunktionalitäten, nicht möglich ist. Auch die Molekulargewichtsverteilung ist relativ breit mit  $\bar{D}$ -Werten von ca. 2.<sup>138</sup> Wünschenswert ist aber eine Polymerisation, die die präpara-



Schema 1.7: Disproportion der radikalischen Polymerisation.

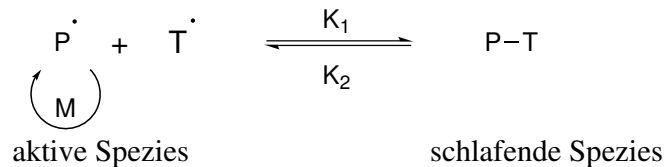
tiven Vorteile der freien radikalischen Polymerisation hat, zugleich eine enge Polydispersität aufweist und auch die Möglichkeit zur Bildung von Blockcopolymeren und Kettenendfunktionalität erlaubt. Hierzu wurde in den vergangenen zwei Jahrzehnten intensiv an verschiedenen Varianten der kontrollierten, radikalischen Polymerisation geforscht.

## 1.5. Kontrollierte radikalische Polymerisation

Um die radikalische Polymerisation zu kontrollieren, muss die Abbruchs- und Übertragungsreaktion zurückgedrängt werden. Gleichzeitig sollen die Polymerketten gleich schnell wachsen, was durch eine Absenkung der Radikalkonzentration  $[P^{\cdot}]$  gelingt, da die Reaktionsordnungen der Wachstumsreaktionen und der Abbruchsreaktionen eine unterschiedliche Abhängigkeit von der Radikalkonzentration zeigen: Die Terminationsreaktion ist 2. Ordnung und die Aufbaureaktion 1. Ordnung bzgl. der Radikalkonzentration. Durch Absenkung der Radikalkonzentration  $[P^{\cdot}]$  wird die Reaktion 2. Ordnung stärker zurückgedrängt als die Reaktion 1. Ordnung, sodass die Wachstumsreaktion gegenüber den unerwünschten Abbruchsreaktionen bevorzugt wird. Die Konzentration der Polymerradikale  $[P^{\cdot}]$  kann chemisch kontrolliert werden, wenn ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Spezies entsteht (Schema 1.8).  $T^{\cdot}$  soll ein stabiles Radikal sein, das selbst nicht in der Lage ist, mit Monomeren zu reagieren, jedoch mit  $P^{\cdot}$  reversibel reagieren kann, sodass durch Abspaltung weitere Monomere an die Kette addiert werden können. Im Prinzip wird dadurch aus einer freien radikalischen Polymerisation eine kontrollierte radikalische Polymerisation (CRP). Obwohl die Abbruchreaktionen nicht zu 100 % unterdrückt werden können, wird ein linearer Anstieg des Polymerisationsgrades mit dem



Umsatz beobachtet, sodass die Kinetik des Monomerverbrauchs einer CRP einen ähnlichen Verlauf wie eine lebende Polymerisation aufweist. Der Prozess wird als „kontrollierte“ und nicht als „lebende“ Polymerisation bezeichnet, weil die lebende Polymerisation Abbruchreaktionen ausschließt. Die Chemoselektivität und die Stereoselektivität bei einer CRP bleiben jedoch wie die bei einer freien radikalischen Polymerisation.<sup>139</sup>



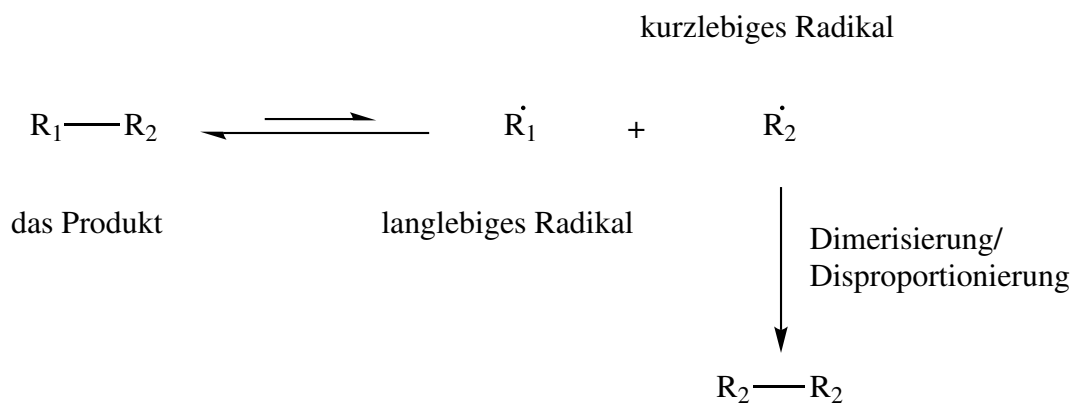
Schema 1.8: Gleichgewicht zwischen aktiver und schlafender Spezies in der CRP.

Das Gleichgewicht zwischen aktiver und schlafender Spezies in Schema 1.8 ist der Hauptbaustein für alle kontrollierten radikalischen Polymerisationsarten.<sup>140</sup> Dies kann durch reversible Terminierung, z. B. Nitroxide mediated Polymerisation (NMP)<sup>141</sup> und *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP),<sup>142</sup> oder durch reversiblen Kettentransfer, z. B. *Reversible addition-fragmentation chain transfer* (RAFT),<sup>143</sup> herbeigeführt werden. Die reversible Terminierungsstrategie ist auf das *persistent radical effect* (PRE)-Prinzip<sup>144</sup> aufgebaut. Das PRE-Prinzip, das in Schema 1.9 dargestellt wird, besteht aus einer selektiven Kreuzkupplung zwischen einem langlebigen Radikal  $R_1^\cdot$  und einem kurzlebigen Radikal  $R_2^\cdot$ . Die Bildung der Radikale muss jedoch gleichzeitig und gleich schnell ablaufen. Das kurzlebige Radikal  $R_2^\cdot$  kann zwei verschiedene Reaktionen eingehen. Zum einen kann es mit dem langlebigen Radikal  $R_1^\cdot$  zum Kreuzkupplungsprodukt  $R_1 - R_2$  reagieren, zum anderen kann es zu  $R_2 - R_2$  dimerisieren. Da das langlebige Radikal  $R_1^\cdot$  nicht in der Lage ist zu dimerisieren, ist die Homokupplung  $R_1 - R_1$  nicht möglich, weshalb das Kreuzkupplungsprodukt das einzige Produkt ist, das aus dem langlebigen Radikal entstehen kann. Das heißt, dass das Produkt  $R_1 - R_2$  in der Anfangsphase zum Produkt  $R_2 - R_2$  im Verhältnis 2:1 steht. Die Konzentration des Radikals  $R_2^\cdot$  nimmt jedoch mit der Zeit ab, was zu einem Überschuss des langlebigen Radikals  $R_1^\cdot$  führt und die Homokupplung  $R_2$

## 1. Einleitung

---

–  $R_2$  verhindert. Als Resultat wird durch die Rekombination von langlebigen und kurzlebigen Radikalen das Produkt  $R_1 - R_2$  dominieren. Werden jedoch die Radikale  $R_1 \cdot$  und  $R_2 \cdot$  aus einem gemeinsamen Vorläufer  $R_1 - R_2$  erzeugt, kann im Verlauf der Reaktion eine hohe selektive Rückbildung der Ausgangssubstanz festgestellt werden.



Schema 1.9: Allgemeine Darstellung des PRE.<sup>145</sup>

Ein langlebiges Radikal ist im Prinzip ein stabiles Radikal. Ein typische Beispiel dafür sind Nitroxid<sup>146</sup> oder Kobalt-Porphyrin-Komplexe.<sup>147</sup> Die Aktivierung der schlafenden Spezies P-T zur aktiven Spezies erfolgt thermisch, in Gegenwart von Licht oder eines geeigneten Katalysators (wie bei der ATRP). Bei allen Systemen, die auf PRE beruhen, wird eine ansteigende Rate der wachsenden Radikale eher durch Aktivierungs- und Deaktivierungsprozesse als durch Initiations- und Abbruchreaktionen – wie bei einer üblichen radikalischen Polymerisation – hervorgerufen. Zu diesen Systemen gehören die Nitroxid-vermittelte Polymerisation (NMP) und die Kobalt-vermittelte Polymerisation (CMRP).

Die zweite Strategie, um das Gleichgewicht in Schema 1.8 zu erreichen, ist der reversible Kettentransfer. Als Kontrollreagenz werden Kettenübertragungsmittel wie Iodidverbindungen<sup>148</sup> oder Dithioesterverbindungen eingesetzt. Ein sehr bekanntes und verbreitetes Beispiel dafür ist die RAFT-Polymerisation.

### 1.5.1. RAFT-Polymerisation

Die Abkürzung RAFT ist ein Akronym für *Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer* (Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragung) und steht für eine reversible Deaktivierung einer radikalischen Polymerisation (RDRP).<sup>149</sup> RAFT-Makromonomer-Reagenzien wurden zum ersten Mal 1986 in der Literatur erwähnt.<sup>150</sup> Die erste Anwendung von RAFT-Reagenzien zur Herstellung von Blockcopolymeren und Polymeren mit geringer Polydispersität wurde 1995 veröffentlicht.<sup>151</sup> Das Thiocarbonylthio-RAFT-Reagenz wurde 1998 im Rahmen der kontrollierten radikalischen Polymerisationsmethoden vorgestellt. Diese Polymerisationstechnik wurde 1998 von *Rizzardo et al.* (CSIRO) weiterentwickelt.<sup>143</sup>

#### 1.5.1.1. RAFT-Mechanismus

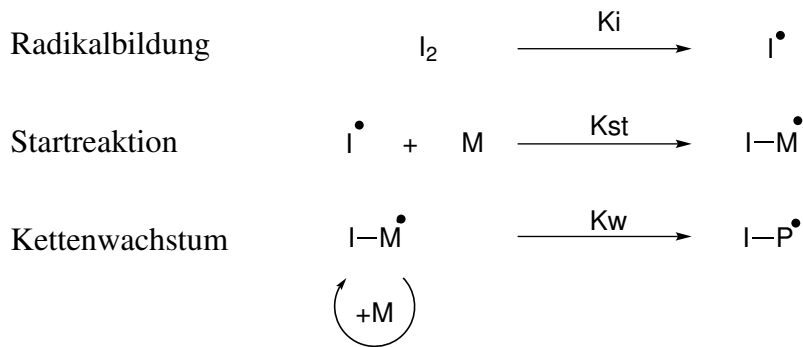
Der RAFT-Mechanismus wurde in Schema 1.10 dargestellt. Die ersten Polymerisationsschritte (Radikalbildung, Startreaktion und Kettenwachstum) verlaufen analog zur konventionellen freien radikalischen Polymerisation ab. Die aktive Polymerkette  $P_n\cdot$  wurde vom RAFT-Reagenz **1** durch die C=S-Doppelbindung abgefangen und bildet das Addukt-radikal **2**. Im nächsten Schritt wurden durch  $\beta$ -Abspaltung das Makro-RAFT-Reagenz **3** und ein neues aktives Radikal  $R\cdot$  gebildet. Die Umwandlung des RAFT-Reagenz **1** zu Makro-RAFT-Reagenz **3** wird als RAFT-Prägleichgewicht bezeichnet. Als nächstes entsteht durch die Reaktion zwischen dem  $R\cdot$ -Radikal und weiteren Monomeren eine neue wachsende Polymerkette  $R-P_m\cdot$ . Diese wurde erneut von der RAFT-Reagenz – dieses Mal von der Makro-RAFT-Reagenz **3** – gefangen, was ein Bipolymer-Radikal-Addukt **4** ergibt. Durch  $\beta$ -Abspaltung wird ein neues Makro-RAFT-Reagenz **5** und eine neue radikale Polymerkette  $P_n\cdot$  entstehen. Das Gleichgewicht zwischen ( $P_n\cdot$ ,  $P_m\cdot$ ) und dem Makro-RAFT-Reagenz (**3**, **5**) über das Addukt-Radikal **4** wurde als RAFT-Hauptgleichgewicht bezeichnet. Dieser Mechanismus wurde durch die Identifizierung der intermediären Ad-

## 1. Einleitung

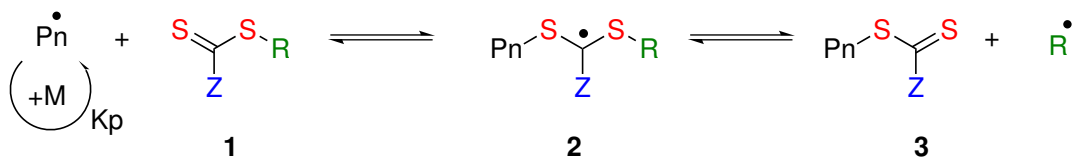
---

dukte **2** und **4**, durch EPR-Spektroskopie<sup>152</sup> und durch Endgruppenanalyse der entstandenen Polymere mittels NMR<sup>143</sup> bewiesen. In der Literatur wird oft der gesamte RAFT-Prozess in einer Gleichung (Schema 1.11) zusammengefasst. Dabei werden die irreversiblen Abbruchreaktionen nicht erwähnt, obwohl sie durch den RAFT-Prozess nicht vollständig verhindert werden können. Allerdings spielen die toten Polymerketten, die durch Abbruchreaktionen entstehen, im Vergleich zur großen Mehrheit der Polymerketten, die an ihrem Ende eine Thiocarbonylthio-Gruppe tragen, nur eine untergeordnete Rolle.

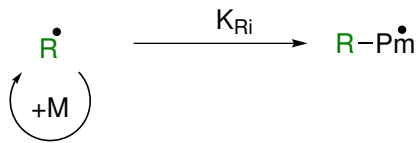
Die RAFT-Polymerisation wird für zahlreiche makromolekulare Architekturen (Homo-, Gradienten-, Blockco- und Sternpolymere) sowie für funktionalisierte Netzwerke eingesetzt.<sup>153–156</sup> Neben der Optimierung der Reaktionsbedingungen ist es wichtig, das geeignete RAFT-Reagenz für die Zielpolymere bzw. die eingesetzten Monomere zu ermitteln.



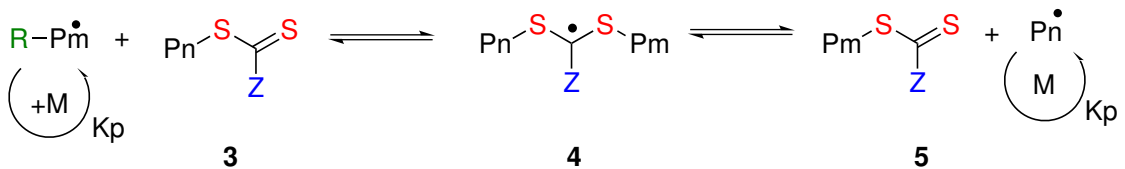
Addition an RAFT-Reagenz



Reinitiiierung



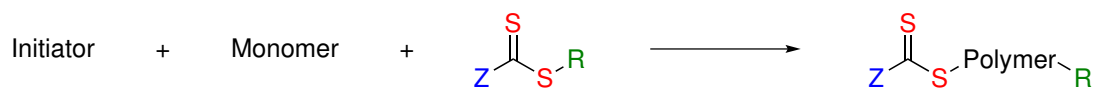
RAFT-Gleichgewicht



Abbruch



Schema 1.10: Allgemeiner RAFT-Mechanismus mit Dithiocarbonyl-RAFT-Reagenz.



Schema 1.11: Gesamtprozess der RAFT-Polymerisation.

### 1.5.1.2. RAFT-Reagenz-Design

Im Allgemeinen besitzen RAFT-Reagenzien eine Thiocarbonyl-Einheit und unterscheiden sich durch die radikalische Abgangsgruppe R und die stabilisierende Gruppe Z (Abbildung 1.11).<sup>157</sup> Die Effektivität des RAFT-Reagenz ist von den substituierenden Gruppen R und Z abhängig.

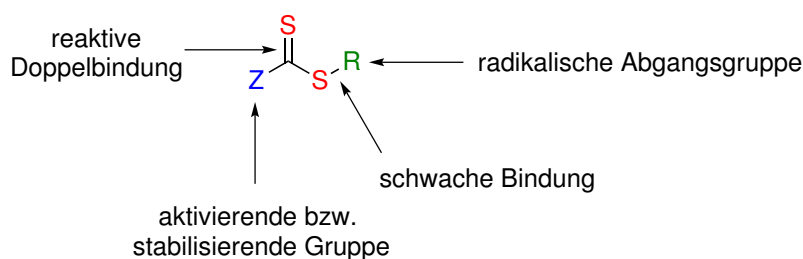
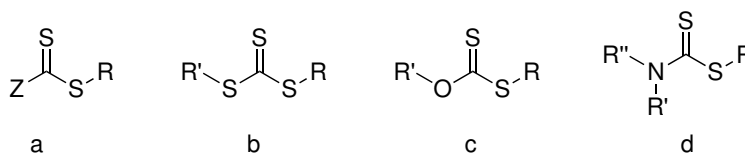


Abbildung 1.11.: Allgemeine Struktur eines RAFT-Reagenz.

Die Z-Gruppe der RAFT-Reagenzien teilt diese in vier Klassen ein, wie in Schema 1.12 zu sehen ist. Hierzu gehören (a) Dithioester für Z = Acryl oder Alkyl, (b) Trithiocarbonate für Z = substituierter Schwefel, (c) Xanthate (Dithiocarbonate) für Z = substituierter Sauerstoff und (d) Dithiocarbamate für Z = substituierter Stickstoff.



Schema 1.12: Die RAFT-Reagenz-Klassen: a) Dithioester, b) Trithiocarbonate, c) Xanthate und d) Dithiocarbamate.

Die Auswahl der RAFT-Reagenzien hängen von den gewünschten Monomeren ab (Abbildung 1.12).<sup>158,159</sup> Die Dithioester- und die Trithiocarbonat-RAFT-Reagenzien sind für die Polymerisation von reaktiven Monomeren geeignet, z. B. Methacrylsäuremethylester (MMA), Methacrylsäure (MAA), Hydroxypropylmethacrylamid (HPMAM), Methylacrylat (MA), Acrylsäure (AAs), Acrylamid (AM), Acrylnitril (AN) sowie Styrol (St), während die Xanthat- und Dialkyldithiocarbamat-RAFT-Reagenzien für die Polymerisa-

tion von weniger reaktiven Monomere, z. B. Vinylacetat (VAc), Vinylpyrrolidon (NVP) und N-vinylcarbazol (NVC), geeignet sind.

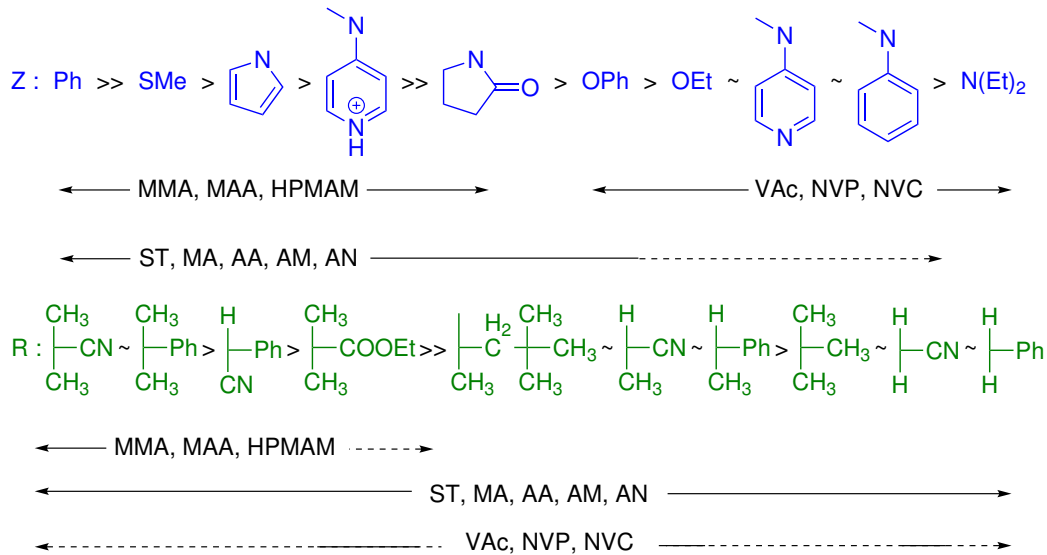


Abbildung 1.12.: Richtlinien für die Auswahl eines RAFT-Reagenz. Bei **Z** nimmt die Additions-geschwindigkeit von links nach rechts ab, während die Geschwindigkeit der Fragmentierung des Adduktradikals von links nach rechts steigt. Bei **R** nimmt die Geschwindigkeit der Fragmentierung von links nach rechts ab.

### 1.5.1.3. RAFT-Reaktionsbedingungen

Die Reaktionsbedingungen einer RAFT-Polymerisation sind fast identisch mit denen der freien radikalischen Polymerisation. Analog zur radikalischer Polymerisation muss die RAFT-Polymerisation sauerstofffrei durchgeführt werden. Um den RAFT-Prozess optimal zu kontrollieren, ist es wichtig, die Initiatorkonzentration im Verhältnis zur RAFT-Reagenz-Konzentration richtig anzusetzen.<sup>158</sup> In der Literatur wurde die RAFT-Reagenz-Konzentration mindestens fünfmal höher als die Initiatorkonzentration angewendet, so dass die Polymerisation eine akzeptable Geschwindigkeit hat und gleichzeitig minimale tote Ketten aufweist. Eine enge Polydispersität ist durch die RAFT-Polymerisation unabhängig von der Polymerisationsgeschwindigkeit zu erhalten. Es ist nicht nötig, die Polymerisation langsam ablaufen zu lassen, um eine gute Molekulargewichtsverteilung zu

## 1. Einleitung

---

erhalten. Es ist aber sehr wichtig, die RAFT-Polymerisation rechtzeitig zu beenden, damit das RAFT-Reagenz nicht unter dem Verlust durch freie Radikale leidet, was die Konzentration der toten Ketten fördert. Es ist in der Literatur bekannt, dass das RAFT-Reagenz vom Ende der Polymerkette durch zusätzliche Addition von freien Radikalen bzw. Initiatoren abgespalten werden kann.<sup>160</sup> Im Prinzip ist jede Quelle von freien Radikalen für die RAFT-Polymerisation geeignet, darunter Azo-Verbindungen, die durch thermischen Zerfall freie Radikale freisetzen können, aber auch Natriumpersulfat, Ammoniumperoxydisulfat und Fotoinitiatoren. Viele Lösungsmittel sind für die RAFT-Polymerisation geeignet, z. B. organische Lösungsmittel, Wasser und überkritisches Kohlenstoffdioxid. Es ist aber wichtig, die Löslichkeit des RAFT-Reagenz zu optimieren und die Hydrolyseempfindlichkeit der RAFT-Reagenzien im polarem Medium und in Anwesenheit von Basen zu beachten.<sup>153</sup>



## **Teil II.**

### **Zielsetzung**



## 2. Ziel dieser Arbeit

Wie in der Einleitung bereits erläutert wurde, ist das Interesse an der Stammzellforschung in den letzten Jahren stark gestiegen. Die Notwendigkeit, Stammzellen zu steuern, zu manipulieren sowie gezielt zu differenzieren, zeigt den Bedarf nach einem vertieften Verständnis der Rolle der natürlichen Stammzellnische und die Herausforderung, wie sich wichtige Eigenschaften der natürlichen Stammzellnische mit synthetischen Materialien imitieren lassen.

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung einer künstlichen extrazellulären Matrix als einer der wichtigsten Komponenten der natürlichen Stammzellnische, die eine Kontrolle über zelluläres Verhalten erlaubt, aber gleichzeitig deutlich weniger komplex ist als die natürliche EZM der Stammzellnische (siehe Abbildung 2.1 a) und b)).

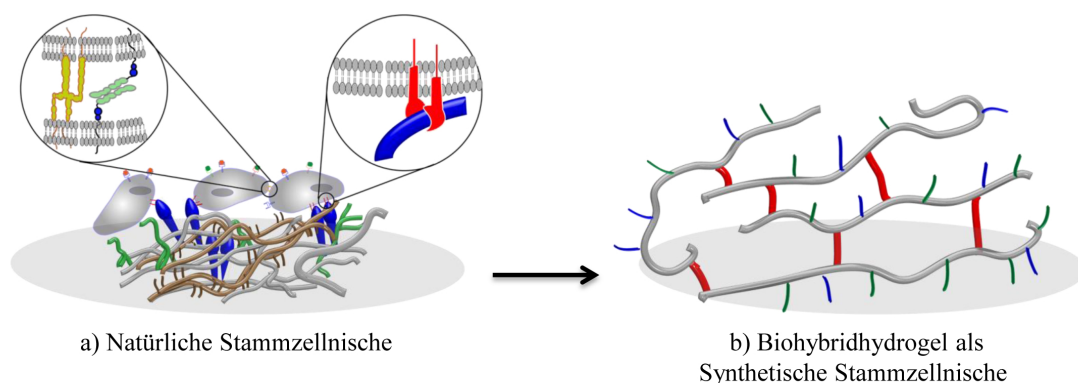


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung der Zielsetzung. Von a) zu b): Imitierung einer natürlichen EZM durch Biohybridhydrogel.

Die vorliegende Arbeit unterteilt sich in drei Ergebniskapitel (Kapitel 3 bis 5). In Ka-

## 2. Ziel dieser Arbeit

---

pitel 3 soll das Initiatorsystem APS/TEMED in der RAFT-Polymerisation in Wasser bei Raumtemperatur und bei 70 °C für zwei RAFT-Reagenzien und zwei wasserlösliche Monomere untersucht werden. In Kapitel 4 soll das Potential der  $^1\text{H}$  HR-MAS NMR Spektroskopiemethode zur Charakterisierung von gequollenen Polymernetzwerken genauer analysiert werden. Im Rahmen der Untersuchungen soll mithilfe geeigneter Modellpolymere geklärt werden, in wie weit diese Methode geeignet ist, die Zusammensetzung von chemisch vernetzten Hydrogelen quantitativ zu bestimmen. In Kapitel 5 sollen chemisch vernetzte Polyacrylamid-basierte Hydrogele mithilfe der freien radikalischen Polymerisation hergestellt werden. Nach Charakterisierung dieser Gele mittels Rheologie und Quellungsuntersuchungen sollen diese Gele anschließend als zweidimensionale Matrices zur Charakterisierung des Verhaltens neuraler Stammzellen eingesetzt werden (in Kooperation mit Prof. Dr. A. Faissner, Ruhr-Universität Bochum). Im Zentrum der geplanten Untersuchungen soll der Einfluss des Ladungszustands (neural oder kationisch) und der Funktionalisierung mit RGD-Peptiden (RGD oder RGD + kationische Ladung) auf das Adhäsions-, Migrations- und Differenzierungsverhalten neuraler Stammzellen untersucht werden.

## **Teil III.**

# **Ergebnisse und Diskussion**



## 3. RAFT-Polymerisation

### 3.1. RAFT-Polymerisation in Wasser bei Raumtemperatur mittels APS/TEMED-System

#### 3.1.1. Einleitung

Aufgrund des degenerativen Transfermechanismus wird die RAFT-Polymerisation meist durch herkömmliche Radikalinitiatoren initiiert, z. B. durch einen thermischen Azoinitiator wie AIBN. Daher wurde die RAFT-Polymerisation zwischen 60 und 80 °C durchgeführt. Jedoch ist die Durchführung der RAFT-Polymerisation bei Raumtemperatur wünschenswert, um die temperaturempfindlichen Materialien unversehrt zu polymerisieren.<sup>161</sup> Zu diesem Zweck wurden verschiedene neue Initiatoren entwickelt, die sich bei niedriger Temperatur zersetzen, beispielsweise die von der Firma Wako entwickelte Azo-Verbindung 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) ( $T_{1/2} = 10$  h bei 30 °C in Toluol). Dieser Initiator wurde von Anthony *et al.* verwendet, um N-Isopropyl acrylamide bei 30 °C zu polymerisieren.<sup>162</sup> Jedoch sind thermische Initiatoren – besonders jene, die sich bei niedrigen Temperatur zersetzen – schwer zu handhaben. Daher vermeiden viele Forschungsgruppen ihre Verwendung. Die geringe Auswahl an wasserlöslichen Azo-Verbindungen stellt eine weitere Begrenzung der RAFT-Polymerisation in Wasser dar. Stenzel *et al.* haben eine RAFT-Polymerisation mittels Gammastrahlung einer <sup>60</sup>Co Quelle erfolgreich bei Raumtemperatur initiiert.<sup>163</sup> Eine weitere interessante Studie berichtet

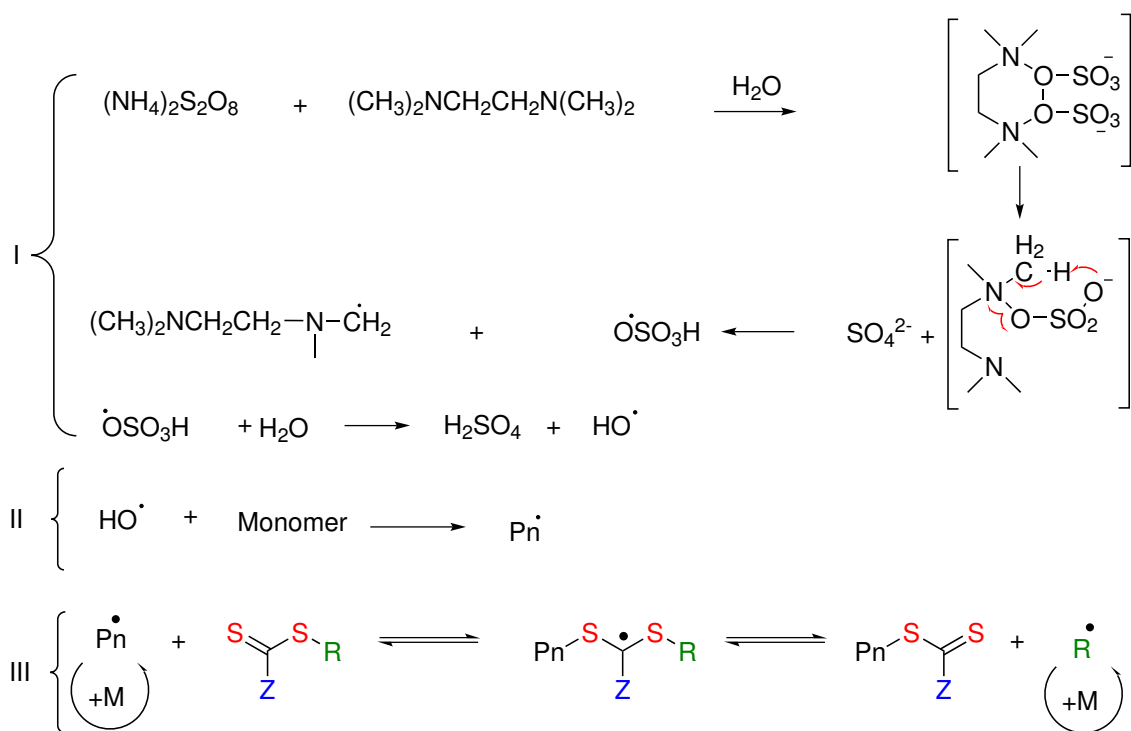
### 3. RAFT-Polymerisation

---

über die Anwendung von blauem LED-Licht, um die RAFT-Polymerisation bei Raumtemperatur zu initiieren.<sup>164</sup> Die sogenannte Photoelektronentransfer-RAFT (PET-RAFT) wurde bei 25 °C durchgeführt. Beim PET-RAFT wird eine Kombination aus Iridium- oder Rutheniumkatalysator und blauem Licht mit niedriger Energie verwendet, um Radikale zu erzeugen.<sup>165</sup> Obwohl diese Technik vielversprechend ist, sind Photopolymerisationen im Allgemeinen weniger für die Polymerisation von größeren Polymermengen geeignet, da die Lichtdurchdringung in der Reaktionslösungen begrenzt ist (Lambert'sches Gesetz). Vor Kurzem wurde von Vandenbergh *et al.* ein säureinduziertes Cyclohexanon/tert-Butylhydroperoxid-Initiierungssystem verwendet, um die RAFT-Polymerisation von N-Isopropylacrylamid und Styrol in MeCN zu initiieren.<sup>161</sup>

Ziel dieses Kapitels ist die Untersuchung der RAFT-Polymerisation in Wasser bei Raumtemperatur ( $T = 20\text{ °C}$ ) und bei  $70\text{ °C}$  mithilfe des APS/TEMED-Systems als Initiator. Das APS/TEMED-System hat gegenüber thermischen Initiatoren den Vorteil, dass es leicht handhabbar ist, eine gute Wasserlöslichkeit bei Raumtemperatur aufweist und kein Explosionsrisiko birgt, da der Zerfall nicht thermisch abläuft. Hierfür wurden die RAFT-Reagenzien 4-Cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl)-sulfanyl]pentansäure (CTA1) (Dithioester) und 2-Cyanopropan-2-yl *N*-methyl-*N*-(pyridin-4-yl) carbamodithioat (CTA2) (Tritiocarbonat) ausgewählt,<sup>166</sup> um Acrylamid (AA) und 2-Aminoethylmethacrylat (AE-MA) zu polymerisieren (Schema 3.2). Die freien Radikale werden bei Raumtemperatur im Wasser durch den Zerfall von Ammoniumperoxodisulfate produziert.<sup>167</sup> Diese Radikale werden dann vom RAFT-Reagenz abgefangen (Schema 3.1).





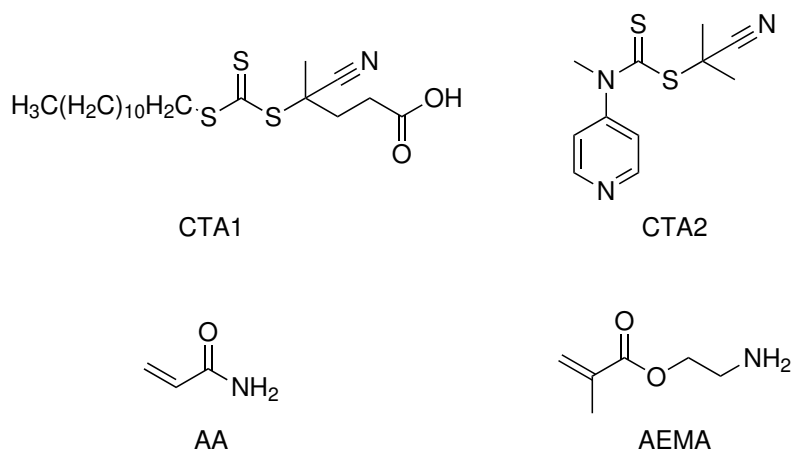
Schema 3.1: Möglicher Initiierungsmechanismus der RAFT-Polymerisation mittels APS/TEMED-Systems.

### 3.1.2. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1.2.1. Einfluss der Temperatur

Die Polymerisationen von Acrylamid (**P-02** – **P-05**) und AEMA (**P-06**, **P-07**) (siehe Tabelle 3.1) wurden bei Raumtemperatur und bei 70 °C durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass bei 70 °C der maximale Umsatz bereits nach 1 h erreicht wurde, während die Polymerisationen bei Raumtemperatur den maximalen Umsatz erst nach 8 bis 16 Stunden erreichten. Dabei konnten geringfügige Unterschiede zwischen  $M_n^{theo.}$  und  $M_n^{NMR}$  beobachtet werden. Bei Raumtemperatur sind sie jedoch geringer als bei 70 °C. Da Abbruchreaktionen durch Kombination häufiger bei hoher Temperatur vorkommen, könnte dies der Grund für die größere Abweichung der  $M_n^{theo.}$  von der  $M_n^{NMR}$  sein (Tabelle 3.1).

### 3. RAFT-Polymerisation



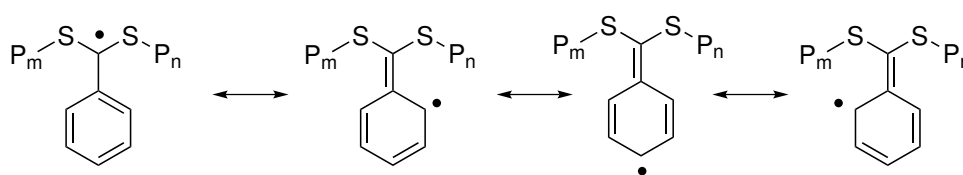
Schema 3.2: Verwendete Monomere und RAFT-Reagenzien.

Tabelle 3.1.: Ergebnisse der Polymerisation von **P-02** bis **P-07**.

Nr.	Monomer	CTA	$\frac{[M]_0}{[CTA]_0}$	T (°C)	$M_n^{theo.}$ (g/mol)	$M_n^{NMR}$ (g/mol)	$M_n^{GPC}$ (g/mol)	Đ
<b>P-02</b>	AA	CTA1	400	20	$2,88 \cdot 10^4$	$2,41 \cdot 10^4$	$6,27 \cdot 10^4$	1,2
<b>P-03</b>	AA	CTA1	400	70	$2,88 \cdot 10^4$	$1,38 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^4$	1,3
<b>P-04</b>	AA	CTA2	400	70	$2,86 \cdot 10^4$	$1,51 \cdot 10^4$	$3,39 \cdot 10^4$	1,1
<b>P-05</b>	AA	CTA2	500	20	$3,58 \cdot 10^4$	$312 \cdot 10^4$	$4,32 \cdot 10^4$	1,2
<b>P-06</b>	AEMA	CTA2	400	20	$6,06 \cdot 10^4$	$5,87 \cdot 10^4$	$6,3 \cdot 10^4$	1,3
<b>P-07</b>	AEMA	CTA2	400	70	$6,06 \cdot 10^4$	$5,76 \cdot 10^4$	$4,97 \cdot 10^4$	1,3

$M_n^{theo.} = \frac{[M]_0 \cdot M_M}{[RAFT]_0} \cdot x + M_{RAFT}$ .  $x = 1$ ,  $M_n^{NMR}$  ermittelt durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $M_n^{GPC}$  und die Dispersität (Đ) in Wasser (Standard = Pullulan).

Die kinetischen Daten in Abbildung 3.1 sind ein deutlicher Beleg dafür, dass die RAFT-Polymerisation mittels APS/TEMED-Systems als kontrollierte radikalische Polymerisation in Wasser abläuft. In weniger als 40 min wurde bei 70 °C ein 80 %iger Umsatz erreicht. Die Messungen während der ersten 10 min zeigten eine Verzögerung des Polymerisationsverlaufs. Solche Abweichungen von der idealen RAFT-Polymerisation sind literaturbekannt.<sup>158,168</sup> Eine der bekanntesten Abweichungen ist die Inhibierung in der Anfangsphase der Polymerisation, durch die die Polymerisation zeitweilig unterbunden wird, was eine Verzögerung der Polymerisation zur Folge hat. Zahlreiche Artikel haben die Verringerung der Polymerisationsgeschwindigkeit von Acrylaten in Gegenwart von Dithiobenzoaten-RAFT-Reagenzien beschrieben.<sup>169–176</sup> Barner-Kowollik *et al.* vertreten die These, dass die Ursache der beobachteten Verzögerung eine langsame Fragmentierung des Adduktradikals sei (**2**, **4** in Schema 1.10).<sup>177,178</sup> Die Tatsache, dass die Phenyl- und Benzyl-substituierten RAFT-Reagenzien (Z-Gruppen) eine deutlich größere Verzögerung der Polymerisation als die Methyl-substituierten RAFT-Reagenzien (Z-Gruppen) zeigen, lassen Radom *et al.* auf eine Delokalisierung der Elektronen im aromatischen Ring schließen, die zur Stabilisierung des entstehenden Radikals führen kann.<sup>179</sup> (Schema 3.3).



Schema 3.3: Mögliche Resonanzstrukturen des intermediären RAFT-Adduktradikals mit Dithiobenzoat-RAFT-Reagenz.

Die Ergebnisse zeigten ebenfalls, dass CTA2 ein geeignetes RAFT-Reagenz in Wasser ist, wenn der pH-Wert im sauren Bereich liegt.<sup>180</sup> Der protonierte Stickstoff im Pyridinring des CTA2 macht dieses RAFT-Reagenz wasserlöslich und Hydrolyse-stabil.<sup>181</sup>

### 3. RAFT-Polymerisation

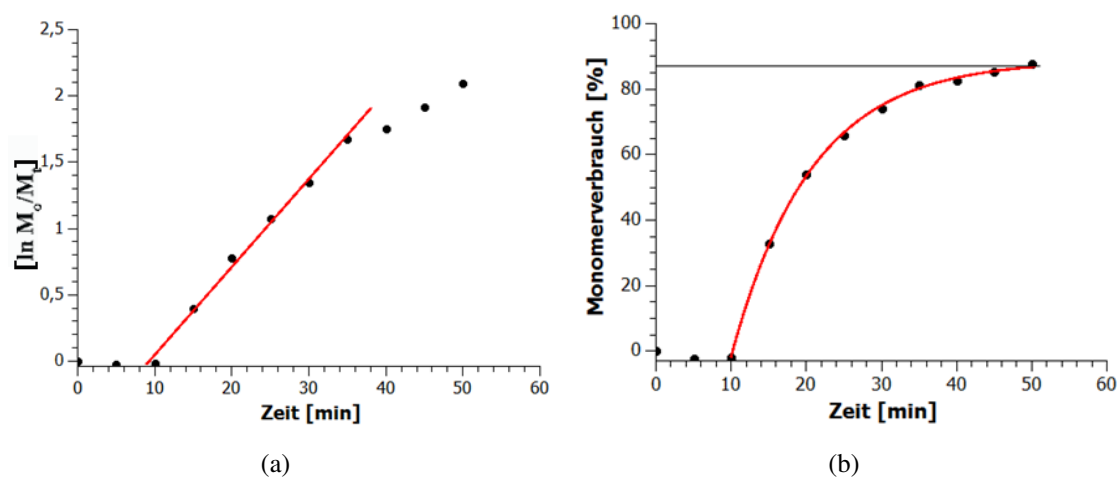


Abbildung 3.1.: Kinetische Messung der RAFT-Polymerisation von AA mittels CTA2 in Wasser bei 70 °C via APS/TEMED-System für  $(\frac{[M]_0}{[CTA]}) = 200$ . Der Monomerverbrauch wurde mittels GC-MS ermittelt.

#### 3.1.2.2. Polymerisation von Polyacrylamid

Polyacrylamid wurde mit zwei verschiedenen RAFT-Reagenzien (CTA1 und CTA2) mithilfe des APS/TEMED-Systems bei 70 °C und bei Raumtemperatur mit verschiedenen Monomer-zu-CTA-Verhältnissen ( $\frac{[M]_0}{[CTA]}$ ) polymerisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 dargestellt.

**Polymerisation mit Tritiocarbonat-RAFT-Reagenz (CTA1).** Die kinetische Untersuchung (Abbildung 3.1, Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2) zeigt, dass Polyacrylamid mithilfe des APS/TEMED-Systems und des RAFT-Reagenz CTA1 kontrolliert polymerisiert werden kann. Das Hauptproblem des CTA1-Reagenz ist die geringe Wasserlöslichkeit aufgrund der C<sub>12</sub>-Kette. Da das CTA1-Reagenz eine Carboxylgruppe besitzt, wurde dieses Problem jedoch durch Verwendung einer TBE-Pufferlösung (pH 7,2) umgangen. Die Carboxylgruppe wurde deprotoniert, sodass CTA1 unter diesen Bedingungen sehr gute Wasserlöslichkeit aufweist. Die Abweichungen der  $M_n^{theo.}$  von der  $M_n^{GPC}$  sind akzeptabel und können auf die GPC-Kalibrierung mit Pullulan als Standardpolymer zurückgeführt

werden, wobei die Daten von  $M_n^{NMR}$  und  $M_n^{theo.}$  nahe beieinanderliegen. Die Polydispersitätswerte weisen auf eine sehr gut kontrollierte Polymerisation mit  $\mathcal{D}$ -Werten zwischen 1,1 und 1,3 hin.

Eine Erhöhung der Monomerkonzentrationen gegenüber den RAFT-Reagenzkonzentrationen  $\frac{[M]_0}{[CTA]}$  (siehe Tabelle 3.2 und Abbildung 3.2) führt zur Erhöhung des Molekulargewichts. Es wurden zwei verschiedene Monomerkonzentrationen gegenüber CTA ( $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$ ), ( $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$ ) bei 70 °C und 20 °C mit mithilfe des APS/TEMED-Systems polymerisiert. Die GPC-Messungen zeigen sehr gute Dispersitäten im Bereich von 1,2 an für die Polymere mit  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$  sowie bei  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$ . Das  $M_n^{NMR}$  zeigt bei **P-08** höhere Molmassen als bei **P-09**, was auch durch die  $M_n^{GPC}$ -Messungen bestätigt wurde (Abbildung 3.2). Der Grund dafür ist die Polymerisationsgeschwindigkeit, die bei 70 °C höher als bei 20 °C ist. Bei größeren Polymeren wurde mehr Zeit benötigt. Diese Abweichung wurde nicht bei **P-10** und **P-11** festgestellt.

 Tabelle 3.2.: Ergebnisse der Polymerisation von **P-08** bis **P-11**.

Nr.	Monomer	CTA	$\frac{[M]_0}{[CTA]_0}$	T (°C)	$M_n^{theo.}$ (g/mol)	$M_n^{NMR}$ (g/mol)	$M_n^{GPC}$ (g/mol)	$\mathcal{D}$
<b>P-08</b>	AA	CTA1	1000	70	$7,14 \cdot 10^4$	$5,93 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^4$	1,2
<b>P-09</b>	AA	CTA1	1000	20	$7,14 \cdot 10^4$	$5,11 \cdot 10^4$	$7,2 \cdot 10^4$	1,2
<b>P-10</b>	AA	CTA1	250	70	$1,85 \cdot 10^4$	$1,79 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	1,18
<b>P-11</b>	AA	CTA1	250	20	$1,85 \cdot 10^4$	$1,72 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$	1,18

$M_n^{theo.} = \frac{[M]_0 \cdot M_M}{[RAFT]_0} \cdot x + M_{RAFT}$ .  $x = 1$ ,  $M_n^{NMR}$  ermittelt durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $M_n^{GPC}$  und die Dispersität ( $\mathcal{D}$ ) in Wasser (Standard = Pullulan).

### 3. RAFT-Polymerisation

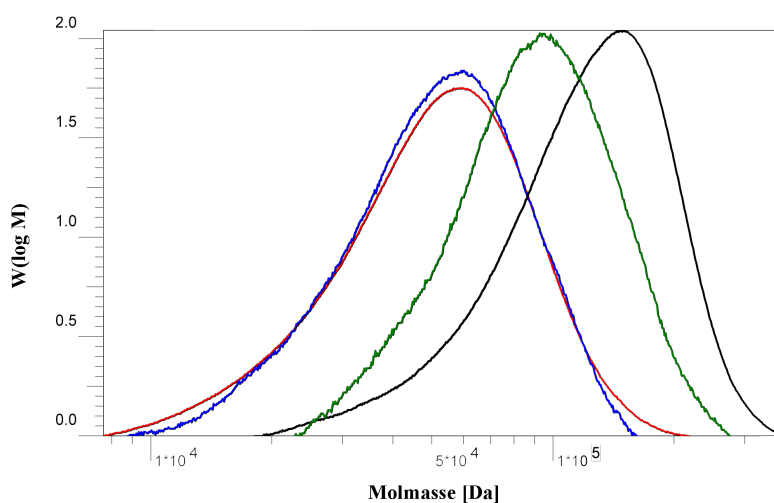


Abbildung 3.2.: Verschiedene GPC-Messungen der RAFT-Polymerisationen von AA mittels CTA1 im Wasser. Blau:  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$  bei 20 °C, rot:  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$  bei 70 °C, grün:  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$  bei 20 °C, schwarz:  $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$  bei 70 °C.

**Polymerisation mit Dithioester-RAFT-Reagenz (CTA2)** Dithioester CTA2 ist ein schaltbares RAFT-Reagenz,<sup>181</sup> das schon für viele Acrylat-Monomere und Vinylacetat angewendet wurde.<sup>166</sup> Diese Klasse der schaltbaren RAFT-Reagenzien wurde von Thang *et al.* entwickelt<sup>182</sup> und ermöglicht es, reaktive (more activated monomers = MAM) und weniger reaktive (less activated monomers = LAM) Monomere kontrolliert zu Poly(MAM)-block-poly(LAM) zu polymerisieren. Dieses RAFT-Reagenz wurde von Keddie *et al.* in Wasser verwendet, um *N,N*-Dimethylacrylamid zu polymerisieren.<sup>181</sup> In dieser Arbeit wurde CTA2 mit TFA protoniert (pH = 1,5). Protoniertes CTA2 wurde verwendet, um Acrylamid bei 70 °C und 20 °C zu polymerisieren (Tabelle 3.1). Die Kinetik, die Polydispersität des Polyacrylamids und die akzeptable Abweichung zwischen  $M_n^{theo.}$  und  $M_n^{NMR}$  zeigen, dass Acrylamid mit CTA2 hervorragend kontrolliert polymerisiert werden kann (Abbildung 3.1).

#### 3.1.2.3. Polymerisation von Poly-AEMA

Analog zu Polyacrylamid wurde PolyAEMA mit CTA2 mithilfe des APS/TEMED-Systems in Wasser bei 20 °C und 70 °C polymerisiert (Tabelle 3.1). AEMA lässt sich bei 70 °C sowie auch bei 20 °C mit einer Dispersität  $\bar{D}$  von 1,3 polymerisieren.  $M_n^{NMR}$  von **P-05** und **P-06** zeigen eine akzeptable Abweichung von  $M_n^{theo.}$ .

#### 3.1.2.4. Einfluss des pH-Werts auf die Polymerisation

Der pH-Wert spielt eine entscheidende Rolle bei der RAFT-Polymerisation und besonders bei Polyacrylamid. Es ist literaturbekannt, dass Acrylamid hydrolyseempfindlich im basischen Medium ist.<sup>180</sup> Das Nebenprodukt der Hydrolyse ist Ammoniak. Dieses kann sogar bei einer geringen Menge Dithioesters (CTA2) in Thiole und Thiobenzamide spalten. Durch einen niedrigen pH-Wert oder die Verwendung eines Puffersystems konnte dieses Problem beseitigt werden. So wurde ein nucleophiler Angriff von Ammoniak auf den Dithioester vermieden.<sup>180</sup> In dieser Arbeit wurde ein Puffersystem für CTA1 und eine starke Säure (TFA) für CTA2 verwendet. Allerdings sind freie Radikale, die vom APS/TEMED-Intermediat freigesetzt werden, von dem TEMED abhängig. Es ist anzunehmen, dass die Zerfallszeit des APS/TEMED-Intermediats sehr kurz ist. Dies ist ein Vorteil gegenüber einer Azoverbindung, die eine relativ lange Zerfallszeit ( $t_{1/2}$ ) hat. In dieser Arbeit wurde die Reaktionsmischung (Monomere, APS, TEMED, CTA) eine Minute lang reagieren gelassen, bevor die Säure oder das Puffersystem hinzugefügt wurde, sodass es genügend Zeit für den Zerfall des APS/TEMED-Intermediats gab bzw. freie Radikale produziert werden konnten.

#### 3.1.3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine RAFT-Polymerisation von Polyacrylamid und Poly-AEMA mittels APS/TEMED-Systems als Radikalquelle in Wasser bei Raum-

### 3. RAFT-Polymerisation

---

temperatur und bei 70 °C erfolgreich durchgeführt. Alle Polymerisationen, die mit diesem System durchgeführt wurden, zeigten einen kontrollierten radikalischen Polymerisationsverlauf und einen Wert für die Polydispersität kleiner als 1,5.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich mit diesem System gut definierte Polymere durch RAFT-Polymerisation bei Raumtemperatur im Wasser herstellen lassen. Im Gegensatz zu anderen Raumtemperatur-RAFT-Methoden erfordert die Polymerisation keine metallhaltigen Katalysatoren oder Lichtbestrahlung. Zudem bietet das APS/TEMED-System die Möglichkeit, die Polymerisation von temperaturempfindlichen Materialien durch RAFT-Polymerisation durchzuführen. Jedoch kann dieses System ausschließlich in Wasser angewendet werden und beschränkt sich auf wasserlösliche Monomere bzw. wasserlösliche RAFT-Reagenzien.



## 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

### 4.1. Verwendung von $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

#### 4.1.1. Einleitung

Hydrogele, die durch Copolymerisation mit multifunktionalen Monomeren synthetisiert wurden, stellen eine große Bandbreite von Biomaterialien dar, die zunehmend für Zellkultivierung und Geweberegenerierung gebraucht werden.<sup>183–187</sup> Obwohl in den letzten Jahrzehnten viele verschiedene Methoden zu deren Herstellung entwickelt worden sind, beruht die einfachste Herstellungsmethode auf der Polymerisation einer Mischung von monofunktionalen Monomeren sowie einem Vernetzer, sodass sich *in situ* ein Polymer Netzwerk bildet.<sup>188–190</sup> Viele Hydrogele, die für die Gewebekonstruktion eingesetzt werden, enthalten zusätzliche Monomere mit bioaktiven Anteilen, beispielsweise die von Fibronectin<sup>191</sup> abgeleitete bioaktive Peptidsequenz RGD zur Förderung der Zelladhäsion und -proliferation. Bei der *in-situ*-Vernetzungsmethode ist es schwierig, einen direkten quantitativen (z. B. spektroskopischen) Nachweis zu erbringen, der bestätigt, ob die gewünschte Menge an Peptiden erfolgreich in das Hydrogel eingebaut wurde. Quantitative Informationen über die Peptidkonzentration im Hydrogel sind jedoch von großer Bedeutung, da unterschiedliche Konzentrationen das Zellverhalten, u. a. die Zelladhäsion, beeinflussen.<sup>192,193</sup> Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit verschiede-

#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

---

nen Methoden entwickelt, die Peptid-Liganden-Konzentration im synthetischen Hydrogel bestimmen zu können, darunter die Aminosäureanalyse,<sup>194</sup> der Einbau von Fluoreszenzmarkierungen in der Peptidsequenz,<sup>195</sup> der Ninhydrin-Assay<sup>196</sup> und die Radiokennzeichnung/Isotopenmarkierung der Peptidsequenz.<sup>197</sup> Obwohl diese Methoden brauchbare Ergebnisse liefern, erfordern sie oft die Entwicklung neuer arbeitsintensiver Prüfungsmethoden oder die Herstellung von zusätzlichen Proben für die Analyse. Eine einfache Methode, die die Zusammensetzung und die bioaktiven Anteile des Hydrogels ohne weitere Modifikationsschritte analysieren könnte, wäre wünschenswert. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieses Kapitels, die HR-MAS-NMR-Spektroskopie als Methode zu verwenden, um bioaktive Hydrogele in Bezug auf die Zusammensetzung der Copolymere und die Quantifizierung des Peptidanteils zu analysieren. Materialien wie kristalline Stoffe oder Feststoffe weisen ein äußerst breites NMR-Signal auf. Die Gründe dafür sind umfangreiche Homo- und Hetero-Atom-Dipol-Kopplungen, die Anisotropie der chemischen Verschiebung (*chemical shift anisotropy* (CSA)) sowie Quadrupol-Wechselwirkungen. Eine Möglichkeit, diese Wechselwirkungen wenigstens teilweise zu reduzieren, kann durch Quellung dieser Materialien erreicht werden. Die Erhöhung der lokalen Mobilität führt zu einer Reduktion der Interaktionen, die in Festkörpern vorkommen.<sup>198</sup> Doch selbst im Falle einer gequollenen Probe ist die magnetische Suszeptibilität von der Struktur der Probe abhängig, und das hat einen großen Einfluss auf die Auflösung des NMR-Spektrums. Es konnte gezeigt werden, dass die HR-MAS-NMR-Spektroskopie mithilfe einer magnetischen Suszeptibilität-Matching-Probentechnologie eine gute Lösung für dieses Problem ist.<sup>199</sup> Die HR-MAS-Methode wurde in der Vergangenheit bereits für die Untersuchung von Harzen in der kombinatorischen Chemie,<sup>200</sup> für gequollene Polystyrolgele<sup>201</sup> und Lipidsysteme<sup>202</sup> eingesetzt. In letzter Zeit sind weitere Anwendungsbereiche hinzugekommen, darunter die Verwendung dieser Technik für die direkte Überwachung des hydrolytischen Abbaus von biologisch-abbaubaren vernetzten Polymernetzwerken,<sup>203</sup> die Abschätzung der Vernetzungsdichte von Poly(dimethylsiloxan)

#### 4.1. <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

---

(PDMS)-Netzwerken,<sup>204</sup> die Analyse der Polymerharz-Funktionalisierung<sup>205</sup> oder auch die Untersuchung von Wasser/Polymer-Wechselwirkungen in einem Poly(ami-doamin)-Hydrogel.<sup>206</sup> In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektroskopie für die Bestimmung des Peptidgehalts in einem Polymernetzwerk (Hydrogel) in Abhängigkeit von der Vernetzungskonzentration bzw. der Gelfestigkeit verwendet.

### 4.1.2. Ergebnisse und Diskussion

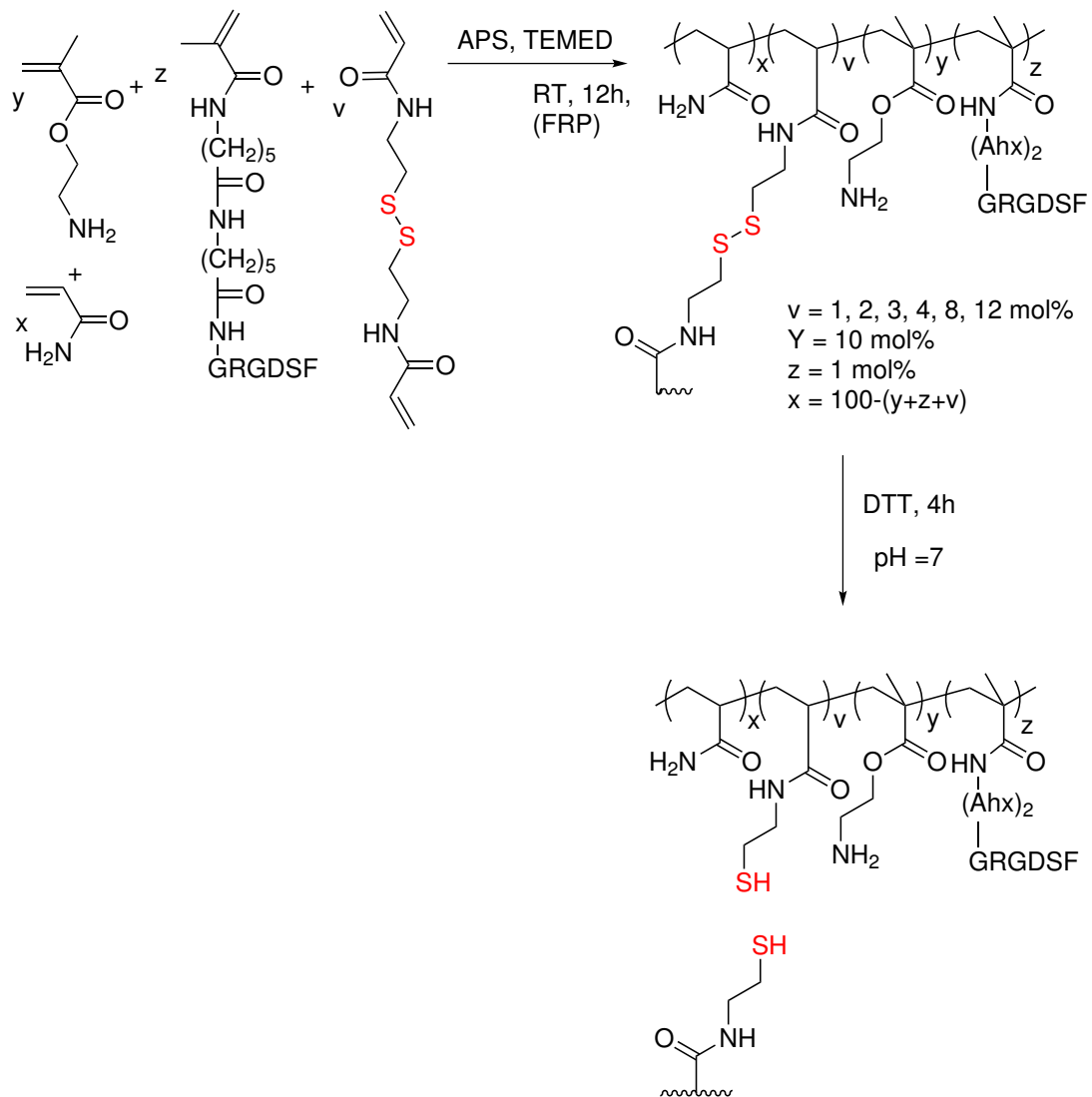
Mittels freier radikalischer Polymerisation wurde eine Versuchsreihe von Hydrogelen hergestellt, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt: Acrylamid (AA), 2-Amino ethylmethacrylat Hydrochlorid (AEMA), einem Peptidmonomer (PM) und *N,N'*-Bis(acryl -oyl)cystamin als einem Disulfid-basiertem, spaltbaren Vernetzer. Alle Polymerisationen wurden mithilfe der freien radikalischen Polymerisation und APS/TEMED als Initiator durchgeführt. Die Vernetzerkonzentration wurde von 1 bis 12 mol% variiert. Als Lösungsmittel wurde eine entgaste Ethanol/Wasser-Lösung (25/75 w/w %) eingesetzt. Nach 12-stündiger Polymerisation wurden die Gele zwei Tage lang in Milli-Q-Wasser dialysiert, um restliche Monomere und niedermolekulare Substanzen zu beseitigen (Schema 4.1).

#### 4.1.2.1. Rheologische Charakterisierung

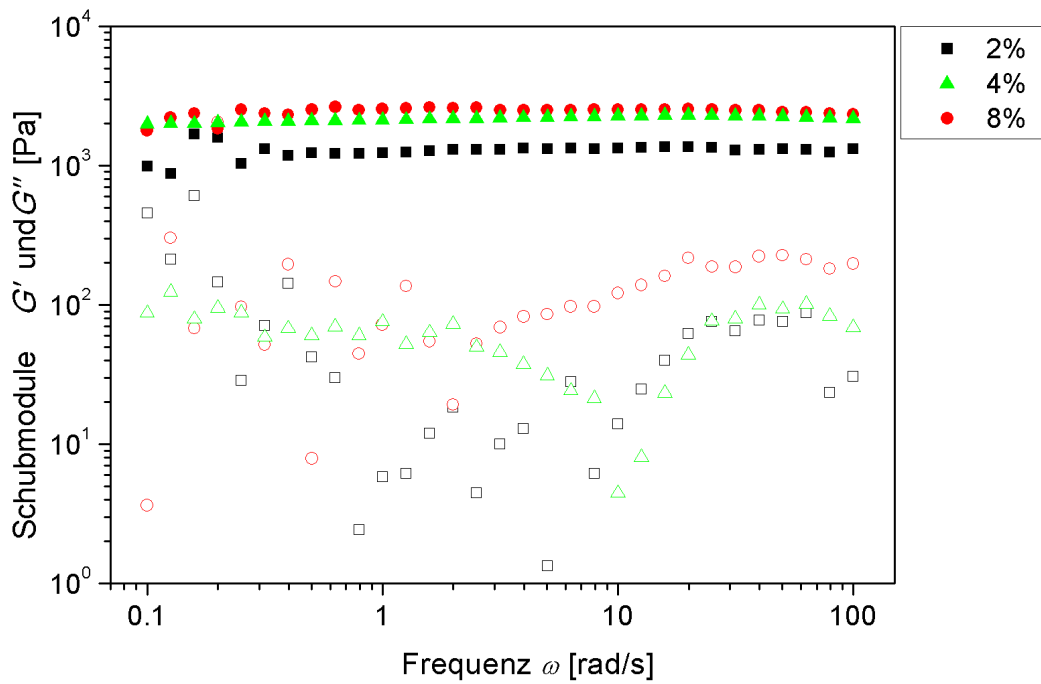
##### Bearbeitung des Gels für rheologische Messungen

Die Gelscheibe wurde 24 h lang in einer Phosphatpufferlösung platziert (*Fisher BioReagents* – zwei Tabletten in 400 ml Milli-Q-Wasser ergeben 0,01 M Phosphatpufferlösung, 0,0027 M KCl und 0,137 M NaCl, pH 7,4 bei 25 °C). Die Dicke der hergestellten Hydrogele betrug etwa 1 mm. Damit die Titanplatte des Rheometers komplett mit der Gelscheibe bedeckt wird, soll sie eine Fläche von mindestens 2,5 cm<sup>2</sup> aufweisen.

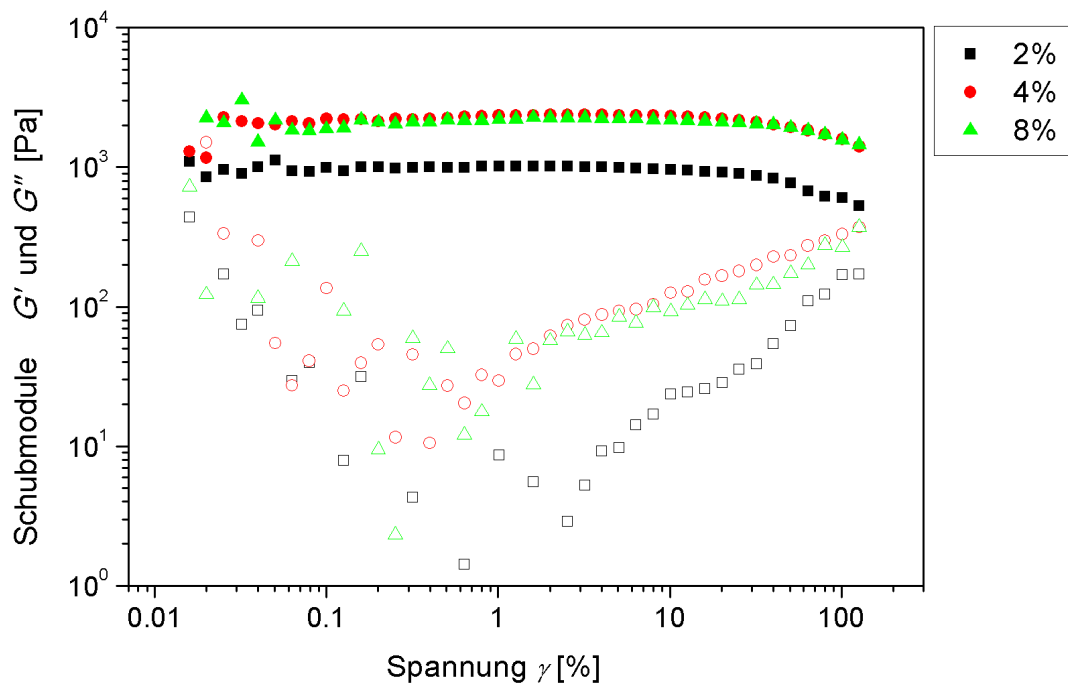
#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie



Schema 4.1: Herstellung Peptid-funktionalisierter Hydrogele (**G1** – **G6**) mit einem spaltbaren Disulfidvernetzer und der reduktiven Spaltung zur Erzeugung von löslichen Copolymeren.



(a)



(b)

Abbildung 4.1.: Speichermodul  $G'$  und Verlustmodul  $G''$  als Funktion (a) der Frequenz und (b) Spannung.

#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

---

Für die Beschreibung der mechanischen Geleigenschaften wurden alle hergestellten Hydrogele (**G1 – G6**) rheologisch untersucht. Zunächst wurde die dynamisch-mechanische Analyse (DMA) durchgeführt, um die linear viskoelastische Region (LVR) und die mechanische Stabilität des Gels zu ermitteln (Abbildung 4.1 a). Sind das Speichermodul  $G'$  und das Verlustmodul  $G''$  konstant, kann die LVR durch den maximalen Wert des Plateaus bestimmt werden. Steigt die Verformung über die LVR, kann eine Abnahme des Speichermoduls  $G'$  beobachtet werden, was auf die partielle Zerstörung der Netzwerkstruktur hindeutet. Die LVR ist der Grad der Gelfestigkeit. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Erhöhung der Vernetzermenge zu einer Erhöhung der Gelfestigkeit führt. In dem daran anschließenden rheologischen Oszillationsversuch (*frequency-sweep-test*), der in Abbildung 4.1 dargestellt ist, wurden 2, 4 und 8 mol% Vernetzerpolymer als Beispiel zusammengefasst. Es wurde eine Deformation von 0,1 % angesetzt, um den Test an allen LVRs aller Gele durchzuführen. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, weist das Gel ein Plateau-Speichermodul  $G'_p$  auf und ein Verlustmodul  $G''_p$ , das klar unterhalb des Plateaumoduls liegt. Des Weiteren wurde eine starke Abhängigkeit der Gelfestigkeit vom Vernetzeranteil beobachtet, wie aus den Werten von  $G'_p$  abzulesen ist. Dies belegt, dass die untersuchten Gele chemisch vernetzt sind. Sowohl die Kurvenprofile als auch die gemessenen Werte korrelieren mit ähnlichen Gelen in der Literatur.<sup>207</sup> Tabelle 4.1 zeigt die eingesetzten Gelzusammensetzungen, Quellungsgrad (Q), Umsatz (U) und Speichermodul  $G'$  in Abhängigkeit von der Vernetzerkonzentration.

#### 4.1. <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

Tabelle 4.1.: Zusammensetzung und Geleigenschaften der Gele **G2** bis **G6**.

Gel	AA:AEMA:PM: V (mol%) <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	U <sup>c</sup> (%)	G' <sup>d</sup> (Pa)
<b>G1</b>	88 : 10 : 1 : 1	17,5	70,6	1312
<b>G2</b>	87 : 10 : 1 : 2	12,5	72,1	1359
<b>G3</b>	86 : 10 : 1 : 3	12,0	69,9	2079
<b>G4</b>	85 : 10 : 1 : 4	11,3	69,8	2294
<b>G5</b>	81 : 10 : 1 : 8	8,0	57,5	2541
<b>G6</b>	77 : 10 : 1 : 12	7,2	48,9	2904

**G1** bis **G6** = (a) Hydrogele, AA = Acrylamid, AEMA = 2-Aminoethylmethacrylat-Hydrochlorid, PM<sup>1</sup> = Peptidmonomer, V = Vernetzer, (b) Q = Quellungsgrad, (c) U = Umsatz der Polymerisation in % und (d) G' = Speichermodul.

#### 4.1.2.2. Quellungsexperimente

##### Bearbeitung der Gele für Quellungsexperimente

Die Gele wurden zuerst in Milli-Q-Wasser 24 h dialysiert und bei 40 °C unter Vakuum für 48 h getrocknet. Danach wurden die getrockneten Gele zügig gewogen, da sie sehr hydrophil sind und Luftfeuchtigkeit aufnehmen, was die Messung verfälschen kann. Die Gele wurden in einer Plastikspritze mit Teflonfilter platziert und schließlich in 10 ml Phosphatpufferlösung 24 h quellen gelassen. Nach 24 h wurde das Wasser herausfiltriert und die Gele erneut gewogen. Der Quellungsgrad wurde mit der Gleichung 4.1 errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

$$Q = \frac{\text{Gewicht des gequollenen Hydrogels} - \text{Gewicht des getrockneten Hydrogels}}{\text{Gewicht des getrockneten Hydrogels}} \quad (4.1)$$

##### 4.1.2.3. NMR-Messungen

In Abbildung 4.2 werden drei unterschiedliche NMR-Spektren für Polymer **G2** mit 2 mol% Vernetzer gezeigt. Während das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des vernetzten Polymers ein typisch breites Signal aufweist (siehe Abbildung 4.2 a), zeigt das entsprechende HR-MAS-Spektrum bei einer Drehgeschwindigkeit von 3,5 kHz bereits eine erheblich verbesserte Auflösung des Signals, sodass eine eindeutige Zuordnung aller aliphatischen  $\text{CH}_3$ -,  $-\text{CH}_2$ - und  $\text{CH}$ -Gruppen aus dem Polymerrückgrat zwischen 1,0 und 2,5 ppm ermöglicht wird. Des Weiteren sind die aromatischen Protonen im Peptidanteil zwischen 7,0 und 7,3 ppm sichtbar (siehe Abbildung 4.2 b). Da der Vernetzer eine Disulfidbindung besitzt, kann diese zu freien Thiolgruppen reduktiv mit D,L-Dithiothreitol (DTT) gespalten werden, was das Gel in lösliche Copolymere umwandelt. Diese löslichen Copolymere ermöglichen eine  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse (siehe Abbildung 4.2 c) und letztendlich die Bestimmung der Copolymerzusammensetzung, die die chemische Zusammensetzung der vernetzten Proben widerspiegelt.

Die Signale 8 bis 10 zwischen 7 und 7,3 ppm können dem aromatischen Phenylring der Peptidseitenkette zugeordnet werden. Die Signale zwischen 1,3 und 2,5 ppm können der  $-\text{CH}_2$ -Gruppe (1, 1,5-2,0 ppm), der  $\text{CH}_3$ -Gruppe (3, 0,9-1,2 ppm) und der  $\text{CH}$ -Gruppe 2 des Polymerrückgrats bei 1,9-2,3 ppm zugeordnet werden.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY-,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC- und  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC-Experimente (*correlation spectroscopy* (COSY), *total correlated spectroscopy* (TOCSY), *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC), *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC)) von **G4** wurden des Weiteren durchgeführt, um die Signale 4 bis 7 der Methylengruppen der Vernetzerseitenkette und der AEMA-Seitenkette zuzuordnen. Die Spektren sind in Abbildung .5 bis Abbildung .8 dargestellt (siehe Anhang). Zusätzlich wurde eine  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Messung für die Copolymere ohne Vernetzer durchgeführt (Abbildung .9, siehe Anhang), um das NH-Amid dem Acrylamid zuzuordnen.



#### 4.1. $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

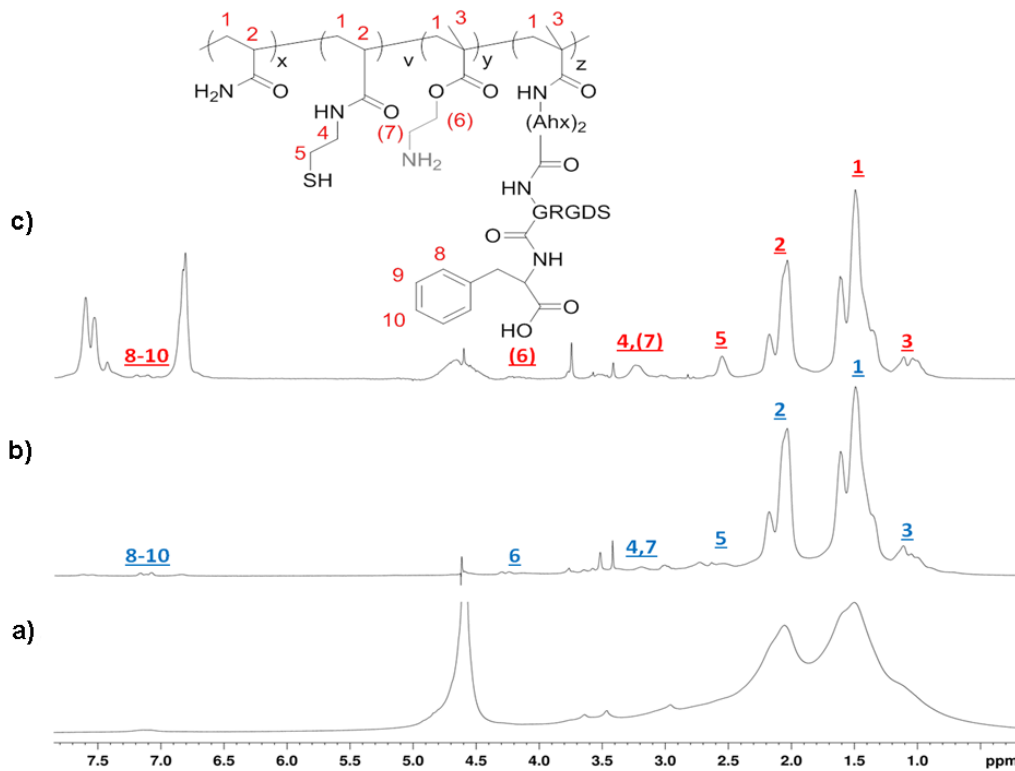


Abbildung 4.2.: a)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **G2** (in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ), b)  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektrum von **G2** bei einer Drehzahlgeschwindigkeit von 3,5 kHz (gequollen in  $\text{D}_2\text{O}$  mit Unterdrückung des Wassersignals) und c)  $^1\text{H}$ -NMR von **G2** nach Disulfid-Spaltung (gequollen  $\text{D}_2\text{O}$  mit Unterdrückung des Wassersignals).

Dies wurde bei 6,8 und 7,5 ppm detektiert. Die Ergebnisse zeigten ferner, dass die Methylengruppen der AEMA-Wiederholungseinheiten nach der DTT-Spaltung nicht mehr nachgewiesen werden können, wahrscheinlich aufgrund der Hydrolyse der Esterbindung.

#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

In Abbildung 4.3 ist das  $^1\text{H}$  HR-MAS-NMR-Spektrum des Hydrogels **G2** in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  zu sehen. Bemerkenswert ist die gute Auflösung des Spektrums, die es erlaubt, jeder Wiederholungseinheit ein eindeutiges Signal zuzuweisen. Dies erlaubt einerseits eine Bestimmung der Copolymerzusammensetzung im Gel und die Quantifizierung des Peptidanteils, der durch die aromatischen Signale 8–10 gekennzeichnet ist.

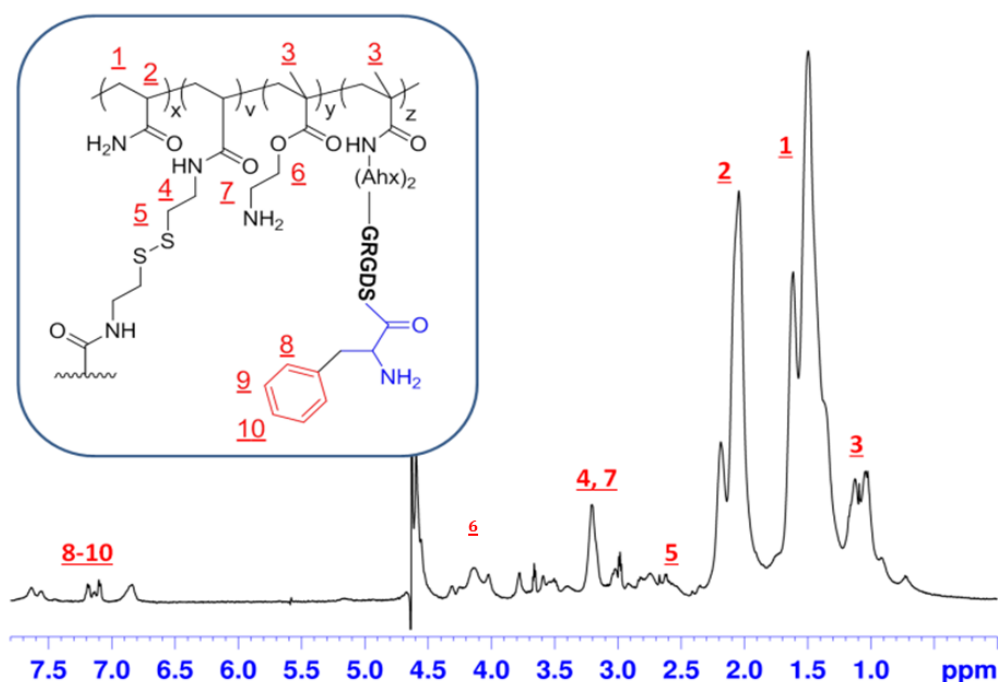


Abbildung 4.3.:  $^1\text{H}$  HR-MAS-NMR-Spektrum von **G2** (in  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ).

Zur Errechnung der Copolymerzusammensetzung der Polymere **G1–G6** wurden die Protonen des Phenylrings 8–10, die Methyl-Gruppe des Polymerrückgrates 3 und die Methylen-Gruppe 4 des Vernetzers herangezogen. Die Ergebnisse zeigen einen Peptidanteil in allen Gelen (**G1 – G6**) von 0,4 - 0,6 mol % an, der ca. 50 % geringer ist, als er ursprünglich angesetzt wurde (siehe Tabelle 4.2).

#### 4.1. $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

Tabelle 4.2.: Bestimmung der Zusammensetzung der Gele mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nach Spaltung des Disulfidvernetzers.

Gel	AA:AEMA:PM: V	AA :AEMA:PM: V
	(mol%) <sup>a</sup>	(mol%) <sup>b</sup>
<b>G1</b>	88 : 10 : 1 : 1	90,7: 6,7 :0,4: 2,2
<b>G2</b>	87 : 10 : 1 : 2	88,5: 7,6 :0,4: 3,4
<b>G3</b>	86 : 10 : 1 : 3	86,3: 7,9 :0,5: 5,3
<b>G4</b>	85 : 10 : 1 : 4	85,7: 8,0 :0,6: 5,7
<b>G5</b>	81 : 10 : 1 : 8	82,7: 6,7 :0,4:10,3
<b>G6</b>	77 : 10 : 1 :12	70,6: 8,2 :0,4:20,8

<sup>a</sup> angesetzte Zusammensetzung der Gele, <sup>b</sup> Zusammensetzung der Gele mittels  $^1\text{H}$ -NMR nach Spaltung des Disulfidvernetzers.

In der nächsten Testreihe wurden die Polymere **G1–G6** im gequollenen Zustand in  $\text{D}_2\text{O}$  mittels  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie analysiert (siehe Abbildung 4.4). Während die aliphatischen Signale **1** und **2** (welche den  $-\text{CH}_2-$  und  $\text{CH}$ -Gruppen entsprechen) des Polymerrückgrates gut aufgelöst sind, wird deutlich, dass die Methylgruppe **3** der AEMA-Wiederholungseinheit eine verringerte Intensität und Auflösung mit zunehmender Vernetzungsdichte aufweist. Des Weiteren können die Signale **4** und **5** der Methylen-Gruppe dem Vernetzer zugeordnet werden. Da beide Methylengruppen nah am unelastischen Teil des Vernetzers bzw. nah am Vernetzungspunkt liegen, konnte durch  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie keine gute Signalauflösung erlangt werden.

#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

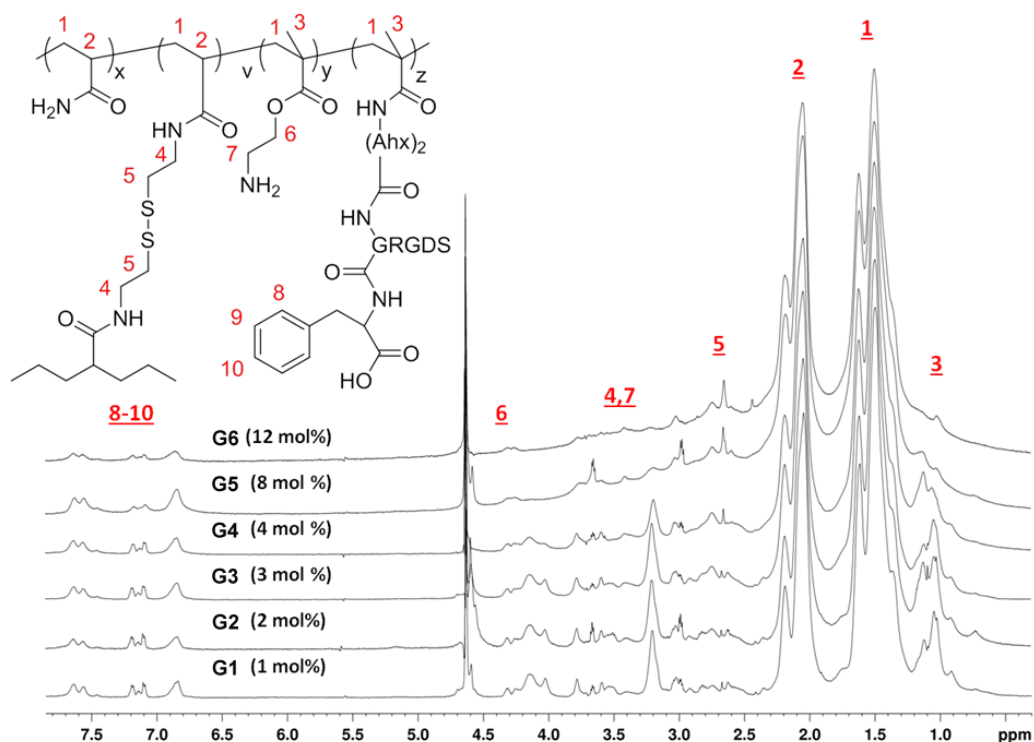


Abbildung 4.4.: <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektrum der Polymere **G1** – **G6** gequollen in D<sub>2</sub>O.

Die Signale der aromatischen Protonen (7,0–7,3 ppm) sind hingegen wieder gut von allen anderen Signalen des Polymerrückgrats getrennt – der erste Beweis dafür, dass das Peptidmonomer in das Hydrogel eingebaut ist. Das Spektrum in Abbildung 4.4 zeigt ebenfalls, dass die Intensität des aromatischen Signals **8–10** mit Zunahme der Vernetzungsdichte abnimmt.

Neben der qualitativen Bestätigung, dass die Peptideinheit in das Gel eingebaut wurde, wurden die <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektren im Detail analysiert, um zu sehen, ob die verfügbaren Informationen für eine quantitative Analyse ausreichen. Insbesondere war es sehr wichtig, den Peptidanteil im Hydrogel mittels <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektren bestimmen zu können und dies mit den statischen <sup>1</sup>H-NMR-Daten der abgespaltenen Gele zu vergleichen. Da einige aliphatische Signale des Vernetzers und der AEMA-Gruppe bei hoher Vernetzungskonzentration eine drastische Verringerung der Signalstärke aufwiesen, wurde entschieden, die starken aromatischen Signale zwischen 7,0 und 7,3 ppm mit den starken aliphatischen

#### 4.1. <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektroskopie zur Charakterisierung von Biohybridhydrogelen

Signalen zwischen 0 und 2,5 ppm zu vergleichen.

Die Signalintensität der aromatischen Region wurde für alle Polymere **G1** bis **G6** mit fünf Protonen als Referenz verwendet, weil fünf Protonen einer Peptideinheit entsprechen. Dies wiederum wurden mit den aliphatischen Signalen zwischen 0 und 2,5 ppm verglichen. Die Ergebnisse der <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektren sowie der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren nach der Disulfid-Spaltung werden in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.3.: Vergleich der aromatischen Signalstärke in Bezug auf die aliphatische Signalintensität im Bereich von 0 von 2,5 ppm.

Gel	aromatische Signalintensität:	aromatische Signalintensität:
	aliphatische Signalintensität (0-2,5 ppm) <sup>a</sup>	aliphatische Signalintensität (0-2,5 ppm) <sup>b</sup>
<b>G1</b>	5:760,7	5:628,9
<b>G2</b>	5:596,4	5:642,6
<b>G3</b>	5:616,0	5:717,5
<b>G4</b>	5:513,8	5:728,3
<b>G5</b>	5:777,2	5:876,2
<b>G6</b>	5:681,4	5:1172

<sup>a</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmte lösliche Copolymere nach der Spaltung des Disulfids,

<sup>b</sup> mittels <sup>1</sup>H-HR-MAS-Spektroskopie bestimmt.

Während mit steigender Vernetzungsdichte das Verhältnis der aromatischen zur aliphatischen Signalintensität der löslichen Copolymere nahezu konstant bleibt, zeigen die HR-MAS-Daten, dass das aliphatische Signal – verglichen mit dem aromatischen Signal mit steigender Vernetzungsdichte – stärker wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mobilität der Peptideinheit bei erhöhter Vernetzungsdichte stärker abnimmt als bei den aliphatischen Protonen des Polymerrückgrats (siehe Tabelle 4.3 und Abbildung 4.5).

#### 4. HR-MAS-NMR-Spektroskopie

---

Die Abweichung der beiden Trendlinien für die  $^1\text{H}$ -NMR- und die  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Daten in Abbildung 4.5 wurde dazu verwendet, die Peptidmenge als Funktion der Vernetzerkonzentration zu berechnen, die durch HR-MAS-Spektroskopie quantifiziert werden kann. Daher wurde der Quotient der aliphatischen Signalintensität des HR-MAS-Spektrums und des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums für jede Vernetzermenge errechnet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei niedrigen Vernetzerkonzentrationen von 1 und 2 mol% der Peptidanteil quantitativ mithilfe der  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektroskopie aufgrund der hohen lokalen Mobilität in schwach vernetzten Hydrogelen detektiert werden kann. Mit zunehmender Vernetzerkonzentration bis zu 12 mol% reduziert sich die Signalintensität der aromatischen Protonen der Peptideinheit im Vergleich zum aliphatischen Rückgrat um etwa 62 %. Der Grund hierfür besteht darin, dass die Beweglichkeit der Peptideinheit mit zunehmender Vernetzungsdichte stärker eingeschränkt wird als die Beweglichkeit des aliphatischen Polymerrückgrats.

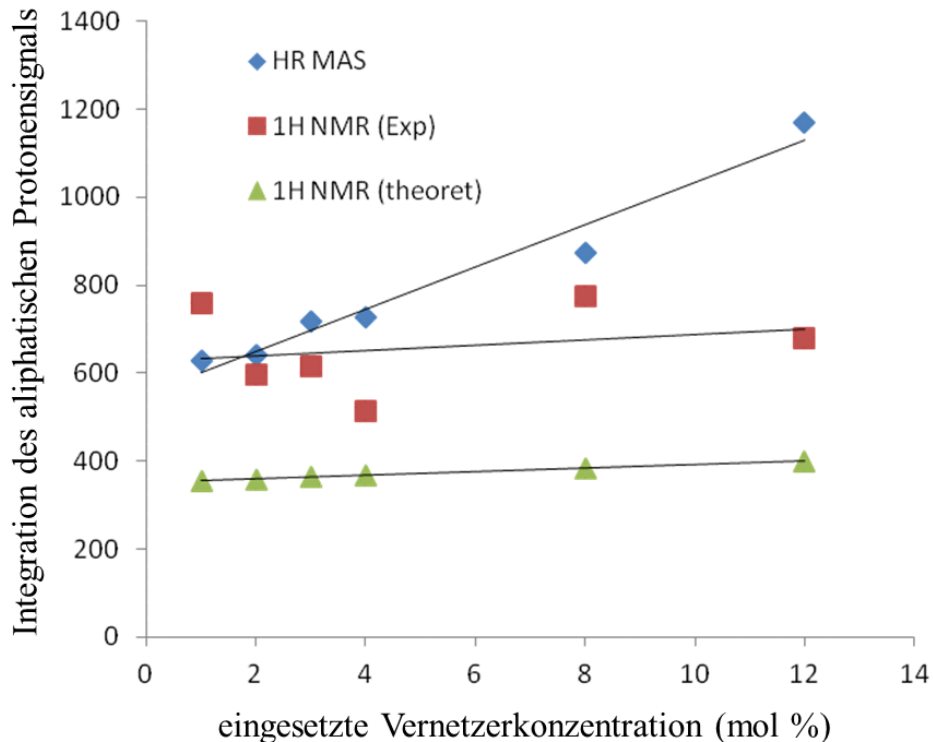


Abbildung 4.5.:  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Daten: Vergleich des gemessenen aromatischen Protonensignals (7,1–7,3 ppm) mit dem gemessenen aliphatischen Protonensignal (0–2,5 ppm) der Hydrogele **G1** – **G6** (◆),  $^1\text{H}$  H-NMR-Daten nach Spaltung der Disulfidvernetzer: Vergleich des gemessenen aromatischen Protonensignals (7,1–7,3 ppm) mit dem gemessenen aliphatischen Protonensignal (0–2,5 ppm) der Hydrogele **G1** – (■) und der theoretischen Berechnung – basierend auf der eingesetzten Monomierzusammensetzung bei der Hydrogelzubereitung (▲).

##### 4.1.3. Zusammenfassung

Die  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie wurde zur Bestimmung des bioaktiven Peptidanteils in einem vernetzten Hydrogel angewendet. Hierfür wurden mittels freier radikalischer Polymerisation sieben Hydrogele mit unterschiedlichen Vernetzerkonzentrationen von 1 bis 12 mol% hergestellt. Der eingesetzte Vernetzer besitzt eine Disulfidbindung, die es ermöglicht, die Gele reduktiv in lösliche Copolymere zu spalten, was eine Charakterisierung der Zusammensetzung mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie erlaubt. Für die Umwandlung des Hydrogels in lösliche Copolymere wurden die Disulfid-basierten Vernetzerstellen durch DTT zu freien Thiolgruppen reduziert bzw. gespalten. Der Peptidgehalt der schwach vernetzten Hydrogele (1–2 mol% Vernetzer), der mittels  $^1\text{H}$ -HR-MAS bestimmt wurde, entspricht dem Peptidgehalt der löslichen Copolymere, der mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bestimmt wurde. Mit der Erhöhung der Vernetzerkonzentration bis zu 12 mol% nimmt die Beweglichkeit der Peptidseitenkette immer weiter ab und die Signalintensität reduziert sich auf 62 % im Vergleich zum löslichen Copolymer.



# 5. Biohybridhydrogel-Zelleexperimente

## 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und GRGDSF in Hydrogelen auf das NSZ-Verhalten

### 5.1.1. Einleitung

Die Fähigkeit der neuronalen Stammzellen, sich in einer bestimmten Mikroumgebung in eine spezialisierte Zelllinie zu differenzieren, ist für die regenerative Medizin von entscheidender Bedeutung. Um das Potenzial neuronaler Stammzellen für regenerative Therapien besser auszunutzen zu können, ist es wichtig, die Funktion der Mikroumgebung, die die Stammzellendifferenzierung reguliert, zu erforschen und zu verstehen.<sup>19,208,209</sup> Neuronale Stammzellen (NSZ) können sich in Neuronen und in Gliazellen differenzieren. Zu den letzteren gehören die Oligodendrozyten, die das Myelin bilden, und Astrozyten. Eine der größten Herausforderungen in Hinblick auf die Arbeit mit NSZ ist es, die Faktoren zu identifizieren und zu optimieren, die das Überleben von Zellen erhöhen und die Differenzierung der NSZ in Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten steuern.

Wie im theoretischen Teil dargestellt wurde, wird die Zelladhäsion in der künstlichen EZM meistens durch die von Fibronectin abgeleitete, zelladhäsionsfördernde Peptidsequenz RGD unterstützt.<sup>73,210</sup> Diese Peptidsequenz ist in der Lage, eine spezifische Bindung mit Integrinen einzugehen, die zu den Transmembranproteinen gehören, insbesondere mit den Integrinen  $\alpha_V\beta_3$  und  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>38,39</sup>

## 5. Biohybridhydrogel-Zellexperimente

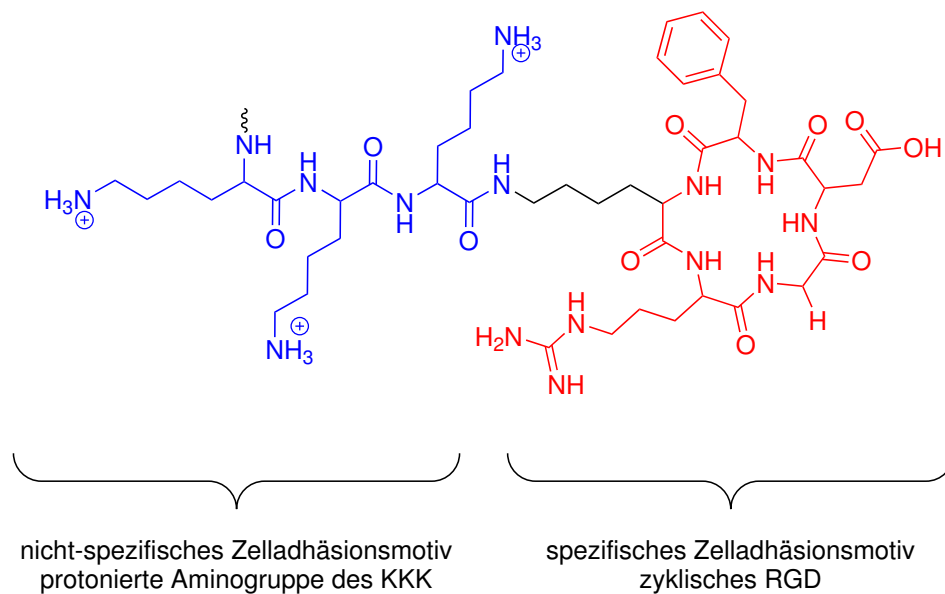
---

Während Polyethylenglykolgele bereits intensiv für zwei- und dreidimensionale Zellexperimente verwendet worden sind,<sup>77,78</sup> sind die auf Polyacrylamid basierten Gele durch die Modifizierung der Geloberfläche mit einer bioaktiven Peptidsequenz (ohne Einfluss auf die mechanischen Gel-Eigenschaften) für zweidimensionale Zellexperimente optimiert worden.<sup>211</sup> Ein interessantes Beispiel, wie ein Substrat die NSZ-Adhäsion und -Zelldifferenzierung beeinflussen kann, wurde kürzlich von Wang *et al.* präsentiert. Poly-L-Lysine zeigten z. B. einen deutlichen Effekt auf die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung.<sup>211,212</sup> Während kationische Oberflächen bereits seit Jahrzehnten für die Förderung der Zelladhäsion verwendet werden,<sup>212–215</sup> erklärten nur wenige Studien den Mechanismus hinter dieser Vorgehensweise. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Zelladhäsion auf kationischen Oberflächen sehr wahrscheinlich auf elektrostatische Interaktionen zwischen der positiv geladenen Oberfläche und der negativ geladenen perizellulären Matrix (PZM) zurückzuführen ist.<sup>216,217</sup> Ein Hauptbestandteil der PZM ist die Hyaluronsäure (HA), ein sehr wasserreiches, negativ geladenes Polysaccharid, das die perizelluläre Matrix mit der Zellmembran verbindet.<sup>218</sup> Die PZM vermittelt eine Vielzahl von zellulären Interaktionen mit Substraten, wenn sich die Zellmembran noch weit von der adhäsiven Oberfläche entfernt befindet, deutlich bevor die Integrin-vermittelte Fokaladhäsion wirken kann.<sup>219</sup>

Kürzlich veröffentlichten Ding *et al.* eine Publikation über die Adhäsion von NIH/3T3 Fibroblastzellen auf Glasoberflächen. Hierfür modifizierten sie Glasoberflächen mit einem zyklischen RGDfKKKK-Peptid. Diese Peptidsequenz enthält ein zyklisches RGD als spezifisches zelladhäsionsförderndes Motiv und drei Lysineinheiten, wobei die protonierte seitliche Aminogruppe des Lysins die Zelladhäsion als nicht spezifisches Zelladhäsionsmotiv fördert (siehe Schema 5.1). Die Modifikation der Glasoberfläche mit der Kombination von spezifischen und nicht-spezifischen Zelladhäsionsmotiven bzw. mit dem zyklischen RGD und dem positiv geladenen Lysin förderte die Zelladhäsion mehr als bei einer nur mit zyklischem RGD modifizierten Glasoberfläche. Ding *et al.* begründeten dies

### 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

damit, dass die initiale, nicht spezifische Zelladhäsion im Zusammenhang mit der elektrostatischen Anziehungskraft der negativ geladenen PZM und einer positiv geladenen Substratoberfläche steht. Nach dieser anfänglichen Zellhaftung an die Oberfläche kann die Bildung von RGD Integrin-Interaktionen stattfinden.<sup>220</sup>



Schema 5.1: Adhäsionsfördernde Peptidsequenz RGDfK (RGDfK in zyklischer Form).

Aufgrund dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine solche Kombination von nicht spezifischen, elektrostatischen Interaktionen und spezifischen, auf Integrin-Rezeptoren basierenden Interaktionen die Herstellung eines Hydrogelmaterials mit einer sehr viel geringeren Menge an RGD-Peptiden erlaubt. Für neutrale Hydrogele liegt der untere Grenzwert der RGD-Peptidkonzentration mindestens bei 5,3 pmol/cm<sup>2</sup>, um die Zelladhäsion zu unterstützen sowie die anschließende Proliferation und Differenzierung.<sup>75</sup> Das Ziel dieses Kapitel war es daher, den Einfluss des RGD-Peptids in einem kationischen Hydrogel zu untersuchen, bei dem die RGD-Konzentration unterhalb der Grenzwertkonzentration liegt. In einem derartigen Gel kann die initiale Zell-adhäsion nur durch die Ladung der kationischen Oberfläche ausgelöst werden. Des Weiteren wurde untersucht, ob das RGD-Peptid in einem neutralen Gel einen Einfluss auf die Zelladhäsion,

Proliferation oder Differenzierung neuraler Stammzellen hat.

Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Gelgruppen hergestellt. Die erste Gruppe (**G7–G9**) enthielt die spezifische zelladhäsionsfördernde 6Ahx6AhxGRGDSF–Peptidsequenz mit einer Konzentration unterhalb des Grenzwertes von  $5,3 \text{ pmol/cm}^2$ . Die zweite Gruppe (**G10–G12**) wurde mit 10 mol% positiv geladenem AEMA als nicht spezifisches, zelladhäsives Motiv ausgerüstet. Für die letzte Gruppe (**G13–G15**) wurde eine Kombination beider Zelladhäsionsmotive verwendet. Hierbei wurde die gleiche Konzentration angesetzt wie in den Gruppen zuvor. Um die Rolle der Gelfestigkeit auf das Zellverhalten zu untersuchen, wurde in jeder Gelgruppe die Vernetzer-Konzentration zwischen 2, 8 und 16 mol% variiert.

### 5.1.2. Ergebnisse und Diskussion

#### 5.1.2.1. Peptidsynthese

Es ist literaturbekannt, dass einige Peptidsequenzen, die von den Proteinen der extrazellulären Matrix abgeleitet sind, das Stammzellenverhalten, wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung, beeinflussen. Dazu gehören die Sequenzen Arg-Gly-Asp (RGD), Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV), Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) usw. (siehe Tabelle 5.1).<sup>62</sup> Im Vergleich zu nativen Proteinen sind Peptidsequenzen stabiler und einfacher zu synthetisieren, und aufgrund ihrer relativ geringen Größe im Vergleich zu Proteinen zeigen sie weniger sterische Hindernisse.

Zu diesem Zweck wurde eine kleine Bibliothek von bioaktiven Peptidsequenzen, deren biologische Aktivitäten zum Teil literaturbekannt sind, hergestellt, um Hydrogele gezielt biologisch aktivieren zu können (Tabelle 5.1). Alle hergestellten Peptidsequenzen sind von EZM-Proteinen abgeleitet, z. B. Fibronectin, Kollagen, Laminin und Tenascin. Die Peptide wurden mittels Fmoc-Strategie hergestellt, mittels präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt und schließlich via hochaufgelöstem LC-

## 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

MS charakterisiert.

Tabelle 5.1.: Hergestellte Peptidsequenzen mit ihren EZM-Stammproteinen und Funktionen.

EZM-Protein	Funktion	Peptidsequenz	Referenzen
<b>Fibronectin</b>	Zelladhäsion	6Ahx6AhxGRGDSF	[40,117,210,221,222]
	Zelladhäsion, Differenzierung	PHSRN	[223–226]
<b>Kollagen IV</b>	Differenzierung, Zelladhäsion	MNYYSNS	[24,227,228]
<b>Kollagen I</b>	Differenzierung	GTPGPQGIAGQRGVV	[23,227,229,230]
<b>Laminin</b>	Zelladhäsion, Differenzierung	YIGSR, SDPGYIGSR	[231–234]
	Differenzierung	IKVAV	[27,64,90,233]
<b>Tenascin-C</b>	Differenzierung	VWSRAPTA	[228]

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Peptide auf einem 2-C1Trt-Harz (Novabiochem<sup>®</sup>) mittels Peptidsynthesizer (Multisyntech SYRO II) sowie auch manuell durch Fmoc-Strategie hergestellt.

### 5.1.2.2. Peptidbioaktivität und ihr Einfluss auf das Zellverhalten

Die nachfolgenden Zellexperimente wurden von Dr. Nicole Brösicke, Lisa-Marie Prior, Albert Job und Marvin Jarocki am Lehrstuhl für Zellmorphologie und molekulare Neurobiologie von Prof. Faissner an der Universität Bochum im Rahmen der Zusammenarbeit durchgeführt.

Das Ziel dieser Voruntersuchungen war es, den Effekt von löslichen Peptiden auf die Migration von neuralen Stammzellen zu untersuchen. Hierzu wurden ca. 5000 Zellen in einer Neurosphäre auf eine mit Fibronectin beschichtete Zellkulturplatte gegeben und unter dem Videomikroskop beobachtet (Abbildung 5.1) und dann die migrierten Zellen in

## 5. Biohybridhydrogel-Zelleperimente

---

bestimmten zeitlichen Abständen gezählt. Im ersten Versuch wurde die GRGDSF-Peptidsequenz in löslicher Form zu einer Neurosphärenkultur gegeben. Im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Peptidadditive ist ein starker Migrationsinhibierungseffekt zu sehen und es konnte eine deutlich geringere Zahl migrierter Zellen beobachtet werden. (Diagramm b, Abbildung 5.2). Als zweites Peptid wurde die IKVAV-Peptidsequenz von Laminin ebenfalls löslich zu einer Neurosphärenkultur hinzugegeben (Abbildung 5.2 b). Im Unterschied zur GRGDSF-Peptidsequenz verringerte sich die Anzahl der migrierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Peptidadditiv nicht. Die Erklärung dafür sind die  $\alpha_v\beta_3$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrine.<sup>235</sup> An sie bindet das GRGDSF-Peptid selektiv und sättigt diese ab, was die Adhäsion von Stammzellen inhibiert, während die IKVAV-Peptidsequenz keine selektive Bindung mit adhäsionsverantwortlichen Integrinen eingehen kann. Die IKVAV-Peptidsequenz bindet vielmehr an  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine.<sup>236</sup> Dadurch wird aber eher die Differenzierung von neuronalen Stammzellen unterstützt, nicht jedoch die Adhäsion.<sup>237</sup>

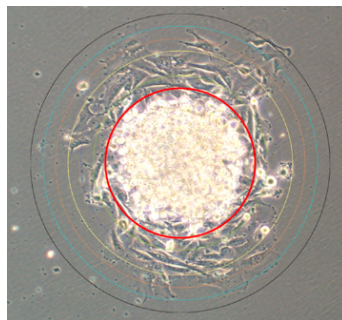
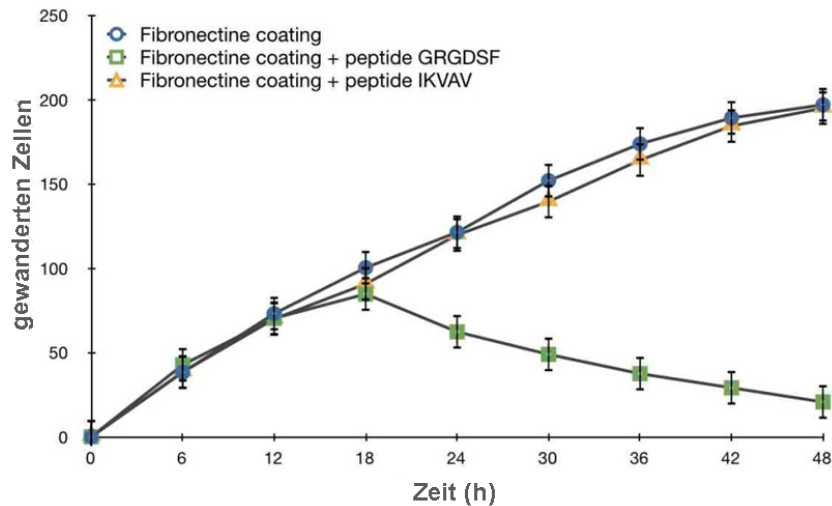
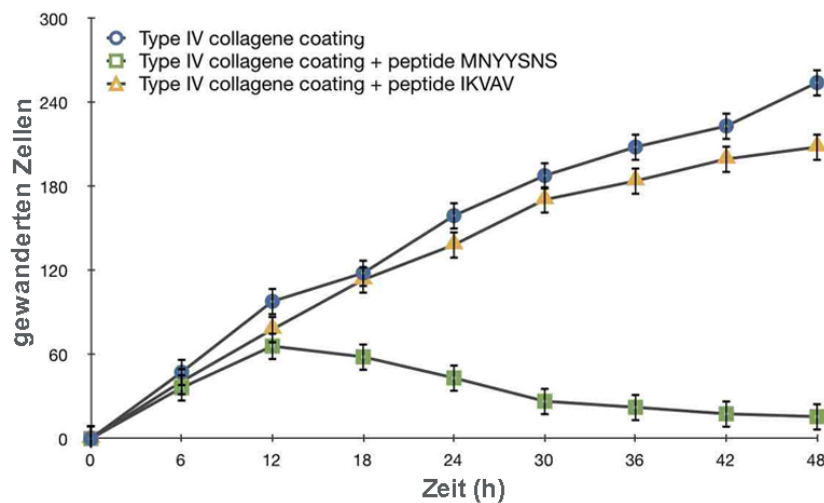


Abbildung 5.1.: Exemplarische Aufnahme einer Neurosphäre und migrierender Zellen in einem Zeitraum von 0 bis 24 h.

## 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten



(a) Anzahl der migrierten neuralen Stammzellen in einem Zeitraum von 48 h. Blau = Negativkontrolle mit einer Fibronektin-beschichteten Kulturplatte (ohne Peptid-Additive), grün = GRGDSF-lösliche Peptidadditive, gelb = IKVAV-lösliche Peptidadditive.



(b) Anzahl der migrierten neuralen Stammzellen in einem Zeitraum von 48 h. Blau = Negativkontrolle mit einer Fibronektin-beschichteten Kulturplatte (ohne Peptid-Additive), grün = MNYYSNS-lösliche Peptidadditive, gelb = IKVAV-lösliche Peptidadditive.

Abbildung 5.2.: Einfluss der löslichen Peptide (GRGDSF, MNYYSNS und IKVAV) auf die Migration von neuralen Stammzellen.

## 5. Biohybridhydrogel-Zelleperimente

---

Des Weiteren wurde die von Kollagen Typ IV abgeleitete Peptidsequenz MNYYSNS getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Peptidsequenz ebenfalls einen starken Effekt auf die Migration der neuralen Stammzellen hat. Die Anzahl der migrierten Zellen sank nach 12 h ab (Abbildung 5.2 b), was auf eine Integrin-Inhibierung zurückzuführen ist. Die von Kollagen IV abgeleitete Peptidsequenz MNYYSNS konkurriert ebenfalls um das  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin,<sup>238</sup> analog zum GRGDSF-Peptid, jedoch findet die Sättigung der Integrine mit dem freien Peptid sehr viel langsamer statt (Abbildung 5.2). Dies legt die Vermutung nahe, dass GRGDS und IKVAV an unterschiedliche Integrine binden und daher auch sehr wahrscheinlich unterschiedliche zelluläre Prozesse unterstützen, bzgl. Adhäsion und Differenzierung. Das Kollagen IV Peptid zeigt einen ähnlichen Effekt und bindet ebenfalls an ein oder mehrere Integrine, die von löslichem IKVAV nicht blockiert werden.

Da der Zelladhäsionsprozess die Basis für alle weiteren zellulären Prozesse bildet, lag der Fokus der weiteren Arbeiten darauf, Hydrogele herzustellen, die die Peptidsequenz RGD enthalten in Kombination mit einer neutralen bzw. kationischen Gelmatrix.

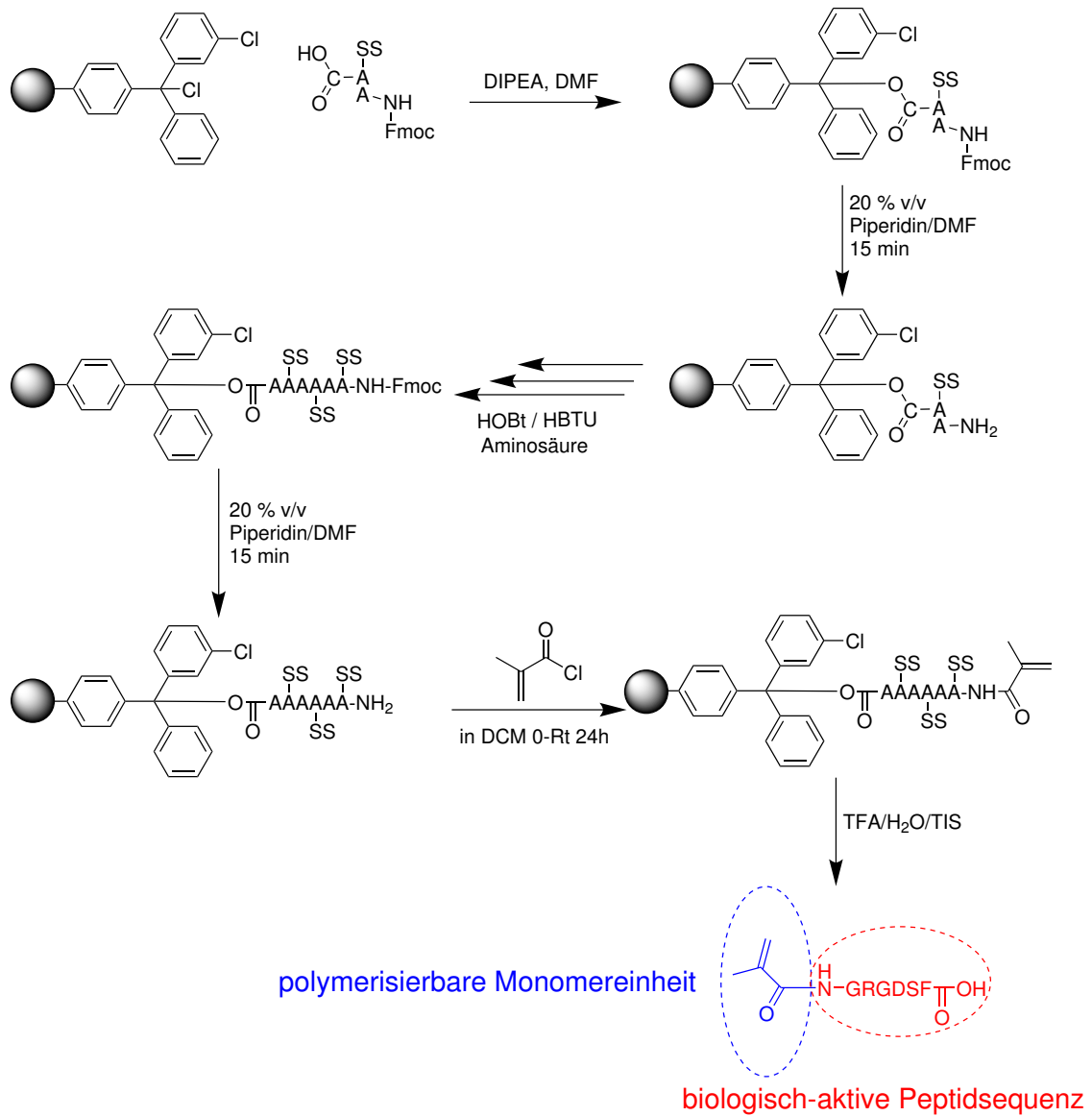
### 5.1.2.3. Herstellung des Peptidmonomers

Nach der Herstellung der gewünschten Peptidsequenz durch Festphasensynthese mittels Fmoc-Strategie wurde der N-Terminus des Peptids entschützt. Danach wurde Methacryloylchlorid angekuppelt. Das Peptid wurde mittels starker Säure (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 95:2,5:2,5) vom Harz abgespalten. Das erhaltene Peptid ist bifunktionell (biologisch-aktive Peptidsequenz und polymerisierbare Monomereinheit), wie auf Schema 5.2 zu sehen ist.

Dieses Peptidmonomer kann mit anderen Monomeren im gewünschten Verhältnis polymerisiert werden. Somit kann in einer Polymerkette die gewünschte Anzahl von Peptidmolekülen eingebaut werden. Diese Strategie erlaubt den Einbau von Peptiden ins Hydrogel mittels freier radikalischer Polymerisation wie auch mittels kontrollierter radikalischer Polymerisation.



5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten



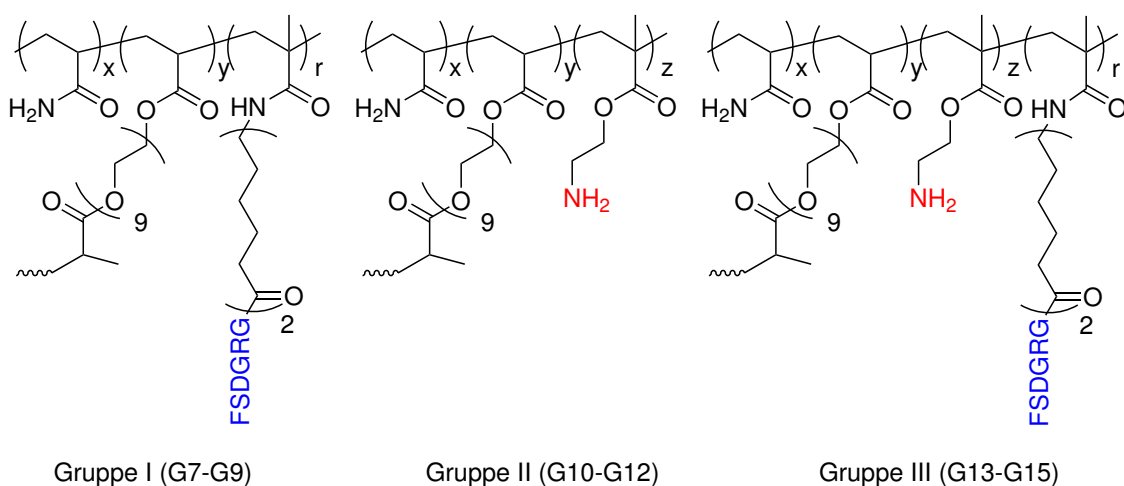
Schema 5.2: Allgemeine Herstellung eines Peptidmonomers PM.

## 5. Biohybridhydrogel-Zelleperimente

Der Fokus der nachfolgenden Arbeiten lag auf der Synthese der unterschiedlich funktionalisierten Hydrogele.

### 5.1.2.4. Hydrogelsynthese und Charakterisierung

Alle Biohybridhydrogele wurden mittels freier radikalischer Polymerisation in entgaster Wasserlösung bei Raumtemperatur für 12 h unter Verwendung des APS/TEMED-Systems als Initiator hergestellt. Die Zusammensetzung der hergestellten Hydrogele wird in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Alle hergestellten Hydrogele **G7–G15** waren transparent. Die chemische Struktur der hergestellten Hydrogele lässt sich in drei Gruppen einteilen: Gruppe I (**G7–G9**), Gruppe II (**G10–G12**), und Gruppe III (**G13–G15**), (Schema 5.3).



Schema 5.3: Darstellung der drei Biohybridhydrogelgruppen.

Um die mechanischen Eigenschaften der Gele zu analysieren, wurden alle hergestellten Hydrogele (**G7–G15**) rheologisch untersucht.

Bei allen Gelen übersteigt das Speichermodul  $G'_p$  das Verlustmodul  $G''_p$  und ist v. a. unabhängig von der Frequenz (Abbildung .13 (b)). Des Weiteren wurde eine starke Abhängigkeit der Gelfestigkeit von der Vernetzerkonzentration beobachtet, wie aus den Werten von  $G'_p$  abzulesen ist. Dies belegt, dass die untersuchten Gele chemisch vernetzt sind. Sowohl die Kurvenprofile als auch die gemessenen Werte korrelieren mit ähnlichen Gelen,

### 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

die auf Acrylamid und flexiblem Bisacrylatvernetzer mit 5–9 EO-Einheiten basieren.<sup>207</sup>

Tabelle 5.2.: Zusammensetzung und Geleigenschaften der Gele **G7** bis **G15**.

Gel	AA:AEMA:PM <sup>1</sup> : V (mol%) <sup>a</sup>	Q <sup>b</sup>	G' <sup>c</sup> (Pa) <sup>c</sup>
<b>G7</b>	97 : 0 : 1 : 2	22,3±0,6	6500
<b>G8</b>	91 : 0 : 1 : 8	9,9±0,8	8500
<b>G9</b>	83 : 0 : 1 : 16	7,5±0,7	10000
<b>G10</b>	88 : 10 : 0 : 2	20,5±0,7	3200
<b>G11</b>	82 : 10 : 0 : 8	10,5±1,1	9000
<b>G12</b>	84 : 10 : 0 : 16	7,4±0,9	13000
<b>G13</b>	87 : 10 : 1 : 2	21,2±1,2	4700
<b>G14</b>	81 : 10 : 1 : 8	9,6±0,9	8500
<b>G15</b>	73 : 10 : 1 : 16	6,8±0,9	13500

**G7** bis **G15** = experimentell eingesetztes Monomerverhältnis der Hydrogele, AA = Acrylamid, AEMA = 2-Aminoethylmethacrylat, PM<sup>1</sup> (Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF), V = Vernetzer (Poly(ethylenglycol)diacrylat, Mn = 575 g/mol), (a) in mol% angesetzte Monomerverhältnisse, Q = Quellungsgrad (b) Quellung bei RT in Phosphatpufferlösung bei pH = 7,2 und (c) G' = Speichermodul in Pa durch Rheologieversuche erhalten.

Tabelle 5.2 fasst alle Ergebnisse der Gele **G7–G15** zusammen. Bei allen drei Hydrogelgruppen hatte die Änderung der Vernetzerkonzentration den größten Einfluss auf das Speichermodul G', wohingegen AEMA oder das Peptid-enthaltende Monomer PM<sup>1</sup> nur einen geringen Einfluss auf die Gelfestigkeit und Quellungseigenschaften der Gele zeigten. Rheologische Messungen zeigten eine Gelfestigkeit mit Speichermodulwerten G' zwischen 3200 und 13500 Pa.

Der Beweis, dass die Gele durch das AEMA positiv geladen sind, liefert eine Zeta-Potential-Analyse bei einem pH-Wert von 7,4. Hierzu wurden lösliche Copolymere mit

## 5. Biohybridhydrogel-Zellexperimente

---

der gleichen Zusammensetzung wie **G8**, **G11** und **G14** hergestellt. Der Vernetzer wurde jedoch durch Acrylamid ersetzt. Die gewonnenen Werte lagen für **G8** bei  $+4 \pm 2$  mV, für **G11** bei  $+27,2 \pm 2,1$  mV und für **G14** bei  $+30 \pm 2$  mV, was zeigt, dass nur Polymere mit AEMA kationisch geladen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen auf Hydrogelen, die spezifische und nicht spezifische Zelladhäsionsmotive sowie deren Kombination trugen, untersucht. Die Hydrogelgruppen wurden unter folgenden Überlegungen zusammengestellt:

- i Die erste Hydrogelgruppe war neutral und mit 1 mol% GRGDSF-Peptid als spezifisches, Integrin-abhängiges Zelladhäsionsmotiv modifiziert (**G7–G9**). Die verwendete RGD-Konzentration lag nach einer Schätzung weit unterhalb des Grenzwertes von  $5,3 \text{ pmol/cm}^2$ .<sup>239</sup> Daher dienten diese Gele als Negativkontrolle.
- ii In der zweiten Gelgruppe (**G10–G12**) wurden 10 mol% AEMA eingebaut, die bei einem pH-Wert von 7,4 eine partielle kationische Ladung aufwiesen, um die Zelladhäsion mittels elektrostatischer Interaktion herbeizuführen.<sup>211,212</sup>
- iii Die dritte Gelgruppe (**G13–G15**) enthielt beide zelladhäsiven Motive. Das Polymerisationsgemisch enthielt 1 mol% GRGDSF und 10 mol% AEMA, um die Auswirkung des GRGDSF-Peptids in Verbindung mit einer kationischen Hydrogeloberfläche zu untersuchen.
- iv Erst kürzlich wurde berichtet, dass die Wachstumsrate von NSZ auf Hydrogelen, die eine ähnliche Festigkeit haben wie Gehirngewebe (E-modulus  $\sim 3,5$  kPa  $\Rightarrow G' \sim 1,2$  kPa, mit  $E = 3 G'$ ),<sup>45</sup> optimal ist. Trotzdem zeigen andere Studien, dass NSZ auch gut auf Substraten mit einem höheren  $G'$ -Wert von 10 bis 250 kPa adhären und proliferieren können.<sup>211</sup> Nur sehr weiche Oberflächen mit einem  $G'$ -Wert von  $< 100$  Pa unterstützen die Adhäsion und Migration von NSZ nicht.<sup>75</sup> Daher

### 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

betrug die Vernetzerkonzentration für jede Gelgruppe 2, 8 sowie 16 mol%, um die Gelfestigkeit zu variieren.

Alle Hydrogele wurden mittels freier radikalischer Polymerisation und *in-situ*-Vernetzung synthetisiert. Die Analysen zur Gelfestigkeit durch rheologische Messungen zeigten typische  $G'$ -Werte zwischen 3000 und 15000 Pa.

#### 5.1.2.5. Kultivierung Maus-embryonaler neuraler Stammzellen

Die Stammzelleexperimente wurden von Marvin Jarocki am Lehrstuhl für Zellmorphologie und molekulare Neurobiologie von Prof. Faissner an der Universität Bochum durchgeführt. Die hier angewandte Stammzellkultivierung wird in Abbildung 5.3 dargestellt.

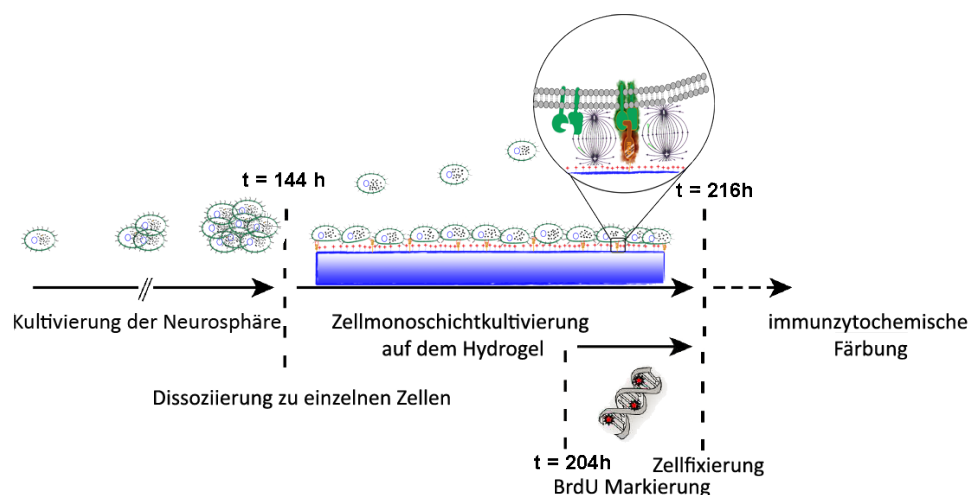


Abbildung 5.3.: Schematische Darstellung der Kultivierung von Maus-embryonalen neuralen Stammzellen.

Nach Abtrennung des Neocortex und der Trennung der Zellen in einzelne Zellsuspensionen wurden embryonale neurale Stammzellen unter dem Einfluss von Mitogenen zu Neurosphären kultiviert, um die Menge der Stammzellen zu erhöhen. Nach 144 h Kultivierung wurden die Neurosphären in einzelne Zellsuspensionen dissoziiert und für die Kultivierung auf das hergestellte Biohybridhydrogel gesetzt.

### 5.1.2.6. *In-vitro*-Analyse der Adhäsion von Maus-embryonalen neuralen

#### Stammzellen auf Biohybridhydrogel

Embryonale NSZ wurden 72 h *in vitro*<sup>240</sup> auf Biohybridhydrogelen kultiviert. Die Zelladhäsionsexperimente, die an der Biohybridhydrogelgruppe I (**G7** bis **G9**, Zelladhäsionsförderndes Motiv = 1 mol% 6Ahs6AhxGRGDSF) durchgeführt wurden, zeigten nach 72 h keine messbare Zelladhäsion. Des Weiteren tendierten die Zellen dazu, zelluläre Aggregate zu formen und den Kontakt mit der Hydrogeloberfläche zu minimieren (siehe Abbildung 5.4, z. B. **G8**). Wie erwartet, förderte die geringe RGD-Konzentration in den modifizierten Gelen **G7** bis **G9** die Zelladhäsion nicht, weshalb diese Gele als Negativkontrolle dienten (siehe Abbildung 5.4).



Abbildung 5.4.: Die Adhäsion von Maus-embryonalen neuralen Stammzellen auf der Gelgruppe I (**G7** bis **G9**, adhäsionsförderndes Motiv = 1 mol% GRGDSF), 72 h, immunzytochemische Doppelfärbung (Vinculin, Phalloidin). Die Zellen neigten zur Bildung zellulärer Cluster und bildeten keine netzwerkähnliche Struktur. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Im weiteren Verlauf wurden die kationischen Gele **G11** und **G12** untersucht. Diese zeigten bei der immunzytochemischen Doppelfärbung mit Phalloidin und Vinculin, dass die Zellen infolge der Wechselwirkung der Zellen mit der Hydrogeloberfläche homogener verteilt waren und netzwerkähnliche Strukturen bildeten (siehe z. B. Abbildung 5.6 (a) **G11**). Lediglich das weiche Gel **G10** unterstützt die Migration der neuralen Stammzellen kaum. Auch hier tendierten die Zellen zur Bildung von zellulären Aggregaten.

Anschließend wurde die Zelladhäsion von Maus-embryonalen neuralen Stammzellen bei der Gelgruppe III (**G13–G15**, zelladhäsionsförderndes Motiv = kationisch geladene

### 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

---

Aminogruppe des AEMAs und GRGDSF) untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Steigerung der Anzahl der adhärierenden Zellen auf allen untersuchten Gelen der Gelgruppe III im Vergleich zur Gruppe II (Abbildung 5.6 (c)). Um die Zelladhäsion quantitativ erfassen zu können, wurde die durchschnittliche Anzahl der Phalloidin- und Vinculin-positiven Zellen auf einer Geloberfläche von 1,52 mm<sup>2</sup> nach 72 h gezählt. Während sich bei den weicheren Gelen **G10** und **G13** keine größeren Unterschiede in der Zelladhäsion zeigten, wurde eine signifikante Steigerung der Anzahl der adhärierenden Zellen von 65 % bei Gel **G14** mit zwei Zelladhäsionsmotiven (AEMA und RGD und 8 mol% Vernetzeranteil) im Vergleich zu Gel **G11** mit einem zelladhäsionsfördernden Motiv (AEMA und 8 mol% Vernetzeranteil) festgestellt. Es wurde fast eine Verdopplung der Zellanzahl von **G12** zu **G15** beobachtet (siehe Abbildung 5.5). Das Biohybridhydrogel förderte nicht nur die Zelladhäsion, sondern auch die Zellmorphologie und -verteilung auf den Gelsubstraten: Wie in Abbildung 5.6 (a) und (c) zu sehen ist, ist bei **G14** eine beachtlich natürlichere Verteilung des Zellwachstums sichtbar als bei **G11**. Auf der Oberfläche der bioaktiven Hydrogele **G14** und **G15** zeigten die Zellen eine ausgedehnte Form, waren homogener verteilt und bildeten ein netzwerkartiges Muster aus, das die verbesserte Zelladhäsionsbedingungen auf den Gelsubstraten beider Gelgruppen – der mit nicht spezifischem kationischen Zelladhäsionsmotiv sowie mit dem bekannten GRGDSF-basierten Zelladhäsionsliganden – unterstreicht (Abbildung 5.6 (b)). Die Ergebnisse zeigten ebenfalls deutlich, dass auch geringe Mengen des GRGDSF-Peptids in der Lage sind, die Adhäsion von Maus-embryonalen neuralen Stammzellen zu beeinflussen, wenn sie zusammen mit einer kationischen Hydrogelmatrix eingesetzt werden, was zu einem starken Anstieg der adhärerten Zellen von 65 % auf 99 % im Vergleich zu den kationischen Gelen führte (Abbildung 5.5).

## 5. Biohybridhydrogel-Zellexperimente

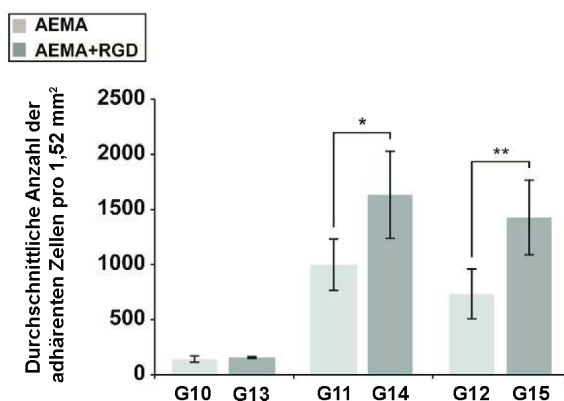


Abbildung 5.5.: Statistische Quantifikation und Vergleich der Anzahl der adhäsierenden neuronalen Stammzellen auf den Gelgruppen II und III. Die Anzahl der Zellen auf **G10** und **G13** (weiche Gele mit 2 mol% Vernetzer) wurde unter 200 Zellen detektiert. Die statistische Auswertung basierte auf fünf unabhängigen Messungen ( $n=5$ ) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler und P-Werten von \*  $P < 0,05$  und \*\*  $P < 0,01$  (Zweistichproben-t-Test mit unabhängigen Stichproben).

Eine Quantifizierung der Anzahl der anhaftenden Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen auf den unterschiedlichen Gelen **G10** – **G15** ist in Abbildung 5.5 aufgeführt. Wie erwartet, unterstützten die Gele **G7** – **G9** mit nur 1 mol% GRGDSF-Peptidmonomer im Polymerisationsgemisch die Zelladhäsion und Migration nicht. Die Gelfestigkeit spielte hier wegen der geringen RGD-Konzentration keine Rolle. Die adhärennten NSZ zeigten vielmehr eine klare Tendenz, den Substratkontakt zu minimieren und größere Aggregate zu bilden (Abbildung 5.4). Auf der anderen Seite zeigte die Gelgruppe II (**G10** – **G12**, zelladhäsionsförderndes Motiv = 10 mol% AEMA) ein ganz anderes Verhalten in den Zelladhäsionsexperimenten. Während nur eine sehr geringe Anzahl an Zellen auf dem weicheren Gel **G10** anhafteten, war auf den härteren Gelen **G11** und **G12** eine stark erhöhte Anzahl von adhärennten Zellen vorzufinden (Abbildung 5.5). Darüber hinaus wiesen die Zellen auf dem weicheren Gel **G10** kaum Migrationsverhalten auf. Bei den Gelen **G11** und **G12** hingegen wiesen die Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen auf der Geloberfläche ein netzwerkähnliches Muster auf. Obwohl die Gelfestigkeit von **G10** ausreichend sein sollte, um die Zelladhäsion zu fördern, wurde in der Literatur darauf hingewiesen,



### 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

---

dass stark gequollene Hydrogele bei geringer Festigkeit fehlerhafte Geloberflächen aufweisen können. Auf solchen unebenen Oberflächen ist die Migration der Zellen deutlich erschwert, was wiederum die Auswertung derart weicher Gele schwieriger macht.<sup>73</sup> Wurden beide, spezifische und nicht spezifische Adhäsionsmotive im Hydrogel (**G13–G15**) kombiniert, wurde ein ähnliches Verhalten auf dem weicheren Gel **G13** beobachtet, was aber keine Verbesserung bei der Zelladhäsion ergab. Außerdem stellte sich heraus, dass das Gel **G14** nach 72 h eine signifikant höhere Anzahl von adhärenierten Zellen auf der Geloberfläche aufwies als das kationische Referenzgel **G11**. Eine mögliche Erklärung für die starke Zelladhäsion auf der Oberfläche der Gele **G14** und **G15** – die zwei adhäsionsfördernde Motive (AEMA und RGD) enthalten – könnte sein, dass die Zelladhäsion in einem frühen Stadium durch nicht spezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der kationischen Geloberfläche und der negativ geladenen PZM der Maus-embryonalen neuralen Stammzellen initiiert wurde. Die elektrostatischen Wechselwirkungen machen die geringe Konzentration von RGD wirksam. Dieser Effekt ist nicht bei der Gelgruppe I vorhanden. Die geringe RGD-Konzentration kann die Zelladhäsion nicht fördern. Wegen der Größe der PZM können die elektrostatischen Wechselwirkungen der kationischen Geloberfläche schon einsetzen, wenn die Zellen noch beträchtlich weit von der adhäsiven Oberfläche entfernt sind, während die Integrin-vermittelte Fokaladhäsion erst erst auf einer Distanz von 20 – 50 nm aktiv ist.<sup>241,242</sup> Diese Untersuchungsergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Wang *et al.*, dass kationische Oberflächen ein exzellentes Material sind, um die Adhäsion der NSZ zu fördern, und dass die embryonalen NSZ mit einer negativ geladenen PZM umgeben sind. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Zelladhäsion in einer zweistufigen Zellmaterial-Wechselwirkung abläuft, wie es auch schon bei anderen Zelltypen wie Chondrozyten – aber noch nie für neurale Stammzellen – beschrieben worden ist.<sup>216,243</sup> Obwohl die GRGDSF-Peptid-Konzentration weit unterhalb des Grenzwertes (RGD-Konzentration = 5,3 pmol/cm<sup>2</sup>)<sup>239</sup> liegt, wie z. B. beim kationischen **G14**, führte dies zu einer signifikant erhöhten Anzahl

## 5. Biohybridhydrogel-Zellexperimente

---

der adhärerten Zellen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die RGD-Integrin-Wechselwirkungen zu einem späteren Zeitpunkt während des Zelladhäsionsprozesses der neuralen Stammzellen mit der Hydrogeloberfläche einsetzen, nachdem schon der anfängliche Kontakt mittels elektrostatischer Wechselwirkungen hergestellt wurde.

## 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten

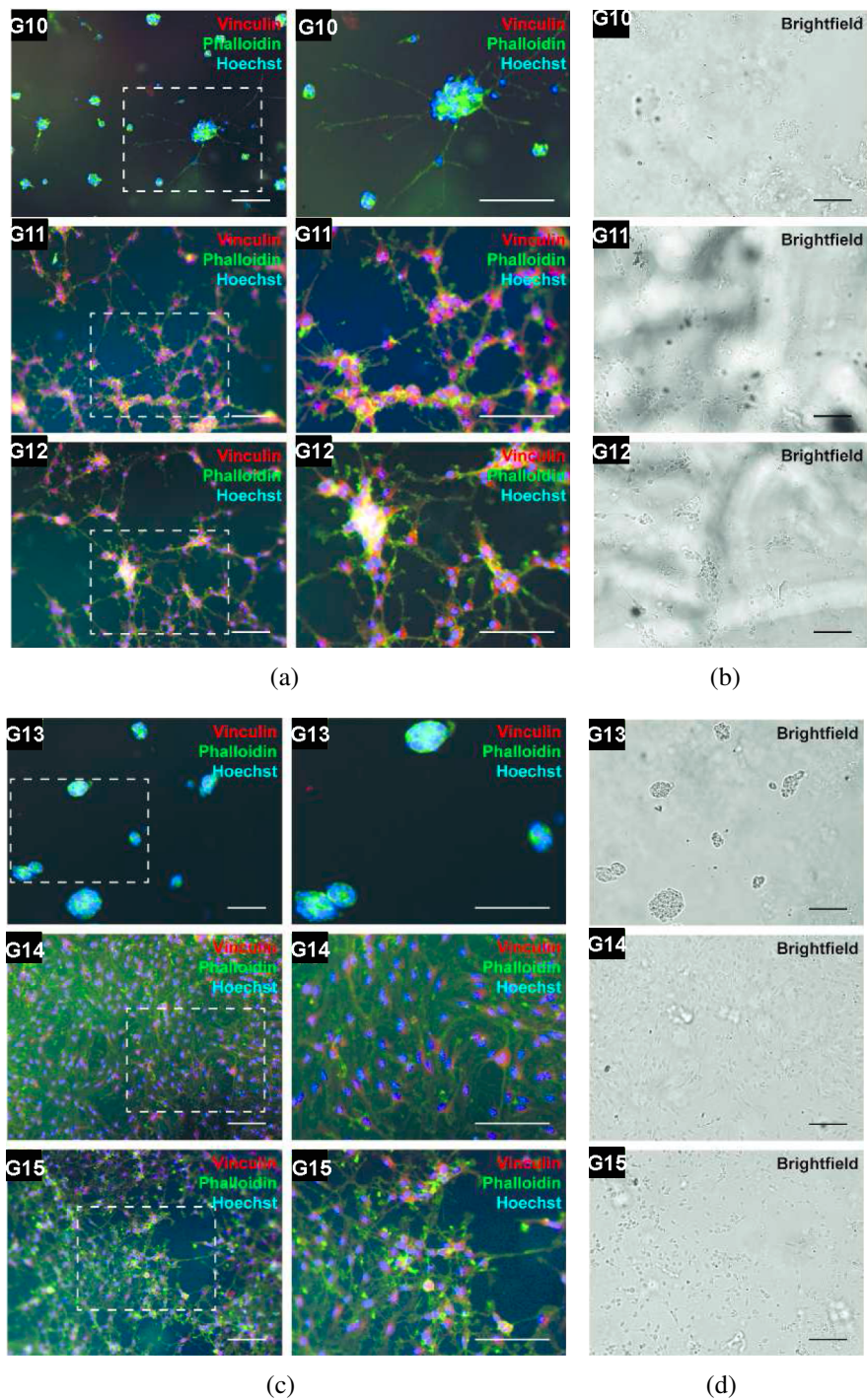
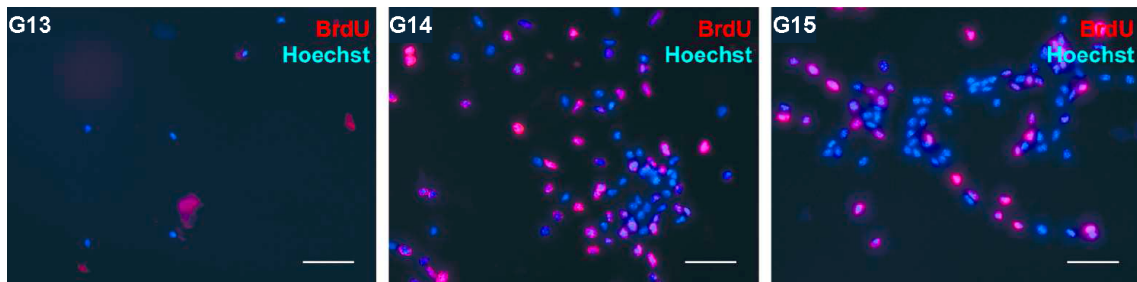


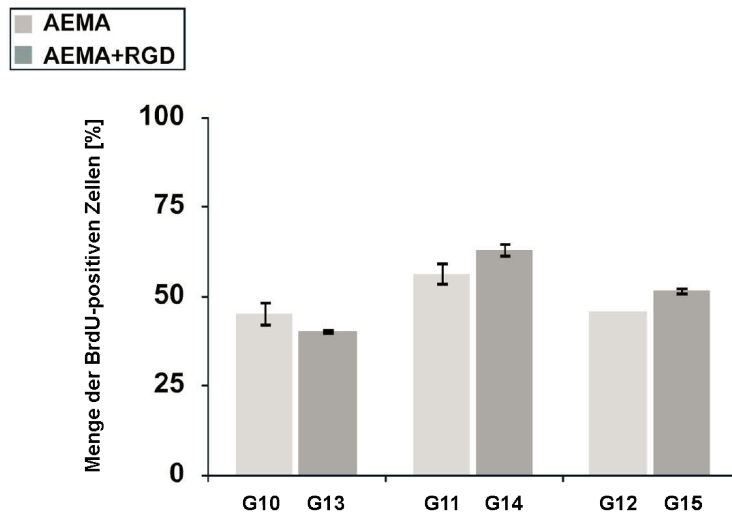
Abbildung 5.6.: Bestimmung der Adhäsion der Maus-embryonalen neuralen Stammzellen auf künstlichem Hydrogelsubstrat mittels immunzytochemischer Doppelfärbung ((a) und (c)) und Hellfeldmikroskopie ((b) und (d)) nach 72 h *in vitro*. In (a) und (c) wurden Antikörper gegen Phalloidin und Vinculin für das Sichtbarmachen des Zytoskeletts und der zellulären Fokaladhäsion der adhärenierten Zellen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.2.7. *In-vitro*-Analyse des Proliferationsverhaltens von embryonalen NSZ auf Biohybridhydrogel

Die Proliferation der embryonalen NSZ wurde nur auf der kationischen Gelgruppe II (**G10–G12**, zelladhäsionsförderndes Motiv = AEMA) und der Gelgruppe III (**G13–G15**, zwei zelladhäsionsfördernde Motive = AEMA und RGD) untersucht, da die Gele der Gruppe I (**G7–G9**, zelladhäsionsförderndes Motiv = RGD) die Zelladhäsion und Migration nicht wirkungsvoll förderten. Das Proliferationsverhalten der aufgetragenen Zellen wurde durch den Einbau von BrdU nach 12 h mittels BrdU-Puls analysiert und ergab, dass während der Kultivierung auf dem Hydrogelsubstrat mindestens eine Zellteilung geschah. Neben dem zusätzlichen Wachstumsfaktor FGF2 und seinem Co-Faktor Heparin wurde kein weiteres Medium während der gesamten Kultivierungszeit hinzugegeben. Die immunzytochemische Färbung mittels BrdU ließ erkennen, dass die Hydrogele **G10** bis **G15**, die in dieser Studie verwendet wurden, einen ähnlichen Effekt auf die Zellproliferation von embryonalen NSZ hatten, und dies nahezu unabhängig von der Gelfestigkeit und den eingebauten zelladhäsionsfördernden Motiven, die auf der Geloberfläche vorhanden waren (Abbildung 5.7). Die Gele **G14** und **G15** (mit den zwei adhäsionsfördernden Motiven AEMA + RGD) unterstützten ebenso wie ihre kationischen Kontrollgele **G11** und **G12** (mit einem adhäsionsfördernden Motiv = AEMA) die Zellproliferation stark. Nur die weicheren Gele führten zu einer langsameren Zellteilung der NSZ. Die Zellen aggregierten in Clustern, wie es zuvor bereits in den Zelladhäsionsexperimenten zu sehen war.



(a)



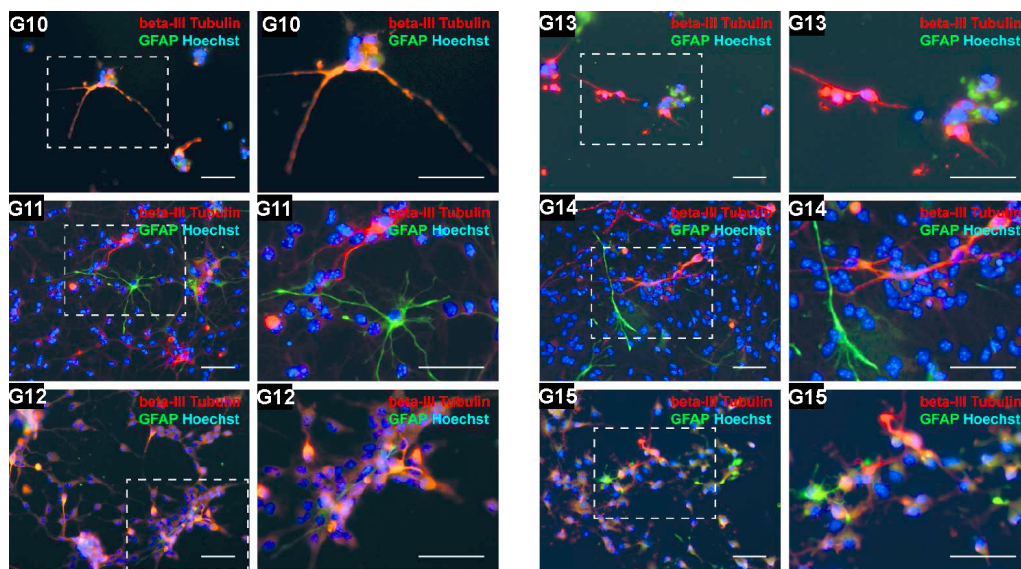
(b)

Abbildung 5.7.: (a) Mikroskopische Aufnahmen von embryonalen neuralen Stammzellen, die mit Antikörpern gegen BrdU behandelt wurden, zeigten während der DNA-Replikation das eingebaute Thymidinanalogon. Der Maßstab Balken entspricht  $50 \mu\text{m}$ . (b) Statistische Quantifizierung und Vergleich. Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen ( $n=3$ ) mit der Ausnahme von Hydrogel **G12** ( $n=2$ ) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler. (Zweistichproben-t-Test mit unabhängigen Stichproben).

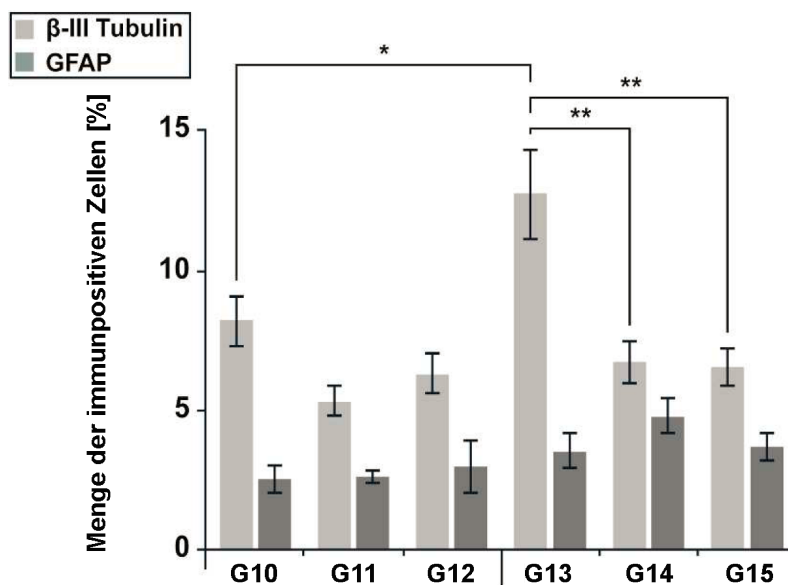
### 5.1.2.8. *In-vitro*-Analyse des Differenzierungsverhaltens von embryonalen NSZ auf Biohybridhydrogel

Um festzustellen, ob die Kombination einer kationischen Oberfläche mit dem RGD-Motiv einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der embryonalen NSZ hat, wurden mittels Doppelfärbung die drei Hauptzellarten des zentralen Nervensystems untersucht. Hierbei wurden Standardzellmarker für Neuronen (III  $\beta$ -Tubulin), Astrozyten (GFAP) und Oligodendrozyten (O4) eingesetzt. Restliche Vorläuferzellen wurden mit Nestin sichtbar gemacht. Während die Mehrheit der Zellen nach drei Tagen (72 h) noch in einem undifferenzierten Zustand blieb, was durch den Anteil der Nestin-positiven Zellen von ca. 75 % deutlich wurde, konnten signifikante Unterschiede im Bezug auf die Verteilung der differenzierten Zellen in Abhängigkeit der Gelfestigkeit sowie bei der An- und Abwesenheit des GRGDSF-Motivs der kationischen Gele beobachtet werden.

## 5.1. Synergistische Wirkung positiver Ladung und RGD in Gelen auf NSZ-Verhalten



(a)

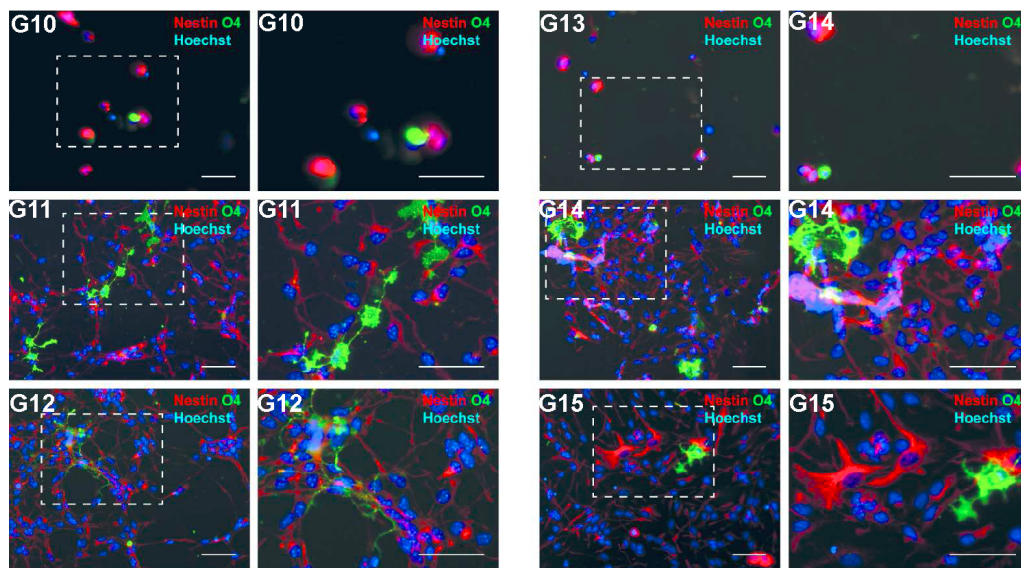


(b)

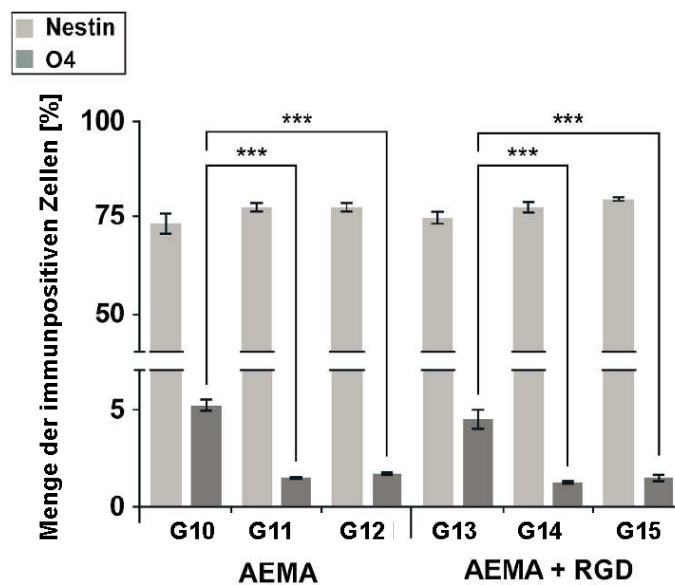
Abbildung 5.8.: Die auf dem Hydrogel kultivierten embryonalen neuronalen Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Differenzierung mittels immunzytochemischer Doppelfärbung nach 72 h *in vitro* bestimmt. (a) Antikörper gegen III- $\beta$ -Tubulin und GFAP wurden für die Mengenbestimmung von Neuronen und Astrozyten unter den kultivierten Zellen verwendet. (b) Statistische Quantifikation und Vergleich. Der Maßstabballen entspricht 50  $\mu$ m. Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen (n=3) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler und P-Werte von \* P < 0,05 und \*\* P < 0,01 (*two-way analysis of variance with Scheffé procedure for post-hoc test*).



## 5. Biohybridhydrogel-Zellexperimente



(a)



(b)

Abbildung 5.9.: Die auf Hydrogel kultivierten embryonalen neuralen Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Differenzierung mithilfe von immunzytochemischer Doppelfärbung nach 72 h *in vitro* bestimmt. (a) Antikörper gegen O4 und Nestin wurden zur Mengenbestimmung bei den Oligodendrozyten und Vorläuferzellen unter den kultivierten Zellen verwendet. (b) Statistische Quantifizierung. Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen ( $n=3$ ) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler und P-Werte von \*\*\*  $P < 0,001$  (*two-way analysis of variance with Scheffé procedure for post-hoc test*).



### 5.1.2.9. Diskussion der Proliferation und Differenzierung embryonaler NSZ

Die Proliferationsexperimente erbrachten keine auffallenden Unterschiede beim Proliferationsverhalten der embryonalen NSZ nach 12 h auf den Gelen mit unterschiedlicher Festigkeit, was mit vorherigen Ergebnissen übereinstimmt.<sup>211</sup>

Im Falle der Zelldifferenzierung zeigten die Ergebnisse eine klare Tendenz beim Vergleich mit den unterschiedlichen Gelfestigkeiten und der Anwesenheit kationischer Motive mit oder ohne GRGDSF-basierten Peptidmotiven. Es ist bekannt, dass die Matrixelastizität die neurale Stammzellmorphologie und die Differenzierung in bestimmte Zelllinien beeinflusst.<sup>75,211</sup> Die Gele wiesen zwei Tendenzen auf: (1) Weichere Gele mit  $G' = 3\text{--}4$  kPa förderten die Differenzierung in Neuronen stärker als Gele mit einer Festigkeit von 10–13 kPa. Außerdem war dieser Effekt bei den Gelen **G14** und **G15**, die beide Adhäsionsmotive enthielten, stärker ausgeprägt, als die rein kationischen Gele **G11** und **G12**. Auf der anderen Seite erhöhte sich die Differenzierung in Astrozyten mit höherer Gelfestigkeit. Eine größere Anzahl GFAP-positiver Zellen wurde auf den kationischen Gelen **G14** und **G15** beobachtet, die ebenfalls das GRGDSF-Peptid enthielten (Abbildung 5.8). Während die erhöhte neurale Differenzierungstendenz auf weicheren Matrixoberflächen mit früheren Studien übereinstimmt,<sup>45,244,245</sup> zeigte die Arbeit von Saha und Schaffer, dass eine solche klare Tendenz der NSZ-Differenzierung als Funktion der Matrixfestigkeit bei RGD-modifizierten Substraten nicht beobachtet werden konnte. Stattdessen berichteten sie, dass keine wesentlichen Unterschiede der III- $\beta$ -Tubulin-positiven Zellen und GFAP-positiven Zellen (Astrozytenmarker) bei den unterschiedlichen Moduli beobachtet werden konnten.<sup>75</sup> Für rein kationische PLL- oder MTAC-gepfropfte Gele war die Tendenz für eine höhere Neuronendifferenzierung wenig ausgeprägt. Neuere Ergebnisse zeigten eine stärkere Tendenz bei Neuronen auf festeren Gelen mit 10 kPa, während sich auf weicheren Gelen mit 1 kPa Astrozyten bevorzugt ausbildeten.<sup>211</sup> Ähnlich wie bei den Zelladhäsionsexperimenten zeigten die Ergebnisse deutlich, dass katio-

## 5. Biohybridhydrogel-Zelleperimente

---

nische Oberflächen sehr effektiv sind, um Zelldifferenzierungen in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu fördern. Das Vorhandensein von zusätzlichem GRGDSF-Peptid in den Gelen **G13** bis **G15** führte – im Vergleich zu den kationischen Referenzgelen **G10** bis **G12** – zu einer erheblichen Steigerung der Neuronen zwischen 3,5 bis 55 %. Die Erhöhung der Anzahl der Astrozyten war sogar mit 24 bis 81 % noch größer. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von externen Stimuli durch Komponenten der extrazellulären Matrix, um die Differenzierung der neuralen Stammzellen zu lenken. Des Weiteren stimmen die Ergebnisse mit vorherigen Veröffentlichungen darin überein, dass die Integrin- $\beta$ 1-Fibronectin-Oberflächenwechselwirkungen und die folgende Aktivierung des Fak/Mek/Erk-Signalwegs essentiell sind, um die Differenzierung der NSZ in Neuronen und Astrozyten zu steigern.<sup>246,247</sup>

Zusammenfassend ist zu sagen, dass hier erstmals gezeigt wurde, dass eine Kombination eines kationischen zelladhäsionsfördernden Motivs mit dem GRGDSF-Peptid in Hydrogelen die Adhäsion und Differenzierung von NSZ steigert, indem die zusammenwirkenden Prinzipien genutzt werden. Die Erklärung dafür besteht darin, dass der Zell-adhäsionsprozess durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der kationischen Oberfläche und der negativ geladenen PZM, die die embryonale Stammzelle umhüllen, gestartet wird. Derartig weitreichende Wechselwirkungen sind höchstwahrscheinlich für die initialen Zelloberflächenkontakte verantwortlich, und dies, noch bevor die Integrinrezeptor-Wechselwirkungen stattfinden können und so die fokale Adhäsion eingeleitet werden kann. Werden das kationische Motiv und das GRGDSF-Peptid kombiniert, verdoppelt sich die Zelladhäsion beinahe. Des Weiteren weisen die Differenzierungsergebnisse darauf hin, dass sich die Anzahl der  $\beta$ -III-Tubulin- und GFAP-positiven Zellen erhöht, wenn beide Motive in einem Gel waren. Die Ergebnisse können Einblick in die Entwicklung von Kultivierungssubstraten gewähren, um die Effizienz der Stammzelltherapie in Zukunft zu erhöhen.

### 5.1.3. Zusammenfassung

Es wurde das Verhalten von embryonalen neuronalen Stammzellen (NSZ) auf verschiedenen Biohybridhydrogelen beobachtet. Dabei wurde nicht nur der Einfluss der Gelfestigkeit auf das neurale Stammzellverhalten betrachtet, sondern auch der Einfluss der kationischen Ladung, der 6Ahx6AhxGRGDSF-Peptidsequenz und deren Kombination. Dafür wurden drei verschiedene Biohybridhydrogelgruppen mittels freier radikalischer Polymerisation durch *in-situ*-Vernetzungsstrategie hergestellt. Jede Gruppe enthielt drei verschiedene Gele mit verschiedenen Festigkeiten (weich = 2 mol% Vernetzer, mittelhart = 8 mol% Vernetzer, hart = 16 mol% Vernetzer). Die erste Gelgruppe **G7** bis **G9** war mit 1 mol% 6Ahx6AhxGRGDSF-Peptidsequenz als Zelladhäsionsmotiv ausgerüstet. Die zweite Gruppe **G10** bis **G12** enthielt 10 mol% AEMA als Zelladhäsionsfaktor. Die dritte Gruppe **G13** bis **G15** hatte eine Kombination von beiden Zelladhäsionsmotiven. Durch die Variation der Vernetzerkonzentration mit 2, 8 und 16 mol% wurde die Hydrogelfestigkeit in einem Bereich von 3 bis 13 kPa variiert.

Die Ergebnisse verdeutlichen die effektive und entscheidende Rolle der kationischen Ladung sowie der Gelfestigkeit der Biohybridhydrogele bei der Zelladhäsion. Die Gele **G13** bis **G15** waren mit einer Kombination der positiv geladenen Aminogruppe von AEMA (10 mol%) und der zelladhäsionsfördernden Peptidsequenz RGD (1 mol%) ausgerüstet. Diese Kombination erzielte eine Erhöhung der Anzahl der adhäsierten neuronalen Stammzellen von 64,5 auf 99 % im Vergleich zu den Gelen **G10** bis **G12**, die nur mit 10 mol% AEMA ausgerüstet worden sind. Zur Negativkontrolle wurden die Zellexperimente mit den Gelen **G7** bis **G9** mit 1 mol% der Peptidsequenz RGD als Zelladhäsionsmotiv durchgeführt. Wie erwartet, reichte diese geringe Konzentration an Peptiden nicht für eine erfolgreiche Zelladhäsion. Dieser positive Effekt der AEMA-RGD-Kombination wurde nicht nur bei der Zelladhäsion beobachtet, sondern auch bei der Zelldifferenzierung. So wurde z. B. eine 54%ige Erhöhung der Anzahl der Neuronen, die sich von den neuronalen

## 5. Biohybridhydrogel-Zelleperimente

---

Stammzellen differenzierten, bei Gel **G13** mit der AEMA-RGD-Kombination gegenüber Gel **G10** festgestellt.

Der Zelladhäsionsprozess kann als zweistufiger Prozess beschrieben werden, bei dem in der ersten Stufe die Zelladhäsion durch elektrostatische Wechselwirkungen der Geloberfläche mit der Zellmembran initiiert wird. Darauf folgt dann in der nächsten Stufe die Interaktion des GRGDSF-Peptids mit Zelloberflächenrezeptoren, darunter den  $\alpha_V\beta_3$ - und  $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Adhäsion der NSZ durch elektrostatische Interaktionen zwischen der kationischen Geloberfläche und der negativ geladenen PZM eingeleitet wird. Solche weiträumigen Interaktionen sind höchstwahrscheinlich verantwortlich für die ersten Zell-Oberflächen-Kontakte (noch bevor die Integrin-Rezeptor-Interaktionen stattfinden können). Die im Folgenden gebildeten Fokaladhäsionsflecken deuten auf eine Zell-Rezeptoroberflächen-Interaktion bei einer ziemlich kurzen Distanz von 25–50 nm hin. Eine Erklärung für die Ergebnisse könnte sein, dass die elektrostatischen Interaktionen zwischen der kationischen Oberfläche und der perizellulären Matrix dafür verantwortlich sind, Zellen in unmittelbare Nähe zu bringen, um die Integrin-Rezeptor-Interaktionen zu erleichtern. Die Ergebnisse könnten erklären, warum eine ziemlich geringe RGD-Konzentration wie in der Hydrogelgruppe III einen starken Effekt speziell auf die Adhäsion von NSZ im Vergleich zu den Referenzgelen der Gelgruppen I und II zeigt.

## **Teil IV.**

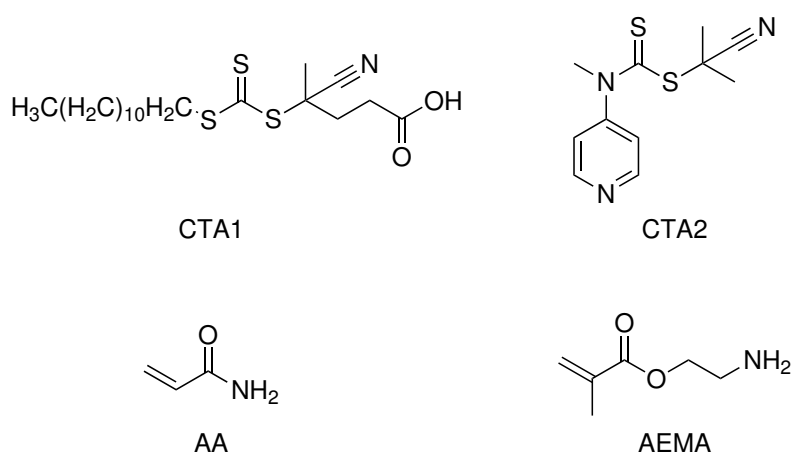
# **Zusammenfassung**



## 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Hydrogelen als Substrate für die Kultivierung von Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen.

In Kapitel 3 wurden hierzu Untersuchungen zur RAFT-Polymerisation von wasserlöslichen Monomeren, wie Acrylamid (AA) und Aminoethylmethacrylat (AEMA), mithilfe des APS/TEMED-Systems bei Raumtemperatur und 70 °C durchgeführt. Als RAFT-Reagenzien wurden ein Trithiocarbonatderivat (CTA1) und ein protonierbarer Dithioester (CTA2) eingesetzt. Die kinetischen Untersuchungen zeigten, dass beide Monomere sowohl bei 20 °C als auch bei 70 °C mit guter Kontrolle über die Molmasse und Dispersität ( $\bar{M}_w = 1,1-1,3$ ) in Wasser bzw. in einem wässrigen Puffersystem polymerisiert werden konnten.



Schema 6.1: Eingesetzte Monomere und RAFT-Reagenzien, die in der Polymerisation in Wasser bei 20 °C bzw. 70 °C mit APS/TEMED untersucht wurden.

## 6. Zusammenfassung

In Kapitel 4 der Arbeit wurde die Eignung der  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von vernetzten Polymeren untersucht. Das Ziel des Kapitels war es, nicht nur eine qualitative Analyse der Polymerzusammensetzung mithilfe dieser NMR-Methode vorzunehmen, sondern auch die Möglichkeiten einer quantitativen Bestimmung der Polymerzusammensetzung zu untersuchen. Hierzu wurden sechs Hydrogele mit einem spaltbaren Disulfidvernetzer in unterschiedlichen Konzentrationen von 1 – 12 mol% mit Acrylamid (AA), Aminoethylmethacrylamid (AEMA) und einem Peptid-funktionalisierten Monomer frei radikalisch copolymerisiert. Anschließend wurden die so erhaltenen Polymere in  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  gequollen und mittels  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht. Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit den  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen der löslichen Copolymere nach Spaltung der Disulfidgruppe verglichen. Besonderer Fokus der Untersuchungen lag auf der Quantifizierung des Peptid-funktionalisierten Monomers.

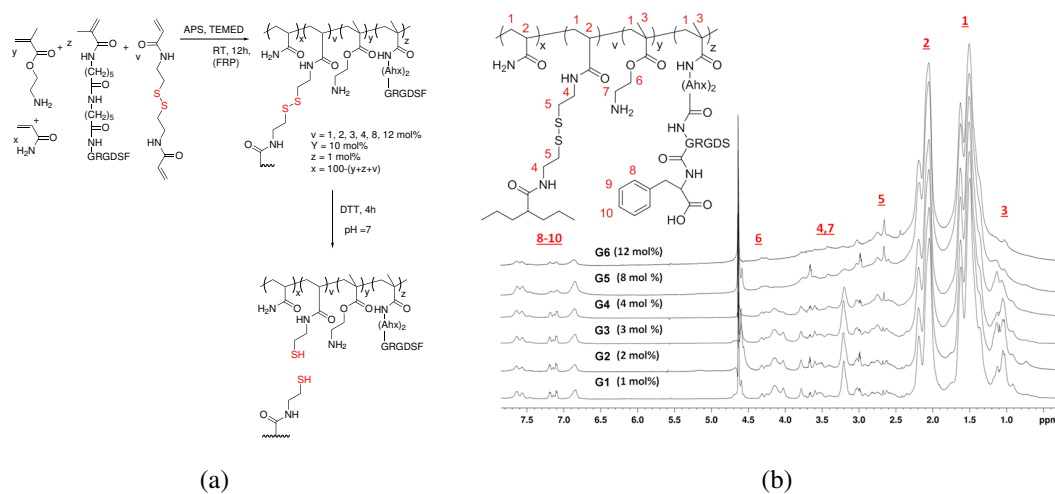


Abbildung 6.1.: (a) Syntheschema der Polymernetzwerke mit spaltbarem Disulfidvernetzer und (b)  $^1\text{H}$  HR MAS NMR Spektren der Polymere **G1** – **G6** gequollen in  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ .

Die Ergebnisse zeigen, dass die  $^1\text{H}$ -HR-MAS-NMR-Methode hervorragend geeignet ist, alle vier eingesetzten Monomere in den gequollenen Gelen eindeutig spektroskopisch nachzuweisen. Darüber hinaus zeigt die quantitative Analyse des Peptidanteils beim Vergleich der  $^1\text{H}$ -HR-MAS-Spektren mit den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der löslichen Copolymere,

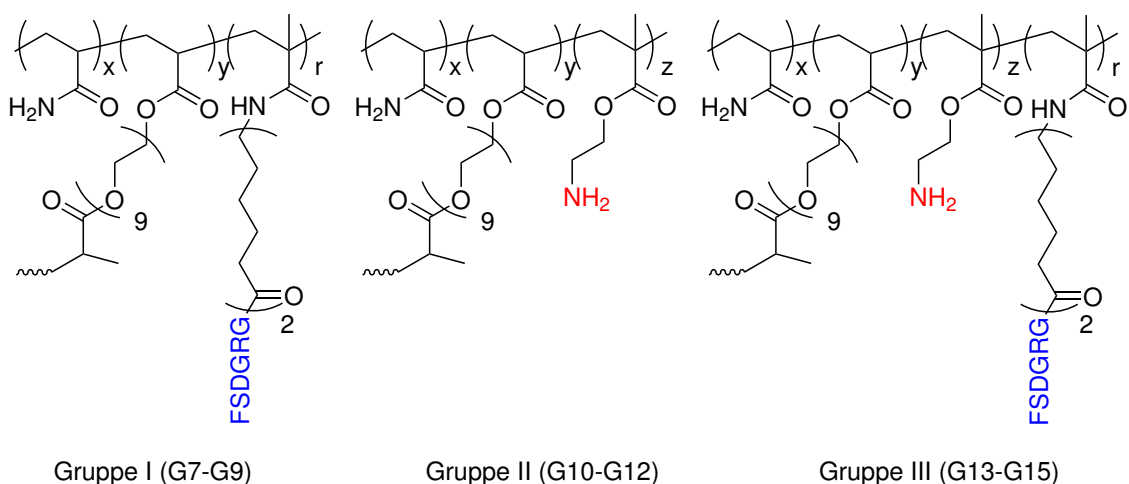


---

dass dieser Anteil von 1 mol% nur für die schwach vernetzten Polymere (1 – 2 mol% Vernetzer) zuverlässig bestimmt werden kann. Mit stärker werdenden Vernetzung nimmt jedoch das Verhältnis der Intensität der aromatischen Protonen im Vergleich zu den aliphatischen Protonen immer weiter ab, vermutlich aufgrund der zunehmend eingeschränkten Beweglichkeit der sterisch anspruchsvollen Peptidseitenkette.

Das Ziel des 5. Kapitels dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss von kationischer Ladung und RGD-Peptiden auf das Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten Maus-embryonaler neuraler Stammzellen zu untersuchen. Dies erschien von besonderem Interesse, da fast alle Materialien, die bis heute in diesem Zusammenhang untersucht wurden, ausschließlich mit RGD-Peptiden modifiziert sind, um Zelladhäsion zu vermitteln. Lediglich eine Arbeitsgruppe hatte sich auch mit einfach kationischen Polymeren auf der Basis von Poly(L-Lysin) als Substrat für neurale Stammzellen befasst. Aus diesem Grund wurden drei Hydrogeltypen mithilfe der freien radikalischen Polymerisation hergestellt. Die erste Gruppe enthielt das RGD-Peptid in einer niedrigen Konzentration von 1 mol%, die für Integrin-vermittelte Adhäsion nicht ausreichend ist und als Negativkontrolle diente. Die zweite Gruppe enthielt 10 mol% Aminoethylmethacrylat (AEMA) als funktionelles Monomer und die dritte Gruppe enthielt die Kombination aus 1 mol% RGD-Peptid und 10 mol% AEMA. Jede Gruppe dieser Hydrogele wurde mit je drei Vernetzerkonzentrationen hergestellt (2, 8 und 16 mol%). Nach Charakterisierung der Hydrogele mittels Rheologie und Quellexperimenten wurden diese Gele als zwei-dimensionale Substrate eingesetzt, um das Verhalten Maus-embryonaler neuraler Stammzellen in Abhängigkeit der chemischen Funktionalisierung zu untersuchen.

## 6. Zusammenfassung



Schema 6.2: Chemische Zusammensetzung der drei Polymernetzwerkegruppen.

Wie zu erwarten war, zeigten die Maus-embryonalen, neuralen Stammzellen keine Adhäsion auf den Gelsubstraten der Gruppe I, da die laterale RGD-Konzentration unterhalb des kritischen Schwellenwertes lag, während die mit 10 mol% AEMA-funktionalisierten Gele die Adhäsion und Migration der Stammzellen hervorragend unterstützten. Überraschenderweise zeigten die Gele der Gruppe III, die eine Kombination aus RGD-Peptid und AEMA enthielten noch mal eine deutliche Steigerung von 64,5 auf 99 % der Anzahl der adherierten Stammzellen gegenüber den einfach kationischen Gelen der Gruppe II nach 72 Stunden.

Während in den Experimenten der Proliferation dagegen kaum Unterschiede zwischen den Gelen der Gruppe II (AEMA) und der Gruppe III (RGD + AEMA) zu sehen waren, zeigten die Untersuchungen zur Zelldifferenzierung nach 72 Stunden ebenfalls Veränderungen in der Zellpopulation nach 72 h Differenzierung auf. Während die Anzahl der gebildeten Neuronen von 3,5 auf 55 % für die Gele der Gruppe III gegenüber den AEMA-funktionalisierten Gelen zunahm, erhöhte sich die Anzahl der Astrozyten auf den Gelen der Gruppe III von 24 auf 81 %. Im Gegensatz dazu sind kaum Veränderungen bei der Anzahl der Oligodendrozyten festzustellen. Weitere Experimente mit längeren Differenzierungszeiten wären jedoch notwendig, um diesen Trend zu bestätigen. Diese Zunahme der

Zelladhäsion auf Gelsubstrate der Gruppe III gegenüber den AEMA-funktionalisierten Gelen der Gruppe I hängt vermutlich damit zusammen, dass der erste Schritt der Zelladhäsion über nicht-spezifische elektrostatische Wechselwirkungen abläuft, wie dies bereits für Chondrozyten beschrieben wurde. Verantwortlich für diese Interaktion der Zellen mit der kationischen Oberfläche ist die perizelluläre Matrix, die größtenteils aus negativ geladener Hyaluronsäure besteht und mit kationischen Oberflächen schon aus Entfernungen von mehreren hundert Nanometern in Wechselwirkung tritt. Diese ersten elektrostatischen Wechselwirkungen sorgen dafür, dass die Stammzellen bzw. deren Oberflächenintegrine in Reichweite (ca. 20-25 nm) der Oberflächen-gebundene RGD-Peptide gelangen und schließlich spezifische Integrin-Ligand Wechselwirkungen ausbilden können. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht noch einmal die Modellvorstellung.

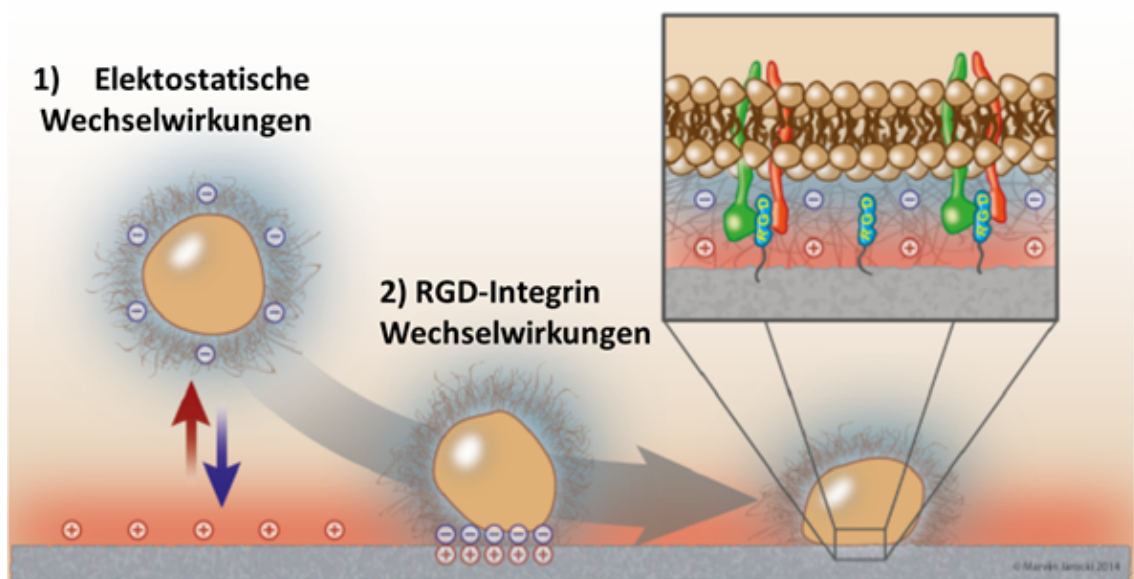


Abbildung 6.2.: Modell der zweistufigen Zelladhäsion Maus-embryonaler neuraler Stammzellen. (1) Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ-geladenen perizellulären Matrix und der kationischen Geloberfläche und (2) Integrin-RGD Wechselwirkungen auf einer Distanz von 20-25 nm.<sup>235</sup>

Diese Ergebnisse können dazu beitragen, bei der Entwicklung neuer Gelsubstrate für die zweidimensionale Kultivierung von Stammzellen den Fokus stärker auf kationische

## 6. Zusammenfassung

---

Oberflächen in Kombination mit bio-aktiven Peptiden zu legen, da dies zu einer deutlichen Reduktion der benötigten Peptidmenge führen kann.

## **Teil V.**

# **Experimenteller Teil**



# 7. Experimenteller Teil

## 7.1. Reagenzien, Lösungsmittel und Analytikgeräte

### Reagenzien und Lösungsmittel

Alle Reaktionen wurden in gut ausgeheizten Apparaturen unter Argonschutzatmosphäre durchgeführt. Argongegenstrom oder Septem wurde bei der Hinzugabe von Substanzen verwendet. Chemikalien und (abs.) Lösungsmittel wurden kommerziell bezogen. Trockene, absolute Lösungsmittel (Dichlormethan, Dimethylformiat, Diethylether, Tetrahydrofuran) wurden in einem Lösungsmittelrockenschranksystem der Firma MBraun des Typs SPS-800 entnommen. Dieser wurde mit Argon als Inertgas, mit aktivierten Aluminiumoxid-Säulen und mit Lösungsmitteln der Firma Fischer Scientific (HPLC Reinheit) betrieben. Trockenes Acetonitril (99,9 %) wurde von der Firma Acros in Septumflaschen, über Molsieb gelagert, bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen ABCR, Acros, Alfa Aesar, Sigma-Aldrich oder TCI bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Alle Lösungsmittel, die für die Polymerisation bzw. die Herstellung der Hydrogele eingesetzt wurden, wurden durch ein „Freeze-pump-and-thaw“-Verfahren entgast. Säulen-chromatographische Aufreinigungen wurden mittels Kieselgel der Firma Baker durchgeführt. Die Porengröße des Gels betrug 40-70  $\mu\text{m}$ . Um Substanzen mit Kieselgur zu filtrieren, wurde das Produkt Celite<sup>®</sup> 521 der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Für die Herstellung von Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten (Kieselgel 60 F254) der

## 7. Experimenteller Teil

---

Firma Merck benutzt. Neben UV-Detektion (254 nm) wurden Ninhydrin-Anisaldehyd- oder Phosphomolybdänsäurelösung zum Anfärben der Reagenzien verwendet. Die säulenchromatographische Reinigung der Rohprodukte erfolgte in Glassäulen bei Normaldruck. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 M der Firma Macherey-Nagel.

### **NMR-Spektroskopie**

Die Spektren der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern DRX 400 und DRX 500 der Firma Bruker sowie mit einem 500 MHz NMR Spektrometer der Firma *Unity INOVA* ermittelt, das mit einer 5 mm Tripleresonance H(C,X) Sonde von Varian Associates ausgestattet ist. 16 Transienten wurden mit 45 kb (data) bei 5500 Hz Spektralbreite, einer Messzeit von 4,096 s, einer Relaxationsverzögerung von 2 s und mit einem 90-Grad-Puls von  $9,5 \mu\text{s}$  summiert. Die Werte wurden mithilfe einer Vorsättigung des Signals (*Presaturation*) gewonnen, um das Wassersignal zu unterdrücken. Die chemische Standardverschiebung der verwendeten Lösungsmittel betrug:  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta\text{H} = 7,26$  ppm,  $\delta\text{C} = 77,0$  ppm;  $\text{D}_2\text{O}$   $\delta\text{H} = 4,67$  ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$ :  $\delta\text{H} = 3,31$  ppm,  $\delta\text{C} = 4,05$  ppm;  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta\text{H} = 2,50$  ppm,  $\delta\text{C} = 39,5$  ppm. Die hier verwendeten Abkürzungen der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren sind wie folgt: (s) Singulett, (d) Dublett, (t) Triplett, (q) Quadruplett, (m) Multiplett und (b) breit.

### **Massenspektrometrie**

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit dem LTY Orbitrap Spektrometer der Firma Thermo Electron Corporation aufgenommen. Mit dem Massenspektrometer der Firma Agilent – Typ LCQ Advantage Max, Serie 1200 – wurden die LC-MS-Analysen durchgeführt.



## **Chromatographien**

### **Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Präp. HPLC)**

Hierfür wurde ein Smartline HPLC-Gerät Firma Knauer verwendet. Als Vorsäule wurde eine Eurosphäre II 300-10 C18 eingesetzt, als Säule eine Eurosphäre II 300-1 C18 (Pumpe Reihe SmartLine 50 ml, Fraktionssammler Foxy R1.12). Die Detektion erfolgte mit einem SmartLine UV Detektor 2600.

### **Gelpermeationschromatographie (GPC)**

Als Messgeräte wurde der Agilent Technologies 1260 Infinity verwendet, als Vorsäule eine 17369 TSKgel HHR-H Guardo 6,0 mm ID × 4,0 cm L, Col. No: HR HT0013 der Firma TOSOH. Als Säule wurde eine 17392 TSKgel GMHHR-M 7,8 mm ID × 30.00 cm L. Col. Säule (No: MHRM90255042) der Firma TOSOH verwendet. Die Messungen wurden in Wasser (0,1 % w/v Essigsäure und 0,2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) als Laufmittel bei einem Fluss von 0,5 ml/min und 100 µl Injektionsvolumen bei 30 °C durchgeführt. Die Probenkonzentration betrug 1 mg/ml. Die Auswertungen wurden mit dem Programm PSSWinGPC Unity durchgeführt. Die Messungen erfolgten an zwei Säulen (1. Vorsäule (1000 Å), 2. Säule (10000 Å)). Die Probenkonzentrationen wurden mit 1 mg/ml angesetzt. Als Kalibrierstandard diente Pullulan. Die Messungen wurden bei 30 °C durchgeführt. Vor jeder Messung wurden die Proben mit einem 0,2 µm Teflon Filter (Fa. VWR) filtriert.

### **ATR-FT-IR-Spektroskopie**

Für die IR-Spektren wurde das ATR-FT-IR-Spektrometer Tensor 27 Platinum der Fa. Bruker verwendet. Für die IR-Spektren wurden die Polymere direkt als Feststoff oder die Hydrogele in gequollenem Zustand eingesetzt. Dabei wurde eine Scanzahl von 32 Scans gewählt. Die Spektren-Auswertung erfolgte mit der Software OPUS.

### UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen wurden am Gerät Evolution 201 der Firma Thermo-Scientific bei Raumtemperatur durchgeführt.

## 7.2. Materialien

4-Cyano 4[(dodecylsulfanylthiocarbonyl) sulfanyl] pentanoic -Säure (CTA1), 2-Cyano-propan -2-yl *N*-methyl-*N*-(pyridin-4-yl)carbamo-dithioat (CTA2), Acrylamid (M1), 2-Aminoethyl methacrylat hydrochlorid (M2) (Schema 3.2, Seite 56), Ammoniumpersulfate (APS), *N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamin (TEMED) und Chloroform-*d* 99,8 % *D* (Sigma-Aldrich). Die verwendeten Lösungsmittel Wasser und Aceton wurden nach Standard gereinigt und unter Argon gelagert (Argon 5.0, Griesheim GmbH). Wasser wurde zusätzlich durch ein „Freeze-pump-and-thaw“-Verfahren entgast.<sup>248</sup> Polyethylenglycol diacrylat ( $\bar{M}_n = 575$  g/mol) wurde als Vernetzer verwendet. *N,N*-bis(acryloyl)-cystamin (BAC) (Elektrophoresegrad, *Bio-Rad*, Richmond, CA), DTT (Elektrophoresegrad, *Bio-Rad*, Richmond, CA) und 3-(2-Carboxyethyl-disulfanyl)propansäure (DTDP) (*Aldrich*, Milwaukee, WI) wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. 2-Aminoethyl methacrylat Hydrochlorid (AEMA) (Acros Organics), Polyethylenglycol diacrylat ( $\bar{M}_n = 575$  g/mol), 99%, (HBTU), HOBT anhydrid (1-Hydroxybenzotriazol anhydrid (Molekula), 1-Methyl-2-pyrrolidinon (NMP) biotechn. Grad,  $\geq 99,5$  % (alle Sigma-Aldrich), O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat (Apollo Scientific), *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) (Fisher Scientific) und Dimethylformamid (DMF) (Biosolve) wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Aminosäuren: (S)-2-(9-Fluorenylmethyloxycarbonylamino)-4-azidobutanoic acid (**Fmoc-L-Ala-OH**), *N*-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N'*-2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-L-arginine (**Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH**), *N*-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-*N*-beta-trityl-L-asparagine (**Fmoc-L-Asn(Trt)-OH**), *N*-alpha-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-

L- aspartic acid alpha t-butyl ester (**Fmoc-L-Asp-OtBu**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) - glycine (**Fmoc-Gly-OH**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) - N- im-trityl-L- histidine (**Fmoc-L-His(Trt)-OH**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -L- isoleucine (**Fmoc-L-Ile-OH**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) - N- epsilon-t- butyloxycarbonyl- L-lysine (**Fmoc-L-Lys (Boc) -OH**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -L-leucine (**Fmoc-L-Leu-OH**), N-alpha- (9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -L- methionine (**Fmoc-L-Met-OH**), N- alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -L- proline monohydrate (**Fmoc-L-Pro-OH\*H<sub>2</sub>O**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -N-gamma-trityl- L-glutamine (**Fmoc-L-Gln(Trt)-OH**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -O-t-butyl-L-serine (**Fmoc-L-Ser(tBu)-OH**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -O-t-butyl-L-threonine (**Fmoc-L-Thr(tBu)-OH**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -L-valine (**Fmoc-L-Val-OH**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -N-in-t-butyl-oxycarbonyl-L-tryptophan (**Fmoc-L-Trp(Boc)-OH**), N-alpha-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -3-t-butyl-L-tyrosine (**Fmoc-L-Tyr(3-tBu)-OH**), N-(9- Fluorenylmethyloxycarbonyl) -epsilon-amino-capronic acid (**Fmoc-6-Ahx-OH**). Alle Aminosäuren stammen von Iris Biotech GmbH<sup>®</sup>.

## 7.3. Herstellung der Polymere P-02 bis P-11

### Allgemeine Herstellungsmethode

Milli-Q-Wasser und TBE-Pufferlösung wurden extra nach dem „Freeze-pump-and-thaw“-Verfahren mit Argon für 20 min belüftet. Für die Polymerisation mit CTA1 wurden 10 mmol Monomer in 4 ml entgastem Wasser gelöst. 0,025 mmol RAFT-Reagenz wurden in 1,5 ml TBE-Pufferlösung gelöst und zu der Monomerlösung gegeben. 0,0225 mmol TEMED wurden hinzugegeben. 5 µmol APS (APS:TEMED = 1:4,5) wurden in Milli-Q-Wasser gelöst und zu der Mischung gegeben. Nach 1-minütigem Rühren wurden 2 ml

## 7. Experimenteller Teil

---

Pufferlösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in zwei gleich große Mengen aufgeteilt. Die eine Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, die andere bei 70 °C für 24 h.

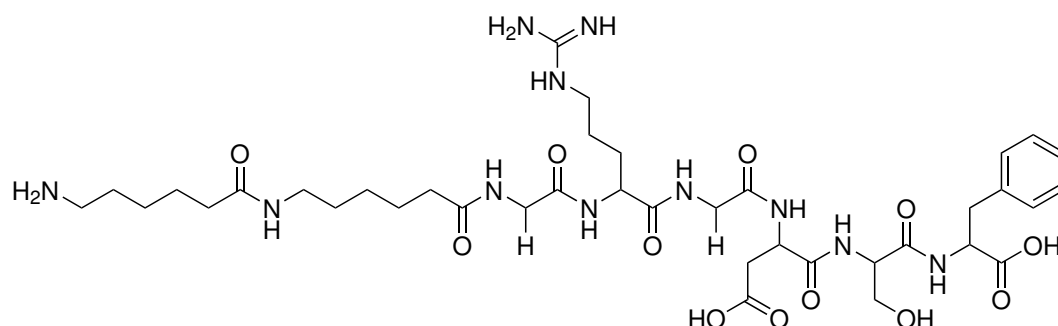
Für die Polymerisation mit CTA2 wurden 10 mmol Monomer in 6 ml entgastem Milli-Q-Wasser gelöst. 0,025 mmol RAFT-Reagenz wurden in einer (1 ml H<sub>2</sub>O, 1,91 µl TFA) Mischung für die Acrylamid-Polymerisation und in einer (1 ml H<sub>2</sub>O, 3,8 µl TFA) Mischung für die AEMA-Polymerisation gelöst, um die CTA2-Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Die RAFT-Lösung und TEMED wurden hinzugefügt. Nach dem Hinzugeben der APS-Lösung und 1-minütigem Rühren wurden 50 µl TFA hinzugefügt, um die RAFT-Reagenz zu stabilisieren. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Die Polymerlösung wurde im Vakuum eingengt und in Milli-Q-Wasser für 24 h dialysiert (Dialyseschlauch: MWCO: 1000, Roth, Karlsruhe). Die dialysierte Polymerlösung wurde in 20 ml Aceton gefällt und zentrifugiert. Das Polymer wurde unter Vakuum bei 30 °C getrocknet.

### 7.4. Peptidsynthese

Die allgemeine Herstellungsmethode lässt sich wie folgt beschreiben: Die erste Aminosäure (2,0 Äq in Bezug auf die Beladung des Harzes) wurde in Dichlormethan (DCM) gelöst und mit Diisopropylethylamin (DIPEA) (4,0 Äq) zum Harz gegeben und 12 h geschüttelt. Die Beladung wurde durch den Fmoc-Test ermittelt. Die Aminosäure (4,0 Äq in Bezug auf den erhaltenen Beladungsgrad des Harzes) wurde stufenweise durch die Kupplungsreagenzien O-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) gekuppelt.<sup>251</sup>

Das Peptid wurde unter sauren Bedingungen (Trifluoroessigsäure/ triisopropylsilane/ Wasser (95:2,5:2,5)) 3 h von dem Harz abgespalten sowie auch die seitlichen Schutzgruppen entschützt. Das Lösungsmittel wurde unter dem Rotationsverdampfer eingengt und in kaltem Diethylether ausgefällt. Die Reinigung wurde durch eine präparative HPLC-

Reversephase C 18 Säule (Knauer Eurospher II 300-10 C18 A 5-95%, Acetonitril) durchgeführt. Die Analyse wurde durch hochaufgelöste LC-MS ermittelt.



Schema 7.1: 6Ahx6AhxGRGDSF-Peptidsequenz.

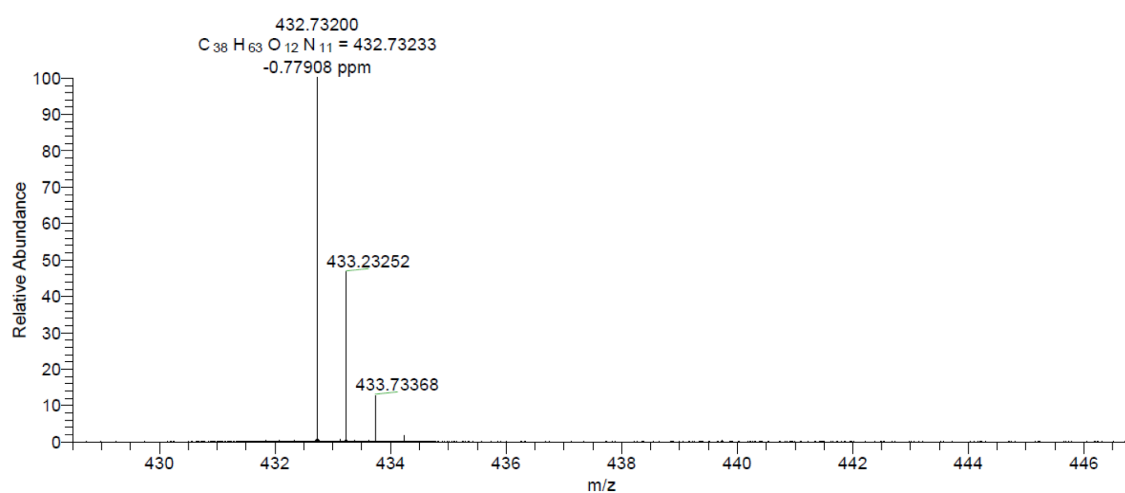
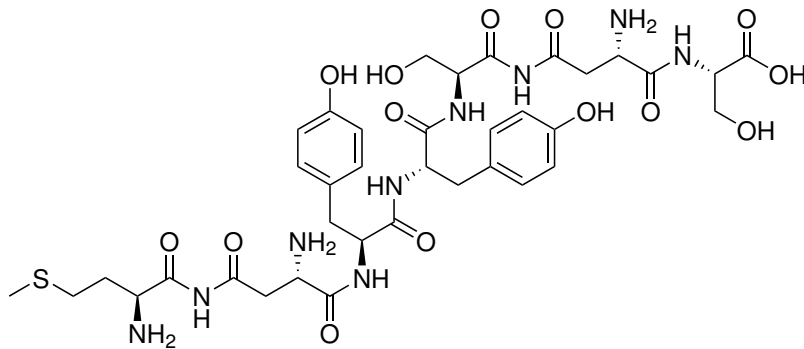


Abbildung 7.1.: HRMS (ESI-MS) von 6Ahx6AhxGRGDSF: gerechnet m/z: 863.45  $C_{38}H_{61}N_{11}O_{12}$  gefunden m/z: 432,73  $[M+2H]^{++}$ .

## 7. Experimenteller Teil



Schema 7.2: MNYYSNS-Peptidsequenz.

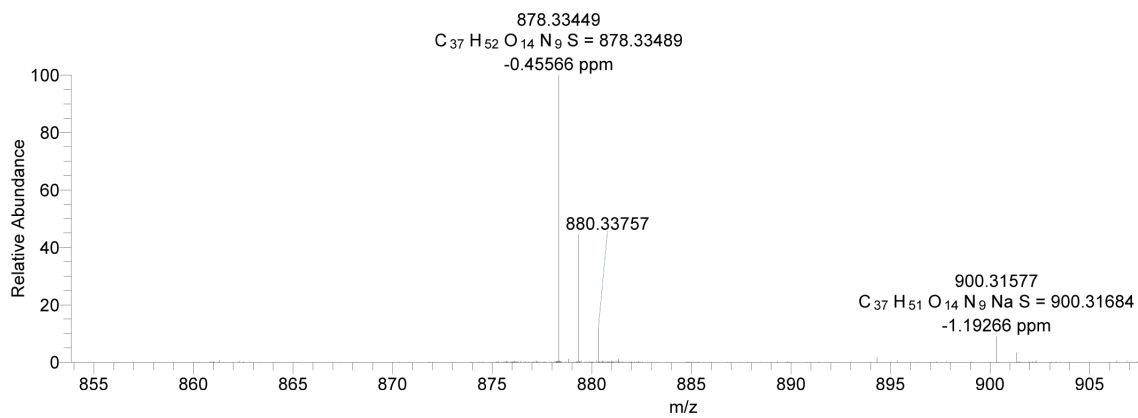
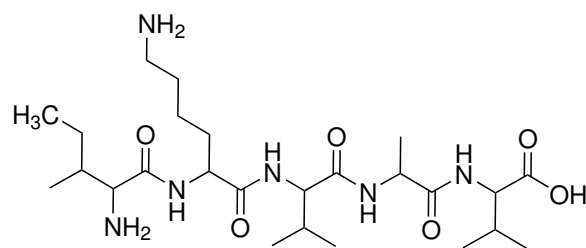


Abbildung 7.2.: HRMS (ESI-MS) von MNYYSNS : gerechnet m/z: 877,33  
 $C_{37}H_{51}N_9O_{14}S$  gefunden m/z: 878,33  $[M+H]^+$ .

## 7.5. Herstellung der Peptidsequenz Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF (PM)



Schema 7.3: IKVKAV.

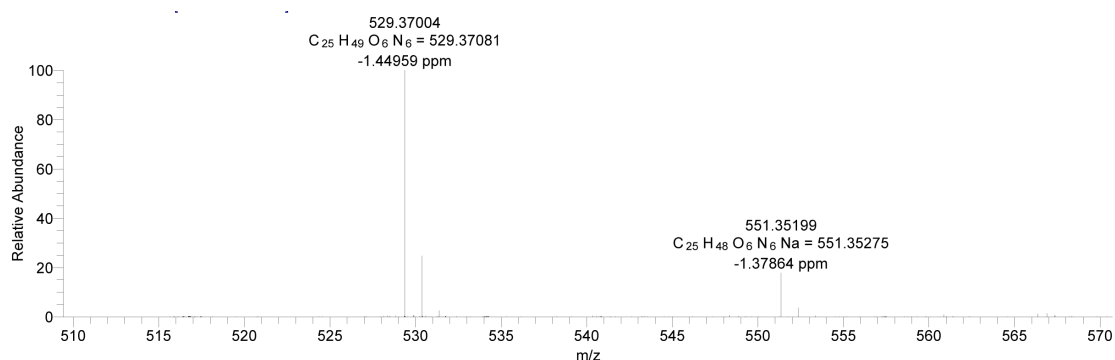


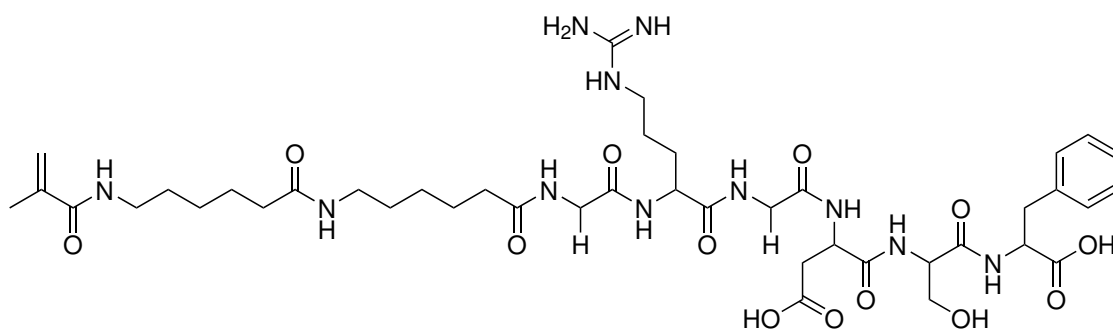
Abbildung 7.3.: HRMS (ESI-MS) von IKVKAV : gerechnet m/z: 528,36 C<sub>25</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> gefunden m/z: 529,37 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.5. Herstellung der Peptidsequenz

### Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF (PM)

Die Herstellung der Monomer-6AHX6AHXGRGDSF-Peptidsequenz (PM) (Schema 7.4) wurde mittels Mehrstufensynthese durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die erste Aminosäure – in diesem Fall Phenylalanin (F) – an das 2-ClTrt Harz gekuppelt.

Zwei Äquivalente (in Bezug auf das Chlortritylchlorid-Harz) der Fmoc-geschützten Aminosäure wurden in trockenem DCM (1 ml pro 100 mg Harz) gelöst und mit acht Äq. DIPEA versetzt. Die Lösung wurde auf das Harz gegeben und 12 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die überstehende Lösung abfiltriert und das beladene Harz jeweils dreimal mit 20 ml DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1), dreimal mit 10 ml DCM,



Schema 7.4: Monomer-6AHX6AHXGRGDSF.

zweimal mit 10 ml DMF und zweimal mit 10 ml DCM gewaschen (Angaben jeweils pro 100 mg Harz).

Im zweiten Schritt wurde der Beladungsgrad des Harzes mithilfe eines Evolution 201 UV-Visible Spectrophotometers der Firma Thermo Scientific bestimmt. Da das bei der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe entstehende Piperidin-Dibenzofulven-Addukt im UV-Vis-Bereich absorbiert, kann die Beladungsdichte durch Umstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt werden (Gleichung 7.1).

5 mg einer Harz-Probe wurden mit 5 ml einer Stammlösung aus Piperidin (20 %) in DMF versetzt und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die UV-Absorption der überstehenden Lösung beim Absorptionsmaximum des Piperidin-Dibenzofulven ( $\lambda = 301$  nm) gemessen. Dazu wurde die Probenlösung um 1/5 mit der Stammlösung verdünnt, da die anschließende Berechnung des Beladungsgrads mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Gleichung 7.1) erfolgte, welches nur für stark verdünnte Lösungen gilt. Als Referenz diente die Stammlösung mit 20 % Piperidin in DMF (Beladung von 2Cl-Trt-F = 1,35 mmol/g).

$$C = \frac{A \cdot V}{d \cdot \xi \cdot f \cdot m} \quad (7.1)$$



### 7.5. Herstellung der Peptidsequenz Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF (PM)

---

- C* Beladung des Harzes
- A* Absorption
- V* Volumen der Probe
- d* Breite der Küvette
- $\xi$  Extinktionskoeffizient ( $= 780 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$  bei 301 nm)<sup>250</sup>
- f* Verdünnungsfaktor
- m* Masse der Probe

Im dritten Schritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Das in DMF gequollene Harz wurde mit Piperidin (40 % in DMF, 1 ml pro 100 mg Harz) versetzt. Nach dreiminütigem Schütteln wurde die Lösung abfiltriert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, allerdings mit Piperidin (20 % in DMF, 1 ml pro 100 mg Harz) und einer Reaktionszeit von 10 Minuten. Anschließend wurde das Harz sechsmal mit DMF (1 ml pro 100 mg Harz) gewaschen.

Den vierten Schritt stellte die Aminosäurekupplung dar. Zunächst wurde die geschützte Aminosäure (4 Äq. Aminosäure in Bezug auf den Beladungsgrad des Harzes) in DMF ( $c = 0,42 \text{ mol/l}$ ) gelöst und mit HOBt (2 Äq. pro Aminosäure,  $c = 1 \text{ mol/l}$  in DMF) versetzt. Nach 20 min wurde die Lösung auf das Harz gegeben. Außerdem wurden noch HBTU (2 Äq. pro Aminosäure in DMF ( $c = 0,45 \text{ mol/l}$ )) und DIPEA (4,4 Äq. DIPEA pro Aminosäure in NMP ( $c = 1,6 \text{ mol/l}$ )) hinzugefügt und für 50 min geschüttelt. Die Lösung wurde abfiltriert. Das Harz wurde viermal mit DMF (2 ml pro 100 mg Harz) gewaschen. Die Schritte 3 und 4 wurden wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz erhalten wurde.

Im letzten Schritt wurde die Fmoc-Schutzgruppe der N-terminalen Aminosäure wie im dritten Schritt abgespalten. Um zu einem Monomer zu gelangen, wurden 2 Äq. Methacryloylchlorid in 20 ml DMF gelöst, auf etwa  $-75 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und zum mit DMF aufge-

## 7. Experimenteller Teil

---

quollenen Harz gegeben. Daraufhin wurden 8 Äq. DIPEA dazugegeben und 24 h gerührt. Das immobilisierte Monomer wurde viermal mit 40 ml DMF gewaschen. Anschließend wurde das Harz dreimal mit DCM (2 ml pro 100 mg Harz) gewaschen. Es wurde dann mit TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95/2,5/2,5; 3 ml pro 100 mg Harz) versetzt und drei h geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde abfiltriert und das Harz wurde zusätzlich jeweils zweimal mit TFA (0,5 ml pro 100 mg Harz) und DCM (0,5 ml pro 100 mg Harz) gewaschen. Die erhaltene Lösung wurde im Vakuum eingengt, der Rückstand mit kaltem Diethylether versetzt und das Peptid als weißer Niederschlag zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert und der Feststoff in Wasser gelöst. Letzteres wurde anschließend durch Lyophilisation entfernt. Das erhaltene Peptid wurde mittels HPLC gereinigt und mittels HRMS (ESI-MS) charakterisiert (Abbildung 7.4).

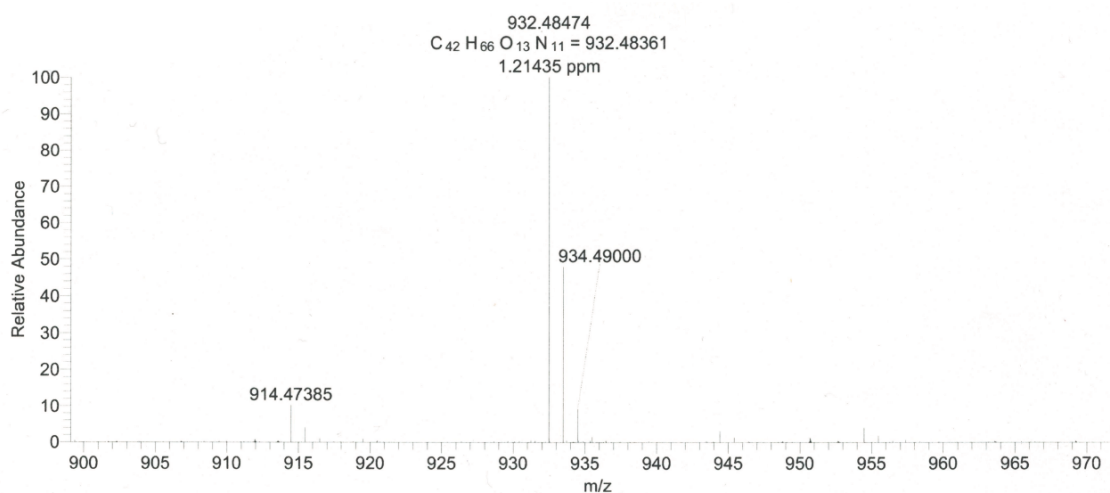


Abbildung 7.4.: HRMS (ESI-MS) von Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF : gerechnet m/z: 931,476 C<sub>42</sub>H<sub>65</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub> gefunden m/z: 932,484 [M+H]<sup>+</sup>.

## 7.6. Herstellung der Biohybridhydrogele G1 bis G6

Die allgemeine Herstellungsmethode wird im Folgenden beispielhaft anhand von **G1** beschrieben. Es wurde eine klassische freie radikalische Polymerisation wie folgt angewendet: 0,123 g (1,74 mmol) AA, 0,0335 g (0,202 mmol) 2-Aminoethylmethacrylat Hydrochlorid (AEMA), 0,0184 g (0,02 mmol) PM und 0,0104 g (0,04 mmol) BAC als Vernetzer (V) wurden in 2 ml 25%igen Ethanol gelöst (25:75 Ethanol:Wasser, w/w). Da die Polymerisation sauerstoffempfindlich ist, wurde die Lösung mittels *Freeze-pump-and-thaw* entgast, um jeglichen gelösten Sauerstoff zu entfernen. Insgesamt wurden 27,6  $\mu$ l TEMED zu der Reaktionsmischung hinzugefügt. Nach der vollständigen Lösung des Monomers wurde die Polymerisation durch Addition von 0,0046 g (0,02 mmol) APS initiiert und über 12 h bei 25 °C fortgeführt. Die hergestellten Gele wurden aus den Reaktionsgefäßen genommen und für 48 h in Milli-Q-Wasser dialysiert, um Restmonomere zu entfernen.

## 7.7. Reduktive Verflüssigung der monomerfreien Gele G1 bis G6

Für die Verflüssigung der Gele wurde DTT bei einem Molverhältnis von 10:1 des BAC im Hydrogel bei einem pH-Wert von 7 angewendet. Da die Reaktion sauerstoffempfindlich ist, wurde das Reaktionsgemisch von löslichem Sauerstoff entgast. Die Reaktionslösung wurde daher 20 min vor Beginn der Reaktion mit Argon gespült. Dann wurde die Reaktion 4 h lang unter Argon durchgeführt. Nach vollständiger Lösung des Gels wurde die Lösung durch 10%iges (v/v) HCl bis zu einem pH-Wert von 4 angesäuert, in einen Dialyseschlauch gegeben und in Milli-Q-Wasser für 24 h dialysiert. Danach wurde die wässrige Polymerlösung gefriergetrocknet. Das trockene Polymer wurde für  $^1\text{H-NMR}$ -Messungen in  $\text{D}_2\text{O}$  gelöst.

## 7.8. Herstellung der Biohybridhydrogele G7 bis G15

Die allgemeine Herstellungsmethode wird im Folgenden beispielhaft anhand von **G7** beschrieben. Eine radikalische Standardpolymerisation wurde wie folgt durchgeführt: 0,252 g (3,54 mmol) AA, 0,068 g (0,412 mmol) AEMA, 0,037 g (0,04 mmol) Monomerpeptid PM<sup>1</sup> und 0,046 g (0,08 mmol) Polyethylenglycol diacrylat ( $\bar{M}_n = 575$  g/mol) als Vernetzer wurden in 4 ml Milli-Q-Wasser gelöst. Die Lösung wurde durch *Freeze-pump-and-thaw* entgast, um jeglichen wasserlöslichen Sauerstoff vor Beginn der Polymerisation zu entfernen. Insgesamt wurden 27,6  $\mu$ l TEMED zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Nach der vollständigen Auflösung der Monomere wurde die Polymerisation durch Zugabe von 9,3 mg (0,04 mmol) APS gestartet und für 12 h bei 25 °C fortgeführt. Die erhaltenen Polymergele wurden aus den Teflonbehältern entfernt und, um restliche Monomere zu entfernen, für 48 h in Milli-Q-Wasser dialysiert. Danach wurde die Größe der Hydrogele durch Stanzen mit einer sterilen Kork-Trepan auf die Größe von  $\emptyset$  15 mm angepasst, um weitere Bearbeitung mit einer 24-Well- oder einer 4-Well-Plate (beide Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zu ermöglichen. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurden die Hydrogele mindestens 5 h in 70 % EtOH inkubiert (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Anschließend wurden umfangreiche Waschschriffe (mindestens dreimal für jeweils 30 min) mit Milli-Q-Wasser und PBS durchgeführt, um restliches EtOH zu beseitigen. Schließlich wurden die hergestellten Hydrogele mit sterilen Mikrolabor-Spateln in der Well-Plate platziert.

## 7.9. Hydrogelcharakterisierung

### 7.9.1. Rheologische Messungen

Die hergestellten Hydrogele hatten eine Dicke von etwa 1 mm und wurden durch rheologische Messungen unter Verwendung eines Rheometrics-Fluid-Spektrometers (RFS2)

von *Rheometrics Scientific* mit einer Platte/Platte-Geometrie untersucht. Der Durchmesser der oberen Titanplatte betrug 25 mm. Die Messung der tatsächlichen Dicke der Gelscheibe bestimmt den Abstand zwischen den beiden Platten. Um das Rutschen zwischen der glatten Gelscheibe und den glatten Titanplatten zu vermeiden, wurden die Titanplatten mit angerauten Klebestreifen modifiziert. Während der rheologischen Messungen wurde eine sinusförmige Belastung auf die untere Platte aufgebracht und die induzierten Drehmomente durch die obere Platte gemessen. Aus der Phasendifferenz zwischen Spannung und Dehnung und ihrer jeweiligen Amplituden wurde das  $G'$  und das  $G''$  unter Verwendung der Gleichungen 7.2, 7.3, und 7.4 berechnet.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (7.2)$$

und

$$\gamma(t) = \gamma_{max} \cdot \sin(\omega \cdot t) \quad (7.3)$$

$$\sigma(t) = \sigma_{max} \cdot \sin(\omega \cdot t + \delta) \quad (7.4)$$

$\gamma$  Deformation

$\sigma$  Schubspannung

$\omega$  Kreisfrequenz

Für die rheologische Charakterisierung der Gele wurden zwei Arten von Messungen durchgeführt. Ein *Frequency-sweep-Test* mit einer konstanten Dehnung ( $\gamma = 0,1 \%$ ) gab detaillierte Information über die Netzwerkeigenschaften, während ein Amplitudentest bei konstanter Frequenz ( $\omega = 1 \text{ rad/s}$ ) Informationen über die Stabilität des PolymerNetzwerkes lieferte.

### 7.9.2. $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem 500 MHz NMR-Spektrometer der Firma *Unity INOVA* ermittelt, welches mit einer 5 mm Tripleresonance H(C,X) Sonde von Varian Associates ausgestattet ist. 16 Transienten wurden mit 45 kb (data) bei 5500 Hz Spektralbreite, einer Messzeit von 4,096 s, einer Relaxationsverzögerung von 2 s und mit einem 90 Gradpuls von 9,5  $\mu\text{s}$  summiert. Die Werte wurden mithilfe einer Vorsättigung des Signals (*Presaturation*) gewonnen, um das Wassersignal zu unterdrücken.

### 7.9.3. $^1\text{H}$ HR-MAS-NMR-Spektroskopie

Das gleiche Spektrometer, das zuvor eingesetzt wurde, wurde nun mit einer 4 mm Nanodetektionssonde gH(X) verwendet. Um die Seitenbänder außerhalb des relevanten Bereichs zu verschieben, wurde eine Drehgeschwindigkeit von 3500 Hz angesetzt. 32 Transienten wurden mit 90 kb (data) bei 11000 Hz Spektralbreite, einer Messzeit von 4,096 s, einer Relaxationsverzögerung von 2 s und einem 90 Gradpuls von 7  $\mu\text{s}$  summiert. Die Werte wurden mithilfe einer Vorsättigung des Signals (*Persaturation*) gewonnen, um das Wassersignal zu unterdrücken.

### 7.9.4. Zeta-Potential

Für die Zeta-Potential-Messungen wurden drei lösliche Copolymere **P12**, **P13** und **P14** mittels freier radikalischer Polymerisation hergestellt. Für die Zusammenstellung wurde der Vernetzer der Gele **G8**, **G11** und **G14** durch Acrylamid ersetzt. Diese wasserlöslichen Copolymere mit einer ungefähren Größe von  $\emptyset$  10 nm in Wasser wurden für die Zeta-Potential-Messungen verwendet. Diese Messungen wurden mit dem Zetasizer Nano Instrument (Malvern) mit einem 4 mW He-Ne Laser (633 nm Wellenlänge) bei einem festgelegten Untersuchungswinkel von  $173^\circ$  durchgeführt. Für jede Probe (**P12**, **P13** und **P14**) wurde dann die Messungen zehnmal bei einer konstanten Temperatur von 25  $^\circ\text{C}$

durchgeführt.

### **7.9.5. Zellexperimente**

Die Stammzellexperimente wurden von Marvin Jarocki am Lehrstuhl für Zellmorphologie und molekulare Neurobiologie von Prof. Faissner an der Universität Bochum im Rahmen der Zusammenarbeit durchgeführt.<sup>235</sup>





## **Teil VI.**

### **Erklärung**



---

## Erklärung

- Alle Abbildungen, wenn nicht anders vermerkt, sind Eigentum des Autors und dürfen nicht ohne schriftliche Genehmigung verwendet werden.
- Eidesstattliche Versicherung (siehe Seite 139)

# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname  
(Surname, first name)

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):

---

---

---

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)

# Literaturverzeichnis

- [1] Hauser, C.; Loo, Y. *Gynäkologische Endokrinologie* **2012**, *10*, 255–264.
- [2] Park, S. B. *Nature News* **2012**, *10*, 1038.
- [3] A, O. *Nature* **2010**, *467*, 633–633.
- [4] George, B. *Perspectives in Clinical Research* **2011**, *2*, 94.
- [5] Klimanskaya, I.; Chung, Y.; Becker, S.; Lu, S.-J.; Lanza, R. *Nature* **2006**, *444*, 481–485.
- [6] Aguado, B. A.; Mulyasmita, W.; Su, J.; Lampe, K. J.; Heilshorn, S. C. *Tissue Engineering, Part A* **2011**, *18*, 806–815.
- [7] Kuhn, H.-G.; Weidner, N.; Winkler, J.; Aigner, L. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **2002**, *45*, 92–101.
- [8] Dettner, K.; Peters, W. *Lehrbuch Der Entomologie*; Spektrum Akademischer Verlag, 2010.
- [9] Conover, J. C.; Notti, R. Q. *Cell and Tissue Research* **2008**, *331*, 211–224.
- [10] Doetsch, F.; Alvarez-Buylla, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93*, 14895–14900.

- [11] Herrera, D. G.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alvarez-Buylla, A. *Annals of Neurology* **1999**, *46*, 867–877.
- [12] Moore, K. A.; Lemischka, I. R. *Science* **2006**, *311*, 1880–1885.
- [13] Alvarez-Buylla, A.; Lim, D. A. *Neuron* **2004**, *41*, 683–686.
- [14] Ayala, R.; Zhang, C.; Yang, D.; Hwang, Y.; Aung, A.; Shroff, S. S.; Arce, F. T.; Lal, R.; Arya, G.; Varghese, S. *Biomaterials* **2011**, *32*, 3700–3711.
- [15] Kelleher, C. M.; Vacanti, J. P. *Journal of The Royal Society Interface* **2010**, rsif20100345.
- [16] Sánchez-Pernaute, R.; Studer, L.; Ferrari, D.; Perrier, A.; Lee, H.; Viñuela, A.; Isacson, O. *Stem cells* **2005**, *23*, 914–922.
- [17] Dutta, R. C.; Dutta, A. K. *Biotechnology Advances* **2009**, *27*, 334–339.
- [18] Prestwich, G. D. *Journal of Cellular Biochemistry* **2007**, *101*, 1370–1383.
- [19] Guilak, F.; Cohen, D. M.; Estes, B. T.; Gimble, J. M.; Liedtke, W.; Chen, C. S. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 17–26.
- [20] Ruoslahti, E.; Öbrink, B. *Experimental Cell Research* **1996**, *227*, 1–11.
- [21] Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell: Reference edition*; Molecular Biology of the Cell: Reference Edition; Garland Science, 2008.
- [22] Bosman, F. T.; Stamenkovic, I. *The Journal of Pathology* **2003**, *200*, 423–428.
- [23] Nguyen, H.; Qian, J. J.; Bhatnagar, R. S.; Li, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *311*, 179–186.

- 
- [24] Floquet, N.; Pasco, S.; Ramont, L.; Derreumaux, P.; Laronze, J. Y.; Nuzillard, J. M.; Maquart, F. X.; Alix, A. J.; Monboisse, J. C. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 2091–2100.
- [25] Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P. G.; Rennard, S. I.; Foidart, J.-M.; Martin, G. R. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, *254*, 9933–9937.
- [26] Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Liotta, L. A.; Robey, P. G.; Tryggvason, K.; Martin, G. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6188–6193.
- [27] Wei, Y.; Tian, W.; Yu, X.; Cui, F.; Hou, S.; Xu, Q.; Lee, I.-S. *Biomedical Materials* **2007**, *2*, S142.
- [28] Järvinen, T.; Kannus, P.; Järvinen, T.; Jozsa, L.; Kalimo, H.; Järvinen, M. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **2000**, *10*, 376–382.
- [29] Erickson, H. P.; Taylor, H. C. *The Journal of Cell Biology* **1987**, *105*, 1387–1394.
- [30] Ikeshima-Kataoka, H.; Shen, J.-S.; Eto, Y.; Saito, S.; Yuasa, S. *In Vivo* **2008**, *22*, 409–413.
- [31] Garwood, J.; Garcion, E.; Dobbertin, A.; Heck, N.; Calco, V.; Ffrench-Constant, C.; Faissner, A. *European Journal of Neuroscience* **2004**, *20*, 2524–2540.
- [32] Midwood, K. S.; Hussenet, T.; Langlois, B.; Orend, G. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2011**, *68*, 3175–3199.
- [33] Kornblihtt, A. R.; Umezawa, K.; Vibe-Pedersen, K.; Baralle, F. *The EMBO Journal* **1985**, *4*, 1755.
- [34] Skorstengaard, K.; Jensen, M. S.; Sahl, P.; Petersen, T. E.; Magnusson, S. *European Journal of Biochemistry* **1986**, *161*, 441–453.

- [35] Akiyama, S. K.; Yamada, K. M.; Hayashi, M. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry* **1981**, *16*, 345–358.
- [36] Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81*, 5985–5988.
- [37] Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [38] Ruoslahti, E. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1996**, *12*, 697–715.
- [39] Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Nature* **1983**, *309*, 30–33.
- [40] Gelain, F.; Bottai, D.; Vescovi, A.; Zhang, S. *PloS one* **2006**, *1*, e119.
- [41] Jones, D. L.; Wagers, A. J. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, *9*, 11–21.
- [42] Alexander von Holst, A. F. *Neurowissenschaftliche Gesellschaft* **2009**, 44–56.
- [43] Garcion, E.; Halilagic, A.; Faissner, A.; *Development* **2004**, *131*, 3423–3432.
- [44] Li, X.; Katsanevakis, E.; Liu, X.; Zhang, N.; Wen, X. *Progress in Polymer Science* **2012**, *37*, 1105–1129.
- [45] Leipzig, N. D.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2009**, *30*, 6867–6878.
- [46] Lu, Y.-B.; Franze, K.; Seifert, G.; Steinhäuser, C.; Kirchhoff, F.; Wolburg, H.; Guck, J.; Janmey, P.; Wei, E.-Q.; Käs, J.; *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 17759–17764.
- [47] Elkin, B. S.; Azeloglu, E. U.; Costa, K. D.; Morrison Iii, B. *Journal of Neurotrauma* **2007**, *24*, 812–822.
- [48] Teixeira, A. I.; Duckworth, J. K.; Hermanson, O. *Cell Research* **2007**, *17*, 56–61.



- [49] Zhang, N.; Yan, H.; Wen, X. *Brain Research Reviews* **2005**, *49*, 48–64.
- [50] Straley, K. S.; Foo, C. W. P.; Heilshorn, S. C. *Journal of Neurotrauma* **2010**, *27*, 1–19.
- [51] Pompe, T.; Prewitz, M.; Werner, C. *BIOspektrum* **2012**, *18*, 382–384.
- [52] Hynes, S. R.; Rauch, M. F.; Bertram, J. P.; Lavik, E. B. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2009**, *89*, 499–509.
- [53] Nisbet, D. R.; Crompton, K. E.; Horne, M. K.; Finkelstein, D. I.; Forsythe, J. S. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2008**, *87*, 251–263.
- [54] Allison, D. D.; Grande-Allen, K. J. *Tissue Engineering* **2006**, *12*, 2131–2140.
- [55] Suh, J.-K. F.; Matthew, H. W. *Biomaterials* **2000**, *21*, 2589–2598.
- [56] Tsou, Y.-H.; Khoneisser, J.; Huang, P.-C.; Xu, X. *Bioactive Materials* **2016**.
- [57] O’Connor, S. M.; Stenger, D. A.; Shaffer, K. M.; Maric, D.; Barker, J. L.; Ma, W. *Journal of Neuroscience Methods* **2000**, *102*, 187–195.
- [58] Hiraoka, M.; Kato, K.; Nakaji-Hirabayashi, T.; Iwata, H. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 976–983.
- [59] Miyazaki, H.; Kato, K.; Teramura, Y.; Iwata, H. *Bioconjugate Chemistry* **2008**, *19*, 1119–1123.
- [60] Sundararaghavan, H. G.; Monteiro, G. A.; Firestein, B. L.; Shreiber, D. I. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *102*, 632–643.
- [61] Ju, Y.-E.; Janmey, P. A.; McCormick, M. E.; Sawyer, E. S.; Flanagan, L. A. *Biomaterials* **2007**, *28*, 2097–2108.

- [62] Schense, J. C.; Bloch, J.; Aebischer, P.; Hubbell, J. A. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 415–419.
- [63] Martin, B. C.; Minner, E. J.; Wiseman, S. L.; Klank, R. L.; Gilbert, R. J. *Journal of Neural Engineering* **2008**, *5*, 221.
- [64] Luo, Y.; Shoichet, M. S. *Nature Materials* **2004**, *3*, 249–253.
- [65] Aizawa, Y.; Leipzig, N.; Zahir, T.; Shoichet, M. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4676–4683.
- [66] Yu, L. M.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *82*, 243–255.
- [67] Blewitt, M. J.; Willits, R. K. *Annals of Biomedical Engineering* **2007**, *35*, 2159–2167.
- [68] Georges, P. C.; Miller, W. J.; Meaney, D. F.; Sawyer, E. S.; Janmey, P. A. *Biophysical Journal* **2006**, *90*, 3012–3018.
- [69] Balgude, A.; Yu, X.; Szymanski, A.; Bellamkonda, R. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1077–1084.
- [70] Zhu, J. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4639–4656.
- [71] Woerly, S. *Neurosurgical Review* **2000**, *23*, 59–77.
- [72] Woerly, S.; Pinet, E.; De Robertis, L.; Van Diep, D.; Bousmina, M. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1095–1111.
- [73] Saha, K.; Irwin, E. F.; Kozhukh, J.; Schaffer, D. V.; Healy, K. E. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *81*, 240–249.
- [74] Discher, D. In *APS March Meeting Abstracts*; p 7003.

- 
- [75] Saha, K.; Keung, A. J.; Irwin, E. F.; Li, Y.; Little, L.; Schaffer, D. V.; Healy, K. E. *Biophysical Journal* **2008**, *95*, 4426–4438.
- [76] Friedmann, M. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4504–4526.
- [77] Bjugstad, K.; Redmond Jr, D.; Lampe, K.; Kern, D.; Sladek Jr, J.; Mahoney, M. *Cell Transplantation* **2008**, *17*, 409–415.
- [78] Bjugstad, K.; Lampe, K.; Kern, D.; Mahoney, M. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, *95*, 79–91.
- [79] Mahoney, M. J.; Anseth, K. S. *Biomaterials* **2006**, *27*, 2265–2274.
- [80] Freudenberg, U.; Hermann, A.; Welzel, P. B.; Stirl, K.; Schwarz, S. C.; Grimmer, M.; Zieris, A.; Panyanuwat, W.; Zschoche, S.; Meinhold, D.; Storch, A.; Werner, C. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5049–5060.
- [81] Leach, J. B.; Brown, X. Q.; Jacot, J. G.; DiMilla, P. A.; Wong, J. Y. *Journal of Neural Engineering* **2007**, *4*, 26.
- [82] Gunn, J. W.; Turner, S. D.; Mann, B. K. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *72*, 91–97.
- [83] Nayak, S.; Lyon, L. A. *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 7862–7886.
- [84] Gehrke, S. H. In *Responsive Gels: Volume Transitions II*; Springer, 1993; pp 81–144.
- [85] Ramazani-Harandi, M.; Zohuriaan-Mehr, M.; Yousefi, A.; Ershad-Langroudi, A.; Kabiri, K. *Polymer Testing* **2006**, *25*, 470–474.
- [86] Shi, Z.; Günther, M.; Gerlach, G.; Sorber, J.; Wallmersperger, T. *MikroSystemTechnik* **2007**.

- [87] Hartinger, J.; Stenius, K.; Högemann, D.; Jahn, R. *Analytical Biochemistry* **1996**, *240*, 126–133.
- [88] Zhan, W.; Seong, G. H.; Crooks, R. M. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4647–4652.
- [89] Lee, K. Y.; Mooney, D. J. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 1869–1880.
- [90] Drury, J. L.; Mooney, D. J. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.
- [91] Park, H.; Park, K.; Shalaby, W. S. *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*; CRC Press, 2011.
- [92] Gombotz, W. R.; Wee, S. F. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 194–205.
- [93] Goosen, M. F.; O’Shea, G. M.; Gharapetian, H. M.; Chou, S.; Sun, A. M. *Biotechnology and Bioengineering* **1985**, *27*, 146–150.
- [94] Lutolf, M. P.; Raeber, G. P.; Zisch, A. H.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A. *Advanced Materials* **2003**, *15*, 888–892.
- [95] Gacesa, P. *Carbohydrate Polymers* **1988**, *8*, 161–182.
- [96] Eagland, D.; Crowther, N.; Butler, C. *European Polymer Journal* **1994**, *30*, 767–773.
- [97] Mathur, A. M.; Hammonds, K. F.; Klier, J.; Scranton, A. B. *Journal of Controlled Release* **1998**, *54*, 177–184.
- [98] Hamley, I. W. *Block Copolymers in Solution: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, 2005.
- [99] Jeong, B.; Bae, Y. H.; Kim, S. W. *Journal of Controlled Release* **2000**, *63*, 155–163.
- [100] Van Vlierberghe, S.; Graulus, G.-J.; Keshari, S.; Samal, I. *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications* **2014**, 335.

- 
- [101] Van Vlierberghe, S.; Dubruel, P.; Schacht, E. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1387–1408.
- [102] Hennink, W.; Van Nostrum, C. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 223–236.
- [103] Sperinde, J. J.; Griffith, L. G. *Macromolecules* **1997**, *30*, 5255–5264.
- [104] Mathur, A. M.; Moorjani, S. K.; Scranton, A. B. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* **1996**, *36*, 405–430.
- [105] Peppas, N. A.; Berner Jr, R. E. *Biomaterials* **1980**, *1*, 158–162.
- [106] Gehrke, S. H.; Uhden, L. H.; McBride, J. F. *Journal of Controlled Release* **1998**, *55*, 21–33.
- [107] Coviello, T.; Grassi, M.; Rambone, G.; Santucci, E.; Carafa, M.; Murtas, E.; Riccieri, F. M.; Alhaique, F. *Journal of Controlled Release* **1999**, *60*, 367–378.
- [108] Kuijpers, A.; Van Wachem, P.; Van Luyn, M.; Engbers, G.; Krijgsveld, J.; Zaat, S.; Dankert, J.; Feijen, J. *Journal of Controlled Release* **2000**, *67*, 323–336.
- [109] Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 666–676.
- [110] Stöckmann, H.; Neves, A. A.; Stairs, S.; Brindle, K. M.; Leeper, F. J. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 7303–7305.
- [111] Jiang, Y.; Chen, J.; Deng, C.; Suuronen, E. J.; Zhong, Z. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4969–4985.
- [112] Crescenzi, V.; Cornelio, L.; Di Meo, C.; Nardecchia, S.; Lamanna, R. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1844–1850.

- [113] Liu, S. Q.; Ee, P. L. R.; Ke, C. Y.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1453–1461.
- [114] Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 8794–8804.
- [115] Prescher, J. A.; Dube, D. H.; Bertozzi, C. R. *Nature* **2004**, *430*, 873–877.
- [116] Laughlin, S. T.; Baskin, J. M.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Science* **2008**, *320*, 664–667.
- [117] DeForest, C. A.; Polizzotti, B. D.; Anseth, K. S. *Nature Materials* **2009**, *8*, 659–664.
- [118] Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1355–1387.
- [119] Chatani, S.; Nair, D. P.; Bowman, C. N. *Polymer Chemistry* **2013**, *4*, 1048–1055.
- [120] Elbert, D. L.; Pratt, A. B.; Lutolf, M. P.; Halstenberg, S.; Hubbell, J. A. *Journal of Controlled Release* **2001**, *76*, 11–25.
- [121] Lutolf, M.; Tirelli, N.; Cerritelli, S.; Cavalli, L.; Hubbell, J. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, *12*, 1051–1056.
- [122] Heinrich, G.; Straube, E.; Helmig, G. In *Polymer Physics*; Springer, 1988; pp 33–87.
- [123] Schramm, G. *Einführung in Rheologie und Rheometrie*; Haake, 1995.
- [124] Seidel, C.; Ph.D. thesis; Rheologische Charakterisierung stärkebasierter Hydrogele im Hinblick auf ihre Eignung als Ultraschallgele; 2003.
- [125] Ferry, J. D. *Viscoelastic Properties of Polymers*; John Wiley & Sons, 1980.

- 
- [126] Sallouh, M.; Degen, P.; Hiller, W.; Weberskirch, R. *Polymer* **2015**, *56*, 141–146.
- [127] Hennel, J. W.; Klinowski, J. In *New Techniques in Solid-State NMR*; Springer, 2005; pp 1–14.
- [128] Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Physical Review* **1946**, *69*, 37–38.
- [129] Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Physical Review* **1946**, *69*, 127–127.
- [130] Andrew, E. R.; Bradbury, A.; Eades, R. G. *Nature* **1959**, *183*, 1802–1803.
- [131] Lowe, I. J. *Physical Review Letters* **1959**, *2*, 285–287.
- [132] Canet, D. *NMR-Konzepte und Methoden*; Springer, 1994.
- [133] Lindon, J. C.; Beckonert, O. P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2009**, *55*, 79–100.
- [134] Beckonert, O.; Coen, M.; Keun, H. C.; Wang, Y. L.; Ebbels, T. M. D.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. *Nature Protocols* **2010**, *5*, 1019–1032.
- [135] Zietkowski, D.; Davidson, R. L.; Eykyn, T. R.; De Silva, S. S.; deSouza, N. M.; Payne, G. S. *NMR in Biomedicine* **2010**, *23*, 382–390.
- [136] Jenkins, A. D.; Kratochvil, P.; Stepto, R. F. T.; Suter, U. W. *Pure and Applied Chemistry* **1996**, *68*, 2287–2311.
- [137] Koltzenburg, S.; Maskos, M.; Nuyken, O.; Milhaupt, R. *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*; Springer-Verlag GmbH, 2013.
- [138] Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science* **2007**, *32*, 93–146.
- [139] Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4710–4717.

- [140] Goto, A.; Hirai, N.; Wakada, T.; Nagasawa, K.; Tsujii, Y.; Fukuda, T. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6261–6264.
- [141] Georges, M. K.; Veregin, R. P.; Kazmaier, P. M.; Hamer, G. K. *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987–2988.
- [142] Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5614–5615.
- [143] Chiefari, J.; Chong, Y.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P.; Mayadunne, R. T.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang S. H. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [144] Studer, A. *Chemistry-A European Journal* **2001**, *7*, 1159–1164.
- [145] Wetter, C. *Der Persistent Radical Effect in der organischen Synthese und in der Polymerchemie*; Cuvillier, 2004.
- [146] Hawker, C. J.; Bosman, A. W.; Harth, E. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 3661–3688.
- [147] Wayland, B. B.; Poszmik, G.; Mukerjee, S. L.; Fryd, M. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 7943–7944.
- [148] Boyer, C.; Valade, D.; Sauguet, L.; Ameduri, B.; Boutevin, B. *Macromolecules* **2005**, *38*, 10353–10362.
- [149] Jenkins, A. D.; Jones, R. G.; Moad, G. *Pure and Applied Chemistry* **2009**, *82*, 483–491.
- [150] Cacioli, P.; Hawthorne, D.; Laslett, R.; Rizzardo, E.; Solomon, D. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry* **1986**, *23*, 839–852.
- [151] Krstina, J.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Winzor, C. L.; Berge, C. T.; Fryd, M. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5381–5385.



- [152] Hawthorne, D. G.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5457–5459.
- [153] Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; Chemiker, S.; Chemicals, S. *Headquarters: Strem Chemicals, Inc.* **2011**, *2*.
- [154] Moad, G.; Chen, M.; Häussler, M.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer Chemistry* **2011**, *2*, 492–519.
- [155] Boyer, C.; Bulmus, V.; Davis, T. P.; Ladmiral, V.; Liu, J.; Perrier, S. *Chemical Reviews* **2009**, *109*, 5402–5436.
- [156] Semsarilar, M.; Perrier, S. *Nature Chemistry* **2010**, *2*, 811–820.
- [157] Storsberg, J.; Hartenstein, M.; Müller, A. H.; Ritter, H. *Macromolecular Rapid Communications* **2000**, *21*, 1342–1346.
- [158] Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Australian Journal of Chemistry* **2005**, *58*, 379–410.
- [159] Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer* **2008**, *49*, 1079–1131.
- [160] Chen, M.; Moad, G.; Rizzardo, E. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2009**, *47*, 6704–6714.
- [161] Vandenberg, J.; Schweitzer-Chaput, B.; Klussmann, M.; Junkers, T. *Macromolecules* **2016**, *49*, 4124–4135.
- [162] Convertine, A. J.; Ayres, N.; Scales, C. W.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1177–1180.
- [163] Millard, P.-E.; Barner, L.; Stenzel, M. H.; Davis, T. P.; Barner-Kowollik, C.; Müller, A. H. *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, *27*, 821–828.

- [164] Ding, C.; Fan, C.; Jiang, G.; Pan, X.; Zhang, Z.; Zhu, J.; Zhu, X. *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, *36*, 2181–2185.
- [165] Xu, J.; Jung, K.; Atme, A.; Shanmugam, S.; Boyer, C. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 5508–5519.
- [166] Benaglia, M.; Chen, M.; Chong, Y. K.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2009**, *42*, 9384–9386.
- [167] Feng, X. D.; Guo, X. Q.; Qiu, K. Y. *Die Makromolekulare Chemie* **1988**, *189*, 77–83.
- [168] Barner-Kowollik, C.; Buback, M.; Charleux, B.; Coote, M. L.; Drache, M.; Fukuda, T.; Goto, A.; Klumperman, B.; Lowe, A. B.; Mcleary, J. B.; et al. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2006**, *44*, 5809–5831.
- [169] Chong, . Y.; Krstina, J.; Le, T. P.; Moad, G.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2003**, *36*, 2256–2272.
- [170] Moad, G.; Chiefari, J.; Krstina, J.; Mayadunne, R. T. A.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Polymer International* **2000**, *49*, 993–1001.
- [171] Moad, G.; Chiefari, J.; Mayadunne, R. T.; Moad, C. L.; Postma, A.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. In *Macromolecular Symposia*; Wiley Online Library; **2002**, *182* pp 65–80.
- [172] Perrier, S.; Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Vana, P.; Davis, T. P. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8300–8306.
- [173] McLeary, J.; McKenzie, J.; Tonge, M.; Sanderson, R.; Klumperman, B. *ChemComm* **2004**, 1950–1951.

- [174] Chernikova, E.; Morozov, A.; Leonova, E.; Garina, E.; Golubev, V.; Bui, C.; Charleux, B. *Macromolecules* **2004**, *37*, 6329–6339.
- [175] Moad, G.; Mayadunne, R. T. A.; Rizzardo, E.; Skidmore, M.; Thang, S. H. *Kinetics and Mechanism of RAFT Polymerization*; ACS Symposium Series **2003**, *854*, 520–535.
- [176] Vana, P.; Davis, T. P.; Barner-Kowollik, C. *Macromolecular Theory and Simulations* **2002**, *11*, 823–835.
- [177] Barner-Kowollik, C.; Quinn, J. F.; Morsley, D. R.; Davis, T. P. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39*, 1353–1365.
- [178] Feldermann, A.; Ah Toy, A.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Polymer* **2005**, *46*, 8448–8457.
- [179] Coote, M. L.; Radom, L. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 1490–1491.
- [180] Thomas, D. B.; Sumerlin, B. S.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L. *Macromolecules* **2003**, *36*, 1436–1439.
- [181] Keddie, D. J.; Guerrero-Sanchez, C.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Macromolecules* **2011**, *44*, 6738–6745.
- [182] Benaglia, M.; Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 6914–6915.
- [183] Hubbell, J. A. *Current Opinion in Biotechnology* **1999**, *10*, 123–129.
- [184] Griffith, L. G. *Acta Materialia* **2000**, *48*, 263–277.
- [185] Drury, J. L.; Mooney, D. J. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.

- [186] Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 47–55.
- [187] Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 1345–1360.
- [188] Stile, R. A.; Burghardt, W. R.; Healy, K. E. *Macromolecules* **1999**, *32*, 7370–7379.
- [189] Elbert, D. L.; Hubbell, J. A. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 430–441.
- [190] Achilleos, M.; Krasia-Christoforou, T.; Patrickios, C. S. *Macromolecules* **2007**, *40*, 5575–5581.
- [191] Hersel, U.; Dahmen, C.; Kessler, H. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [192] Cavalcanti-Adam, E. A.; Volberg, T.; Micoulet, A.; Kessler, H.; Geiger, B.; Spatz, J. P. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, 2964–2974.
- [193] Deeg, J. A.; Louban, I.; Aydin, D.; Selhuber-Unkel, C.; Kessler, H.; Spatz, J. P. *Nano Letters* **2011**, *11*, 1469–1476.
- [194] Park, K. M.; Joung, Y. K.; Park, K. D.; Lee, S. Y.; Lee, M. C. *Macromolecular Research* **2008**, *16*, 517–523.
- [195] Barber, T. A.; Harbers, G. M.; Park, S.; Gilbert, M.; Healy, K. E. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6897–6905.
- [196] Mann, B. K.; Tsai, A. T.; Scott-Burden, T.; West, J. L. *Biomaterials* **1999**, *20*, 2281–2286.
- [197] Auernheimer, J.; Haubner, R.; Schottelius, M.; Wester, H. J.; Kessler, H. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, *89*, 833–840.
- [198] Alam, T. M.; Jenkins, J. E. *Advanced Aspects of Spectroscopy, Intech Open* **2012**.

- [199] Keifer, P. A.; Baltusis, L.; Rice, D. M.; Tymiak, A. A.; Shoolery, J. N. *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1996**, *119*, 65–75.
- [200] Sarkar, S. K.; Garigipati, R. S.; Adams, J. L.; Keifer, P. A. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 2305–2306.
- [201] Stover, H. D. H.; Frechet, J. M. J. *Macromolecules* **1991**, *24*, 883–888.
- [202] Gross, J. D.; Costa, P. R.; Dubacq, J. P.; Warschawski, D. E.; Lirsac, P. N.; Devaux, P. F.; Griffin, R. G. *Journal of Magnetic Resonance Series B* **1995**, *106*, 187–190.
- [203] Melchels, F. P. W.; Velders, A. H.; Feijen, J.; Grijpma, D. W. *Macromolecules* **2010**, *43*, 8570–8579.
- [204] Chasse, W.; Lang, M.; Sommer, J. U.; Saalwachter, K. *Macromolecules* **2012**, *45*, 899–912.
- [205] Wilson, H.; Byrne, S.; Bampos, N.; Mullen, K. M. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 2105–2115.
- [206] Calucci, L.; Forte, C.; Ranucci, E. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2936–2942.
- [207] Abdurrahmanoglu, S.; Okay, O. *Macromolecules* **2008**, *41*, 7759–7761.
- [208] Flaim, C. J.; Chien, S.; Bhatia, S. N. *Nature Methods* **2005**, *2*, 119–125.
- [209] Flaim, C. J.; Teng, D.; Chien, S.; Bhatia, S. N. *Stem Cells and Development* **2008**, *17*, 29–40.
- [210] Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. *Science* **1987**, *238*, 491–497.
- [211] Cai, L.; Lu, J.; Sheen, V.; Wang, S. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 342–349.
- [212] Wang, J.-H.; Hung, C.-H.; Young, T.-H. *Biomaterials* **2006**, *27*, 3441–3450.

- [213] Schneider, G. B.; English, A.; Abraham, M.; Zaharias, R.; Stanford, C.; Keller, J. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3023–3028.
- [214] Royce Hynes, S.; McGregor, L. M.; Ford Rauch, M.; Lavik, E. B. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2007**, *18*, 1017–1030.
- [215] Dadsetan, M.; Knight, A. M.; Lu, L.; Windebank, A. J.; Yaszemski, M. J. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3874–3881.
- [216] Zimmerman, E.; Geiger, B.; Addadi, L. *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 1848–1857.
- [217] Fotia, C.; Messina, G. M.; Marletta, G.; Baldini, N.; Ciapetti, G. *European Cells and Materials* **2013**, *26*, 133–149.
- [218] Rilla, K.; Tiihonen, R.; Kultti, A.; Tammi, M.; Tammi, R. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2008**, *56*, 901–910.
- [219] Cohen, M.; Joester, D.; Geiger, B.; Addadi, L. *ChemBiochem* **2004**, *5*, 1393–1399.
- [220] Lai, Y.; Xie, C.; Zhang, Z.; Lu, W.; Ding, J. *Biomaterials* **2010**, *31*, 4809–4817.
- [221] Kalinina, S.; Gliemann, H.; López-García, M.; Petershans, A.; Auernheimer, J.; Schimmel, T.; Bruns, M.; Schambony, A.; Kessler, H.; Wedlich, D. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3004–3013.
- [222] Chollet, C.; Chanseau, C.; Brouillaud, B.; Durrieu, M. *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 477–482.
- [223] Feng, Y.; Mrksich, M. *Biochemistry* **2004**, *43*, 15811–15821.
- [224] Jung, J. P.; Gasiorowski, J. Z.; Collier, J. H. *Peptide Science* **2010**, *94*, 49–59.
- [225] van Hest, J. C. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* **2007**, *47*, 63–92.

- [226] Lee, S. T.; Im Yun, J.; Jo, Y. S.; Mochizuki, M.; van der Vlies, A. J.; Kontos, S.; Ihm, J. E.; Lim, J. M.; Hubbell, J. A. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1219–1226.
- [227] Cooke, M.; Zahir, T.; Phillips, S.; Shah, D.; Athey, D.; Lakey, J.; Shoichet, M.; Przyborski, S. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2010**, *93*, 824–832.
- [228] Brösicke, N.; Sallouh, M.; Prior, L.-M.; Job, A.; Weberskirch, R.; Faissner, A. *Cellular and Molecular Neurobiology* **2015**, 1–13.
- [229] Mohanram, Y.; Kirkham, J.; Yang, X. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* **2012**, *94*, 19–19.
- [230] Hole, B. B.; Schwarz, J. A.; Gilbert, J. L.; Atkinson, B. L. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2005**, *74*, 712–721.
- [231] Suzuki, M.; Itoh, S.; Yamaguchi, I.; Takakuda, K.; Kobayashi, H.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. *Journal of Neuroscience Research* **2003**, *72*, 646–659.
- [232] Boateng, S. Y.; Lateef, S. S.; Mosley, W.; Hartman, T. J.; Hanley, L.; Russell, B. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2005**, 288, C30–C38.
- [233] Zustiak, S. P.; Durbal, R.; Leach, J. B. *Acta Biomaterialia* **2010**, *6*, 3404–3414.
- [234] Derda, R.; Li, L.; Orner, B. P.; Lewis, R. L.; Thomson, J. A.; Kiessling, L. L. *ACS Chemical Biology* **2007**, *2*, 347–355.
- [235] Sallouh, M.; Jarocki, M.; Sallouh, O.; Degen, P.; Faissner, A.; Weberskirch, R. *Macromolecular Bioscience* **2016**.
- [236] Caniggia, I.; Liu, J.; Han, R.; Wang, J.; Tanswell, A.; Laurie, G.; Post, M. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **1996**, *270*, L459–L468.

- [237] Li, X.; Liu, X.; Josey, B.; Chou, C. J.; Tan, Y.; Zhang, N.; Wen, X. *Stem Cells Translational Medicine* **2014**, *3*, 662–670.
- [238] KERN, A.; EBLE, J.; GOLBIK, R.; KÜHN, K. *European Journal of Biochemistry* **1993**, *215*, 151–159.
- [239] Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G. *Journal of Cell Science* **2000**, *113*, 1677–1686.
- [240] Jepsen, K.; Solum, D.; Zhou, T.; McEvelly, R. J.; Kim, H.-J.; Glass, C. K.; Hermanson, O.; Rosenfeld, M. G. *Nature* **2007**, *450*, 415–419.
- [241] Campbell, I. D.; Humphries, M. J. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, *3*, a004994.
- [242] Ventre, M.; Causa, F.; Netti, P. A. *Journal of the Royal Society Interface* **2012**, rsif20120308.
- [243] Cohen, M.; Kam, Z.; Addadi, L.; Geiger, B. *The EMBO Journal* **2006**, *25*, 302–311.
- [244] Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Cell* **2006**, *126*, 677–689.
- [245] Watt, F. M.; Huck, W. T. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013**, *14*, 467–473.
- [246] Chen, Y.-C.; Lee, D.-C.; Tsai, T.-Y.; Hsiao, C.-Y.; Liu, J.-W.; Kao, C.-Y.; Lin, H.-K.; Chen, H.-C.; Palathinkal, T. J.; Pong, W.-F.; et al. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5575–5587.
- [247] Yang, K.; Jung, K.; Ko, E.; Kim, J.; Park, K. I.; Kim, J.; Cho, S.-W. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 10529–10540.



- [248] Hao, X.; Nilsson, C.; Jesberger, M.; Stenzel, M. H.; Malmström, E.; Davis, T. P.; Östmark, E.; Barner-Kowollik, C. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2004**, *42*, 5877–5890.
- [249] Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 5441–5452.
- [250] Zinieris, N.; Leondiadis, L.; Ferderigos, N. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2005**, *7*, 4–6.
- [251] Fields, C.; Lloyd, D.; Macdonald, R.; Otteson, K.; Noble, R. *Peptide Research* **1990**, *4*, 95–101.
- [252] Qin, M.; Hou, S.; Wang, L.; Feng, X.; Wang, R.; Yang, Y.; Wang, C.; Yu, L.; Shao, B.; Qiao, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *60*, 243–249.
- [253] Novak, B. M. *Advanced Materials* **1993**, *5*, 422–433.
- [254] von Holst, A.; Sirko, S.; Faissner, A. *The Journal of Neuroscience* **2006**, *26*, 4082–4094.
- [255] Sommer, I.; Schachner, M. *Developmental Biology* **1981**, *83*, 311–327.
- [256] Sirko, S.; Akita, K.; Von Holst, A.; Faissner, A. *Methods in Enzymology* **2010**, *479*, 37–71.



# Tabellenverzeichnis

1.1. Natürliche Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen. . . .	17
1.2. Synthetische Materialien als künstliche EZM für neurale Stammzellen. . .	20
3.1. Ergebnisse der Polymerisation von <b>P-02</b> bis <b>P-07</b> . . . . .	56
3.2. Ergebnisse der Polymerisation von <b>P-08</b> bis <b>P-11</b> . . . . .	59
4.1. Zusammensetzung und Geleigenschaften der Gele <b>G2</b> bis <b>G6</b> . . . . .	69
4.2. Bestimmung der Zusammensetzung der Gele mittels <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie nach Spaltung des Disulfidvernetzers. . . . .	73
4.3. Vergleich der aromatischen Signalstärke in Bezug auf die aliphatische Si- gnalintensität im Bereich von 0 von 2,5 ppm. . . . .	75
5.1. Hergestellte Peptidsequenzen mit ihren EZM-Stammproteinen und Funk- tionen. . . . .	83
5.2. Zusammensetzung und Geleigenschaften der Gele <b>G7</b> bis <b>G15</b> . . . . .	89



# Abbildungsverzeichnis

1.1. Schematische Darstellung der Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie schematische Darstellung der Funktion der Astrozyten und Oligodendrozyten. . . . .	6
1.2. Schematische Darstellung der EZM . . . . .	8
1.3. Schematische Darstellung des kreuzförmigen Glykoproteins Laminin . .	10
1.4. Tenascin-C als sechsarmiges hexabrachionförmiges Glykoprotein . . . .	11
1.5. Dreidimensionale Struktur der 10. Domäne Typ III von Fibronectin; die rote Schleife stellt die RGD-Peptidsequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp.) dar. . . . .	12
1.6. Beispiele für die Verwendung von Hydrogelen: 1. Nanoreaktor, 2. Biomaterialien, Zellnische, 3. Chemische/biologische Trennung, 4. Funktionalisiertes Hydrogel, 5. Wirkstofffreisetzung, 6. Superabsorber. . . . .	22
1.7. Vernetzungsstrategien der chemisch vernetzten Hydrogele. . . . .	24
1.8. Oszillationsexperiment. Amplitudenreduzierung und Phasenverschiebung bei einer sinusförmigen Deformation $\gamma$ einer viskoelastischen Probe. . . .	30
1.9. Verlauf von $G'$ und $G''$ als Funktion der Kreisfrequenz . . . . .	32
1.10. Schematische Darstellung einer Messprobe im magischen Winkel. . . . .	35
1.11. Allgemeine Struktur eines RAFT-Reagens. . . . .	44
1.12. Richtlinien für die Auswahl eines RAFT-Reagens . . . . .	45

2.1.	Schematische Darstellung der Zielsetzung. Von a) zu b): Imitierung einer natürlichen EZM durch Biohybridhydrogel. . . . .	49
3.1.	Kinetische Messung der RAFT-Polymerisation von AA mittels CTA2 in Wasser bei 70 °C via APS/TEMED-System für $(\frac{[M]_0}{[CTA]}) = 200$ . Der Monomerverbrauch wurde mittels GC-MS ermittelt. . . . .	58
3.2.	Verschiedene GPC-Messungen der RAFT-Polymerisationen von AA mittels CTA1 im Wasser. Blau: $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$ bei 20 °C, rot: $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 250$ bei 70 °C, grün: $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$ bei 20 °C, schwarz: $\frac{[M]_0}{[CTA]} = 1000$ bei 70 °C. . .	60
4.1.	Speichermodul $G'$ und Verlustmodul $G''$ als Funktion der Frequenz und Spannung. . . . .	67
4.2.	a) $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von <b>G2</b> (in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ), b) $^1\text{H-HR-MAS-NMR}$ -Spektrum von <b>G2</b> bei einer Drehzahlgeschwindigkeit von 3,5 kHz (gequollen in $\text{D}_2\text{O}$ mit Unterdrückung des Wassersignals) und c) $^1\text{H-NMR}$ von <b>G2</b> nach Disulfid-Spaltung (gequollen $\text{D}_2\text{O}$ mit Unterdrückung des Wassersignals). . . . .	71
4.3.	Zuordnung der Peptidanteile quantitativ der NMR-Signale von <b>G2</b> (in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ). . . . .	72
4.4.	$^1\text{H-HR-MAS}$ -Spektrum der Polymere <b>G1 – G6</b> gequollen in $\text{D}_2\text{O}$ . . . . .	74
4.5.	$^1\text{H-HR-MAS}$ -Daten: Vergleich des gemessenen aromatischen Protonensignals (7,1–7,3 ppm) mit dem gemessenen aliphatischen Protonensignal (0–2,5 ppm) der Hydrogele <b>G1 – G6</b> (◆), $^1\text{H-NMR}$ -Daten nach Spaltung der Disulfidvernetzer: Vergleich des gemessenen aromatischen Protonensignals (7,1–7,3 ppm) mit dem gemessenen aliphatischen Protonensignal (0–2,5 ppm) der Hydrogele <b>G1 – G6</b> (■) und der theoretischen Berechnung – basierend auf der eingesetzten Monomierzusammensetzung bei der Hydrogelzubereitung (▲). . . . .	77

---

5.1. Exemplarische Aufnahme einer Neurosphäre und migrierender Zellen in einem Zeitraum von 0 bis 24 h. . . . .	84
5.2. Einfluss der löslichen Peptide (GRGDSF, MNYYSNS und IKVAV) auf die Migration von neuronalen Stammzellen. . . . .	85
5.3. Schematische Darstellung der Kultivierung von Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen. . . . .	91
5.4. Die Adhäsion von Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen auf der Gelgruppe I ( <b>G7</b> bis <b>G9</b> , adhäsionsförderndes Motiv = 1 mol% GRGDSF), 72 h, immunzytochemische Doppelfärbung (Vinculin, Phalloidin). Die Zellen neigten zur Bildung zellulärer Cluster und bildeten keine netzwerkähnliche Struktur. Der Maßstab balken entspricht 50 $\mu\text{m}$ . . . . .	92
5.5. Statistische Quantifikation und Vergleich der Anzahl der adhäsierenden neuronalen Stammzellen auf den Gelgruppen II und III. Die Anzahl der Zellen auf <b>G10</b> und <b>G13</b> (weiche Gele mit 2 mol% Vernetzer) wurde unter 200 Zellen detektiert. Eine deutliche Steigerung wurde auf den festere Gelen mit 8 mol% Vernetzer ( <b>G11</b> und <b>G14</b> ) festgestellt, wobei auf dem Gel mit zwei adhäsionsfördernden Motiven ( <b>G14</b> ) fast doppelt so viele Zellen wie bei <b>G11</b> gezählt wurden. Die statistische Auswertung basierte auf fünf unabhängigen Messungen (n=5) mit folgenden Werten: $\pm$ Stichprobenfehler und P-Werten von * $P < 0,05$ und ** $P < 0,01$ (Zweistichproben-t-Test mit unabhängigen Stichproben). . . . .	94
5.6. Bestimmung der Adhäsion der Maus-embryonalen neuronalen Stammzellen auf künstlichem Hydrogelsubstrat mittels immunzytochemischer Doppelfärbung ((a) und (c)) und Hellfeldmikroskopie ((b) und (d)) nach 72 h <i>in vitro</i> . In (a) und (c) wurden Antikörper gegen Phalloidin und Vinculin für das Sichtbarmachen des Zytoskeletts und der zellulären Fokaladhäsion der adhären Zellen verwendet. Der Maßstab balken entspricht 50 $\mu\text{m}$ . .	97

- 5.7. Die auf dem bioaktiven Hydrogel kultivierten neuronalen Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Proliferierungskapazität mittels immunzytochemischer Färbung gegen das eingebaute BrdU nach 72 h *in vitro* mit einem 12 h dauernden BrdU-Puls vor der Einfärbung analysiert. (a) Mikroskopische Aufnahmen von embryonalen neuronalen Stammzellen, die mit Antikörpern gegen BrdU behandelt wurden, zeigten während der DNA-Replikation das eingebaute Thymidinanalogon. Der Maßstabbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . (b) Statistische Quantifizierung und Vergleich. Weder Unterschiede in der Gelfestigkeit noch der Einsatz von bioaktiven Peptiden schienen einen signifikanten Einfluss auf die zelluläre Proliferationskapazität zu haben. Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen (n=3) mit der Ausnahme von Hydrogel **G12** (n=2) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler. (Zweistichproben-t-Test mit unabhängigen Stichproben). . . . . 99
- 5.8. Die auf dem Hydrogel kultivierten embryonalen neuronalen Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Differenzierung mittels immunzytochemischer Doppelfärbung nach 72 h *in vitro* bestimmt. (a) Antikörper gegen III- $\beta$ -Tubulin und GFAP wurden für die Mengenbestimmung von Neuronen und Astrozyten unter den kultivierten Zellen verwendet. (b) Statistische Quantifikation und Vergleich. Die Menge der Klasse III- $\beta$ -Tubulin-positiven Zellen ist auf weichem Gel im Vergleich zu härterem Gel signifikant gestiegen. Der Maßstabbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen (n=3) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler und P-Werte von \* P < 0,05 und \*\* P < 0,01 (*two-way analysis of variance with Scheffé procedure for post-hoc test*). . . . . 101



- 
- 5.9. Die auf Hydrogel kultivierten embryonalen neuralen Stammzellen wurden hinsichtlich ihrer Differenzierung mithilfe von immunzytochemischer Doppelfärbung nach 72 h *in vitro* bestimmt. (a) Antikörper gegen O4 und Nestin wurden zur Mengenbestimmung bei den Oligodendrozyten und Vorläuferzellen unter den kultivierten Zellen verwendet. (b) Statistische Quantifizierung. Die Menge der O4-positiven Zellen stieg bei weicheren Gelen im Vergleich zu härteren Gelen signifikant an. Die statistische Auswertung basiert auf drei unabhängigen Messungen (n=3) mit folgenden Werten:  $\pm$  Stichprobenfehler und P-Werte von \*\*\*  $P < 0,001$  (*two-way analysis of variance with Scheffé procedure for post-hoc test*). . . . . 102
- 6.1. (a) Syntheschema der Polymernetzwerke mit spaltbarem Disulfidvernetzer und (b)  $^1\text{H}$  HR MAS NMR Spektren der Polymere **G1 – G6** gequollen in  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ . . . . . 110
- 6.2. Modell der zweistufigen Zelladhäsion Maus-embryonaler neuraler Stammzellen. (1) Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ-geladenen perizellulären Matrix und der kationischen Geloberfläche und (2) Integrin-RGD Wechselwirkungen auf einer Distanz von 20-25 nm.<sup>235</sup> . . . . . 113
- 7.1. HRMS (ESI-MS) von 6Ahx6AhxGRGDSF: gerechnet m/z: 863,45  $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$  gefunden m/z: 432,73  $[\text{M}+2\text{H}]^{++}$ . . . . . 123
- 7.2. HRMS (ESI-MS) von MNYYSNS : gerechnet m/z: 877,33  $\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}$  gefunden m/z: 878,33  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . . . . . 124
- 7.3. HRMS (ESI-MS) von IKVKAV : gerechnet m/z: 528,36  $\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_6$  gefunden m/z: 529,37  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . . . . . 125
- 7.4. HRMS (ESI-MS) von Monomer-6Ahx6AhxGRGDSF : gerechnet m/z: 931,476  $\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{N}_{11}\text{O}_{13}$  gefunden m/z: 932,484  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . . . . . 128

.5.	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY der Probe <b>G4</b> mit 4 mol % Vernetzer. . . . .	171
.6.	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY der Probe <b>G4</b> mit 4 mol % Vernetzer. . . . .	172
.7.	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC der Probe <b>G4</b> mit 4 mol % Vernetzer (sensitive Phase: blau für $\text{CH}_2$ -Gruppen und rot für $\text{CH}$ - und $\text{CH}_3$ -Gruppen). . . . .	173
.8.	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC der Proben <b>G4</b> mit 4 mol % Vernetzer. . . . .	174
.9.	$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HMBC des Copolymers der <b>G4</b> ohne Vernetzer. . . . .	175
.10.	Adhäsion von NSC. Adhäsion von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h <i>in vitro</i> Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat. . . . .	176
.11.	Differenzierung von NSC. Differenzierung von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h <i>in vitro</i> Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat. . . . .	177
.12.	Differenzierung von NSC. Differenzierung von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h <i>in vitro</i> Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat. . . . .	178
.13.	Speicher- und Verlustmodul als (a) Funktion der Spannung und (b) Frequenz für die Hydrogele <b>G13</b> bis <b>G15</b> (AEMA und RGD) mit unterschiedlicher Vernetzerkonzentration (2, 8, 16 mol% Vernetzer). . . . .	179

# Schemenverzeichnis

1.1. Nachträgliche Vernetzung. Click-Chemie (Kupfer (I)-Katalysator). . . . .	26
1.2. Nachträgliche Vernetzung. Click-Chemie (Kupfer(I)-frei). . . . .	26
1.3. Nachträgliche Vernetzung. Thiol-Michael-Addition. . . . .	27
1.4. Start der radikalischen Polymerisation. . . . .	37
1.5. Kettenwachstum der radikalischen Polymerisation. . . . .	37
1.6. Rekombination der radikalischen Polymerisation. . . . .	37
1.7. Disproportion der radikalischen Polymerisation. . . . .	38
1.8. Gleichgewicht zwischen aktiver und schlafender Spezies in der CRP. . . . .	39
1.9. Allgemeine Darstellung des PRE. <sup>145</sup> . . . . .	40
1.10. Allgemeiner RAFT-Mechanismus mit Dithiocarbonyl-RAFT-Reagenz. . . . .	43
1.11. Gesamtprozess der RAFT-Polymerisation. . . . .	43
1.12. Die RAFT-Reagenz-Klassen: a) Dithioester, b) Trithiocarbonate, c) Xan- thate und d) Dithiocarbamate. . . . .	44
3.1. Möglicher Initiierungsmechanismus der RAFT-Polymerisation mittels APS/TEMED- Systems. . . . .	55
3.2. Verwendete Monomere und RAFT-Reagenzien. . . . .	56
3.3. Mögliche Resonanzstrukturen des intermediären RAFT-Adduktradikals mit Dithiobenzoat-RAFT-Reagenz. . . . .	57

4.1. Herstellung Peptid-funktionalisierter Hydrogele ( <b>G1 – G6</b> ) mit einem spaltbaren Disulfidvernetzer und der reduktiven Spaltung zur Erzeugung von löslichen Copolymeren. . . . .	66
5.1. Adhäsionsfördernde Peptidsequenz RGDfK (RGDfK in zyklischer Form). . . . .	81
5.2. Allgemeine Herstellung eines Peptidmonomers PM. . . . .	87
5.3. Darstellung der drei Biohybridhydrogelgruppen. . . . .	88
6.1. Eingesetzte Monomere und RAFT-Reagenzien, die in der Polymerisation in Wasser bei 20 °C bzw. 70 °C mit APS/TEMED untersucht wurden. . .	109
6.2. Chemische Zusammensetzung der drei Polymernetzwerkegruppen. . . .	112
7.1. 6Ahx6AhxGRGDSF-Peptidsequenz. . . . .	123
7.2. MNYYSNS-Peptidsequenz. . . . .	124
7.3. IKVKAV. . . . .	125
7.4. Monomer-6AHX6AHXGRGDSF. . . . .	126

# Anhang

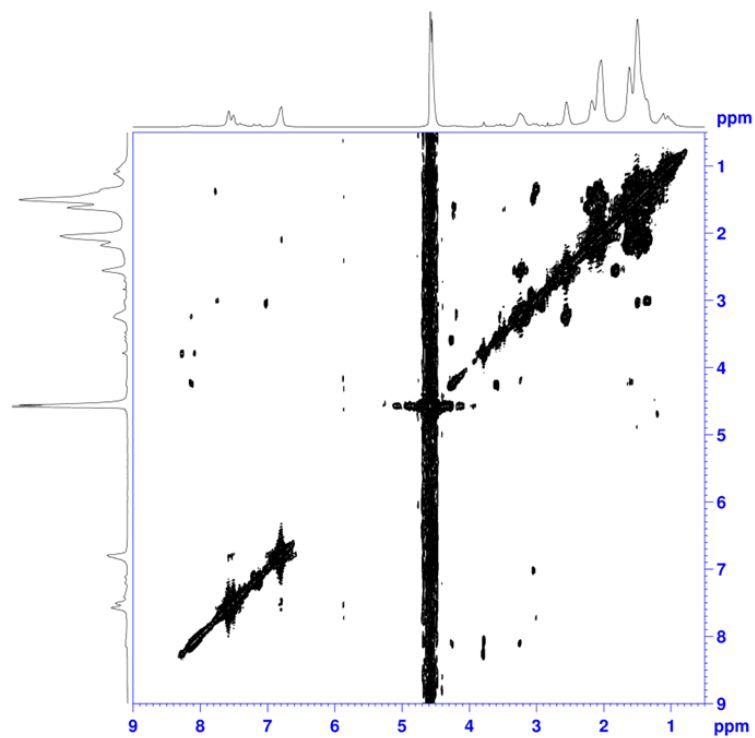


Abbildung .5.:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY der Probe **G4** mit 4 mol % Vernetzer.

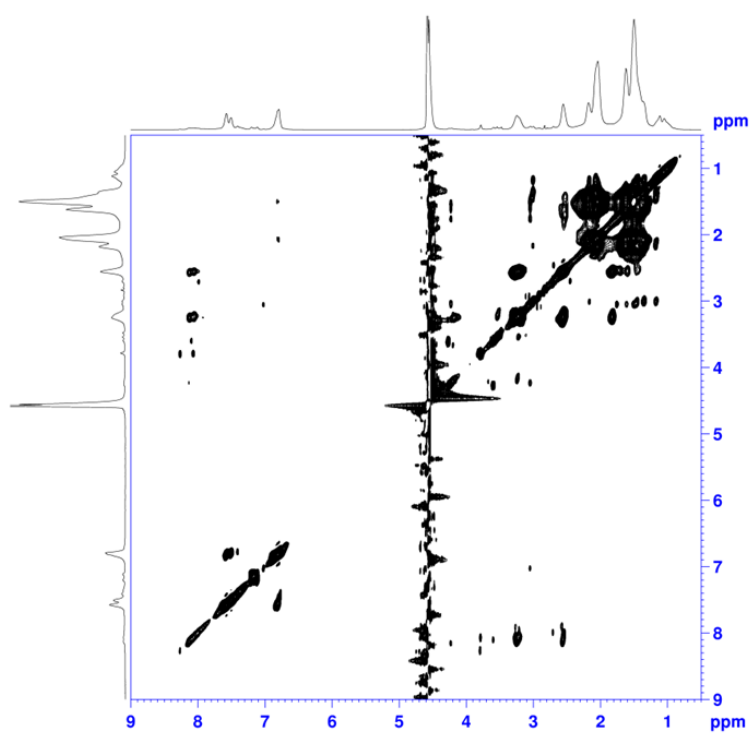


Abbildung .6.:  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY der Probe **G4** mit 4 mol % Vernetzer.

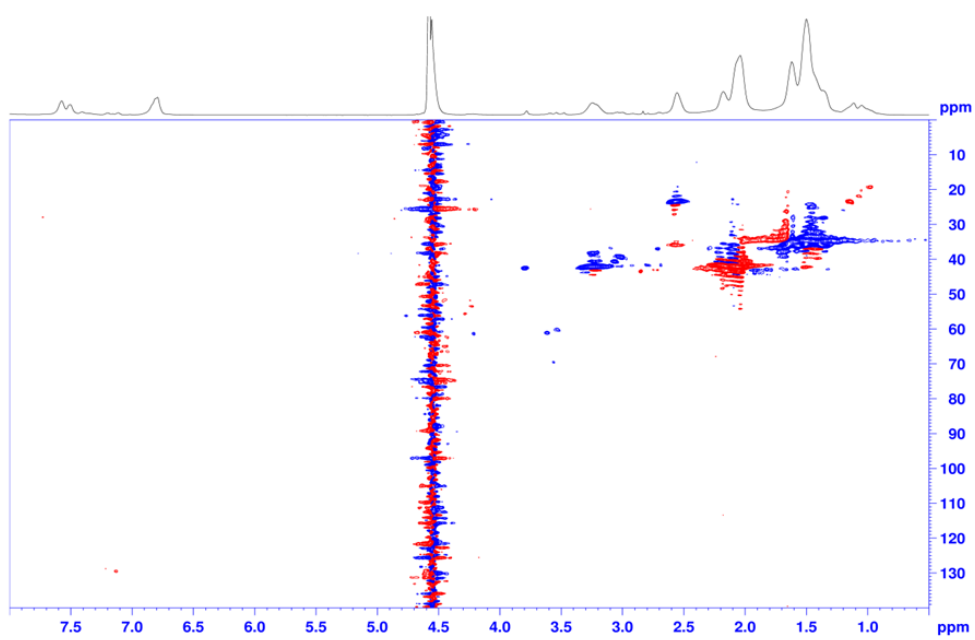


Abbildung .7.:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC der Probe **G4** mit 4 mol % Vernetzer (sensitive Phase: blau für  $\text{CH}_2$ -Gruppen und rot für  $\text{CH}$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen).

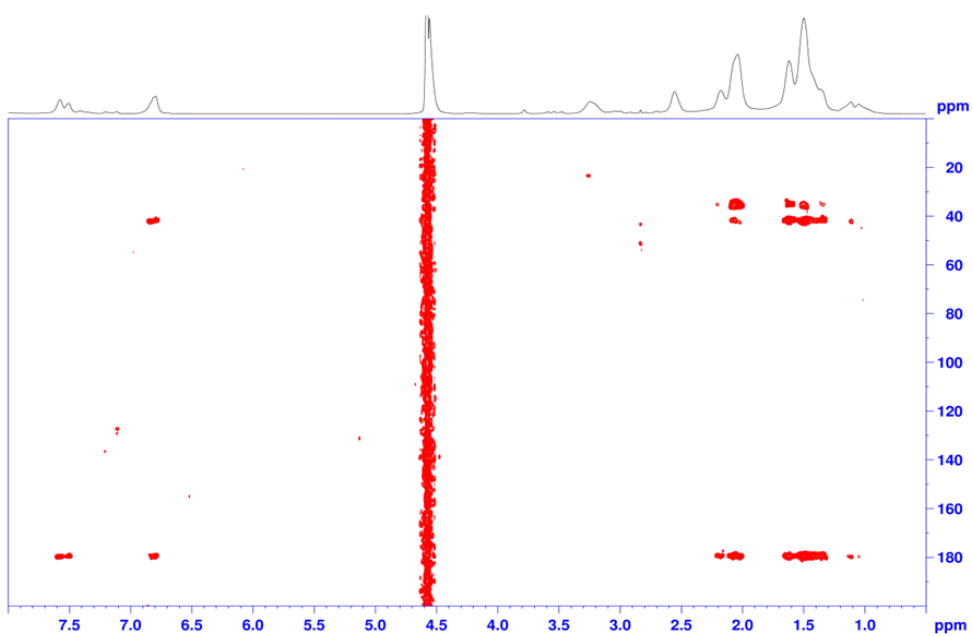


Abbildung .8.:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC der Proben **G4** mit 4 mol % Vernetzer.



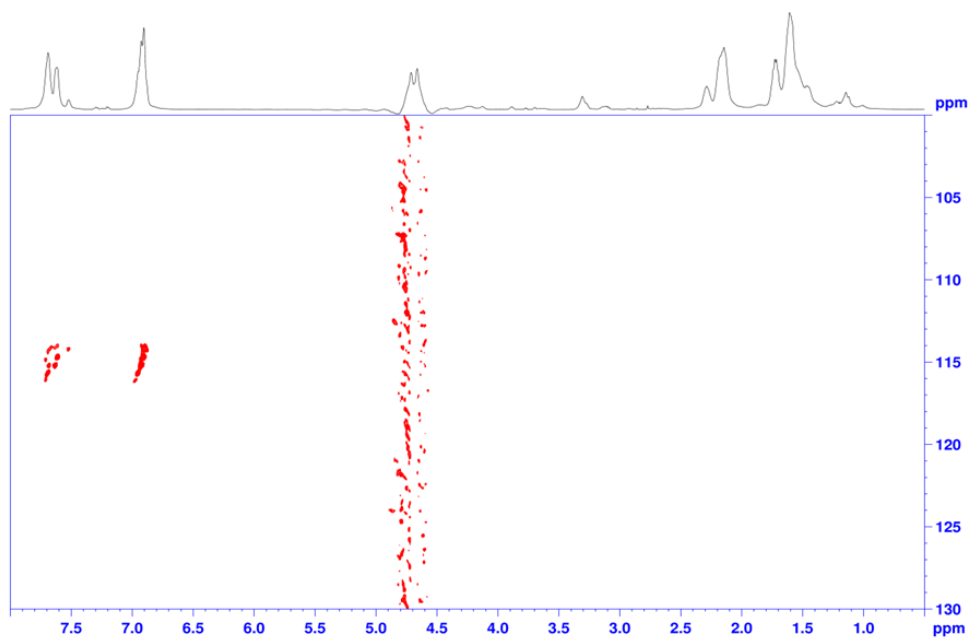


Abbildung .9.:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC des Copolymers der **G4** ohne Vernetzer.

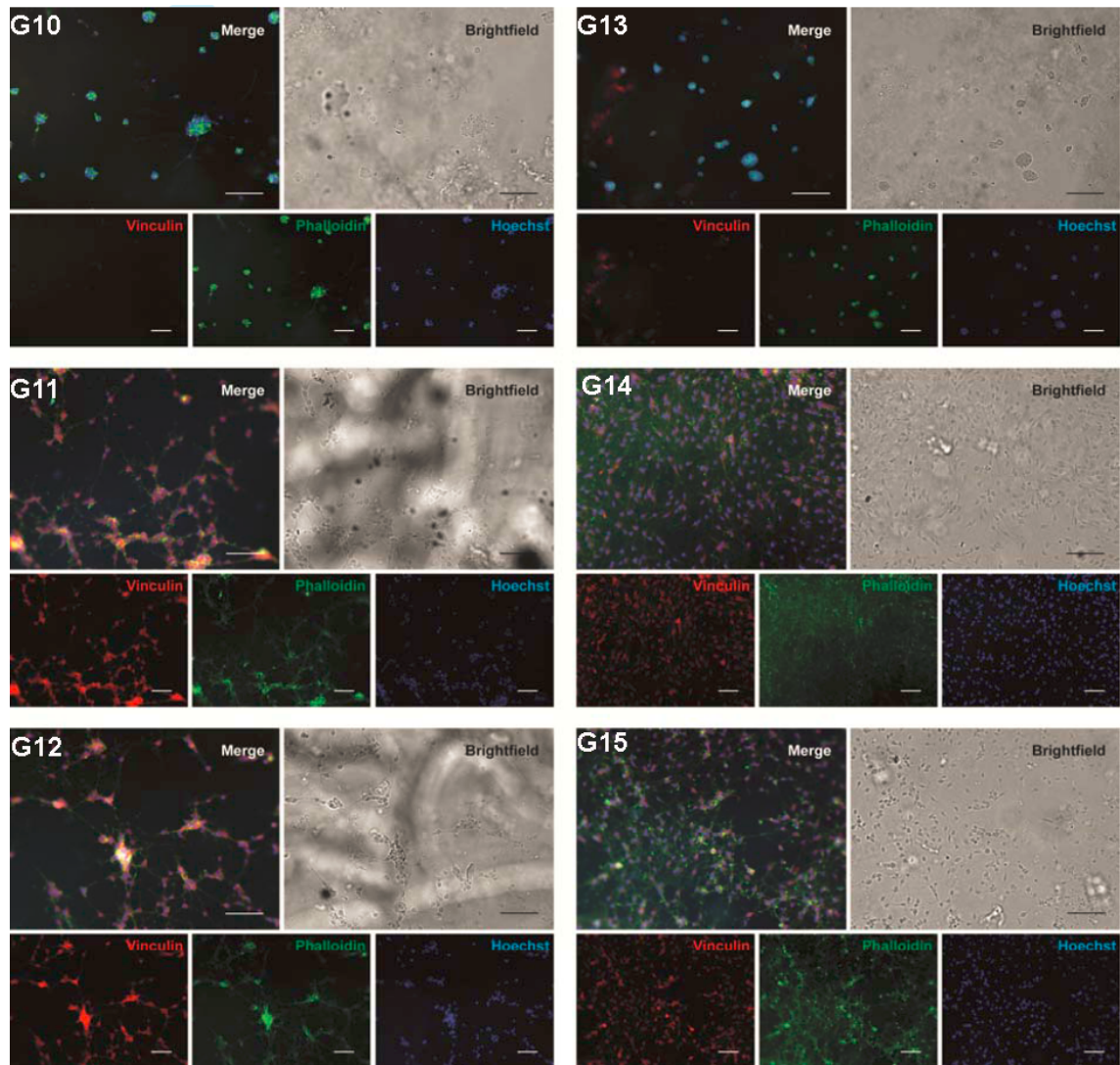


Abbildung .10.: Adhäsion von NSC. Adhäsion von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h *in vitro* Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat.

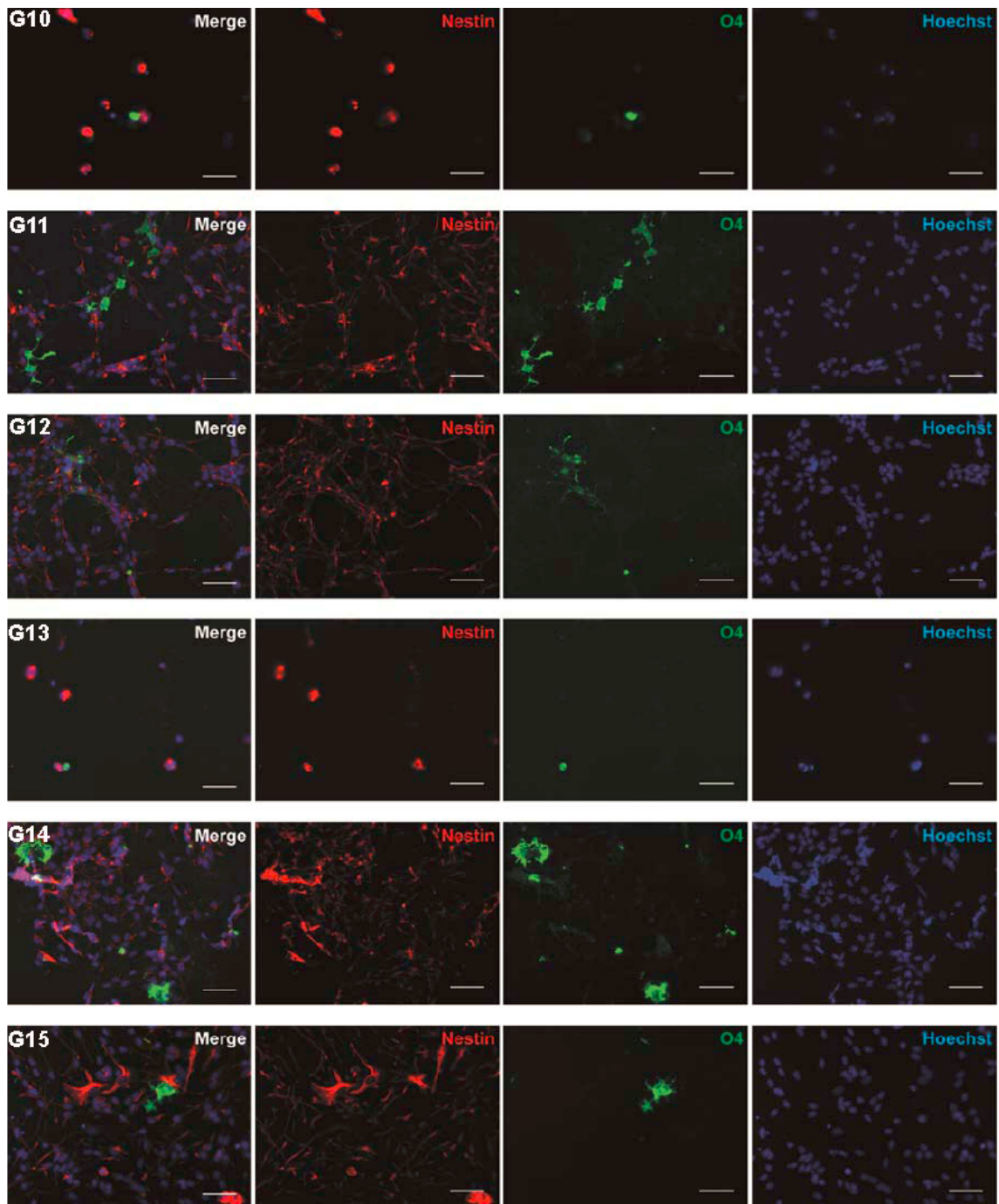


Abbildung .11.: Differenzierung von NSC. Differenzierung von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h *in vitro* Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat.

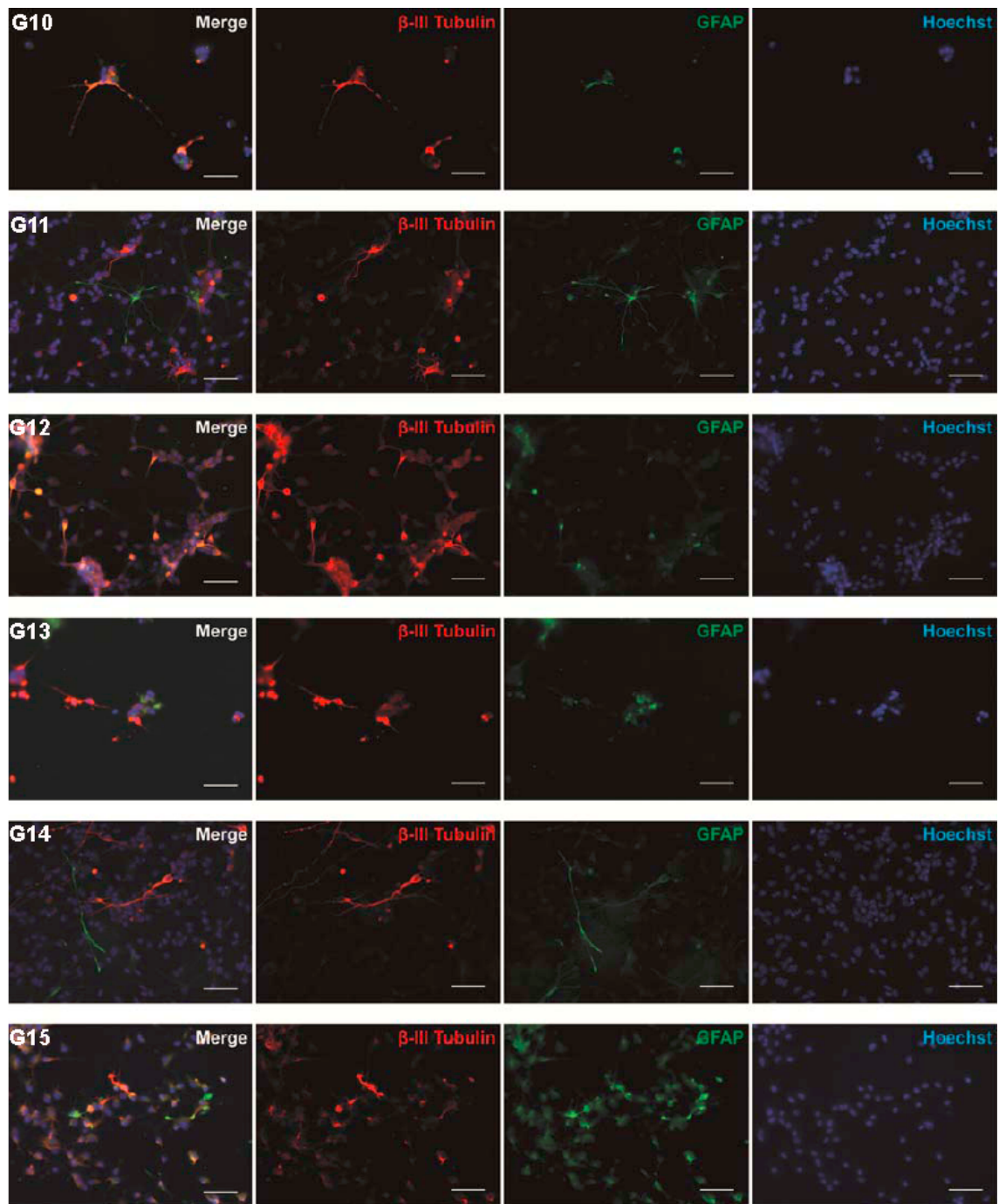
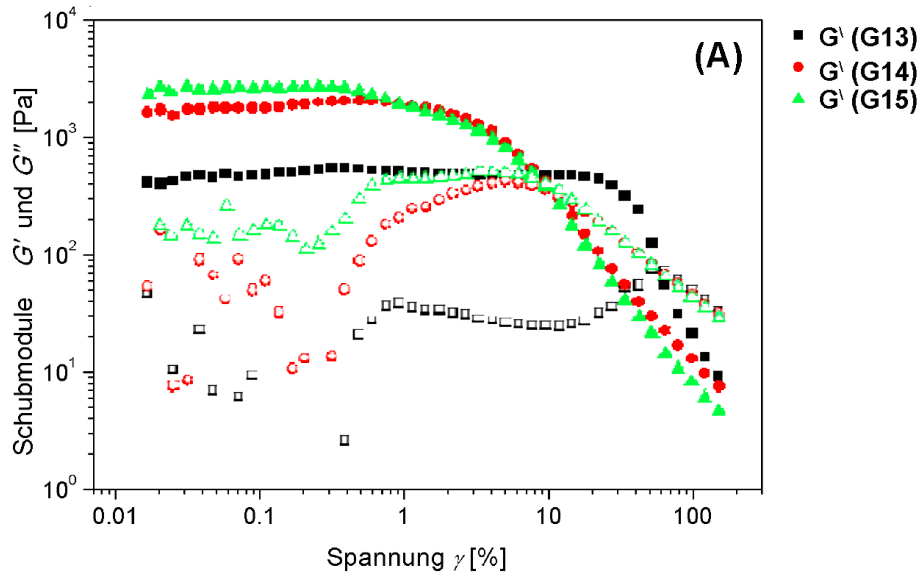
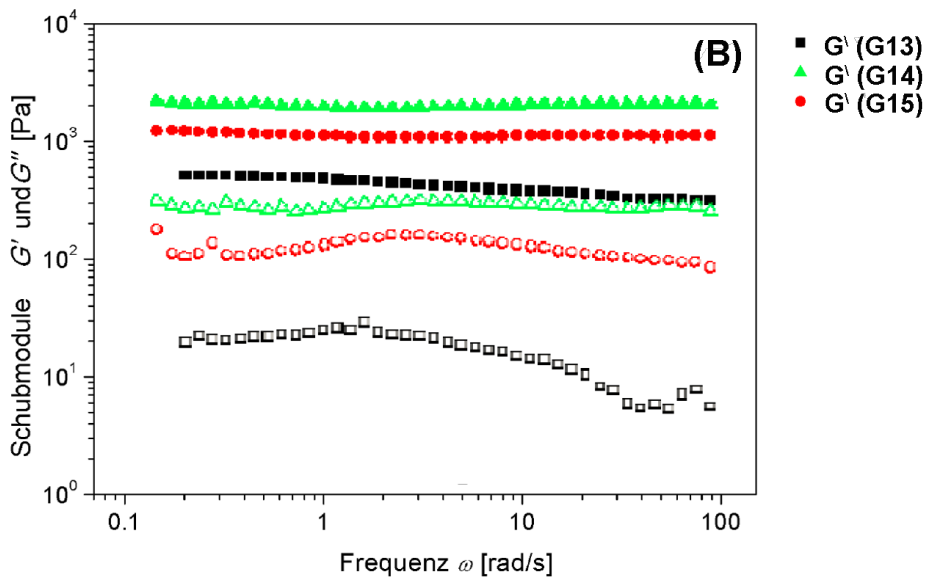


Abbildung .12.: Differenzierung von NSC. Differenzierung von embryonalen neuronalen Stammzellen nach 72 h *in vitro* Kultivierung auf künstlichem Hydrogelsubstrat.



(a)



(b)

Abbildung .13.: Speicher- und Verlustmodul als (a) Funktion der Spannung und (b) Frequenz für die Hydrogele **G13** bis **G15** (AEMA und RGD) mit unterschiedlicher Vernetzerkonzentration (2, 8, 16 mol% Vernetzer).