

Synthese und Charakterisierung von Wirt-Gast-vernetzten Hydrogelen für 3D-Zellanwendungen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Arbeitsgruppe Polymere Hybridsysteme

vorgelegt von

Wiebke Schnettger

aus Datteln

Dortmund, 2025

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2020 bis März 2024 unter der Leitung von Herrn *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* an der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund erstellt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tiller

Eingereicht am: 26.02.2025

Danksagung

Herrn *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* danke ich herzlich für die Ermöglichung der Promotion und das interessante Promotionsthema. Außerdem möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Jörg Tiller* bedanke ich mich sehr für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Außerdem danke ich *PD Dr. Leif Dehmelt* für die Möglichkeit, Zellexperimente in seinem Arbeitskreis durchführen zu können. Besonders danke ich seinen Mitarbeiterinnen *Ricarda Lüttig* und *Carolin Gierse*, ohne deren Unterstützung die erfolgreiche Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen wäre. Für die Durchführung von Absorptionsmessungen möchte ich mich bei *Daniel Hafki* bedanken.

Bei *PD Dr. Frank Katzenberg* und *Volker Brandt* bedanke ich mich herzlich für die Aufnahme von REM-Bildern. Ein weiterer Dank sei an die NMR-Abteilung von *Prof. Dr. Wolf Hiller*, insbesondere an *Dr. Bastian Grabe*, für die schnelle Messung zahlreicher Proben gerichtet.

Ein großer Dank gilt den Mitgliedern des Arbeitskreises Weberskirch *Dr. Christian Gramse*, *Dr. Max Jopen*, *Dr. Florian Pätzold*, *Dr. Yannik Alt*, *Dr. Nils Stamm*, *Dr. Marvin Dieter*, *Janick Weßelmann*, *Lara Frentrup*, *Dieu Frosien*, *Wibke Langenkamp*, *Shenja Over* und *David Mroß* für die tolle Atmosphäre sowie die vielen fachlichen und außerfachlichen Gespräche.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei *Katja Weber* für die Chemikalienbestellungen und die Beantwortung vieler organisatorischer Fragen bedanken. *Andrea Bokelmann* danke ich für die Durchführung von GPC-Messungen und bei *Silvia Lessing* bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei bürokratischen und organisatorischen Angelegenheiten.

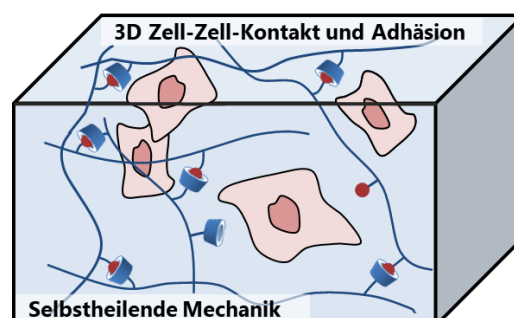
Ein großer Dank gilt auch den Studentinnen und Studenten *Dominik Schneeweiß*, *Lennard Richter*, *Fabian Röttger*, *Ricardo Ferreira*, *Tobias Ahlers*, *Maria Beerbaum*, *Mahmood Shekho* und *Gizem Karatas*, die über Praktika oder Abschlussarbeiten zu meiner Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei *Yasmin Sörries* und *Franziska Klutzny*, die ich während ihrer Ausbildung betreuen durfte und die mir eine große Unterstützung bei der Laborarbeit waren. Vielen Dank für euren Einsatz und euer Interesse an meinem Projekt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für deren Unterstützung während des gesamten Studiums. Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Bruder *Alexander*, der mit mir durch die Höhen und Tiefen des Studiums gegangen ist und mir stets unterstützend zur Seite stand.

Kurzfassung

In den letzten Jahren erfolgte eine rasche Entwicklung selbstheilender Hydrogele für Anwendungen in der Biomedizin, da diese eine einfache Methode zur dreidimensionalen (3D) Verkapselung von Zellen darstellen. Die 3D-Verkapselung von lebenden Zellen hat aufgrund ihrer vielfältigen Anwendungen, wie beispielsweise für die Wiederherstellung funktioneller Gewebe, die *in vitro*-Zellkultur, als vaskuläre Strukturen oder makroskopische Zellkonstrukte, an Bedeutung gewonnen. Allerdings stellt die gezielte Anpassung der mechanischen und chemischen Eigenschaften der Hydrogele an die Anforderungen der verschiedenen Anwendungen eine Herausforderung dar.

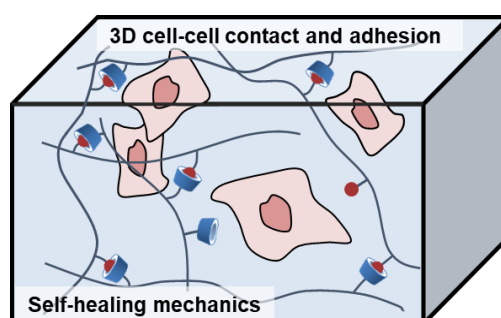
Daher wurde in dieser Arbeit ein vollsynthetisches, selbstheilendes Hydrogel, dessen Zusammensetzung gut kontrollierbar ist, entwickelt. Das Hydrogel basiert auf reversiblen Wirt-Gast-Vernetzungen zwischen β -Cyclodextrin (β -CD) und Adamantan (Ad). Es wurden Wirtpolymere hergestellt, indem β -CD an Poly(dimethylacrylamid-*co*-acrylamidohexansäure)-Copolymeren immobilisiert wurde. Die Gastpolymere wurden durch einfache Copolymerisation von Dimethylacrylamid, [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid und dem Gastmonomer 6-Acrylamido-*N*-(adamantyl)hexanamid synthetisiert. Durch die Variation der Parameter Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration konnten die Steifigkeit, die Elastizität und die Selbstheilung der Hydrogele gezielt eingestellt werden. Außerdem konnte durch eine Kombination der Wirt-Gast-Vernetzung mit einer kovalenten Vernetzung über Poly(ethylenglykol)diacrylat eine Erhöhung der Steifigkeit auf das Neun- bis Zehnfache der Wirt-Gast-Hydrogele bei gleichzeitigem Erhalt der Fähigkeit zur Selbstheilung erzielt werden. Darüber hinaus wurde das Hydrogelsystem erfolgreich über eine Copolymerisation bzw. über eine polymeranaloge Immobilisierung von Peptidliganden biofunktionalisiert. In 3D-Zellexperimenten wurde die Biokompatibilität der Hydrogele sowie eine Förderung der Adhäsion von B16F1-Zellen durch RGD-Funktionalisierung der Hydrogele nachgewiesen. Folglich erwiesen sich die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele als geeignet für eine potenzielle Anwendung in der 3D-Zellkultivierung.



Abstract

In recent years, there has been a rapid development of self-healing hydrogels for biomedical applications as they provide a straightforward method for three-dimensional (3D) encapsulation of cells. The 3D encapsulation of living cells has gained importance due to its wide range of applications such as functional tissue restoration, *in vitro* cell culture, as vascular structures or macroscopic cell constructs. However, tailoring the mechanical and chemical properties of the hydrogels to the requirements of the various applications remains a challenge.

Therefore, a fully synthetic, self-healing hydrogel with well controllable composition was developed in this work. The hydrogel is based on reversible host-guest cross-links between β -cyclodextrin (β -CD) and adamantane (Ad). Host polymers were prepared by immobilizing β -CD on poly(dimethylacrylamide-*co*-acrylamidohexanoic acid) copolymers. The guest polymers were synthesized by copolymerization of dimethylacrylamide, [2-(acryloyloxy)ethyl]trimethylammonium iodide and the guest monomer 6-acrylamido-*N*-(adamantyl)hexanamide. The combination of both polymers in aqueous solution led to the successful formation of dynamic hydrogels. By varying the parameters crosslinking density and total polymer concentration, the stiffness, elasticity and self-healing of the hydrogels could be adjusted. Furthermore, by combining host-guest crosslinking with covalent crosslinking via poly(ethylene glycol) diacrylate, an increase in stiffness of nine to ten times that of the host-guest hydrogels was achieved while maintaining the ability to self-heal. In addition, the hydrogel system was successfully biofunctionalized via copolymerization or polymer-analogue immobilization of peptide ligands. In 3D cell experiments, the biocompatibility of the hydrogels and the promotion of adhesion of B16F1 cells by RGD functionalization of the hydrogels were demonstrated. Consequently, the hydrogels produced in this work proved to be suitable for potential application in 3D cell cultivation.



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Polymere in der Medizin	1
1.2 Materialanforderungen in der Zellkultivierung	1
1.3 Die extrazelluläre Matrix.....	2
1.4 2D versus 3D Zellkultivierung	4
1.5 Hydrogele	5
1.5.1 Natürliche und synthetische Hydrogele.....	6
1.5.2 Chemische Hydrogele.....	7
1.5.3 Physikalische Hydrogele	9
1.6 Cyclodextrine.....	11
1.6.1 Cyclodextrine als Komplexbildner	13
1.6.2 Stand der Forschung – β -Cyclodextrin als Vernetzer in Hydrogelen	15
2. Zielsetzung.....	20
3. Synthese und Charakterisierung von Wirt-Gast-Hydrogelen	22
3.1 Entwicklung des Hydrogelsystems.....	22
3.2 Einfluss der Vernetzungsdichte und Polymerkonzentration auf die mechanischen Eigenschaften der Wirt-Gast-Hydrogele	26
3.2.1 Synthese der Wirtpolymere	26
3.2.2 Synthese der Gastpolymere	30
3.2.3 Synthese der Wirt-Gast-Hydrogele.....	32
3.2.4 Rheologische Charakterisierung der Wirt-Gast-Hydrogele.....	34
3.2.5 Morphologie der Hydrogele	40
3.2.6 Abschnittszusammenfassung	41
3.3 Copolymerisation von Peptidliganden und deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Wirt-Gast-Hydrogele	42
3.3.1 Einleitung und Zielsetzung.....	42
3.3.2 Synthese der Wirt- und Gastpolymere.....	45
3.3.3 Synthese der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des Kontrollgels	49
3.3.4 Rheologische Charakterisierung der peptidfunktionalisierten Hydrogele.....	50
3.3.5 Mikrostruktur der peptidfunktionalisierten Hydrogele.....	55
3.3.6 Abschnittszusammenfassung	57
3.4 Zellexperimente mit den Wirt-Gast-Hydrogelen.....	58
3.4.1 Zytokompatibilität der Wirt- und Gastpolymere	58
3.4.2 3D-Zellexperimente.....	61

3.4.3	Abschnittszusammenfassung	66
4.	Synthese und Charakterisierung thiolactonhaltiger Wirt-Gast-Hydrogele	67
4.1	Einleitung und Zielsetzung	67
4.2	Synthese der Wirt- und Gastpolymere	70
4.2.1	Synthese der Wirtpolymere	70
4.2.2	Synthese der thiolactonhaltigen Gastpolymere	73
4.2.2.1	Polymeranaloge Öffnung des Thiolactonrings	76
4.2.2.2	Peptidfunktionalisierung der ringgeöffneten Gastpolymere	80
4.3	Synthese der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele	85
4.4	Rheologische Charakterisierung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele	87
4.5	Mikrostruktur der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele	95
4.6	3D-Zellexperimente – Zytokompatibilität und Adhäsionsverhalten in thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen	96
4.7	Kapitelzusammenfassung	103
5.	Dual-vernetzte Hydrogele aus thiolactonhaltigen Copolymeren	106
5.1	Einleitung und Zielsetzung	106
5.2	Synthese der Wirt- und Gastpolymere	108
5.3	Synthese des PEGDA-Vernetzers	112
5.4	Hydrogelsynthese	112
5.5	Rheologische Charakterisierung der dual-vernetzten Hydrogele	115
5.6	Untersuchung der Gelierzeiten der dualen Hydrogele	125
5.7	Untersuchung der Quellwerte der dualen Hydrogele	127
5.8	Untersuchung der Mikrostruktur der dualen Hydrogele	128
5.9	Zytotoxizität der Wirt- und Gastpolymere	129
5.10	3D-Zellexperimente – Zytokompatibilität und Adhäsionsverhalten in den dualen Hydrogelen und den Kontrollgelen	130
5.11	Kapitelzusammenfassung	134
6.	Anwendung der Hydrogele zur Einbettung von Sphäroiden	137
6.1	Einleitung und Zielsetzung	137
6.2	Einbettung der Sphäroide in Wirt-Gast-Hydrogele	138
6.3	Untersuchung der Sphäroidmorphologie mittels Durchlichtmikroskopie	139
6.4	Kapitelzusammenfassung	141
7.	Zusammenfassung und Ausblick	142
8.	Experimenteller Teil	153
8.1	Materialien und Methoden	153
8.1.1	Materialien	153

8.1.2 NMR-Spektroskopie	153
8.1.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)	154
8.1.4 Rheologie.....	154
8.1.5 UV/Vis-Spektroskopie.....	159
8.1.6 IR-Spektroskopie	159
8.1.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	159
8.1.8 Hochauflösende Massenspektrometrie	160
8.1.9 Ellman's Assay	160
8.1.10 Bestimmung der Quellwerte	160
8.1.11 Zellkulturmedien.....	160
8.1.12 Cell Counting Kit 8 (CCK-8) Assay.....	161
8.1.13 3D-Zellexperimente und Lebend-Tot-Färbung	161
8.1.14 Herstellung und Einbettung von Sphäroiden.....	163
8.2 Synthesevorschriften	164
9. Literaturverzeichnis	177
10. Abkürzungsverzeichnis	208
11. Abbildungsverzeichnis	210
12. Tabellenverzeichnis	217
13. Schemataverzeichnis	219
14. Anhang.....	221
Eidesstattliche Versicherung.....	266

1. Einleitung

1.1 Polymere in der Medizin

Polymere sind aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Neben ihrer Anwendung als Verpackungs- und Beschichtungsmaterialien oder als Bestandteil von Kleidungsstücken, werden sie auch in der Medizin eingesetzt.¹⁻⁴ Beispielsweise werden in der modernen Medizin Einwegartikel wie Blutbeutel und Spritzen aus Kunststoff verwendet. Um für eine *in vivo* Anwendung geeignet zu sein, müssen die polymeren Materialien eine gewisse mechanische und thermische Stabilität sowie eine Nicht-Toxizität aufweisen.⁵ Beispiele für *in vivo* einsetzbare polymere Materialien sind Polymethylmethacrylat (PMMA) als Knochenzement, Polypropylen (PP) als Nahtmaterial oder polymere Nanopartikel als Wirkstofftransportsysteme.^{6,7} Des Weiteren können die zur Gefäßerweiterung verwendeten Stents neben Polyethylenterephthalat (PET) und expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) auch auf bioabbaubaren, wirkstofffreisetzenden Polymeren wie Poly-L-milchsäure (PLLA) oder Polyglykolsäure (PGA) basieren.^{8,9} Ein weiteres Beispiel für eine Materialentwicklung fand im Bereich der Kontaktlinsen statt, indem das früher meist verwendete PMMA aufgrund einer besseren Sauerstoffdurchlässigkeit gegen Tris(trimethylsiloxysilan)-(TRIS)-basierte Hydrogele ersetzt wurde.^{10,11} Hydrogele finden in der Medizin neben den Kontaktlinsen auch in vielen anderen Bereichen wie z. B. der Wundversorgung oder der Zellkultivierung Anwendung.¹² In ihrer Funktion als Zellkulturplattform sind Hydrogele dazu in der Lage, die *in vivo* Zellumgebung nachzuahmen und somit grundlegende, zellbiologische Untersuchungen, Gewebekonstruktionen und regenerative Medizin zu ermöglichen.¹³ Damit Hydrogele für diese zellbiologischen Anwendungen in Frage kommen, müssen sie einige Anforderungen erfüllen. Diese Anforderungen werden im Folgenden näher beschrieben.

1.2 Materialanforderungen in der Zellkultivierung

Das wichtigste Kriterium für die Anwendung eines Hydrogeles in der Zellkultivierung ist die Biokompatibilität. Unter Biokompatibilität wird die Nicht-Toxizität und Funktionalität in einer Anwendung verstanden. Dies bedeutet, dass ein Material mit seiner biologischen Umgebung interagiert, ohne selbst oder durch seine Abbauprodukte einen negativen Einfluss darauf auszuüben.⁵

Darüber hinaus ist die gezielte Modifizierbarkeit der biophysikalischen Eigenschaften wie der Steifigkeit, Elastizität, Viskosität und Porosität der Hydrogele für eine Anwendung in

Zellexperimenten essentiell, damit diese Eigenschaften gezielt an die jeweilige Anwendung angepasst werden können. Studien zum Einfluss der Steifigkeit auf das Zellverhalten zeigten, dass sowohl die Stammzellendifferenzierung als auch die Zellmigration und -adhäsion¹⁴⁻¹⁷ durch die Steifigkeit der Hydrogele gesteuert werden können, denn Zellen sind dazu in der Lage, mechanische Signale über Zelloberflächenrezeptoren in chemische Signale umzuwandeln (Mechanotransduktion) und so auf physikalische Änderungen ihrer Umgebung zu antworten.^{18,19} Aktuelle Forschungsarbeiten verdeutlichen außerdem die Bedeutung der Viskoelastizität für das Zellverhalten, denn das Aktin-Zytoskelett und die fokale Adhäsion reagieren sowohl auf die elastischen als auch auf die viskosen Eigenschaften des Hydrogels. Eine besonders sorgfältige Abstimmung der viskoelastischen Eigenschaften der Hydrogelmatrix kann über dynamische, reversible Vernetzungen erreicht werden.^{20,21}

Neben den biophysikalischen Eigenschaften sind auch die biochemischen Eigenschaften, die die Zell-Matrix-Wechselwirkungen beeinflussen, von Bedeutung. Bei biologisch inerten Materialien können Funktionalisierungen mit bioaktiven Peptidsequenzen, die aus Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) bekannt sind, eine Bioaktivität herbeibringen. Diese Biofunktionalisierung der Materialien kann zum Beispiel über kovalente Bindung,²² photochemische Pfropfung²³ oder nicht-spezifische Adsorption²⁴ erfolgen.²⁵

Auch der Syntheseprozess der Hydrogele ist entscheidend für einen erfolgreichen Einsatz in Zellexperimenten, denn für eine gezielte Einstellung der biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften sollte die Charakterisierbarkeit der Zusammensetzung nach der Synthese gegeben sein. Darüber hinaus sollte der Syntheseprozess hinsichtlich einer ökonomischen Tauglichkeit möglichst einfach und skalierbar gestaltet sein, um ausreichend große Mengen des Hydrogels herstellen zu können.²⁶

1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die Aufgabe von Hydrogelen in der Zellkultivierung ist es, die extrazelluläre Matrix (EZM) in ihren strukturellen und mechanischen Eigenschaften nachzuahmen, daher wird in diesem Abschnitt näher auf die extrazelluläre Matrix und deren Bestandteile eingegangen. Die extrazelluläre Matrix ist ein komplexes, hierarchisch organisiertes, nicht-zelluläres Netzwerk, das die Zellen im Gewebe umschließt und nicht nur als mechanische Stütze dient, sondern auch funktionale Eigenschaften besitzt. So nimmt die EZM Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Wachstum, Migration, Adhäsion und Differenzierung.²⁷⁻²⁹ Die native EZM besteht je nach Gewebetyp aus verschiedenen Bestandteilen, die Hauptkomponenten dabei sind Faserproteine,

wie Kollagen und Elastin, und Adhäsionsproteine, wie Fibronectin und Laminin. Das Faserprotein Kollagen sorgt für die mechanische Steifigkeit der EZM, während Elastin die Matrix mit Elastizität ausstattet.^{30,31} Die Proteine Fibronectin und Laminin enthalten spezifische Aminosäuresequenzen, die von Rezeptorproteinen (Integrinen) in der Zellmembran als Bindungsstellen erkannt werden und somit die Adhäsion der Zelle an die EZM fördern (Abbildung 1). Diese Erkennungssequenz in Fibronectin ist die RGD-Sequenz, abgeleitet von den Ein-Buchstaben Codes der Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D). Bei Laminin wurde die IKVAV-Sequenz als Erkennungssequenz identifiziert, bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin (I), Lysin (K), Valin (V) und Alanin (A).³²⁻³⁴

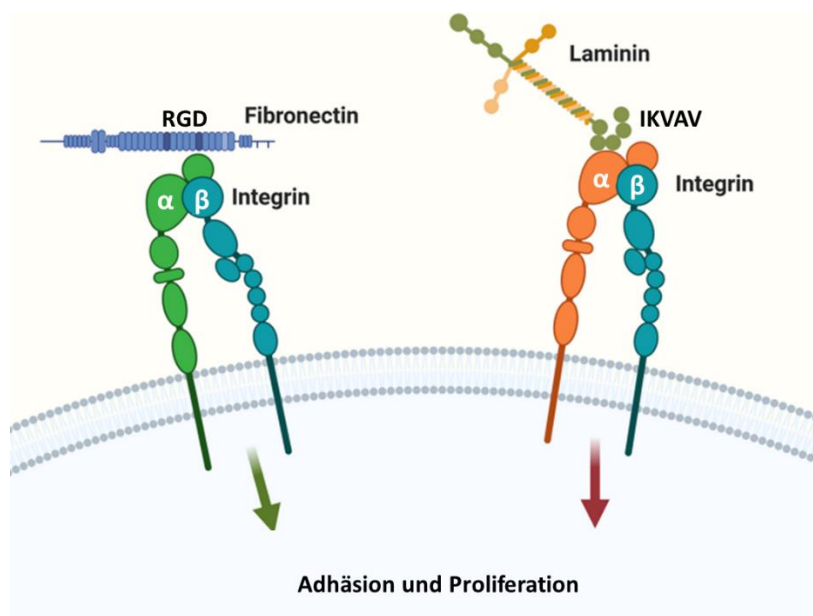


Abbildung 1: Darstellung der Interaktion der RGD- und IKVAV-Sequenzen mit den Integrinen in der Zellmembran (modifiziert aus ³²).

Um die biologische Aktivität der in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele zu fördern, wurden diese mit RGD- und IKVAV-Peptiden funktionalisiert.

Zur möglichst optimalen Nachahmung der EZM wurden über die Jahre verschiedene Hydrogele für die zwei- und dreidimensionale Zellkultivierung entwickelt. Die Vor- und Nachteile beider Konzepte werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

1.4 2D versus 3D Zellkultivierung

Unter der zweidimensionalen (2D) Zellkultivierung wird das Kultivieren der Zellen auf der Oberfläche eines Substrats verstanden. Bei der dreidimensionalen (3D) Zellkultivierung hingegen werden die Zellen vor der Gelbildung mit dem Hydrogel gemischt und während des Gelierungsprozesses von dem Gel eingekapselt.³⁵ Standardmäßig wurden in den letzten Jahrzehnten zweidimensionale feste Substrate aus Polystyrol und Glas mit adhäsionsfördernden Beschichtungen verwendet, da sie eine einfache, kostengünstige und reproduzierbare Methode zur Zellkultivierung boten.³⁶ Sie besitzen allerdings den entscheidenden Nachteil, eine bis zu sechs Größenordnungen höhere Steifigkeit als die meisten Gewebearten aufzuweisen.³⁷ Die Entwicklung von 2D-Hydrogelen bot eine verbesserte Anpassung der Oberflächensteifigkeit und -chemie, doch die Zellen erleben nach wie vor eine nicht-physiologische räumliche Umgebung. In typischen 2D-Kulturen sind die Zellen unnatürlich polarisiert, da sie auf einer Seite mit der Substratoberfläche und auf der anderen Seite mit dem wässrigen Medium in Kontakt stehen. Diese konstante Polarität in normalerweise unpolaren Zellen kann die Zellfunktionen wie z. B. die Proliferation und Apoptose beeinflussen.³⁸ Außerdem treten Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen nur lateral auf, während in der dreidimensionalen Umgebung zu allen Seiten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen stattfinden (Abbildung 2).

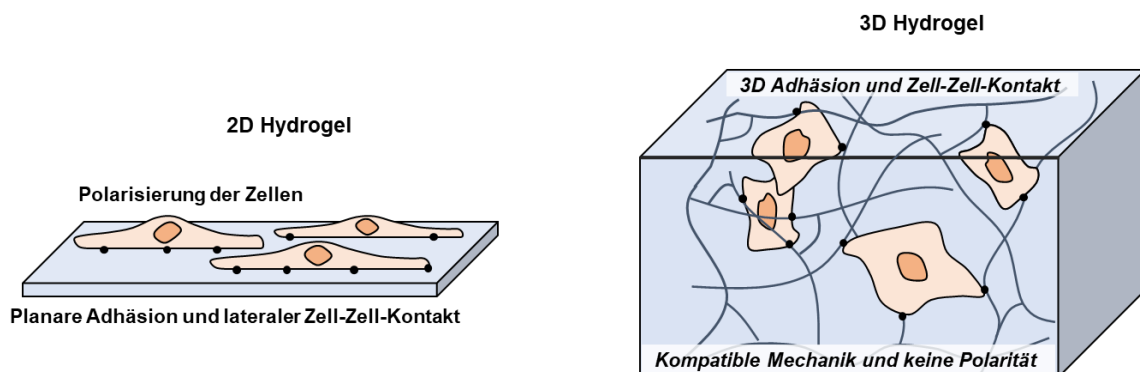


Abbildung 2: Kultivierung von Zellen auf einem 2D Hydrogel (links) und in einem 3D Hydrogel (rechts) in Anlehnung an WILSON *et al.*³⁹

Ein weiterer Vorteil von 3D-Hydrogelen als Trägermaterial für Zellen ist die eingeschränktere Möglichkeit zur Zellausbreitung und Migration. Dies hört sich zunächst nach einem Nachteil an, entspricht aber eher den natürlichen Umgebungsbedingungen der Zellen als die ungehinderte Ausbreitung auf einem 2D-Substrat, da Zellen in natürlichem Gewebe mit der EZM interagieren und diese umstrukturieren müssen, um zu migrieren. Die poröse 3D-

Hydrogelumgebung schränkt außerdem die Diffusion von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten ein, was in Konzentrationsgradienten von der Oberfläche bis zum Hydrogelinneren resultiert. Diese Gradienten treten ebenfalls in natürlichem Gewebe abhängig von der Permeabilität der EZM und der Distanz zu Blutgefäßen auf und spielen eine wichtige Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen. In 2D-Kulturen hingegen besteht ein unbegrenzter Zugang zu Nährstoffen und oftmals liegt der Sauerstoffgehalt in Inkubatoren höher als im Körper, wodurch Änderungen im Zellverhalten oder sogar Zellschäden ausgelöst werden können.⁴⁰

Insgesamt können 3D-Hydrogelkonstrukte die natürliche Gewebeumgebung von Zellen exakter nachahmen als deren zweidimensionale Alternative.⁴¹⁻⁴³ Weitere Forschung mithilfe von 3D-Trägermaterialien kann daher genauere Einblicke in *in-vivo*-Zellfunktionen liefern und fortschrittliche Anwendungen in der Geweberekonstruktion oder als Plattform für Wirkstoffentwicklungen oder Toxizitätstests ermöglichen.⁴⁴ Darüber hinaus hat sich die 3D-Zellkultivierung zu einem wichtigen Instrument für die Zelltherapie mittels 3D-Bioprinting oder injizierbarer Hydrogele entwickelt.⁴⁵⁻⁴⁷

Im Laufe der Jahre wurden sowohl für 2D- als auch für 3D-Zellkultivierungen zahlreiche verschiedene Hydrogele entwickelt. Auf deren Bestandteile und Vernetzungsmethoden wird im Folgenden näher eingegangen.

1.5 Hydrogele

Hydrogele sind hydrophile Polymernetzwerke, die große Mengen an Wasser aufnehmen können und eine elastische Struktur aufweisen.^{48,49} Die Fähigkeit der Hydrogele, Wasser zu binden, beruht auf hydrophilen funktionellen Gruppen wie Hydroxyl-, Carboxyl-, Amino- und Amidgruppen entlang der Polymerketten.⁵⁰ Hydrogele können nach verschiedenen Kriterien wie der Herkunft, der Ladung, der Zusammensetzung, der Vernetzung oder der Beständigkeit klassifiziert werden (Abbildung 3).⁵¹

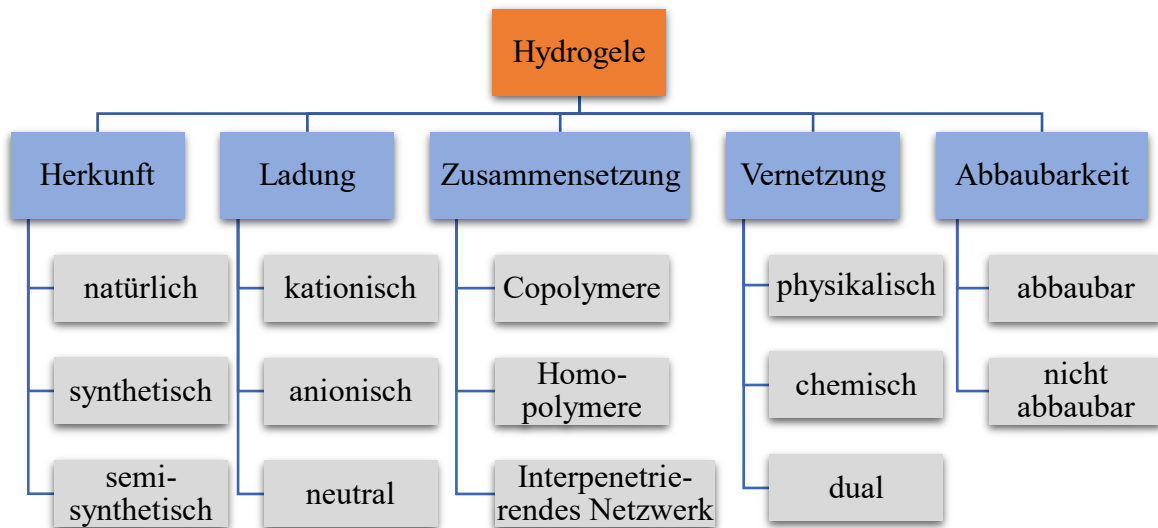


Abbildung 3: Übersicht über einige Klassifizierungsmöglichkeiten von Hydrogelen.⁵¹

Nachfolgend sollen einige Hydrogelklassifizierungen und ihre Anwendung in Zellexperimenten näher beleuchtet werden.

1.5.1 Natürliche und synthetische Hydrogele

Werden Hydrogele nach ihrer Herkunft klassifiziert, wird zwischen natürlichen, synthetischen und semi-synthetischen Hydrogelen unterschieden. Natürliche Hydrogele basieren auf Biopolymeren, die selbst Bestandteile der EZM sind. Zu den Biopolymeren, die auch kommerziell zur Zellkultivierung eingesetzt werden, zählen unter anderem Kollagen,⁵² Alginate,⁵³ Hyaluronsäure⁵⁴ und Matrigel®.^{55,56} Sie werden aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und der Möglichkeit des enzymatischen Abbaus bevorzugt für Zellexperimente und *in vivo*-Anwendungen eingesetzt.¹³ Allerdings unterliegen natürliche Hydrogele aufgrund ihres tierischen Ursprungs großen Chargendifferenzen, die sich negativ auf die Reproduzierbarkeit von Experimenten auswirken. Das häufig zur dreidimensionalen Zellkultivierung eingesetzte Matrigel® beispielsweise, das aus *Engelbreth-Holm-Swarm*-Sarkomen (EHS-Sarkomen) von Mäusen extrahiert wird, weist nur eine 53 %ige Übereinstimmung zwischen verschiedenen Chargen auf und eignet sich daher nicht für klinische Studien.^{57,58} Weitere Probleme, die von der Gewinnung aus natürlichen Quellen herrühren, sind die oft hohen Kosten und die Verunreinigung der Materialien mit tierischen Pathogenen, die zur Übertragung von Infektionen führen können.⁵⁹ Darüber hinaus besitzen natürliche Hydrogele begrenzte Möglichkeiten zur Modifikation und aufgrund von hohen Abbauraten in zellulärer Umgebung eine geringe Langzeitstabilität.⁵⁶

Diese Nachteile können mit synthetischen Hydrogelen umgangen werden, da diese zahlreiche Möglichkeiten zur Variation der mechanischen und chemischen Eigenschaften bieten und dank ihrer kontrollierbaren Zusammensetzung ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit ermöglichen.^{60,61} Synthetische Hydrogele, die in der Forschung Anwendung finden, werden häufig auf der Basis von Polyethylenglykol (PEG) oder Polyacrylamid hergestellt. SAWHNEY *et al.* haben 1993 ein PEG-Hydrogel veröffentlicht, das ein interpenetrierendes Netzwerk mit einem natürlichen Gewebe ausgebildet hat, und haben damit den Grundstein für viele weitere PEG-basierte Hydrogele gelegt.⁶²⁻⁶⁴ 2002 zeigten BRYANT und ANSETH anhand von PEG-Gelen, dass synthetische Hydrogele ohne integrinbindende Liganden als 3D-Zellkulturplattform fungieren können.⁶⁵ Sie können die Lebensfähigkeit der Zellen erhalten, allerdings fehlen ihnen die Faktoren, die das Zellverhalten beeinflussen.^{66,67} Diese Problematik kann durch eine Funktionalisierung mit biologisch aktiven Liganden behoben werden.^{68,69} Eine weitere Problematik synthetischer Hydrogele ist jedoch, dass sie toxische Verunreinigungen aus der Synthese beinhalten können und deswegen gründlich aufgereinigt werden müssen.⁷⁰

Die Vorteile von natürlichen und synthetischen Hydrogelen werden in den semi-synthetischen Hydrogelen kombiniert. Dabei werden Biopolymere zusätzlich chemisch vernetzt, um die mechanische Stabilität natürlicher Hydrogele zu verbessern und die Abbaurate zu senken. Die Vernetzung kann z. B. über Copolymerisation, MICHAEL-Addition oder Disulfidbrücken erfolgen. Eines der am stärksten erforschten semi-synthetischen Hydrogele für biomedizinische Anwendungen basiert auf methacrylierter Hyaluronsäure, die über UV-Bestrahlung in Gegenwart eines Photoinitiators vernetzt wird.⁷¹⁻⁷³ Da die semi-synthetischen Hydrogele hauptsächlich aus Biopolymeren bestehen, bleibt ihre gute Biokompatibilität erhalten.^{34,74,75}

Eine weitere Klassifizierungsmöglichkeit für Hydrogele stellt die Vernetzungsart dar, nach der zwischen chemischen und physikalischen Hydrogelen unterschieden wird.

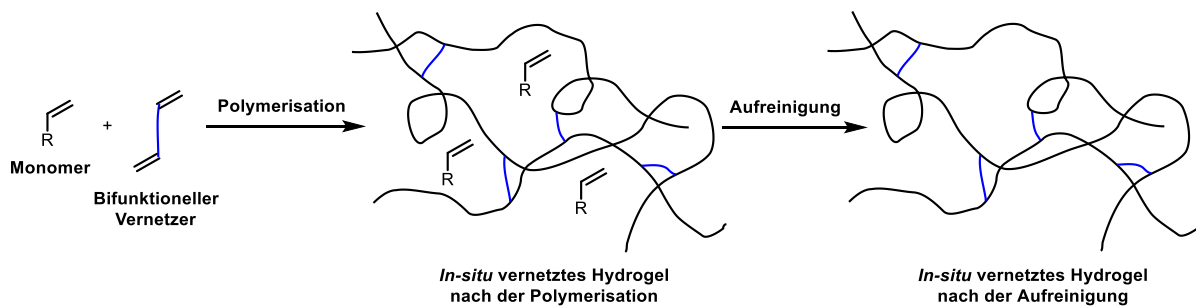
1.5.2 Chemische Hydrogele

Chemische Hydrogele bestehen aus Polymernetzwerken, die auf kovalenten Vernetzungen beruhen. Diese kovalente Vernetzung der Polymere kann während der Polymerisation oder polymeranalog stattfinden und wird daher als *in-situ* beziehungsweise nachträgliche Vernetzung bezeichnet.⁷⁶

Bei der *in-situ*-Vernetzung werden Monomere mit einem bifunktionellen Monomer, dem Vernetzer, copolymerisiert, wodurch sich während der Polymerisationsreaktion ein Hydrogel ausbildet (Schema 1). Einer der am häufigsten eingesetzten *in-situ*-Vernetzer ist *N,N'*-

Methylenbisacrylamid (MBA), welches mit verschiedenen Monomeren copolymerisiert wurde und Anwendung in der Biomedizin fand.^{77,78} Beispielsweise wird MBA in Kombination mit Acrylamid seit 1959 als Elektrophorese-Gel zur Trennung von Proteinen verwendet.⁷⁹

Ein Nachteil der *in-situ* Vernetzung ist, wie in Schema 1 gezeigt wird, der Verbleib von niedermolekularen Verbindungen aus der Polymerisation im Hydrogel, die aufwendig entfernt werden müssen. Außerdem ist diese Vernetzungsmethode nicht mit 3D-Zellexperimenten kompatibel, da toxische Monomere, Vernetzer und Initiatoren in der Synthese eingesetzt werden, in deren Gegenwart Zellen ihre Integrität verlieren.



Schema 1: Synthese eines *in-situ* vernetzten Hydrogels.⁷⁶

Abgesehen davon sind die *in-situ* vernetzten Hydrogele nicht löslich, wodurch lösungsbasierte Analytikmethoden, wie die NMR-Spektroskopie, nicht genutzt werden können, um die genaue Zusammensetzung der Polymere zu analysieren. Eine weitere Einschränkung, die sich aus der Unlöslichkeit der Hydrogele ergibt, ist, dass alle Funktionalisierungen in Form von Monomeren bei der Copolymerisation in das Hydrogel integriert werden müssen, um eine gleichmäßige Verteilung dieser zu erreichen. Allerdings können Monomere mit biologisch aktiven Verbindungen zu Löslichkeitsproblemen oder Nebenreaktionen bei der Polymerisation führen.^{25,80}

Eine Möglichkeit, diese Nachteile zu umgehen, ist die Verwendung der nachträglichen Vernetzung, bei der zunächst Polymere synthetisiert und diese anschließend miteinander vernetzt werden. Die Vernetzung der Polymere kann über zwei Polymere mit komplementären Gruppen oder über ein Polymer und einen bi- oder multifunktionalen Vernetzer erfolgen. Ein Problem bei der Verwendung von Vernetzermolekülen ist jedoch die Zytotoxizität von niedermolekularen Vernetzern, die eine Anwendung in der 3D-Verkapselung einschränken. Erst ab einer Molmasse von 1000 Da können die Vernetzer nicht mehr von Zellen aufgenommen werden und weisen somit keine toxische Wirkung auf.^{81,82}

Die Vernetzungsreaktionen zwischen den komplementären Polymeren bzw. den funktionellen Gruppen eines Polymers und eines Vernetzers basieren meist auf Click-Reaktionen.

Beispielsweise können über Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionen (CuAAC) Hydrogele mit kurzen Gelierzeiten hergestellt werden.⁸³ Hydrogele, die über die CuAAC vernetzt werden, können allerdings aufgrund der zytotoxischen Wirkung des Kupferkatalysators nicht für 3D-Zellexperimente verwendet werden. Eine zellkompatible Alternative zur CuAAC stellt die *strain-promoted* Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) dar, die ohne einen Katalysator auskommt und stattdessen auf der Reaktivität eines durch Ringspannung destabilisierten Alkins basiert.⁸⁴ Die SPAAC gehört zu den bioorthogonalen Reaktionen, die sich durch hohe Selektivitäten, die Abwesenheit toxischer Nebenprodukte und Katalysatoren, hohe Umsätze und niedrige Reaktionstemperaturen auszeichnen und dadurch für die Synthese von Hydrogelen in Gegenwart von Zellen geeignet sind. Eine der am häufigsten zur Hydrogelbildung eingesetzten bioorthogonalen Reaktionen ist die MICHAEL-Addition, die zwischen Thiolen oder Aminen und α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen wie Maleimiden, Vinylsulfonen oder Acrylaten abläuft.^{85,86} Andere Beispiele für häufig verwendete bioorthogonale Reaktionen sind DIELS-ALDER-Reaktionen z. B. zwischen Furanen und Maleimiden,⁸⁷ Kondensationsreaktionen zwischen Aminen und Aldehyden⁸⁸ oder die STAUDINGER-Ligation zwischen Aziden und Triphenylphosphinen.⁸⁹

Die nachträgliche Vernetzung bietet neben der Löslichkeit und der damit einhergehenden Charakterisierbarkeit der Polymere den Vorteil, dass nicht nur die freie radikalische Polymerisation, sondern auch kontrollierte Polymerisationsmethoden angewendet werden können.

1.5.3 Physikalische Hydrogele

Physikalische Hydrogele werden über nicht-kovalente Bindungen, wie z. B. ionische Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen vernetzt. Diese Vernetzungen werden oft durch die Änderung äußerer Bedingungen wie z. B. des pH-Wertes, der Temperatur oder der Konzentration hervorgerufen.⁹⁰ Die physikalische Vernetzung ist im Gegensatz zur chemischen Vernetzung reversibel und nicht permanent,⁹¹ daher sind physikalische Hydrogele löslich und lassen sich über die gängigen Analysemethoden charakterisieren. Außerdem laufen bei der Vernetzung keine Reaktionen ab, für die toxische Vernetzer oder Katalysatoren benötigt werden, wodurch sich physikalische Hydrogele besonders gut zur dreidimensionalen Einbettung von Zellen eignen.⁹² Physikalische Hydrogele setzen sich bei der Entwicklung von Biomaterialien zunehmend durch, da sie sich durch Eigenschaften auszeichnen, die für natürliches Gewebe typisch sind wie z. B. ein dynamisches Verhalten, denn ihre reversible Vernetzung erlaubt es ihnen, mechanische Beanspruchung auf

molekularer Ebene durch das Brechen und Wiederherstellen von Bindungen zu dispergieren.⁴⁹ Zudem erleichtert eine dynamische Hydrogelstruktur die Migration, Ausbreitung und Proliferation von Zellen, denn auch die extrazelluläre Matrix bietet den Zellen ein dynamisches Netzwerk, durch das sie sich hindurchbewegen und permanent umstrukturieren können.^{93–99} Beispielsweise können Fibroblasten über Fokaladhäsionen mit einer Zugspannung von ~ 5500 Pa an ihrer umgebenen Matrix ziehen.^{100,101}

Außerdem eröffnet die Fähigkeit zur Selbstheilung eine einfache Injizierbarkeit und Biodruckbarkeit der Hydrogele. Ein Nachteil der physikalischen Hydrogele gegenüber chemischen Hydrogelen ist ihre geringere Steifigkeit, da nicht-kovalente Bindungen schwächer ($2\text{--}250$ kJ mol⁻¹) sind als kovalente Bindungen ($100\text{--}400$ kJ mol⁻¹). Durch eine Kombination aus beiden Vernetzungstypen können die Steifigkeit und Elastizität von natürlichem Gewebe jedoch erfolgreich nachgeahmt werden.¹⁰²

Eines der bekanntesten physikalischen Hydrogele ist das Matrigel[®], welches hauptsächlich aus Laminin, Kollagen IV, Entaktin und Proteoglykan besteht und temperaturabhängig geliert. Während es bei 4 °C als Flüssigkeit vorliegt, bildet es in einem Temperaturbereich von $22\text{--}37$ °C irreversibel ein Gel aus. Dabei fungiert Entaktin als Vernetzer zwischen Laminin und Kollagen IV.¹⁰³ Auf Seiten der synthetischen Polymere ist Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm) ein bekanntes thermoresponsives Polymer, das beim Überschreiten der unteren kritischen Lösungstemperatur (*lower critical solution temperature*, LCST) oder Unterschreiten der oberen kritischen Lösungstemperatur (*upper critical solution temperature*, UCST) ein Gel bildet.^{104,105}

Häufig in der 3D-Zellkultivierung verwendete ionische Hydrogele sind Alginat-Hydrogele. Dabei werden die Alginat-Polysaccharide über die Wechselwirkung mit Calciumionen vernetzt.^{53,106}

Eine physikalische Vernetzungsmethode, die vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, ist die Wirt-Gast-Vernetzung. Verglichen mit den anderen nicht-kovalenten Vernetzungen können mit Wirt-Gast-Vernetzungen höhere Bindungsstärken erreicht und somit eine schnelle Gelierung ermöglicht werden.^{107–109} Außerdem stellt die Wirt-Gast-Vernetzung aufgrund der genauen Anpassung der Gast- auf die Wirtmoleküle eine hoch selektive Vernetzungsmethode dar.¹¹⁰ Die meisten Wirt-Gast-Hydrogele basieren auf den makrocyclischen Cucurbiturilen und zu einem noch größeren Anteil auf Cyclodextrinen. Die

Bevorzugung der Cyclodextrine ist vor allem in ihrer guten Biokompatibilität, einfacheren Funktionalisierbarkeit und niedrigen Kosten begründet.^{111–114}

Da die Vernetzung der Hydrogele in dieser Arbeit über Wirt-Gast-Komplexe mit β -Cyclodextrin realisiert werden soll, wird im Folgenden näher auf die strukturellen Eigenschaften von Cyclodextrinen sowie deren Eigenschaften als Komplexbildner eingegangen.

1.6 Cyclodextrine

Cyclodextrine (CDs) sind cyclische Oligosaccharide, die aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten bestehen.¹¹⁵ Die Glucoseeinheiten besitzen jeweils zwei sekundäre Hydroxylgruppen in C2- und C3-Position, die aufgrund der 4C_1 -Sesselkonfiguration alle auf einer Seite des Moleküls angeordnet sind. Außerdem befinden sich in C6-Position der Glucoseeinheiten primäre Hydroxylgruppen, die sich alle auf der anderen Seite des Moleküls anordnen. Da der Umfang der beiden Hydroxylgruppenränder unterschiedlich groß ist, ergibt sich für die Cyclodextrine, wie in Abbildung 4 gezeigt, eine Kegelstumpfform.¹¹⁶

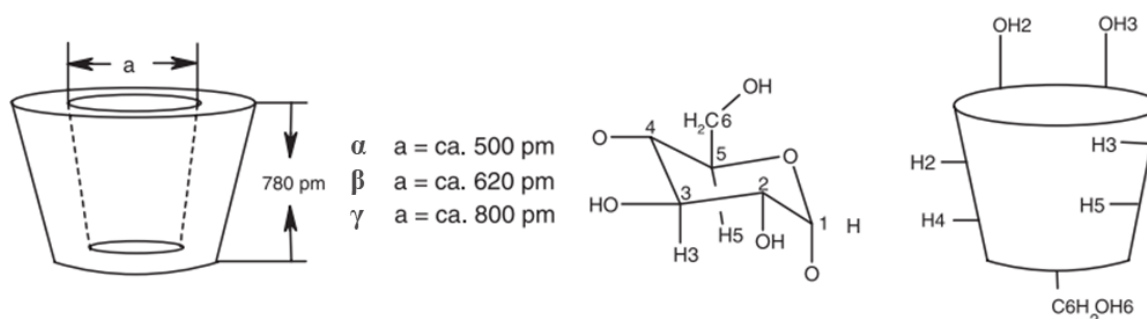


Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Cyclodextrinen.¹¹⁷

Hergestellt werden Cyclodextrine durch den enzymatischen Abbau von Stärke mithilfe von Cyclodextrin-Glucosyl-Transferasen (CGTasen). Die CGTasen werden aus den Mikroorganismen *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca* oder *Bacillus circulans* gewonnen. Bei der Behandlung der Stärke mit den CGTasen entstehen Cyclodextrine verschiedener Größen, die α -, β - und γ -Cyclodextrine, die über verschiedene Technologien, z. B. die *non-solvent*- oder die *solvent*-Technologie, nach oder während der Produktion aufgetrennt werden können. Mittlerweile stehen aber auch spezifische Enzyme zur Verfügung, die die Cyclodextrin-Produktion erleichtern. α -Cyclodextrin besteht aus 6 Glucoseeinheiten, während sich β - und γ -Cyclodextrine aus 7 bzw. 8 Glucoseeinheiten zusammensetzen (Abbildung 5).^{115,118,119}

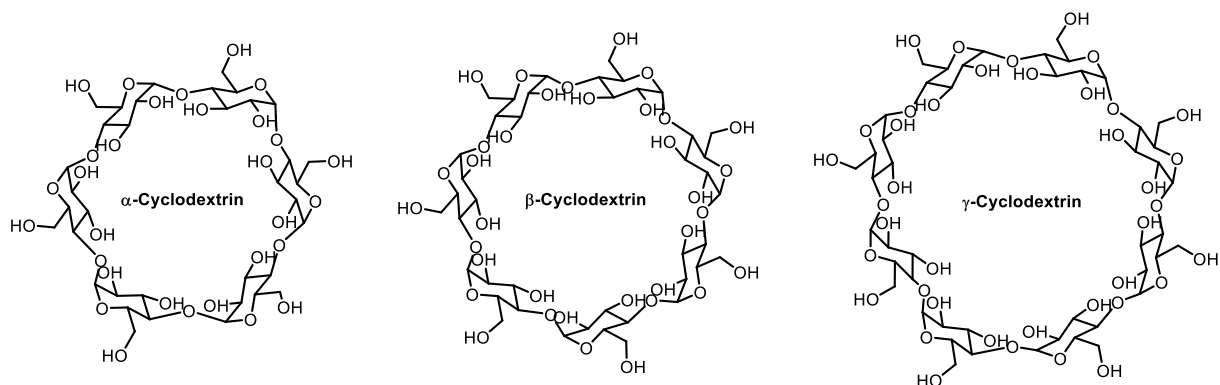


Abbildung 5: Molekülstruktur von α -, β - und γ -Cyclodextrin.

In Abhängigkeit der Anzahl an Glucoseeinheiten verändern sich auch die Eigenschaften der Cyclodextrine (Tabelle 1). Die Größe der Kavität beispielsweise liegt für α -CD bei 4,7-5,3 Å, für β -CD bei 6,0-6,5 Å und für γ -CD bei 7,5-8,3 Å.¹¹⁶ Je größer die Kavität der Cyclodextrine ist, desto mehr Wassermoleküle können sich in die Kavität einlagern. Die sich in der Kavität befindenden Wassermoleküle weisen aufgrund ihrer eingeschränkten Bewegungsfreiheit und der geringeren Anzahl an Möglichkeiten, Wasserstoffbrücken zu anderen Wassermolekülen zu bilden, einen energetisch ungünstigeren Zustand als Bulkwasser auf. Mit steigender Anzahl an Wassermolekülen in der Kavität nimmt der energetische Unterschied dieser Wassermoleküle im Vergleich zum Bulkwasser ab.¹²⁰

Wird die Wasserlöslichkeit der drei Cyclodextrine verglichen, fällt die deutlich niedrigere Wasserlöslichkeit des β -Cyclodextrins auf. Bedingt ist diese Auffälligkeit durch die Ausrichtung der sekundären Hydroxylgruppen des β -Cyclodextrins zueinander, wodurch sich ein Gürtel aus intramolekularen Wasserstoffbrücken bildet, durch den die Wechselwirkung der Hydroxylgruppen mit den umgebenen Wassermolekülen reduziert wird und das Molekül eine starre Struktur erhält.¹¹⁵

Tabelle 1: Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrinen.

Parameter	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin	γ -Cyclodextrin
Kavitätsdurchmesser / Å ¹¹⁶	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Höhe des Kegelstumpfes / Å ¹¹⁶	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Kavitätsvolumen / Å ³ ¹¹⁶	174	262	472
Wassermoleküle in Kavität ¹¹⁷	6	11	17
Wasserlöslichkeit / g/L ¹²¹	0,120	0,017	0,180

Die wichtigste Eigenschaft der Cyclodextrine ist ihre Fähigkeit, verschiedene als Gastmoleküle bezeichnete Verbindungen in ihre Kavität einzulagern und damit Wirt-Gast-Komplexe auszubilden. Diese Fähigkeit beruht auf der Verteilung der hydrophilen und hydrophoben Molekülteile in den Cyclodextrinen, denn die hydrophoben Bereiche wie die C3-, C5- und C6-Wasserstoffatome und die etherartigen glycosidischen Bindungen liegen im Inneren des Moleküls, wodurch die Kavität einen hydrophoben Charakter erhält und daher bevorzugt hydrophobe Gastmoleküle einlagert. Außerdem sind die nichtbindenden Elektronenpaare der Etherbindung in das Innere der Kavität gerichtet, was die Kavität mit einem Lewis-Base-Charakter ausstattet.¹¹⁶

1.6.1 Cyclodextrine als Komplexbildner

Die Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines Wirt-Gast-Komplexes ist die molekulare Erkennung (*molecular recognition*), das heißt, das Gastmolekül muss der Form und Größe nach in die Kavität des Cyclodextrins passen.¹²² Cyclodextrine fungieren als einseitige Liganden, denn die Einlagerung des Gastmoleküls erfolgt meist über die Seite mit dem größeren Ring. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe können α -, β - und γ -Cyclodextrine verschiedene Gastmoleküle in ihre Kavität einlagern. Sie bilden dabei je nach Gastmolekül mehr oder weniger stabile Einschlusskomplexe. Je besser das Gastmolekül die Kavität ausfüllt, desto stabiler ist der gebildete Komplex. α -Cyclodextrine sind beispielsweise dazu in der Lage, Alkylketten oder Benzolderivate wie *trans*-Azobenzol einzulagern. Mit Ferrocen bilden sie 2:1-Komplexe (α -CD:Ferrocen), während β - und γ -Cyclodextrine 1:1-Komplexe mit Ferrocen ausbilden können. Wie anhand der in Tabelle 2 bereitgestellten Assoziationskonstanten K_a deutlich wird, ist der Wirt-Gast-Komplex aus β -CD und Ferrocen am stabilsten, gefolgt von dem mit γ -CD. Die niedrigste Assoziationskonstante weist Ferrocen mit α -CD auf. Dieselbe Reihenfolge der Komplexstabilitäten ist bei der Komplexierung des Adamantanderivates 1-Adamantylcarboxylat zu erkennen. Der Grund dafür ist die Übereinstimmung der Kavitätsgröße von β -CD mit der Größe der Gastmoleküle, wohingegen α -CD die Gastmoleküle nicht vollständig einlagern kann, da dessen Kavität zu klein ist, und die Kavität von γ -CD nicht vollständig von den Gastmolekülen ausgefüllt wird, weil diese zu groß ist. Auffällig ist die besonders große Assoziationskonstante K_a des Komplexes aus β -CD und dem Adamantanderivat, die neben der perfekten Passform auch mit dem hydrophoben Charakter des Adamantanderivates erklärt werden kann. Mit anderen Adamantanderivaten können noch größere Assoziationskonstanten K_a von bis zu $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ erreicht werden.¹²³

Tabelle 2: Assoziationskonstanten K_a einiger Gastmoleküle mit α -, β - und γ -Cyclodextrinen.

Gastmolekül	$K_a, \alpha\text{-CD} / 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_a, \beta\text{-CD} / 10^3 \text{ M}^{-1}$	$K_a, \gamma\text{-CD} / 10^3 \text{ M}^{-1}$
<i>trans</i> -Azobenzol ^{a 124}	6	4	-
Ferrocen ^{b 125}	0,24	1,90	0,40
1-Adamantylcarboxylat ^{c 126}	0,14	20	3

^a bestimmt mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC); ^b bestimmt mittels Rotationsscheibenvoltametrie (RDV); ^c bestimmt über Mikrokolorimetrie bei pH 8,5.

Thermodynamisch kann die Komplexbildung als ein Gleichgewichtsprozess aus Assoziation und Dissoziation des Cyclodextrins (CD) mit dem Gastmolekül (G) betrachtet werden, wie in Gleichung 1 dargestellt ist:



Die Assoziationskonstante K_a lässt sich somit über Gleichung 2 berechnen.

$$K_a = \frac{c([G\text{-}CD])}{c(G) \cdot c(CD)} \quad (2)$$

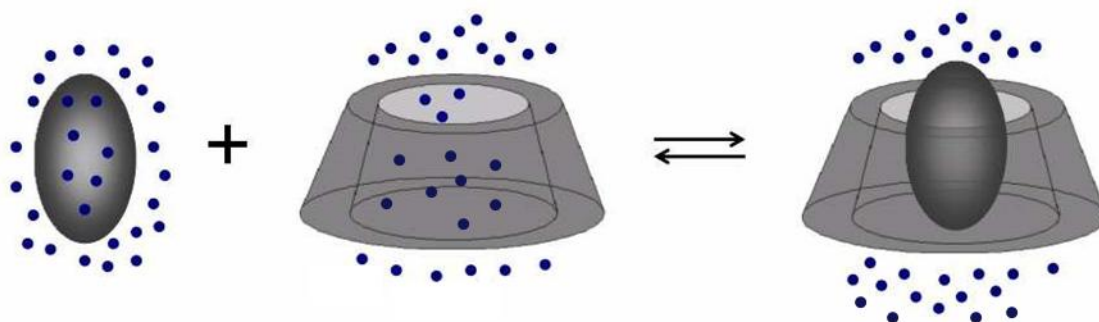
Damit die Komplexbildung als ein spontaner Prozess abläuft, muss die Änderung der Gibbs-Energie ΔG kleiner als 0 sein. ΔG beschreibt die Energie, die notwendig ist, damit die Komplexbildung stattfindet. Sie setzt sich aus einem enthalpischen und entropischen Beitrag zusammen, was in der GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung verdeutlicht wird:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

Darin stellt ΔH die Änderung der Enthalpie und ΔS die Änderung der Entropie dar. Die Assoziationskonstante K_a steht mit der Gibbs-Energie über die Gleichung 4 in Beziehung.¹²⁷

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_a \quad (4)$$

Die Komplexbildung mit Cyclodextrinen wird zum Teil enthalpisch getrieben, indem sich VAN DER WAALS-Wechselwirkungen und in einigen Fällen auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Cyclodextrin und dem Gastmolekül ausbilden.¹²⁸ Vor allem ist die Komplexbildung aber durch den entropischen Beitrag des hydrophoben Effektes getrieben. Der hydrophobe Effekt beschreibt die Aggregation hydrophober Moleküle in einem wässrigen Medium. Dabei werden die Wassermoleküle, die die hydrophoben Moleküle in einer entropisch ungünstigen Hydrathülle umgeben, freigesetzt, wodurch eine Entropiesteigerung erlangt wird (Schema 2).



Schema 2: Schematische Darstellung des hydrophoben Effektes bei der Bildung eines Wirt-Gast-Komplexes eines Cyclodextrins (modifiziert aus ¹¹⁹).

Die Freisetzung der Wassermoleküle aus der Cyclodextrinkavität führt neben dem entropischen Beitrag zusätzlich zu einem enthalpisch günstigeren Zustand, da die Wassermoleküle in der Cyclodextrinkavität nicht nur in ihren Freiheitsgraden, sondern auch in der Anzahl an Wasserstoffbrücken eingeschränkt und somit enthalpiereicher sind als das Bulkwasser. Durch die Freisetzung dieser Wassermoleküle erlangen sie den niedrigeren Enthalpiewert des Bulkwassers.¹²⁹

Außerdem können Wasserstoffbrückenbindungen hydrophiler Molekülteile des Gastmoleküls, die aus der Kavität herausragen, mit den Hydroxylgruppen des Cyclodextrins den Komplex zusätzlich stabilisieren. Weitere Beiträge zur Stabilisierung des Komplexes können durch Konformationsänderungen oder eine nachlassende Ringspannung des Cyclodextrins hervorgerufen werden.^{130,131}

Aus der Fähigkeit zur Komplexbildung ergeben sich für Cyclodextrine zahlreiche Anwendungen wie z. B. als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie,¹¹⁷ als Lösungsvermittler,¹³² zur Stabilisierung und kontrollierten Freisetzung von Wirkstoffen^{133,134} und als Vernetzer in Hydrogelen.

Im Folgenden wird auf Literaturbeispiele zur Vernetzung von Hydrogelen auf der Basis von β -Cyclodextrin eingegangen.

1.6.2 Stand der Forschung – β -Cyclodextrin als Vernetzer in Hydrogelen

Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten Cyclodextrin-basierte Hydrogele zu erstellen, zum einen die Bildung von Pseudo-Polyrotaxan-Strukturen, bei denen sich lineare Polymerketten in die Cyclodextrin-Kavität einlagern, und zum anderen die Ausbildung von Einschlusskomplexen des Cyclodextrins mit kleinen Gastmolekülen.¹³⁵ Da β -Cyclodextrin im

Gegensatz zu seinen Analoga α - und γ -CD zu groß bzw. zu klein ist, um eine bzw. zwei Polymerketten in dessen Kavität einzulagern, existieren nur wenige Beispiele, in denen Pseudo-Polyrotaxan-Strukturen mit β -CD zur Vernetzung von Hydrogelen genutzt wurden. In einigen Fällen waren Poly(milchsäure)¹³⁶ und Poly(propylenglykol)¹³⁷ dazu in der Lage, Hydrogele auf der Basis von Pseudo-Polyrotaxan-Strukturen mit β -CD zu bilden.

In der Mehrheit der Fälle werden Einschlusskomplexe von β -CD mit kleinen Molekülen wie Adamantan,¹³⁸ Ferrocen,¹³⁹ Azobenzol,¹¹² Cholesterin⁹² und Cholsäure¹⁴⁰ dazu verwendet, Hydrogele zu bilden. Die genannten Gastmoleküle weisen hohe Bindungsaffinitäten zu β -CD auf, insbesondere Adamantan wird aufgrund seiner hohen Assoziationskonstante häufig als Gastmolekül in β -CD-basierten Hydrogelen eingesetzt.¹⁴¹ Außerdem zeigen Adamantan/ β -CD-Komplexe reversible, wärmeempfindliche Eigenschaften, da die Komplexe bei höheren Temperaturen dissoziieren.¹⁴¹

Die Einschlusskomplexe der Gastmoleküle mit β -CD werden im 1:1-Verhältnis ausgebildet. Für die Bildung von Wirt-Gast-Hydrogelen auf der Basis dieser Einschlusskomplexe wurden in den letzten Jahren verschiedene Systeme entwickelt. Zum einen wurden die Gastmoleküle und die β -CD-Moleküle an separate Polymerketten gebunden und die Hydrogele durch Mischen der beiden Polymerlösungen gebildet (Abbildung 6A). Eine Voraussetzung dafür ist die Wasserlöslichkeit der Polymere, daher wurden bei dieser Synthesemethode häufig Polymere wie Hyaluronsäure,¹⁴² Alginate,¹⁴³ Poly(vinylalkohol),¹⁴⁴ Poly(acrylsäure),¹⁴⁵ Poly(methylvinylether-*alt*-maleinsäure)¹⁴⁶ verwendet. Da einige der Gastmoleküle oder der verwendeten Polymere auf externe Trigger reagieren, sind die Hydrogele beispielsweise mit redoxresponsiven (Ferrocen), lichtresponsiven (Azobenzol), thermoresponsiven (PNIPAAm) oder pH-responsiven (Poly(acrylsäure)) Eigenschaften ausgestattet.

Eine zweite Methode zur Hydrogelbildung auf Basis der Wirt-Gast-Komplexe stellt die Copolymerisation von Einschlusskomplexen zwischen acrylierten Wirt- und Gastmonomeren dar (Abbildung 6B). Beispielsweise stellten KAKUTA *et al.* hoch elastische Hydrogele her, indem sie β -Cyclodextrin-Acrylamid und *N*-Adamantan-1-yl-acrylamid in wässriger Lösung zur Bildung von Komplexen brachten und diese anschließend mit Acrylamid copolymerisierten.¹⁴⁷

Andere Arbeitsgruppen nutzten Wirt- bzw. Gastvernetzer, um komplementäre Gast- bzw. Wirtpolymere miteinander zu verknüpfen (Abbildung 6C und 6D). Diese Vernetzer können bi- oder multifunktionell sein.^{99,148} Zum Beispiel vernetzten OOI *et al.* β -CD-funktionalisierte Alginatpolymere sowohl mit einem bivalenten als auch mit einem vier- bzw. achtarmigem PEG-

Adamantan-Vernetzer und stellten dabei steigende Bindungsaffinitäten mit höherer Vernetzervalenz fest.¹⁴⁹

Eine weitere Methode zur Erstellung β -CD-basierter Wirt-Gast-Hydrogele verkörpert die Verwendung amphiphiler β -CD-modifizierter Polymere, die zweischichtige Polymervesikel bilden und damit ein Gast-funktionalisiertes Polymer vernetzen können (Abbildung 6E).¹⁵⁰

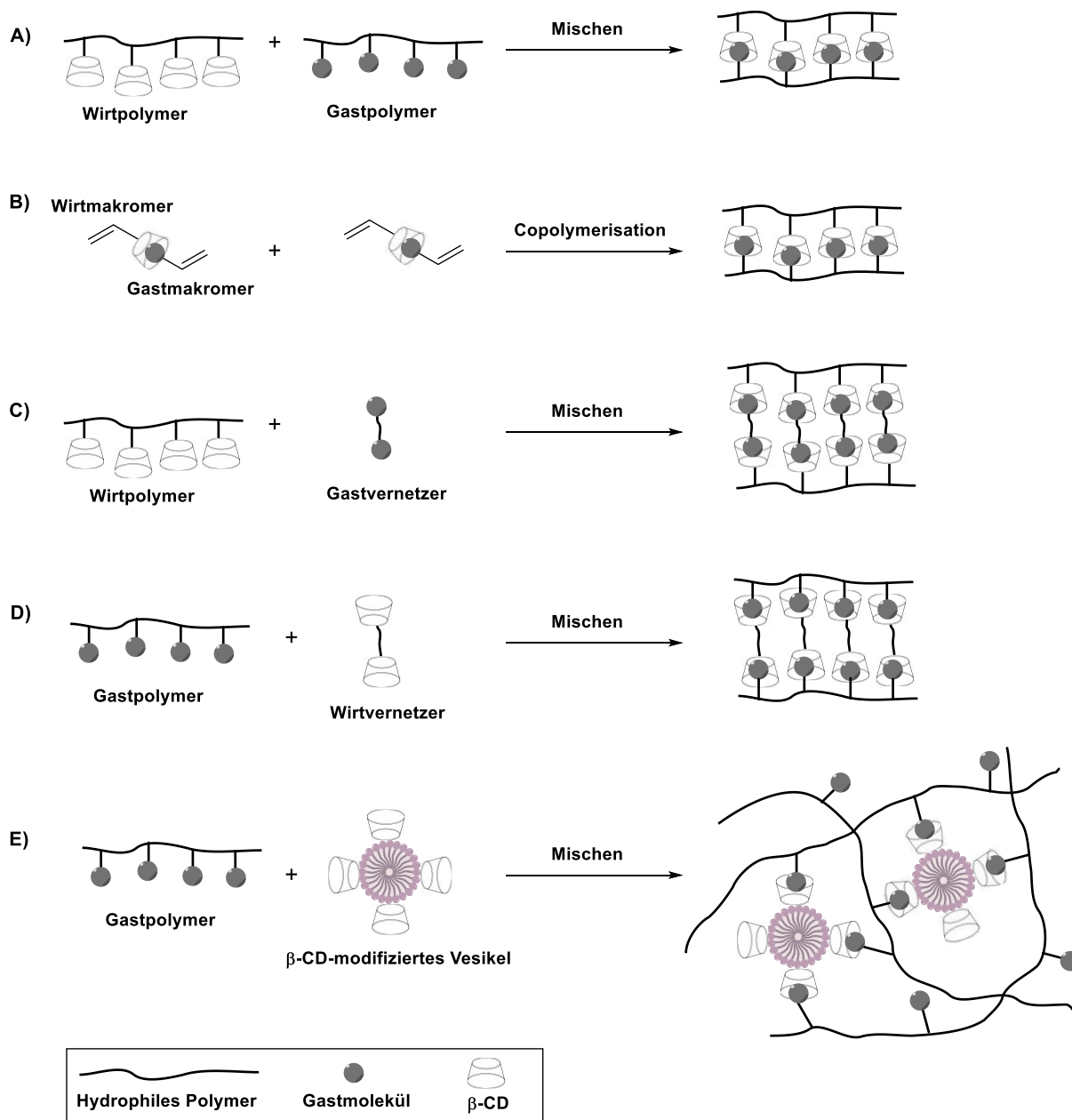


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wirt-Gast-Hydrogelsysteme auf β -Cyclodextrin-Basis in Anlehnung an FANG *et al.*¹³⁵

Insgesamt basieren alle genannten Methoden auf dem Mischen von Wirt- und Gastmolekülen in einem wässrigen Medium.¹³⁵ Aufgrund der reversiblen Wirt-Gast-Vernetzung besitzen die Hydrogele selbstheilende Eigenschaften. Mit Hydrogelen, die über Adamantan und β -

Cyclodextrin vernetzt wurden, konnte eine Selbstheilungseffizienz von bis zu 100 % erreicht werden.^{151,152} Dynamische Polymernetzwerke wie diese ähneln der extrazellulären Matrix und heben sich dadurch im Bereich der 3D-Zellkultivierung von kovalent vernetzten Hydrogelen ab, denn die reversiblen Vernetzungen können von Zellen zur Seite geschoben werden, sodass diese innerhalb des Netzwerkes wachsen können. Beispielsweise war in einer Studie von YANG *et al.* durch die reversiblen Vernetzungen eine Zellkraft-induzierte Reorganisation des Netzwerkes möglich, die zu schnellem Wachstum, Assemblierung und Differenzierung der eingebetteten Zellen beitrug.^{114,140} Das von YANG *et al.* verwendete Hydrogel bestand aus zwei Hyaluronsäurepolymeren, von denen eines mit Adamantylgruppen und RGD-Peptiden entlang der Polymerkette modifiziert war und das andere kovalent mit β -Cyclodextrin funktionalisiert wurde. Zum Vergleich wurden ein Hydrogel, bei dem Cholin säure anstelle von Adamantan am Polymer immobilisiert wurde, und ein kovalent vernetztes Hyaluronsäure-Hydrogel hergestellt. Diese drei Hydrogele wurden bezüglich des 3D-Zellverhaltens miteinander verglichen, wobei das mit Adamantan/ β -CD-Komplexen vernetzte Hydrogel die stärkste Adhäsion hervorbrachte, da es die Vernetzung mit der kürzesten Lebensdauer aufwies und somit von den Zellen am einfachsten umzuorganisieren war (Abbildung 7).¹⁴⁰

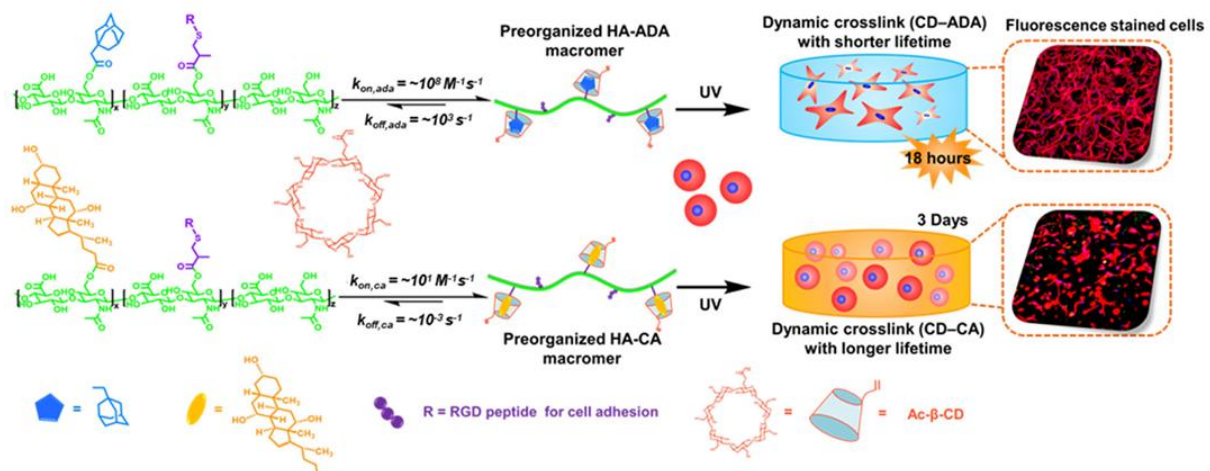


Abbildung 7: Darstellung der von YANG *et al.* entwickelten Hyaluronsäure-Hydrogele, die über Adamantan/ β -CD-Komplexe bzw. Cholin säure/ β -CD-Komplexe vernetzt und zur 3D-Einbettung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) verwendet wurden.¹⁴⁰

In weiteren Hyaluronsäure-basierten Hydrogelen, die über Adamantan/ β -CD-Komplexe vernetzt wurden, konnten ebenfalls 3D-Einbettungen verwirklicht werden, in einigen Beispielen wurden diese wie bei YANG *et al.* mit Peptiden funktionalisiert.⁹⁹ Viele der Hyaluronsäure-basierten Hydrogele enthielten jedoch keine Peptide zur Erhöhung der Bioaktivität.^{142,153,154} In zwei Publikationen von RODELL *et al.* und einer weiteren von JEONG *et*

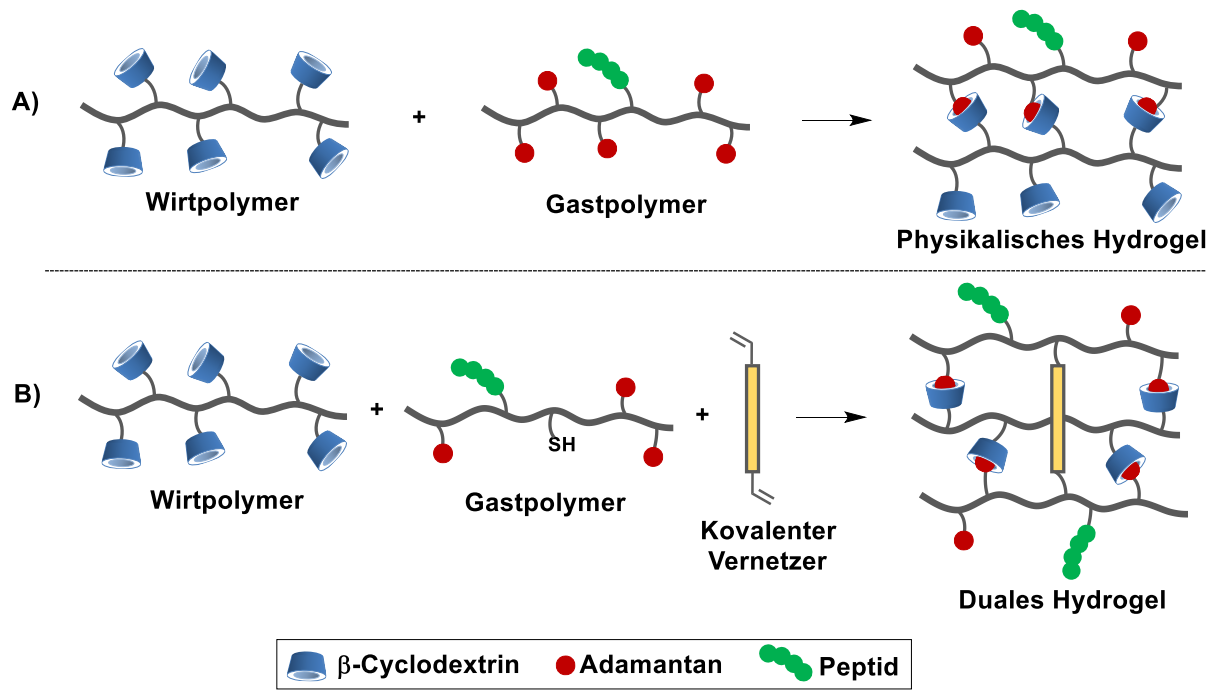
al. wurden Hyaluronsäure-basierte Adamantan/ β -CD-Hydrogele mit integrierten Peptidsequenzen hergestellt, diese wurden allerdings nicht für 3D-Zellkultivierungen, sondern zur Injektion in Gewebe eingesetzt.^{155–157} Neben der Hyaluronsäure, die ein häufiger Vertreter der natürlichen Polymere in 3D-Zellexperimenten ist, haben sich auch andere natürliche Polymere wie Alginate und Gelatine als Polymerrückgrat für die Adamantan/ β -CD-Vernetzung in der 3D-Zelleinbettung bewährt.^{158–161} Doch bei diesen ist die Modifikation mit Peptiden entlang der Polymerkette selten in der Literatur zu finden. Synthetische Hydrogele mit Adamantan/ β -CD-Vernetzung, die in 3D-Zellexperimenten getestet wurden, sind im Vergleich zu den natürlichen Hydrogelen in der Unterzahl und nur wenige von ihnen werden mit Peptiden modifiziert.¹⁶² In den meisten synthetischen Adamantan/ β -CD-Hydrogelen werden weder Peptide noch kationische Einheiten für die Biofunktionalisierung eingesetzt.^{146,163–165} Sowohl bei den natürlichen als auch bei den synthetischen Wirt-Gast-Hydrogelen wird eine kationische Modifikation nur selten genutzt, obwohl dieser eine adhäsionsfördernde Eigenschaft nachgewiesen wurde.^{105,166} Eine Kombination aus Kationik und Peptiden in Adamantan/ β -CD-Hydrogelen ist zum heutigen Stand nicht bekannt. Daher sollten in dieser Arbeit Adamantan/ β -CD-Hydrogele mit entsprechender Funktionalisierung entwickelt und in 3D-Zellkultivierungen getestet werden.

2. Zielsetzung

Hydrogele sind in der Zellbiologie als künstliche extrazelluläre Matrix seit vielen Jahren unersetzbar. Da synthetische Hydrogele den natürlichen Hydrogelen durch ihre kontrollierbare Zusammensetzung überlegen sind, sollten in dieser Arbeit vollsynthetische Hydrogele entwickelt werden. Die Vernetzung dieser Hydrogele sollte auf den dynamischen Wirt-Gast-Komplexen zwischen β -Cyclodextrin und Adamantan beruhen, um den Hydrogelen die Fähigkeit zur Selbstheilung zu verleihen. Diese dynamische Netzwerkstruktur erleichtert die 3D-Zelleinbettung sowie die Zellproliferation und -migration. Dadurch sollen die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele eine Alternative zu den derzeit verwendeten Materialien in der 3D-Zellkultivierung bieten.

Die Wirt-Gast-Hydrogele sollten durch kationische Comonomere mit adhäsionsfördernden Einheiten ausgestattet werden. Außerdem wurde eine Funktionalisierung der Hydrogele mit biologisch aktiven Komponenten über eine Copolymerisation von Peptidmonomeren bzw. eine polymeranaloge Peptidkopplung angestrebt (Schema 3A, Kapitel 3 und 4). Zusätzlich sollten dual-vernetzte Hydrogele zur Erhöhung der Steifigkeit der Hydrogele bei gleichzeitigem Erhalt der selbstheilenden Eigenschaften entwickelt werden (Schema 3B, Kapitel 5). Die mechanischen Eigenschaften der physikalischen und dualen Hydrogele sollten durch die Variation der Parameter Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration im Hydrogel verändert und über rheologische Methoden charakterisiert werden. Die daraus abzuleitenden Struktur-Eigenschaftsbeziehungen sollen eine gezieltere Anpassung der mechanischen Eigenschaften auf die gewünschte Anwendung der Hydrogele ermöglichen.

Zur Bestimmung der Biokompatibilität der Polymere sollten Zytotoxizitätsassays durchgeführt werden. Darüber hinaus galt es, in 3D-Zellexperimenten den Einfluss der Steifigkeit, der Peptidkonzentration und der Ladung der Hydrogele auf das Zellverhalten zu untersuchen. Dadurch sollten die entwickelten Hydrogele hinsichtlich eines Einsatzes in der 3D-Zellkultivierung optimiert werden, sodass sie die damit verbundenen Materialanforderungen erfüllen. Zu diesen Anforderungen gehören die Biokompatibilität, die Modifizierbarkeit der mechanischen und chemischen/biologischen Eigenschaften, die Charakterisierbarkeit der Zusammensetzung und eine einfache und skalierbare Synthese der Hydrogele. Zudem ist die Transparenz der Materialien eine Grundvoraussetzung für mikroskopische Untersuchungsmethoden in der Zellbiologie.



Schema 3: Schematische Darstellung der physikalischen (A) und dualen (B) Hydrogelsysteme dieser Arbeit.

3. Synthese und Charakterisierung von Wirt-Gast-Hydrogelen

3.1 Entwicklung des Hydrogelsystems

Das physikalische Hydrogelsystem dieser Arbeit sollte aus zwei komplementären Polymeren bestehen, einem Wirt- und einem Gastpolymer, die beide löslich und somit durch Standardmethoden wie die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und die Gelpermeationschromatographie (GPC) charakterisierbar sein sollten. Eine gute Charakterisierbarkeit der Polymere ist für die gezielte Modifikation der chemischen und damit der mechanischen Eigenschaften essentiell. Durch das Mischen der Wirt- und Gastpolymere in wässriger Lösung sollten Hydrogele ausgebildet werden. Die Wirt-Gast-Vernetzung wurde gewählt, da sie eine dynamische Vernetzung ermöglicht und im Gegensatz zu anderen physikalischen Vernetzungen eine höhere Bindungsstärke bietet, wodurch auch physikalische Hydrogele mit höheren Steifigkeiten erzeugt werden können.^{107–109} Das Wirtpolymer wurde mit β -Cyclodextrin als Wirtmolekül funktionalisiert, da β -CD sich im Vergleich zu anderen Wirtmolekülen, wie Cucurbiturilen, durch eine gute Wasserlöslichkeit, kostengünstige Synthese und sehr gute Biokompatibilität auszeichnet.^{111–113} Da Adamantanderivate zu den Gastmolekülen des β -CD mit der höchsten Assoziationskonstante zählen, sollten Adamantylamin-Acrylamide in das Gastpolymer einpolymerisiert werden. In der Literatur wird ein Großteil der über β -CD und Adamantan vernetzten Hydrogele auf der Basis von natürlichen Polymeren wie Alginaten und Hyaluronsäure hergestellt,^{140,143,155,158,167} dies sollte in dieser Arbeit geändert werden, indem ein synthetischer Ansatz gewählt wurde.

Da das Hydrogelsystem über eine möglichst einfache Synthese hergestellt werden sollte, wurden die Polymere basierend auf Acrylaten und Acrylamiden mittels der freien radikalischen Polymerisation (FRP) synthetisiert. Die FRP besitzt den Vorteil, dass sie tolerant gegenüber vielen verschiedenen Monomeren und äußeren Einflüssen ist, somit ist während des Polymerisationsprozesses lediglich der Ausschluss von Sauerstoff und radikalübertragenden Verbindungen zu beachten. Darüber hinaus kann die FRP unter milden Bedingungen durchgeführt und einfach skaliert werden. Die Verwendung von Acrylaten und Acrylamiden ist außerdem dank ihrer großen Monomervielfalt vorteilhaft.^{25,168} Aufgrund dieses vollsynthetischen Ansatzes besteht anders als bei natürlichen Polymeren keine Gefahr von großen Chargendifferenzen, zu hohen Abbauraten oder der Übertragung von tierischen Pathogenen.^{56–59}

Die Polymere wurden mit Blick auf die zellbiologische Anwendung auf der Grundlage von hydrophilen und biokompatiblen Monomeren entwickelt. Daher wurde als Hauptmonomer auf das kommerziell erhältliche und schon zahlreich in der Biomedizin angewendete Monomer *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) zurückgegriffen. DMA besitzt eine exzellente Löslichkeit in Wasser und den meisten organischen Lösungsmitteln und weist aufgrund seines tertiären Amids eine höhere Hydrolysestabilität als Acrylamid auf.¹⁶⁹ Es wurde häufig zur Synthese von Hydrogelen angewendet, die in Verbindung mit Zellen eingesetzt wurden.^{170–172} Da die Adamantanmoleküle über eine Copolymerisation in das Polymer integriert werden sollten, wurde 1-Adamantylamin über einen Linker mit einer Acrylamidgruppe verbunden. Die Länge des Linkers beeinflusst die spätere Komplexierung im Hydrogel maßgeblich. So stellten KOOPMANS *et al.* eine 100-fach höhere Nullviskosität ihrer Wirt-Gast-Hydrogele fest, als sie einen Hexyl-Linker verwendeten anstelle einer direkten Bindung der Adamantylgruppe an das Polymerrückgrat. Die Verwendung eines Dodecyl-Linkers hingegen führte wiederum zu einer Verringerung der Nullviskosität der Hydrogele. Analog dazu wiesen WANG *et al.* über NOESY-Messungen eine schwächere Wechselwirkung zwischen β -CD-Protonen und Adamantyl-Protonen in Abwesenheit eines Linkers als bei der Verwendung eines Hexyl-Linkers nach. Die weitere Verlängerung des Linkers zu einer Dodecylkette führte zu Wechselwirkungen der β -CD-Kavität mit den Linker-Protonen und einer schwächeren Wechselwirkung zwischen den Adamantyl-Protonen und den β -CD-Protonen. Beide Arbeitsgruppen erklären die schlechtere Komplexierung ohne Linker mit einer sterisch störenden Wirkung des Polymerrückgrats, während der Linker die Zugänglichkeit der Adamantylgruppe verbessert. Mit steigender Linkerlänge wird allerdings dessen Flexibilität erhöht, wodurch dieser in die β -CD-Kavität eingelagert werden kann und somit in Konkurrenz zu der Adamantylgruppe steht.^{173,174} Außerdem beobachteten KRETSCHMANN *et al.* eine beschleunigte Rekomplexierung von Adamantylgruppen und β -CD nach einer Dissoziation, wenn ein Hexyl-Linker anstelle eines Linkers verwendet wurde.¹⁷⁵ Diese Erkenntnis lässt auf eine schnellere Selbstheilung der Hydrogele bei der Verwendung eines Linkers schließen. Basierend auf den Literaturergebnissen wurde in dieser Arbeit eine Hexylkette als Linker gewählt, somit ergab sich 6-Acrylamido-*N*-(adamantyl)hexanamid (AdHexAAm) als Gastmonomer.

Zusätzlich sollte ein kationisches Monomer in das Gastpolymer integriert werden, welches zwei Funktionen zu erfüllen hatte. Zum einen sollte es die Wasserlöslichkeit des Copolymers erhöhen, die besonders durch höhere Molanteile des hydrophoben Adamantanmonomers reduziert werden kann. Zum anderen hatte das kationische Monomer die Aufgabe, die Zelladhäsion zu verbessern. Die Zelladhäsion ist ein Prozess, durch den Zellen an anderen

Zellen oder der extrazellulären Matrix haften. Diese Zellhaftung ist die Grundlage für die Zellkommunikation und -regulation.¹⁷⁶ Verschiedene Forschungsarbeiten zeigten, dass Zellen aktiv über große Adhäsionskontakte, die Fokalkontakte, an ihrer Umgebung ziehen, um dadurch Informationen über die mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung zu sammeln, die für zelluläre Entscheidungsprozesse von Bedeutung sind.^{93,177,178} Die Zelladhäsion kann durch kationische Ladung unterstützt werden, da sich elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der kationisch geladenen Oberfläche und der negativ geladenen Zellmembran ausbilden.¹⁷⁹ Bekannt sind in der Zellkultivierung kationische Oberflächen auf der Basis von Poly-L-Lysin und Poly(ethylenimin)-Beschichtungen, die die Zelladhäsion mithilfe der Ladung als unspezifische Bindungsfaktoren vermitteln.^{180,181} In aktuelleren Arbeiten wurden acrylat- oder acrylamidfunktionalisierte Alkylamine, die aufgrund ihrer Basizität abhängig vom pH-Wert protoniert vorliegen, eingesetzt, aber auch quartäre Amine wurden zur Beeinflussung der Zelladhäsion verwendet. Diese Variante besitzt gegenüber den Beschichtungen den Vorteil, dass die Menge an kationischer Ladung besser eingestellt und mit anderen biologisch aktiven Einheiten wie Peptiden kombiniert werden kann.^{166,182–184} Der Einbau von kationischen Ladungen in die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele sollte über eine Copolymerisation des acrylatfunktionalisierten quartären Amins [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) erfolgen, da dieses gegenüber den nicht quartären Alkylaminen permanent und pH-Wert unabhängig kationisch geladen ist und sich zusätzlich als hydrolysestabiler erweist.²⁵

Aus den drei Monomeren DMA, AdHexAAm und TMAEA sollte das in Abbildung 8 dargestellte Gastpolymer in verschiedenen Monomerverhältnissen über einfache Copolymerisation hergestellt werden.

Das Gastpolymer sollte ebenfalls hauptsächlich aus dem hydrophilen Monomer DMA aufgebaut sein. Das Wirtmolekül β -Cyclodextrin sollte allerdings nicht wie das Gastmolekül als Monomer über eine Copolymerisation in das Polymer eingebaut werden, da dies, wie beispielsweise in den Arbeiten von IKURA *et al.* gezeigt, zu einer dynamischen kovalenten Vernetzung führen würde, indem das Polymer während der Polymerisation durch die β -CD-Kavität hindurchwächst.¹⁸⁵ Stattdessen sollte eine polymeranaloge Immobilisierung eines β -CD-Derivates erfolgen. In der Literatur wird β -Cyclodextrin häufig mit Ethylendiamin monofunktionalisiert und über eine Amidkupplung an Carboxylgruppen-haltigen Polymeren, meist Polysacchariden, immobilisiert.^{140,146,186} Längere Linker werden selten zusätzlich eingebracht.^{156,187} Um die Hydrogele hinsichtlich der Vernetzungseffizienz und einer guten Selbstheilungsfähigkeit zu optimieren, sollte hier ein Hexyl-Linker zwischen das

Polymerrückgrat und β -CD gesetzt werden. Dafür sollte das Monomer Acrylamidohexansäure (HexAAM) mit DMA copolymerisiert und das Ethylendiamin-funktionalisierte β -CD (β -CD-EDA) über eine Amidkupplung mit der Carboxylgruppe von HexAAM verbunden werden. Ein Aspekt, der bei der Verwendung von HexAAM allerdings zu beachten ist, ist die pH-Wert abhängige Deprotonierung der Carboxylgruppen. Im protonierten Zustand bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxyl- und den Amidgruppen des Monomers aus, während im deprotonierten Zustand eine Abstoßung der negativ geladenen Carboxylatgruppen stattfinden kann. Da PHADKE *et al.* basierend auf diesen Wechselwirkungen pH-Wert abhängige reversible Hydrogele herstellten,¹⁸⁸ wurde in Vorexperimenten zu dieser Arbeit der Einfluss von nicht vollständig mit β -CD-EDA umgesetzten HexAAM-Einheiten auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele untersucht. Dafür wurden Hydrogele mit gleicher Vernetzungsdichte und verschiedenen HexAAM-Anteilen hergestellt und rheologisch charakterisiert. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied der mechanischen Eigenschaften zwischen Hydrogelen mit höheren und niedrigeren HexAAM-Anteilen festgestellt, wodurch ein nicht vollständiger Umsatz von HexAAM für das in dieser Arbeit verwendete Hydrogelsystem kein Problem darstellt, dennoch wurde in den nachfolgenden Polymer-Synthesen ein möglichst guter Umsatz der HexAAM-Einheiten mit β -CD-EDA anvisiert. Das angestrebte Wirtpolymer ist in Abbildung 8 zusammen mit dem Gastpolymer dargestellt.

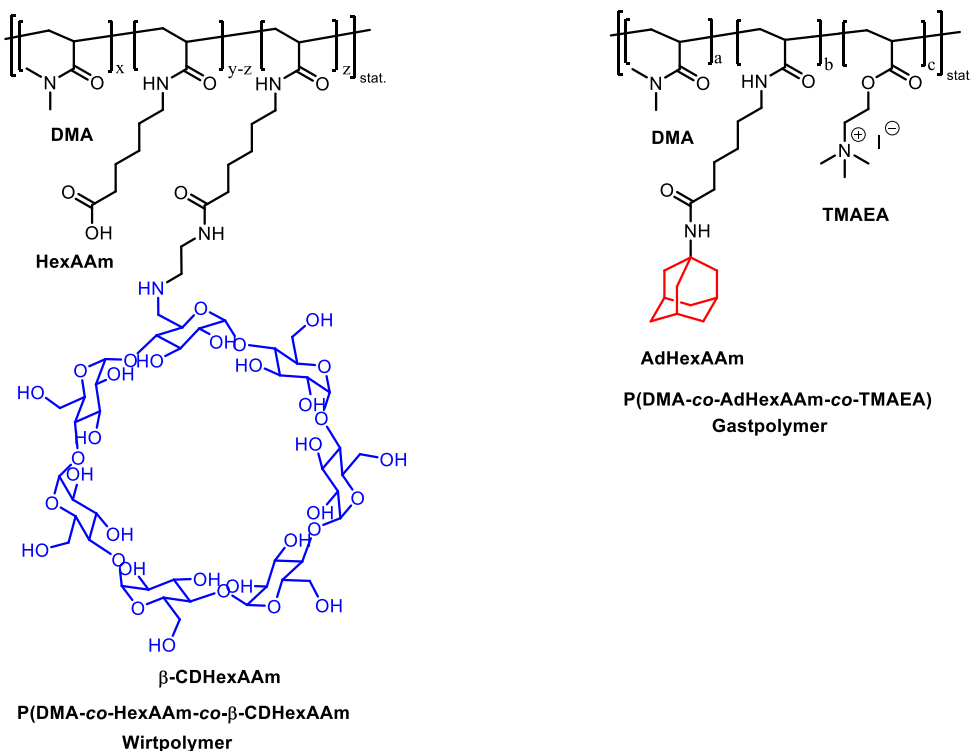


Abbildung 8: Zusammensetzung der β -Cyclodextrin- und Adamantanpolymere für die Herstellung von Wirt-Gast-Hydrogelen.

Zur Charakterisierung des Hydrogelsystems basierend auf diesen beiden Polymeren und um zu prüfen, ob die Anforderungen für eine zellbiologische Anwendung erfüllt werden können, werden in den folgenden drei Abschnitten die Modifizierbarkeit der mechanischen Eigenschaften (Abschnitt 3.2), die Funktionalisierung mit biologisch aktiven Liganden sowie deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften (Abschnitt 3.3) und die Biokompatibilität der Wirt-Gast-Hydrogele (Abschnitt 3.4) untersucht.

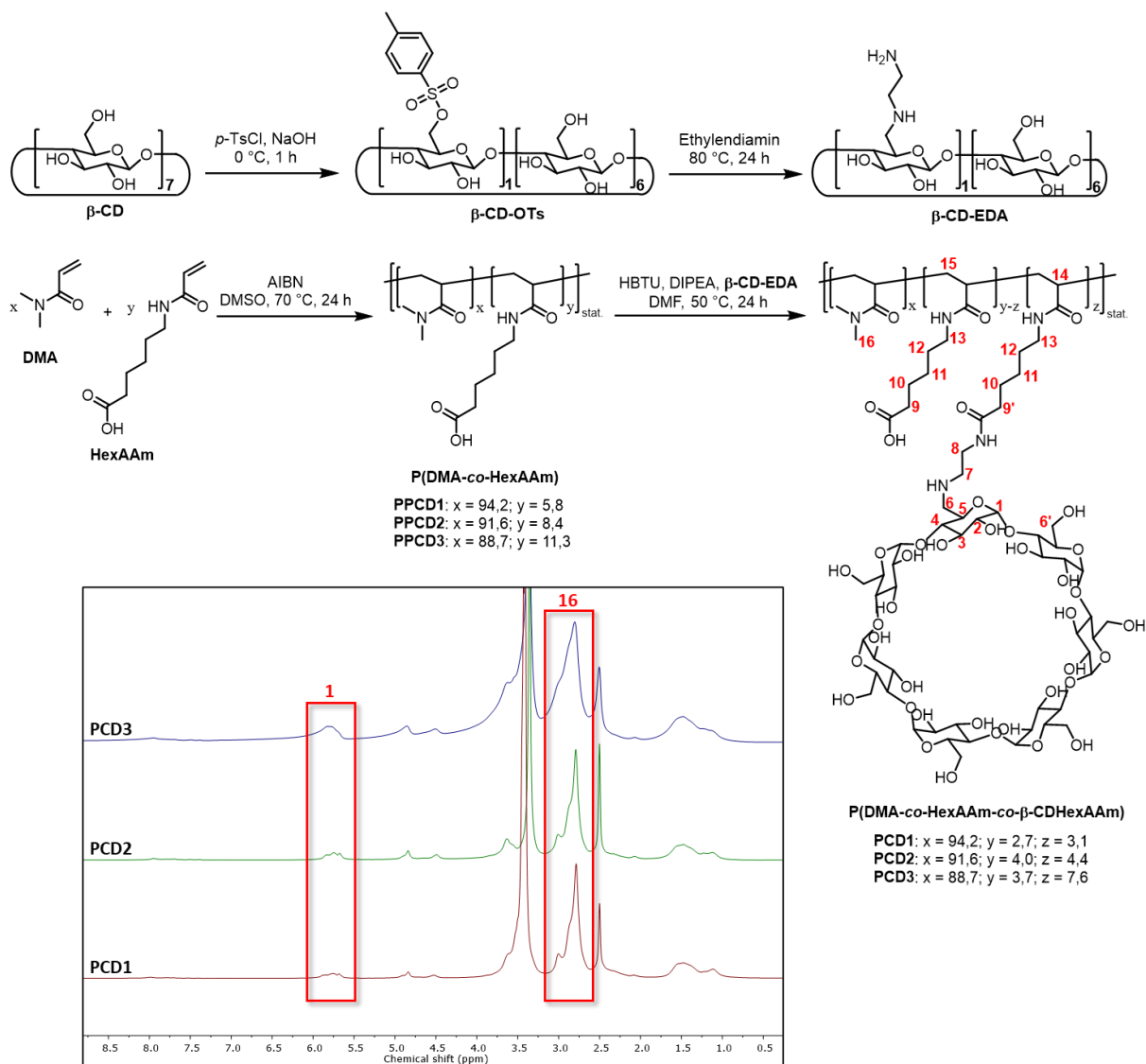
3.2 Einfluss der Vernetzungsdichte und Polymerkonzentration auf die mechanischen Eigenschaften der Wirt-Gast-Hydrogele

Da die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen einen maßgeblichen Einfluss auf das Zellverhalten haben und daher die gezielte Einstellbarkeit dieser Eigenschaften von Interesse ist, soll in diesem Abschnitt die Abhängigkeit der Steifigkeit, Elastizität und der Selbstheilung der Hydrogele von den Parametern Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration untersucht werden. Dafür wurden zunächst die Wirt- und Gastpolymere mit drei verschiedenen Anteilen an Adamantan und β -Cyclodextrin hergestellt und anschließend die daraus hergestellten Hydrogele rheologisch charakterisiert.

3.2.1 Synthese der Wirtpolymere

Für die Synthese der Wirtpolymere wurden zunächst die Präpolymere P(DMA-*co*-HexAAM) **PPCD1-PPCD3** über eine freie radikalische Polymerisation von DMA und 6-*N*-Acrylamidohexansäure (HexAAM) hergestellt (Schema 4).

Das Monomer HexAAM wurde in Anlehnung an die Literatur¹⁸⁹ über eine SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion zwischen 6-*N*-Aminohexansäure und Acryloylchlorid synthetisiert und in einer Ausbeute von 40 % erhalten. Die Struktur und Reinheit von HexAAM wurde über ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Die entsprechenden Spektren sind im Anhang gezeigt (Abbildungen A1 und A2). HexAAM wurde in den Molanteilen 5,1 mol% (**PPCD1**), 7,6 mol% (**PPCD2**), und 10,1 mol% (**PPCD3**) zum Polymerisationsgemisch hinzugegeben, um Polymere mit drei verschiedenen Vernetzeranteilen herstellen zu können. Die Polymerisation wurde mit Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Initiator bei 70 °C in DMSO durchgeführt. Anschließend wurden die Polymergemische über eine Dialyse gegen Wasser aufgereinigt und lyophilisiert.



Schema 4: Synthese von β -CD-EDA über β -CD-OTs sowie die Synthese und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (DMSO- d_6) der Wirtpolymere **PCD1-PCD3** mit der Zuordnung der Signale, über die die Polymerzusammensetzung bestimmt wurde.

Die erhaltenen Zusammensetzungen der Präpolymere wurden über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt und weichen nur geringfügig von den eingesetzten Monomerverhältnissen ab (Tabelle 3). Außerdem wurden die mittleren Molmassen \bar{M}_n und Dispersitäten D der Präpolymere über Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt. Die erhaltenen mittleren Molmassen der Präpolymere liegen zwischen 151700 Da (**PPCD1**) und 62600 Da (**PPCD3**) und die Dispersitäten befinden sich in einem für eine freie radikalische Polymerisation niedrigen Bereich. Um im nächsten Schritt β -CD an die Carboxylgruppen der Präpolymere kuppeln zu können, wurde es nach einem literaturbekannten Verfahren¹⁹⁰ zunächst mit p -Toluolsulfonylchlorid (p -TsCl) zu Mono-(6- O -(p -toluylsulfonyl))- β -cyclodextrin (β -CD-OTs)

umgesetzt. β -CD-OTs ist eines der wichtigsten Zwischenprodukte des β -Cyclodextrins, da die Tosylgruppe im Gegensatz zur Hydroxylgruppe eine sehr gute Abgangsgruppe darstellt, die mit verschiedenen Nucleophilen substituiert werden kann.¹⁹¹ Die Tosylierung läuft selektiv an den primären Hydroxylgruppen in C6-Position des β -Cyclodextrins ab, da die sekundären Hydroxylgruppen für das sterisch anspruchsvolle *p*-TsCl schlecht zugänglich sind. Außerdem bildet sich ein Wirt-Gast-Komplex zwischen *p*-TsCl und β -CD aus, der das Reagenz in die Nähe der primären Hydroxylgruppen bringt. Eine Mehrfachtosylierung wurde über die Reaktionstemperatur und -zeit verhindert, sodass das monotosylierte Produkt mit einer Ausbeute von 31 % erhalten und die Struktur über ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte (Abbildungen A8 und A9). Anschließend wurde β -CD-OTs mit 1,2-Ethylendiamin zu Mono-6-deoxy-6-ethylendiamin- β -cyclodextrin (β -CD-EDA) in Anlehnung an die Synthesevorschrift von KANG *et al.* umgesetzt¹⁹² und nach Aufreinigung über wiederholte Fällungsschritte mit einer Ausbeute von 87 % erhalten. Die Struktur von β -CD-EDA wurde über ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und Massenspektroskopie (MS) nachgewiesen (Abbildungen A10-A12).

Die Kupplungsreaktion erfolgte schließlich, indem die Carboxylgruppen der drei P(DMA-*co*-HexAAm)-Präpolymere **PPCD1-PPCD3** mit HBTU aktiviert und die dabei entstandenen Aktivester mit β -CD-EDA nucleophil substituiert wurden. Die Aufreinigung der erhaltenen Wirtpolymere P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm) (**PCD1-PCD3**) fand über eine viertägige Dialyse gegen Wasser statt, um eine vollständige Entfernung ungebundener β -CD-EDA-Moleküle zu erreichen. Die vollständige Entfernung der ungebundenen β -CD-EDA-Moleküle ist für eine effiziente Hydrogelbildung essentiell, da die freien β -CD-EDA-Moleküle eine Konkurrenz zu den immobilisierten β -CD-EDA-Moleküle darstellen würden. Die erfolgreiche Synthese der Wirtpolymere wurde über ¹H-NMR- und FTIR-Spektroskopie nachgewiesen.

Das FTIR-Spektrum (Abbildung 9) der Wirtpolymere zeigt die charakteristischen Banden von β -CD bei den Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ 946 cm⁻¹, 1025 cm⁻¹ und 1153 cm⁻¹. Die Bande bei 946 cm⁻¹ kann der Gerüstschwingung der R-1,4-Bindung von β -CD zugeordnet werden, während die Banden bei 1025 cm⁻¹ und 1153 cm⁻¹ der antisymmetrischen glycosidischen C-O-C-Schwingung und der gekoppelten C-C/C-O-Streckschwingung zuzuschreiben sind.¹⁹³ Auch die Streckschwingung der Hydroxylgruppen von β -CD ist bei 3286 cm⁻¹ zu erkennen. Außerdem zeigen die FTIR-Spektren der Prä- und Wirtpolymere bei einer Wellenzahl $\tilde{\nu}$ von 1617 cm⁻¹ die C=O-Streckschwingung der Amidgruppen.¹⁴⁶

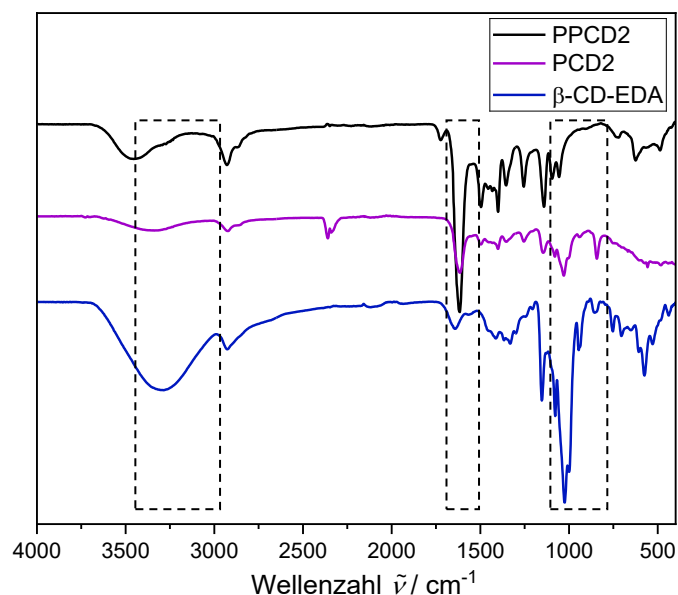


Abbildung 9: Repräsentative FTIR-Spektren des Präpolymers **PPCD2**, des Wirtpolymers **PCD2** und des β -CD-Derivates β -CD-EDA.

Die Monomerverhältnisse der Wirtpolymere wurden anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelt. Dabei wurde der β -CD-Anteil über das Signal der CH-Gruppe von β -CD in Position 1 bei einer chemischen Verschiebung von 4,84 ppm und der DMA-Anteil anhand des Signals der CH_3 -Gruppe bei 3,22-2,64 ppm nach Subtraktion der überlagernden Signale bestimmt (Schema 1).

Tabelle 3: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Präpolymere **PPCD1-PPCD3** und der Wirtpolymere **PCD1-PCD3**.

Polymer	Zusammensetzung DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm / mol%		\bar{M}_n / Da ^b	D^b
	theoretisch	experimentell ^a		
PPCD1	94,9/5,1/0,0	94,2/5,8/0,0	151700	1,93
PPCD2	92,4/7,6/0,0	91,6/8,4/0,0	120600	1,93
PPCD3	89,9/10,1/0,0	88,7/11,3/0,0	62600	1,84
PCD1	94,9/1,1/4,0	94,2/2,7/3,1	- ^c	- ^c
PCD2	92,4/1,6/6,0	91,6/4,0/4,4	- ^c	- ^c
PCD3	89,9/2,1/8,0	88,7/3,7/7,6	- ^c	- ^c

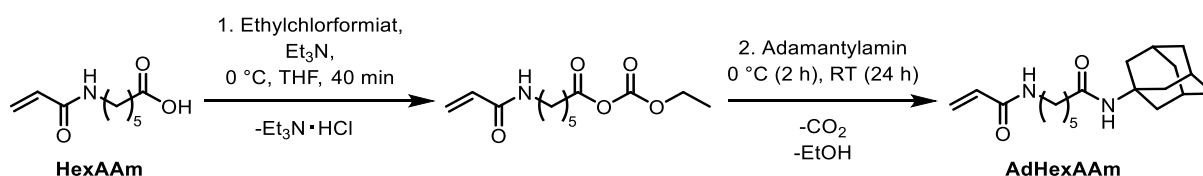
^a bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ aus dem Verhältnis der Methylprotonen von DMA (3,22-2,64 ppm) zu den Methylprotonen neben der Carboxylgruppe von HexAAm (2,19 ppm) und den Protonen in Position 1 von β -CD (4,84 ppm); ^b bestimmt über GPC-Messungen mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluenten und PMMA als Standard; ^c Polymere waren nicht in dem GPC-Eluenten löslich.

Die theoretischen und aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestimmten Zusammensetzungen der Wirtpolymere sind in Tabelle 3 gezeigt. Da aus vorherigen Experimenten der nicht quantitative

Umsatz der Kupplungsreaktion von β -CD bekannt war, wurde HexAAm in einem Überschuss copolymerisiert, um die gewünschten Molanteile an β -CD im finalen Polymer zu erreichen. Die resultierten Molanteile an immobilisiertem β -CD liegen mit 3,1 mol% (**PCD1**), 4,4 mol% (**PCD2**) und 7,6 mol% (**PCD3**) für die nachfolgenden Experimente ausreichend nah an den theoretischen Werten. Die GPC-Daten der Wirtpolymere **PCD1** bis **PCD3** konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit der Polymere in dem GPC-Eluenten nicht bestimmt werden.

3.2.2 Synthese der Gastpolymere

Die Gastpolymere P(DMA-*co*-AdHexAAm-*co*-TMAEA) (**PAd1-PAd3**) wurden über eine freie radikalische Polymerisation von DMA, 6-Acrylamido-*N*-(adamantyl)hexanamid (AdHexAAm) und [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) synthetisiert (Abbildung 10). Dabei sollte das Gastmonomer AdHexAAm in den Molanteilen 4 mol% (**PAd1**), 6 mol% (**PAd2**) und 8 mol% (**PAd3**) copolymerisiert werden, um möglichst ähnliche Anteile an Adamantanmolekülen in den Gastpolymeren wie β -CD-Molekülen in den Wirtpolymeren zu erhalten. Zunächst wurde AdHexAAm anhand der Synthesevorschriften von RITTER *et al.* und YAMADA *et al.* aus HexAAm, Ethylchlorformiat und 1-Adamantylamin dargestellt (Schema 5).



Schema 5: Synthese des Monomers AdHexAAm aus HexAAm und Adamantylamin nach Aktivierung der Carboxylgruppe mit Ethylchlorformiat.

Ethylchlorformiat diente dabei zur Aktivierung der Carboxylgruppe von HexAAm unter Bildung eines Anhydrids, welches anschließend nukleophil mit 1-Adamantylamin substituiert wurde. AdHexAAm konnte mit einer Ausbeute von 71 % isoliert werden. Die Synthese des Monomers TMAEA erfolgte über eine Methylierung von Dimethylaminoethylacrylat (DMAEA), bei der das Produkt in einer 99 %igen Ausbeute erhalten wurde. Die Struktur der Monomere wurde über ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie nachgewiesen (Abbildungen A3 und A4).

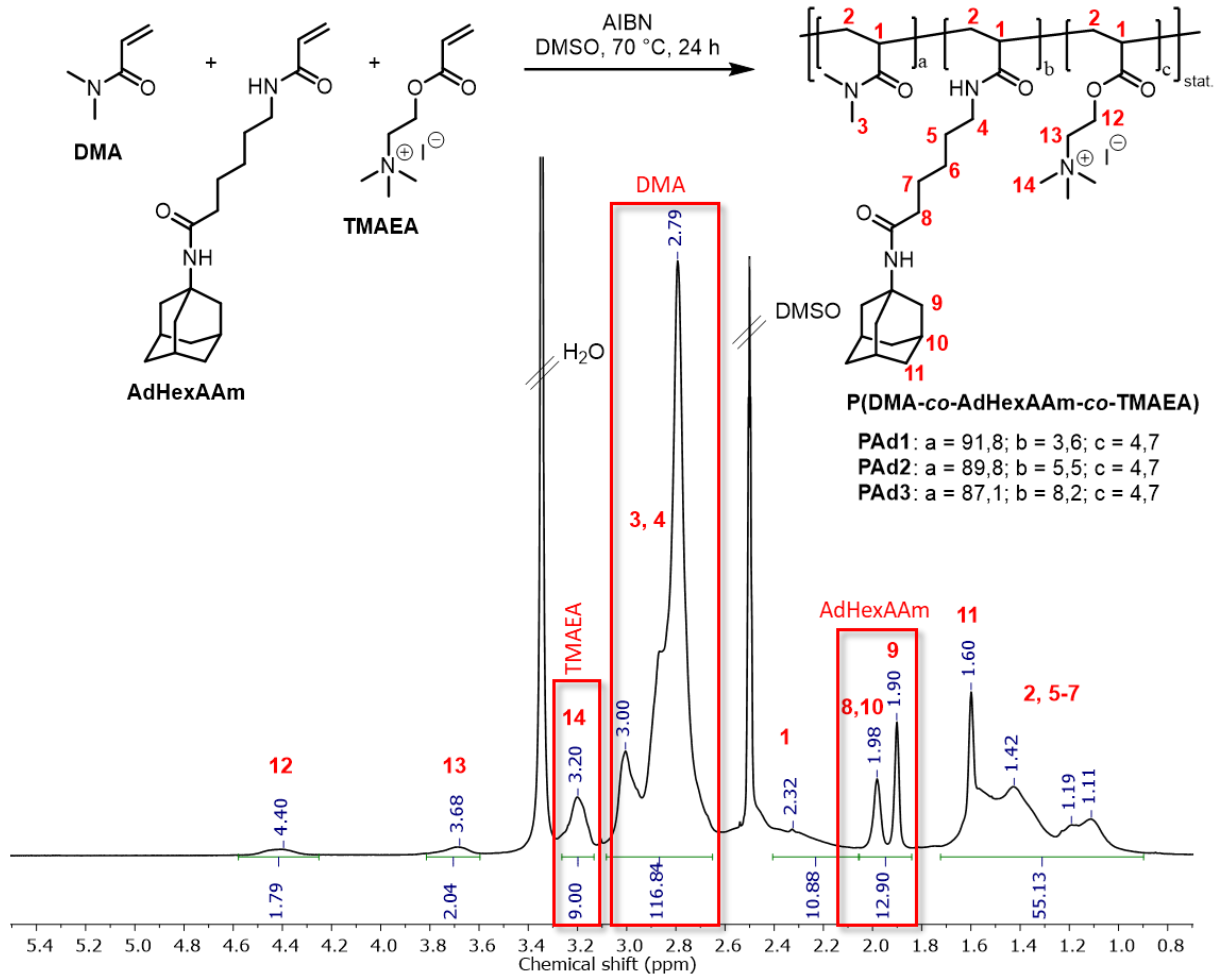


Abbildung 10: Freie radikalische Polymerisation von DMA, AdHexAAm und TMAEA zum Gastpolymer P(DMA-co-AdHexAAm-co-TMAEA) und ein exemplarisches $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) des Gastpolymers **PA3** mit den Zuordnungen der Signale.

Die Copolymerisation der Monomere fand in DMSO bei 70 °C mit AIBN als Initiator statt. Die anschließende Charakterisierung der hergestellten Gastpolymere **PA1-PA3** über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigte ein erfolgreiches Erreichen der gewünschten Zusammensetzung der drei Copolymere (Tabelle 4). Der Anteil an AdHexAAm wurde über die Protonensignale der Adamantylgruppe bei 2,05-1,84 ppm, der Anteil an TMAEA über das Methylprotonensignal bei 3,20 ppm und der Anteil an DMA über das Methylprotonensignal bei 3,11-2,60 ppm bestimmt. Zur weiteren Charakterisierung der Gastpolymere wurden GPC-Messungen durchgeführt. Die dabei ermittelten mittleren molaren Massen der drei Polymere lagen mit Werten zwischen 158400 Da und 178600 Da nah beieinander, was eine gute Vergleichbarkeit der Polymere ermöglicht. Die Dispersitäten der drei Gastpolymere liegen in einem für die freie radikalische Polymerisation typischen Bereich.

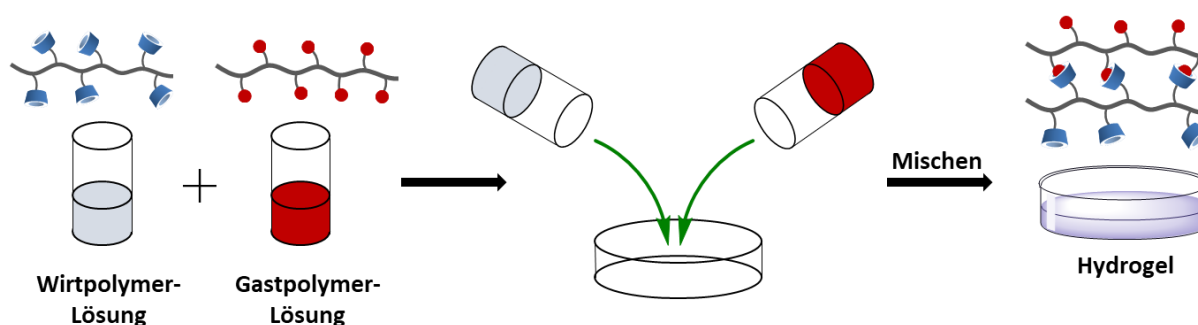
Tabelle 4: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität \bar{D} der Copolymere **PAd1-PAd3**.

Polymer	Zusammensetzung DMA/AdHexAAM/TMAEA / mol%		\bar{M}_n / Da ^b	\bar{D} ^b
	theoretisch	experimentell ^a		
PAd1	91/4/5	91,8/3,6/4,7	178600	2,00
PAd2	89/6/5	89,8/5,5/4,7	143100	1,89
PAd3	87/8/5	87,1/8,2/4,7	158400	2,21

^a bestimmt mittels ¹H-NMR aus dem Verhältnis der Methylprotonen von DMA (3,11-2,60 ppm) zu den Methylprotonen von TMAEA (3,20 ppm) und den Adamantylprotonen von AdHexAAM (2,05-1,84 ppm); ^b bestimmt über GPC-Messungen mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluenten und PMMA als Standard.

3.2.3 Synthese der Wirt-Gast-Hydrogele

Für die Synthese der Wirt-Gast-Hydrogele wurden die β -CD- und Ad-Polymere zunächst in Wasser gelöst. Anschließend wurden die beiden Polymerlösungen zusammengegeben und gründlich vermischt (Schema 6). Dabei wurden **PAd1** mit **PCD1 (G1-G4)**, **PAd2** mit **PCD2 (G5-G8)** und **PCD3** mit **PAd3 (G9-G12)** in jeweils vier verschiedenen Gesamtpolymerkonzentrationen (β = 4, 6, 8, 10 Gew.-%) kombiniert, sodass insgesamt zwölf verschiedene Hydrogele erhalten wurden.



Schema 6: Schematische Darstellung der Hydrogelsynthese aus wässrigen Wirt- und Gastpolymerlösungen.

Die Polymere wurden in einem Mengenverhältnis gemischt, das ein 1:1-Verhältnis der β -CD- und Ad-Einheiten ergab. Das 1:1-Verhältnis von Wirt- und Gastmolekül ermöglicht laut vorausgegangener Studien die effizienteste Vernetzung.^{173,194,195} Da die β -CD-Anteile in den Polymeren unterhalb derer der Adamantanmoleküle liegen, sind sie limitierend für die Gesamtvernetzungsichte der Hydrogele, die somit für **G1** bis **G4** bei 3,1 mol%, für **G5** bis **G8** bei 4,4 mol% und für **G9** bis **G12** bei 7,6 mol% liegt. Die Zusammensetzungen und Gesamtpolymerkonzentrationen der Hydrogele sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 5: Gesamtpolymerkonzentration β und Zusammensetzung der Hydrogele G1-G12.

Hydrogel	β / mg/mL	Gastpolymer	Wirtpolymer
G1	4	PAd1	PCD1
G2	6	PAd1	PCD1
G3	8	PAd1	PCD1
G4	10	PAd1	PCD1
G5	4	PAd2	PCD2
G6	6	PAd2	PCD2
G7	8	PAd2	PCD2
G8	10	PAd2	PCD2
G9	4	PAd3	PCD3
G10	6	PAd3	PCD3
G11	8	PAd3	PCD3
G12	10	PAd3	PCD3

Die hergestellten Hydrogele sind in der Abbildung 11A) dargestellt. Die Hydrogele zeigten bei ihrer Herstellung eine sofortige Zunahme der Viskosität. Dennoch wurden die Hydrogele, um die vollständige Ausbildung der Vernetzungen sicherzustellen, erst nach einer mindestens zwölfstündigen Wartezeit charakterisiert. Als ein erster Test auf Gel- bzw. Flüssigkeitscharakter wurden die Probengläser auf den Kopf gestellt (*Vial-Inversion-Test*). Da alle Gele am Glasboden haften geblieben und nicht nach unten geflossen sind, deutet der Test auf einen Gelcharakter aller Hydrogele hin.


Abbildung 11: Bilder der Wirt-Gast-Hydrogele G1-G12 im *Vial-Inversion-Test* (A) und des Hydrogels G11 zur Verdeutlichung der Transparenz (B).

Darüber hinaus verdeutlicht Abbildung 11B) die Transparenz der Hydrogele, die für viele Anwendungen, wie beispielsweise Mikroskopieexperimente, von Bedeutung ist.

Für die genauere Untersuchung der Struktur-Eigenschaft-Zusammenhänge wurden die Wirt-Gast-Hydrogele mit rheologischen Methoden charakterisiert.

3.2.4 Rheologische Charakterisierung der Wirt-Gast-Hydrogele

Über oszillatorische Amplitudentests sollten der linear-viskoelastische Bereich (LVE-Bereich) sowie das Speichermodul G' und der Verlustfaktor $\tan\delta = G''/G'$ im LVE-Bereich bestimmt werden. Mithilfe von G'_{LVE} und $\tan\delta_{LVE}$ lassen sich Aussagen über die Steifigkeit beziehungsweise die Elastizität der Hydrogele treffen.

Die in Abbildung 12A)-C) dargestellten Amplitudentests der Hydrogele **G1-G12** zeigen bei niedrigeren Scherdeformationen einen Plateaubereich, den linear-viskoelastischen Bereich, der bei allen Gelen bis zu einer Scherdeformation, der sogenannten Nachgebgränze γ_y , von mindestens 24 % anhält.

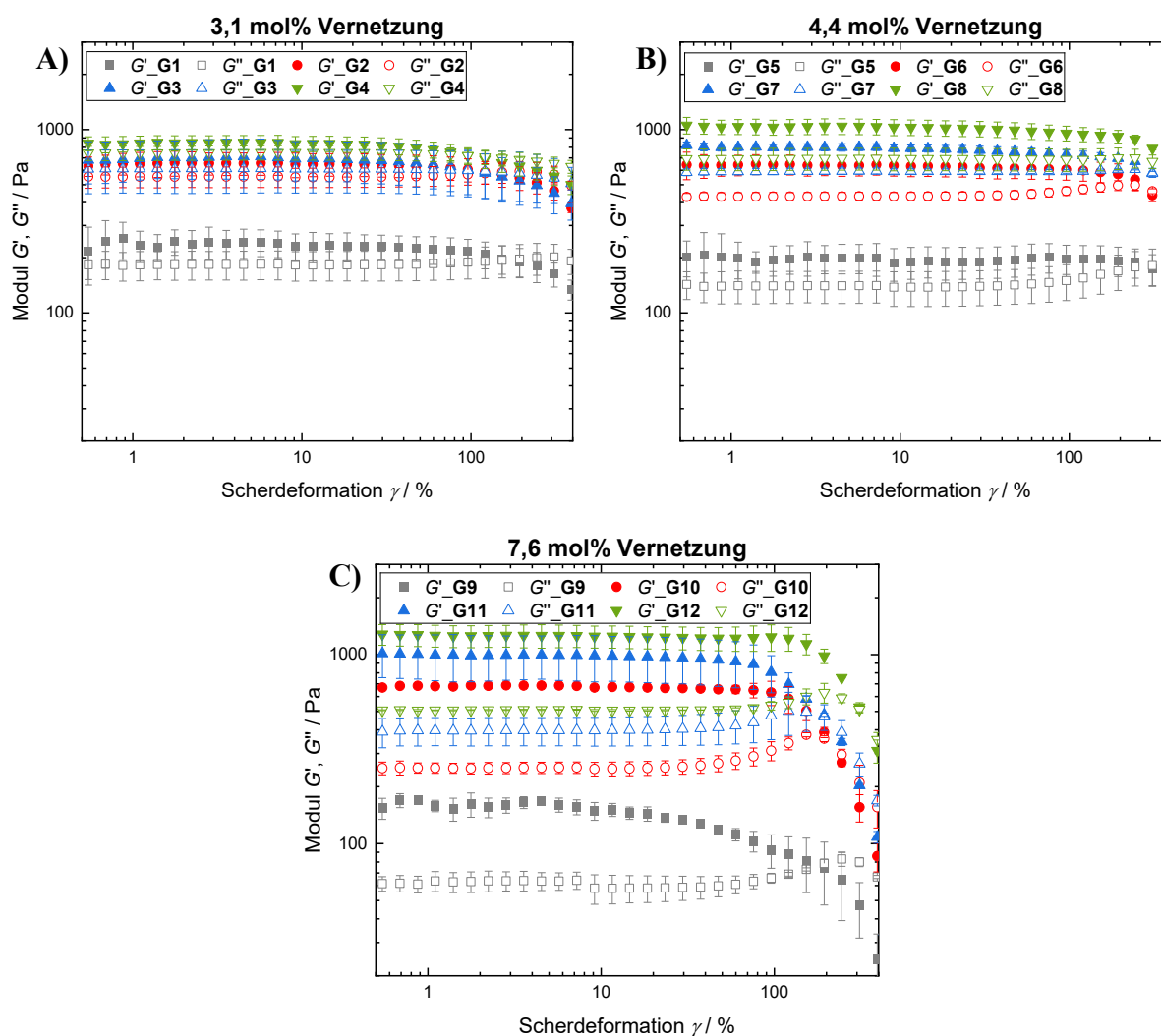


Abbildung 12: Amplitudentests der Hydrogele **G1-G4** mit 3,1 mol% Vernetzer (A), **G5-G8** mit 4,4 mol% Vernetzer (B) und **G9-G12** mit 7,6 mol% Vernetzer (C) gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

Innerhalb des LVE-Bereiches weisen alle hergestellten Hydrogele einen Gelcharakter auf, da der Wert des Speichermoduls G' den des Verlustmoduls G'' übersteigt. Dies bedeutet, dass schon die niedrigste verwendete Vernetzungsdichte von 3,1 mol% ausreichend war, um ein Hydrogel zu bilden. Bei stärkerer Scherdeformation ist für alle hergestellten Hydrogele ein Abfall des Speicher- und des Verlustmoduls zu beobachten, der auf eine Zerstörung der Wirt-Gast-Vernetzungen hindeutet, die letztlich zum Verlust der Gelstruktur führt. Dieser Verlust der Gelstruktur ist an dem Schnittpunkt von G' und G'' , der sogenannten Fließgrenze, zu erkennen, die bei allen hergestellten Hydrogelen bei einer Scherdeformation von $>100\%$ liegt und somit auf eine gute Netzwerkstabilität hindeutet im Vergleich zu anderen Wirt-Gast-Hydrogelen, die über β -CD und Adamantan vernetzt sind.^{146,158,194}

Zur besseren Verdeutlichung der Abhängigkeit der Steifigkeit und der Elastizität der Hydrogele von der Vernetzungsdichte und der Gesamtpolymerkonzentration β wurden die Mittelwerte von G'_{LVE} und $\tan\delta_{LVE}$ im LVE-Bereich der Amplitudentests bestimmt und in den Abbildungen 16A) und 16B) gegen die Gesamtpolymerkonzentration β aufgetragen.

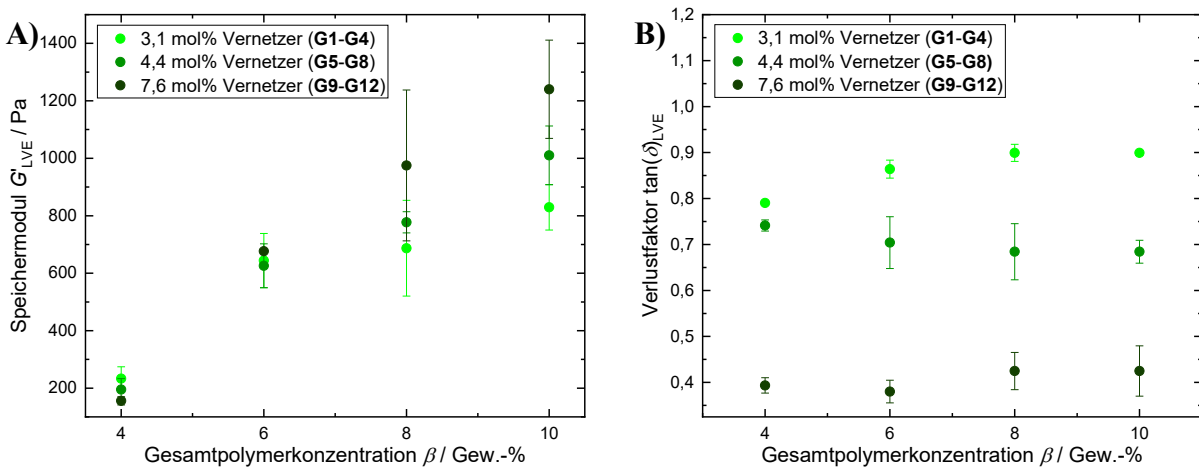


Abbildung 13: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} (A) und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) der Hydrogele **G1-G12** als Funktion der Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

Die drei verwendeten Vernetzungsdichten wurden in den Abbildungen durch farbliche Abstufungen markiert. In der Abbildung 13A) ist ein Anstieg des Speichermoduls G'_{LVE} und damit der Steifigkeit der Hydrogele mit der Gesamtpolymerkonzentration zu erkennen. Ein Einfluss der Vernetzungsdichte auf die Steifigkeit ist erst ab einer Gesamtpolymerkonzentration von 8 Gew.-% zu beobachten. Bei den 4 Gew.-%igen Hydrogelen (**G1, G5, G9**) lagen die Steifigkeiten mit 156-233 Pa und bei den 6 Gew.-%igen Hydrogelen (**G2, G6, G10**) mit 626-677 Pa nah beieinander. Bei den 8 und 10 Gew.-%igen Hydrogelen steigt G'_{LVE} und damit die

Steifigkeit der Hydrogele mit zunehmendem Molanteil an Vernetzermolekülen. **G12** besitzt als Gel mit dem größten Vernetzeranteil (7,6 mol%) und der höchsten Gesamtpolymerkonzentration β (10 Gew.-%) das mit $G'_{LVE} = 1240 \pm 171$ Pa größte Speichermodul. Dadurch wird bestätigt, dass ein größerer β -CD- und Adamantan-Anteil im Polymer zu mehr Vernetzungen im Hydrogel führt.

Die Auftragung des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ in Abhängigkeit der Gesamtpolymerkonzentration und der Vernetzungsdichte in Abbildung 13B) zeigt, dass die Elastizität der Hydrogele von der Vernetzungsdichte abhängt und unabhängig von der Gesamtpolymerkonzentration ist. Je höher der β -CD- und Adamantan-Anteil ist, desto höher ist die Vernetzungsdichte und desto größer ist die Elastizität. Dies zeigt, dass bei den Hydrogelen **G1-G12** die Deformationsenergie in der elastischen Dehnung des Polymernetzwerkes gespeichert wird.

Darüber hinaus wurden oszillatorische Frequenztests durchgeführt, um den Einfluss der Polymerkonzentration und der Vernetzungsdichte auf das dynamische viskoelastische Verhalten der Hydrogele zu untersuchen. Die in Abbildung 14A)-C) gezeigten Frequenztests wurden im linear-viskoelastischen Bereich bei konstanter Scherdeformation von $\gamma = 1\%$ und in einem breiten Frequenzbereich von 0,1-100,0 Hz durchgeführt. In den Abbildungen ist für alle zwölf Hydrogele eine Frequenzabhängigkeit des Speicher- und des Verlustmoduls zu erkennen, welche eine typische Eigenschaft von reversibel vernetzten Hydrogelen ist. Die Frequenzabhängigkeit der Hydrogele nimmt mit steigendem β -CD- und Adamantan-Anteil ab, denn während **G1-G4** einen Schnittpunkt von G' und G'' (Sol-Gel-Übergang) aufweisen, liegt das Speichermodul G' bei den Hydrogelen **G5-G12** über den gesamten gemessenen Frequenzbereich oberhalb des Verlustmoduls G'' . Außerdem ist der Abstand zwischen G' und G'' bei den Gelen **G9-G12** größer und die Steigung der Graphen geringer als bei den Gelen **G5-G8**. Die sinkende Frequenzabhängigkeit der Hydrogele deutet auf eine stärkere Vernetzung hin und ist damit ein weiterer Nachweis der höheren Vernetzungsdichte durch größere Molanteile an β -CD und Adamantan in den Polymeren.

Die Gesamtpolymerkonzentration hingegen führt nicht zu einer Änderung der Frequenzabhängigkeit der Hydrogele, denn die Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} der Gele **G1-G4** bleibt trotz der Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration nahezu konstant (Abbildung 14A)), Tabelle A1). Auch die Steigung der Graphen in den Abbildungen 14B) und 14C) ändert sich nicht mit der Gesamtpolymerkonzentration, was in Übereinstimmung mit der Auswertung der Amplitudentests (Abbildung 13B)) verdeutlicht, dass die Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration nicht zu mehr elastischen Vernetzungen führt, aber zu mehr Steifigkeit durch stärkere Füllung.

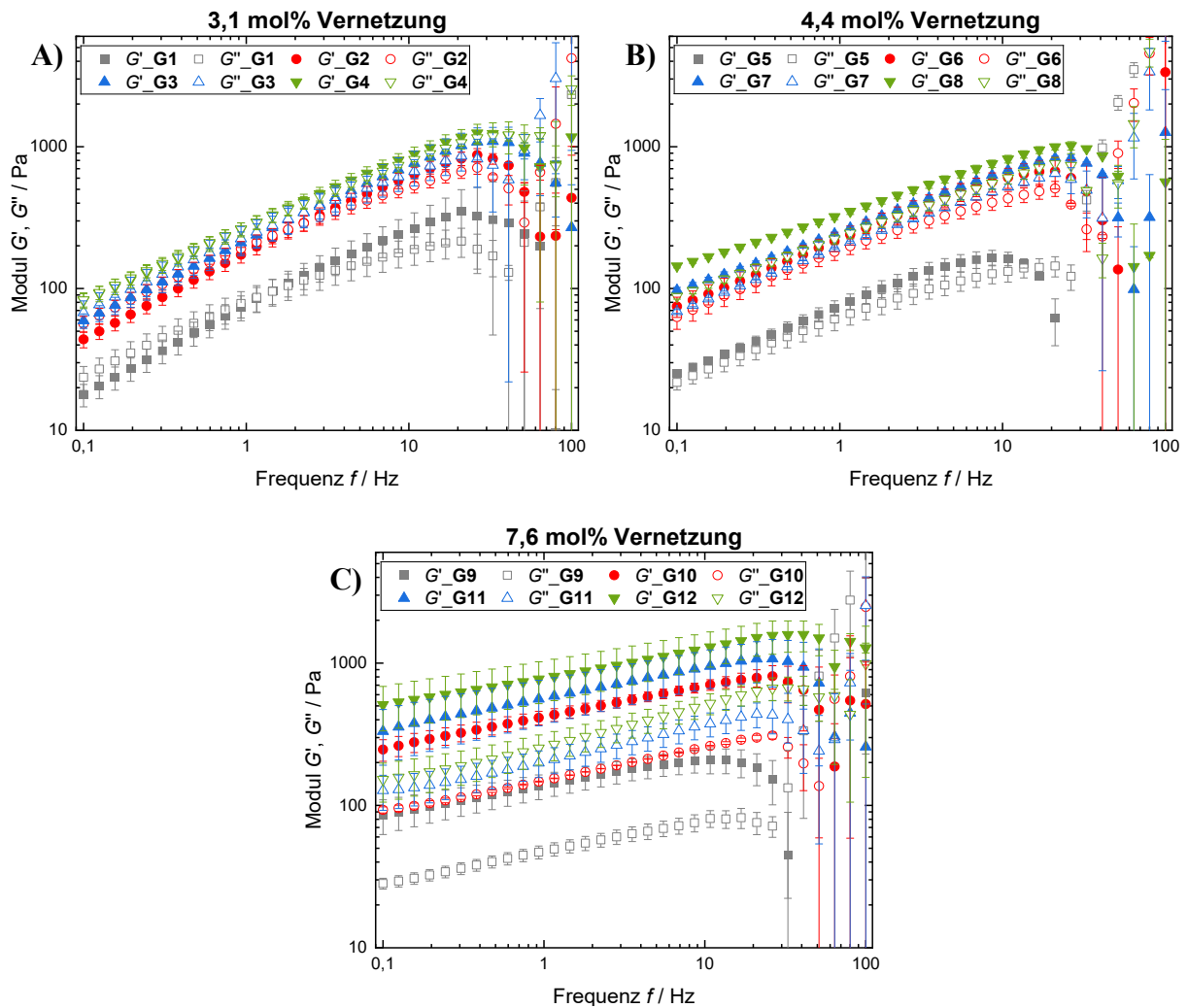


Abbildung 14: Frequenztests der Wirt-Gast-Hydrogele **G1-G4** mit 3,1 mol% Vernetzer (**A**), **G5-G8** mit 4,4 mol% Vernetzer (**B**) und **G9-G12** mit 7,6 mol% Vernetzer (**C**) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % und 25 °C.

Die Amplituden- und Frequenztests haben gezeigt, dass die Netzwerkstruktur der hergestellten Hydrogele über die Molanteile an β -CD und Adamantan in den Polymeren und die Gesamtpolymerkonzentration eingestellt werden kann. Diese Ergebnisse stimmen mit Erkenntnissen von *RODELL et al.*, die Wirt-Gast-Hydrogele auf Hyaluronsäure-Basis hergestellt und rheologisch charakterisiert haben, überein.¹⁵¹ Außerdem können die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele Steifigkeiten von 156 Pa bis 1240 Pa erreichen und somit die Gewebesteifigkeiten von beispielsweise Hirn (1000-3000 Pa),¹⁹⁶ Lungengewebe (840-1500 Pa)¹⁹⁷ und der Linse (200-10300 Pa)^{198,199} nachahmen, wodurch sie potenziell als künstliche Kulturplattform für Zellen aus derartigem Gewebe genutzt werden können.

Um die Selbstheilungsfähigkeit der Hydrogele nach einer Deformation, wie beispielsweise einer Injektion durch eine Spritze zu untersuchen, wurden die Hydrogele Zeitmessungen bei abwechselnd hoher (500,0 %) und niedriger (0,5 %) Scherdeformation über vier Zyklen ausgesetzt. In Abbildung 14A) ist die Zeitmessung von **G4** exemplarisch gezeigt. Die Phase der hohen Deformation führt zur Zerstörung der Gelstruktur von **G4**, da G' und G'' in dieser Phase deutlich sinken und G' unterhalb von G'' liegt. Das Material liegt in dieser Phase folglich als viskoelastische Flüssigkeit vor. In der anschließenden Erholungsphase bei niedriger Deformation ist für **G4** ein Rückgang von dem Flüssigkeits- zum Gelcharakter zu beobachten, da G' den Wert von G'' wieder übersteigt. Diese Erholung der Gelstruktur ist nach allen vier Zerstörungsphasen zu erkennen.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Selbstheilungsfähigkeit der Gele wurden die Mittelwerte des Speichermoduls G' in den Phasen niedriger Scherdeformation in Prozent umgerechnet. Dafür wurde der Mittelwert des Speichermoduls G' vor der ersten Zerstörung (Zyklus 0) auf 100 % gesetzt und die Mittelwerte von G' in den nachfolgenden Erholungsphasen im Verhältnis zu Zyklus 0 in Prozent angegeben. Die Erholung von G' sowie die Verlustfaktoren $\tan\delta$ in den einzelnen Erholungsphasen sind für die Gele **G1-G12** in den Abbildungen 15B)-D) dargestellt. Bei allen zwölf Gelen ist eine partielle Erholung des Speichermoduls über vier Zerstörungs-Erholungs-Zyklen und somit eine Selbstheilungsfähigkeit zu erkennen. Das Speichermodul sinkt bei allen Gelen in dem ersten Zerstörungs-Erholungs-Zyklus am stärksten und in den nachfolgenden Zyklen nur geringfügig. Eine Ausnahme davon bilden die 4 Gew.-%igen Hydrogele **G1**, **G5** und **G9**, bei denen die Selbstheilungsfähigkeit von G' mit jedem Zyklus weiter sinkt. Bei **G1** sinkt die Selbstheilungsfähigkeit von G' von Zyklus 1 bis Zyklus 4 um weitere 25 %, bei **G5** um 15 % und bei **G9** um 24 %. Auffällig ist auch der Anstieg des Verlustfaktors $\tan\delta$ der 4 Gew.-%igen Hydrogele mit jedem Zerstörungs-Erholungs-Zyklus, besonders bei **G5** und **G9**, während die Verlustfaktoren der übrigen Hydrogele über alle vier Zyklen nahezu konstant bleiben. Die Verlustfaktoren der 4 Gew.-%igen Hydrogele steigen ab Zyklus 2 auf >1 , das heißt, der Gelcharakter dieser Materialien geht verloren. Dies deutet darauf hin, dass in jedem Zyklus weitere Wirt-Gast-Komplexe irreversibel dissoziieren. Zusätzlich ist ein Anstieg der Selbstheilungsfähigkeit von G' mit zunehmender Gesamtpolymerkonzentration der Hydrogele zu beobachten, denn von **G1** mit 4 Gew.-% bis **G4** mit 10 Gew.-% steigt die Selbstheilungsfähigkeit von G' im ersten Zyklus von 50 ± 16 % bei **G1** auf 75 ± 7 % bei **G4**. Bei den Gelen **G5** (4 Gew.-%) bis **G8** (10 Gew.-%) ist ein Anstieg der Selbstheilungsfähigkeit von G' im ersten Zyklus von 27 ± 27 % (**G5**) auf 62 ± 0 % (**G8**) und bei den Gelen **G9** (4 Gew.-%) bis **G12** (10 Gew.-%) von 32 % auf 42 ± 11 % zu verzeichnen. Dieser Anstieg der

Selbsteilungsfähigkeit mit der Gesamtpolymerkonzentration kann mit einer höheren Stoßwahrscheinlichkeit der Wirt- und Gastmoleküle bei höherer Konzentration erklärt werden. Die Wiederausbildung der Vernetzungen kann folglich schneller erfolgen als bei niedrigerer Polymerkonzentration. Auch KOOPMANS *et al.* stellten eine schnellere Rekompexierung von β -CD und Adamantanderivaten bei höherer Konzentration beider Komponenten fest, wodurch die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.¹⁷³

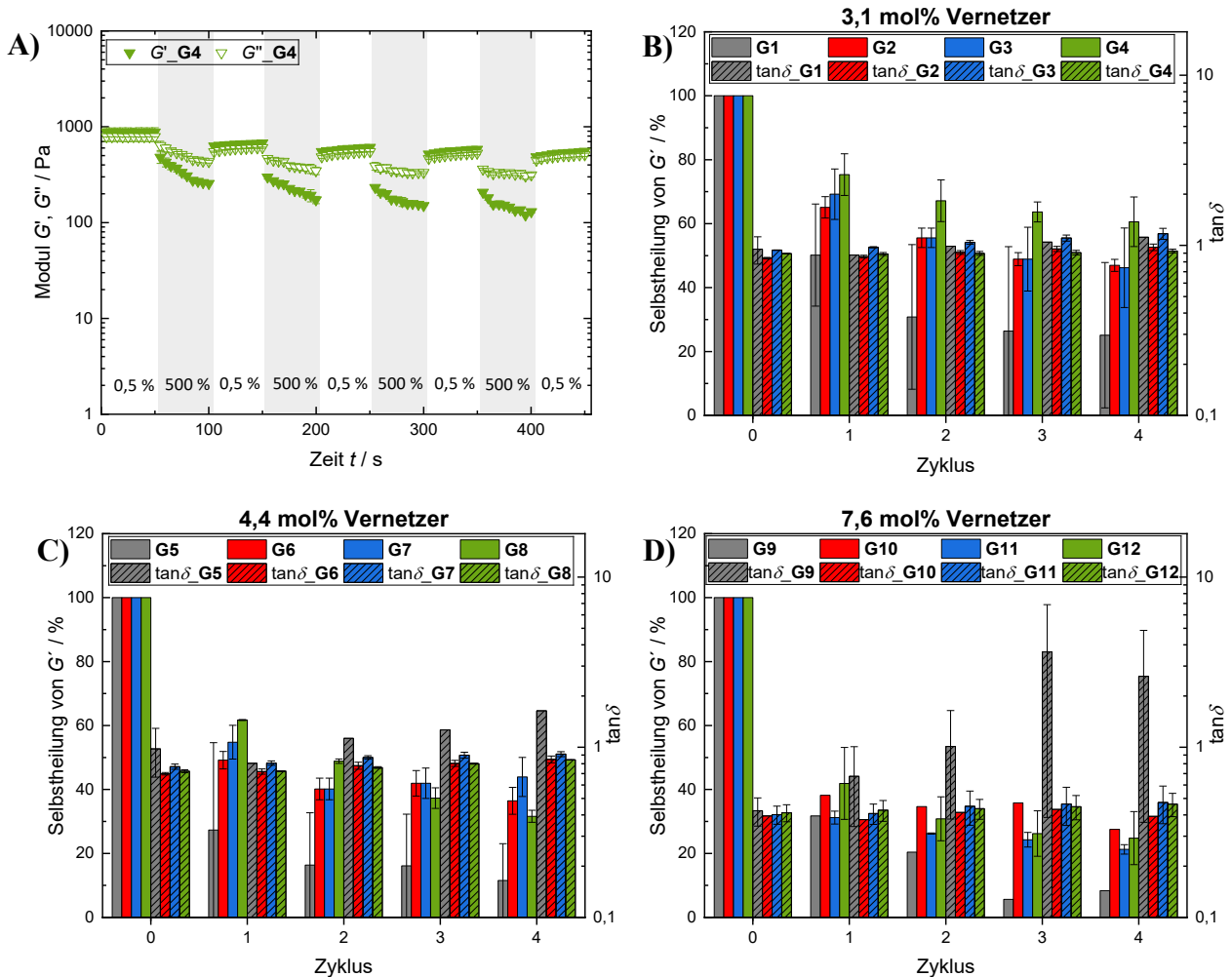


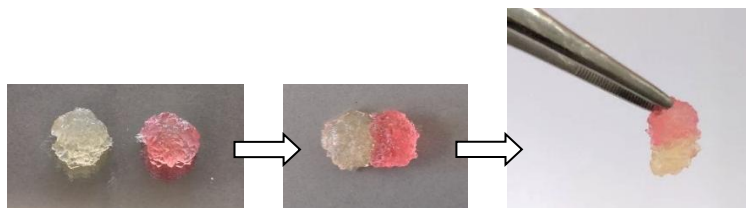
Abbildung 15: Exemplarischer Selbstheilungstest von **G4** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C (A). Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 und der Verlustfaktor $\tan\delta$ in den Erholungsphasen bestimmt aus den Selbstheilungstest der Hydrogele **G1-G4** mit 3,1 mol% Vernetzer (A), **G5-G8** mit 4,4 mol% Vernetzer (B) und **G9-G12** mit 7,6 mol% Vernetzer (C).

Außerdem wird in den Abbildungen 15B)-D) deutlich, dass die Gele mit der geringsten Vernetzungsdichte von 3,1 mol% (**G1-G4**) die beste Erholung von G' aufweisen, gefolgt von den Hydrogelen mit der mittleren Vernetzungsdichte von 4,4 mol% (**G5-G8**). Die niedrigste

Erholung von G' zeigen die am stärksten vernetzten Hydrogele mit 7,6 mol% Vernetzung (**G9-G12**). Auch der Anstieg des Verlustfaktors $\tan\delta$ der 4 Gew.-%igen Hydrogele ist bei geringerer Vernetzungsdichte weniger stark ausgeprägt, denn bei **G1** steigt der Verlustfaktor bis Zyklus 4 auf $\tan\delta = 1,12$, bei **G5** auf $\tan\delta = 1,64$ und bei **G9** auf $\tan\delta = 2,61$. Dies deutet ebenfalls auf eine bessere Selbstheilung mit geringerer Vernetzungsdichte hin. Diese Beobachtungen können mit der weicheren Struktur der weniger vernetzten Hydrogele erklärt werden, durch die eine bessere Energiedissipation besteht und die Hydrogele somit weniger stark zerstört werden. Außerdem sind schnellere Molekularbewegungen möglich, wodurch die Wiederausbildung der reversiblen Vernetzungen beschleunigt wird.^{97,200,201}

Insgesamt kann für die untersuchten Gele mit Ausnahme der 4 Gew.-%igen Hydrogele eine gute Selbstheilungsfähigkeit festgestellt werden, da die Verlustfaktoren $\tan\delta$ über vier Zerstörungs-Erholungs-Zyklen nahezu konstant bleiben und die Gele folglich ihre ursprüngliche Elastizität nach der Zerstörung wiederherstellen können. Lediglich die Steifigkeit der Gele kann in dem gemessenen Zeitraum von 50 s nur zum Teil wiederhergestellt werden.

Die Fähigkeit zur Selbstheilung der hergestellten Hydrogele wurde zusätzlich in Schema 7 visualisiert. Schema 7 zeigt zwei Hydrogelstücke, eines davon rot eingefärbt, die direkt nebeneinandergelegt wurden und sich dann durch Ausbildung reversibler Wirt-Gast-Komplexe an der Grenzfläche innerhalb weniger Sekunden zu einem Hydrogel vereint haben. Das Anheben des neu gebildeten Hydrogels von einer Seite bestätigt die erfolgreiche Vernetzung der beiden Hydrogele an der Grenzfläche.



Schema 7: Visualisierung der Selbstheilung von **G4**. Der mit Phenolrot angefärbte und der nicht angefärbte Teil des Hydrogels **G4** wurden vereint und nach wenigen Sekunden Wartezeit mit einer Pinzette angehoben.

3.2.5 Morphologie der Hydrogele

Zur weiteren Charakterisierung der inneren Struktur der Wirt-Gast-Hydrogele wurden rasterelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahmen der lyophilisierten Hydrogele durchgeführt. Die Rasterelektronenmikroskopie stellt eine Methode zur Untersuchung der

Oberflächentopographie und zur Aufklärung der Netzwerkstruktur dar.^{202,203} Hydrogele, die in 3D-Zellexperimenten eingesetzt werden, sollten eine poröse innere Struktur aufweisen, die eine ausreichend schnelle Diffusion von Nährstoffen, die im Zellkulturmedium enthalten sind, sowie den zügigen Abtransport von metabolischen Abfallprodukten erlauben. Das typischerweise in Zellkulturmedien enthaltene und für die Nährstoffaufnahme der Zellen benötigte fötale Rinderserum (FBS) enthält verschiedene Proteine wie beispielsweise Albumin und Globulin mit Stokes-Radien R_s von 3,5 nm und 13,2 nm.^{204,205} Die Hydrogele sollten daher eine Porengröße besitzen, die die Diffusion von Molekülen solcher Größe zulässt.

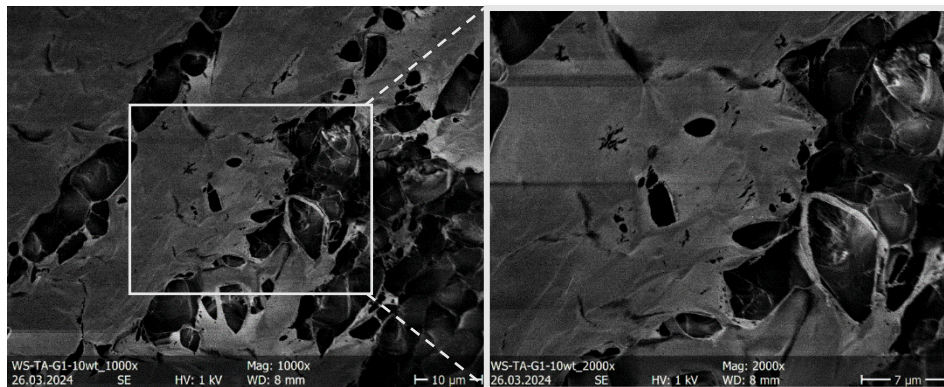


Abbildung 16: REM-Aufnahmen der Hydrogelmorphologie des gefriergetrockneten Hydrogeles **G4** in 1000-facher (links) und 2000-facher Vergrößerung (rechts).

Abbildung 16 zeigt eine exemplarische REM-Aufnahme des Hydrogeles **G4** in 1000-facher und 2000-facher Vergrößerung. Die Aufnahmen zeigen eine poröse Mikrostruktur in dem lyophilisierten Hydrogel. Die Porengrößen liegen im Bereich von 10-20 μm und bieten daher ausreichend Möglichkeiten für den Transport von Nährstoffen oder die Migration von Zellen bei einer biologischen Anwendung der Hydrogele.^{206,207} Allerdings ist bei der Betrachtung von REM-Ergebnissen zu beachten, dass die ermittelte Mikrostruktur stark von dem Lyophilisierungsprozess des Hydrogeles abhängig ist und die Poren im gequollenen Gel größer sein können als im lyophilisierten Gel.

3.2.6 Abschnittszusammenfassung

Insgesamt konnte die Synthese von rein synthetischen Wirt-Gast-vernetzten Hydrogelen auf der Basis von β -Cyclodextrin-Adamantan-Komplexen realisiert werden. Durch Herstellung der Hydrogele mit drei verschiedenen Vernetzungsdichten in jeweils vier Gesamtpolymerkonzentration konnten insgesamt zwölf Hydrogele hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften untersucht und Struktur-Eigenschaftsbeziehungen festgestellt

werden. So zeigten die Hydrogele einen Anstieg der Steifigkeit mit der Gesamtpolymerkonzentration und der Vernetzungsdichte. Die Elastizität der Hydrogele hingegen ließ sich ausschließlich mit der Vernetzungsdichte erhöhen. Die Selbstheilungseffizienz der Hydrogele konnte über die Steigerung der Gesamtpolymerkonzentration erhöht werden und die Hydrogele mit geringerer Vernetzungsdichte wiesen eine bessere Selbstheilung auf als die stärker vernetzten Hydrogele. Mithilfe dieser Ergebnisse ist eine gezielte Modifikation der Steifigkeit, Elastizität und Selbstheilung der Hydrogele möglich.

Da neben der Anpassung der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele für die gewünschte zellbiologische Anwendung auch die Biofunktionalisierung der Hydrogele von Bedeutung ist, soll in Abschnitt 3.3 das bestehende Polymersystem um Peptidliganden erweitert werden. Die Ergebnisse des Abschnitts 3.3 wurden im Rahmen des Wahlpflichtpraktikums von *Maria Beerbaum* erhalten.

3.3 Copolymerisation von Peptidliganden und deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Wirt-Gast-Hydrogele

3.3.1 Einleitung und Zielsetzung

Während die kationische Ladung der TMAEA-Monomere lediglich die Zelladhäsion fördert, können Peptide Einfluss auf die Adhäsion, Proliferation und Migration von Zellen nehmen. Daher soll in diesem Abschnitt der Einbau von Peptidliganden in das Wirt-Gast-Hydrogelsystem untersucht werden. Generell bestehen zwei Möglichkeiten zum Einbau von Peptiden in ein Polymer – die polymeranaloge Kupplung von funktionalisierten Peptidliganden oder die Copolymerisation von Peptidmonomeren. Beide Methoden besitzen ihre Vor- und Nachteile. Probleme, die bei der Verwendung der Copolymerisation auftreten, sind der Einfluss der sterisch anspruchsvollen Peptidmonomere auf die mittlere molare Masse und Dispersität der Polymere sowie die Entstehung eines Peptidgradienten entlang des Polymers als Folge einer nicht statistischen Copolymerisation. Ein Vorteil hingegen ist die Einfachheit der Synthese, da nicht wie bei der polymeranalogen Kupplung nach der Polymerisation weitere Kupplungsreaktionen notwendig sind, die eventuell unvollständig ablaufen und bei denen toxische Kupplungsreagenzien eingesetzt werden, die nach abgelaufener Reaktion entfernt werden müssen.

Ein grundsätzliches Problem der Peptidfunktionalisierung von Polymeren ist, dass eine Modifikation des Polymers in der Regel auch zu einer Änderung der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele führt, die ebenfalls einen Einfluss auf das Zellverhalten haben.²⁰⁸ Wünschenswert für die Untersuchung des Peptideinflusses auf die Zelleigenschaften wäre eine unabhängige Variation der Peptidkonzentration und der mechanischen Eigenschaften. Daher ist es von Interesse, den Einfluss der Peptidkonzentration auf die mechanischen Eigenschaften zu untersuchen.

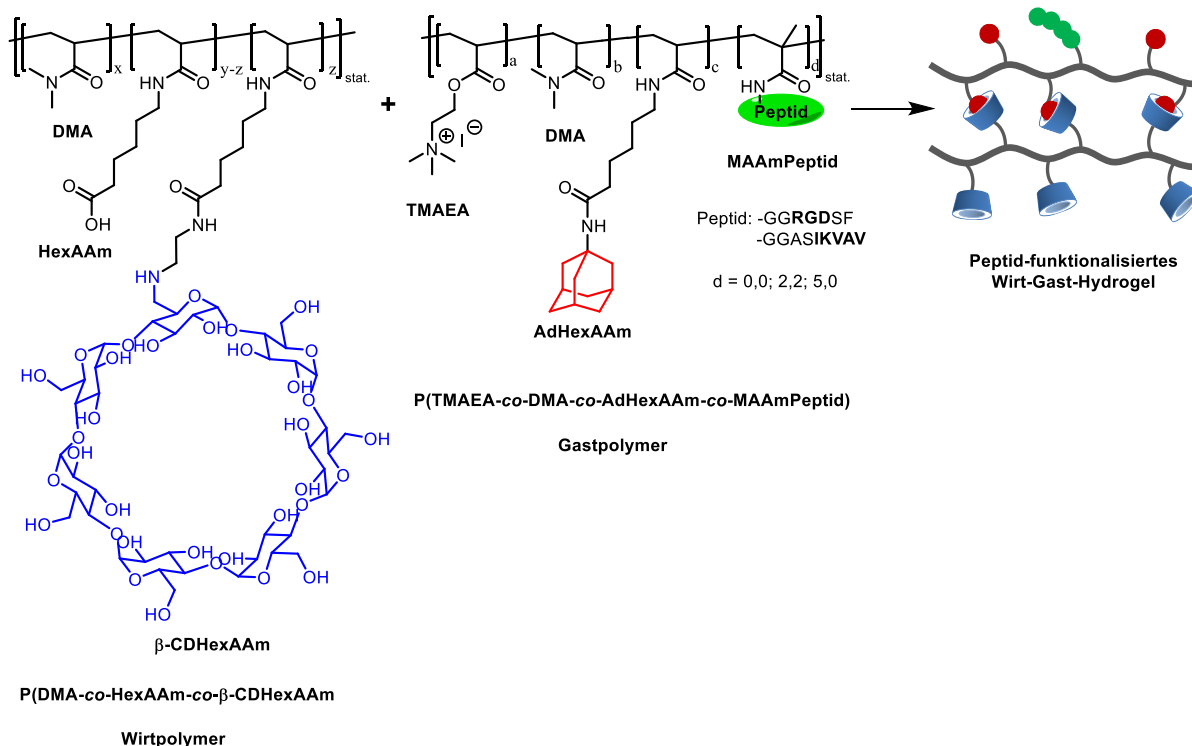
Die Anzahl an Literaturbeispielen, in denen β -Cyclodextrin-Adamantan-vernetzte Hydrogele mit Peptid-Liganden funktionalisiert wurden, ist überschaubar. Die Nutzung der Wirt-Gast-Komplexierung für den Einbau von Peptiden in Hydrogele ist dagegen häufiger zu finden. Dabei wird meist ein β -Cyclodextrinderivat am Polymer immobilisiert und ein Adamantan-modifiziertes Peptid über Wirt-Gast-Komplexierung an das β -CD-Polymer gebunden. Die Vernetzung dieser Hydrogele erfolgte dabei über andere physikalische Methoden oder über kovalente Bindungen.^{209,210} Außerdem bestehen Arbeiten, in denen Hydrogele über β -CD- und Adamantan-modifizierte Peptidamphiphile vernetzt werden. Da diese Hydrogele mehrheitlich aus Peptiden bestehen und über diese vernetzt sind, bietet sich ein Vergleich mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Hydrogelsystem allerdings nicht an.²¹¹⁻²¹³ Arbeiten, in denen die Hydrogele über Komplexe zwischen Adamantan und β -CD vernetzt sind und zusätzlich Peptide integrieren, fokussieren ihre Analytik meist auf das Zellverhalten und vernachlässigen die mechanischen Eigenschaften^{162,214} oder handeln nur von einem einzigen Gel, das rheologisch charakterisiert wird, wodurch die Untersuchung des Peptideinflusses auf die mechanischen Eigenschaften nicht möglich ist.¹⁵⁷ Ein Literaturbeispiel, welches die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen, die mit zwei verschiedenen Peptidsequenzen modifiziert waren, vergleicht, stammt von RODELL *et al.*. Die Arbeitsgruppe funktionalisierte zum einen Hyaluronsäure-Polymere mit β -CD-Derivaten und zum anderen wurde Adamantan über zwei verschiedene Peptidlinker mit Hyaluronsäure verbunden. Aus diesen Polymeren wurden zwei Hydrogele, die sich folglich in den Peptidlinkern unterschieden, gebildet und rheologisch charakterisiert. Allerdings wurde kein Kontrollgel ohne Peptid untersucht. Außerdem weist das Hydrogelsystem von RODELL *et al.* einen entscheidenden Nachteil auf, denn mit diesem System ist es nicht möglich, die Vernetzungsdichte und die Peptidkonzentration separat einzustellen.¹⁵⁶ Dies soll in den hier hergestellten Wirt-Gast-Hydrogelen möglich sein.

Um das Einbringen der Peptide in das Polymersystem möglichst einfach zu gestalten, sollten Methacrylamid-funktionalisierte Peptidsequenzen über eine freie radikalische Polymerisation

in das Adamantan-Polymer integriert werden. Für die Copolymerisation wurde das Adamantan-Polymer und nicht das β -CD-Polymer gewählt, weil durch die sterisch anspruchsvollen Peptidliganden entlang des Präpolymers eine Beeinträchtigung der Kupplung der ebenfalls sterisch anspruchsvollen β -CD-Derivate erwartet wurde.

Als Peptidsequenzen sollten zwei der am häufigsten in Hydrogelen verwendeten Sequenzen – die RGD- und die IKVAV-Sequenz – eingesetzt werden. Die aus dem EZM-Protein Fibronectin stammende Peptidsequenz RGD ist dazu in der Lage, die Adhäsion, Verbreitung, Proliferation und Migration von Zellen zu fördern,^{215,216} während die aus dem EZM-Protein Laminin abgeleitete Sequenz IKVAV die Adhäsion und Viabilität von Zellen unterstützt.^{69,217,218} Bei dem RGD-Peptid wurden als flankierende Aminosäuren Glycin (G) und Serin (S) verwendet, da diese in der natürlichen RGD-Sequenz des Fibronectins enthalten sind und zu einer Steigerung der Bindungsaffinität beitragen.^{219,220} Zur einfacheren Bestimmung des RGD-Anteils über ¹H-NMR-Spektroskopie wurde zusätzlich die Aminosäure Phenylalanin (F) aufgrund ihrer charakteristischen Signale im aromatischen Bereich eingeführt. Bei der IKVAV-Sequenz diente die Aminosäuresequenz GGAS zusätzlich als ein hydrophiler *Spacer*, der die Zugänglichkeit und Effektivität der IKVAV-Sequenz erhöht.²²¹ Als polymerisierbare Einheit wurden die Peptidsequenzen am N-Terminus mit der Methacrylamid-Gruppe (MAAm) funktionalisiert, sodass sich die Peptidmonomere MAAm-GGRGDSF und MAAm-GGASIKVAV ergaben.

Um im Folgenden die Steifigkeit, Elastizität, Deformierbarkeit, Selbstheilung und Mikrostruktur der Hydrogele in Abhängigkeit der Konzentrationen der IKVAV- und RGD-Liganden untersuchen zu können, sollten die IKVAV- und RGD-Monomere jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen in das Gastpolymer einpolymerisiert sowie ein Kontrollpolymer ohne Peptid hergestellt werden. Das Wirtpolymer sollte, wie in Schema 8 gezeigt ist, analog zu dem in Abschnitt 3.2 verwendeten Wirtpolymer aufgebaut sein und die Vernetzungsdichte sollte konstant gehalten werden.



Schema 8: Schematische Darstellung der Synthese von peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen aus einem β -CD-Polymer und RGD- bzw. IKVAV-funktionalisierten Ad-Polymeren.

3.3.2 Synthese der Wirt- und Gastpolymere

Die Synthese und Charakterisierung der Monomere und des Wirtpolymers erfolgten analog zu den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Vorschriften. Für das Wirtpolymer wurde ein β -CD-Anteil von 5 mol% angestrebt. Erreicht wurde mit 4,6 mol% ein β -CD-Anteil (**PCD4**), der nah an dem gewünschten Wert liegt. Die mittlere molare Masse des Wirtpolymers konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit in dem GPC-Eluenten nicht bestimmt werden. Für das Präpolymer **PPCD4** hingegen konnte eine GPC-Analyse durchgeführt und Werte von 129800 g/mol und 2,27 für die mittlere molare Masse bzw. die Dispersität erhalten werden. Die Polymerisation der Gastpolymere wurde zunächst ebenfalls unter denselben Reaktionsbedingungen wie in Abschnitt 3.2 durchgeführt, lediglich die Peptidmonomere Methacrylamid-GGRGDSF und Methacrylamid-GGASIKVAV wurden zusätzlich in den Molanteilen 2,2 mol% (**PRGD1**, **PIKVAV1**) und 5,0 mol% (**PRGD2**, **PIKVAV2**) zur Polymerisationsreaktion hinzugegeben. Ein Gastpolymer wurde ohne Peptidanteil (**PAd4**) synthetisiert, um daraus ein Kontrollgel zu erstellen. Alle fünf Gastpolymere sollten einen TMAEA-Anteil von 5 mol% und einen Adamantan-Anteil von 5 mol% im Polymer aufweisen, um hinsichtlich des Peptideinflusses miteinander vergleichbar zu sein. Die Synthese der peptidfunktionalisierten Gastpolymere stellte sich allerdings zunächst problematisch dar, da unter den gewählten

Reaktionsbedingungen keine Polymerisationsreaktion ablief. Durch Erhöhung der Initiatormenge von 1 Äq. auf 4 Äq. konnte die Polymerisationsreaktion wie gewünscht ablaufen. Der Grund für das Ausbleiben der Polymerisation bei einer Initiatormenge von 1 Äq. war die geringe Ansatzgröße, die bei diesen Reaktionen gewählt wurde. Dadurch wurde nur eine geringe Menge an Initiator abgewogen, die schon vor Reaktionsbeginn zerfallen und mit Luftsauerstoff abreagiert ist.

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der letztendlich erhaltenen Gastpolymere wurden die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren herangezogen. Die Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Kontrollpolymers **PAd4** erfolgte analog zu dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen Vorgehen. Dabei konnte ein Monomerverhältnis von 90,6/4,3/5,1 (DMA/AdHexAAm/TMAEA) ermittelt werden, das dem eingesetzten Monomerverhältnis gut entspricht (Tabelle 6). Die Zusammensetzung der erhaltenen RGD- und IKVAV-haltigen Polymere wurde über die in den Abbildungen 17 und 18 markierten Signale der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestimmt.

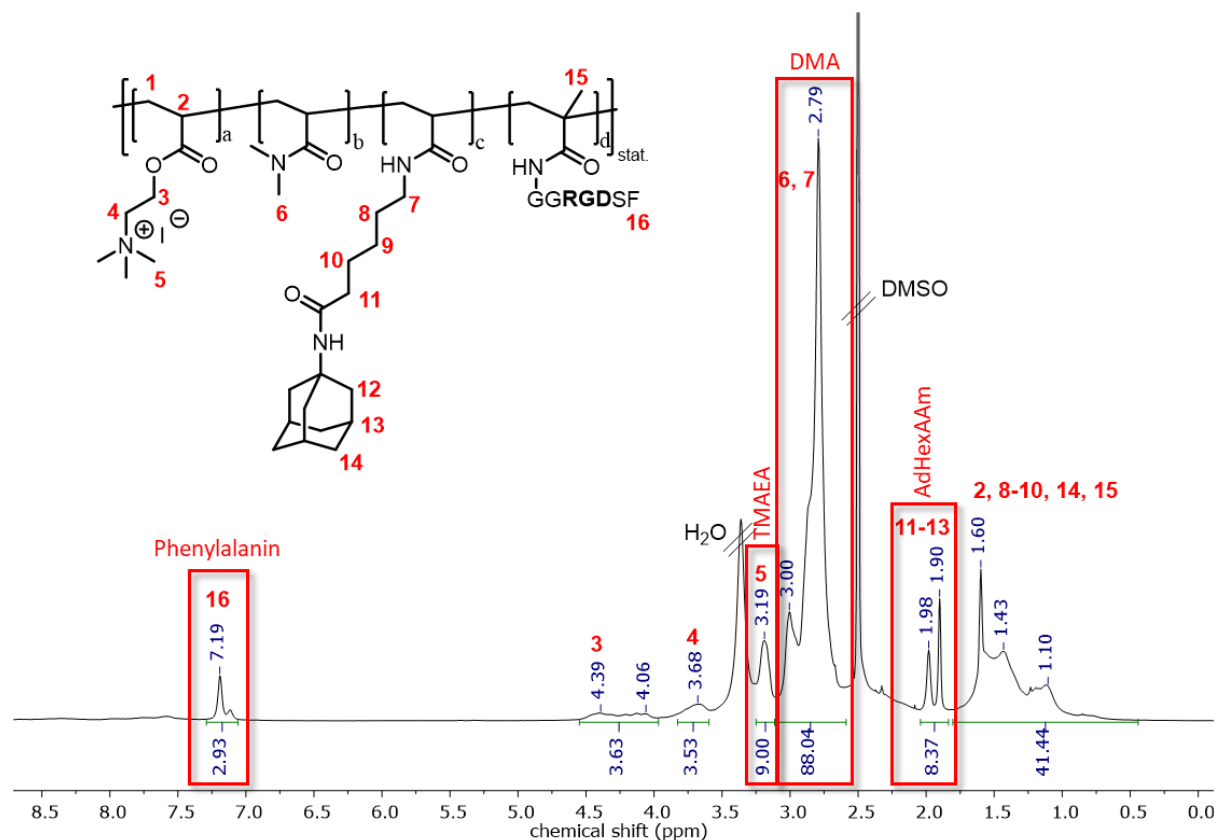


Abbildung 17: Exemplarisches $^1\text{H-NMR}$ des RGD-funktionalisierten Polymers **PRGD2** in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

Für die Bestimmung des AdHexAAm- und des TMAEA-Anteils im Polymer wurden die Signale bei den chemischen Verschiebungen von 1,90 und 1,98 ppm beziehungsweise 3,19 ppm

verwendet. Mithilfe des charakteristischen Signals der fünf Phenylprotonen des Phenylalanins bei 7,19 ppm konnte der RGD-Anteil im Verhältnis zu den anderen Monomeren ermittelt werden. Der DMA-Anteil im Polymer wurde über das Signal bei 3,12-2,62 ppm nach Abzug der überlagernden Signale einer CH₂-Gruppe von AdHexAAm, der CH₂-Gruppe in δ-Position des Arginins und der CH₂-Gruppe des Phenylalanins berechnet.

Bei der Bestimmung der Monomerverhältnisse der IKVAV-funktionalisierten Gastpolymere ist zu beachten, dass unter den zur Berechnung verwendeten AdHexAAm-Signalen das Signal der CH-Gruppe des Valins liegt, welches zunächst abgezogen werden muss. Außerdem überlagert das DMA-Signal mit dem Signal einer CH₂-Gruppe des Lysins. Zur Ermittlung des Verhältnisses des IKVAV-Monomers zu den anderen Monomeren im Polymer wurde das Signal bei 0,82 ppm verwendet, welches den Methylprotonen des Valins und des Isoleucins zugeordnet werden kann.

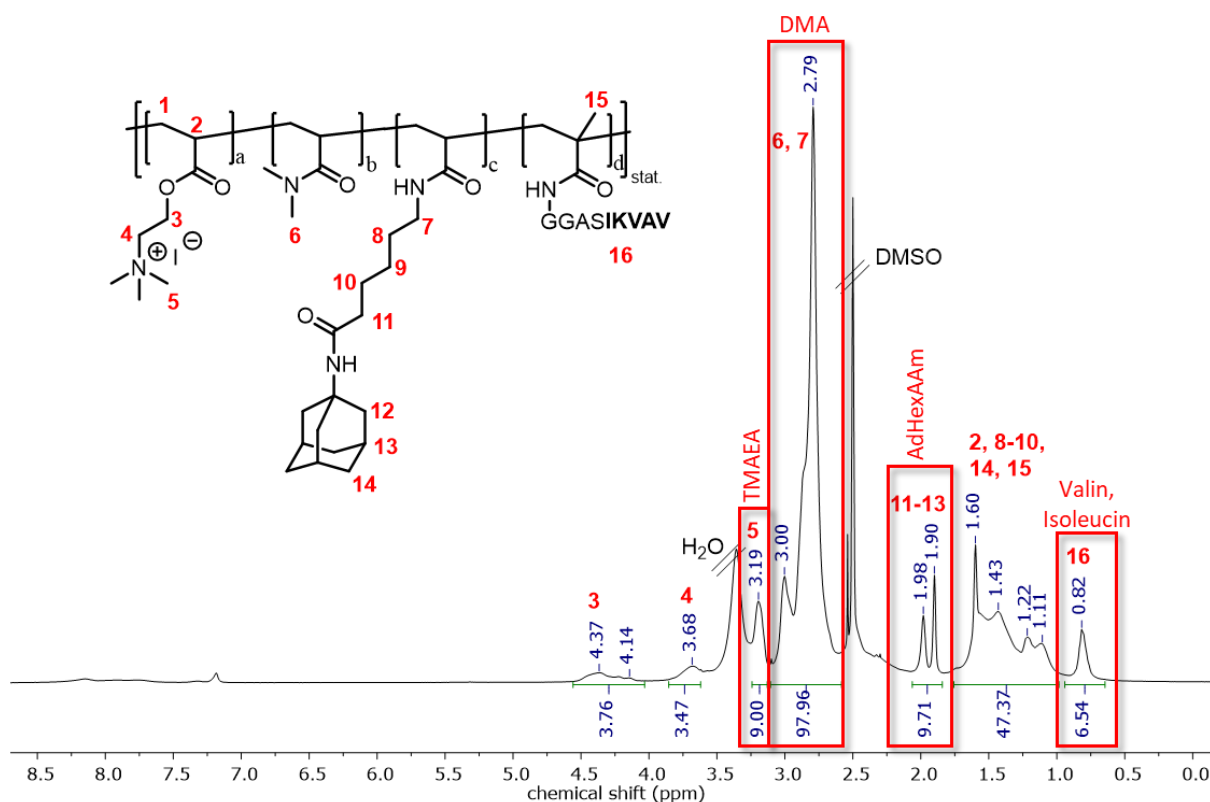


Abbildung 18: Exemplarisches ¹H-NMR des IKVAV-funktionalisierten Polymers **PIKVAV2** in DMSO-*d*₆ (400 MHz).

Die aus den ¹H-NMR-Spektren erhaltenen Molanteile an TMAEA und AdHexAAm liegen bei allen vier peptidfunktionalisierten Gastpolymeren annähernd bei den theoretischen Werten (Tabelle 6). Die copolymerisierten RGD-Anteile weichen mit 1,2 mol% und 2,9 mol% statt

2,2 mol% und 5,0 mol% stärker von den theoretischen Werten ab. Die IKVAV-Anteile im Polymer entsprechen mit 2,0 mol% und 3,8 mol% annähernd den angestrebten Werten. Eine Erklärung für die geringe Copolymerisation der RGD-Monomere liefert ein Blick auf das im Anhang gezeigte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des RGD-Monomers (Abbildung A26), denn darin ist eine nur 50 %ige Funktionalisierung der RGD-Peptide mit den Methacrylamid-Einheiten zu erkennen. In dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des IKVAV-Monomers kann eine 80 %ige Funktionalisierung der IKVAV-Peptide mit den Methacrylamid-Einheiten festgestellt werden (Abbildung A27). Unter Einbezug dieser Funktionalisierungsgrade kann die Copolymerisation beider Peptidmonomere als vollständig betrachtet werden.

Tabelle 6: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der RGD- und IKVAV-funktionalisierten Gastpolymere **PRGD1/2** und **PIKVAV1/2**, des Kontrollpolymers **PAd4**, des Präpolymers **PPCD4** und des Wirtpolymers **PCD4**.

Polymer	Zusammensetzung		\bar{M}_n / Da ^c	D ^c
	DMA/AdHexAAm/TMAEA/Peptid / mol%			
	theoretisch ^a	experimentell ^b		
PRGD1	87,8/5,0/5,0/2,2	89,3/4,3/5,2/1,2	114400	2,17
PRGD2	85,0/5,0/5,0/5,0	86,8/4,5/5,9/2,9	69700	1,89
PIKVAV1	87,8/5,0/5,0/2,2	88,3/4,3/5,5/2,0	57000	2,08
PIKVAV2	85,0/5,0/5,0/5,0	86,5/3,9/5,8/3,8	39100	7,42
PAd4	90,0/5,0/5,0/0,0	90,6/4,3/5,1/0,0	161600	2,47
	DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm / mol%			
PPCD4	92,4/7,6/0,0	91,1/8,9/0,0	129800	2,27
PCD4	92,4/2,6/5,0	91,1/4,3/4,6	- ^d	- ^d

^a bei der Synthese eingesetzte Monomerverhältnisse; ^b bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie; ^c bestimmt über GPC-Messungen mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluenten und PMMA als Standard; ^d das Polymer war nicht in dem GPC-Eluenten löslich.

Die Gastpolymere wurden zusätzlich über GPC-Messungen hinsichtlich ihrer mittleren Molmassen \bar{M}_n und Dispersitäten D charakterisiert (Tabelle 6). Dabei konnte eine Verringerung der mittleren molaren Masse mit steigendem Peptidanteil beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Peptidmonomere zu mehr Abbruchreaktionen oder zu einer Verlangsamung der Polymerisation aufgrund ihrer Größe und der erhöhten Viskosität führen. Die Dispersitäten der Gastpolymere liegen um den Wert zwei, was für eine freie radikalische Polymerisation einen guten Wert darstellt. Eine Ausnahme davon bildet das IKVAV-funktionalisierte Polymer mit dem größeren IKVAV-Anteil (**PIKVAV2**), welches eine Dispersität von 7,42 aufweist. Die

Ursache dafür ist eine zu geringe Probenkonzentration bei der GPC-Messung aufgrund der schlechten Löslichkeit des Polymers in dem GPC-Eluenten DMF. Daraus resultierte ein kleines Signal im GPC-Elugramm, wodurch es zu starken Ungenauigkeiten in der Auswertung kam. Bei den für **PIKVAV2** ermittelten Daten handelt es sich somit nicht um repräsentative Werte.

3.3.3 Synthese der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des Kontrollgels

Zur Synthese der Wirt-Gast-Hydrogele wurden die fünf hergestellten Gastpolymere jeweils mit dem β -CD-Polymer **PCD4** gemischt. Insgesamt wurden dabei, wie in Tabelle 7 gezeigt, fünf Wirt-Gast-Hydrogele hergestellt, die alle auf eine Gesamtpolymerkonzentration von 6 Gew-% eingestellt wurden. Die einzusetzenden Wirt- und Gastpolymer-Mengen wurden so berechnet, dass das Verhältnis von Adamantan zu β -CD 1:1 betrug. Da die Molanteile der Adamantylgruppen in den fünf Polymeren mit Werten zwischen 3,9 mol% und 4,5 mol% unterhalb des β -CD-Anteils des Wirtpolymers **PCD4** (4,6 mol%) liegen, sind sie limitierend für die Vernetzungsdichte. Die Vernetzungsdichten in den fünf erstellten Hydrogelen bewegen sich folglich zwischen 3,9 mol% und 4,5 mol%. Da diese Werte nah beieinander liegen, ist eine gute Vergleichbarkeit der Hydrogele bezüglich des Peptideinflusses gegeben.

Tabelle 7: Gesamtpolymerkonzentration β und Zusammensetzung der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.

Hydrogel	β / mg/mL	Gastpolymer	Wirtpolymer
GK	6	PAd4	PCD4
GRGD1	6	PRGD1	PCD4
GRGD2	6	PRGD2	PCD4
GIKVAV1	6	PIKVAV1	PCD4
GIKVAV2	6	PIKVAV2	PCD4

Beim Lösen der Polymere in Wasser zeigten die RGD-funktionalisierten Polymere eine bessere Löslichkeit und bildeten niedriger viskose Polymerlösungen aus als die IKVAV-funktionalisierten Polymere. Dies deutet auf Aggregatbildungen zwischen den IKVAV-Peptiden hin.

Nach vollständigem Lösen der Polymere wurden die Polymerlösungen zusammengeführt und gründlich vermischt bis ein homogenes Material entstand. Während des Mischvorgangs war eine direkte Viskositätszunahme zu beobachten, die ein Indiz für eine erfolgreiche

Hydrogelbildung darstellt. Außerdem war eine Trübung der IKVAV-haltigen Hydrogele (**GIKVAV1** und **GIKVAV2**) zu erkennen, während das Kontrollgel ohne Peptid (**GK**) und die RGD-haltigen Hydrogele (**GRGD1** und **GRGD2**) klar waren. Erklärt werden kann die Trübung über die geringere Hydrophilie der IKVAV-Peptide, aufgrund derer die Peptide stärker aggregieren.

Die Hydrogele wurden für die rheologische Charakterisierung in Triplikaten hergestellt.

3.3.4 Rheologische Charakterisierung der peptidfunktionalisierten Hydrogele

Zur Untersuchung des Einflusses der Peptidliganden auf die mechanischen Eigenschaften wurden oszillatorische Amplitudentests, Frequenztests und Selbstheilungstests durchgeführt. In Abbildung 19 sind die aus den Triplikaten gemittelten Amplituden- und Frequenztests der fünf hergestellten Hydrogele dargestellt.

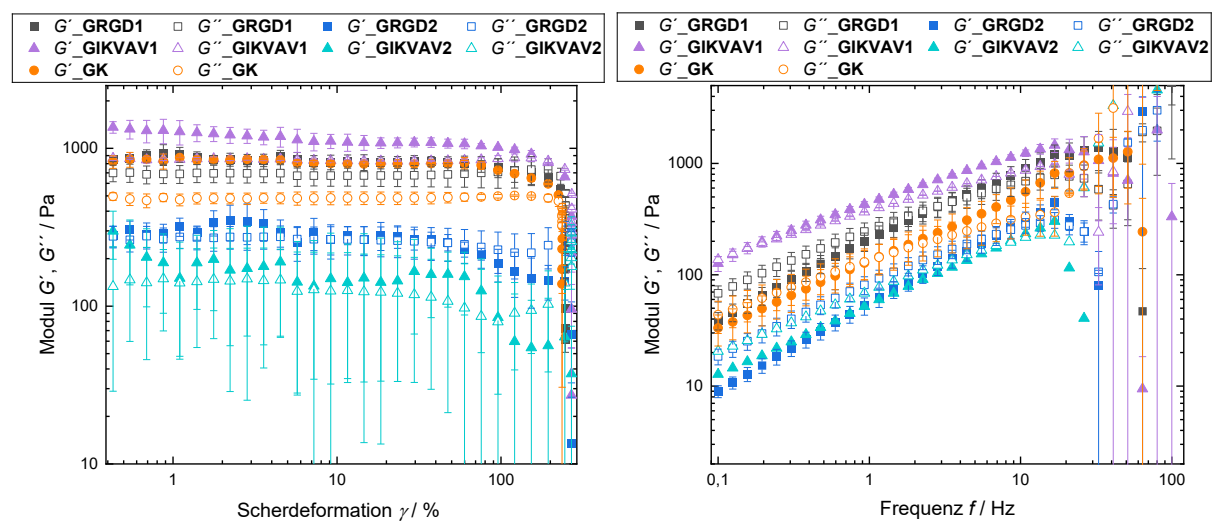


Abbildung 19: Amplitudentests (links) gemessen bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und Frequenztests (rechts) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.

Die Amplitudentests zeigen bei niedrigeren Scherdeformationen einen LVE-Bereich, in dem bei allen fünf Hydrogelen das Speichermodul G' oberhalb von G'' liegt. Damit überwiegt der elastische Charakter und das Material kann als Gel bezeichnet werden. Höhere Scherdeformationen bewirken ein Nachgeben des Netzwerks bis das Material zu fließen beginnt. Der Verlauf der Amplitudentests ist daher sowohl mit als auch ohne Peptidfunktionalisierung typisch für dynamisch vernetzte Hydrogele. Die Mittelwerte der im LVE-Bereich der Amplitudentests ermittelten Steifigkeiten G'_{LVE} und Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ sowie die Nachgebegrenzen γ_y sind in der Tabelle 8 zusammengestellt.

In den Frequenztests (Abbildung 19) ist ein eindeutig frequenzabhängiges Verhalten, wie es für physikalische Hydrogele zu erwarten ist, und ein Sol-Gel-Übergang bei allen fünf Proben zu erkennen. Die Frequenzen der Sol-Gel-Übergänge sind ebenfalls in der Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ im LVE-Bereich und der Nachgebrenze γ_y in den Amplitudentests sowie der Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} in den Frequenztests der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.

Hydrogel	G'_{LVE} / Pa^a	$\tan\delta_{LVE}^a$	$\gamma_y / \%^a$	f_{co} / Hz^b
GK	832 ± 17	$0,58 \pm 0,06$	62 ± 14	$1,1 \pm 0,1$
GRGD1	838 ± 65	$0,82 \pm 0,06$	104 ± 37	$3,1 \pm 0,3$
GRGD2	296 ± 58	$0,92 \pm 0,05$	35 ± 18	$7,8 \pm 0,4$
GIKVAV1	1200 ± 175	$0,73 \pm 0,09$	66 ± 55	$0,1 \pm 0,1$
GIKVAV2	288 ± 28	$0,78 \pm 0,06$	30 ± 0	$7,9^c$

^a bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und 25 °C; ^b bestimmt über Frequenztests gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C; ^c Wert wurde aus nur einer Messung bestimmt.

In Tabelle 8 ist zu erkennen, dass das Speichermodul und die Nachgebrenze bei den Peptidhaltigen Hydrogelen mit der geringeren Menge an Peptid (**GRGD1** und **GIKVAV1**) ähnlich zu den Werten von Kontrollgel **GK** sind. Ein Vergleich der Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ von **GRGD1** und **GIKVAV1** mit **GK** zeigt, dass der Verlustfaktor des Kontrollgels **GK** mit $\tan\delta_{LVE} = 0,58 \pm 0,06$ unterhalb der Verlustfaktoren der Peptidhaltigen Hydrogele liegt. Unter Einbezug der Ergebnisse aus Kapitel 3.2, in denen der Verlustfaktor $\tan\delta_{LVE}$ eine Abhängigkeit von der Vernetzungsdichte zeigte, weisen die Verlustfaktoren auf eine geringere Vernetzung von **GRGD1** und **GIKVAV1** im Vergleich zu **GK** hin. Dies kann mit einer Störung der Wirt-Gast-Vernetzung durch die Peptide erklärt werden, denn die sterisch anspruchsvollen Peptide erhöhen die Abstände zwischen den Polymeren und erschweren somit die Wirt-Gast-Vernetzung. Allerdings ist der Einfluss auf die Vernetzung bei den geringeren Peptidanteilen noch nicht so stark, dass die Steifigkeit und die Nachgebrenze verändert werden. Dies ist im Hinblick auf Zelleexperimente vorteilhaft, da eine gewisse Vergleichbarkeit der Hydrogele besteht.

Auffällig ist, dass das IKVAV-haltige Hydrogel **GIKVAV1** mit $\tan\delta_{LVE} = 0,73 \pm 0,09$ eine stärkere Vernetzung als das RGD-haltige Hydrogel **GRGD1** mit $\tan\delta_{LVE} = 0,82 \pm 0,06$ aufweist, obwohl die Anteile an IKVAV im Polymer größer und die Polymerketten kürzer sind als die der RGD-Peptide. Auch das Speichermodul von **GIKVAV1** liegt mit

$G'_{LVE} = 1200 \pm 175$ Pa oberhalb dessen von **GRGD1** und sogar oberhalb des Wertes von **GK**, während das Speichermodul von **GRGD1** mit $G'_{LVE} = 838 \pm 65$ Pa sehr ähnlich zu dem von **GK** ist. Auch der Sol-Gel-Übergang von **GIKVAV1** ist zu niedrigeren Frequenzen verschoben, was auf eine langsamere Bewegung der Polymere hindeutet und daher ein Zeichen für mehr Vernetzung ist. Ein Grund dafür können Wechselwirkungen zwischen den IKVAV-Peptiden sein, die aufgrund ihrer hydrophoberen Struktur stärker agglomerieren als die RGD-Peptide und somit die Vernetzungsdichte ein wenig erhöhen. Darüber hinaus sind die RGD-Peptide aufgrund ihrer größeren Hydrophilie dazu in der Lage, mehr Wasserstoffbrücken zu den Hydroxygruppen der β -CD-Moleküle auszubilden, die die Effizienz der Wirt-Gast-Vernetzungen weiter einschränken. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass IKVAV- und RGD-Peptide in den von ZUSTIAK *et al.* hergestellten kovalenten Hydrogelen einen ähnlichen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele hatten, denn die Immobilisierung von IKVAV-Liganden an ein PEG-Hydrogel führte zu einem Anstieg des Speichermoduls G' , während die Bindung von RGD-Liganden zu einem Absinken von G' führte.²⁰⁸ Außerdem berichteten auch JAIN *et al.* von einer hydrophoben Selbstassemblierung von IKVAV-Peptiden.²²²

Durch die Erhöhung der Peptidkonzentrationen in **GRGD2** und **GIKVAV2** scheint das Vernetzungssystem stärker beeinträchtigt zu werden, was an der Abnahme des Speichermoduls um 65 % (**GRGD2**) bzw. 76 % (**GIKVAV2**), der Zunahme der Verlustfaktoren und dem Verschieben der Nachgebrenze zu niedrigeren Scherdeformationen zu erkennen ist. Alle drei Werte deuten auf eine Reduktion der Wirt-Gast-Vernetzung und daher eine geringere Steifigkeit und Elastizität und einen schlechteren Ausgleich der Scherung auf molekularer Ebene hin, da die Wiederherstellung der Wirt-Gast-Komplexe durch die Wechselwirkungen mit den sterisch-anspruchsvollen Peptiden gestört ist. Auch der Sol-Gel-Übergang in den Frequenztests wird zu höheren Frequenzen verschoben und weist damit auf eine schnellere Bewegung der Polymere hin, die ebenfalls auf weniger Vernetzung schließen lässt. Dennoch bleibt der Gelcharakter erhalten, was bedeutet, dass die Netzwerkstruktur noch nicht vollständig kollabiert. Die Vergleichbarkeit der Hydrogele **GRGD2** und **GIKVAV2** mit den weniger stark funktionalisierten Hydrogelen **GRGD1** und **GIKVAV1** oder dem Kontrollgel **GK** in einem Zellexperiment wäre allerdings stark eingeschränkt.

Für die Untersuchung des Einflusses der Peptide auf die selbstheilenden Eigenschaften der Hydrogele wurden die in Abbildung 20 dargestellten Selbstheilungstests durchgeführt.

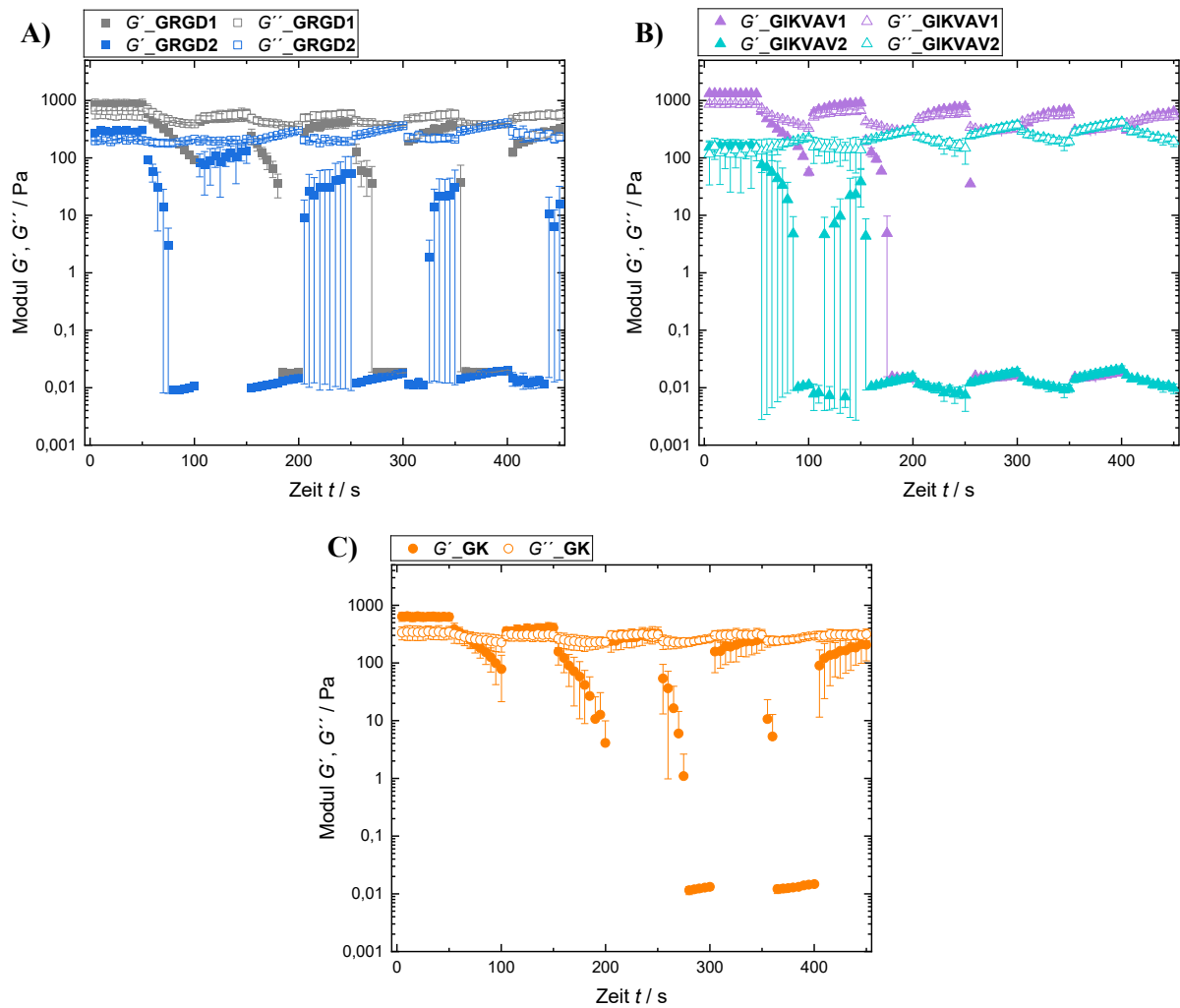


Abbildung 20: Selbstheilungstests der (A) RGD-funktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogele (**GRGD1** und **GRGD2**), (B) IKVAV-funktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogele (**GIKVAV1** und **GIKVAV2**) und (C) des Kontrollgels **GK** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

Die Graphen zeigen bei dem Kontrollgel **GK** erst ab der dritten Zerstörungsphase ein starkes Absinken des Speichermoduls, während bei den Hydrogelen mit geringer Peptidfunktionalisierung (**GRGD1** und **GIKVAV1**) schon in der zweiten Zerstörungsphase und bei den Hydrogelen mit hoher Peptidfunktionalisierung (**GRGD2** und **GIKVAV2**) in der ersten Zerstörungsphase ein starkes Absinken des Speichermoduls zu beobachten ist.

Die prozentuale Auswertung der Selbstheilung von G' in den Erholungsphasen ist in der Tabelle 9 aufgelistet. Die Selbstheilungsfähigkeit des Kontrollgels **GK** und der Hydrogele, die mit der geringeren Peptidkonzentration ausgestattet sind (**GRGD1** und **GIKVAV1**), ist nahezu identisch. Die drei Hydrogele können sich im ersten Zyklus zu 63-67 % regenerieren, mit jedem weiteren Zyklus sinkt die Selbstheilung jedoch weiter ab. Das IKVAV-haltige Hydrogel **GIKVAV1** weist dabei einen etwas geringeren Verlust der Selbstheilung auf als **GK** und

GRGD1. Dies kann, wie auch die in den Amplitudentests festgestellte erhöhte Steifigkeit, über eine Wechselwirkung zwischen den IKVAV-Peptiden erklärt werden, die zu einer zusätzlichen dynamischen Stabilisierung des Netzwerkes beiträgt.

Mit höheren Peptidkonzentrationen im Hydrogel wird die Selbstheilungsfähigkeit jedoch stark herabgesetzt, so regenerierte G' bei **GRGD2** und **GIKVAV2** im ersten Zyklus nur noch zu $34 \pm 15 \%$ bzw. $17 \pm 15 \%$ und im vierten Zyklus sogar nur zu $1 \pm 1 \%$ bzw. $0 \pm 0 \%$. Die höheren Peptidkonzentrationen stören und verlangsamen die Rekomplexierung der Wirt-Gast-Komplexe so deutlich, dass ein kompletter Verlust der Selbstheilungsfähigkeit die Folge ist. Damit sind die Ergebnisse der Selbstheilungstests mit denen der Amplituden- und Frequenztests konsistent.

Tabelle 9: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die peptidfunktionalisierten Hydrogele und das unfunktionalisierte Kontrollgel.

Hydrogel	Selbstheilung von G' / % ^a				
	Zyklus 0	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
GK	100	63 ± 1	49 ± 8	39 ± 9	31 ± 12
GRGD1	100	64 ± 3	48 ± 8	39 ± 7	33 ± 6
GRGD2	100	34 ± 15	11 ± 11	4 ± 4	1 ± 1
GIKVAV1	100	67 ± 5	59 ± 5	50 ± 3	47 ± 2
GIKVAV2	100	17 ± 15	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

^a bestimmt über oszillatorische Zeitmessungen bei abwechselnd geringer (0,5 %) und hoher (500,0 %) Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C. Das Speichermodul G' in Zyklus 0 wurde auf 100 % gesetzt und die prozentuale Erholung von G' in den nachfolgenden Zyklen mit geringer Scherdeformation wurde im Verhältnis zu Zyklus 0 berechnet.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist allerdings zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit relativ große Mengen an Peptiden eingesetzt wurden. Die niedrigeren eingebauten Peptidanteile von 1,2 mol% auf Seiten des RGD-Peptids und 2,0 mol% auf Seiten des IKVAV-Peptids entsprechen Konzentrationen von 2,6 $\mu\text{mol/mL}$ bzw. 4,2 $\mu\text{mol/mL}$ im Hydrogel. In Zellexperimenten zeigen häufig schon geringere Peptidkonzentrationen die gewünschte Wirkung auf die Zellen. Die benötigte Konzentration hängt dabei stark von der Zelllinie und der übrigen Zusammensetzung der Hydrogele ab. Außerdem werden bei 2D-Hydrogelen meist höhere Konzentrationen als bei 3D-Hydrogelen benötigt.^{222,223} Beispielsweise konnten DHAND *et al.* in kovalenten 3D-Hydrogelen auf Hyaluronsäure-Basis mit einer RGD-Konzentration von 2 $\mu\text{mol/mL}$ eine Verdreifachung der Zellproliferation und -ausbreitung erreichen.²¹⁴ In einem

3D PEG-Dimethacrylat-Hydrogel von YANG *et al.* führte eine IKVAV-Konzentration von 0,06 $\mu\text{mol/mL}$ zu den besten Ergebnissen hinsichtlich Differenzierung, Adhäsion und Minimierung der Apoptoseaktivität von mESC-Zellen. In dem 2D Analogon des PEG-Dimethacrylat-Hydrogels ließ eine IKVAV-Konzentration von 0,57 $\mu\text{mol/mL}$ die Adhäsion der mESCs steigen, während eine IKVAV-Konzentration von über 0,74 $\mu\text{mol/mL}$ die Apoptoseaktivität der Zellen erhöhte.²²³

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für die Steifigkeiten und Nachbegrenzen der peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogele sind vergleichbar mit denen, die RODELL *et al.* bei ihren Adamantan/ β -CD-vernetzten Hyaluronsäure-Hydrogelen gemessen haben. RODELL *et al.* haben Adamantan über einen Peptidlinker an die Hyaluronsäure (HA) gebunden, dafür wurden zwei Peptidlinker, die sich in nur zwei Aminosäuren unterschieden, verwendet (**PAd-HA** und **NAd-HA**). 25 % der Hyaluronsäure wurden mit β -CD und Adamantan und somit auch mit Peptid funktionalisiert. Bei der rheologischen Charakterisierung der Hydrogele stellten RODELL *et al.* Nachbegrenzen von 50-80 % fest. Außerdem wurde bei 5 Gew.-%igen Hydrogelen eine Steifigkeit von 350 Pa (**PAd-HA**) und bei 7,5 Gew.-%igen Hydrogelen eine Steifigkeit von 800 Pa (**NAd-HA**) bzw. 900 Pa (**NAd-HA**) bei einer Frequenz von 10 Hz gemessen. Diese Werte sind in einem vergleichbaren Bereich mit den in dieser Arbeit gemessenen Steifigkeiten und Nachbegrenzen. Die Selbstheilung der Hydrogele von RODELL *et al.* ist allerdings mit 95 % nach drei Zerstörungs-Erholungs-Zyklen besser als die in dieser Arbeit erzielte Selbstheilung, was dadurch bedingt sein kann, dass die Adamantylgruppe bei RODELL *et al.* durch den Peptidlinker weit vom Polymerrückgrat entfernt liegt und gut zugänglich gemacht statt wie in den in dieser Arbeit hergestellten Hydrogelen vom Peptidliganden abgeschirmt wird.¹⁵⁶

3.3.5 Mikrostruktur der peptidfunktionalisierten Hydrogele

Die hergestellten peptidfunktionalisierten Hydrogele wurden außerdem hinsichtlich ihrer Mikrostruktur mit dem Kontrollgel **GK** verglichen. Dafür wurden von allen fünf Hydrogelen REM-Bilder im lyophilisierten Zustand aufgenommen (Abbildung 21). In den Aufnahmen ist bei allen Hydrogelen eine poröse Mikrostruktur zu erkennen, wie sie für eine gute Nährstoffdiffusion in Zellexperimenten wünschenswert ist.

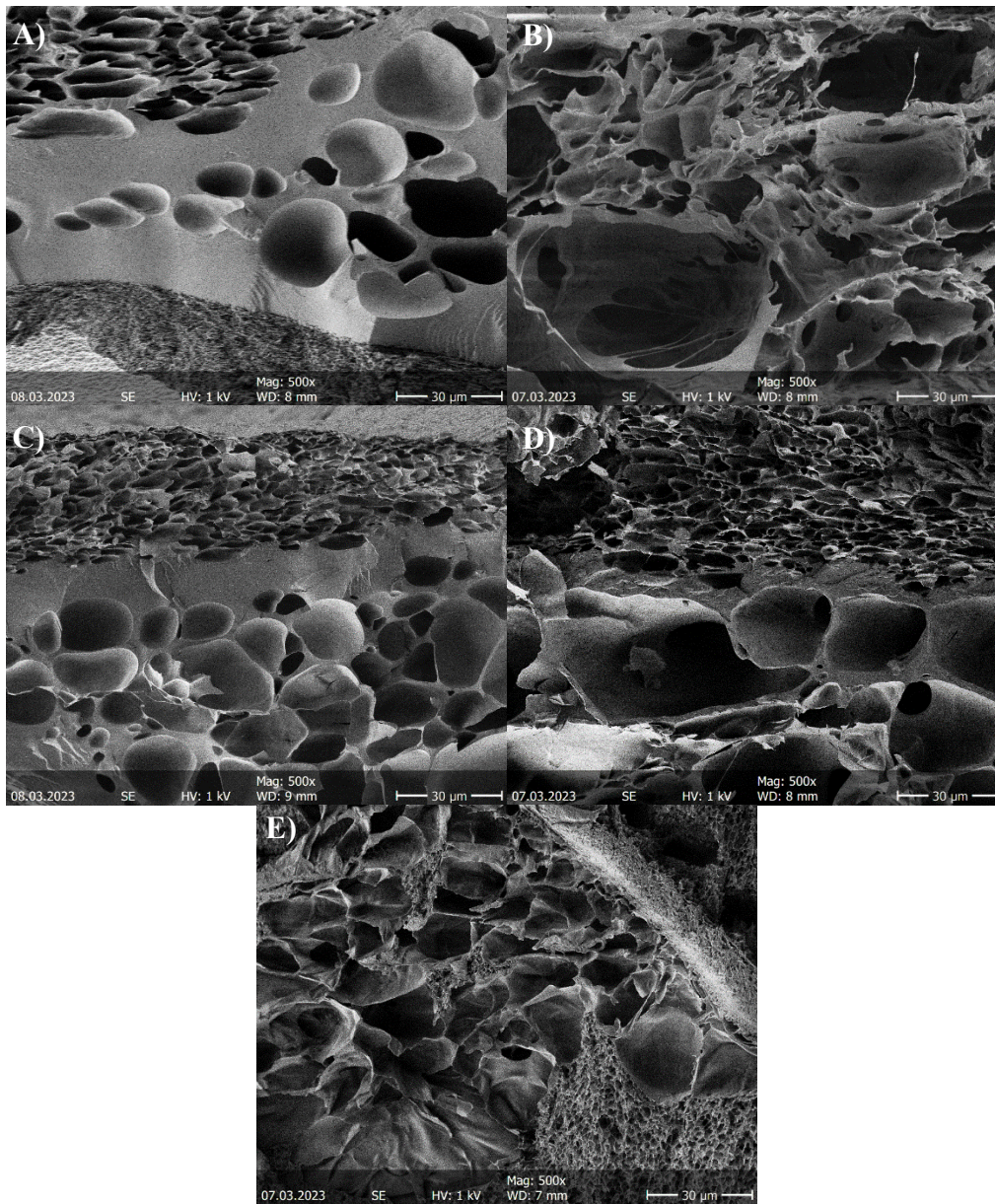


Abbildung 21: REM-Bilder der gefriergetrockneten Hydrogele (A) GRGD1, (B) GRGD2, (C) GIKVAV1, (D) GIKVAV2 und (E) GK.

Auffällig ist, dass die Hydrogele mit den größeren Peptidkonzentrationen, sowohl bei der RGD- als auch bei der IKVAV-Modifizierung (B, D), größere (bis 70 µm) und tiefere Poren aufweisen als die Hydrogele mit den geringeren Peptidkonzentrationen mit Porengrößen von bis zu 30 µm (A, C). Die Kontrollgele weisen mit einer Porengröße von bis zu 25 µm die kleinsten Poren auf (E).

Diese Beobachtungen passen zu den Rheologieergebnissen, da sie ebenfalls auf eine geringere Vernetzungsdichte und dadurch ausgelöste größere Porung bei höherer Peptidkonzentration in den Wirt-Gast-Hydrogelen hindeuten.

Darüber hinaus treten bei allen Hydrogelen, ob mit oder ohne Peptidfunktionalisierung, grob- und feinporige Bereiche in der Mikrostruktur auf. Diese Inhomogenitäten bei allen fünf Hydrogelen können durch die schnelle Gelierung und durch unzureichende Durchmischung der Hydrogele ausgelöst worden sein.

3.3.6 Abschnittszusammenfassung

In diesem Abschnitt konnte die Biofunktionalisierung der Wirt-Gast-Hydrogele erreicht werden, indem RGD- und IKVAV-Monomere in zwei verschiedenen Anteilen durch freie radikalische Copolymerisation mit DMA, AdHexAAm und TMAEA in das Gastpolymer eingebaut wurden. Außerdem konnte über rheologische Untersuchungen der Einfluss der Peptide auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele im Vergleich zu einem nicht peptidhaltigen Kontrollgel herausgestellt werden. Der Einbau von 1,2 mol% RGD-Peptiden und 2,0 mol% IKVAV-Peptiden in die Wirt-Gast-Hydrogele führte nur zu einer geringfügigen Änderung der mechanischen Eigenschaften, denn bei gleichbleibender Steifigkeit, Deformierbarkeit und Selbstheilung wurde lediglich die Elastizität herabgesetzt. Die Erhöhung der RGD- und IKVAV-Anteile in den Wirt-Gast-Hydrogelen auf 2,9 mol% bzw. 3,8 mol% führte hingegen zu einer starken Reduktion der Steifigkeit, Deformierbarkeit und Selbstheilung und einer weiteren Herabsetzung der Elastizität. Zurückzuführen sind diese Einflüsse der Peptidliganden auf eine Störung der Wirt-Gast-Vernetzung durch die sterisch anspruchsvolle Struktur der Peptide. Für das RGD-Peptid wurde dabei eine etwas stärkere Reduktion der Vernetzungsdichte festgestellt, die auf stärkere Wechselwirkungen der Peptide mit den β -Cyclodextrinmolekülen aufgrund ihrer höheren Hydrophilie hindeutet. Die etwas stärkere Vernetzung bei Verwendung der IKVAV-Peptide kann auf Zusammenlagerungen der hydrophoberen IKVAV-Liganden zurückgeführt werden. Zusätzlich bestätigten REM-Aufnahmen eine Reduktion der Vernetzungsdichte bei höheren Peptidkonzentrationen, da die Porengrößen der Hydrogele im Vergleich zu den Hydrogelen mit niedrigerer Peptidkonzentration erhöht wurden.

Diese Einflüsse der Peptidliganden auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele sind bei dem Einsatz in Zellexperimenten zu beachten, da sowohl die Mechanik als auch die Biofunktionalisierung das Zellverhalten beeinflussen und so keine unabhängige Analyse der Parameter möglich ist. Vielversprechend ist jedoch, dass die geringeren Peptidkonzentrationen nur zu einer geringfügigen Änderung der mechanischen Eigenschaften geführt haben und diese

Peptidkonzentrationen trotzdem noch oberhalb vieler in Zellexperimenten benötigten Konzentrationen liegen.

3.4 Zellexperimente mit den Wirt-Gast-Hydrogelen

Die Untersuchung der Wirt-Gast-Hydrogele in Zellexperimenten sollte die allgemeine Eignung dieser für Anwendungen in der Zellbiologie verifizieren. Dafür sollte zunächst die Zytokompatibilität der einzelnen Polymere getestet werden, bevor erste Versuche zur dreidimensionalen Einbettung der Zellen in die Wirt-Gast-Hydrogele unternommen wurden.

3.4.1 Zytokompatibilität der Wirt- und Gastpolymere

Um die Zytokompatibilität der Polymere zu überprüfen, wurden die Polymere mit verschiedenen Molanteilen der einzelnen Monomere hergestellt, sodass eine Abschätzung der Zytotoxizität der einzelnen Komponenten möglich war. Der Molanteil des Monomers AdHexAAm wurden von 2 mol% bis 7 mol% eingestellt und TMAEA zu 5 mol% bzw. 9 mol% copolymerisiert (**PAd5-PAd8**). Der Molanteil von β -CDHexAAm im Wirtpolymer wurde von 3 mol% bis 8 mol% (**PCD5-PCD7**) variiert (Tabelle 10).

Tabelle 10: Theoretische und experimentelle Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Gastpolymere **PAd5-PAd8** und der Wirtpolymere **PCD5-PCD7**.

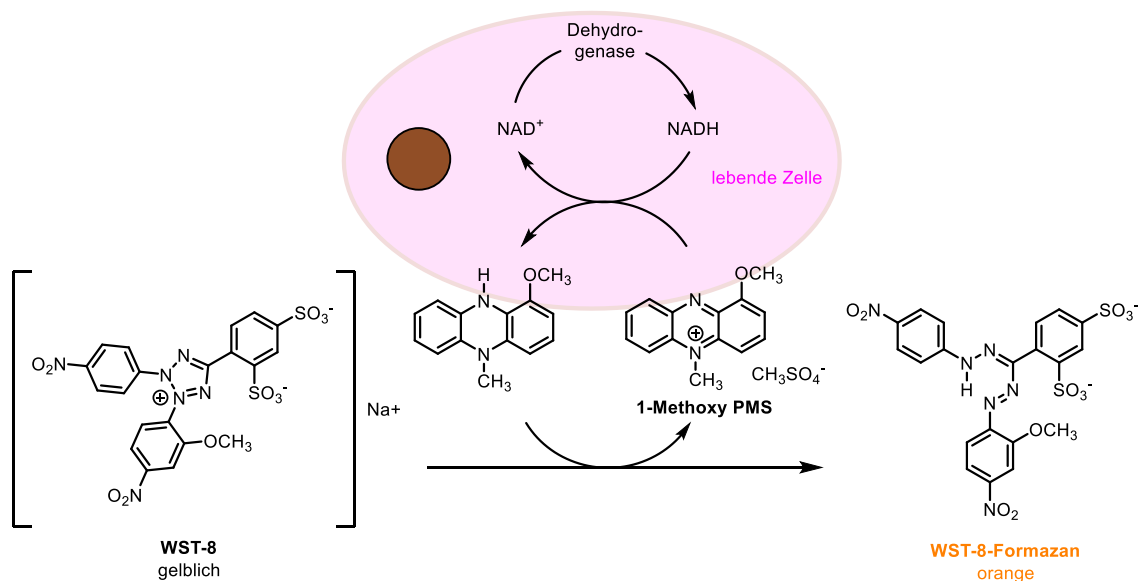
Polymer	Zusammensetzung		\bar{M}_n / Da^b	D^b
	DMA/AdHexAAm/TMAEA / mol%	theoretisch		
PAd5	93/2/5	93,0/2,3/4,7	146100	1,92
PAd6	89/6/5	89,7/5,4/4,9	192400	2,23
PAd7	87/8/5	88,3/7,0/4,7	118600	1,81
PAd8	82/8/10	83,3/7,3/9,4	178000	2,15
	DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm / mol%			
PCD5	94,9/1,1/4,0	94,4/2,3/3,3	- ^c	- ^c
PCD6	92,4/1,6/6,0	92,4/2,8/4,8	- ^c	- ^c
PCD7	89,9/2,1/8,0	90,1/2,4/7,5	- ^c	- ^c

^a bestimmt über ¹H-NMR-Spektroskopie; ^b bestimmt mittels GPC in DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und PMMA als Standard; ^c keine Daten wegen schlechter Löslichkeit der Polymere im GPC-Eluenten.

Die Zytokompatibilität des Monomers DMA wurde bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen und wird daher hier vorausgesetzt.^{224,225} In Tabelle 10 sind die Zusammensetzungen der einzelnen Polymere sowie deren mittlere Molmassen \bar{M}_n und Dispersitäten \bar{D} zusammengefasst. Die Molmassen der Adamantan-Polymere liegen zwischen 118600 Da und 192400 Da und die Dispersitäten entsprechen dem typischen Bereich einer freien radikalischen Polymerisation. Die Molmassen und Dispersitäten der Wirtpolymere konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit der Polymere im GPC-Eluenten nicht bestimmt werden.

Für die Untersuchung der Zytokompatibilität der Polymere wurden COS-7-Zellen als Modellzelllinie eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine fibroblastenähnliche Zelllinie, die aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze gewonnen wird. Das Akronym „COS“ steht für „*CV-1 in Origin, carrying SV40*“ und beschreibt die Abstammung der Zellen von CV-1-Zellen, die Simian-Virus 40-Genmaterial in sich tragen.²²⁶

Für die Bestimmung der Zytokompatibilität der Polymere wurde ein *Cell Counting Kit-8* (CCK-8)-Assay verwendet. Der CCK-8-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der relativen Zellviabilität. Er basiert auf dem wasserlöslichen 4-[3-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat Natriumsalz (WST-8), das in Gegenwart des Elektronenüberträgers 1-Methoxy-5-methylphenaziniummethylsulfat (1-Methoxy PMS) durch das Enzym NADH, welches von Dehydrogenasen in lebenden Zellen hergestellt wird, zu dem ebenfalls wasserlöslichen WST-8-Formazan reduziert wird (Schema 9).



Schema 9: Reduktion des CCK-8-Assay-Anfärbereagenzes WST-8 zu WST-8-Formazan durch die Aktivität der Dehydrogenase in lebenden Zellen mithilfe des Elektronenüberträgers 1-Methoxy PMS.²²⁷

Die Menge an gebildetem WST-8-Formazan ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen. WST-8-Formazan besitzt eine orangene Färbung und absorbiert bei einer Wellenlänge von 450 nm.²²⁷ Bei der Durchführung des CCK-8-Assays wurde daher die Absorption einer Lösung des Polymers in Zellkulturmedium, in der COS-7-Zellen für 24 h inkubiert wurden, bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Da die Polymere selbst auch Strahlung absorbieren könnten, wurde zusätzlich die Absorption der Polymerlösung ohne Zellen (Blank-Probe) gemessen und von der Absorption der Polymerlösung mit Zellen subtrahiert. Als Referenz wird die Absorption einer Probe mit Zellen, die in Zellkulturmedium ohne Polymer inkubiert wurden, gemessen. Aus dem Quotienten der Absorption der Polymerprobe mit Zellen reduziert um die Blank-Probe und der Absorption der Referenzprobe kann, wie in Formel 5 gezeigt, die relative Zellviabilität in der Polymerprobe berechnet werden.

$$\text{Relative Zellviabilität} = \frac{\text{Absorption}_{\text{Polymer+Zellen}} - \text{Absorption}_{\text{Polymer}}}{\text{Absorption}_{\text{Referenz}}} \cdot 100 \% \quad (5)$$

Mithilfe des CCK-8-Assays wurde die Zellviabilität der COS-7-Zellen, nachdem diese in den einzelnen Polymerlösungen mit Konzentrationen von 0,125 mg/mL bis 8,000 mg/mL inkubiert wurden, bestimmt. Die dabei ermittelte Zellviabilität relativ zur Referenz ist in Abbildung 22A) für die Adamantan-Copolymere und in Abbildung 22B) für die β -Cyclodextrin-Copolymere dargestellt. Die Erhöhung des Molanteils von AdHexAAM (**PAd5-PAd7**) zeigt dabei keinen Einfluss auf die Zellviabilität, die in allen verwendeten Polymerkonzentrationen eine gute Zytokompatibilität von AdHexAAM bestätigt. Dahingegen führt die Erhöhung des TMAEA-Anteils von 5 mol% (**PAd7**) auf 9 mol% (**PAd8**) zu einer Abnahme der Zellviabilität von 80 % auf 30 % bei einer Polymerkonzentration c von 8 mg/mL. Ein Grund dafür kann die Hydrolyse der Esterfunktionalität von TMAEA sein, durch die Choliniodid entsteht. Zu Choliniodid sind keine quantitativen Toxizitätsdaten verfügbar, jedoch ist Cholinchlorid mit $\text{LD}_{50} = 3,4 \text{ g/kg}$ als nicht toxisch eingestuft und auch eine angemessene Menge an Iodid wie Natriumiodid ist tierexperimentellen Studien zufolge ungiftig.^{228,229} Der Molanteil von TMAEA im Polymer sollte dennoch den Wert von 5 mol% nicht deutlich übersteigen. Die relative Zellviabilität der β -Cyclodextrin-Polymere liegt für alle verwendeten Molanteile von β -CDHexAAM in allen Polymerkonzentrationen von 0,125 mg/mL bis 8,000 mg/mL bei $>84 \%$ und verifiziert damit eine gute Zytokompatibilität der β -Cyclodextrin-Polymere.

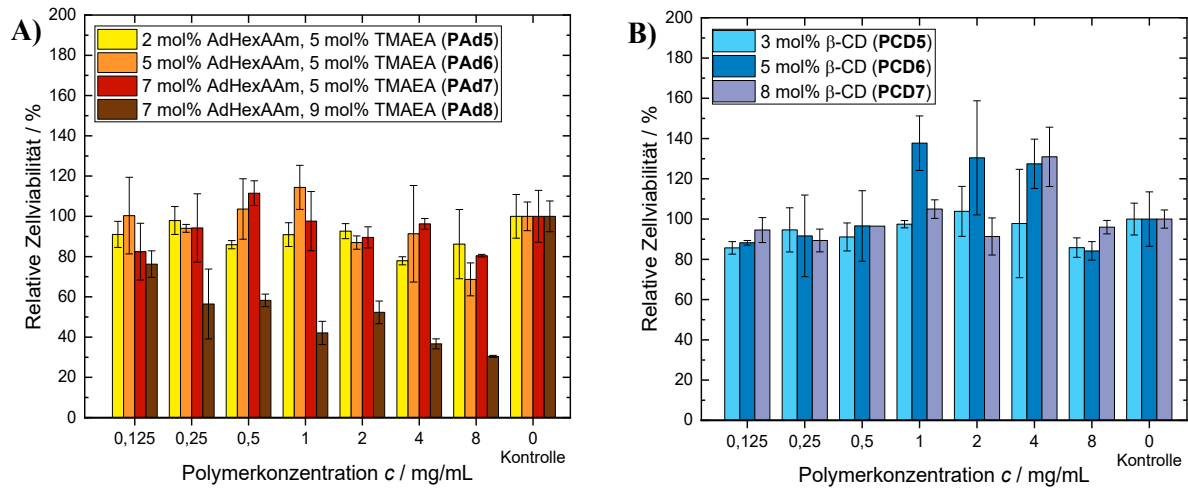
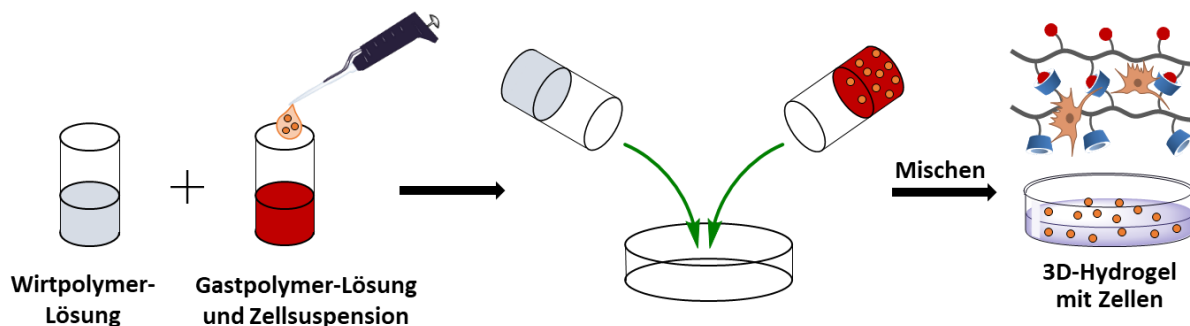


Abbildung 22: Zellviabilität von COS-7-Zellen bestimmt über CCK-8-Assays nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) mit (A) den Adamantan-Polymeren **PAd5-PAd8** und (B) den β -Cyclodextrin-Polymeren **PCD5-PCD7** in verschiedenen Polymerkonzentrationen c relativ zur Kontrolle mit normalem Zellkulturmedium.

3.4.2 3D-Zellexperimente

Die 3D-Zellexperimente wurden mit der Absicht, die optimalen Gelbedingungen für die 3D-Einbettung einer Modellzellart herauszufinden, durchgeführt. Ziel war es, die Gelbedingungen zu finden, mit denen die Zellen dreidimensional gleichmäßig eingebettet werden können ohne über die Zeit hinweg zum Boden des Hydrogels zu sinken. Die 3D-Zelleinbettung bietet, wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, diverse Vorteile gegenüber 2D-Zellkultivierungen und wird deswegen mit den in dieser Arbeit entwickelten Hydrogelen versucht zu erreichen. Als Modellzellart für diese ersten 3D-Zellexperimente dienten B16F1 opto CaaX Zellen. steht dabei für eine Zelllinie, die von B16F0-Mausmelanomzellen abstammt und durch ein einmaliges Selektionsverfahren gewonnen wurde. B16F1-Zellen besitzen eine fibroblastenähnliche Morphologie, die eine Mischung aus spindelförmigen und epithelähnlichen Zellen umfasst. Außerdem weisen sie ein niedrigeres Potenzial zur Metastasenbildung und eine niedrigere invasive Aktivität als ihre Schwesterzelllinien B16F10 und B16BL6 auf. Zudem ermöglichen sie dank ihres auch nach mehreren Subkulturen noch konsistenten Verhaltens eine gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Aufgrund ihrer stabilen Eigenschaften und ihres reproduzierbaren Verhaltens werden B16F1-Zellen bevorzugt als Modellzellart verwendet.²³⁰ Die Erweiterung opto CaaX steht für eine Modifizierung der Zellen mit einem optogenetischen Tool,²³¹ welches für die an dieser Stelle durchgeführten Experimente keine weitere Relevanz besitzt.

Die Gelpräparation und Einbettung der Zellen erfolgte wie in Schema 10 skizziert, indem die Wirt- und Gast-Copolymere zunächst separat in Mikroskopiepuffer gelöst wurden, bevor die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren in die Gastpolymerlösung hineingemischt wurde. Die Bevorzugung der Gastpolymerlösung zum Einmischen der Zellsuspension anstelle der Wirtpolymerlösung ist in der höheren Viskosität der Wirtpolymerlösung begründet, die beim Mischen eine höhere mechanische Beanspruchung für die Zellen bedeutet hätte. Das anschließende Zusammenmischen der beiden Polymerlösungen erfolgte durch behutsames Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette für hochviskose Flüssigkeiten. Das sich dabei gebildete Hydrogel wurde auf drei Vertiefungen einer 384-Well-Platte aufgeteilt und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator aufbewahrt. Eine Grundvoraussetzung für eine 3D-Einbettung von Zellen ist eine zügige Gelierung innerhalb weniger Minuten, damit die Zellen während der Gelierzeit nicht zum Boden der Platte absinken. Diese Voraussetzung konnten die hergestellten Wirt-Gast-Hydrogele erfüllen, denn beim Vermischen der Polymere war eine sofortige Gelierung zu erkennen. Im Gegensatz dazu benötigen natürliche Hydrogele wie das Matrigel, das temperaturabhängig geliert, einige Minuten bis die Gelierung einsetzt. In der Zeit bis zur Gelierung muss das Matrigel mehrfach auf- und abpipettiert werden, um die Ablagerung der Zellen zu verhindern, wodurch die Zellen zusätzlichem mechanischem Stress ausgesetzt werden.



Schema 10: Darstellung der Präparation der Wirt-Gast-Hydrogele für 3D-Zellexperimente.

Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurde die Verteilung der Zellen in den Wirt-Gast-Hydrogelen mithilfe eines Durchlichtmikroskops untersucht. Es wurden Wirt-Gast-Hydrogele mit den Vernetzungsdichten von 3,3 mol% über 4,8 mol% bis hin zu 7,5 mol% und Gesamtpolymerkonzentrationen von 4 bis 10 Gew.-% betrachtet. In Abbildung 23A) ist exemplarisch eine Durchlichtmikroskopieaufnahme eines 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogeles mit 3,3 mol% Vernetzung gezeigt, in dem eine gleichmäßige dreidimensionale Verteilung der Zellen erhalten werden konnte, denn die Zellen befanden sich in verschiedenen

Ebenen des Hydrogeles, wohingegen in Abbildung 23B) ein Hydrogel gezeigt ist, bei dem der Großteil der Zellen zum Plattenboden gesunken ist. In diesem 4 Gew.-%igen Hydrogel mit 7,5 mol% Vernetzung war demnach keine dreidimensionale Einbettung der Zellen möglich.

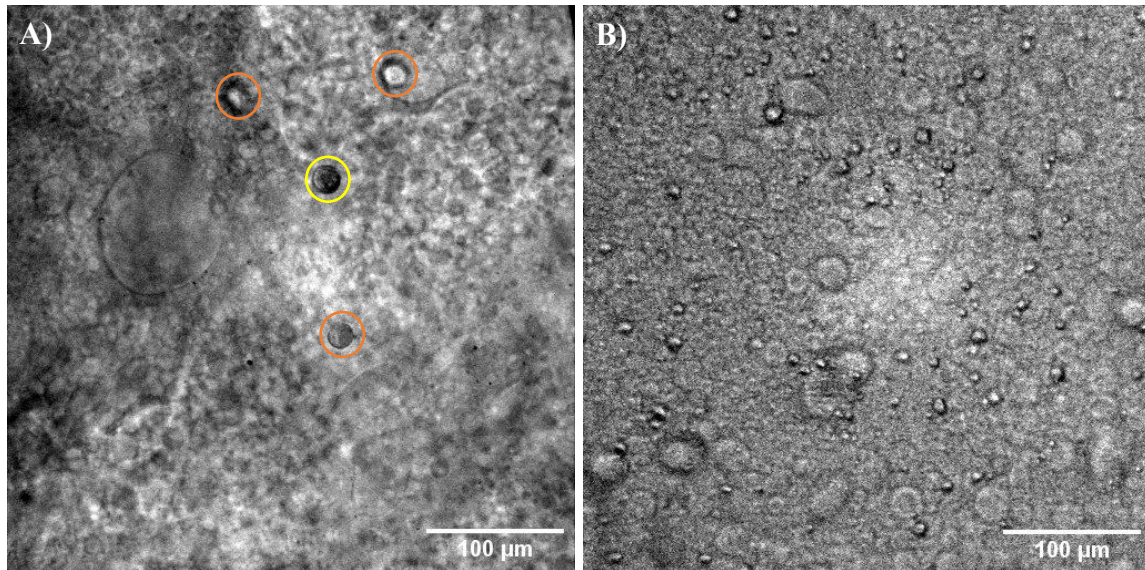


Abbildung 23: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) einem 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogel mit 3,3 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; orangener Kreis = Zelle nicht in der fokussierten Ebene) und am Boden eines (B) 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogels mit 7,5 mol% Vernetzung.

Die Durchlichtaufnahmen weiterer untersuchter Wirt-Gast-Hydrogele befinden sich im Anhang (Abbildungen A41 und A42). Die Ergebnisse der Durchlichtmikroskopie aller untersuchten Hydrogele sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Darin ist zu erkennen, dass die Hydrogele mit niedrigerer Vernetzungsdichte bei allen vier Gesamtpolymerkonzentrationen eine 3D-Zelleinbettung ermöglichen, wohingegen sich bei höherer Vernetzungsdichte der Großteil der Zellen am Plattenboden befand, obwohl eine stärkere Vernetzung und Elastizität der Hydrogele die Zellen stabilisieren sollten. An dieser Stelle war die Netzwerkeelastizität jedoch nicht der ausschlaggebende Punkt, sondern die Durchmischung der beiden Polymerlösungen, denn die hohe β -CD-Konzentration in den Wirtpolymeren führte zu einer höheren Viskosität der Polymerlösungen, wodurch die Mischbarkeit mit den dünnflüssigen Gastpolymerlösungen beeinträchtigt wurde. Dadurch ergab sich beim Mischen der Polymerlösungen kein homogenes Material, sondern Teile der dünnflüssigen Gastpolymerlösung wurden nicht untergemischt und bahnten den Zellen den Weg, um zum Boden zu fließen. Ein höherer Mischaufwand wäre notwendig gewesen, um die Hydrogele zu homogenisieren, wie er bei der Präparation der Hydrogele für die Rheologieexperimente angewandt wurde, doch dieser hätte die Zellen mechanisch so stark beansprucht, dass ein Großteil der Zellen zerstört worden wäre.

Unabhängig von der Verteilung der Zellen zeigten diese in allen Hydrogelen eine runde und intakte Morphologie, was auf eine Lebendigkeit der Zellen hindeutet und somit die Nicht-Toxizität der Hydrogele verifiziert.

Tabelle 11: Vorhandensein einer dreidimensionalen Verteilung der Zellen in Wirt-Gast-Hydrogelen mit verschiedenen Vernetzeranteilen und Gesamtpolymerkonzentrationen β .

3D-Verteilung der Zellen ^a			
Gesamtpolymerkonzentration β / Gew.-%	Vernetzungsdichte im Hydrogel		
	3,3 mol% ^b	4,8 mol% ^c	7,5 mol% ^d
4	Ja	Nein	Nein
6	Ja	Ja	Nein
8	Ja	Ja	- ^e
10	Ja	Ja	- ^e

^a bestimmt mittels Durchlichtmikroskopie über 3D-Scans in Z-Richtung durch das Hydrogel mit B16F1 opto CaaX Zellen in serumhaltigem Mikroskopiepuffer nach mindestens 2 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂; **Ja** = Zellen sind dreidimensional im Hydrogel verteilt; **Nein** = Zellen sind zum Plattenboden gesunken; Polymerzusammensetzungen (Gastpolymer: DMA/AdHexAAm/TMAEA; Wirtpolymer: DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm): ^b Gastpolymer: 91,3/3,8/4,8, \bar{M}_n = 213700 Da, D = 2,41, Wirtpolymer: 94,4/2,3/3,3, ^c Gastpolymer: 89,8/5,3/4,9, \bar{M}_n = 220500 Da, D = 2,30, Wirtpolymer: 92,4/2,8/4,8, ^d Gastpolymer: 86,5/8,4/5,2, \bar{M}_n = 196500 Da, D = 2,33, Wirtpolymer: 90,1/2,4/7,5; ^e Experimente wurden nicht durchgeführt.

Darüber hinaus wurden ebenfalls RGD-haltige Hydrogele auf die Verteilung der Zellen hin untersucht. Dabei wurden parentale B16F1-Zellen ohne optogenetisches Tool verwendet. Als RGD-haltiges Polymer wurde das mit 2,9 mol% RGD-Peptid funktionalisierte Polymer **PRGD2** eingesetzt und daraus zwei 4 Gew.-%ige Hydrogele mit 2,5 mol% bzw. 5,5 mol% Vernetzung gebildet. Durchlichtaufnahmen der beiden Hydrogele sind in den Abbildungen 24A) und 24B) dargestellt. Das 4 Gew.-%ige RGD-haltigen Hydrogel mit 2,5 mol% Vernetzung zeigte analog zu den nicht RGD-haltigen Hydrogelen mit niedriger Vernetzungsdichte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im gesamten Hydrogel. Zusätzlich konnten einzelne Zellen mit Adhäsion beobachtet werden (Abbildung 24A). In dem RGD-haltigen Hydrogel mit 5,5 mol% Vernetzung setzten sich die Zellen, wie in Abbildung 24B) deutlich zu erkennen ist, am Boden ab. Die Ergebnisse der RGD-haltigen Hydrogele bestätigten damit die der Hydrogele ohne RGD.

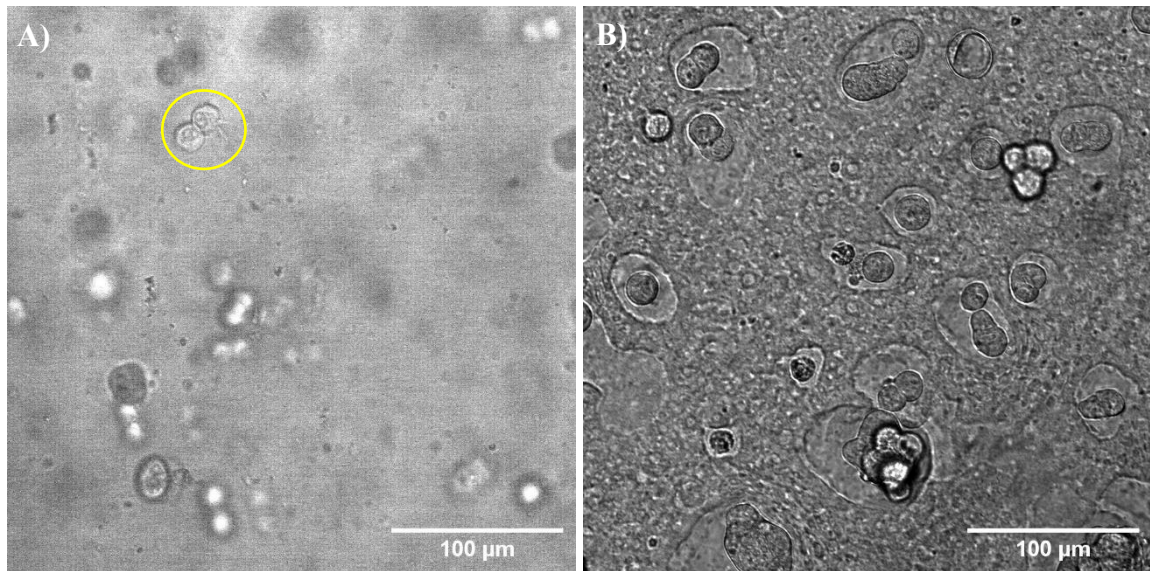


Abbildung 24: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) einem 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogel mit 2,9 mol% RGD im Gastpolymer und 2,5 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; übrige Zellen liegen ober- und unterhalb der fokussierten Ebene) und (B) am Boden eines 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogeles mit 2,9 mol% RGD im Gastpolymer und 5,5 mol% Vernetzung.

Ein anderer Aspekt, der bei allen Hydrogelen, auch bei denen mit weniger Vernetzung, die eine 3D-Verteilung ermöglichen, auftrat und in den Durchlichtaufnahmen sichtbar ist, ist die blasenartige Struktur innerhalb der Hydrogele. Lediglich das RGD-haltige Hydrogel mit der niedrigsten Vernetzungsdichte von 2,5 mol% wies eine homogene Struktur unter dem Mikroskop auf. Die übrigen schwach vernetzten Hydrogele sahen zwar bei Betrachtung mit dem Auge homogen aus, zeigten aber keine homogene innere Struktur unter dem Mikroskop. Ähnliche strukturelle Eigenschaften wurden von ABBADESSA *et al.* bei Hydrogelen aus Triblockcopolymeren bestehend aus PEG und methacryliertem Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid-mono/dilactat) (pHPMAlac) gemischt mit verschiedenen Mengen methacrylierter Hyaluronsäure (HAMA) festgestellt und mit einer Phasentrennung zwischen wasserreichen Phasen mit wenig Polymeren und wasserarmen, polymerreichen Phasen erklärt.²³² Auch OUDSHOORN *et al.* beschrieben eine Phasentrennung zwischen wasserreichen, hydrophilen Domänen und wasserarmen, hydrophoben Domänen der Polymere in hochverzweigten Polyglycerin-Hydrogelen.²³³ Von RODELL *et al.* wurde in Hyaluronsäure-basierten Hydrogelen, die über Adamantan und β -CD vernetzt waren, ebenfalls eine Phasentrennung beobachtet, die durch die Kondensation der Polymere zu einer festen Phase verursacht wurde.²³⁴ Eine Phasentrennung bei den in dieser Arbeit hergestellten Hydrogelen in konzentriertere und weniger konzentrierte Phasen ist denkbar, benötigt aber weiterführender Experimente zur Verifikation. Negative Einflüsse dieser strukturellen Eigenschaften auf die

Zellviabilität sind nicht ersichtlich, da die Zellen dennoch lebendig sind. Die Zellmorphologie wird in dem homogenen RGD-haltigen Hydrogel (Abbildung 24A) allerdings positiv beeinflusst, da einzelne Zellen eine Adhäsion aufweisen, was in dem inhomogenen RGD-haltigen Hydrogel (Abbildung 24B) nicht zutrifft. Im Allgemeinen ist eine strukturelle Homogenität in Zellexperimenten vorteilhaft für eine gleichmäßige Zellverteilung und die Kontrolle der Materialeigenschaften. Auch die mechanischen Eigenschaften sind innerhalb der Hydrogele und zwischen verschiedenen Proben konsistenter, wenn die Struktur homogen ist.²³⁵

3.4.3 Abschnittszusammenfassung

Insgesamt konnte für die in diesem Kapitel hergestellten Wirtpolymere P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm) und Gastpolymere P(TMAEA-*co*-DMA-*co*-AdHexAAm) mithilfe von CCK-8-Assays eine gute Zytokompatibilität nachgewiesen werden, die in den 3D-Zellexperimenten bestätigt wurde.

Das Ziel, die Zellen dreidimensional in die Wirt-Gast-Hydrogele einzubetten, konnte bei den Hydrogelen mit niedrigeren Vernetzungsdichten von 2,5 mol% bis 4,8 mol% erreicht werden. Bei den Hydrogelen mit hohen Vernetzungsdichten führte eine schlechte Mischbarkeit der Wirt- und Gastpolymerlösungen zu einem Absinken der Zellen zum Plattenboden. Darüber hinaus wurde mittels Durchlichtmikroskopie eine inhomogene innere Hydrogelstruktur festgestellt, die nur bei der niedrigsten verwendeten Vernetzungsdichte von 2,5 mol% nicht auftrat. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden in den nachfolgenden Kapiteln niedrige Vernetzungsdichten verwendet. Negative Einflüsse der inhomogenen inneren Struktur auf die Zellviabilität wurden zwar nicht nachgewiesen, dennoch ist eine homogene Hydrogelstruktur und dadurch gleichmäßige Umgebungsbedingung für alle Zellen erstrebenswert.

In den nachfolgenden Kapiteln sollte das bestehende Gastpolymer P(TMAEA-*co*-DMA-*co*-AdHexAAm) um eine Thiolacton-Einheit erweitert werden, um diese für die polymeranaloge Bindung von Peptiden zu nutzen. Weitere Vorteile der Verwendung von Thiolacton-Einheiten werden im folgenden Abschnitt erläutert.

Teile der in den Kapiteln 4 und 5 beschriebenen Ergebnisse wurden im Rahmen der Masterarbeit von *Gizem Karatas* erarbeitet.²³⁶

4. Synthese und Charakterisierung thiolactonhaltiger Wirt-Gast-Hydrogele

4.1 Einleitung und Zielsetzung

In diesem Kapitel soll die alternative Methode zu der in Kapitel 3 verwendeten Copolymerisation von Peptidmonomeren, nämlich die polymeranaloge Kupplung von Peptiden, verwendet werden. In den letzten Jahren wurden einige Kupplungsmethoden zur polymeranalogen Peptidimmobilisierung entwickelt. Zu den am häufigsten verwendeten Kupplungsmethoden gehören die Azid-Alkin-Click-Reaktionen,^{83,237} die Amidkupplung über aktivierte Carbonsäuren²³⁸ und Thiol-MICHAEL-Additionen.^{239–242} Da die Azid-Alkin-Reaktionen häufig auf hydrophoben Verbindungen basieren, sind sie für die Anwendung in Hydrogelen unvorteilhaft. Die Verwendung von Aktivestern birgt den Nachteil, Aktivierungsreagenzien zu benötigen und Nebenprodukte zu erzeugen, die sorgfältig entfernt werden müssen, um eine Zytokompatibilität des Polymers zu gewährleisten. Die Thiol-MICHAEL-Addition hingegen zeichnet sich durch ihre hohe Atomökonomie, milden Reaktionsbedingungen und die Abwesenheit toxischer Reagenzien aus, wodurch sie auch in Gegenwart von Zellen eingesetzt werden kann.²⁴³ Bei der Thiol-MICHAEL-Addition reagiert ein Thiol mit einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung, dem sogenannten MICHAEL-Akzeptor. Das Einbringen der für die Thiol-MICHAEL-Addition benötigten Thiolgruppen in ein Polymer ist jedoch eine Herausforderung, da thiolhaltige Monomere die Polymerisation stören. Thiole werden auch als Kettenübertragungsreagenzien in radikalischen Polymerisationen eingesetzt.^{105,244} Folglich können Thiole nur in geschützter Form polymerisiert werden. Zu diesen geschützten Thiolen gehören Thioester,²⁴⁵ Thioether²⁴⁶ und spaltbare Disulfide, die allerdings den Nachteil aufweisen, bei der Thiolschutzung Nebenprodukte zu bilden und im Fall von Disulfidvernetzern zu einer *in-situ* Gelierung zu führen, wodurch lediglich eingeschränkte Thiolkonzentrationen im Polymer erreicht werden können.^{105,182} Eine vielversprechende Alternative stellen Thiolactone dar, da sie die polymeranaloge Bildung großer Mengen an Thiolen ohne Nebenproduktbildung ermöglichen.²⁴⁷

Bei Thiolactonen handelt es sich um ringförmige Thioester, die aus Mercaptosäuren unter Abspaltung von Wasser in verschiedenen Ringgrößen synthetisiert werden können.²⁴⁸ Die häufigsten Vertreter dieser Molekülklasse sind die β -, γ - und δ -Thiolactone, die aus vier-, fünf- oder sechsgliedrigen Ringen bestehen (Abbildung 25). Die als α -Thiolactone bezeichneten dreigliedrigen Ringe können nur als instabile Zwischenprodukte erhalten werden.²⁴⁹

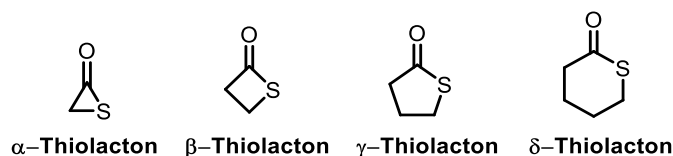


Abbildung 25: Molekülstrukturen von α -, β -, γ - und δ -Thiolacton.

Eines der am häufigsten verwendeten Thiolactonderivate ist das Homocystein-Thiolacton, das aufgrund seiner Aminogruppe für Modifikationen durch elektrophile Angriffe zur Verfügung steht.²⁵⁰ In dieser Arbeit soll Homocystein-Thiolacton verwendet werden, um das Thiolactonmonomer *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton (TLaAAM) darzustellen und über Copolymerisation in das Gastpolymer zu integrieren. Da Thiolactone empfindlich gegenüber Nucleophilen sind, können sie sehr effizient durch primäre Amine ringgeöffnet werden (Aminolyse), um freie Thiole zu erzeugen. Unter bestimmten Bedingungen ist auch eine Ringöffnung durch Alkohole und Wasser möglich. Ein weiterer Vorteil der Thiolactone besteht in der Möglichkeit zur doppelten Funktionalisierung, da durch das gewählte Ringöffnungsreagenz ebenso wie über das bei der Ringöffnung entstehende Thiol verschiedene Verbindungen am Polymer immobilisiert werden können.²⁵¹ In dieser Arbeit sollte die Ringöffnung über eine Aminolyse mittels *n*-Propylamin erfolgen. Die dabei entstehenden Thiole sollten vollständig zur Immobilisierung von RGD-Peptiden am Gastpolymer genutzt werden. Dafür wurde dieselbe Aminosäure-Sequenz wie in Kapitel 3 verwendet. Diese wurde anstelle der Methacrylamidgruppe mit einer Maleimidgruppe (Mal) funktionalisiert, denn Studien von NGUYEN *et al.* zufolge gehören Maleimide, gefolgt von Vinylsulfonen und Acrylaten zu den reaktivsten MICHAEL-Akzeptoren.²⁵² Darüber hinaus wurden die Peptide am N-Terminus, um eine Aminocaprinsäure (Aca) als *Spacer* zwischen der Peptidsequenz und der Maleimidfunktionalität erweitert, um eine höhere Flexibilität und bessere Zugänglichkeit des Peptids für Integrine zu erreichen und zugleich die Immobilisierungsreaktion zu erleichtern.^{220,253} Folglich ergab sich für die Molekülbezeichnung des RGD-Peptids die Abkürzung Mal-Aca-GGRGDSF.

Prinzipiell wäre auch eine Immobilisierung des Peptids über die direkte Aminolyse des Thiolactonrings mit dem Amin des N-Terminus des Peptids denkbar gewesen, dies ist aber die weniger reaktive Kupplungsvariante und würde zu einer geringeren Funktionalisierungsrate als die Thiol-MICHAEL-Addition führen.¹⁰⁵

Da die Kontrolle über die zellulären Interaktionen wichtig ist und einige Anwendungen eine reduzierte Zelladhäsion benötigen, während in anderen Anwendungen eine ausgeprägte Zelladhäsion gewünscht ist,²¹⁴ sollten die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele mit

verschiedenen Mengen an RGD-Peptiden versehen und deren Einfluss auf das Zellverhalten untersucht werden.

Außerdem sollte in diesem Kapitel der Einfluss des kationischen Monomers TMAEA auf das Zellverhalten in 3D-Zellexperimenten näher untersucht werden, indem Gastpolymere mit und ohne TMAEA-Einheiten synthetisiert wurden. Die Kombination aus adhäsionsfördernden Peptiden und kationischer Ladung führte in den kovalent vernetzten Hydrogelen von SALLOUH *et al.* und STAMM *et al.* zu einem synergistischen Effekt auf die Zelladhäsion.^{166,184} Arbeiten mit Adamantan/ β -CD-vernetzten Hydrogelen, die Peptidliganden mit Kationik kombinieren, sind bisher nicht bekannt, daher soll in diesem Abschnitt zusätzlich untersucht werden, ob ein ähnlicher synergistischer Effekt zu erreichen ist.

Die Vernetzungsdichte der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele sollte nicht variiert werden, wodurch die Synthese nur eines Wirtpolymers notwendig war. Das Wirtpolymer sollte wie in den vorausgegangenen Kapiteln aus DMA, HexAAM und β -CD-EDA aufgebaut sein. Da die mechanischen Eigenschaften der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele dennoch variiert werden sollten, wurden die Hydrogele in vier unterschiedlichen Polymerkonzentrationen hergestellt, wodurch Hydrogele in vier verschiedenen Steifigkeiten erzeugt werden sollten.

Insgesamt sollten in diesem Abschnitt folglich die Parameter Peptidkonzentration, kationische Ladung und mechanische Eigenschaften hinsichtlich ihres Einflusses auf das Zellverhalten charakterisiert werden, da diese drei Parameter bisher selten in Kombination untersucht wurden. Dafür wurden, wie in Abbildung 26 gezeigt, thiolactonhaltige Gastpolymere mit und ohne kationische Einheiten hergestellt. Diese Gastpolymere wurden zum einen ohne Peptidfunktionalisierung eingesetzt (**PAd_n** und **PAd_{kat}**) und zum anderen mit RGD-Peptiden funktionalisiert (**PAd_nRGD2** und **PAd_{kat}RGD2**). Durch Kombination der peptidhaltigen und nicht peptidhaltigen Gastpolymere sollte eine weitere mittlere Peptidkonzentration erzeugt werden, um den Einfluss verschiedener Peptidkonzentration näher untersuchen zu können. Insgesamt wurden dadurch sechs unterschiedlich zusammengesetzte Hydrogele mit gleicher Vernetzungsdichte hergestellt, die jeweils in vier verschiedenen Polymerkonzentrationen erstellt werden sollten. Über rheologische Untersuchungen dieser thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele sollten deren mechanischen Eigenschaften charakterisiert werden, bevor die Hydrogele in Zellexperimenten auf ihre Zytotoxizität und ihre Beeinflussung der Zelladhäsion hin getestet wurden. Der Einfluss der Kationik und der RGD-Konzentration wurde dabei unabhängig voneinander und in Kombination untersucht.

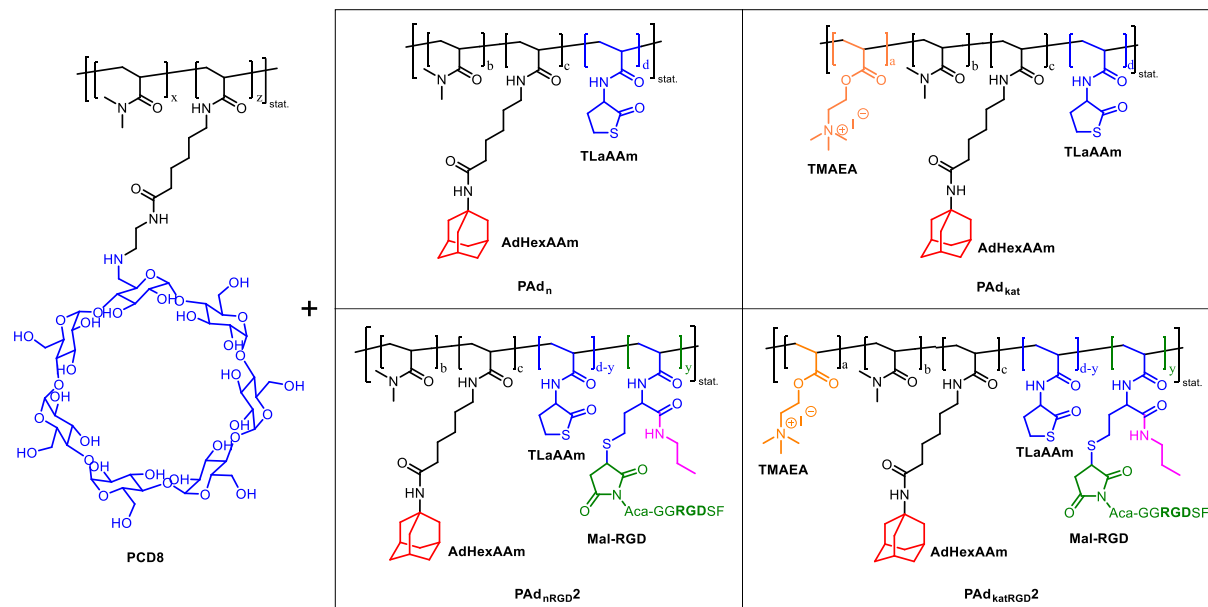


Abbildung 26: Zusammensetzung der vier verschiedenen thiolactonhaltigen Gastpolymere und des Wirtpolymers.

4.2 Synthese der Wirt- und Gastpolymere

Bei der Synthese der Wirt- und der Gastpolymere wurde ein relativ geringer β -CD-beziehungswise Adamantan-Anteil von jeweils 2 mol% angestrebt, da die Wirt-Gast-Hydrogele mit geringerer Vernetzungsdichte in den vorausgegangenen Zellexperimenten in Kapitel 3.4 eine homogenere Struktur und eine gleichmäßigere dreidimensionale Zellverteilung zeigten.

4.2.1 Synthese der Wirtpolymere

Die Darstellung der Wirtpolymere erfolgte in Anlehnung an die in Kapitel 3 genutzte Synthesevorschrift, lediglich der letzte Syntheseschritt, die polymeranaloge Kupplung von β -CD-EDA sollte an dieser Stelle optimiert werden. Das Ziel der Optimierung war es, das Aktivierungsreagenz HBTU zu ersetzen, da HBTU bei der Kupplungsreaktion das Nebenprodukt 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) bildet, welches einen Einschlusskomplex mit β -CD eingehen kann und dadurch schlecht aus dem Polymer zu entfernen ist. Überreste an HOBt würden sich wie die meisten niedermolekularen Verbindungen negativ auf die Biokompatibilität der Polymere auswirken. Daher wurden im Folgenden mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) alternative Aktivierungsreagenzien getestet, deren Nebenprodukte sich schlechter in die β -CD-Kavität einlagern. Mit diesen Reagenzien wurde die Kupplungsreaktion in kleinen Ansätzen

unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt, um den gewünschten Funktionalisierungsgrad des Wirtpolymers zu erreichen. Die dabei erhaltenen Test-Polymere werden im Folgenden als **TPCD_x** (x = Testnummer) bezeichnet. Zur Ermittlung der Zusammensetzung der Test-Polymere wurden ¹H-NMR-Spektren der Polymere aufgenommen und diese wie in Kapitel 3 beschrieben ausgewertet. Da der gewünschte Funktionalisierungsgrad des β-CD-Polymers bei 2 mol% lag, wurde ein P(DMA-co-HexAAm)-Präpolymer mit einem DMA/HexAAm-Verhältnis von 97,5/2,5 verwendet (**PPCD8**). Der HexAAm-Anteil wurde in einem leichten Überschuss eingesetzt, da in vorherigen Experimenten beobachtet wurde, dass die Immobilisierung von β-CD nicht quantitativ ablief. Die über GPC-Methoden ermittelte mittlere molare Masse \bar{M}_n und die Dispersität \bar{D} von **PPCD8** liegen bei $\bar{M}_n = 246700$ g/mol und $\bar{D} = 1,90$. Die zur Optimierung der β-CD-Immobilisierung getesteten Reaktionsbedingungen und die erhaltenen Zusammensetzungen der Test-Polymere sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Ein Nachteil der Verwendung der Aktivierungsreagenzien EDC und DCC im Gegensatz zu HBTU ist das erhöhte Auftreten von Nebenreaktionen, denn bei der Aktivierung der Carbonsäuren mit den Carbodiimiden bildet sich ein hochreaktiver *O*-Acylisoharnstoff als Zwischenstufe, der spontan zu dem inaktiven *N*-Acylharnstoff racemisieren kann. Diese Nebenreaktion kann allerdings durch den Zusatz von *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) verhindert werden, denn NHS reagiert mit dem Aktivester *O*-Acylisoharnstoff zu einem weiteren aktiven Ester, der nicht racemisiert und ein ausreichend hohes Aktivierungsniveau für die Amidkupplung besitzt.²⁵⁴⁻²⁵⁶

Eine weitere Problematik bei der Verwendung von DCC ist dessen schlechte Wasserlöslichkeit, wodurch es bei der Aufreinigung der Polymere über Dialyse schwer zu entfernen ist. Die Verwendung von DCC wurde aus diesem Grund und, da es keine bessere Immobilisierungsrate von β-CD erbrachte als EDC (**TPCD4**), nicht weiter verfolgt. EDC hingegen weist ebenso wie die daraus bei der Reaktion gebildete Abgangsgruppe *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)harnstoff (EDU) eine bessere Wasserlöslichkeit auf und lässt sich folglich über eine Dialyse gegen Wasser eliminieren.

Als Lösungsmittel eignen sich für die Umsetzung zu *O*-Acylisoharnstoff vor allem apolare Lösungsmittel, viele polare aprotische Lösungsmittel können jedoch auch in Betracht gezogen werden. Da das hydrophile Präpolymer und β-CD-EDA in den meisten apolaren Lösungsmitteln nicht löslich sind, wurde an dieser Stelle wasserfreies DMF als Lösungsmittel eingesetzt, denn DMF ist dazu in der Lage, alle verwendeten Reagenzien zu lösen und wurde bereits für Kupplungen mit Carbodiimiden eingesetzt.^{257,258}

Tabelle 12: Die verwendeten Reaktionsbedingungen zur Optimierung der polymeranalogen β -CD-Kupplung in DMF als Lösungsmittel bei einer Reaktionszeit von 24 h sowie die Zusammensetzungen der erhaltenen Test-Polymere P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm) (**TPCD1-TPCD8**).

Polymer	Reaktionsbedingungen ^a							Zusammensetzung DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm / mol%	
	PPCD8 ^b	β -CD-EDA	DIPEA	EDC	NHS	DCC	<i>T</i>	theor. ^c	exp. ^d
	/ Äq.	/ Äq.	/ Äq.	/ Äq.	/ Äq.	/ Äq.	/ °C		
TPCD1	1	1,2	3,0	2,0	2	0	RT	97,5/2,0/0,5	97,5/0,7/1,7
TPCD2	1	1,2	3,0	2,0	2	0	50	97,5/2,0/0,5	97,5/0,9/1,5
TPCD3	1	5,0	3,0	2,0	2	0	RT	97,5/2,0/0,5	97,5/0,5/1,9
TPCD4	1	1,2	3,0	0,0	2	2	RT	97,5/2,0/0,5	97,5/0,5/1,9
TPCD5	1	5,0	3,0	8,0	8	0	RT	97,5/2,0/0,5	97,5/1,6/0,9
TPCD6	1	1,2	1,5	1,5	0	0	RT	97,5/2,0/0,5	97,5/0,4/2,0
TPCD7	1	5,0	13,0	8,0	8	0	50	97,5/2,0/0,5	97,5/1,0/1,5
TPCD8	1	10,0	26,0	16,0	16	0	50	97,5/2,0/0,5	97,5/1,7/0,8

^a Äquivalente bezogen auf 1 Äq. HexAAm; ^b Zusammensetzung des Präpolymers **PPCD8**: DMA/HexAAm = 97,5/2,5; ^c gewünschte Polymerzusammensetzung; ^d bestimmt durch ¹H-NMR-Spektroskopie.

Zusätzlich wurde DIPEA als Base zu der Reaktion hinzugegeben, um die Deprotonierung der Aminogruppe von β -CD-EDA sicherzustellen, die eine Voraussetzung für den nukleophilen Angriff am Aktivester ist.

Der Vergleich der Test-Polymere **TPCD1** und **TPCD2** zeigt eine Erhöhung der Immobilisierung durch Verwendung einer Reaktionstemperatur von 50 °C anstelle von Raumtemperatur. Die höchste Immobilisierungsrate wies **TPCD8** auf, das mit einem 10-fachen Überschuss an β -CD-EDA und einem entsprechenden Überschuss der anderen Reagenzien synthetisiert wurde.

Mit den für **TPCD8** verwendeten Reaktionsbedingungen wurde anschließend ein großer Reaktionsansatz durchgeführt, der für die Synthese der Hydrogele genutzt werden sollte. Die Zusammensetzung des dabei erhaltenen Wirtpolymers **PCD8** wurde aus dem in Abbildung 27 gezeigten ¹H-NMR-Spektrum über das Verhältnis des Signals bei 4,48 ppm, das dem Proton **16** des β -CD zugeordnet wurde, zu dem DMA-Signal bei einer chemischen Verschiebung von

2,79 ppm ermittelt. Dabei konnte ein DMA/ β -CDHexAAm-Verhältnis von 97,5/2,5 und damit ein quantitativer Umsatz der Carbonsäuregruppen des Präpolymers festgestellt werden.

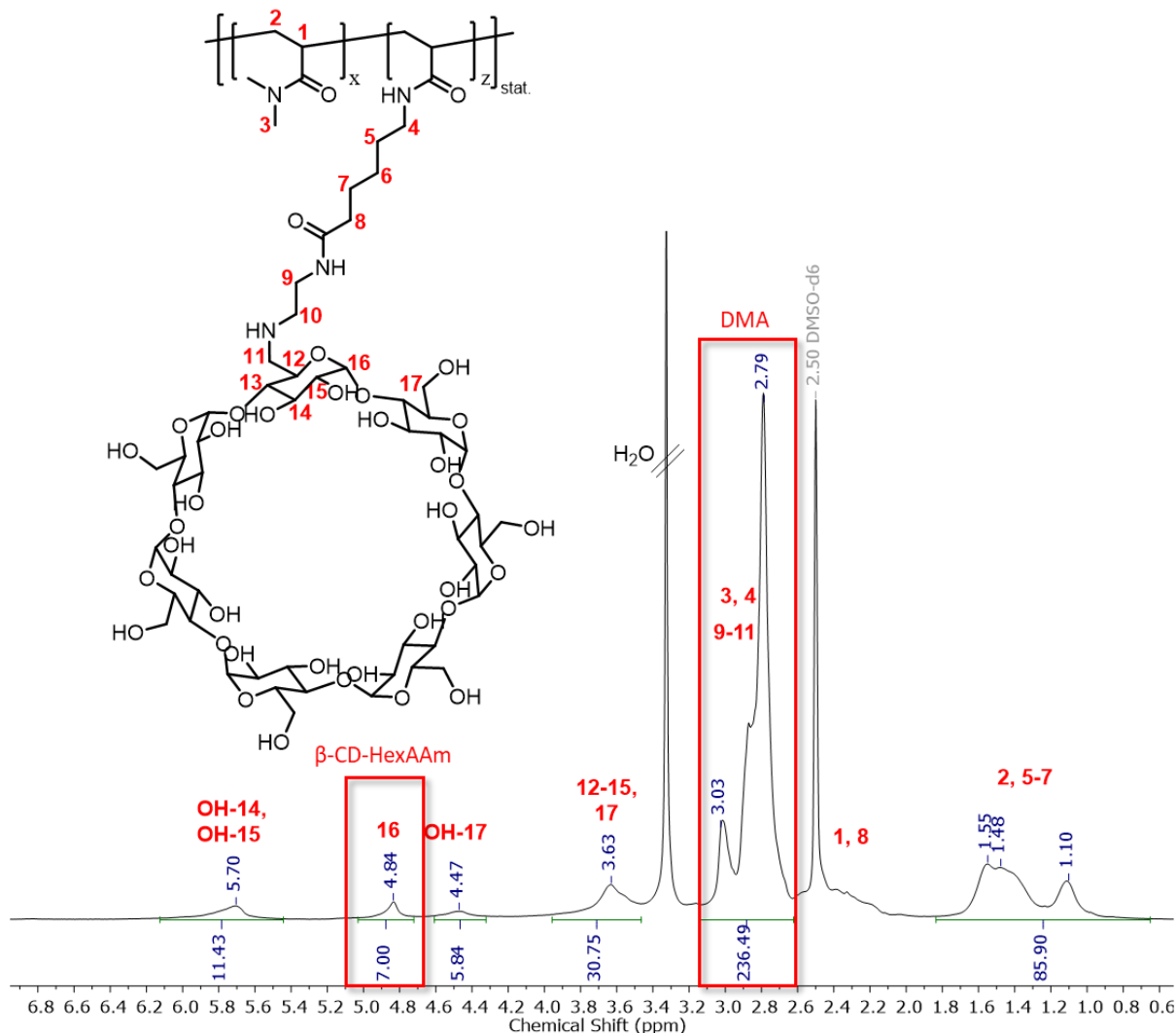


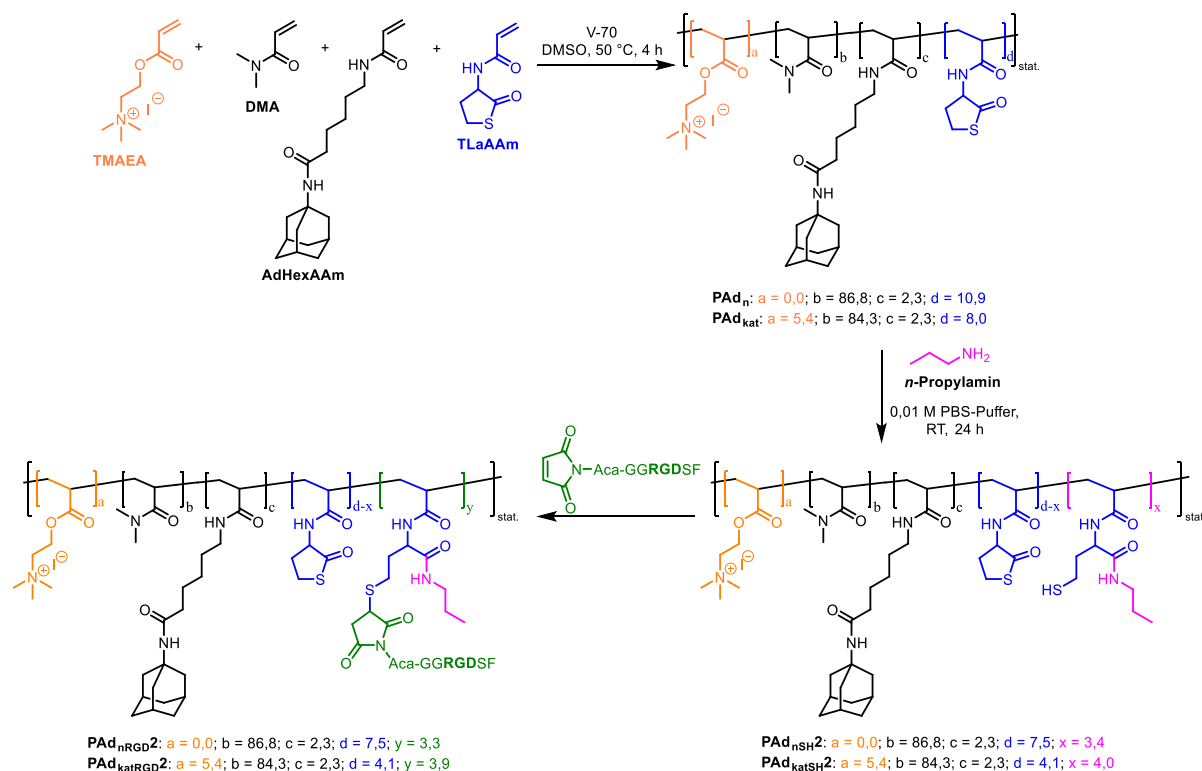
Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Wirtpolymers **PCD8** in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

Die analytischen Daten des Präpolymers **PPCD8** und des Wirtpolymers **PCD8** sind zusammen mit den analytischen Daten der Adamantan-Polymeren in Tabelle 15 bereitgestellt.

4.2.2 Synthese der thiolactonhaltigen Gastpolymere

Die thiolactonhaltigen Gastpolymere wurden durch eine freie radikalische Polymerisation der Monomere DMA, AdHexAAm, *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton (TLAAm) und TMAEA in zwei verschiedenen Zusammensetzungen, einmal mit und einmal ohne TMAEA, dargestellt. Ein Teil der Produktmenge dieser beiden Copolymeren wurde weiter funktionalisiert, indem die Thiolactonringe des TLAAm über eine Aminolyse geöffnet und die dabei entstehenden Thiole mit den Maleimid-funktionalisierten RGD-Peptiden umgesetzt wurden. Schema 11 zeigt einen

Überblick über die gesamte Syntheseroute, die im Folgenden in ihren Teilschritten erläutert wird.



Schema 11: Syntheseroute zur Darstellung der neutralen und kationischen Gastpolymere ohne RGD-Peptid (**PAd_n** und **PAd_{kat}**) sowie der neutralen und kationischen Gastpolymere mit RGD-Peptid (**PAd_nRGD2** und **PAd_{kat}RGD2**) über eine Aminolyse als Zwischenschritt.

Die für den ersten Schritt, die radikalische Polymerisation, benötigten Monomere AdHexAAm und TMAEA wurden analog zu den in Kapitel 3 beschriebenen Synthesevorschriften dargestellt. TLaAAm wurde mithilfe einer SCHOTTEN-BAUMANN-Reaktion nach REINIKÉ *et al.* aus Homocystein-Thiolacton-Hydrochlorid und Acryloylchlorid hergestellt.²⁵⁹ Der Reaktion wurde zur Deprotonierung des Homocystein-Thiolacton-Hydrochlorids und zur Neutralisation der bei der Reaktion entstehenden Salzsäure ein Überschuss an Natriumhydrogencarbonat zugesetzt. Nach Aufreinigung des Produktes über Extraktion und Umkristallisation wurde es in 30 %iger Ausbeute erhalten und dessen Struktur und Reinheit über ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie nachgewiesen (Abbildungen A19 und A20).

Die Polymerisation der Monomere erfolgte in DMSO als Lösungsmittel, da alle verwendeten Monomere und der Initiator in diesem Lösungsmittel löslich sind. Als Initiator wurde 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70) bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C verwendet. Unter diesen Polymerisationsbedingungen wurden zwei Adamantan-Copolymere

synthetisiert, eines davon sollte kein TMAEA enthalten und folglich neutral geladen sein, deswegen wird es im Folgenden als **PAd_n** bezeichnet. Das zweite Adamantan-Copolymer sollte 5 mol% TMAEA enthalten und somit kationisch geladen sein, daher erhält es die Bezeichnung **PAd_{kat}**. Beide Adamantan-Copolymere sollten einen identischen Vernetzeranteil von 2 mol% AdHexAAM besitzen, um eine gute Vergleichbarkeit der Polymere und damit die Identifikation des TMAEA-Einflusses auf das Zellverhalten zu ermöglichen. Die Polymere wurden nach erfolgter Polymerisation und Aufreinigung über Dialyse per ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 28). Dabei wurde das Signal bei 2,63-3,11 ppm zur Berechnung des DMA-Anteils verwendet, während das Signal bei 4,48 ppm zur Bestimmung des TLaAAM-Anteils herangezogen wurde. Das Signal bei 3,67 ppm, das der CH₂-Gruppe in Position 4 von TMAEA zugeordnet werden konnte, wurde zur Bestimmung des TMAEA-Gehalts im Copolymer verwendet. Bei den kationischen Copolymeren überlagerte jedoch das Signal von TLaAAM bei 4,48 ppm mit dem Signal der CH₂-Gruppe in Position 3 von TMAEA. Um den TLaAAM-Anteil bestimmen zu können, wurde deshalb zunächst der TMAEA-Anteil über das Signal bei 3,67 ppm bestimmt und anschließend das nun bekannte überlagernde TMAEA-Signal von dem TLaAAM-Signal bei 4,48 ppm abgezogen. Für die Bestimmung des AdHexAAM-Anteils wurden die Signale bei 1,90 ppm und 1,98 ppm verwendet, die den Protonen 12 und 13 der Adamantylgruppe sowie der CH₂-Gruppe in Position 11 der Hexylkette zugeordnet werden konnten. Die Ergebnisse zeigen einen erfolgreichen Einbau aller Monomere. Außerdem lag der AdHexAAM-Anteil in beiden Polymeren wie gewünscht bei mit 2,3 mol% demselben Wert. Darüber hinaus wurden die Polymere über GPC-Messungen untersucht. Die Messungen ergaben für die Polymere **PAd_n** und **PAd_{kat}** mittlere molare Massen, die mit 135300 g/mol und 126900 g/mol nah beieinander liegen, was ebenfalls zu einer guten Vergleichbarkeit der beiden Polymere führt. Die über die GPC-Messungen erhaltenen Dispersitäten weisen mit $D = 5,47$ für **PAd_n** und $D = 2,80$ für **PAd_{kat}** zwar größere Differenzen auf, liegen aber im Rahmen der typischen Werte einer freien radikalischen Polymerisation. Die Zusammensetzungen sowie die GPC-Ergebnisse der beiden thiolactonhaltigen Adamantan-Polymere sind zusammen mit den analytischen Daten der nachfolgend beschriebenen Polymere in Tabelle 15 bereitgestellt.

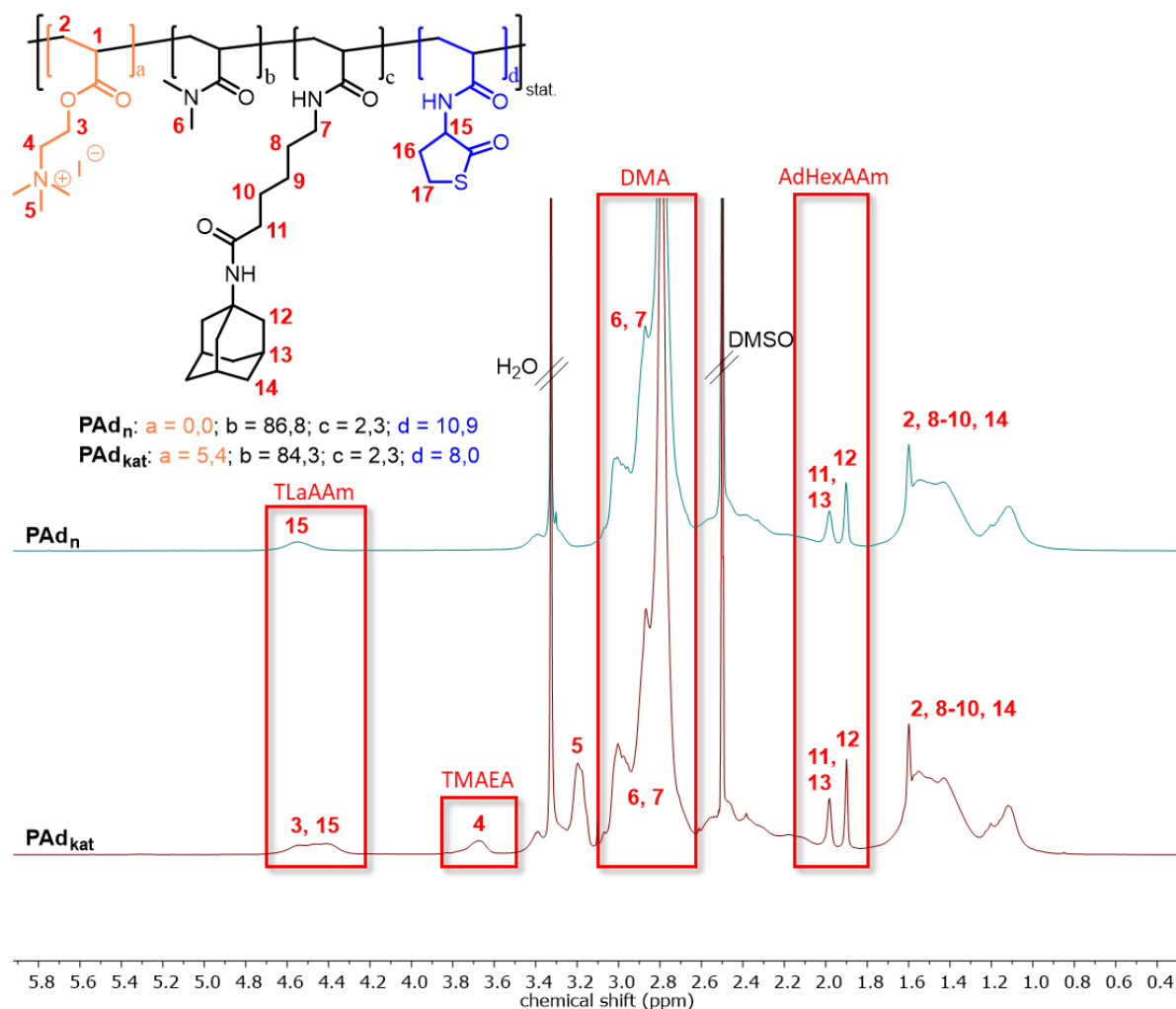
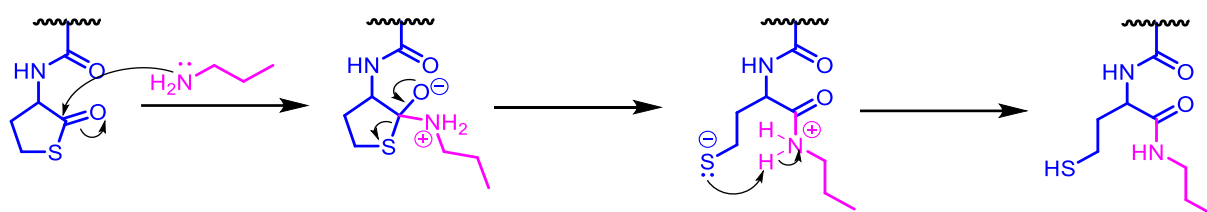


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektren der neutralen und kationischen thiolactonhaltigen Gastpolymere PAd_n (600 MHz) und PAd_{kat} (400 MHz) in $\text{DMSO}-d_6$ mit der Markierung der Signale, über die die Zusammensetzung ermittelt wurde.

4.2.2.1 Polymeranaloge Öffnung des Thiolactonrings

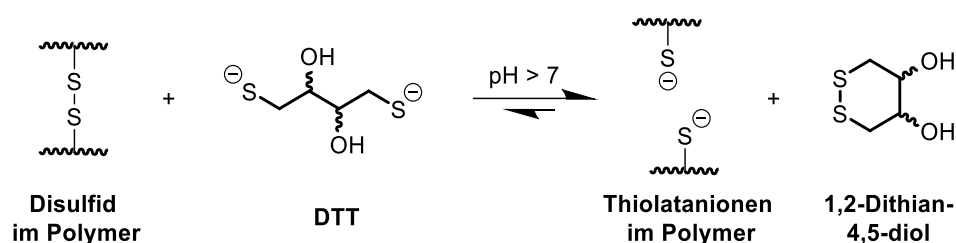
Im nächsten Schritt wurde ein Teil der Produktmenge von PAd_n und PAd_{kat} für die Peptidfunktionalisierung vorbereitet, indem die Thiolactoneinheiten der Polymere über eine Aminolyse mit *n*-Propylamin ringgeöffnet wurden. Die dabei freigesetzten Thiolgruppen können später mit Maleimid-funktionalisierten Peptiden in einer Thiol-MICHAEL-Addition umgesetzt werden.^{35,36} Das Aminolysereagenz wurde auf der Grundlage der Arbeiten von ESPEEL *et al.* ausgewählt. Da ESPEEL *et al.* in einem Screening verschiedener primärer Amine zur Thiolactonringöffnung die Amine mit linearen Alkylketten als reaktivste Aminolysereagenzien herausstellten, sollten diese auch in dieser Arbeit Anwendung finden.²⁶⁰ Die Alkylkette des hier verwendeten Amins sollte möglichst kurz sein, um die Wasserlöslichkeit des Polymers nicht zu reduzieren, gleichzeitig sollte der Alkylrest so lang

sein, dass das Signal der endständigen CH_3 -Gruppe im $^1\text{H-NMR}$ ausreichend hochfeldverschoben ist, um nicht mit dem Signal des Polymerrückgrats zu überlagern und somit für die Ermittlung der Polymerzusammensetzung zur Verfügung zu stehen. Da *n*-Propylamin diese Anforderungen erfüllt, ist es hier als Aminolysereagens zum Einsatz gekommen.²⁶⁰ Die Aminolysereaktion wurde in PBS (*phosphate buffered saline*)-Puffer, der einen physiologischen pH-Wert von 7,4 aufweist, durchgeführt. Der PBS-Puffer sollte den pH-Wert während der Reaktion stabilisieren und so die Protonierung von *n*-Propylamin verhindern, da dieses als Nukleophil fungieren und am Carbonylkohlenstoffatom der Thioestergruppe angreifen soll. Der nukleophile Angriff resultiert durch Elektronenpaarverschiebungen in der Öffnung des Thiolactonrings wie in Schema 12 dargestellt ist.



Schema 12: Mechanismus der polymeranalogen Thiolactonringöffnung mit *n*-Propylamin.

Zu den Polymeren PAd_n und PAd_{kat} wurden jeweils 4,4 Äq. *n*-Propylamin pro 100 Monomereinheiten hinzugegeben. Die Ringöffnungsreaktion wurde unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt, da die bei der Reaktion entstehenden Thiolgruppen, dadurch dass sie in der basischen Reaktionslösung deprotoniert vorliegen, eine Nukleophilie aufweisen und in der Gegenwart von Luftsauerstoff zu Disulfiden oxidieren können. Da während der 24-stündigen Reaktion dennoch Sauerstoff in das Reaktionsgefäß gelangen und sich Disulfidbrücken ausbilden können, wurde nach Ablauf der Reaktionszeit, das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) als Spaltreagens hinzugefügt und die Reaktion für weitere 10 min gerührt. Da DTT ein niedriges Redoxpotential besitzt, ist es in der Lage, Disulfide innerhalb weniger Minuten quantitativ zu reduzieren.²⁶¹ Bei der reduktiven Spaltung läuft die in Schema 13 visualisierte Thiol-Disulfid-Austauschreaktion ab, bei der es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, die aufgrund der thermodynamisch günstigen Bildung des Sechsrings 1,2-Dithian-4,5-diol vorwiegend in Richtung der Produktseite verläuft. Da DTT unter den in dieser Arbeit verwendeten leicht basischen Reaktionsbedingungen im deprotonierten Zustand vorliegt, weist es ein noch niedrigeres Redoxpotential auf und ist folglich noch reaktiver.²⁶¹

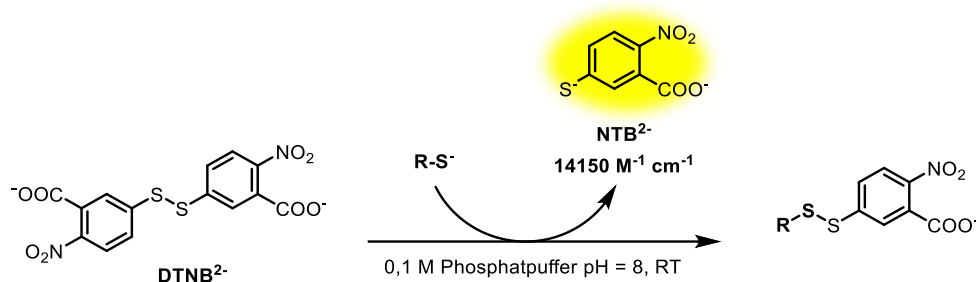


Schema 13: Schematische Darstellung der reduktiven Disulfidsplaltung durch DTT unter basischen Bedingungen.

Um nach Beendigung der Spaltungsreaktion die erneute Bildung von Disulfidbrücken bei der Aufreinigung der Polymere zu verhindern, wurden die Thiole protoniert, indem die Reaktionslösung mit 1 M HCl angesäuert wurde.

Die Aufreinigung erfolgte über eine viertägige Dialyse, in der überschüssiges *n*-Propylamin und DTT entfernt werden sollte. Die Reinheit der im Folgenden als **PAd_nSH** und **PAd_{kat}SH** bezeichneten ringgeöffneten Polymere konnte über die ¹H-NMR-Spektren nachgewiesen werden, denn weder Reste an DTT noch an *n*-Propylamin waren zu erkennen (Abbildungen A21 und A22). Auf die ¹H-NMR-Spektren der Polymere kann zur genauen Bestimmung des Thiolanteils allerdings nicht zurückgegriffen werden, da die Signale der ungeöffneten und geöffneten Thiolactonringe aufgrund von Überlagerungen nicht genau integriert werden können und das Signal der durch die Aminolyse am Polymer gebundenen Propylgruppe sowohl in D₂O als auch in DMSO-*d*₆ aufgrund von Aggregatbildungen ein kleineres Integral aufweist als der Realität entsprechen würde. Die genaue Bestimmung des Thiolgehalt der ringgeöffneten Polymere erfolgte daher mithilfe des ELLMAN's Assays.

Der ELLMAN's Assay ist eine von GEORGE L. ELLMAN veröffentlichte Methode zur Bestimmung der Thiolkonzentration einer Probe. Dabei wird eine Probenlösung mit einer bekannten Probenkonzentration in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 8 erstellt und eine definierte Menge des ELLMAN's Reagenzes 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB²⁻) hinzugegeben. Zur Vermeidung der Oxidation der Thiole durch Luftsauerstoff wurde der Phosphatpuffer zuvor entgast. Innerhalb einer Reaktionszeit von 20 min erfolgt in einer Thiol-Disulfid-Austauschreaktion die Bildung von einem Mol 2-Nitro-5-thiobenzoat (NTB²⁻) pro Mol Thiol (Schema 14).²⁶²



Schema 14: Reaktion des ELLMAN's Reagenzes DTNB mit einer Thiolgruppe bei einem pH-Wert von 8 zu einem Äquivalent NTB^{2-} .²⁶³

Da das 2-Nitro-5-thiobenzoat eine starke gelbe Färbung aufweist, kann es UV-spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 412 nm detektiert werden. Die dabei gemessene Extinktion E_{TNB} kann über das LAMBERT BEER'sche Gesetz in die Konzentration des NTB^{2-} -Anions c_{TNB} , die der Konzentration des Thiols c_{Thiol} entspricht, umgerechnet werden. Dafür werden, wie in der Gleichung 6 beschrieben, der molare Extinktionskoeffizient von NTB^{2-} , der bei niedrigen Konzentrationen einem Wert von $\epsilon_{\text{TNB}} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ entspricht, und die Schichtdicke d der Messküvette benötigt.

$$c_{\text{NTB}^{2-}} = c_{\text{Thiol}} = \frac{E_{\text{NTB}^{2-}}}{\epsilon_{\text{NTB}^{2-}} \cdot d} \quad (6)$$

Anhand der bekannten Probenmenge in der Messküvette, kann aus der ermittelten Thiolkonzentration der Messlösung die Thiolkonzentration der Probe berechnet werden. Über den Vergleich der theoretischen mit der gemessenen Thiolkonzentration kann der Molanteil der Thiole im Polymer ermittelt werden.

Für die hergestellten Polymere PAd_{nSH} und $\text{PAd}_{\text{katSH}}$, bei deren Synthese jeweils 4,4 Äq. *n*-Propylamin pro 100 Monomereinheiten eingesetzt wurden, ergab der ELLMAN's Assay Thiolanteile von 4,0 mol% und 3,2 mol%. Dies entspricht Umsätzen von 91 % bei PAd_{nSH} und 73 % bei $\text{PAd}_{\text{katSH}}$ (Tabelle 13).

Zur weiteren Erhöhung des Thiolgehaltes und zur Angleichung der Thiolgehalte der beiden Polymere wurden die beiden Polymere PAd_{nSH} und $\text{PAd}_{\text{katSH}}$ erneut in PBS-Puffer gelöst und die Ringöffnung nochmals unter denselben Reaktionsbedingungen durchgeführt, lediglich die Zugabe des Aminolysereagenzes *n*-Propylamin wurde angepasst. Zu $\text{PAd}_{\text{katSH}}$ wurden diesmal 3,9 Äq. *n*-Propylamin hinzugegeben, während die Lösung mit PAd_{nSH} nur mit 2,2 Äq. *n*-Propylamin versetzt wurde, dadurch sollte der Thiolgehalt der beiden Polymere nach erfolgter Reaktion ähnlich ausfallen. Die zweite Ringöffnungsreaktion führte laut ELLMAN's Assay bei

dem kationischen Gastpolymer **PAd_{katSH}** lediglich zu einer Erhöhung des Thiolanteils von 3,2 mol% auf 4,0 mol% (**PAd_{katSH2}**, Tabelle 13 Eintrag 2.2). Der zweite Reaktionsansatz verlief folglich weniger effizient als der erste.

Tabelle 13: Die über den ELLMAN'S Assay bestimmten Thiolanteile x_{SH} und zur Ringöffnungsreaktion hinzugegebenen Äquivalente *n*-Propylamin für die kationischen und neutralen thiolactonhaltigen Gastpolymere. Die Reaktionen wurden jeweils in PBS-Puffer (pH = 7,4) bei Raumtemperatur (RT) unter Ausschluss von Sauerstoff mit einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt.

Eintrag	Polymer	Eingesetztes Polymer		<i>n</i> -Propylamin / Äq. ^a	x_{SH} / mol%
		(TMAEA/DMA/AdHexAAm/ TLaAAm/Thiol)			
1.1	PAd_{nSH}	PAd_n (0,0/86,8/2,3/10,9/0,0)		4,4	4,0
1.2	PAd_{katSH}	PAd_{kat} (5,4/84,3/2,3/8,0/0,0)		4,4	3,2
2.1	PAd_{nSH2}	PAd_{nSH} (0,0/86,8/2,3/6,9/4,0)		2,2	3,4
2.2	PAd_{katSH2}	PAd_{katSH} (5,4/84,3/2,3/4,8/3,2)		3,9	4,0

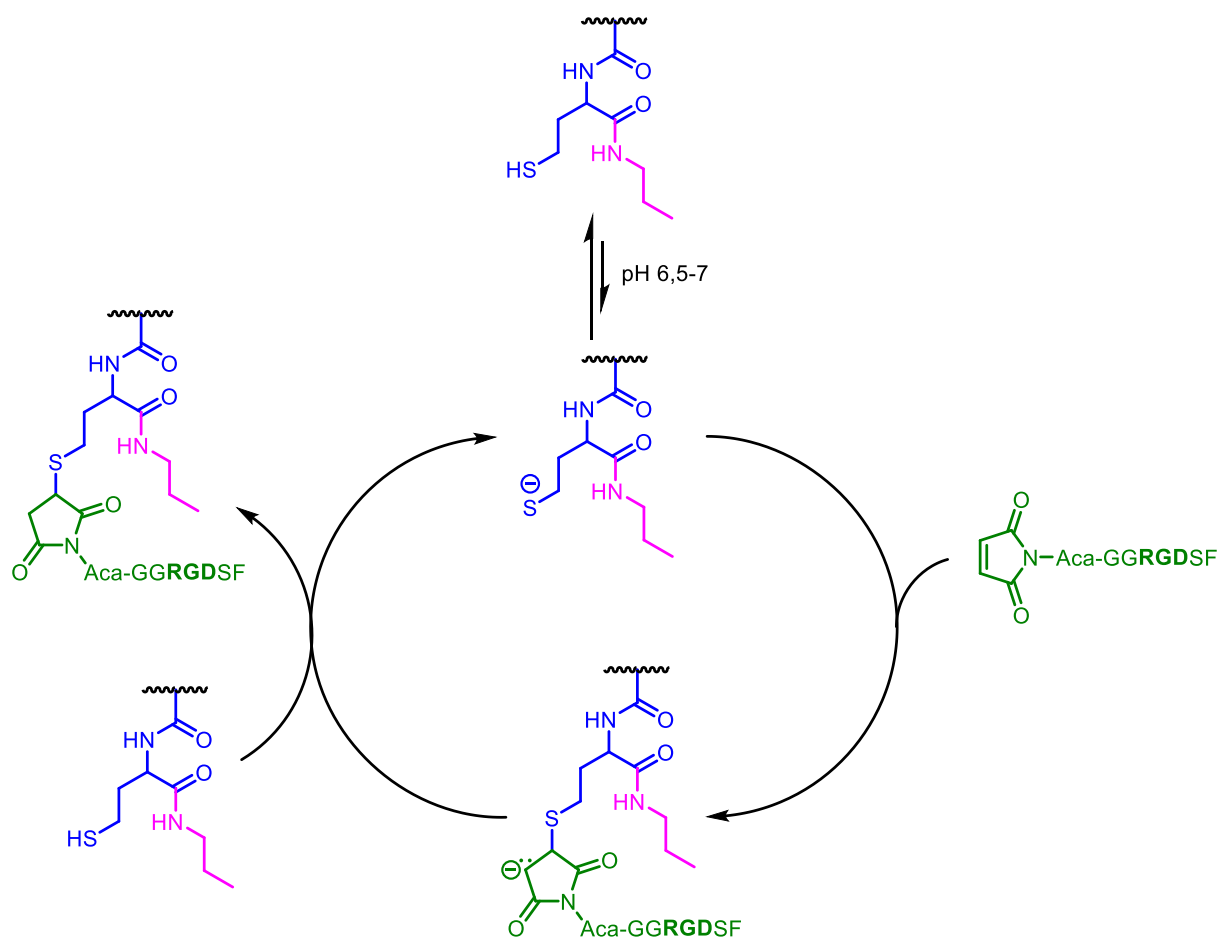
^a bezogen auf 100 Monomereinheiten des eingesetzten Adamantan-Polymers.

Bei dem neutralen Gastpolymer **PAd_{nSH}** führte der zweite Reaktionsansatz zu einer Verringerung des Thiolanteils von 4,0 mol% auf 3,4 mol% (**PAd_{nSH2}**, Tabelle 13 Eintrag 2.1). Dieses Resultat kann durch die Oxidation von Thiolen zu Disulfiden erklärt werden, da die Polymere bei der Aufreinigung mit Luftsauerstoff in Kontakt kommen. Für die Bildung unerwünschter Disulfidbrücken spricht ebenfalls die leichte Erhöhung der mittleren Molmasse von 136400 g/mol bei **PAd_{nSH}** auf 155100 g/mol bei **PAd_{nSH2}** (Tabelle 13). Da sich das ringgeöffnete Polymer **PAd_{nSH2}** immer noch problemlos lösen ließ, hat die Bildung der Disulfidbrücken lediglich zu einer Verlängerung der Polymere, aber nicht zur Vernetzung geführt.

4.2.2.2 Peptidfunktionalisierung der ringgeöffneten Gastpolymere

An den beiden ringgeöffneten Polymeren **PAd_{nSH2}** und **PAd_{katSH2}** erfolgte im nächsten Schritt die Immobilisierung der Maleimid-funktionalisierten RGD-Peptide über eine Thiol-MICHAEL-Addition. Die Reaktion wurde unter Sauerstoffausschluss bei einem pH-Wert von 6,5-7,0 durchgeführt, damit die Thiolgruppen vorwiegend protoniert vorliegen und dadurch weniger stark zur Oxidation neigen. Der pH-Wert wurde allerdings nur leicht sauer eingestellt, da für den Ablauf der Thiol-MICHAEL-Addition die anfängliche Bildung eines Thiolatanions erforderlich ist (Schema 15). Im Allgemeinen wird unter der Thiol-MICHAEL-Addition die

konjugierte 1,4-Addition eines Nucleophiles (MICHAEL-Donor) an das β -Kohlenstoffatom einer α,β -ungesättigten Carbonylverbindung (MICHAEL-Akzeptor) verstanden, wobei das sogenannte MICHAEL-Addukt entsteht. Bei der hier durchgeführten Reaktion stellt das Thiol das Nucleophil dar, das die Doppelbindung des Maleimids, welche aufgrund der elektronenziehenden Wirkung der beiden Carbonylgruppen ein sehr reaktiver MICHAEL-Akzeptor ist, angreift. Dabei bildet sich ein Carbanion als Zwischenprodukt, welches anschließend über die Deprotonierung eines weiteren Thiols in das Thiol-MICHAEL-Addukt übergeht und gleichzeitig ein neues Thiolatanion bildet.²⁶⁴



Schema 15: Mechanismus der Thiol-MICHAEL-Addition zur Peptidimmobilisierung am ringgeöffneten Polymer.²⁶⁵

Die Immobilisierung der Maleimid-funktionalisierten RGD-Peptide wurde in einem 2:1-Gemisch aus Wasser und DMSO durchgeführt, wobei der DMSO-Anteil die Funktion der Löslichkeitsverbesserung der Peptide erfüllte. Zunächst wurde die Umsetzung des neutralen Polymers **PAd_nSH2** zu **PAd_nRGD** durchgeführt. Dabei wurde eine leicht erhöhte Reaktionstemperatur von 45 °C gewählt, um die Beweglichkeit der Polymerketten zu steigern

und dadurch die Zugänglichkeit der Thiolgruppen zu verbessern. Um einen möglichst vollständigen Umsatz der Thiole mit den sterisch anspruchsvollen Peptidliganden zu erreichen, wurde eine Reaktionszeit von 72 h angesetzt. Allerdings beschleunigte die erhöhte Temperatur auch die Bildung von Disulfidbrücken, wodurch sich die Reaktionslösung schon nach einer Reaktionszeit von 30 min als Folge der Polymernetzung zu einer gelartigen Substanz entwickelte. Die Funktionalisierung des kationischen Polymers **PAd_{kat}SH2** mit RGD-Peptiden zu **PAd_{kat}RGD** wurde daher bei Raumtemperatur durchgeführt, führte allerdings nach zweitägiger Reaktionszeit ebenfalls zur Gelierung der Reaktionslösung, was ein eindeutiges Zeichen für einen nicht vollständigen Umsatz der Thiole mit den Peptiden ist. In beiden Reaktionsansätzen wurden die Disulfidbrücken durch die Zugabe von DTT zu Thiolen reduziert und die Polymere nach Ansäuerung mit HCl über eine Dialyse gegen Wasser aufgereinigt. Die Bestimmung des Funktionalisierungsgrads erfolgte sowohl über den ELLMAN's Assay als auch über die ¹H-NMR-Spektroskopie (Abbildungen 29 und A23). Der über den ELLMAN's Assay ermittelte Funktionalisierungsgrad wurde aus der Differenz des Thiolgehaltes vor und nach der Reaktion berechnet.

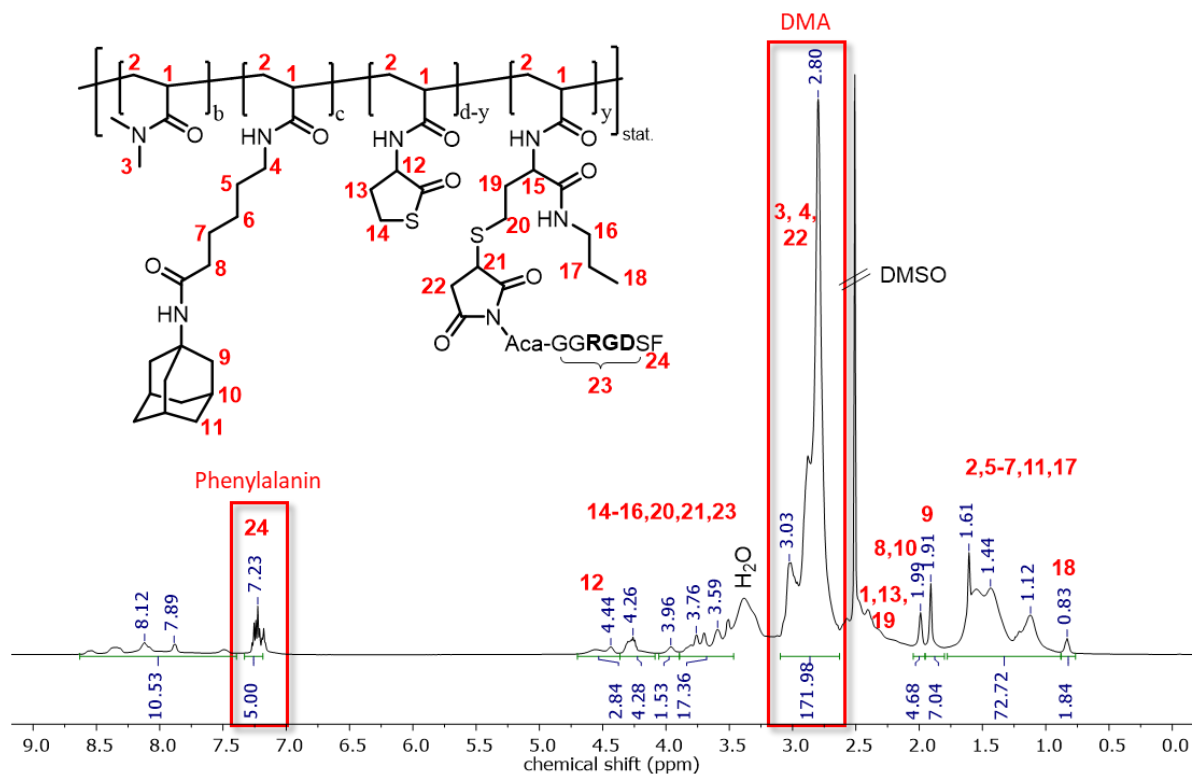


Abbildung 29: Exemplarisches ¹H-NMR-Spektrum des RGD-funktionalisierten Gastpolymers **PAd_nRGD2** in DMSO-d₆ (500 MHz) mit der Markierung der Signale, über die der Molanteil an RGD im Polymer berechnet wurde.

Für die Bestimmung des Funktionalisierungsgrads über die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden, wie beispielhaft in Abbildung 29 gezeigt, das Integral des DMA-Signals bei einer chemischen Verschiebung von 2,64-3,12 ppm nach Abzug von Überlagerungen und das Integral des Aromaten-Signals von Phenylalanin bei 7,19-7,28 ppm ins Verhältnis gesetzt.

Wie in Tabelle 14, die die Analytikergebnisse und die eingesetzten Reaktionsbedingungen zusammenfasst, zu erkennen ist, bestätigen die aus beiden Analytikmethoden erhaltenen RGD-Anteile einander. Im Folgenden wird sich allerdings auf die Resultate des ELLMAN'S Assays bezogen, da diese als genauer erachtet werden, weil es bei der Signalintegration im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu unvermeidbaren Ungenauigkeiten kommt. Der RGD-Anteil von **PAd_nRGD** liegt demnach bei 2,1 mol% und der von **PAd_{kat}RGD** bei 3,2 mol%. Daraus ergibt sich für **PAd_nRGD** trotz der kurzen Reaktionszeit von 30 min bis zur Gelierung ein Umsatz von 62 %. Bei **PAd_{kat}RGD**, welches bei Raumtemperatur nach 48 h gelierte, lag der Umsatz der Thiole bei 80 %.

Tabelle 14: Die über den ELLMAN'S Assay und die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmten Thiolanteile und bei der Thiol-MICHAEL-Addition eingesetzten Polymere sowie hinzugegebenen Äquivalente Mal-Aca-GGRGDSF und verwendeten Reaktionstemperaturen T und -zeiten t für die kationischen und neutralen thiolactonhaltigen Gastpolymere.

Polymer	Eingesetztes Polymer (TMAEA/DMA/AdHexAAm/ TLAAm/Thiol/RGD)	Mal-Aca- GGRGD SF / Äq.	$T /$ °C	$t /$ h	$x_{\text{RGD}} / \text{mol}\%$	
					Ellman	NMR
PAd_nRGD	PAd_nSH2 (0,0/86,8/2,3/7,5/3,4/0,0)	5,0	45	72	2,1 ^a	1,9
PAd_{kat}RGD	PAd_{kat}SH2 (5,4/84,3/2,3/4,1/4,0/0,0)	5,0	RT	72	3,2 ^a	3,1
PAd_nRGD2	PAd_nRGD (0,0/86,8/2,3/7,5/1,3/2,1)	3,0	RT	5	3,3 ^b	3,2
PAd_{kat}RGD2	PAd_{kat}RGD (5,4/84,3/2,3/4,1/0,8/3,2)	1,5	RT	5	3,9 ^b	3,6

^a der ELLMAN'S Assay wurde nach der Aufreinigung der Polymere durchgeführt; ^b der ELLMAN'S Assay wurde mit einer Probe aus der Reaktionslösung nach 3 h Reaktionszeit durchgeführt.

Da bei beiden Polymeren ein vollständiger Umsatz der Thiolgruppen entscheidend ist, um einen möglichst hohen RGD-Anteil am Polymer zu immobilisieren und die Bildung von nicht-gewünschten kovalenten Vernetzungen über Disulfidbrücken im Hydrogel zu vermeiden, wurden beide Polymere erneut in einer zweiten Reaktion umgesetzt. Die aus dieser zweiten Reaktion resultierenden Polymere werden daher als **PAd_nRGD2** und **PAd_{kat}RGD2** bezeichnet. Die Reaktion wurde für beide Polymere bei Raumtemperatur durchgeführt, um die frühzeitige Gelierung zu unterbinden. Außerdem sollte nach einer Reaktionszeit von 5 h ein Überschuss an

Maleimid hinzugegeben werden, um nicht umgesetzte Thiole abreagieren zu lassen, damit keine Gefahr der Disulfidbrückenbildung besteht. Maleimid wurde für diesen Zweck ausgewählt, da es einen sehr reaktiven MICHAEL-Akzeptor darstellt und hydrolysestabil ist im Gegensatz zu Acrylat-basierten MICHAEL-Akzeptoren, die in Zellexperimenten bei pH = 7,4 hydrolysieren und toxische Hydrolyseprodukte bilden können. Außerdem ist Maleimid wasserlöslich, wodurch der Überschuss einfach über eine Dialyse aus der Polymerlösung entfernt werden kann. Die Maleimidmoleküle besitzen aufgrund ihrer Größe eine bessere Zugänglichkeit zu den Thiolgruppen als die sterisch anspruchsvollen Maleimid-funktionalisierten Peptide und sollten daher eine vollständige Umsetzung der Thiole garantieren.

Darüber hinaus wurde das Peptid Mal-Aca-GGRGDSF bei den zweiten Reaktionsansätzen in einem höheren, nämlich zweifachen Überschuss hinzugegeben. Um den Umsatz mit Mal-Aca-GGRGDSF mittels ELLMAN's Assay überprüfen zu können, wurde vor dem Ablauf der fünf-stündigen Reaktionszeit eine Probe aus der Reaktionslösung entnommen und mittels des ELLMAN's Assays analysiert (Tabelle 14, **PAd_nRGD2** und **PAd_{kat}RGD2**). Wichtig war es, vor der Maleimid-Zugabe den Thiolgehalt im Polymer zu bestimmen, um aus der Differenz zum ursprünglichen Thiolgehalt den Anteil gebundener RGD-Peptide berechnen zu können. Da der ELLMAN's Assay bei beiden Polymeren vor dem Ablauf der Reaktionszeit einen Thiolgehalt von 0,0 mol% anzeigte, konnte von einer vollständigen Umsetzung der Thiole mit Maleimid-funktionalisierten RGD-Peptiden ausgegangen werden. Der RGD-Anteil des neutralen Copolymers **PAd_nRGD2** lag demnach bei 3,3 mol% und der des kationischen Copolymers **PAd_{kat}RGD2** bei 3,9 mol%. Der Überschuss an Maleimid wurde dennoch hinzugegeben und über Nacht gerührt, um die vollständige Umsetzung aller Thiolgruppen sicherzustellen. Nach Aufreinigung der beiden peptidhaltigen Copolymere über Dialyse wurde deren Reinheit über die ¹H-NMR-Spektren nachgewiesen. Bei beiden Polymeren ist das typische Maleimidsignal nicht zu erkennen, was die vollständige Entfernung ungebundener Peptidliganden und Maleimide bestätigt.

Die mittlere Molmasse \bar{M}_n von **PAd_nRGD2** wurde über GPC-Messungen ermittelt und liegt mit 220752 g/mol deutlich über der mittleren Molmasse des Präpolymers **PAd_nSH2**, was einen weiteren Nachweis der erfolgreichen Peptidimmobilisierung darstellt. Die mittlere Molmasse \bar{M}_n des kationischen RGD-haltigen Polymers **PAd_{kat}RGD2** konnte wegen dessen schlechter Löslichkeit im GPC-Eluenten nicht bestimmt werden. Die analytischen Daten und Zusammensetzungen aller verwendeten Polymere sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der letztendlich weiterverwendeten Adamantan- und β -CD-Copolymere.

Polymer	Zusammensetzung TMAEA/DMA/AdHexAAm/		\bar{M}_n / Da ^c	D ^c
	TLAAm/Thiol/RGD / mol%			
	theoretisch ^a	experimentell ^b		
PAd_n	0/83/2/10/0/0	0,0/86,8/2,3/10,9/0,0/0,0	135300	5,47
PAd_{kat}	5/83/2/10/0/0	5,4/84,3/2,3/8,0/0,0/0,0	126900	2,80
PAd_{nSH2}	0/83/2/4/6/0	0,0/86,8/2,3/7,5/3,4/0,0	155100	5,06
PAd_{katSH2}	5/83/2/4/6/0	5,4/84,3/2,3/4,1/4,0/0,0	101100	3,01
PAd_{nRGD2}	0/83/2/4/0/6	0,0/86,8/2,3/7,5/0,0/3,3	220752	6,68
PAd_{katRGD2}	5/83/2/4/0/6	5,4/84,3/2,3/4,1/0,0/3,9	- ^d	- ^d
DMA/HexAAm/ β -CDHexAAm / mol%				
PPCD8	97,8/2,2/0,0	97,5/2,5/0,0	246700	1,90
PCD8	97,8/0,2/2,0	97,5/0,0/2,5	- ^d	- ^d

^a gewünschte Zusammensetzung; ^b bestimmt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und ELLMAN's Assay; ^c bestimmt über GPC-Messungen mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluenten und PMMA als Standard; ^d das Polymer war nicht in dem GPC-Eluenten löslich.

Um bei einer nächsten Funktionalisierungsreaktion in nur einem Reaktionsansatz einen vollständigen Umsatz der Thiolgruppen zu generieren, sollte anstelle einer langen Reaktionszeit direkt ein etwas höherer Überschuss an Maleimid-funktionalisierten Peptiden verwendet werden.

4.3 Synthese der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele

Für die Synthese der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele wurden die Wirt- und die thiolactonhaltigen Gastpolymere in einem Massenverhältnis gemischt, in dem die β -CD- und Adamantan-Einheiten im 1:1-Verhältnis vorliegen. Insgesamt wurden, wie in Tabelle 16 gezeigt, sechs verschiedene Hydrogelgruppen bestehend aus jeweils vier Hydrogelen, die sich in ihrer Gesamtpolymerkonzentration unterscheiden (4, 6, 8 und 10 Gew.-%), hergestellt. Die sechs Hydrogelgruppen unterteilen sich in drei Gruppen ohne TMAEA und drei Gruppen mit TMAEA. Von diesen neutralen bzw. kationischen Hydrogelgruppen sollte jeweils eine Hydrogelgruppe keine Peptide enthalten, diese wurden aus den Gastpolymeren **PAd_n** bzw. **PAd_{kat}** und dem Wirtpolymer **PCD8** synthetisiert und werden im Folgenden als **Gn4-10** und **Gkat4-10** bezeichnet. Je eine weitere Hydrogelgruppe sollte 1,5 mol% RGD (**G1,5n4-10** und

G1,5kat4-10) und die dritten Hydrogelgruppen sollten 3,3 mol% RGD (**G3,3n4-10** und **G3,3kat4-10**) enthalten.

Tabelle 16: Zusammensetzung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele mit und ohne Kationik und mit jeweils drei verschiedenen RGD-Anteilen hergestellt in den Gesamtpolymerkonzentrationen β 4, 6, 8 und 10 Gew.-%.

Hydrogel	RGD / mol% ^a	cRGD im Gel / $\mu\text{mol/mL}$	TMAEA / mol% ^a	cTMAEA im Gel / $\mu\text{mol/mL}$	Wirt-polymer	Gast-polymer ^b
Gn4	0,0	0,0	0,0	0,0	PCD8	PAd_n
Gn6	0,0	0,0	0,0	0,0		
Gn8	0,0	0,0	0,0	0,0		
Gn10	0,0	0,0	0,0	0,0		
Gkat4	0,0	0,0	5,4	8,5	PCD8	PAd_{kat}
Gkat6	0,0	0,0	5,4	12,8		
Gkat8	0,0	0,0	5,4	17,0		
Gkat10	0,0	0,0	5,4	21,3		
G1,5n4	1,5	2,4	0,0	0,0	PCD8	PAd_nRGD2:PAd_n 50:50
G1,5n6	1,5	3,6	0,0	0,0		
G1,5n8	1,5	4,8	0,0	0,0		
G1,5n10	1,5	6,0	0,0	0,0		
G3,3n4	3,3	5,0	0,0	0,0	PCD8	PAd_nRGD2
G3,3n6	3,3	7,5	0,0	0,0		
G3,3n8	3,3	10,0	0,0	0,0		
G3,3n10	3,3	12,6	0,0	0,0		
G1,5kat4	1,5	2,4	5,4	8,5	PCD8	PAd_{kat}RGD2:PAd_{kat} 88:12
G1,5kat6	1,5	3,6	5,4	12,8		
G1,5kat8	1,5	4,8	5,4	17,0		
G1,5kat10	1,5	6,0	5,4	21,3		
G3,3kat4	3,3	5,0	5,4	8,5	PCD8	PAd_{kat}RGD2:PAd_{kat} 45:55
G3,3kat6	3,3	7,5	5,4	12,8		
G3,3kat8	3,3	10,0	5,4	17,0		
G3,3kat10	3,3	12,6	5,4	21,3		

^a Gesamtanteil im Gastpolymergemisch; ^b Massenverhältnisse der eingesetzten Gastpolymere.

Um die Peptidkonzentrationen genau einstellen zu können, wurden die RGD-funktionalisierten Gastpolymere **PAd_nRGD2** bzw. **PAd_{kat}RGD2** mit den nicht RGD-funktionalisierten Gastpolymeren

PAd_n bzw. **PAd_{kat}** in den entsprechenden Verhältnissen gemischt. Die RGD-Konzentrationen von 1,5 mol% und 3,3 mol% beziehen sich auf den in der Gastpolymermischung enthaltenen Molanteil an RGD. Die in den Hydrogelen letztendlich enthaltene RGD-Konzentration ist eine andere und verändert sich mit der Gesamtpolymerkonzentration. Gleiches gilt für die TMAEA-Konzentration. Da diese Konzentrationen für die späteren Zellexperimente interessant sind, werden sie in Tabelle 16 aufgelistet.

Die Polymere wurden für die Hydrogelsynthese anders als in Kapitel 3 nicht in Wasser, sondern in PBS-Puffer gelöst, um die rheologischen Charakterisierungen bei demselben pH-Wert wie die 3D-Zellexperimente durchzuführen. Alle Polymere ließen sich gut in PBS-Puffer lösen und wiesen eine geringe Viskosität auf, wodurch sie sich einfach vermischen ließen und die Bildung homogener und klarer Hydrogele ermöglichten. Für die rheologische Charakterisierung wurden die Hydrogele in Duplikaten hergestellt.

4.4 Rheologische Charakterisierung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele

Die rheologische Charakterisierung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele erfolgte erneut über Amplituden-, Frequenz- und Selbstheilungstests. Die gemittelten Amplitudentests der thiolactonhaltigen Hydrogele sind nach Hydrogelgruppen geordnet in Abbildung 30 gezeigt.

Die Amplitudentests zeigen bei allen thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen denselben typischen Verlauf von physikalisch vernetzten Materialien. G' und G'' verlaufen bis zum Erreichen der Nachgebegrenze γ_y linear und parallel zueinander. Die Graphen der 4 Gew.-%igen Hydrogele weisen Schwankungen auf, die auf Messungenauigkeiten des Rheometers zurückzuführen sind, da dieses bei sehr weichen Materialien eine längere Messpunktdauer benötigt, um konstantere Werte zu messen. Eine längere Messdauer würde allerdings zu einer verstärkten Austrocknung der Hydrogele führen und wurde deswegen nicht eingestellt.

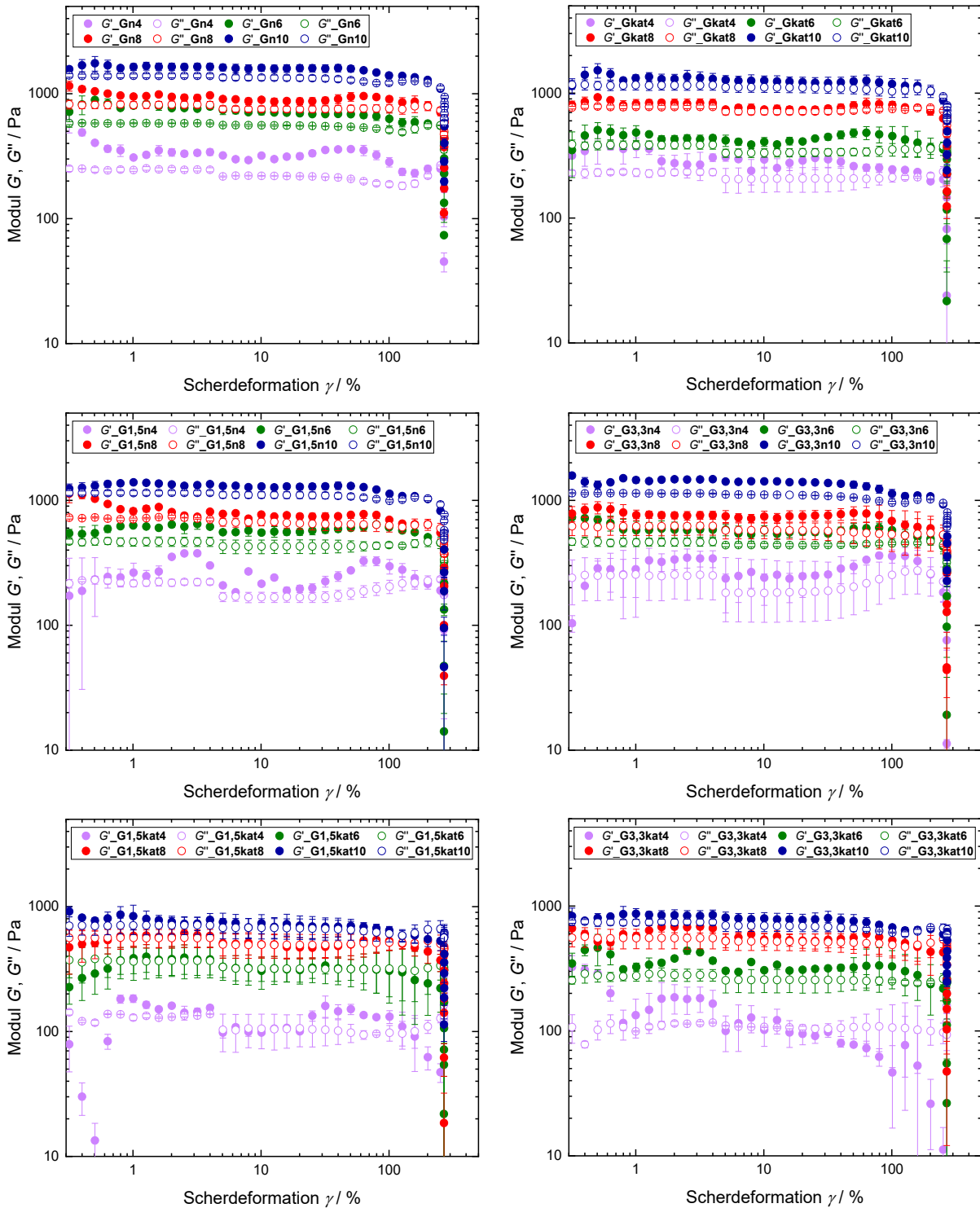


Abbildung 30: Amplitudentests der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele gemessen bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und 25 °C.

Um die Steifigkeit und Elastizität der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele besser vergleichen zu können, wurden die aus den Duplikaten gebildeten Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ im LVE-Bereich der Amplitudentests bestimmt (Tabelle A5) und in den Abbildungen 31A) und 31B) gegen die

Gesamtpolymerkonzentration β aufgetragen. Auch die Nachgebrenzen γ_y , die ein Indikator für die Deformierbarkeit der Hydrogele sind, wurden gegen die Gesamtpolymerkonzentration β aufgetragen (Abbildung 31C).

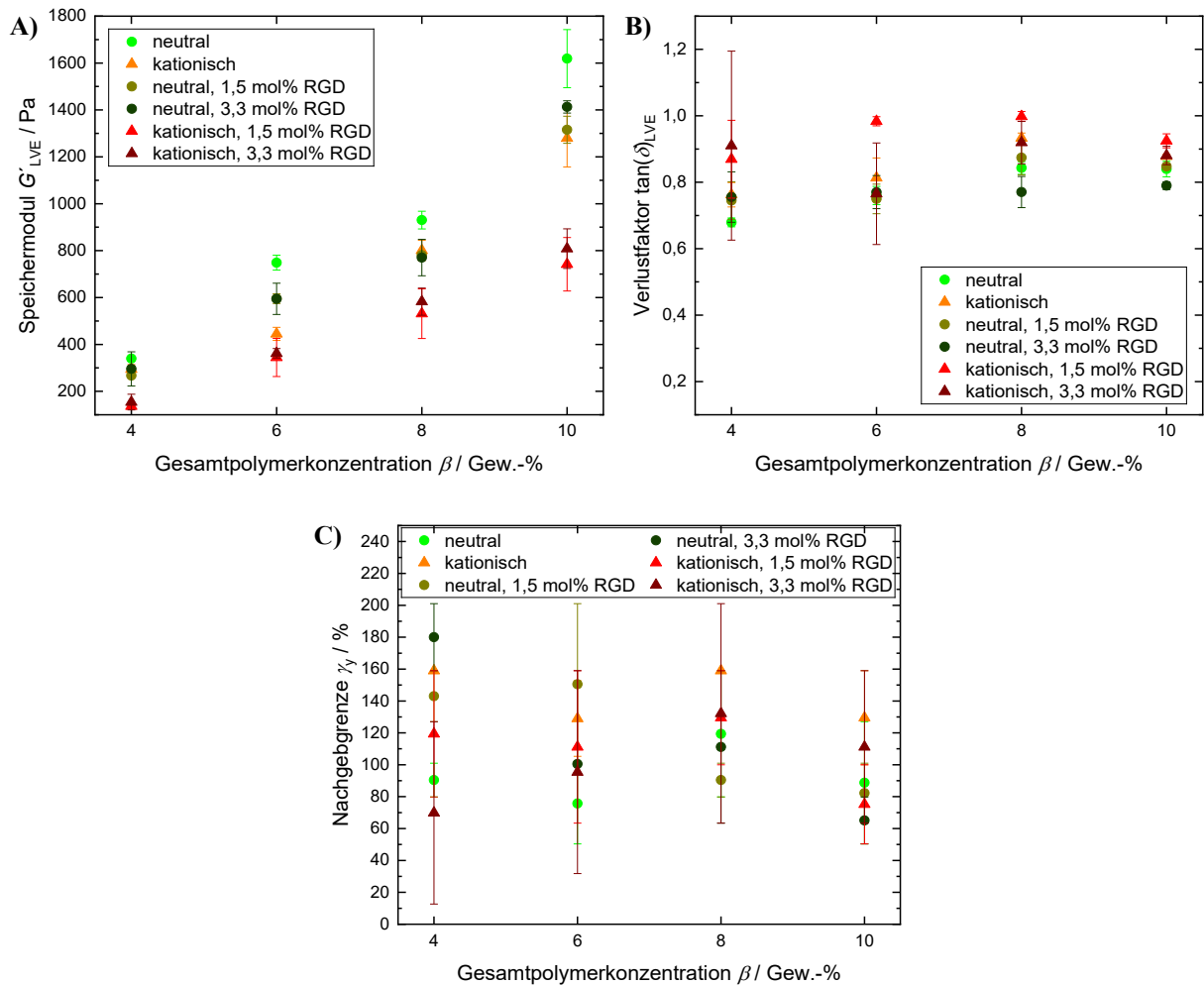


Abbildung 31: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} (A), des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) und der Nachgebrenze γ_y der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele als Funktion der Gesamtpolymerkonzentration β bestimmt aus den Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

In Abbildung 31A) ist innerhalb aller Hydrogelgruppen ein Anstieg des Speichermoduls G'_{LVE} mit der Gesamtpolymerkonzentration zu beobachten, das heißt, die Steifigkeit der Hydrogele konnte, wie gewünscht, über die Gesamtpolymerkonzentration eingestellt werden. Die höchste Steifigkeit wurde für das neutrale, nicht peptidfunktionalisierte Hydrogel **Gn10** mit $G'_{LVE} = 1616 \pm 121$ Pa gemessen. Die niedrigste Steifigkeit besitzt das mit 3,3 mol% RGD-Peptid funktionalisierte, kationische Hydrogel **G3,3kat4** mit $G'_{LVE} = 154 \pm 33$ Pa. Die Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ in Abbildung 31B) zeigen konstante Werte bei steigender Gesamtpolymerkonzentration. Die Elastizität ist folglich, wie auch in Abschnitt 3.2 festgestellt

wurde, unabhängig von der Gesamtpolymerkonzentration. Eine leicht erhöhte Lage der Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ der drei kationischen Hydrogelgruppen im Vergleich zu den neutralen Hydrogelgruppen ist zu erkennen. Auch die Steifigkeiten der kationischen Hydrogele liegen um 11-49 % unterhalb ihrer neutralen Analoga. Diese beiden Beobachtungen zeugen von einer geringeren Vernetzungsdichte der kationischen Hydrogelgruppen.

Der Einbau der RGD-Peptide führt sowohl bei den neutralen als auch bei den kationischen Hydrogelen zu einer Reduktion der Steifigkeit, die analog zu den Beobachtungen in Abschnitt 3.3 mit einer Störung der Wirt-Gast-Vernetzung durch die sterisch anspruchsvollen Peptide, die den Abstand zwischen den Polymerketten vergrößern, erklärt werden kann. Bei den kationischen Hydrogelen ist diese Veränderung allerdings deutlich stärker ausgeprägt, denn die Steifigkeit sinkt durch den Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid (**G1,5kat4-10**) um bis zu 23-55 %, während bei den neutralen Hydrogelen (**G1,5n4-10**) nur eine Reduktion der Steifigkeit um 16-22 % festzustellen ist. Der Grund dafür kann eine Abstoßung zwischen der kationischen Ladung der TMAEA-Einheiten und dem RGD-Peptid sein, dessen Aminosäure Arginin bei einem pH-Wert von 7,4 protoniert vorliegt.

Die Verdoppelung des RGD-Anteils von 1,5 mol% auf 3,3 mol% führt allerdings sowohl bei den neutralen als auch bei den kationischen Hydrogelen zu keinem weiteren Herabsetzen der Steifigkeit. Außerdem wird der Verlustfaktor $\tan\delta_{LVE}$ weder durch den Einbau von 1,5 mol% noch von 3,3 mol% RGD-Peptid verändert. Dies deutet auf einen geringeren Einfluss des Peptideinbaus auf die Vernetzungsdichte als bei den in Kapitel 3.3 beschriebenen Hydrogelen hin, obwohl ein etwas größerer Peptidanteil in die Polymere eingebaut wurde. Die Ursache dafür kann die niedrigere Vernetzungsdichte der thiolactonhaltigen Hydrogele von 2,3 mol% im Gegensatz zu ca. 4 mol% bei den Hydrogelen in Kapitel 3.3 sein, denn in den weniger engmaschig vernetzten Hydrogelen steht den Peptidliganden mehr Raum zur Verfügung und die beiden sterisch anspruchsvollen Moleküle – das β -Cyclodextrin und das RGD-Peptid – treffen seltener aufeinander, wodurch die Wirt-Gast-Vernetzung weniger gestört wird. Außerdem kann der Abstand zwischen den Polymeren durch den Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid anscheinend so weit vergrößert werden, dass auch 3,3 mol% RGD-Peptid ausreichend Raum finden, deshalb kommt es zu keiner weiteren Änderungen der mechanischen Eigenschaften bei der Verdoppelung der Peptidkonzentration. Folglich kann der Einfluss der Erhöhung der Peptidkonzentration von 1,5 mol% auf 3,3 mol% in den Zellexperimenten unabhängig von den mechanischen Eigenschaften der thiolactonhaltigen Hydrogele ausgewertet werden.

Bei einem Vergleich der Steifigkeiten und Elastizitäten der vier thiolactonhaltigen Hydrogele **Gkat4-10** mit den Werten der vier Wirt-Gast-Hydrogele **G1-G4** ohne Thiolacton aus Abschnitt 3.2, die eine etwas höhere Vernetzungsdichte von 3,1 mol% aufweisen, wird deutlich, dass die Werte ähnlich sind, lediglich das 10 Gew.-%ige Hydrogel **G4** zeigt eine deutlich niedrigere Steifigkeit als das 10 Gew.-%ige thiolactonhaltige Hydrogel **Gkat10**. Auch die Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ der beiden Hydrogelsysteme liegen in einem ähnlichen Bereich. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Vernetzungsdichte der Hydrogele **G1-G4** mit 3,1 mol% oberhalb derer der thiolactonhaltigen Hydrogele mit 2,3 mol% liegt, können die thiolactonhaltigen Hydrogele als steifer und elastischer bezeichnet werden. Ein Grund dafür kann eine effizientere Vernetzung der thiolactonhaltigen Hydrogele aufgrund ihrer einfacheren Mischbarkeit und homogeneren Struktur sein.

Die Nachbegrenzen der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele liegen bei Scherdeformationen zwischen 65 % und 180 % und die Werte aller sechs Hydrogelgruppen schwanken mit steigender Gesamtpolymerkonzentration ohne erkennbares Muster. Auch der Vergleich der Hydrogelgruppen hinsichtlich der Ladungen lässt kein Muster erkennen, was damit begründet werden kann, dass die Nachbegrenzen durch die Vernetzungsdichten der Hydrogele beeinflusst werden. Da die Vernetzungsdichten der Hydrogele jedoch ähnlich sind, wird kein klarer Trend vorgegeben.

In Abbildung 32 sind die Graphen der Frequenztests der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele den Hydrogelgruppen nach sortiert dargestellt. Sie zeigen bei allen sechs Hydrogelgruppen eine Frequenzabhängigkeit von G' und G'' , die für eine dynamische Vernetzung spricht. Außerdem weisen alle Graphen einen Sol-Gel-Übergang auf, deren zugehörige Frequenzen f_{co} in Tabelle 17 aufgelistet sind.

Die Frequenzen der Sol-Gel-Übergänge zeigen bei allen sechs Hydrogelgruppen keine Veränderung in Abhängigkeit der Gesamtpolymerkonzentration β . Das heißt, die Erhöhung der Polymerkonzentration führt zu keiner Änderung der Polymerbeweglichkeit in den Hydrogelen.

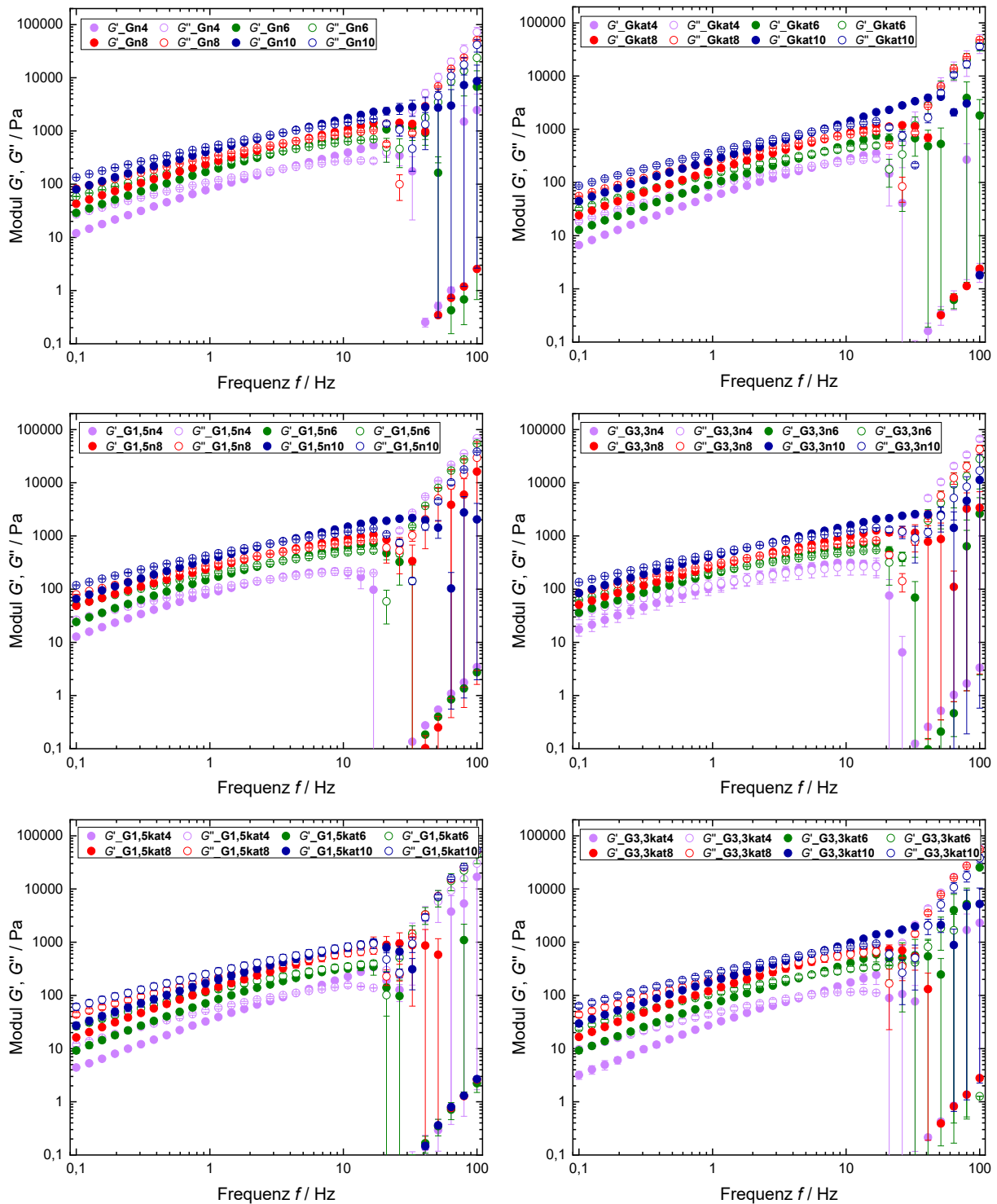


Abbildung 32: Frequenztests der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C.

Bei einem Vergleich der Sol-Gel-Übergänge in Abhängigkeit der Ladung der Hydrogele zeichnet sich eine leichte Verschiebung der Sol-Gel-Übergänge der kationischen Hydrogele zu höheren Frequenzen ab, welche ebenso wie die niedrigere Steifigkeit und Elastizität für eine geringere Vernetzung und daher höhere Beweglichkeit der kationischen Polymere spricht. Der

Einbau der RGD-Peptide bewirkt hingegen keine Verschiebung der Sol-Gel-Übergänge, wodurch der in den Amplitudentests festgestellte geringfügige Einfluss der Peptide auf die Vernetzungsdichte bestätigt wird.

Tabelle 17: Die Frequenzen an den Sol-Gel-Übergängen f_{co} ermittelt aus den Frequenztests gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % und 25 °C für die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele.

Gesamtpolymer- konzentration β / Gew.-%	Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} / Hz					
	Gn	Gkat	G1,5n	G3,3n	G1,5kat	G3,3kat
4	3,5 ± 0,2	7,2 ± 0,2	2,8 ± 0,4	1,7 ± 0,1	4,5 ± 0,3	5,3 ± 0,8
6	3,8 ± 0,0	6,4 ± 0,2	3,4 ± 0,3	1,8 ± 0,1	6,4 ± 0,2	6,2 ± 2,3
8	4,4 ± 0,0	7,7 ± 0,1	2,9 ± 0,5	2,1 ± 0,2	7,9 ± 1,5	7,1 ± 0,5
10	3,9 ± 0,3	6,1 ± 0,0	3,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0	11,8 ± 1,8	6,0 ± 0,2

Im Anschluss wurde die Selbstheilung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele analog zu Kapitel 3 untersucht, indem in oszillatorischen Zeitmessungen mit vier Zerstörungs-Erholungs-Zyklen die prozentuale Wiederherstellung des Speichermoduls G' nach der Zerstörung bestimmt wurde. Die Graphen der Selbstheilungstests befinden sich im Anhang (Abbildungen A30-A35) und die daraus berechneten prozentualen Selbstheilungen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Die erhaltenen Werte verdeutlichen für alle thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele eine Fähigkeit zur Selbstheilung, die bei den meisten Gelen nach dem ersten Zyklus oberhalb von 60 % liegt. In den nachfolgenden Zyklen nimmt die Selbstheilung von G' weiter ab.

Innerhalb aller sechs Hydrogelgruppen ist eine Verbesserung der Selbstheilung mit steigender Gesamtpolymerkonzentration zu erkennen, sodass die Selbstheilung aller 10 Gew.-%igen Hydrogele bei über 70 % bis hin zu 85 % liegt. Dieses Muster kann ähnlich wie in Abschnitt 3.2 mit einer schnelleren Wiederherstellung der Wirt-Gast-Komplexe bei höherer Konzentration erklärt werden.

Außerdem zeigen die neutralen Hydrogele eine bessere Selbstheilung als die kationischen Hydrogele. Die beste Selbstheilung konnte bei den vier nicht peptidfunktionalisierten neutralen Gelen **Gn4-10** festgestellt werden, bei denen die Regeneration von G' im ersten Zyklus zwischen 61 ± 4 % (**Gn4**) und 82 ± 3 % (**Gn10**) liegt.

Tabelle 18: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele.

Hydrogel	Selbstheilung von G' / % ^a				
	Zyklus 0	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Gn4	100	61 ± 4	44 ± 5	37 ± 5	34 ± 3
Gn6	100	68 ± 2	51 ± 3	39 ± 5	28 ± 4
Gn8	100	80 ± 4	67 ± 10	54 ± 9	41 ± 11
Gn10	100	82 ± 3	72 ± 8	67 ± 19	63 ± 24
Gkat4	100	40 ± 1	6 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
Gkat6	100	66 ± 4	45 ± 6	31 ± 7	25 ± 7
Gkat8	100	72 ± 0	56 ± 5	48 ± 4	41 ± 1
Gkat10	100	75 ± 3	64 ± 3	57 ± 3	58 ± 1
G1,5n4	100	60 ± 1	47 ± 2	42 ± 1	39 ± 1
G1,5n6	100	59 ± 5	35 ± 11	22 ± 14	17 ± 16
G1,5n8	100	71 ± 5	50 ± 5	42 ± 5	38 ± 7
G1,5n10	100	72 ± 8	57 ± 17	40 ± 22	32 ± 23
G3,3n4	100	43 ± 2	13 ± 5	3 ± 3	1 ± 1
G3,3n6	100	63 ± 9	42 ± 16	31 ± 20	26 ± 23
G3,3n8	100	75 ± 2	65 ± 1	62 ± 3	57 ± 5
G3,3n10	100	85 ± 1	75 ± 3	68 ± 0	64 ± 2
G1,5kat4	100	18 ± 3	2 ± 2	0 ± 0	0 ± 0
G1,5kat6	100	12 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
G1,5kat8	100	59 ± 4	36 ± 8	22 ± 10	15 ± 10
G1,5kat10	100	73 ± 2	58 ± 7	47 ± 6	44 ± 9
G3,3kat4	100	37 ± 20	21 ± 21	18 ± 18	16 ± 16
G3,3kat6	100	31 ± 13	10 ± 10	5 ± 5	5 ± 5
G3,3kat8	100	68 ± 0	50 ± 2	44 ± 7	38 ± 7
G3,3kat10	100	70 ± 5	50 ± 7	40 ± 13	30 ± 15

^a bestimmt über oszillatorische Zeitmessungen bei abwechselnd geringer (0,5 %) und hoher (500,0 %) Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C. Das Speichermodul G' in Zyklus 0 wurde auf 100 % gesetzt und die prozentuale Erholung von G' in den nachfolgenden Zyklen mit geringer Scherdeformation wurde im Verhältnis zu Zyklus 0 berechnet.

Auch durch den Einbau der Peptide wurde die Selbstheilung der neutralen Hydrogele unwesentlich verändert. Lediglich bei **G3,3n4** sank die Selbstheilungsfähigkeit im ersten

Zyklus auf $43 \pm 2 \%$ und ging bis zum vierten Zyklus nahezu vollständig verloren. Bei den kationischen Hydrogelen ist der Einfluss der Peptidfunktionalisierung auf die Selbstheilung größer, besonders bei den Hydrogelen mit geringerer Gesamtpolymerkonzentration wie **G1,5kat4** und **G1,5kat6** ist ein deutlicher Abfall der Selbstheilung zu erkennen. Dieses Ergebnis war unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus den Amplitudentests, in denen ein stärkeres Sinken der Steifigkeit durch den Peptideinbau beobachtet wurde, zu erwarten, da die stärkere Abstoßung zwischen den Polymerketten auch zu einer verlangsamten Wiederherstellung der Wirt-Gast-Komplexe führt.

Die insgesamt dennoch gute Selbstheilung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele war auch makroskopisch zu erkennen, wie in Abbildung 33 visualisiert wurde. Dafür wurde das Hydrogel **Gn8** in dreifacher Ausführung hergestellt. Eines der drei Gele wurde bei der Herstellung rot und eines schwarz eingefärbt, während das dritte seine natürliche leicht gelbliche Färbung behielt.



Abbildung 33: Visualisierung der selbstheilenden Eigenschaften der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele am Beispiel von Hydrogel **Gn8**, welches in Originalfarbe, rot eingefärbt und schwarz eingefärbt hergestellt, dann zusammengeschoben und nach der Selbstheilung auseinandergezogen wurde.

Das Zusammenschieben der drei Hydrogele führte zur Selbstheilung an den Grenzflächen, wodurch sich die drei Gele zu einem Gel zusammenfügten. Die Stabilität der Verknüpfung zwischen den Gelen wurde durch das Auseinanderziehen des Gels verdeutlicht. Darüber hinaus kann in Abbildung 33 die Transparenz des nicht gefärbten Hydrogeles erkannt werden, die eine Grundvoraussetzung für zellbiologische Mikroskopieexperimente ist.

4.5 Mikrostruktur der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele

Zur zusätzlichen Charakterisierung der Mikrostruktur der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele wurden REM-Messungen herangezogen. Exemplarisch wurden die REM-Aufnahmen des Hydrogeles **G3,3kat10** in Abbildung 34 gezeigt. Darin ist eine hochporöse, feinporige Struktur mit bis zu $10 \mu\text{m}$ großen Poren zu erkennen. Diese Porengröße ist für die Nährstoffdiffusion zur Versorgung von Zellen ausreichend.^{205,207}

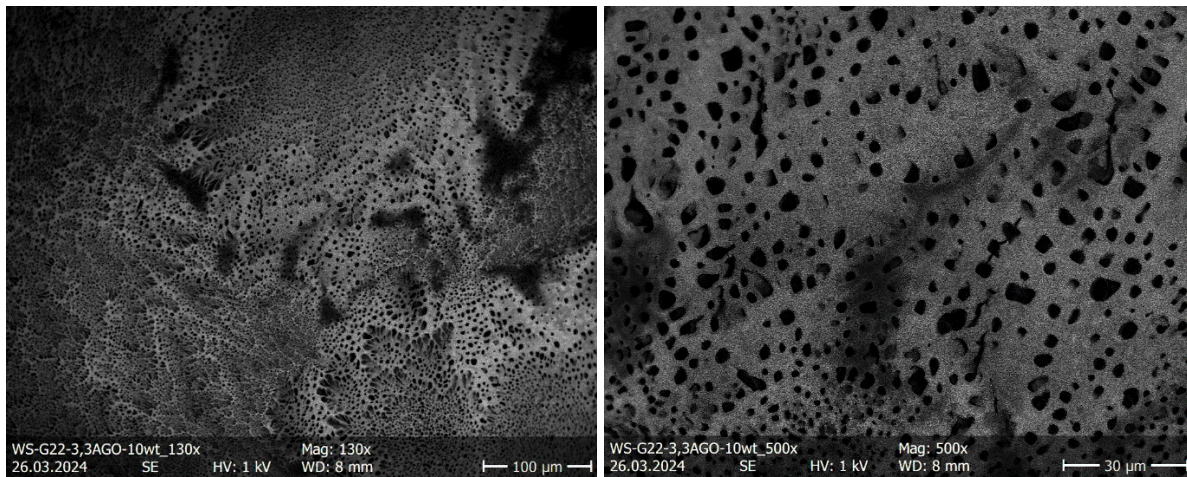


Abbildung 34: REM-Aufnahmen des gefriergetrockneten Hydrogeles **G3,3kat10** in 130-facher (links) und 500-facher (rechts) Vergrößerung.

Verglichen mit den REM-Aufnahmen des ebenfalls 10 Gew.-%igen nicht thiolactonhaltigen Hydrogeles **G4** mit 3,1 mol% Vernetzung in Abbildung 16 des Abschnitts 3.2, weist **G3,3kat10** eine kleinere Porengröße auf. Eine kleinere Porengröße steht meist mit einer höheren Vernetzung in Verbindung.²⁶⁶ Da **G3,3kat10** jedoch geringere Molanteile an β -CD und Adamantan (2,3 mol%) enthält, deutet dies auf eine höhere Vernetzungseffizienz der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele im Vergleich zu den Hydrogelen des Abschnitts 3.2 hin. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Rheologieergebnissen, die eine höhere Steifigkeit und Elastizität der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele im Vergleich zeigten. Zusätzlich kann eine homogenere Porosität der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele verglichen mit den in den Abschnitten 3.2 und 3.3 untersuchten nicht thiolactonhaltigen Hydrogelen mit höheren β -CD- und Adamantan-Anteilen festgestellt werden, die auf eine homogenere Vermischung und Vernetzung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele schließen lässt und somit eine Ursache für die effizientere Vernetzung darstellt. Die homogenere innere Struktur der thiolactonhaltigen Hydrogele kann sowohl aus den niedrigen β -CD- und Adamantan-Anteilen als auch aus der Anwesenheit der Thiolactone resultieren.

Allerdings ist bei der Auswertung der REM-Aufnahmen immer zu beachten, dass die Ergebnisse stark von dem Lyophilisierungsprozess abhängen und daher schwanken können.

4.6 3D-Zellexperimente – Zytokompatibilität und Adhäsionsverhalten in thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen

Da die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der hergestellten thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele eine gute Vergleichbarkeit der Hydrogele bestätigte, sollten die

Hydrogele in 3D-Zellexperimenten bezüglich des Einflusses der RGD-Konzentration, der Ladung und der Gesamtpolymerkonzentration auf das Zellverhalten untersucht werden. Dafür sollten B16F1-Zellen dreidimensional in die Hydrogele eingebettet und anschließend die Zellviabilität und das Adhäsionsverhalten bestimmt werden.

Die Adhäsion von Zellen ist ein Prozess, durch den Signale generiert werden, die die Zelldifferenzierung, den Zellzyklus, die Zellviabilität und die Migration regulieren. Nur wenn Zellen sich in einer Umgebung befinden, die ihnen passende Bedingungen für die Adhäsion bietet, können sie anschließend ihre normalen Zellaktivitäten ausführen.²⁶⁷ Die Adhäsion besteht aus vier Teilschritten und basiert im Wesentlichen auf der Bindung zwischen den Integrinen in der Zellmembran und Peptidliganden in der extrazellulären Matrix. Der erste Schritt der Adhäsion ist die Kontaktaufnahme zu dem Bindungspartner, bei der sich eine erste Integrin-Liganden-Bindung ausbildet. Im zweiten Schritt breitet die Zelle ihre Plasmamembran entlang der Bindungsoberfläche aus und bildet Verlängerungen der Zellmembran (Protrusionen) aus. Der dritte Schritt beinhaltet die Zusammenlagerung von Aktinfasern zu einer sogenannten Stressfaser. Im vierten Schritt bildet sich die Fokaladhäsion aus, bei der es sich um große makromolekulare Komplexe handelt, die die Aktinfilamente des Zytoskeletts mit der EZM verbinden. Die Fokaladhäsion dient mithilfe von Signalproteinen wie Tyrosinkinase und fokalen Adhäsionskinase der Signaltransduktion.^{34,40} Die Zellmigration wird durch die Adhäsion ausgelöst, da fest an der EZM anhaftende Protrusionen neben der Aktinpolymerisation notwendig sind, um eine weitere Ausbreitung der Protrusionen hervorzurufen. Durch das Lösen von Fokaladhäsionen an der hinteren Seite und das Ausbilden neuer Fokaladhäsionen an der vorderen Seite „kriecht“ die Zelle voran (Abbildung 35).^{40,268,269}

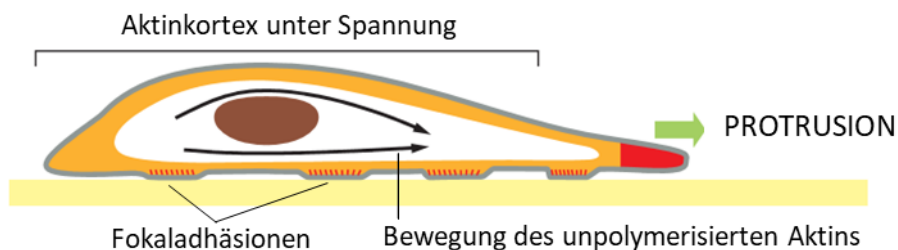


Abbildung 35: Ausbildung einer Protrusion bei einer adhären Zelle.²⁶⁹

Da die Ausbreitung der Zellen und die Protrusionen im Durchlichtmikroskop sichtbar sind, wurden für die Untersuchung der Adhäsion in dieser Arbeit Durchlichtaufnahmen über 585 μm der verschiedenen Hydrogele in Z-Richtung aufgenommen und die Zellen mit entsprechender Morphologie gezählt. Dabei wurden alle Zellen, die Protrusionen ausgebildet haben –

unabhängig von der Anzahl und Länge der Protrusionen – als adhärenente Zellen betrachtet. Ein Ausschnitt einer Durchlichtaufnahme des Hydrogels **G1,5kat4**, in der die adhärenente Zellen gelb markiert sind, ist in Abbildung 36 beispielhaft gezeigt. Die Zellen, die keine Protrusionen ausgebildet haben, zeigen eine runde Morphologie. Außerdem ist eine homogene Struktur des Hydrogels zu erkennen. Aufnahmen aus den übrigen thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen sind dem Anhang zu entnehmen (Abbildungen A43-A45).

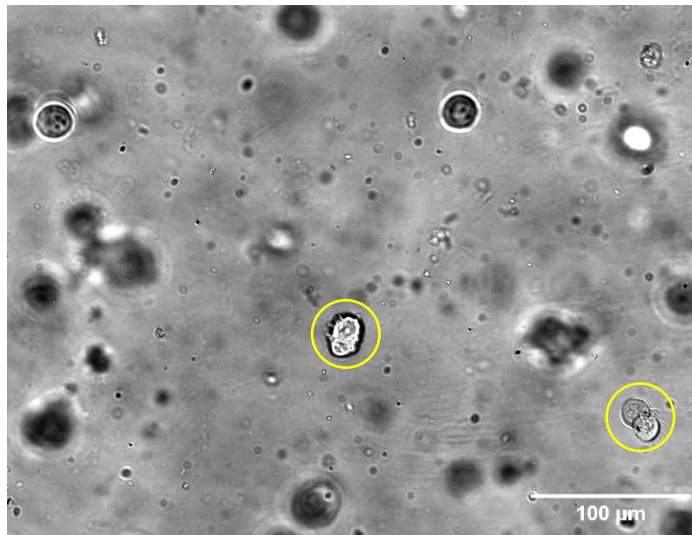


Abbildung 36: Repräsentative Durchlichtaufnahme von B16F1-Zellen in dem Hydrogel **G1,5kat4** mit gelber Markierung der adhärenente Zellen.

Zur Untersuchung der Zytokompatibilität wurden die B16F1-Zellen mithilfe eines Lebend-Tot-Färbe-Kits angefärbt. Das Kit besteht aus einer Kombination der Anfärbereagenzien Calcein-Acetylmethoxy-Methylester (Calcein AM) zur Anfärbung der lebenden Zellen und Propidiumiodid (PI) zur Anfärbung der toten Zellen. Calcein AM ist lipophil und kann die Zellmembran durchdringen. Der Acetylmethoxy-Methylester des Calcein fluoresziert nicht, doch durch die in lebenden Zellen vorhandenen Esterasen wird Calcein AM in das stark grün fluoreszierende Calcein umgesetzt (Anregung: 490 nm, Emission: 515 nm). Dadurch färbt Calcein AM ausschließlich lebende Zellen an. Propidiumiodid hingegen ist nicht dazu in der Lage, die Zellmembran lebender Zellen zu durchdringen, es kann lediglich die nicht intakte Membran von toten Zellen durchdringen, um dann mit der DNA zu interkalieren und eine rote Fluoreszenz zu emittieren (Anregung: 535 nm, Emission: 617 nm), dadurch färbt PI selektiv tote Zellen an.^{270,271}

Die Einbettung der B16F1-Zellen in die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele wurde wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Eine Änderung der Durchführung bestand darin, die Polymere in serumfreiem statt serumhaltigem Mikroskopiepufer zu lösen, um eine

Einlagerung von Serumbestandteilen in die β -CD-Kavität zu verhindern. Nach erfolgter Gelbildung wurden die Hydrogele mit einem mit 20 % FBS versetzten Mikroskopiepuffer übergossen und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die B16F1-Zellen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/mL Gel eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Hydrogele einmal mit serumfreiem Mikroskopiepuffer gewaschen, bevor sie mit dem Lebend-Tot-Färbe-Kit angefärbt wurden. Der Waschschritt diente zur Entfernung des FBS, welches Esterasen enthalten und das Anfärbereagenz Calcein AM lysieren kann. Als Referenz wurden die B16F1-Zellen in Matrigel ($c = 5$ mg/mL) unter denselben Bedingungen kultiviert und untersucht. Sowohl für die Durchlicht- als auch für die Fluoreszenzaufnahmen wurden 585 μ m der Gele in Z-Richtung betrachtet. Die Durchführung der Experimente erfolgte in Duplikaten, in denen jeweils 3-5 Mikroskopieaufnahmen der einzelnen Hydrogele gemacht wurden.

Eine repräsentative 3D-Projektion einer Fluoreszenzaufnahme ist in Abbildung 37 für des Hydrogel **G3,3n6** dargestellt.

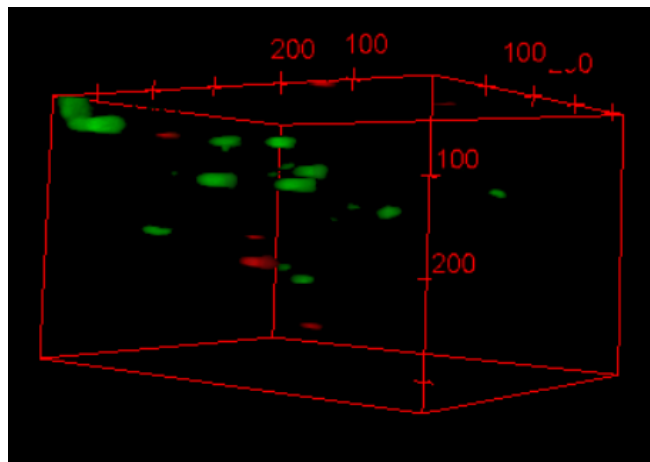


Abbildung 37: Repräsentative 3D-Projektion von B16F1-Zellen in dem neutralen, mit 3,3 mol% RGD-funktionalisierten Hydrogel **G3,3n6** mit Lebend-Tot-Färbung nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Die lebenden B16F1-Zellen sind mit Calcein AM (grün) und die toten Zellen mit PI (rot) angefärbt.

Diese zeigt neben einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen eine gute Zytokompatibilität des Geles, da der Großteil der Zellen grün angefärbt vorliegt. Durch das Zählen der lebenden und toten Zellen in derartigen Fluoreszenzaufnahmen wurden die in Abbildung 38A) dargestellten Mittelwerte lebender und toter Zellen ermittelt.

In Abbildung 38A) ist zu erkennen, dass alle thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele eine größere Anzahl lebender als toter Zellen aufweisen. Insbesondere die 4 Gew.-%igen Hydrogele zeigen mit 80-96 % lebenden Zellen eine gute Zytokompatibilität, die bei den meisten

Hydrogelen auch die Viabilität in der Matrigelkontrolle, welche bei 81 % lebenden Zellen liegt, übersteigt (Tabelle A6). Auffällig ist die Zytokompatibilität der Hydrogelgruppe **G1,5kat4-10**, da diese mit Werten von $89 \pm 4\%$ (**G1,5kat10**) bis $96 \pm 2\%$ (**G1,5kat4**) lebenden Zellen deutlich besser ist als die der übrigen Hydrogele. Anscheinend konnten mit diesen Hydrogelen die optimalen Bedingungen für die Viabilität der B16F1-Zellen getroffen werden.

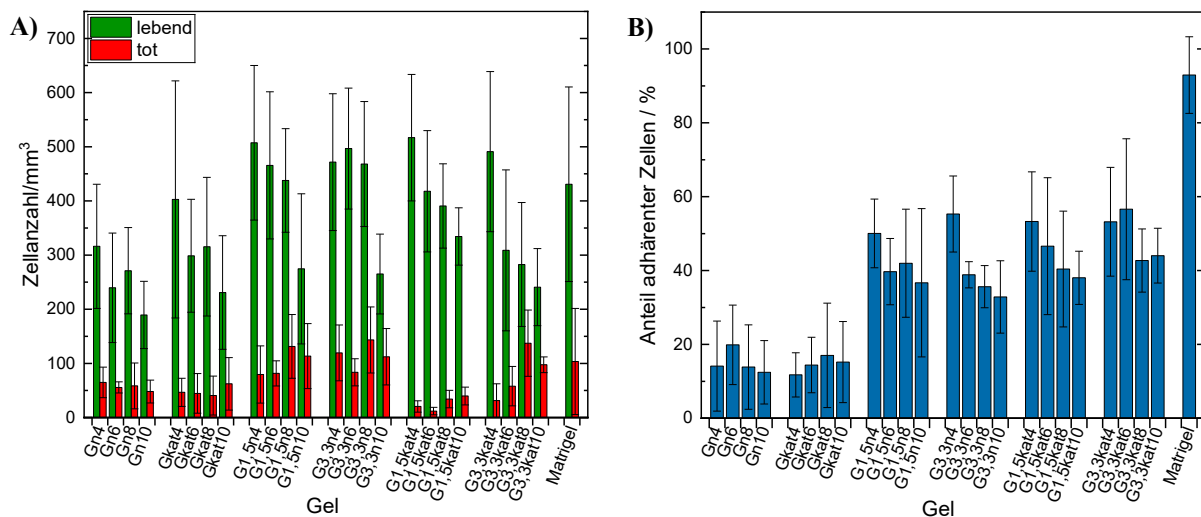


Abbildung 38: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation in den thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen bei 37 °C und 5 % CO₂.

(c_{RGD} im Gel, 1,5 mol% RGD: 4 Gew.-% = 2,4 $\mu\text{mol/mL}$, 6 Gew.-% = 3,6 $\mu\text{mol/mL}$, 8 Gew.-% = 4,8 $\mu\text{mol/mL}$, 10 Gew.-% = 6,0 $\mu\text{mol/mL}$; c_{RGD} im Gel, 3,3 mol% RGD: 4 Gew.-% = 5,0 $\mu\text{mol/mL}$, 6 Gew.-% = 7,5 $\mu\text{mol/mL}$, 8 Gew.-% = 10,0 $\mu\text{mol/mL}$, 10 Gew.-% = 12,6 $\mu\text{mol/mL}$; c_{TMAEA} im Gel: 4 Gew.-% = 8,5 $\mu\text{mol/mL}$, 6 Gew.-% = 12,8 $\mu\text{mol/mL}$, 8 Gew.-% = 17,0 $\mu\text{mol/mL}$, 10 Gew.-% = 21,3 $\mu\text{mol/mL}$).

Innerhalb aller Hydrogelgruppen ist jedoch ein Abfall der Viabilität mit steigender Gesamtpolymerkonzentration zu erkennen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ist zu beachten, dass mit steigender Gesamtpolymerkonzentration auch die Kationik- und RGD-Konzentration in den Hydrogelen zunimmt. Da allerdings bei den neutralen und nicht RGD-funktionalisierten Hydrogelgruppen **Gn4-10** und **Gkat4-10** der gleiche Trend mit steigender Gesamtpolymerkonzentration zu erkennen ist, kann weder die TMAEA- noch die RGD-Konzentration die Ursache für die Reduktion der Viabilität sein. Die erhöhte Steifigkeit hingegen verstärkt die mechanische Beanspruchung der Zellen während des Mischvorganges bei der Gelpräparation und auch nach der Einbettung können die erhöhte Steifigkeit und der geringere Freiraum im Netzwerk Stress für die Zellen bedeuten, da sie mehr Material verschieben müssen, um zu migrieren und sich auszubreiten. Außerdem war in den Durchlichtaufnahmen der 10 Gew.-%igen Hydrogelen bei einigen Zellen eine gequetschte

Morphologie zu erkennen. Auch in der Arbeit von LIU *et al.* wurde für B16F1-Zellen eine höhere Proliferation in weicheren als in festeren dreidimensionalen Fibringelen festgestellt. Getestet wurden Gele mit den Steifigkeiten 90 Pa, 420 Pa und 1050 Pa, von denen das Gel mit einer Steifigkeit von 90 Pa nach 5 Tagen die größte Zellanzahl enthielt.²⁷²

Ein Vergleich der Anzahl der lebenden Zellen/mm³ Gel in Abbildung 38A) verdeutlicht, dass die geringste Zellanzahl bei den vier neutralen Hydrogelen ohne RGD-Funktionalisierung (**Gn4-10**) auftritt. Durch die zusätzliche kationische Ladung in den vier Gelen **Gkat4-10** konnte die Anzahl an lebenden Zellen/mm³ Gel erhöht werden. Bei den 4 Gew.-%igen Hydrogelen beispielsweise stiegen die Zellanzahlen von 316 ± 115 Zellen/mm³ bei **Gn4** auf 403 ± 219 Zellen/mm³ bei **Gkat4**. Das heißt, die Proliferation der Zellen konnte durch die Kationik gefördert werden. Eine weitere Verbesserung der Proliferation erfuhren die Zellen, wie erwartet, durch den Einbau der RGD-Peptide. Die Zellanzahl der peptidfunktionalisierten 4 Gew.-%igen Hydrogele liegt bei ca. 500 Zellen/mm³. Eine weitere Verbesserung der Proliferation durch die Erhöhung des RGD-Anteils von 1,5 mol% auf 3,3 mol% oder die Kombination von Kationik und RGD-Funktionalisierung konnte nicht festgestellt werden.

Bei Betrachtung der in Abbildung 38B) dargestellten prozentualen Anteile adhärenter B16F1-Zellen von lebenden Zellen ist zwischen den neutralen und kationischen Hydrogelgruppen ohne RGD-Funktionalisierung (**Gn4-10** und **Gkat4-10**) kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Der Anteil an adhärenenten Zellen liegt in beiden Hydrogelgruppen zwischen 12 % und 20 % ohne einen Trend bezüglich der Gesamtpolymerkonzentration. Im Vergleich dazu liegt der Anteil adhärenter Zellen in der Matrigelkontrolle bei 93 ± 10 %.

Durch den Einbau der RGD-Peptide konnte der Anteil adhärenter B16F1-Zellen sowohl in den neutralen als auch in den kationischen Hydrogelgruppen deutlich erhöht werden. Bei den 4 Gew.-%igen RGD-funktionalisierten Hydrogelen (**G1,5n4**, **G3,3n4**, **G1,5kat4**, **G3,3kat4**), deren Werte nah beieinander liegen, wurde ein Anteil adhärenter Zellen von 50-55 % erreicht. Bei den vier Hydrogelgruppen mit RGD-Funktionalisierung ist jeweils eine Abnahme der Adhäsion mit steigender Gesamtpolymerkonzentration zu beobachten. Die stärkste Adhäsion zeigten die Zellen daher bei niedrigeren Steifigkeiten von 136 ± 3 Pa (**G1,5kat4**) bis 362 ± 20 Pa (**G3,3kat6**). In der Literatur wird bei 2D und auch 3D Hydrogelen jedoch meist davon berichtet, dass eine höhere Steifigkeit zu einer stärkeren Ausbreitung der Zellen führt.^{273–}

²⁷⁵ In einem anderen Literaturbeispiel hingegen, in dem der Einfluss der Viskosität auf die Adhäsion von Chondrozyten in einer 3D Gelatinelösung untersucht wurde, stellten die Forscher eine vermehrte Adhäsion bei geringerer Viskosität fest.²⁷⁶ Auch die Arbeitsgruppe von ANSETH

berichtet, dass hMSCs eingebettet in Hydrazon-Hydrogelen aufgrund der niedrigen Hydrolyserate der aromatischen Hydrazonvernetzung keine Adhäsion aufweisen, weil die Beweglichkeit der Zellen zu stark eingeschränkt ist.^{277,278} Das Zellverhalten ist im Allgemeinen stark von der Zelllinie sowie von der Art der Kultivierung (2D oder 3D) abhängig. So wiesen B16F1-Zellen in 2D-Kulturen auf härteren Gelen eine bessere Adhäsion und Proliferation auf, während sie in 3D-Kulturen in weicheren Gelen eine bessere Proliferation zeigten.²⁷²

Die Erhöhung des RGD-Anteils von 1,5 mol% auf 3,3 mol% führte bei den neutralen Hydrogelen (**G3,3n4-10**) zu keiner Verbesserung der Adhäsion und bei den kationischen Hydrogelen (**G3,3kat4-10**) nur zu einer leichten Zunahme der Adhäsion bei den Gelen mit 6-10 Gew.-% Gesamtpolymerkonzentration. Da der Einbau der niedrigsten verwendeten RGD-Konzentration von 2,4 $\mu\text{mol/mL}$ (**G1,5n4**, **G1,5kat4**) im Vergleich zu den Hydrogelen ohne RGD-Funktionalisierung (**G1,5n4**, **G1,5kat4**) zu einer Erhöhung der Adhäsion um 41 % führte, die weitere Verdoppelung der Konzentration aber zu keiner signifikanten Verbesserung der Adhäsion beitrug, ist von dem Erreichen einer Sättigung auszugehen. Ein Literaturvergleich unterstützt dieses Ergebnis, da die in dieser Arbeit verwendete RGD-Konzentrationen von 2,4 $\mu\text{mol/mL}$ in dem Bereich oder sogar oberhalb der RGD-Konzentrationen liegt, die in anderen Arbeiten zur 3D-Einbettung verwendet wurden.^{99,214,279}

Bei den RGD-funktionalisierten Hydrogelen ist ein Einfluss der Kationik auf die Zelladhäsion zu erkennen, denn der Anteil adhärenter B16F1-Zellen konnte durch den Einbau von TMAEA (**G1,5kat4-10**, **G3,3kat4-10**) um 1-18 % im Vergleich zu den neutralen Analoga (**G1,5n4-10**, **G3,3n4-10**) gesteigert werden. Da der Einbau von TMAEA in Abwesenheit von RGD-Peptiden (**Gkat4-10**) zu keiner Steigerung der Adhäsion führte, kann von einem synergistischen Effekt der Kombination von Kationik mit RGD-Peptiden ausgegangen werden. Ausnahmen davon bilden die Hydrogele **G1,5kat8** und **G3,3kat4**, bei denen der Anteil adhärenter B16F1-Zellen jeweils um 2 % unterhalb der Werte der neutralen Analoga liegt. Im Vergleich zur Literatur fällt der synergistische Effekt in dieser Arbeit allerdings marginal aus, denn SALLOUH *et al.* stellten durch den Kationik-Einbau einen 11-fachen Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen und durch die Kombination von Kationik und RGD-Funktionalisierung einen 22-fachen Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen fest.¹⁸⁴

Ein Grund für den marginalen Einfluss der Kationik in dieser Arbeit kann eine zu niedrig gewählte TMAEA-Konzentration sein, denn SALLOUH *et al.* verwendeten einen ca. vierfach höheren Molanteil an kationischen Einheiten. Auch in den Arbeiten von STAMM *et al.* wurden deutlich höhere TMAEA-Konzentrationen als die in dieser Arbeit verwendeten 8,5-

21,3 $\mu\text{mol/mL}$ eingesetzt. STAMM *et al.* haben in einem kovalenten 2D-Hydrogel ohne RGD-Funktionalisierung TMAEA-Konzentrationen von 60-910 $\mu\text{mol/mL}$ Gel verwendet und deren Einfluss auf die Morphologie von U251-MG-Zellen untersucht. Bei den niedrigeren TMAEA-Konzentrationen von 60 $\mu\text{mol/mL}$, 110 $\mu\text{mol/mL}$ und 230 $\mu\text{mol/mL}$ wurde nur sporadisch eine Ausbreitung der U251-MG-Zellen festgestellt. Erst ab einer TMAEA-Konzentration von 460 $\mu\text{mol/mL}$ Gel zeigten die Zellen eine breitere Morphologie. Mit dieser TMAEA-Konzentration konnte außerdem ein synergistischer Effekt in Kombination mit RGD-Peptiden einer Konzentration von 0,13 $\mu\text{mol/mL}$ Gel beobachtet werden, denn diese Kombination ermöglichte dieselbe Oberflächenbedeckung wie eine TMAEA-Konzentration von 910 $\mu\text{mol/mL}$.¹⁶⁶ Da in 2D-Hydrogelen allerdings durchaus 10-fach höhere Konzentrationen benötigt werden als in 3D-Hydrogelen, um die gleiche Wirkung zu erzielen,²²³ sind die von STAMM *et al.* verwendeten Konzentrationen nicht genau mit den in dieser Arbeit verwendeten TMAEA-Konzentrationen zu vergleichen, dennoch sind sie ein Indiz dafür, dass die in dieser Arbeit gewählte TMAEA-Konzentration zu niedrig ist, um einen signifikanten Einfluss auf das Zellverhalten auszuüben.

Um eine weitere Verbesserung der Adhäsion der B16F1-Zellen in dem in dieser Arbeit entwickelten Hydrogelsystem zu erreichen, bieten sich folglich eine Erhöhung der Kationikkonzentration und eine Verringerung der Steifigkeit als Optimierungsoptionen an, wohingegen die maximale Wirkung der RGD-Konzentration schon ausgeschöpft wurde. Auch die Verlängerung der Inkubationszeit kann zu einer weiteren Erhöhung der Adhäsion führen.²⁷⁶

4.7 Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel konnte das Gastpolymer P(TMAEA-*co*-DMA-*co*-AdHexAAm) erfolgreich um das Thiolactonmonomer TLaAAm erweitert und dieses zur Immobilisierung von Maleimid-funktionalisierten RGD-Peptiden genutzt werden. Als Wirtpolymer wurde wie in Kapitel 3 ein β -CD-funktionalisiertes P(DMA-*co*-HexAAm)-Copolymer eingesetzt. Durch die Verwendung einer geringen Vernetzungsdichte von 2,3 mol% hebt sich die in diesem Kapitel hergestellten Hydrogele durch ihre homogene innere Struktur von den in Kapitel 3 hergestellten Hydrogelen ab, da die homogene Struktur nicht nur eine effizientere Vernetzung, sondern auch eine gleichmäßige dreidimensionale Verteilung der Zellen ermöglichte.

Während die Vernetzungsdichte mit 2,3 mol% konstant gehalten wurde, wurden die Parameter Ladung (neutral, kationisch), RGD-Konzentration (0,0 mol%, 1,5 mol%, 3,3 mol%) und Gesamtpolymerkonzentration (4 Gew.-%, 6 Gew.-%, 8 Gew.-%, 10 Gew.-%) variiert, um deren

Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele und das Verhalten von B16F1-Zellen in 3D-Zellexperimenten zu untersuchen. Zur Variation der Parameter Ladung und RGD-Konzentration mussten nur zwei Gastpolymere über eine freie radikalische Polymerisation hergestellt werden, eines davon wurde mit und das andere ohne das kationische Monomer TMAEA copolymerisiert. Von den erhaltenen Polymeren wurde jeweils ein Teil mit RGD-Peptiden funktionalisiert, sodass letztendlich vier Polymere erhalten wurden. Durch die Kombination der Peptid-haltigen und der nicht Peptid-haltigen Hydrogele konnten mit geringem synthetischen Aufwand Hydrogele mit drei verschiedenen RGD-Konzentrationen hergestellt werden.

Die rheologische Charakterisierung der thiolactonhaltigen Hydrogele ergab Steifigkeiten von 140-1600 Pa und eine Fähigkeit zu 70-85 % Selbstheilung bei den 10 Gew.-%igen Hydrogelen im ersten Zerstörungs-Erholungs-Zyklus. Die Steifigkeiten wurden hauptsächlich, wie gewünscht, durch die Variation der Gesamtpolymerkonzentration beeinflusst, wodurch eine gezielte Anpassung der mechanischen Eigenschaften für verschiedene Zellexperimente möglich ist. Eine Reduktion der Steifigkeit wurde allerdings durch die kationische Ladung sowie die Immobilisierung von 1,5 mol% RGD-Peptid ausgelöst. Ein signifikanter Einfluss auf die Elastizität und Selbstheilung war nicht zu erkennen. Bei der Erhöhung des RGD-Anteils auf 3,3 mol% blieben die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele im Vergleich zu denen mit 1,5 mol% RGD-Peptid konstant. Folglich bestand eine gute Vergleichbarkeit der Hydrogele in den Zellexperimenten hinsichtlich des Einflusses der RGD-Konzentration auf das Zellverhalten.

In den 3D-Zellexperimenten wurde bei den Hydrogelen ohne RGD-Funktionalisierung eine proliferationsfördernde Wirkung der kationischen Ladung im Vergleich zu den neutralen Hydrogelen beobachtet. Außerdem rief der Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptiden sowohl bei den neutralen als auch bei den kationischen Hydrogelen eine Verbesserung der Proliferation hervor. Bezüglich der Adhäsion der B16F1-Zellen wurde ein Anstieg um bis zu 41 % bei den neutralen wie auch bei den kationischen Hydrogelen beobachtet. Die Erhöhung des RGD-Anteils im Polymer auf 3,3 mol% konnte weder eine weitere Verbesserung der Proliferation noch der Adhäsion erbringen. Daher wurde mit 1,5 mol% RGD-Peptid bereits der maximal mögliche Einfluss der RGD-Funktionalisierung auf die Proliferation und Adhäsion der B16F1-Zellen erreicht. Die kationische Ladung bewirkte bei den Hydrogelen ohne RGD-Funktionalisierung einen Anstieg der Proliferation um 16-28 %, aber besaß keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten. Bei den RGD-funktionalisierten Hydrogelen verbesserte die

kationische Ladung die Viabilität der Hydrogele mit 1,5 mol% RGD, zeigte auf die Hydrogele mit 3,3 mol% RGD allerdings keinen signifikanten Einfluss hinsichtlich der Viabilität. In Bezug auf die Adhäsion zeigte sich durch die Kombination von RGD-Peptid und Kationik im Vergleich zur Literatur ein marginaler synergistischer Effekt, der durch die Verwendung höherer Kationikkonzentrationen vergrößert werden könnte.

Die Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration führte zu einem Herabsetzen der Viabilität und der Adhäsion der B16F1-Zellen, weil für diese Zelllinie weichere Hydrogele besser geeignet sind.

Da andere Zelllinien jedoch einer deutlich steiferen Umgebung bedürfen, soll in Kapitel 5 eine Möglichkeit zur Erhöhung der Steifigkeit und Elastizität der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele untersucht werden.

5. Dual-vernetzte Hydrogele aus thiolactonhaltigen Copolymeren

5.1 Einleitung und Zielsetzung

Neben den Vorteilen der physikalischen Vernetzung, wie der dynamischen Netzwerkstruktur, den selbstheilenden Eigenschaften und der kurzen Gelierzeit, ist die größte Limitation von physikalisch vernetzten Hydrogelen deren begrenzte Steifigkeit. Nicht nur die in dieser Arbeit hergestellten physikalischen Hydrogele mit einer maximalen Steifigkeit von 1600 Pa können nur Gewebe im weicheren Bereich nachahmen. Andere physikalische Hydrogele liegen in ähnlichen Steifigkeitsbereichen.^{99,114,146} Im Körper hingegen variiert die mechanische Umgebung der Zellen um mehrere Größenordnungen, von sehr weichem Gewebe (0,1 kPa) im Gehirn bis hin zu sehr hartem Gewebe (80 kPa) in den Knochen. Folglich ist es wichtig, die Hydrogele auch in höheren Steifigkeiten herstellen zu können, um in der Lage zu sein, die extrazelluläre Matrix möglichst genau zu imitieren.²⁸⁰ Ein weiteres Problem besteht darin, dass es in physikalischen Hydrogelen durch Oberflächenerosion zu einem Massenverlust der Hydrogele kommen kann, wodurch die mechanische Stabilität in Langzeitexperimenten nicht gegeben ist.^{281,282}

Eine Lösung für diese Probleme kann die duale Vernetzung – die Kombination von physikalischer und kovalenter Vernetzung – darstellen. Durch den physikalischen Anteil wird der Erhalt der Selbstheilungsfähigkeit angestrebt, während die kovalente Vernetzung die langfristige Elastizität und Steifigkeit der Hydrogele erhöhen soll.

Die Idee, physikalische Vernetzungen mit kovalenten Vernetzungen zu kombinieren, basiert auf Literaturbeispielen, in denen das Erreichen höherer Steifigkeiten unter Erhalt der Selbstheilung nachgewiesen werden konnte. Der Anteil an Arbeiten, in denen die Wirt-Gast-Vernetzung zwischen β -CD und Adamantan mit einer kovalenten Vernetzung kombiniert wurde, ist jedoch gering. Außerdem wurde ein Großteil dieser Arbeiten analog zu den rein-physikalischen Ansätzen mithilfe von natürlichen Polymeren realisiert.^{99,155,155,214,283,284} Um die Nachteile, die natürliche Polymere mit sich bringen, zu umgehen, wurde in diesem Kapitel weiterhin an der Verwendung synthetischer Polymere festgehalten.

Es gibt einige Arbeiten zu dualen Adamantan/ β -CD-Hydrogelen, die auf synthetischen Polymeren basieren, diese weisen allerdings den Nachteil auf, für die Vernetzung zelltoxische Trigger wie UV-Licht zu benötigen oder über eine *in-situ*-Gelierung hergestellt worden zu sein, in der niedermolekulare Monomere und Reaktionstemperaturen eingesetzt wurden, die die Zellintegrität beeinträchtigen.^{165,285,286} Folglich waren diese Hydrogelsysteme nicht für 3D-

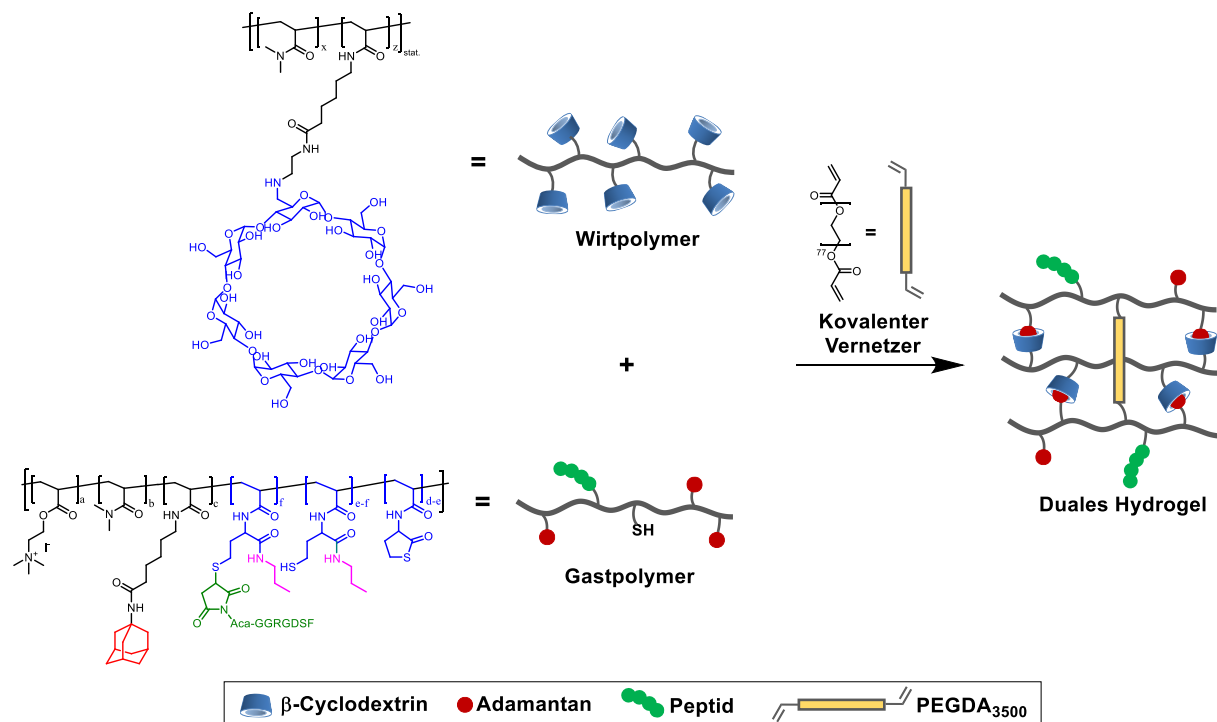
Zellexperimente geeignet. Die *in-situ*-Gelierung hat zudem den Nachteil der nicht vollständigen Analysierbarkeit der Zusammensetzung nach der Gelierung und des Verbleibs zytotoxischer Komponenten aus der Polymerisationsreaktion im Hydrogel, die aufwendig zu entfernen sind.

In dieser Arbeit sollte, um ein in der 3D-Zellkultivierung anwendbares duales Hydrogel zu entwerfen, eine nachträgliche kovalente Vernetzung über die bioorthogonale Thiol-MICHAEL-Addition genutzt werden. Dabei sollte wie in Kapitel 4 auf die Verwendung thiolactonhaltiger Gastpolymere gesetzt werden, da diese eine besonders einfache Synthese ermöglichen. Die polymeranalogen Thiolacton-Einheiten erfüllen in diesem Kapitel zwei Zwecke, sie dienen zum einen erneut der effizienten Immobilisierung der RGD-Peptide Mal-Aca-GGRGDSF und zum anderen der kovalenten Vernetzung (Schema 16). Ein weiterer Vorteil der Thiolactone besteht darin, dass für die Variation der kovalenten Vernetzungsdichte nur ein Polymer mit einem ausreichend großen Thiolacton-Anteil hergestellt werden muss, dessen Thiolactone dann nach Bedarf ringgeöffnet werden können. Das Gastpolymer sollte im Vergleich zu Kapitel 4 unverändert bleiben.

Für die kovalente Vernetzung über die Thiol-MICHAEL-Addition wurde der bifunktionelle Vernetzer Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) mit einer molaren Masse von 3500 g/mol eingesetzt. Dabei fungieren die Acrylatendgruppen als MICHAEL-Akzeptoren, die mit den Thiolgruppen des Gastpolymers umgesetzt werden sollen. Die Verwendung von PEGDA als Vernetzer ist in der guten Biokompatibilität und Hydrophilie des PEG begründet. PEG gehört zu den am häufigsten zur Synthese von synthetischen Hydrogelen verwendeten Polymeren in Zellanwendungen, da es neben den schon genannten Eigenschaften zusätzlich für eine geringe Proteinadsorption sorgt.^{287,288} Die Molmasse von 3500 g/mol wurde gewählt, da Moleküle mit einem Molekulargewicht von >1000 g/mol nicht bioakkumuliert werden können und somit eine toxische Wirkung ausgeschlossen ist.^{81,82}

Die dual-vernetzten Hydrogele sollten in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Anteilen an kovalentem Vernetzer bei konstantem Anteil an Wirt-Gast-Vernetzung dargestellt werden, um den Einfluss der kovalenten Vernetzung auf die mechanischen Hydrogeleigenschaften und das Zellverhalten zu untersuchen. Außerdem sollten die mechanischen Eigenschaften erneut über die Gesamtpolymerkonzentration eingestellt und die RGD-Konzentration variiert werden. Um die erfolgreiche Ausbildung beider Vernetzungsarten im Hydrogel zu verifizieren, wurden sowohl rein physikalische als auch rein kovalente Kontrollgele gebildet, deren rheologische Eigenschaften mit denen der dualen Hydrogele verglichen werden sollen. Auch ein Vergleich

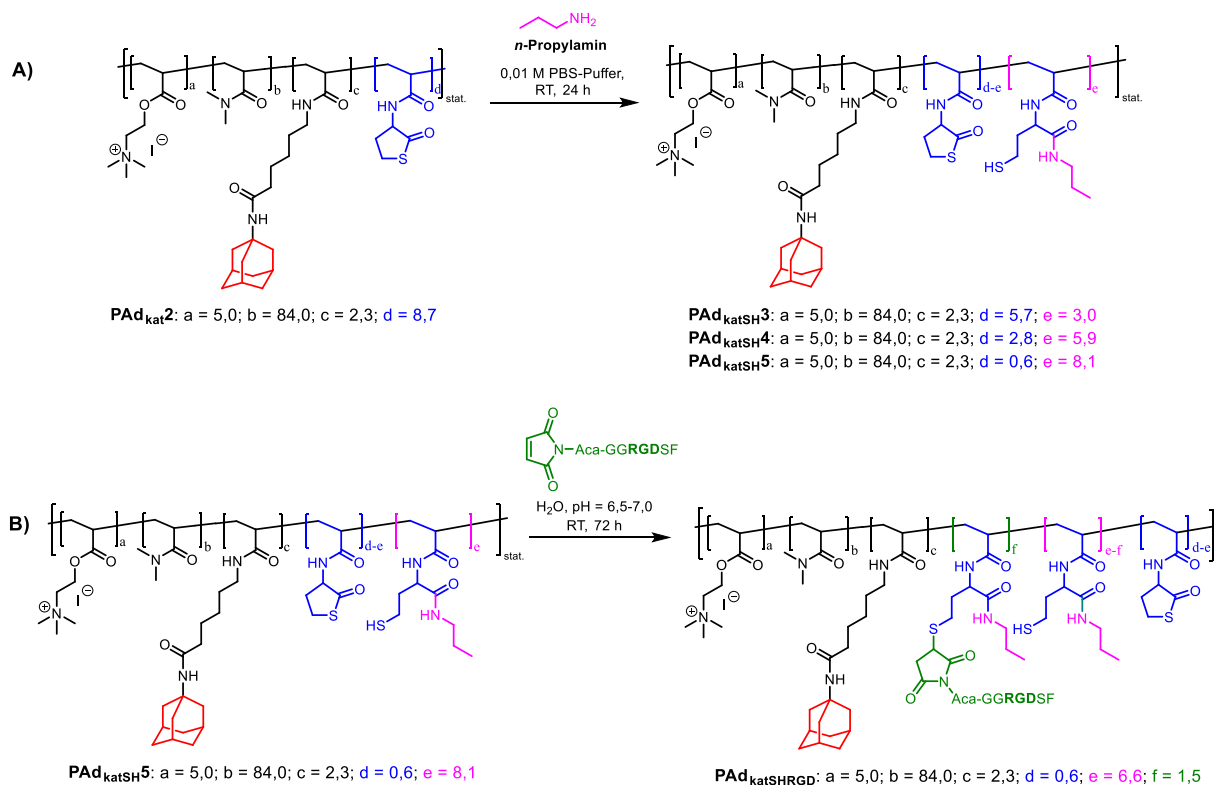
des Einflusses der dualen Hydrogele und der Kontrollgele auf das Zellverhalten wurde vorgenommen.



Schema 16: Schematische Darstellung der Synthese eines dual-vernetzten Hydrogels aus einem thiolhaltigen Adamantan-Gastpolymer, einem β -Cyclodextrin-Wirtpolymer und einem PEGDA-Vernetzer.

5.2 Synthese der Wirt- und Gastpolymere

Als Wirtpolymer wurde das in Kapitel 4 beschriebene Polymer **PCD8** mit einem β -CD-Anteil von 2,5 mol% verwendet. Die Synthese und Charakterisierung des thiolactonhaltigen Gastpolymers erfolgte analog zu den in Kapitel 4 beschriebenen Verfahren. Angestrebt wurde dabei zunächst dieselbe theoretische Polymerzusammensetzung wie die des Polymers **PAd_{kat}** in Kapitel 4, daher wird das in diesem Kapitel hergestellte Gastpolymer als **PAd_{kat2}** bezeichnet. Anschließend sollten die Thiolactonringe von **PAd_{kat2}** in drei verschiedenen Anteilen (**PAd_{katSH3/4/5}**) geöffnet werden. Bei zwei der Proben (**PAd_{katSH3}** und **PAd_{katSH4}**) sollten die verschiedenen erhaltenen Thiolanteile für die kovalente Vernetzung verwendet werden, während bei der dritten Probe (**PAd_{katSH5}**) eine Öffnung aller Thiolactonringe erfolgen sollte, um einen Teil davon mit RGD-Peptiden zu funktionalisieren und die restlichen Thiolgruppen für die kovalente Vernetzung zu nutzen (Schema 17).



Schema 17: (A) Thiolactonringöffnung am Gastpolymer **PAd_{kat}2** über eine Aminolyse mit drei verschiedenen Mengen an *n*-Propylamin zur Darstellung von **PAd_{katSH}3/4/5** und (B) die anschließende RGD-Peptid-Funktionalisierung von **PAd_{kat}5**.

Bei der Synthese des Gastpolymers **PAd_{kat}2** über eine freie radikalische Polymerisation von DMA, AdHexAAM, TMAEA und TLaAAM konnte die Zusammensetzung des Polymers **PAd_{kat}** gut reproduziert werden, denn der AdHexAAM-Anteil im Polymer lag erneut bei 2,3 mol% und die TLaAAM- und TMAEA-Anteile mit 8,7 mol% und 5,0 mol% bei sehr ähnlichen Werten wie in **PAd_{kat}**. Die über Gelpermeationschromatographie ermittelte mittlere molare Masse und die Dispersität des Gastpolymers **PAd_{kat}2** liegen mit $\bar{M}_n = 59100$ g/mol und $D = 2,99$ im erwarteten Bereich für eine freie radikalische Polymerisation. Alle Analytikergenergebnisse von **PAd_{kat}2** und den anderen in diesem Kapitel hergestellten Gastpolymeren sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität \mathcal{D} der Adamantan-Copolymere.

Polymer	Zusammensetzung TMAEA/DMA/AdHexAAm/		\bar{M}_n / Da ^d	\mathcal{D} ^d
	TLAAAm/Thiol/RGD / mol%			
	theoretisch ^a	experimentell		
PAd_{kat}2	5/83/2/10/0/0	5,0/84,0/2,3/8,7/0,0/0,0 ^b	59100	2,99
PAd_{kat}SH3	5,0/84,0/2,3/6,7/2/0,0	5,0/84,0/2,3/5,7/3,0/0,0 ^c	- ^e	- ^e
PAd_{kat}SH4	5,0/84,0/2,3/4,7/4/0,0	5,0/84,0/2,3/2,8/5,9/0,0 ^c	- ^e	- ^e
PAd_{kat}SH5	5,0/84,0/2,3/0,0/8,7/0,0	5,0/84,0/2,3/0,6/8,1/0,0 ^c	- ^e	- ^e
PAd_{kat}SHRGD	5,0/84,0/2,3/0,6/5,9/2,2	5,0/84,0/2,3/0,6/6,6/1,5 ^b	- ^e	- ^e

^a gewünschte Zusammensetzung; ^b bestimmt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie; ^c ermittelt über den ELLMAN's Assay; ^d bestimmt über GPC-Messungen mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluenten und PMMA als Standard; ^e keine Daten aufgrund zu schlechter Löslichkeit im GPC-Eluenten.

Im nächsten Schritt erfolgte die Ringöffnung des Gastpolymers **PAd_{kat}2** über eine Aminolyse mittels *n*-Propylamin in PBS-Puffer mit einer Reaktionszeit von 24 h und anschließender DTT-Zugabe analog zu Kapitel 4. Zur Realisierung der Bildung zweier verschiedener Anteile an Thiolgruppen wurden zum einen 2,2 Äq. und zum anderen 4,4 Äq. *n*-Propylamin bezogen auf 100 Wiederholungseinheiten zur Reaktion hinzugegeben. Daraus resultierten laut Analyse mithilfe des ELLMAN's Assays Thiolanteile von 3 mol% (**PAd_{kat}SH3**) und 6 mol% (**PAd_{kat}SH4**). Um für die Darstellung des RGD-funktionalisierten Gastpolymers **PAd_{kat}SHRGD** alle Thiolactonringe des Gastpolymers **PAd_{kat}2** zu öffnen, wurde ein Überschuss von 43,2 Äq. *n*-Propylamin pro 100 Wiederholungseinheiten eingesetzt. Erhalten wurde ein Thiolanteil von 8,1 mol%, der einer Öffnung von 93 % der Thiolactonringe entspricht (**PAd_{kat}SH5**). Über die Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums des komplett geöffneten Gastpolymers **PAd_{kat}SH5** wurde allerdings eine Reduktion des TMAEA-Anteils im Polymer um 4 mol% festgestellt. Die Ursache dafür kann eine Aminolyse der Esterfunktionalität durch die Zugabe des hohen Überschusses an *n*-Propylamin sein.

Bei der anschließenden Peptidimmobilisierung an dem komplett geöffneten Gastpolymer **PAd_{kat}SH5** via Thiol-MICHAEL-Addition wurde eine Funktionalisierung von 2,2 mol% angestrebt, damit 6 mol% Thiol für die spätere kovalente Vernetzung verbleiben. Der Anteil an restlichen Thiolgruppen sollte dadurch dem des Polymers **PAd_{kat}SH4** entsprechen, damit die Kombination dieser beiden Gastpolymere in verschiedenen Verhältnissen zur Einstellung verschiedener RGD-Anteile genutzt werden konnte. Da bei der Peptidimmobilisierung hier anders als in Kapitel 4 kein vollständiger Umsatz erreicht werden sollte, wurde kein

Überschuss, sondern genau 2,2 Äq. Mal-Aca-GGRGDSF zur Reaktion hinzugegeben. Außerdem wurde nach Ablauf der Reaktionszeit DTT hinzugegeben, um die während der 72-stündigen Reaktion in Nebenreaktionen gebildeten Disulfidbrücken zu spalten. Anschließend wurde die Reaktionslösung gegen Wasser dialysiert, um restliches DTT und eventuell nicht umgesetzte RGD-Peptide zu entfernen. Für die Bestimmung des Funktionalisierungsgrads von $\text{PA}_{\text{katSHRGD}}$ wurde das in Abbildung 39 gezeigte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum genutzt.

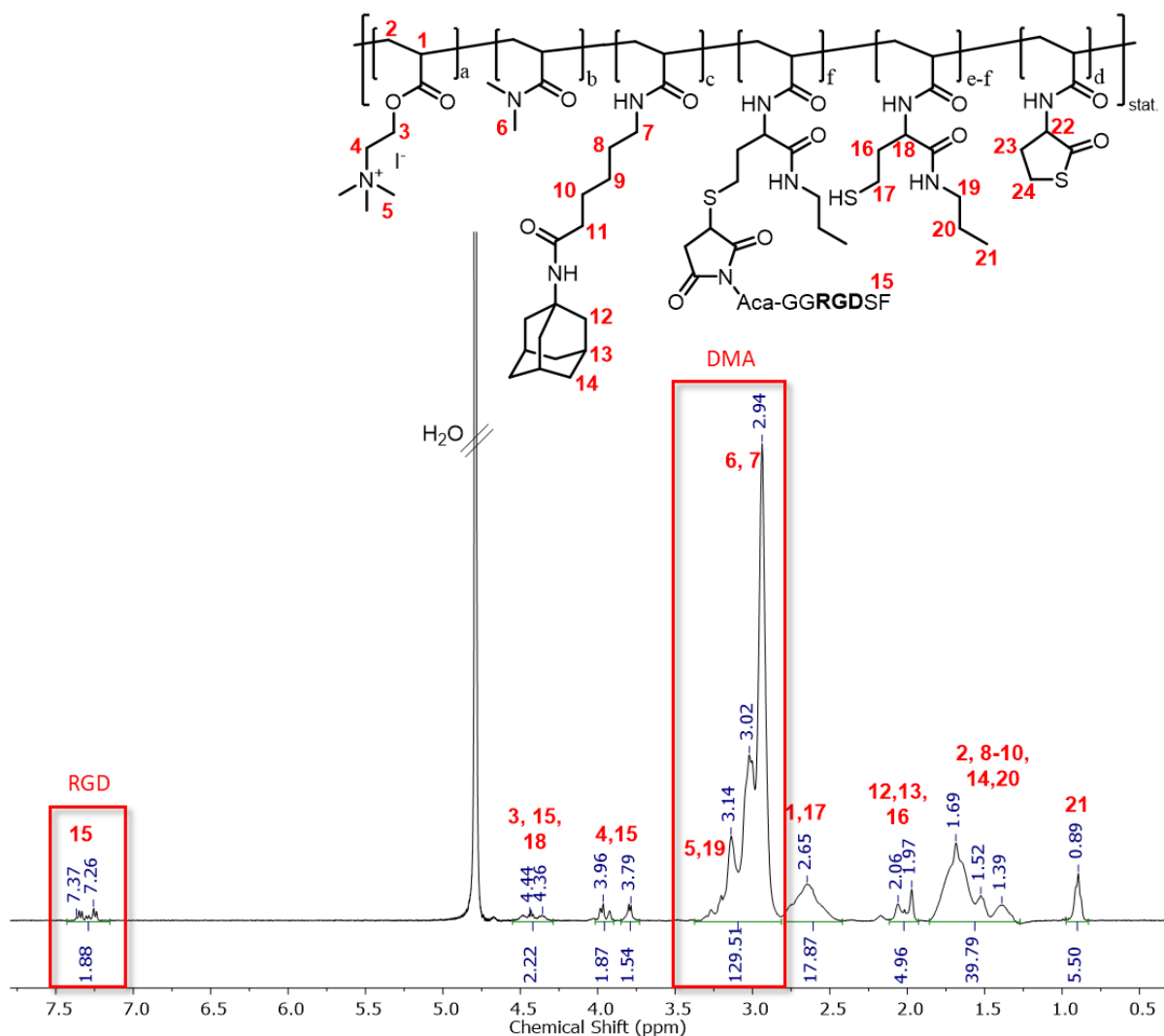
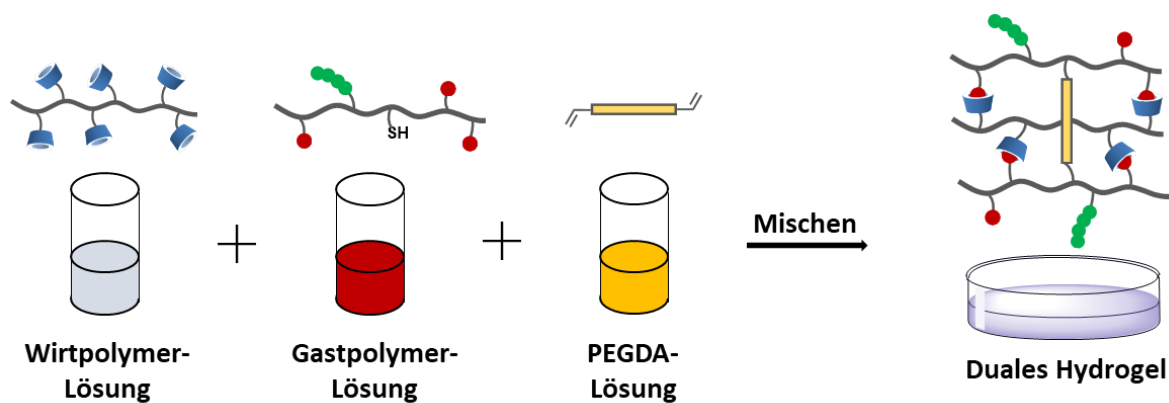


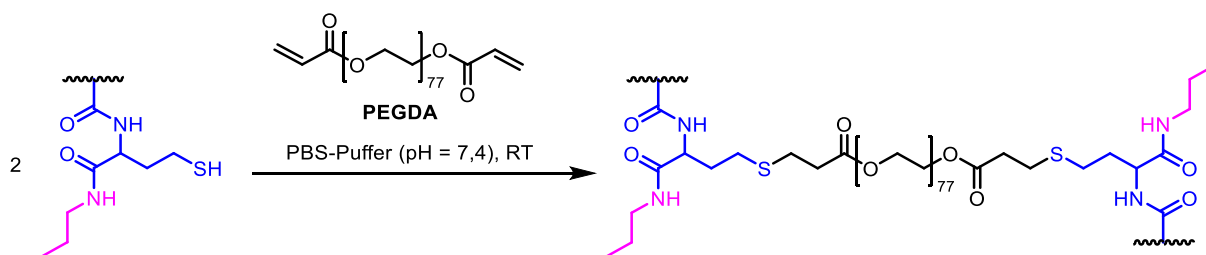
Abbildung 39: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des RGD-funktionalisierten, thiolhaltigen Gastpolymers $\text{PA}_{\text{katSHRGD}}$ in D_2O (500 MHz) mit der Markierung der Signale, über die der Molanteil an RGD im Polymer berechnet wurde.

Über den Vergleich des Integrals des Signals der 5 Protonen des Phenylrings von Phenylalanin bei 7,26-7,37 ppm mit dem Integral des DMA-Signals bei 2,90-3,32 ppm nach Abzug von Überlagerungen konnte eine RGD-Funktionalisierung von 1,5 mol% ermittelt werden. Der RGD-Anteil blieb damit unterhalb des angestrebten Wertes von 2,2 mol%, was mit einer



Schema 19: Schematische Darstellung der Präparation der dual-vernetzten Hydrogele.

Durch das Mischen erfolgte eine sofortige Zunahme der Viskosität der Hydrogele, die vor allem auf der sofortigen Ausbildung der Wirt-Gast-Vernetzungen beruhte. Nach einer Wartezeit von wenigen Minuten war beim Schwenken der Hydrogelgefäße eine weitere Zunahme der Viskosität sichtbar, die durch die Ausbildung der kovalenten Vernetzungen über die Thiol-MICHAEL-Addition zwischen den Thiolgruppen im Gastpolymer und den Acrylatendgruppen des PEGDA-Vernetzers hervorgerufen wurde (Schema 20). Der leicht basische pH-Wert von 7,4 beschleunigt die Thiol-MICHAEL-Addition zusätzlich, da die Thiole zu einem größeren Anteil deprotoniert vorliegen.



Schema 20: Vernetzung der Gastpolymere mit PEGDA über die Thiol-MICHAEL-Addition.

Durch das Mischen des Gastpolymers **PAd_{kat}SH3** (3 mol% Thiol) bzw. **PAd_{kat}SH4** (6 mol% Thiol) mit der entsprechenden Menge an PEGDA und Wirtpolymer **PCD8** wurden Hydrogele mit einer kovalenten Vernetzungsdichte von 3 mol% (**Gd1**) bzw. 6 mol% (**Gd2**) erhalten, die beide eine physikalische Vernetzungsdichte von 2 mol% aufwiesen. Beide Hydrogele wurden in den Gesamtpolymerkonzentrationen 4, 6, 8 und 10 Gew.-% hergestellt, sodass insgesamt die acht dualen Hydrogele **Gd1.4-10** und **Gd2.4-10** erhalten wurden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Zusammensetzung der dual-vernetzten Hydrogele und der Kontrollhydrogele.

Hydrogel	Gesamtpolymer- konzentration β / Gew.-%	Wirt-Gast- Vernetzung / mol%	Wirt- polymer	Gast- polymer	Kovalente Vernetzung / mol% ^a
Gd1.4	4	2	PCD8	PAd _{katSH3}	3
Gd1.6	6	2	PCD8	PAd _{katSH3}	3
Gd1.8	8	2	PCD8	PAd _{katSH3}	3
Gd1.10	10	2	PCD8	PAd _{katSH3}	3
Gd2.4	4	2	PCD8	PAd _{katSH4}	6
Gd2.6	6	2	PCD8	PAd _{katSH4}	6
Gd2.8	8	2	PCD8	PAd _{katSH4}	6
Gd2.10	10	2	PCD8	PAd _{katSH4}	6
GdRGD1	4	2	PCD8	PAd _{katSHRGD}	7
GdRGD2	4	2	PCD8	PAd _{katSH4} : PAd _{katSHRGD} 1:1	7
GdRGD3	4	2	PCD8	PAd _{katSH4} : PAd _{katSHRGD} 3:1	7
KG1.4	4	-	-	PAd _{katSH3}	3
KG1.6	6	-	-	PAd _{katSH3}	3
KG1.8	8	-	-	PAd _{katSH3}	3
KG1.10	10	-	-	PAd _{katSH3}	3
KG2.4	4	-	-	PAd _{katSH4}	6
KG2.6	6	-	-	PAd _{katSH4}	6
KG2.8	8	-	-	PAd _{katSH4}	6
KG2.10	10	-	-	PAd _{katSH4}	6
KG3.4	4	2	PCD8	PAd _{kat2}	-
KG3.6	6	2	PCD8	PAd _{kat2}	-
KG3.8	8	2	PCD8	PAd _{kat2}	-
KG3.10	10	2	PCD8	PAd _{kat2}	-

^a kovalente Vernetzung im Gastpolymer.

Um die RGD-haltigen dualen Hydrogele mit drei unterschiedlichen RGD-Konzentrationen herzustellen, wurde das Polymer PAd_{katSHRGD} einmal alleine eingesetzt und zweimal in verschiedenen Verhältnissen mit dem Gastpolymer PAd_{katSH4} gemischt. Dadurch sind

Hydrogele mit 1,5 mol% (**GdRGD1**), 0,8 mol% (**GdRGD2**) und 0,4 mol% (**GdRGD3**) RGD-Anteil im Gastpolymer erhalten worden. Diese wurden nur in einer 4 Gew.-%igen Gesamtpolymerkonzentration hergestellt, da die 4 Gew.-%igen Hydrogele in den vorausgegangenen Zellexperimenten die besten Ergebnisse hervorbrachten. Die in den Gastpolymer-Gemischen enthaltenen RGD-Anteile entsprechen im Hydrogel einer Konzentration von 1,6 $\mu\text{mol/mL}$, 0,8 $\mu\text{mol/mL}$ und 0,4 $\mu\text{mol/mL}$.

Als Vergleich zu den dual-vernetzten Hydrogelen wurden rein kovalente Kontrollgele hergestellt, die sich ausschließlich aus den thiolhaltigen Gastpolymeren **PAd_{katSH3} (KG1)** bzw. **PAd_{katSH4} (KG2)** und den entsprechenden Mengen an PEGDA zusammensetzten. Sie wiesen folglich 3 mol% bzw. 6 mol% kovalente Vernetzung und jeweils 0 mol% Wirt-Gast-Vernetzung auf. Da diese Hydrogele ebenfalls in vier Gesamtpolymerkonzentrationen hergestellt wurden, ergaben sich die Hydrogelgruppen **KG1.4-10** und **KG2.4-10**.

Zusätzlich wurden rein physikalische Kontrollgele in ebenfalls vier Gesamtpolymerkonzentrationen (**KG3.4-10**) erstellt. Diese setzten sich aus dem nicht ringgeöffneten Gastpolymer **PAd_{kat2}** und dem Wirtpolymer **PCD8** zusammen und enthielten somit 2 mol% Wirt-Gast-Vernetzung.

Alle hergestellten Hydrogele waren klar und zeigten keine oder eine leichte gelbliche Färbung. Die Gele wurden über Nacht ruhen gelassen, um eine vollständige Ausbildung der Vernetzungen sicherzustellen, bevor die Materialien rheologisch charakterisiert wurden.

5.5 Rheologische Charakterisierung der dual-vernetzten Hydrogele

Die rheologische Charakterisierung der hergestellten Hydrogele erfolgte über Amplituden-, Frequenz- und Selbstheilungstests. Da die Amplitudentests und die Selbstheilungstests in diesem Kapitel mit den Standardbedingungen für kovalente Hydrogele, nämlich bei einer konstanten Frequenz von 1 Hz gemessen wurden, während die in den vorherigen Kapiteln untersuchten physikalischen Hydrogele bei einer Frequenz von 10 Hz gemessen wurden, können die ermittelten Werte nicht direkt miteinander verglichen werden.

Bei der Charakterisierung der dualen Hydrogele und der Kontrollgele über Amplitudentests traten verschiedene Kurvenverläufe auf, wie in Abbildung 40 zu erkennen ist.

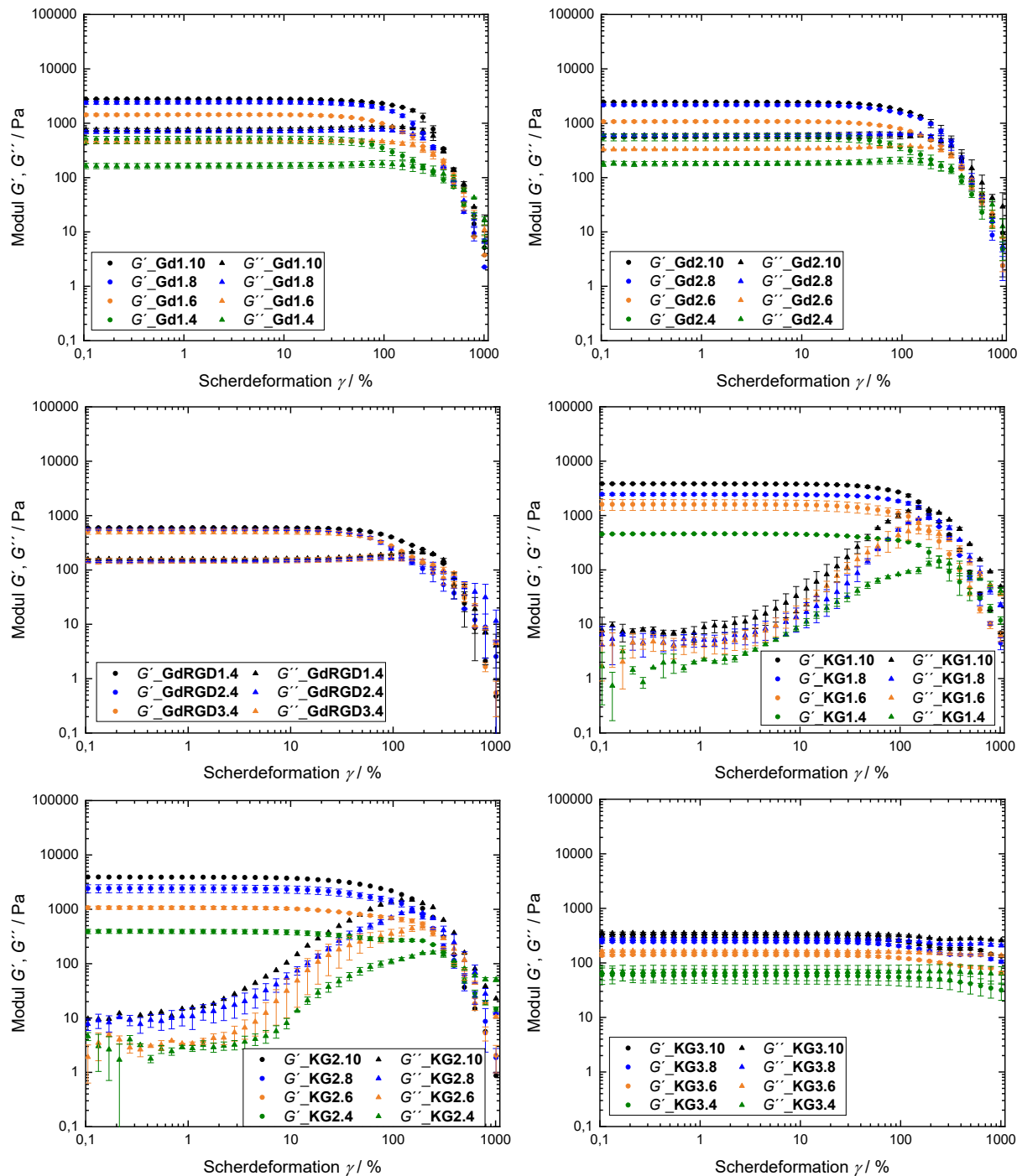


Abbildung 40: Amplitudentests der dual-vernetzten Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), der RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und der Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) gemessen bei einer konstanten Frequenz f von 1 Hz und 25 °C.

Während bei den kovalent-vernetzten Kontrollgelen (**KG1.4-10**, **KG2.4-10**) ein deutlicher Anstieg des Verlustmoduls G'' mit steigender Scherdeformation vor dem Erreichen der Fließgrenze zu beobachten ist, zeigen die Graphen der dual-vernetzten Hydrogele (**Gd1.4-10**,

Gd2.4-10, GdRGD1-3) nur andeutungsweise einen Anstieg des Verlustmoduls. Bei den physikalischen Kontrollgelen (**KG3.4-10**) fällt das Verlustmodul nach dem Erreichen der Grenze des LVE-Bereichs stetig ab. Der Anstieg des Verlustmoduls bis zum Erreichen der Fließgrenze bedeutet, dass bei steigender Scherdeformation immer mehr Deformationsenergie durch innere Reibungsvorgänge verloren geht, da sich Teilbereiche der inneren Struktur bereits irreversibel verformen. Es treten folglich Mikrorisse auf, bevor bei wesentlich höheren Scherdeformationen die Vernetzungsstruktur vollständig zerstört wird und das Material zu fließen beginnt. Diese Kurvenverläufe sind typisch für kovalent vernetzte Materialien, während in dynamisch vernetzten Materialien die Energie über einen größeren Bereich der Scherdeformationen konstant dissipiert wird, bis das Netzwerk bei höheren Scherdeformationen komplett zerbricht.²⁸⁹

Aus den Amplitudentests sind erneut die Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} , der Nachgebgränze γ_y und des Verlustfaktors $\tan(\delta)_{LVE}$ bestimmt und gegen die Gesamtpolymerkonzentration β aufgetragen worden (Abbildung 41A/C/E). Für die RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele **GdRGD1-3** wurden dieselben Parameter ermittelt, diese wurden aber gegen die RGD-Konzentration aufgetragen (Abbildung 41B/D/F).

Bei allen hergestellten Hydrogelen ist ein Anstieg des Speichermoduls G'_{LVE} (Abbildung 41A) und damit der Steifigkeit mit zunehmender Gesamtpolymerkonzentration β zu erkennen. Beispielsweise steigt G'_{LVE} bei den vier dualen Hydrogelen mit 3 mol% kovalenter Vernetzung von 497 ± 76 Pa (**Gd1.4**) bis 2754 ± 28 Pa (**Gd1.10**). Die Werte des Speichermoduls der vier dualen Hydrogele mit 6 mol% kovalenter Vernetzung (**Gd2.4-10**) befinden sich bei ähnlichen Werten. Die Steifigkeiten der kovalenten Kontrollgele liegen, wie erwartet, oberhalb derer der dualen Hydrogele mit Ausnahme der 4 Gew.-%igen Hydrogele, deren Steifigkeiten sehr ähnlich zu denen der dualen Hydrogele sind. Bei den kovalenten Kontrollgelen ist, äquivalent zu den dualen Hydrogelen, kein signifikanter Unterschied zwischen den Gelen mit 3 mol% und mit 6 mol% Vernetzung ersichtlich. Die physikalischen Kontrollgele sind mit einer deutlich geringeren Steifigkeit von 58 ± 17 Pa (**KG3.4**) bis 313 ± 21 Pa (**KG3.10**) ausgestattet. Da im Vergleich dazu die Steifigkeit in den dualen Hydrogelen deutlich erhöht werden konnte, kann von einer erfolgreichen Ausbildung der kovalenten Bindungen zwischen PEGDA und den Thiolgruppen in den dualen Hydrogelen ausgegangen werden.

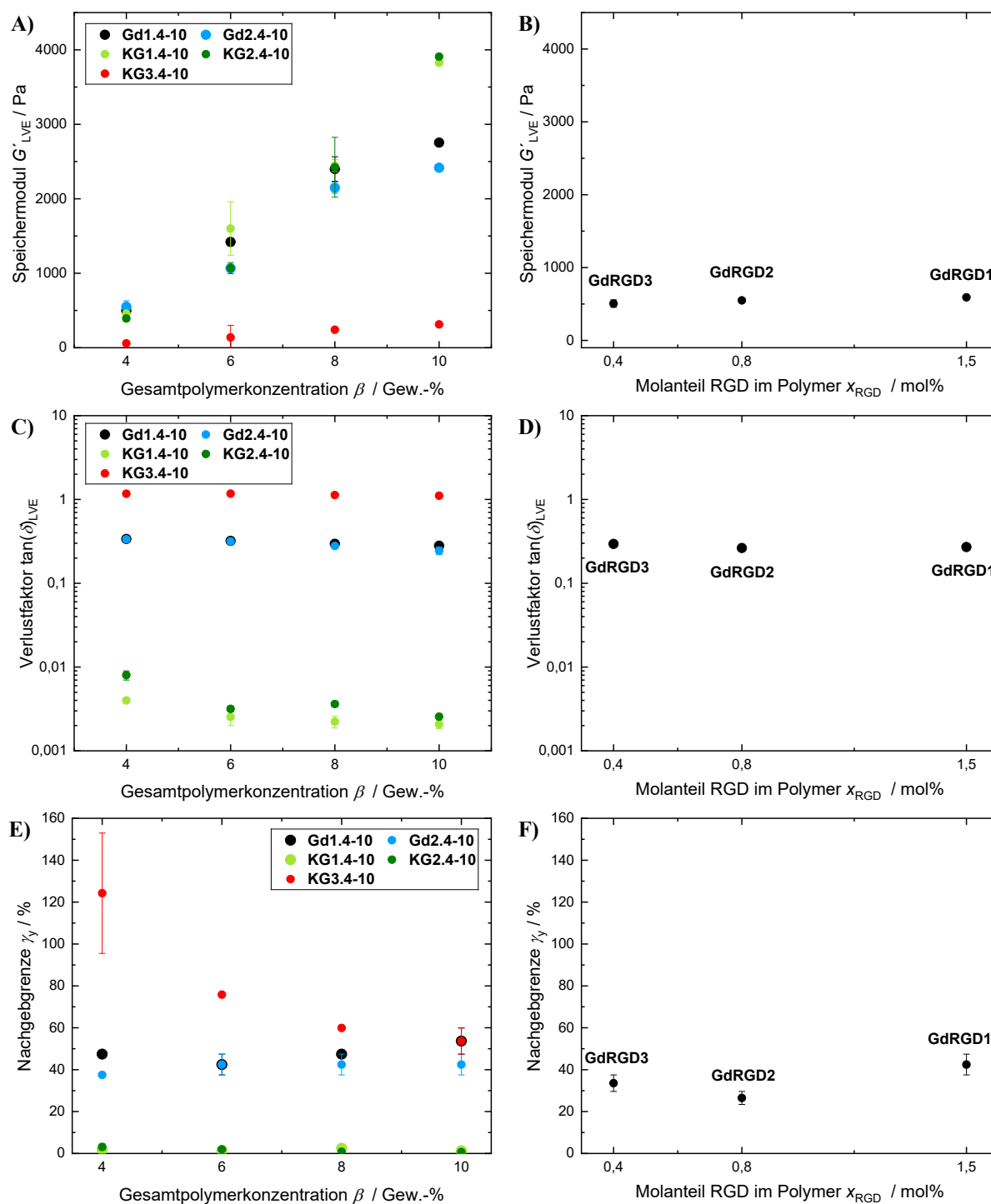


Abbildung 41: Auftragerungen der Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} (A, B), des Verlustfaktors $\tan\delta_{\text{LVE}}$ (C, D) und der Nachgebrenze γ_y (E, F) gegen die Gesamtpolymerkonzentration β für die dualen Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und die Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) und gegen die Peptidkonzentration für die RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) ermittelt über Amplitudentests ($f = 1$ Hz, 25 °C).

Bei Betrachtung der Verlustfaktoren $\tan\delta_{LVE}$ wird ein deutlicher Anstieg des elastischen Charakters der Materialien durch den Einbau der kovalenten Vernetzungen deutlich. Während die physikalischen Kontrollgele mit einem Verlustfaktor von $\tan\delta_{LVE} > 1$ einen überwiegend viskosen Charakter aufweisen, überwiegt bei den acht dualen Hydrogelen **Gd1.4-10** und **Gd2.4-10** mit Werten zwischen $\tan\delta_{LVE} = 0,337 \pm 0,014$ und $\tan\delta_{LVE} = 0,245 \pm 0,025$ der elastische Anteil des Materials. Die kovalenten Kontrollgele weisen mit Werten zwischen $\tan\delta_{LVE} = 0,008 \pm 0,001$ und $\tan\delta_{LVE} = 0,002 \pm 0,000$ eine noch deutlich höhere Elastizität und damit stärkere Vernetzung aufgrund der höheren Bindungsstärke der kovalenten Vernetzungen auf. Dass die Elastizität der dualen Hydrogele zwischen den Werten der physikalischen und kovalenten Kontrollgele liegt, bestätigt ebenfalls die erfolgreiche Kombination der Wirt-Gast-Vernetzung mit der kovalenten Vernetzung. Allerdings liegen die Werte von **Gd1.4-10** und **Gd2.4-10** erneut nah beieinander. Die Elastizität der kovalenten Kontrollgele mit 6 mol% kovalentem Vernetzer (**KG2.4-10**) ist dagegen etwas höher als die der kovalenten Kontrollgele mit 3 mol% kovalentem Vernetzer (**KG1.4-10**).

Darüber hinaus ist durch die Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration ein leichtes Sinken der Verlustfaktoren aller Hydrogelgruppen zu beobachten, das auf eine leichte Erhöhung der Vernetzungsdichte hindeutet.

Die in Abbildung 41E) dargestellten Werte der Nachgebrenzen γ_y sinken von den physikalischen Kontrollgelen über die dualen Hydrogele bis hin zu den kovalenten Kontrollgelen immer weiter ab. Außerdem ist innerhalb der physikalischen Kontrollgele eine Abnahme der Nachgebrenzen mit zunehmender Gesamtpolymerkonzentration β von $\gamma_y = 124 \pm 29 \%$ (**KG3.4**) bis $\gamma_y = 54 \pm 6 \%$ (**KG3.10**) festzustellen. Die Nachgebrenzen der dualen Hydrogele und kovalenten Kontrollgele zeigen hingegen keine Abhängigkeit von der Gesamtpolymerkonzentration β . Ein Sinken der Nachgebrenze deutet auf eine schlechtere Deformierbarkeit und ein schnelleres Zerbrechen der Hydrogele hin, was mit einer höheren und weniger dynamischen Vernetzungsdichte und daher geringeren Energiedissipation in Verbindung steht.²⁹⁰ Somit bestätigen die Ergebnisse der Nachgebrenzen in Übereinstimmung mit den Trends des Speichermoduls und des Verlustfaktors die erfolgreiche Kombination der Eigenschaften der Wirt-Gast-Vernetzungen und der kovalenten Vernetzungen. Allerdings liegen auch hier die Werte der Gele mit 3 mol% und 6 mol% kovalenter Vernetzung sowohl bei den dualen Hydrogelen als auch bei den kovalenten Kontrollgelen nah beieinander.

Dass die Erhöhung des Anteils an kovalenter Vernetzung von 3 mol% auf 6 mol% nicht zu einer weiteren Erhöhung des Speichermoduls und der Elastizität sowie zum weiteren Sinken der

Deformierbarkeit führt, hat verschiedene Gründe. Einer davon ist, dass in den Hydrogelen mit höherer kovalenter Vernetzung der Massenanteil an PEGDA erhöht und der der Polymere entsprechend verringert wurde, um die Gesamtpolymerkonzentration konstant zu halten. Da PEGDA im Vergleich zu den Polymeren kurzkettig ist, wurde der Anteil an langkettigen Polymeren reduziert, wodurch es zu weniger Verknäuelungen der Polymere und daher zu weniger Vernetzung kommt. Auch in den Arbeiten von TAKENO und NAKAMURA wurde eine Abnahme der Steifigkeit mit sinkender Molmasse beschrieben.^{291,292} Weitere Gründe für die sinkende Steifigkeit und Elastizität können zunehmende Inhomogenitäten oder Phasentrennungen im Gel durch die Änderung der Polymermengen sein.^{232,293}

Die Auswertung der Amplitudentests der RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele ergab mit steigendem RGD-Anteil einen leichten Anstieg des Speichermoduls G'_{LVE} von 506 ± 51 Pa (**GdRGD3**) bis 591 ± 8 Pa (**GdRGD1**). Außerdem wurde eine leichte Abnahme des Verlustfaktors von $\tan\delta_{LVE} = 0,295 \pm 0,000$ (**GdRGD3**) auf $\tan\delta_{LVE} = 0,270 \pm 0,005$ (**GdRGD1**) festgestellt. Diese Zunahme an Steifigkeit und Elastizität mit steigendem RGD-Anteil verdeutlicht, dass die kovalente Vernetzung durch die RGD-Peptide nicht beeinträchtigt wird und es zu einer leichten Steigerung der Vernetzung durch zusätzliche Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken zwischen den Peptiden kommt. Ein Vergleich der Hydrogele **GdRGD1-3** mit dem nicht RGD-funktionalisierten dualen Hydrogel **Gd2.4** mit vergleichbarer Vernetzungsdichte bestätigt diese Beobachtung, denn das Speichermodul von **Gd2.4** liegt mit $G'_{LVE} = 550 \pm 80$ Pa im Rahmen der Werte von **GdRGD1-3** und der Verlustfaktor liegt mit $\tan\delta_{LVE} = 0,335 \pm 0,018$ sogar oberhalb der Verlustfaktoren von **GdRGD1-3**. Damit wurde die Steifigkeit durch den Einbau der RGD-Peptide nicht signifikant verändert und die Elastizität sogar leicht erhöht.

Da die drei RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele ähnliche mechanische Eigenschaften aufweisen, besteht eine gute Vergleichbarkeit dieser drei Hydrogele in den späteren Zellexperimenten.

Über oszillatorische Frequenztests sollte das zeitabhängige mechanische Verhalten der Hydrogele untersucht werden, da dieses sich bei physikalischen und chemischen Hydrogelen typischerweise unterscheidet. Während G' und G'' bei physikalischen Hydrogelen ein frequenzabhängiges Verhalten zeigen, sind sie bei chemischen Hydrogelen nicht frequenzabhängig.^{49,294}

Die vier hergestellten physikalischen Kontrollgele **KG3.4-10** zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur ein deutliches frequenzabhängiges Verhalten und weisen einen Sol-Gel-Übergang

bei Frequenzen zwischen $f_{co} = 1,9 \pm 0,3$ Hz (**KG3.10**) und $f_{co} = 2,3 \pm 0,03$ Hz (**KG3.6**) auf (Abbildung 42).

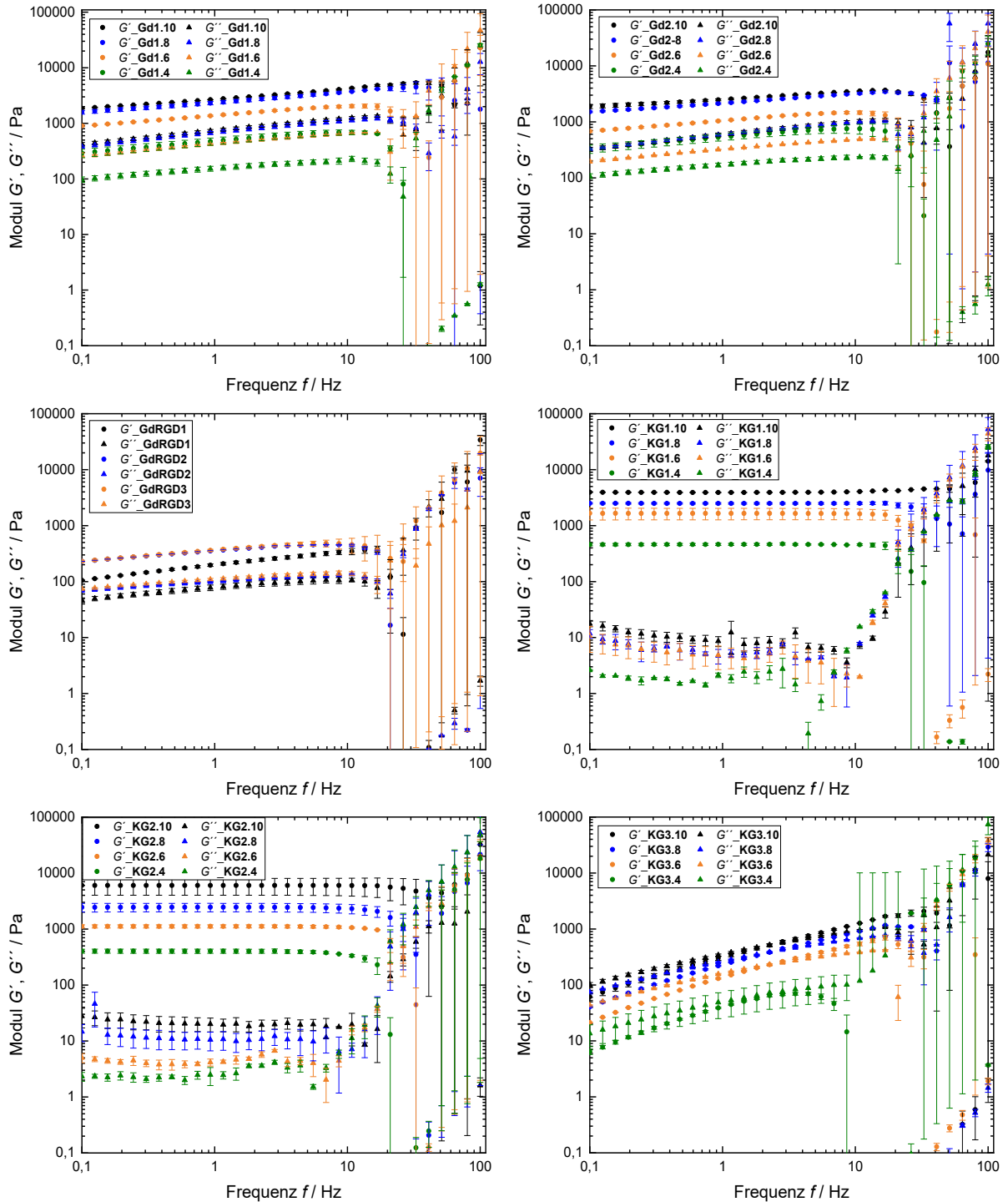


Abbildung 42: Frequenztests der dual-vernetzten Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), der RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und der Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C.

Lediglich das physikalische Kontrollgel mit der niedrigsten Gesamtpolymerkonzentration von 4 Gew.-% weist keinen Sol-Gel-Übergang auf, es zeigt auch bei höheren Frequenzen ein viskoelastisches Flüssigkeitsverhalten auf. Dies bedeutet, dass so wenig Netzpunkte vorhanden sind, dass sich die Polymerketten auch bei schneller Deformation entknäuelen und aneinander vorbeibewegen können.

Bei den dual-vernetzten Hydrogelen **Gd1.4-10**, **Gd2.4-10** und **GdRGD1-3** sind G' und G'' weniger stark frequenzabhängig und der Sol-Gel-Übergang liegt unterhalb des gemessenen Frequenzbereichs. Je weiter der Sol-Gel-Übergang eines Materials zu niedrigeren Frequenzen verschoben ist, desto stärker ist das Material vernetzt.⁴⁹ Bei den dualen Hydrogelen liegt schon bei niedrigen Frequenzen ein Gelverhalten vor, was bedeutet, dass die Polymerketten so stark vernetzt und dadurch in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind, dass die Polymere schon bei langsamer Deformation nicht mehr genug Zeit haben, sich zu entknäuelen und aneinander vorbeizugleiten.²⁹⁵

Bei den kovalenten Kontrollgelen treten ebenfalls keine Sol-Gel-Übergänge auf. Außerdem verlaufen das Speicher- und das Verlustmodul frequenzunabhängig bis die Gelstruktur bei hohen Frequenzen zerstört wird. Dieses frequenzunabhängige Verhalten beweist die rein kovalente Vernetzung der Hydrogele und verdeutlicht den Unterschied zu den dualen Hydrogelen, deren Frequenzabhängigkeit den Erhalt der dynamischen Netzwerkstruktur nachweist, trotz deutlicher Stabilisierung durch die kovalente Vernetzung.

Da die Selbstheilung eine wichtige Eigenschaft der Hydrogele ist, um die Zellmigration und Proliferation zu erleichtern oder eine Injizierbarkeit der Hydrogele zu ermöglichen, wurde mithilfe von Selbstheilungstests untersucht, inwieweit die Selbstheilungsfähigkeit bei den dualen Hydrogelen erhalten bleibt. Dabei wurde die prozentuale Selbstheilung des Speichermoduls G' über vier Zerstörungs-Erholungs-Zyklen bestimmt (Tabelle 21). Die dazugehörigen Selbstheilungsgraphen befinden sich im Anhang (Abbildungen A36-A39).

Bei allen untersuchten Hydrogelen ist eine Erholung des Speichermoduls auch im vierten Zerstörungs-Erholungs-Zyklus zu erkennen. Die beste Selbstheilung zeigten die vier physikalischen Kontrollgele mit mindestens 93 % Regeneration des Speichermoduls im vierten Zyklus. Die Selbstheilung der dual-vernetzten Hydrogele sinkt vor allem im ersten Zyklus und nimmt in den nachfolgenden Zyklen nur noch geringfügig ab. Dies deutet darauf hin, dass ein Teil der Vernetzungen nicht oder nur über einen längeren Zeitraum hinweg wiederhergestellt werden kann. Gründe dafür sind die höhere Steifigkeit und die permanenten Vernetzungen der dualen Hydrogele, die die Beweglichkeit der Polymerketten einschränken und somit verhindern, dass Energie durch Molekularbewegung dissipiert wird und sich alle Wirt-Gast-

Komplexe innerhalb der Erholungsphase wieder ausbilden. Außerdem kann es aufgrund des hohen kovalenten Anteils zu irreversiblen Brüchen in der Netzwerkstruktur kommen.^{296–298}

Tabelle 21: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die dualen Hydrogele und die physikalischen Kontrollgele.

Hydrogel	Selbstheilung von G' / %				
	Zyklus 0	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
Gd1.4	100	77 ± 19	78 ± 22	72 ± 20	72 ± 19
Gd1.6	100	38 ± 0	37 ± 2	19 ± 5	17 ± 6
Gd1.8	100	39 ± 10	32 ± 7	29 ± 5	27 ± 3
Gd1.10	100	35 ± 0	27 ± 0	21 ± 2	20 ± 2
Gd2.4	100	57 ± 3	48 ± 0	50 ± 2	36 ± 2
Gd2.6	100	59 ± 18	54 ± 20	55 ± 15	55 ± 10
Gd2.8	100	20 ± 3	13 ± 2	8 ± 0	5 ± 0
Gd2.10	100	42 ± 4	34 ± 4	31 ± 5	30 ± 5
GdRGD1	100	84 ± 6	77 ± 15	72 ± 12	69 ± 13
GdRGD2	100	82 ± 19	85 ± 14	89 ± 15	89 ± 15
GdRGD3	100	100 ± 12	92 ± 3	82 ± 6	79 ± 7
Physikalische Kontrollgele					
KG3.4	100	94 ± 0	96 ± 0	94 ± 0	93 ± 0
KG3.6	100	98 ± 0	97 ± 0	96 ± 1	95 ± 2
KG3.8	100	98 ± 0	97 ± 0	96 ± 1	94 ± 1
KG3.10	100	97 ± 1	96 ± 1	95 ± 1	94 ± 2

^a bestimmt über oszillatorische Zeitmessungen bei abwechselnd geringer (0,5 %) und hoher (500,0 %) Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 25 °C. Das Speichermodul G' in Zyklus 0 wurde auf 100 % gesetzt und die prozentuale Erholung von G' in den nachfolgenden Zyklen mit geringer Scherdeformation wurde im Verhältnis zu Zyklus 0 berechnet.

Darüber hinaus fällt bei den dualen Hydrogelen auf, dass die Selbstheilung mit sinkender Gesamtpolymerkonzentration zunimmt. Diese Beobachtung ist konträr zu den Trends der physikalischen Hydrogele in den vorherigen Kapiteln, bei denen eine höhere Polymerkonzentration zu einer schnelleren Wiederherstellung der Wirt-Gast-Komplexe geführt hatte. Bei den dualen Hydrogelen hingegen scheint der Einfluss der Steifigkeit den der Konzentration zu überwiegen. Die drei RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele, die alle eine niedrige Gesamtpolymerkonzentration von 4 Gew.-% besitzen, zeigen mit bis zu 89 % im vierten Zyklus ebenfalls eine hohe Regeneration von G' . In den weicheren Hydrogelen sind schnellere Molekularbewegungen und dadurch ein schnelleres Aufeinandertreffen der Wirt-

und Gastmoleküle möglich, wodurch dissoziierte Komplexe in kürzerer Zeit wieder ausgebildet werden können.^{97,299}

Mit den kovalenten Kontrollgelen wurden keine Selbstheilungstests vorgenommen, da diese nach den Amplitudentests makroskopisch zerstört vorlagen.

Zusätzlich wurde die Selbstheilungsfähigkeit der dualen Hydrogele im Vergleich zu den kovalenten Hydrogelen visualisiert (Abbildung 43), indem ein dual-vernetztes Hydrogel (**Gd2.4**) und ein vergleichbares kovalentes Kontrollgel (**KG2.4**) jeweils in zwei verschiedenen Farben hergestellt wurden. Eines der Gele wurde jeweils mit Phenolrot angefärbt, während das andere nicht angefärbt wurde.

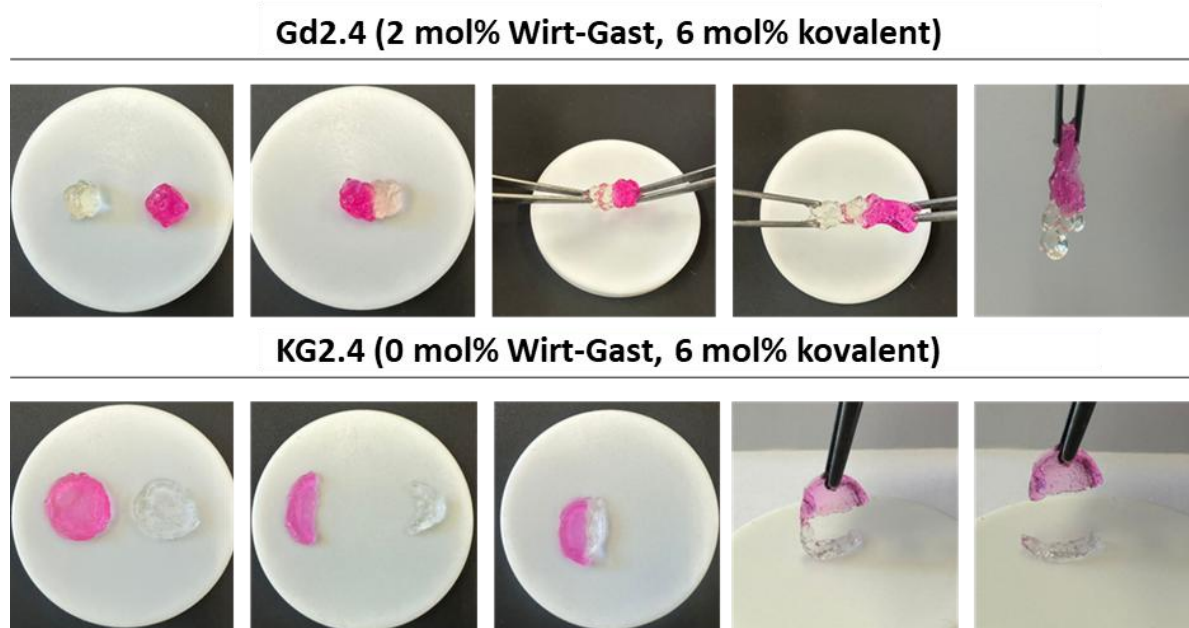


Abbildung 43: Visualisierung der selbstheilenden Eigenschaften des dualen Hydrogels **Gd2.4** im Vergleich zu dem kovalenten Kontrollgel **KG2.4** durch Zusammenschieben und anschließendes Auseinanderziehen der Hydrogelstücke.

Anschließend wurden das angefärbte und das farblose Gel direkt nebeneinandergelegt, damit sich an der Grenzfläche zwischen den beiden Gelen Vernetzungen ausbilden können. Nach einer Wartezeit von wenigen Minuten wurde versucht, die beiden Gelstücke auseinanderzuziehen, dabei konnte bei dem dualen Hydrogel eine Verbindung der beiden Gelstücke festgestellt werden, die die selbstheilenden Eigenschaften der dualen Hydrogele bestätigt. Das kovalente Kontrollgel hingegen zerriss direkt beim Anheben der Probe, wodurch die erwartete Abwesenheit der selbstheilenden Eigenschaften verdeutlicht wird.

5.6 Untersuchung der Gelierzeiten der dualen Hydrogele

Für die Anwendung der hergestellten Hydrogele in 3D-Zellexperimenten ist eine zügige Gelierung von Bedeutung, um das Absetzen der Zellen auf dem Plattenboden während des Gelierungsprozesses zu unterbinden. Daher sollte die Gelierung innerhalb weniger Minuten ablaufen. Bei den kovalenten Hydrogelen stellt die Gelierzeit aufgrund der nicht vorhandenen selbstheilenden Eigenschaften zusätzlich die maximale Verarbeitungszeit dar. Zur Bestimmung der Gelierzeit t_{Gel} ausgewählter Hydrogele wurden oszillatorische Zeitmessungen direkt nach dem Vermischen der Polymerlösungen über eine Zeitspanne von 30 min bei konstanter Frequenz von $f = 1$ Hz und konstanter Scherdeformation von $\gamma = 1\%$ durchgeführt. Die Zeitmessungen des dualen Hydrogels **Gd1.4** (2 mol% Wirt-Gast, 3 mol% kovalent) und des kovalenten Kontrollgels **KG2.10** (0 mol% Wirt-Gast, 6 mol% kovalent) sind beispielhaft in Abbildung 44 dargestellt. In den Zeitmessungen sind jeweils ein Ansteigen von G' und G'' sowie ein Sol-Gel-Übergang zu erkennen. Durch Ablesen der Zeit, zu der der Sol-Gel-Übergang auftritt, wurde die Gelierzeit t_{Gel} bestimmt. Die Zeitmessungen der übrigen Hydrogele befinden sich im Anhang (Abbildung A40).

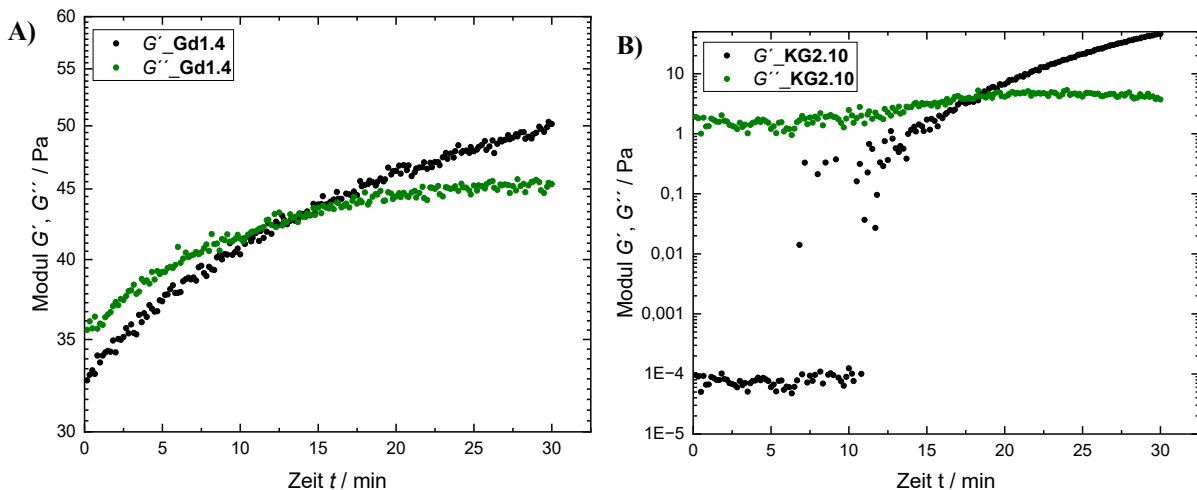


Abbildung 44: Exemplarische Auftragung des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' gegen die Zeit t für das (A) duale Hydrogel **Gd1.4** (2 mol% Wirt-Gast, 3 mol% kovalent) und das (B) kovalente Kontrollgel **KG2.10** (0 mol% Wirt-Gast, 6 mol% kovalent) aufgenommen direkt nach dem Mischen der Polymerlösungen zur Bestimmung der Gelierzeit bei einer Scherdeformation von $\gamma = 1\%$, einer Frequenz von $f = 1$ Hz und einer Temperatur von $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Anhand der ermittelten Gelierzeiten ist zu erkennen, dass die dualen Hydrogele mit 6 mol% kovalentem Vernetzer erwartungsgemäß etwas schneller gelieren als die mit 3 mol% kovalentem Vernetzer (Tabelle 22).

Bei den kovalenten Kontrollgelen hingegen wurde kein Unterschied der Gelierzeiten bezüglich des Vernetzeranteils festgestellt. Stattdessen fällt auf, dass die kovalenten Kontrollgele mit höheren Gesamtpolymerkonzentrationen (**KG1.10** und **KG2.10**) schneller gelieren als die mit niedrigerer Gesamtpolymerkonzentration (**KG1.4** und **KG2.4**). Dies kann mit einer höheren Stoßwahrscheinlichkeit der funktionellen Gruppen bei höherer Polymerkonzentration begründet werden. Dass dieser Trend bei den dual-vernetzten Hydrogelen nicht auftritt, und die Gelierung schneller abläuft, kann mit der sofortigen Ausbildung der physikalischen Vernetzung begründet werden, durch die der Abstand zwischen den funktionellen Gruppen verringert wird. Auffällig ist die besonders kurze Gelierzeit des RGD-funktionalisierten dualen Hydrogeles **GdRGD1**. Diese deutet auf die Anwesenheit zusätzlicher physikalischer Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken hin, die sich sofort ausbilden.

Tabelle 22: Die Gelierzeiten t_{Gel} der dualen Hydrogele und kovalenten Kontrollgele ermittelt über oszillatorische Zeitmessungen bei einer Scherdeformation von $\gamma = 1\%$, einer Frequenz von $f = 1\text{ Hz}$ und einer Temperatur von 25 °C .

	Gd1.10	Gd1.4	Gd2.10	Gd2.4	GdRGD1
$t_{\text{Gel}} / \text{min}$	17	15	13	13	< 1
	Kontrollgele				
	KG1.10	KG1.4	KG2.10	KG2.4	
$t_{\text{Gel}} / \text{min}$	18	> 30	18	> 30	

Für die physikalischen Kontrollgele wurden die Gelierzeiten nicht bestimmt, da sie im Amplitudentest kein Gerverhalten zeigten.

Mit Blick auf eine Anwendung der dualen Hydrogele in Zellexperimenten stellen die gemessenen Gelierzeiten von 13 min zu hohe Werte dar. Allerdings weisen die dualen Hydrogele im Vergleich zu den kovalenten Kontrollgelen (Abbildung 44) dank der sofortigen Wirt-Gast-Vernetzung schon zu Beginn der Zeitmessung deutlich höhere Steifigkeiten und Elastizitäten auf, die bereits ausreichen, um die Zellen zu stabilisieren, sodass diese nicht absinken.

5.7 Untersuchung der Quellwerte der dualen Hydrogele

Ergänzend zu der rheologischen Charakterisierung wurde auch das Quellverhalten der dualen Hydrogele und der kovalenten Kontrollgele charakterisiert, da dieses Rückschlüsse auf die Vernetzungsdichte und die Hydrophilie der Hydrogele zulässt. Zur Bestimmung des Quellwertes Q_m wurden das Gewicht des in PBS-Puffer über 24 h gequollenen Geles m_s und das Trockengewicht m_d des Geles bestimmt und über Gleichung 7 miteinander verrechnet.³⁰⁰

$$Q_m = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (7)$$

Die ermittelten Quellwerte Q_m wurden für die acht dualen Hydrogele ohne RGD-Funktionalisierung (**Gd1.4-10**, **Gd2.4-10**) und die kovalenten Kontrollgele (**KG1.4-10**, **KG2.4-10**) gegen die Gesamtpolymerkonzentration β (Abbildung 45A) und für die RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele (**GdRGD1-3**) gegen den RGD-Anteil im Polymer aufgetragen (Abbildung 45B). Für die physikalischen Kontrollgele konnten keine Quellwerte bestimmt werden, weil sich diese in einem Überschuss an Lösungsmittel auflösen.

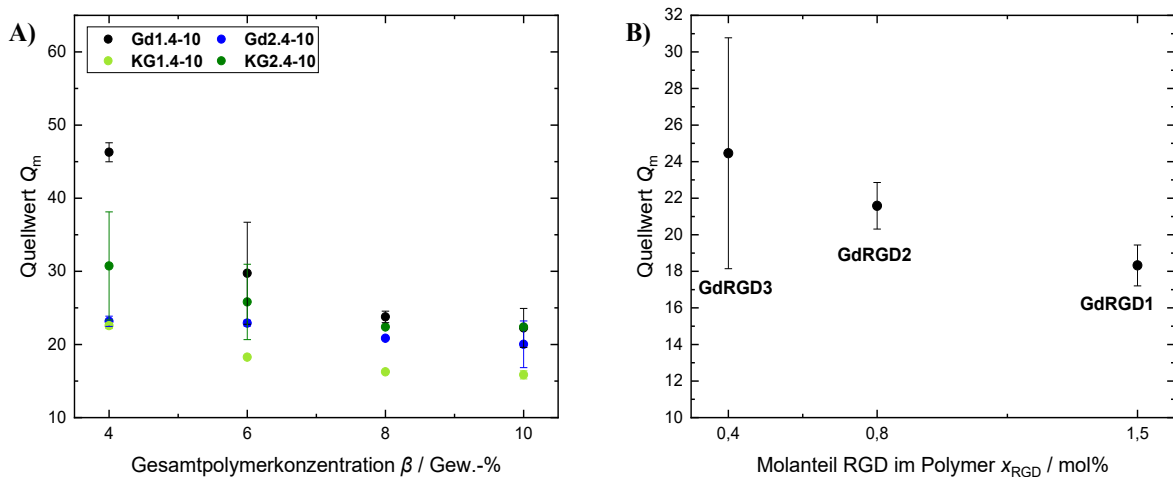


Abbildung 45: Auftragung der Quellwerte Q_m gegen die Gesamtpolymerkonzentration β für die dual-vernetzten Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und die Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) (A) sowie die Auftragung der Quellwerte Q_m gegen den RGD-Anteil im Polymer für die RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) bestimmt nach 24-stündiger Quellung in PBS-Puffer bei 37 °C.

In Abbildung 45A) ist eine Abnahme der Quellwerte der dualen Hydrogele und der kovalenten Kontrollgele mit steigender Gesamtpolymerkonzentration zu erkennen. Dies deutet auf eine steigende Vernetzungsdichte der höher konzentrierten Hydrogele hin, denn stärker vernetzte Hydrogele können aufgrund der engeren Maschendichte weniger Wasser aufnehmen.²⁸³

Außerdem liegen die Quellwerte der kovalenten Kontrollgele unterhalb der Werte der dualen Hydrogele, was die höhere Vernetzungsdichte in Übereinstimmung mit den Rheologieergebnissen bestätigt.

Die Quellwerte der RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele **GdRGD1-3** sinken mit zunehmendem RGD-Anteil. Da die Steifigkeit und die Elastizität dieser Hydrogele jedoch nur geringfügig mit zunehmendem RGD-Anteil gestiegen sind, stellt eine steigende Vernetzungsdichte keine hinreichende Erklärung für die Abnahme der Quellwerte dar. Stattdessen kann dieser Trend auf die Reduktion der Hydrophilie des Hydrogels durch die Peptidliganden zurückgeführt werden.

5.8 Untersuchung der Mikrostruktur der dualen Hydrogele

Um einen Überblick über die Mikrostruktur der dualen Hydrogele und der Kontrollgele zu bekommen, wurden ausgewählte Proben über Rasterelektronenmikroskopie untersucht.

Es wurden die vier dualen Hydrogele mit 6 mol% kovalentem Vernetzer (**Gd2.4-10**) untersucht, um einen möglichen Trend der Porengröße in Abhängigkeit der Gesamtpolymerkonzentration herauszustellen. Zum Vergleich wurde von den anderen Hydrogelgruppen jeweils eine Probe untersucht.

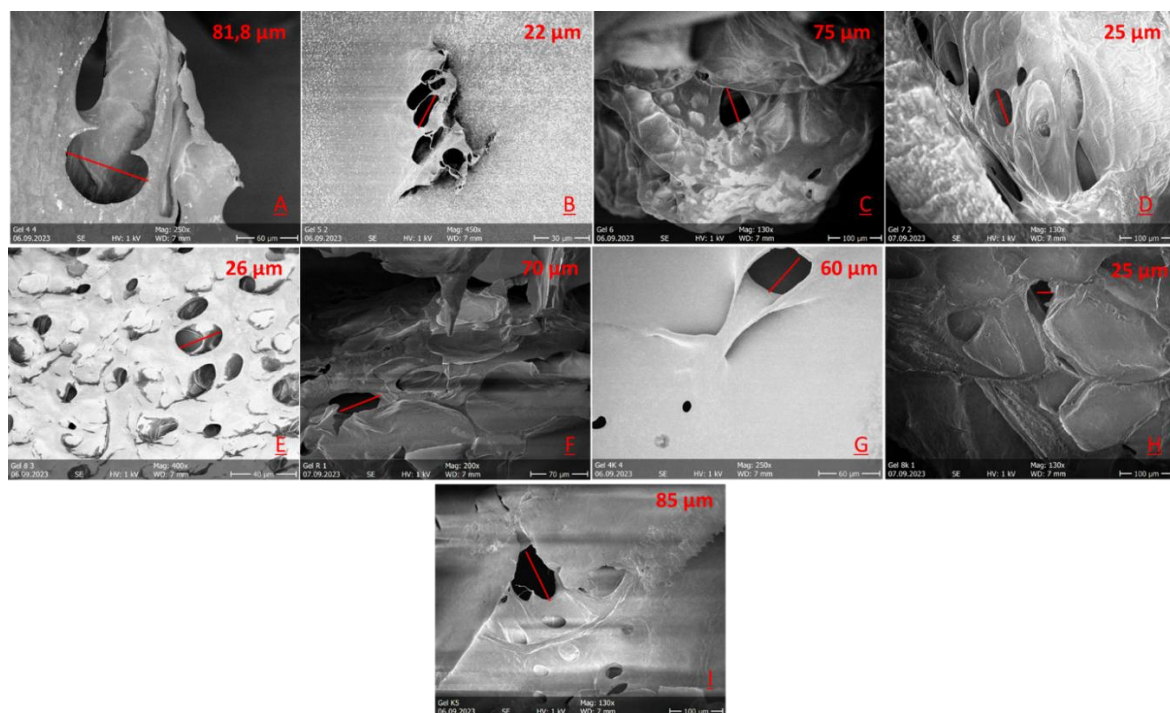


Abbildung 46: REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Hydrogele **Gd1.4 (A)**, **Gd2.10 (B)**, **Gd2.8 (C)**, **Gd2.6 (D)**, **Gd2.4 (E)**, **GdRGD1 (F)**, **KG1.4 (G)**, **KG2.4 (H)**, **KG3.10 (I)**.

Wie in Abbildung 46 zu erkennen ist, zeigen die erhaltenen REM-Aufnahmen poröse innere Strukturen der Hydrogele, allerdings ist kein Trend bezüglich der Gesamtpolymerkonzentration ersichtlich. Generell stellen sich die inneren Strukturen der untersuchten Hydrogele eher inhomogen dar, wodurch der Vergleich der Hydrogele erschwert wird, dennoch weisen alle untersuchten Hydrogele Poren mit einer Größe von über 22 μm auf. Sie bieten damit die Möglichkeit für eine ausreichende Diffusion zur Nährstoffversorgung von Zellen.^{205,207} Außerdem liegen die Porengrößen aller untersuchten Hydrogele in derselben Größenordnung, es sind folglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den physikalischen, dualen und chemischen Hydrogelen festzustellen.

5.9 Zytotoxizität der Wirt- und Gastpolymere

Im Hinblick auf die Anwendung der hergestellten Hydrogele in Zellexperimenten sollte die Zytotoxizität der zur Hydrogelsynthese eingesetzten Polymere untersucht werden. Dafür wurde analog zu Abschnitt 3.4 ein CCK-8-Assay durchgeführt, über den die relative Zellviabilität von COS-7-Zellen nach 24-stündiger Inkubation in den einzelnen Polymerlösungen mit Konzentrationen von 0,25 mg/mL bis 4 mg/mL bestimmt werden konnte. Als Referenzlösung wurde dabei serumhaltiges Kulturmedium ohne Polymer verwendet. Die erhaltenen relativen Zellviabilitäten der fünf untersuchten Polymere **PCD8**, **PAd_{kat}2**, **PAd_{kat}SH3**, **PAd_{kat}SH4** und **PAd_{kat}SHRGD** sind in Abbildung 47 in Abhängigkeit der verwendeten Polymerkonzentrationen aufgetragen.

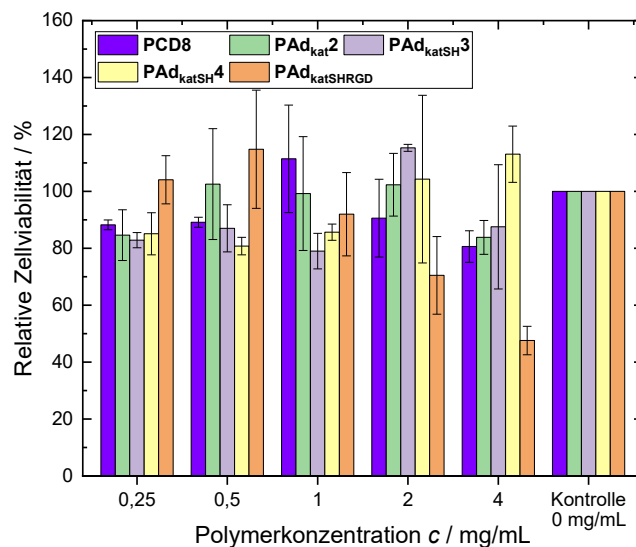


Abbildung 47: Auftragung der Zellviabilität von COS-7-Zellen gegen die Polymerkonzentration der Polymere **PCD8**, **PAd_{kat}2**, **PAd_{kat}SH3**, **PAd_{kat}SH4** und **PAd_{kat}SHRGD** nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ bestimmt mittels CCK-8-Assay.

Für alle Polymere mit Ausnahme von **PAd_{kat}SHRGD** wurde in den untersuchten Polymerkonzentrationen eine relative Zellviabilität von über 80 % ermittelt, wodurch eine gute Zytokompatibilität der Polymere bestätigt wird. Bei Polymer **PAd_{kat}SHRGD** allerdings fällt die relative Zellviabilität bei einer Konzentration von 4 mg/mL auf 48 ± 5 % ab. Ein möglicher Grund dafür kann die nicht vollständige Entfernung von Verunreinigungen bei der Dialyse sein.

5.10 3D-Zellexperimente – Zytokompatibilität und Adhäsionsverhalten in den dualen Hydrogelen und den Kontrollgelen

Um die allgemeine Eignung der dualen Hydrogele für 3D-Zellexperimente zu testen und den Einfluss der dualen Vernetzung auf das Zellverhalten zu untersuchen, wurden B16F1-Zellen sowohl in die dualen Hydrogele als auch in die physikalischen und kovalenten Kontrollgele eingebettet. Die dreidimensionale Einbettung der Zellen erfolgte analog zu dem in Kapitel 4 beschriebenen Vorgang, indem die Zellen zunächst in die Adamantan-Polymerlösung eingemischt und anschließend die übrigen Polymerlösungen hinzugegeben und miteinander vermischt wurden. Dabei war für die kovalenten Kontrollgele die in Abschnitt 5.6 bestimmte Gelierzeit zu beachten, um ein Absinken der Zellen zu vermeiden. Die mit den Zellen vermischten Polymerlösungen wurden deshalb in regelmäßigen Zeitabständen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt bis das Einsetzen der Gelierung durch eine Erhöhung der Viskosität festgestellt wurde. Die Präparation der dualen und physikalischen Hydrogele stellte sich weniger aufwendig dar, da die sofortige Ausbildung der Wirt-Gast-Vernetzungen zu einer ausreichenden Viskosität geführt hat, um das Absinken der Zellen zu verhindern. Als Referenz wurden außerdem B16F1-Zellen in Matrigel eingebettet. Nach erfolgter dreidimensionaler Einbettung wurden die Zellen für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert, bevor sie über Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie untersucht wurden.

Zu den untersuchten Parametern gehörten erneut die mithilfe einer Lebend-Tot-Färbung bestimmte Zellviabilität und der über Durchlichtaufnahmen ermittelte prozentuale Anteil adhärenter Zellen. Beispielhaft ist in Abbildung 48 eine repräsentative 3D-Projektion einer Fluoreszenzaufnahme des dualen Hydrogeles **Gd1.8** nach Lebend-Tot-Färbung der B16F1-Zellen abgebildet.

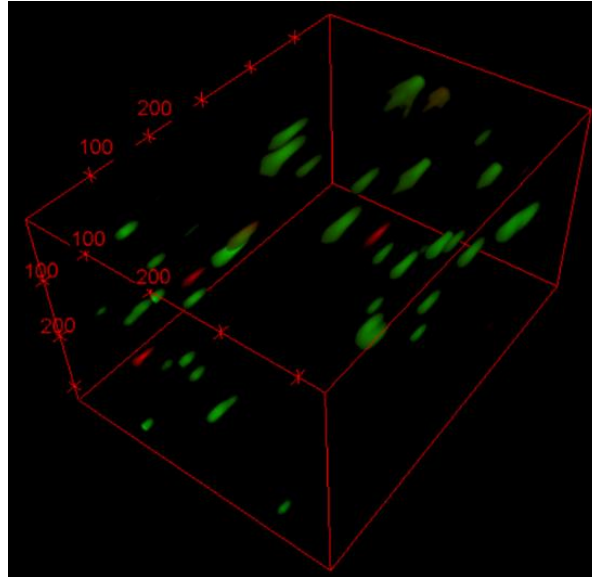


Abbildung 48: Repräsentative 3D-Projektion von B16F1-Zellen in dem dualen Hydrogel **Gd1.8** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) mit Lebend-Tot-Färbung nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Die lebenden B16F1-Zellen sind mit Calcein AM (grün) und die toten Zellen mit PI (rot) angefärbt.

Zu erkennen ist eine gleichmäßige dreidimensionale Verteilung der B16F1-Zellen sowie ein Überwiegen an lebenden (grün) gegenüber toten Zellen (rot), das auf eine gute Biokompatibilität des Hydrogels hindeutet.

Außerdem sind in Abbildung 49 Ausschnitte aus den 3D-Durchlichtaufnahmen beispielhaft für die 4 Gew.-%igen dualen Hydrogele und Kontrollgele gezeigt, um die Morphologie der B16F1-Zellen zu visualisieren. Ein Großteil der Zellen weist eine runde Morphologie auf, während die gelb markierten Zellen Protrusionen ausgebildet haben und somit als adhärenente Zellen betrachtet werden können.²⁶⁹

Die anhand der Fluoreszenzaufnahmen ermittelte Anzahl lebender und toter Zellen ist in der Abbildung 50A) für alle hergestellten Hydrogele dargestellt und der mithilfe von Durchlichtaufnahmen bestimmte Anteil adhärenente von lebenden Zellen ist in Abbildung 50B) für die verschiedenen Hydrogele aufgetragen. Alle Ergebnisse sind Mittelwerte aus insgesamt acht 3D-Aufnahmen, die in zwei biologischen Replikaten aufgenommen wurden.

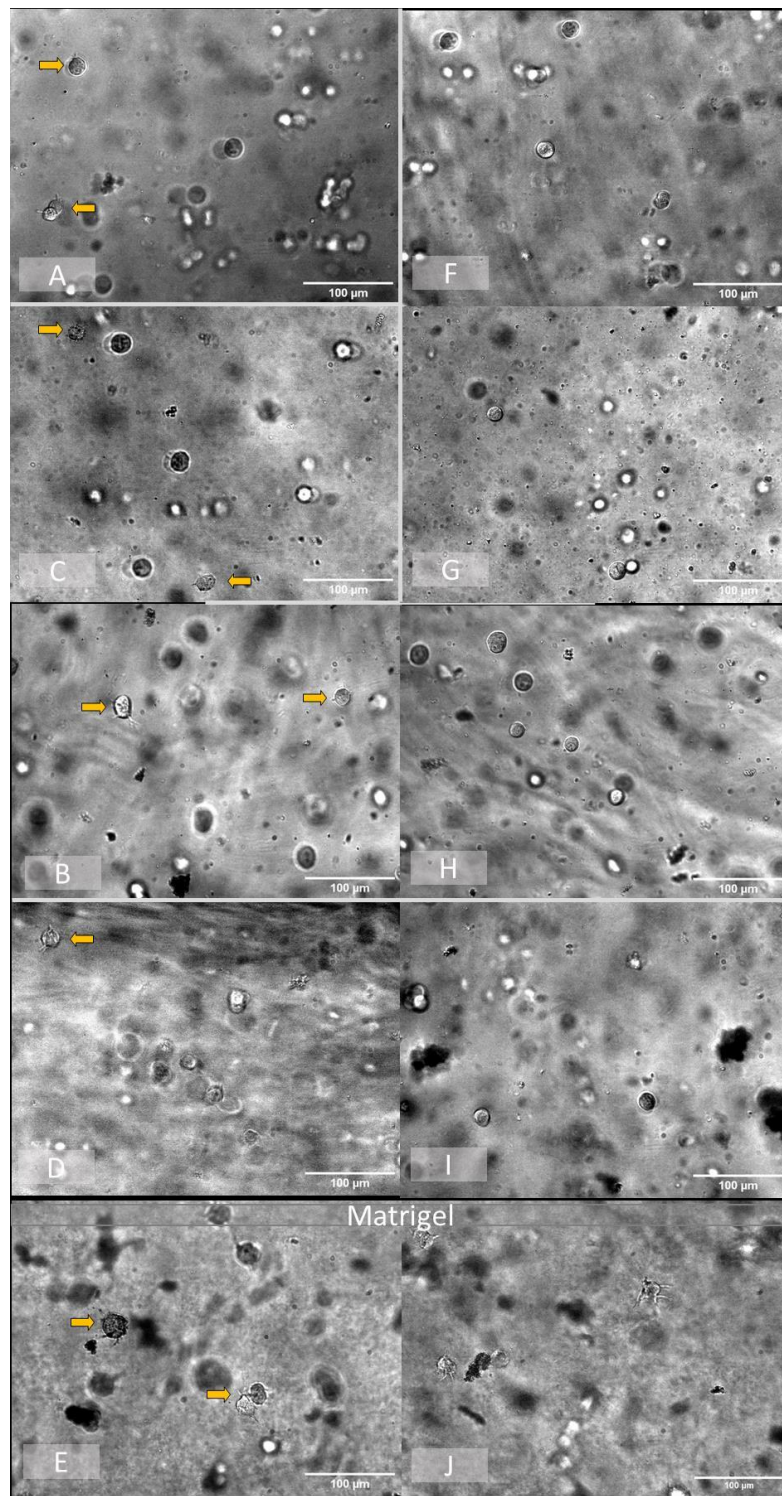


Abbildung 49: Beispielhafte Durchlichtaufnahmen von B16F1-Zellen in den Hydrogelen (A) **KG3.4** (2 mol% Wirt-Gast, 0 mol% kovalent), (B) **GdRGD2** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 0,8 mol% RGD), (C) **GdRGD1** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 1,5 mol% RGD), (D) **GdRGD3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 0,4 mol% RGD), (F) **Gd1.4** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), (G) **KG1.4** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), (H) **Gd2.4** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), (I) **KG1.4** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und (E/J) Matrigel nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit gelber Markierung der adhärenente Zellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl an lebenden Zellen in allen hergestellten Hydrogelen die Anzahl der toten Zellen übersteigt. Ein Vergleich der dualen Hydrogelgruppen mit 3 mol% (**Gd1.4-10**) bzw. 6 mol% (**Gd2.4-10**) kovalentem Vernetzer zeigt eine um 11-90 % höhere Anzahl lebender Zellen bei den Hydrogelen mit dem niedrigeren Anteil an kovalentem Vernetzer (**Gd1.4-10**). Die Anzahl lebender Zellen in den acht kovalenten Kontrollgelen (**KG1.4-10** und **KG2.4-10**) ist vergleichbar mit der in den vier dualen Hydrogelen mit 6 mol% kovalentem Vernetzer (**Gd2.4-10**). In den physikalischen Kontrollgelen mit 6-10 Gew.-% Gesamtpolymerkonzentration (**KG3.6-10**) liegt die Anzahl lebender Zellen in einem ähnlichen Bereich wie in den dualen Hydrogelen mit 3 mol% kovalentem Vernetzer (**Gd1.4-10**). Lediglich die Anzahl lebender Zellen in dem 4 Gew.-%igen physikalischen Kontrollgel **KG3.4** liegt signifikant höher. Mit 570 ± 128 lebenden Zellen weist **KG3.4** die insgesamt höchste Proliferation auf. Bei den RGD-funktionalisierten dualen Hydrogelen ist ein Anstieg der Proliferation mit zunehmender RGD-Konzentration zu beobachten. Außerdem nimmt die Anzahl toter Zellen mit steigender RGD-Konzentration ab.

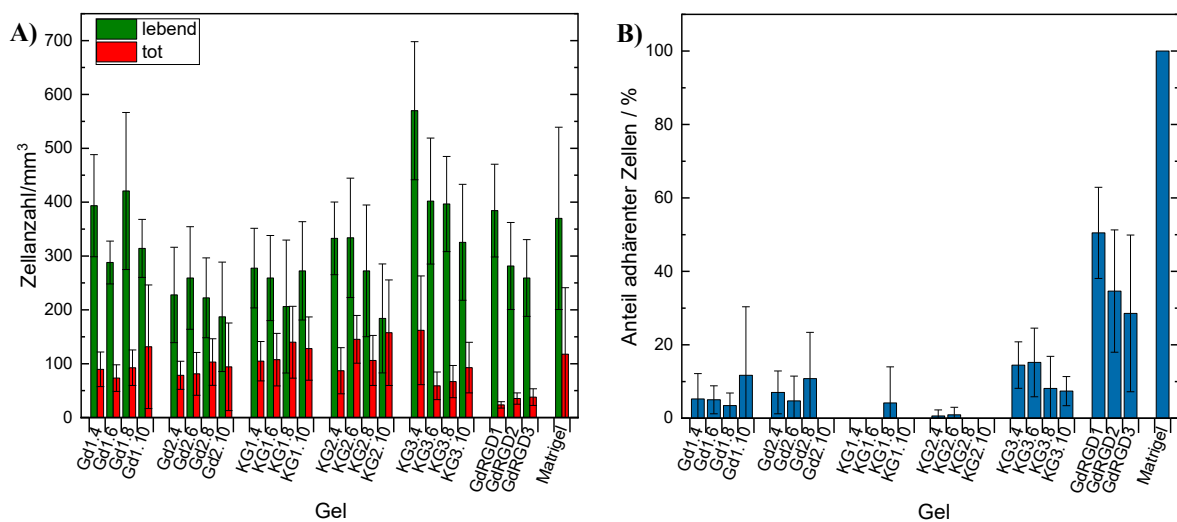


Abbildung 50: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in den dual-vernetzten Hydrogelen **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), den RGD-haltigen dualen Hydrogelen **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und den Kontrollgelen **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent).

Daher zeigen die RGD-funktionalisierten dualen Hydrogele mit 87 ± 5 % lebenden Zellen (**GdRGD1**) bis 94 ± 2 % lebenden Zellen (**GdRGD3**) die beste Viabilität (Tabelle A9). Die Viabilitäten der Zellen in den dualen Hydrogelen mit 3 mol% kovalentem Vernetzer **Gd1.4-10**

und den physikalischen Kontrollgelen **KG3.4-10** liegen mit 75-81 % lebenden Zellen bzw. 78-87 % lebenden Zellen nicht viel niedriger. Im Vergleich dazu sind die B16F1-Zellen in Matrigel zu 79 ± 14 % lebendig. Die Zytokompatibilität der RGD-funktionalisierten Hydrogele und einiger weiterer synthetisierter Hydrogele übersteigt damit sogar die des Matrigels.

Bei Betrachtung der Zelladhäsion in Abbildung 50B) fällt eine Reduktion des Anteils adhärenter Zellen mit zunehmendem Anteil an kovalenter Vernetzung auf. Während die vier dualen Hydrogele mit 3 mol% kovalentem Vernetzer (**Gd1.4-10**) mit 5-12 % adhärenter Zellen noch sehr ähnliche Werte aufweisen wie die vier physikalischen Kontrollgele **KG3.4-10** mit 7-15 % adhärenter Zellen, befinden sich in den dualen Hydrogelen mit 6 mol% kovalentem Vernetzer (**Gd2.4-10**) nur 0-11 % adhärenter Zellen. Außerdem enthalten die am stärksten vernetzten Hydrogele, die kovalenten Kontrollgele **KG1.4-10** und **KG2.4-10**, größtenteils keine adhärenter Zellen. Diese Ergebnisse sprechen für die Vorteile der dynamischen Vernetzung und bestätigen die Hypothese, dass die Proliferation und Adhäsion in dynamischen Hydrogelen erleichtert wird.

Durch den Einbau der RGD-Peptide konnte der Anteil adhärenter Zellen, wie erwartet, erhöht werden. Mit steigender RGD-Konzentration nimmt der Anteil adhärenter Zellen zu, so steigt der Anteil adhärenter Zellen von 29 ± 21 % bei **GdRGD3** (0,4 $\mu\text{mol/mL}$ RGD) auf 35 ± 17 % bei **GdRGD2** (0,8 $\mu\text{mol/mL}$ RGD) und um weitere 15 % auf 50 ± 12 % bei **GdRGD1** (1,6 $\mu\text{mol/mL}$ RGD).

Insgesamt zeigen die Untersuchungen eine Abnahme der Proliferation, der Viabilität und der Adhäsion durch den Einbau von kovalenten Vernetzungen. Diese Beobachtungen lassen auf eine Bevorzugung von weicheren und dynamischeren Gelen durch die B16F1-Zellen schließen. Erklärt werden können diese Ergebnisse ähnlich wie die Ergebnisse in Abschnitt 4.6 mit einer eingeschränkten Beweglichkeit und höheren mechanischen Beanspruchung der B16F1-Zellen durch die höhere Steifigkeit und Elastizität der stärker vernetzten Hydrogele. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Literatur, in der von JING *et al.* eine reduzierte Zelladhäsion aufgrund einer hohen Elastizität ausgelöst durch kovalente Vernetzungen in einem supramolekularen Hydrogel beobachtet wurde.⁹⁹

5.11 Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel sollten die Steifigkeit und Elastizität der Wirt-Gast-vernetzten Hydrogele durch den Einbau einer zusätzlichen kovalenten Vernetzung erhöht werden, um damit ein breiteres Spektrum an Gewebesteifigkeiten nachahmen zu können. Dabei sollte die auf der

Wirt-Gast-Vernetzung beruhende Fähigkeit zur Selbstheilung erhalten bleiben, um die Proliferation und Ausbreitung von Zellen in den Hydrogelen zu erleichtern. Die Wirt-Gast-Vernetzung wurde über das β -CD-funktionalisierte Wirtpolymer und das Adamantan-funktionalisierte, thiolactonhaltige Gastpolymer realisiert. Die Thiolacton-Einheiten wurden zur Generierung von Thiolgruppen genutzt, um diese sowohl für die zusätzliche kovalente Vernetzung über eine Thiol-MICHAEL-Addition mit PEGDA als auch für die RGD-Funktionalisierung der Polymere einzusetzen. Die Nutzung der Thiolactonmonomere ermöglichte eine synthesearme Einstellung verschiedener Anteile kovalenter Vernetzung, da nur ein Copolymer hergestellt werden musste, dessen Thiolactonringe nach Belieben geöffnet werden konnten. Auf diese Weise wurden zum einen physikalische Hydrogele mit 2 mol% Wirt-Gast-Vernetzung hergestellt, die zum anderen um 3 mol% bzw. 6 mol% kovalente Vernetzung erweitert und in vier Gesamtpolymerkonzentrationen hergestellt wurden. Außerdem wurden kovalente Kontrollgele ohne Wirt-Gast-Vernetzung mit ausschließlich 3 mol% bzw. 6 mol% kovalenter Vernetzung hergestellt, indem die thiolhaltigen Gastpolymere mit dem PEGDA-Vernetzer gemischt wurden.

Der Vergleich der mechanischen Eigenschaften der dualen Hydrogele mit den physikalischen und kovalenten Kontrollgelen zeigte eine erfolgreiche Kombination der beiden Vernetzungsmethoden, da eine deutliche Steigerung der Steifigkeit und Elastizität der dualen Hydrogele im Vergleich zu den physikalischen Kontrollgelen unter Erhalt der dynamischen Eigenschaften festgestellt wurde. Die Steifigkeit der dual-vernetzten Hydrogele mit 3 mol% kovalentem Vernetzer konnte im Vergleich zu den physikalischen Kontrollgelen auf das Neun- bis Zehnfache erhöht werden. Ebenso konnte die Elastizität deutlich gesteigert werden. Über die Erhöhung des Anteils an kovalentem Vernetzer auf 6 mol% konnte allerdings kein weiterer Anstieg der Steifigkeit und Elastizität der dualen Hydrogele erzielt werden. Insgesamt konnten duale Hydrogele mit Steifigkeiten von 497 ± 76 Pa bis 2754 ± 28 Pa hergestellt werden. Die Einstellung der Steifigkeiten der dualen Hydrogele basierte vor allem auf der Änderung der Gesamtpolymerkonzentration. Außerdem konnte die Selbstheilungsfähigkeit der dualen Hydrogele im Gegensatz zu den kovalenten Kontrollgelen sowohl makroskopisch als auch rheologisch nachgewiesen werden, jedoch wurde die Regeneration der Steifigkeit im Vergleich zu den physikalischen Kontrollgelen um 17-78 % reduziert. Interessanterweise wurde bei den dualen Hydrogelen ein Anstieg der Selbstheilung mit sinkender Gesamtpolymerkonzentration bedingt durch die reduzierte Steifigkeit festgestellt. Dies stellt einen Gegensatz zu den physikalischen Hydrogelen dieser Arbeit dar, bei denen eine Abnahme der Selbstheilung mit sinkender Gesamtpolymerkonzentration beobachtet wurde.

Die dreidimensionale Einbettung von B16F1-Zellen in die hergestellten Hydrogele ergab eine gleichmäßige Zellverteilung. Außerdem wurden für die Hydrogele, die eine dynamische Vernetzung enthielten, höhere Proliferationen und Viabilitäten sowie ein größerer Anteil an adhärenen Zellen nachgewiesen als für jene, die ausschließlich kovalent vernetzt waren. Je größer der Anteil an kovalenter Vernetzung wurde, desto weiter nahmen Viabilität und Adhäsion ab. Durch den Einbau von RGD-Peptiden konnten sowohl die Viabilität als auch die Adhäsion verbessert werden, wodurch eine maximale Adhäsion von 50 % der Zellen erreicht wurde.

6. Anwendung der Hydrogele zur Einbettung von Sphäroiden

6.1 Einleitung und Zielsetzung

Als ein Ausblick auf weitere Anwendungen der in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele sollte in diesem Abschnitt die Einbettung von Sphäroiden in die Wirt-Gast-Hydrogele getestet werden. Sphäroide – organähnliche (organoide) Sphären – sind kugelige Zellaggregate, die entstehen, wenn adhärent wachsende Zellen in Suspension kultiviert werden und dann als Wachstumsoberfläche wie im Ursprungstumor andere Zellen anstatt einer Matrix nutzen. Sie können aus unterschiedlichen Zellen und Zelllinien bestehen und sollen das Verhalten des Ursprungstumors oder -gewebes widerspiegeln. Sphäroide sollen *in vitro*-Zellkulturen, die meist auf der Kultivierung einzelner Zellen basieren, die Eigenschaft der Dreidimensionalität verleihen. Damit bieten sie der Untersuchung von Krankheiten, insbesondere von Krebs, eine größere physiologische Relevanz,³⁰¹ denn Tumore sind komplexe, dreidimensionale Gebilde, deren Eigenschaften und Reaktionen auf Medikamente von der Diffusion in das Innere des Tumors und von der Zell-Zell-Interaktion abhängen.^{302,303} Neben der Anwendung in Medikamententests³⁰¹ werden Sphäroide zu Zwecken der Grundlagenforschung genutzt, da sie Untersuchungen der Zell-Zell-Kontakte ermöglichen^{304,305} und bereits zu einem besseren Verständnis der Differenzierung, der Gewebeorganisation und der Homöostase beitragen konnten.³⁰⁶ In Kombination mit der Möglichkeit die Kulturbedingungen anzupassen und zu ergänzen, stellen Sphäroide einen entscheidenden Fortschritt für die Erforschung biologischer Prozesse dar.⁴¹ Allerdings werden Sphäroide vorwiegend in natürlichen Hydrogelen wie Collagen,^{307,308} Matrigel,³⁰⁹ Chitosan³¹⁰ und Agarose^{311,312} kultiviert, die weniger Modifikationsmöglichkeiten und eine schlechtere Reproduzierbarkeit bieten als synthetische Hydrogele.⁵⁶⁻⁵⁸ Da die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele verschiedene Modifikationen hinsichtlich der Mechanik und der biologischen Aktivität ermöglichen, besitzen sie ein Potenzial zur definierten Variation der Kulturbedingungen von Sphäroiden.

Um die Einsatzfähigkeit der Wirt-Gast-Hydrogele zur Einbettung von Sphäroiden zu testen, sollten an dieser Stelle erste Experimente durchgeführt werden, in denen es galt herauszufinden, welche mechanischen Eigenschaften die Hydrogele aufweisen müssen, um die Sphäroide ausreichend zu stabilisieren, sodass diese sich nicht auf dem Plattenboden absetzen, sondern in einer dreidimensionalen Umgebung verbleiben. Das Absetzen der Sphäroide auf dem Plattenboden würde eine ungewollte Änderung der Morphologie und des Migrationsverhaltens

der Sphäroidzellen verursachen, wodurch das natürliche Verhalten der Zellen weniger realistisch abgebildet werden würde.

6.2 Einbettung der Sphäroide in Wirt-Gast-Hydrogele

Für die Untersuchung der Sphäroideinbettung wurden zunächst Sphäroide aus B16F1-Zellen gebildet und diese anschließend in vier Wirt-Gast-Hydrogele mit verschiedenen Gesamtpolymerkonzentrationen und somit vier verschiedenen Steifigkeiten eingebettet. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde mithilfe von Durchlichtmikroskopie überprüft, in welchen der vier Hydrogele die Sphäroide ihre Struktur erhalten konnten und sich nicht am Boden abgesetzt haben.

Die Einbettungsexperimente erfolgten in den vier thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen **KG3.4-10** (Kapitel 5), da diese rein physikalisch vernetzt waren und in den vorausgegangenen Zellexperimenten aufgrund der niedrigen Vernetzungsdichte von 2,3 mol% eine homogene Struktur und gleichmäßige 3D-Verteilung der Zellen sowie eine hohe Zytokompatibilität zeigten. Sie setzten sich aus dem β -CD-funktionalisierten Wirtpolymer **PCD8** und dem Adamantan-funktionalisierten, thiolactonhaltigen Gastpolymer **PAd_{kat}2** zusammen (Abbildung 51) und wurden in den vier Gesamtpolymerkonzentrationen 4, 6, 8 und 10 Gew.-% hergestellt. Außerdem enthielten sie mit dem Monomer TMAEA eine nur leicht adhäsionsfördernde Komponente.

Zur Herstellung der Sphäroide wurden B16F1-Zellen auf einer Agarschicht ausplattiert. Da Agar ein nicht adhäsionsförderndes Substrat darstellt, lagern sich die Zellen nicht an der Agarschicht, sondern an anderen Zellen ab. Die Agarschicht wurde in 96-Well-Platten so ausplattiert, dass sich ein Meniskus bildete, wodurch die Zellen der darauf aufgetragenen Zellsuspension sich aufgrund der Schwerkraft am tiefsten Punkt des Meniskus sammelten und zu kugelförmigen Aggregaten, den Sphäroiden, zusammenlagerten.⁴⁰ Aufgrund der zellabweisenden Eigenschaft von Agar konnten die Sphäroide nach Ablauf der 72-stündigen Inkubationszeit nicht-enzymatisch von der Agarschicht entnommen werden.

Für die dreidimensionale Einbettung der hergestellten Sphäroide wurden zunächst die vier thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele **KG3.4-10** synthetisiert, indem das Wirt- und das Gastpolymer separat in serumfreiem Mikroskopiepuffer gelöst und die Lösungen anschließend gemischt wurden. Die Synthese der Hydrogele erfolgte in serumfreiem Mikroskopiepuffer, da sich Inhaltsstoffe des FBS-Serums in die β -CD-Kavität einlagern und somit die Wirt-Gast-Komplexierung beeinträchtigen können. Um ein Well einer 8-Well-Glasbodenplatte, in der die

Durchlichtmikroskopie-Experimente durchgeführt werden sollten, mit dem Hydrogel zu füllen, wurden 270 μL Hydrogel benötigt. Davon wurden zuerst 100 μL gleichmäßig in einem Well verteilt, bevor 30 μL einer Sphäroidsuspension auf die Hydrogelschicht aufgetragen wurden. Die 30 μL der Sphäroidsuspension enthielten 2-4 Sphäroide, die mit etwas Abstand voneinander auf dem Hydrogel verteilt wurden, damit sie in der Durchlichtmikroskopie einzeln betrachtet und aufgenommen werden konnten. Anschließend wurde das restliche Hydrogel behutsam auf den Sphäroiden verteilt. Die so in das Hydrogel eingebetteten Sphäroide wurden anschließend für 30 min unter Kulturbedingungen inkubiert, sodass das Hydrogel die Sphäroide vollständig umschließen konnte, bevor 160 μL eines serumhaltigen Mikroskopiepuffers hinzugegeben wurden (Abbildung 51).

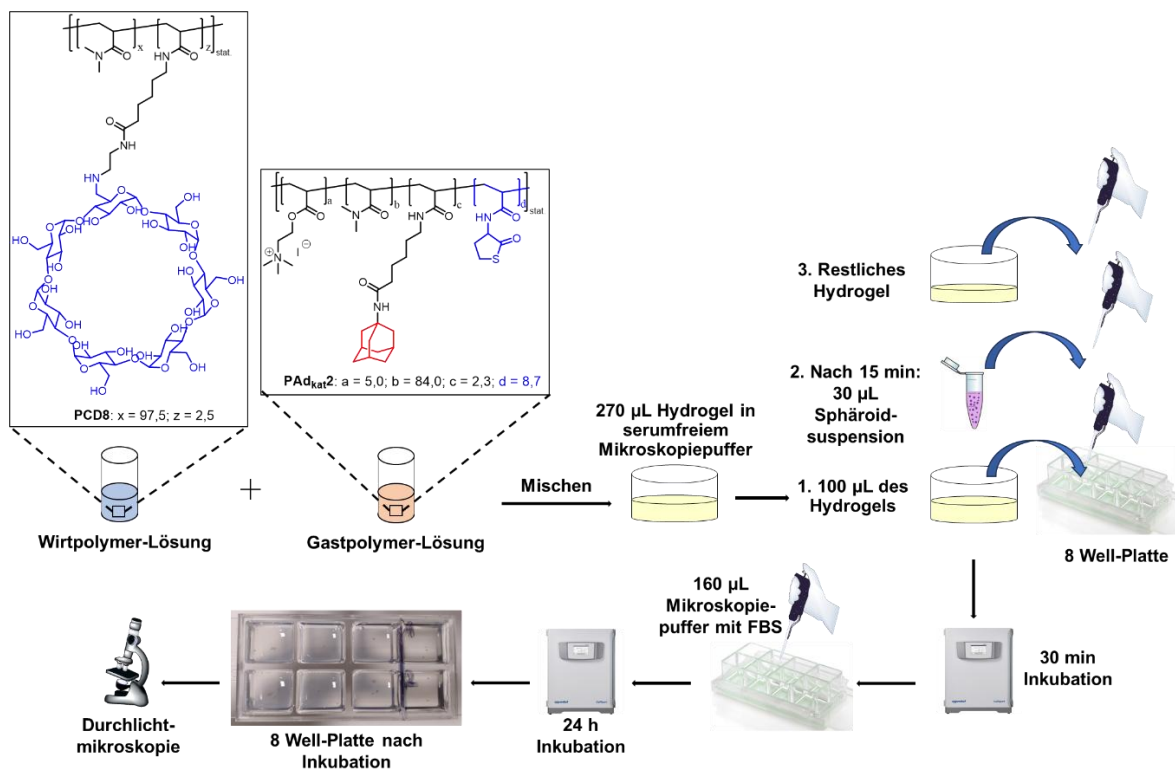


Abbildung 51: Darstellung der Vorgehensweise bei der dreidimensionalen Einbettung von B16F1-Sphäroiden in die Wirt-Gast-Hydrogele KG3.4-10.

Die somit vollständig präparierten Hydrogelproben wurden für 24 h inkubiert und anschließend mithilfe von Durchlichtmikroskopie untersucht. Alle Proben wurden in Duplikaten hergestellt.

6.3 Untersuchung der Sphäroidmorphologie mittels Durchlichtmikroskopie

Um herauszufinden, ob die B16F1-Sphäroide nach der Einbettung und der Inkubation in den Wirt-Gast-Hydrogelen noch eine runde und intakte Morphologie aufweisen und sich nicht am

Boden abgesetzt haben, wurden Durchlichtaufnahmen mit 20-facher Vergrößerung durchgeführt (Abbildung 52).

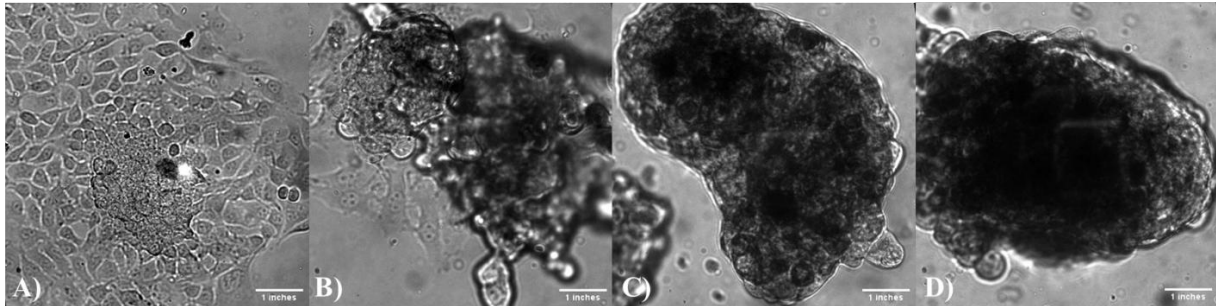


Abbildung 52: Durchlichtaufnahmen mit 20-facher Vergrößerung von B16F1-Sphäroiden in (A) **KG3.4** (4 Gew.-%), (B) **KG3.6** (6 Gew.-%), (C) **KG3.8** (8 Gew.-%) und (D) **KG3.10** (10 Gew.-%) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

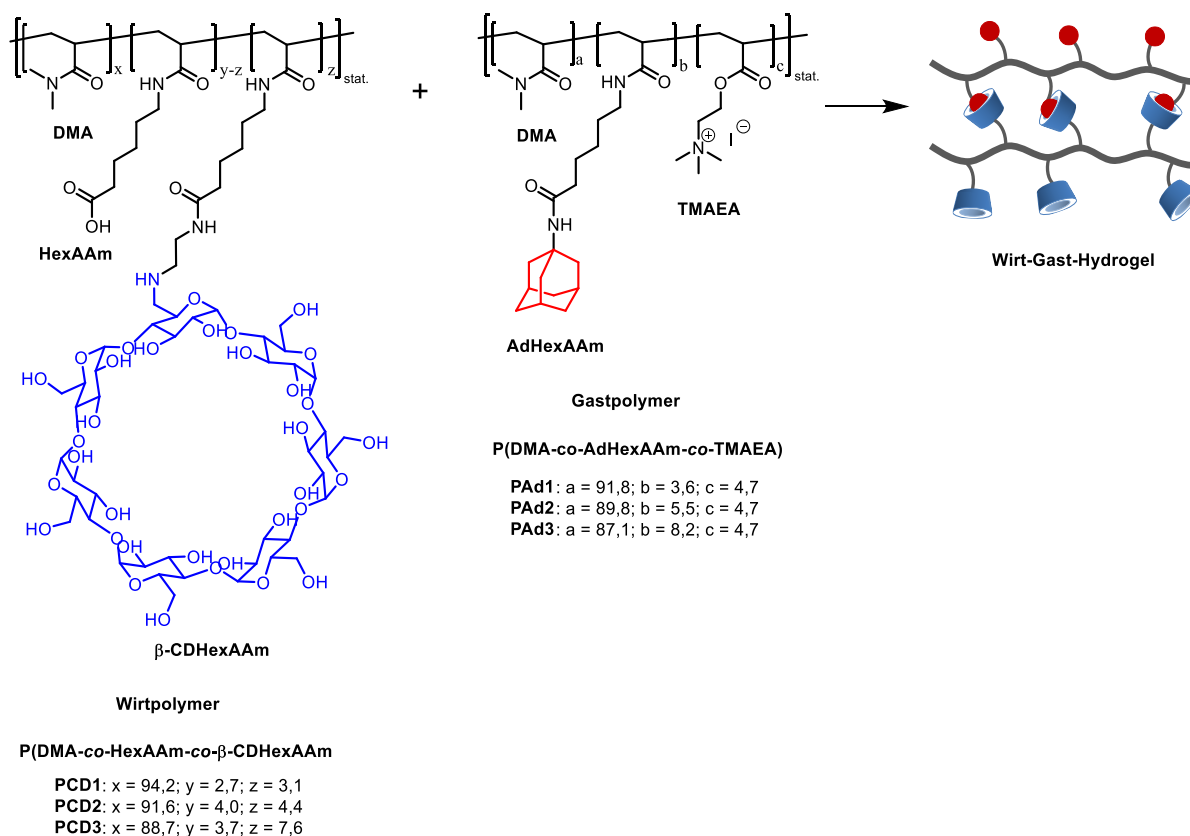
Die B16F1-Sphäroide, die in die 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogele **KG3.4** eingebettet wurden, konnten nicht ausreichend stabilisiert werden und sanken durch das Hydrogel hindurch zu Boden. In der dazugehörigen Durchlichtaufnahme (Abbildung 52A) ist eine ausgebreitete Morphologie der B16F1-Zellen zu erkennen, die darauf hindeutet, dass die Zellen die dreidimensionale Sphäroidstruktur verlassen haben und am Plattenboden adhären. In den 6 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogelen **KG3.6** zeigten sich bei kleineren Sphäroiden dreidimensionale Sphäroidstrukturen, die sich allerdings nur mit geringem Abstand über dem Boden befanden, wodurch sich einige Zellen aus dem Sphäroid herauslösten und am Plattenboden adhärten. Die 6 Gew.-%igen Hydrogele zeichnen sich durch eine dreifach höhere Steifigkeit als die 4 Gew.-%igen Hydrogele aus (Tabelle A7) und können die Sphäroide daher besser stabilisieren. In den 8 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogelen, die wiederum die doppelte Steifigkeit der 6 Gew.-%igen Hydrogele aufzeigten, lagen die meisten Sphäroide dreidimensional eingekapselt vor und nur sehr große Exemplare sanken zu Boden. Die 10 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogele waren dazu in der Lage, das Absinken aller eingebetteten Sphäroide zu verhindern, sodass diese in ihrer dreidimensionalen, runden Morphologie vorlagen und prinzipiell für weiterführende Untersuchungen an der dreidimensionalen Struktur genutzt werden konnten. Insgesamt sind folglich die 8 Gew.-%igen (**KG3.8**) und 10 Gew.-%igen (**KG3.10**) Wirt-Gast-Hydrogele für die Einbettung von B16F1-Sphäroiden geeignet und bieten die Möglichkeit, als potenzielle Ersatzmaterialien für herkömmliche Substrate wie Collagen eingesetzt zu werden.

6.4 Kapitelzusammenfassung

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass eine dreidimensionale Einbettung von Sphäroiden in die in dieser Arbeit hergestellten thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele möglich ist, ohne die Morphologie der Sphäroide zu verändern. Dafür wurden B16F1-Sphäroide in vier Wirt-Gast-Hydrogele mit Gesamtpolymerkonzentrationen von 4, 6, 8 und 10 Gew.-% und einer Vernetzungsdichte von 2,3 mol% eingebettet und nach 24 h Inkubation über Durchlichtmikroskopie untersucht. Während die 4 und 6 Gew.-%igen Hydrogele zu weich waren, um die Sphäroide zu stabilisieren, konnten die 8 und 10 Gew.-%igen Hydrogele die dreidimensionale Einbettung der Sphäroide und somit den Erhalt ihrer runden, dreidimensionalen Struktur gewährleisten.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein physikalisches Hydrogel für dreidimensionale Zellanwendungen herzustellen. Die physikalische Vernetzung sollte dabei der Erstellung einer dynamischen Netzwerkstruktur dienen, welche den Hydrogelen selbstheilende Eigenschaften und Injizierbarkeit verleiht. Außerdem ermöglicht die physikalische Vernetzung eine einfache 3D-Zelleinbettung⁹² und fördert die Zellproliferation, -ausbreitung und -migration.⁹³⁻⁹⁹ Da die bestehenden Standardmaterialien für die Zellkultivierung vorwiegend auf natürlichen Polymeren basieren, welche Nachteile wie eine hohe Chargendifferenz sowie eine begrenzte Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Eigenschaften aufweisen, sollte in dieser Arbeit ein vollsynthetischer Ansatz gewählt werden.⁵⁶⁻⁵⁸ Das in dieser Arbeit entwickelte Hydrogelsystem verwendete als physikalische Vernetzungsmethode die Wirt-Gast-Vernetzung zwischen β -Cyclodextrin (β -CD) und Adamantan (Ad), weil diese sich durch eine im Vergleich zu anderen physikalischen Bindungen hohe Bindungsstärke und Selektivität auszeichnet.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Basierend darauf wurden zwei Polymere, ein Adamantan-funktionalisiertes Gastpolymer und ein β -Cyclodextrin-funktionalisiertes Wirtpolymer, entwickelt. Das Gastpolymer wurde über eine freie radikalische Polymerisation des Gastmonomers 6-Acrylamido-*N*-(adamantyl)hexanamid (AdHexAAM), des hydrophilen Monomers *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) und des kationischen Monomers [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) synthetisiert. Das kationische Monomer TMAEA erfüllte dabei zwei Zwecke, zum einen sollte es die Wasserlöslichkeit des Polymers erhöhen und zum andern wurde es als zelladhäsionsfördernde Komponente eingesetzt.¹⁷⁹ Für die Synthese des Wirtpolymers wurde ebenfalls das hydrophile Monomer DMA eingesetzt, welches mit 6-*N*-Acrylamidohexansäure (HexAAM) copolymerisiert wurde. Über eine polymeranaloge Amidkupplung der Carboxylgruppe von HexAAM mit dem β -CD-Derivat Mono-(6-ethandiamin-6-deoxy)- β -cyclodextrin (β -CD-EDA) konnte β -Cyclodextrin am Polymer immobilisiert werden. Beim Mischen beider Polymere in wässriger Lösung bildeten sich erfolgreich Wirt-Gast-Hydrogele (Schema 21).



Schema 21: Zusammensetzung der β -Cyclodextrin- und Adamantan-Polymere für die Herstellung von Wirt-Gast-Hydrogelen.

Damit die in dieser Arbeit entwickelten Wirt-Gast-Hydrogele als potenzielle Ersatzmaterialien für herkömmliche Zellkulturmatrizes eingesetzt werden können, müssen sie einige Anforderungen erfüllen. Zu diesen Anforderungen gehören die Modifizierbarkeit der mechanischen Eigenschaften, die Möglichkeit zur Funktionalisierung mit biologisch aktiven Liganden und eine gute Zytokompatibilität.

Um die Modifizierbarkeit der mechanischen Eigenschaften zu erreichen, wurden die Parameter Vernetzungsdichte (3,1 mol%, 4,4 mol%, 7,6 mol%) und Gesamtpolymerkonzentration (4 Gew.-%, 6 Gew.-%, 8 Gew.-%, 10 Gew.-%) variiert (Abschnitt 3.2). So wurden die Wirt-Gast-Hydrogele in drei verschiedenen Vernetzungsdichten und jeweils vier verschiedenen Gesamtpolymerkonzentrationen hergestellt und deren mechanische Eigenschaften über rheologische Methoden untersucht. Dabei konnte ein Anstieg der Steifigkeit und Elastizität mit steigender Vernetzungsdichte beobachtet werden (Abbildung 53). Die Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration führte zu einer Zunahme der Steifigkeit, aber ließ die Elastizität unbeeinflusst. Insgesamt konnten Wirt-Gast-Hydrogele mit Steifigkeiten zwischen 156 Pa und 1240 Pa (gemessen bei einer Frequenz von 10 Hz) erhalten werden, die in guter

Übereinstimmung mit Steifigkeiten literaturbekannter Ad/ β -CD-vernetzter Hydrogele stehen.¹⁵¹

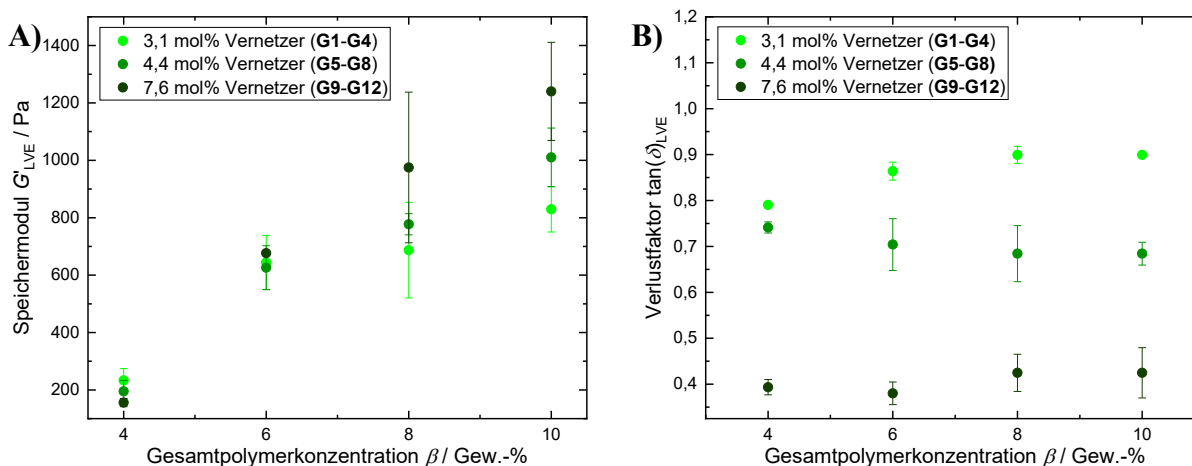


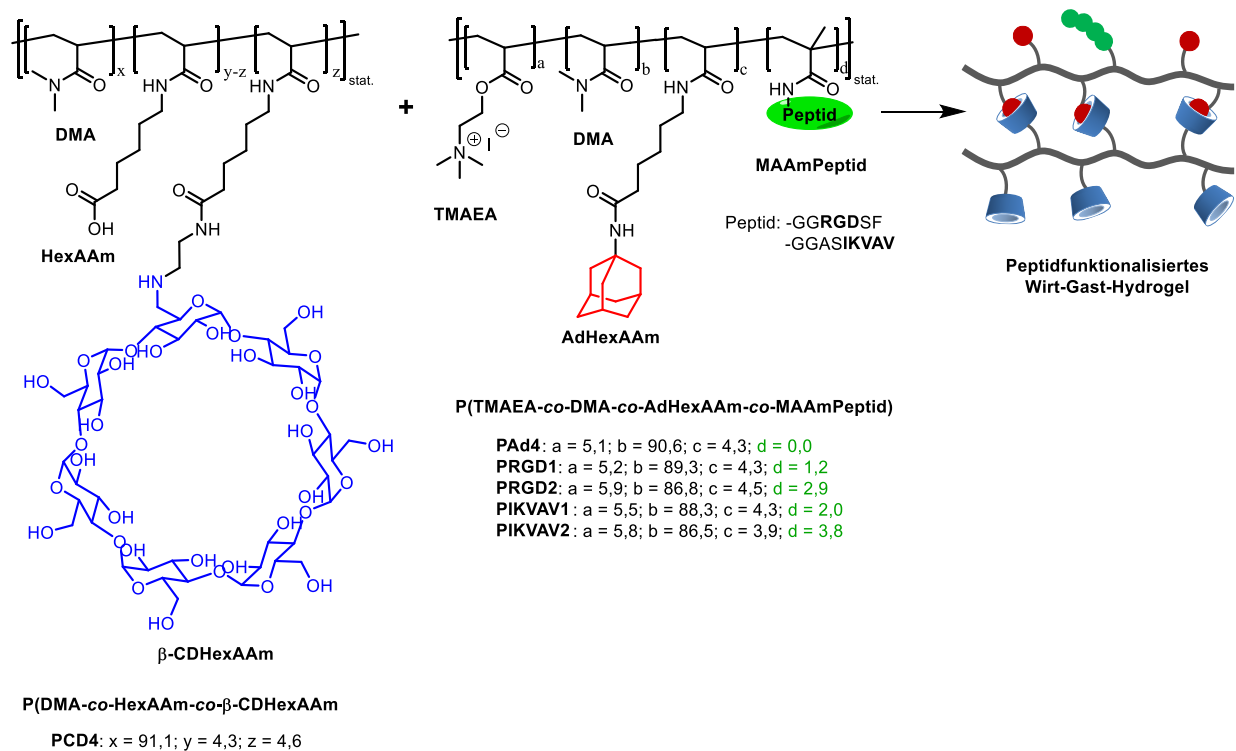
Abbildung 53: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} (A) und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) der Hydrogele G1-G12 als Funktion der Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

Zusätzlich konnte eine Verbesserung der Selbstheilung der Hydrogele mit sinkender Vernetzungsdichte und steigender Gesamtpolymerkonzentration aufgrund schnellerer Begegnung dissoziierter Wirt- und Gastmoleküle festgestellt werden.

Anschließend sollten, um eine weitere Anforderung – die Funktionalisierung der Hydrogele mit biologisch aktiven Komponenten – zu erfüllen, RGD- und IKVAV-Liganden in das Gastpolymer integriert werden (Abschnitt 3.3). Dafür wurden die Methacrylamid-funktionalisierten Peptidliganden in je zwei verschiedenen Molanteilen über eine freie radikalische Polymerisation mit den Monomeren des Gastpolymers (DMA, AdHexAAM, TMAEA) copolymerisiert (Schema 22). Aus den dabei erfolgreich erhaltenen, peptidfunktionalisierten Gastpolymeren wurden Hydrogele hergestellt und diese anschließend im Vergleich zu einem Kontrollhydrogel ohne Peptidfunktionalisierung rheologisch charakterisiert, um den Einfluss der Peptidliganden auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele zu bestimmen, denn nicht nur die Peptidfunktionalisierung, sondern auch die mechanischen Eigenschaften beeinflussen das Zellverhalten maßgeblich.^{14–17} Alle Hydrogele enthielten dabei die gleiche Vernetzungsdichte von 4 mol%. Während der Einbau der geringeren Peptidkonzentrationen (1,2 mol% RGD bzw. 2,0 mol% IKVAV) bei den RGD-funktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen zu keiner Änderung der Steifigkeit, aber einer Reduktion der Elastizität führte, ergab sich bei den IKVAV-funktionalisierten Wirt-Gast-

Hydrogelen eine Erhöhung der Steifigkeit, die auf Aggregationen der hydrophoberen IKVAV-Liganden zurückzuführen ist.

Durch die Erhöhung der Peptidkonzentrationen auf 2,9 mol% RGD-Peptid bzw. 3,8 mol% IKVAV-Peptid nahm die Steifigkeit der Hydrogele um 65 % bzw. 76 % ab. Außerdem sanken die Elastizität, die Deformierbarkeit und die Selbstheilungsfähigkeit der Hydrogele, was auf eine deutliche Beeinträchtigung des Vernetzungssystems durch die Peptide hindeutet. Begründet werden kann dies mit einer Vergrößerung des Abstandes zwischen den Polymeren durch die sterisch anspruchsvollen Peptide, wodurch die Komplexbildung der Wirt- und Gastmoleküle erschwert wird. Eine derartige Veränderung der mechanischen Eigenschaften durch den Peptideinbau erschwert die Auswertung des Peptideinflusses in Zellexperimenten, jedoch ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit gewählten höheren Peptidkonzentrationen oberhalb derer liegen, die laut Literatur für eine gezielte Beeinflussung des Zellverhaltens notwendig sind. Die niedrigeren untersuchten Peptidkonzentrationen von 1,2 mol% RGD-Peptid und 2,0 mol% IKVAV-Peptid, die einen moderaten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften ausübten, liegen näher an dem benötigten Konzentrationsbereich.



Schema 22: Schematische Darstellung der Synthese von peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen aus einem β-CD-Polymer und RGD- bzw. IKVAV-funktionalisierten Ad-Polymeren.

Um die Zytokompatibilität der Wirt- und Gastpolymere zu untersuchen, wurden die beiden Copolymere mit variierenden Molanteilen der einzelnen Monomere dargestellt und

anschließend deren Zytokompatibilität mithilfe von CCK-8-Assays überprüft. Dabei wurde die relative Zellviabilität von COS-7-Zellen in Lösungen der einzelnen Polymere bestimmt. Die erhaltenen relativen Zellviabilitäten lagen in allen Polymerlösungen bei über 80 %. Lediglich die Erhöhung des TMAEA-Anteils von 5 mol% auf 9 mol% verursachte eine Abnahme der relativen Zellviabilität auf 30 % bei einer Polymerkonzentration c von 8 mg/mL. Ein Grund dafür kann die Hydrolyse der Esterfunktionalität von TMAEA sein, die zur Bildung zytotoxischer Nebenprodukte führt.

Darüber hinaus wurde in Experimenten zur dreidimensionalen Einbettung von B16F1-Zellen in die Wirt-Gast-Hydrogele (Abschnitt 3.4.2) herausgefunden, dass die Verwendung geringer Vernetzungsdichten von 2,5-4,8 mol% zu homogeneren Hydrogelen und dadurch zu einer gleichmäßigen dreidimensionalen Einbettung der Zellen führt. Daher wurde in den nachfolgenden Kapiteln eine geringe physikalische Vernetzungsdichte von 2,3 mol% verwendet.

In Kapitel 4 wurde das aus TMAEA, DMA und AdHexAAm bestehende Gastpolymer um das Monomer *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton (TLAAm) erweitert (Abbildung 54).

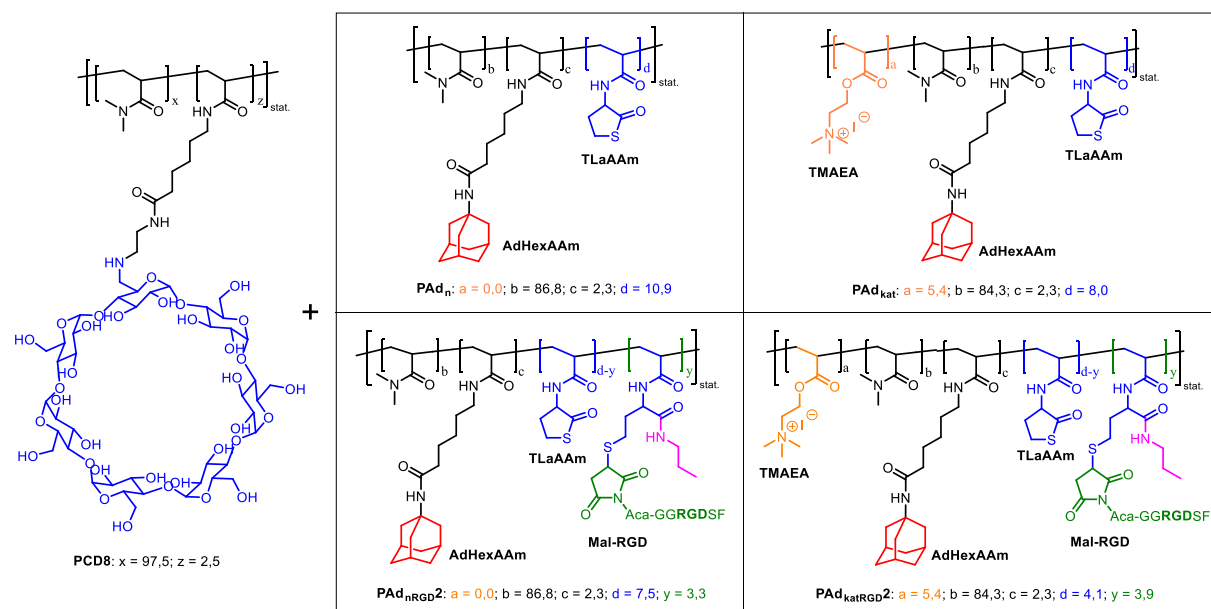


Abbildung 54: Zusammensetzung der vier verschiedenen thiolactonhaltigen Gastpolymere und des Wirtpolymers.

TLAAm sollte für eine effiziente Funktionalisierung des Polymers mit bioaktiven Peptidliganden genutzt werden und somit eine Alternative zur Copolymerisation von Peptidmonomeren darstellen, da es eine gleichmäßige Verteilung der Peptide entlang der Polymerkette gewährleistet. Außerdem sollte in diesem Kapitel der Einfluss der kationischen

Ladung auf das Zellverhalten untersucht werden. Dafür wurden Gastpolymere mit und ohne TMAEA-Monomere hergestellt. Insgesamt wurden in diesem Kapitel die Parameter RGD-Konzentration (0,0 mol%, 1,5 mol%, 3,3 mol%), Ladung (neutral, kationisch) und Gesamtpolymerkonzentration (4 Gew.-%, 6 Gew.-%, 8 Gew.-%, 10 Gew.-%) variiert und deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele sowie die Zellviabilität und -adhäsion in 3D-Zellexperimenten ermittelt.

Die rheologischen Charakterisierungen der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele zeigten einen Anstieg der Steifigkeit auf das Vier- bis Fünffache durch Erhöhung der Gesamtpolymerkonzentration von 4 Gew.-% auf 10 Gew.-%, während die Elastizität sich erneut als unabhängig von der Gesamtpolymerkonzentration erwies. Insgesamt konnte ein Steifigkeitsbereich von 140-1600 Pa (gemessen bei einer Frequenz von 10 Hz) abgedeckt werden (Abbildung 55). Des Weiteren löste der Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid bei den neutralen und kationischen Wirt-Gast-Hydrogelen eine 16-22%ige bzw. 23-55 %ige Abnahme der Steifigkeit aus, da es zu einer Störung der Wirt-Gast-Vernetzung durch Wechselwirkungen mit den sterisch anspruchsvollen RGD-Peptiden kommt. Bei den kationischen Hydrogelen kommt es aufgrund einer zusätzlichen Abstoßung der kationischen TMAEA-Monomere mit protonierten Aminen der Peptide zu einer stärkeren Reduktion der Steifigkeit. Die Elastizität blieb allerdings nahezu unverändert, da es neben der Reduktion des elastischen Teils durch die Störung der Wirt-Gast-Vernetzung gleichermaßen zu einer Abnahme des viskosen Anteils im Hydrogel kommt, weil die sperrigen Peptidliganden die Beweglichkeit der Polymere und somit die Energiedissipation einschränken. Der Einbau des höheren RGD-Peptid-Anteils von 3,3 mol% führte zu keiner weiteren Änderung der mechanischen Eigenschaften, wodurch eine gute Vergleichbarkeit der RGD-funktionalisierten Hydrogele in den Zellexperimenten gegeben war. Auf die Selbstheilungsfähigkeit der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele wurde kein signifikanter Einfluss der Peptidfunktionalisierung festgestellt. Verglichen mit den peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen aus Kapitel 3 zeigte sich ein deutlich geringerer Einfluss der RGD-Peptide auf die mechanischen Eigenschaften, was mit der niedrigeren Vernetzungsdichte der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele von 2,3 mol% im Gegensatz zu 4 mol% begründet werden kann, da diese den Peptidliganden einen größeren Freiraum bietet.

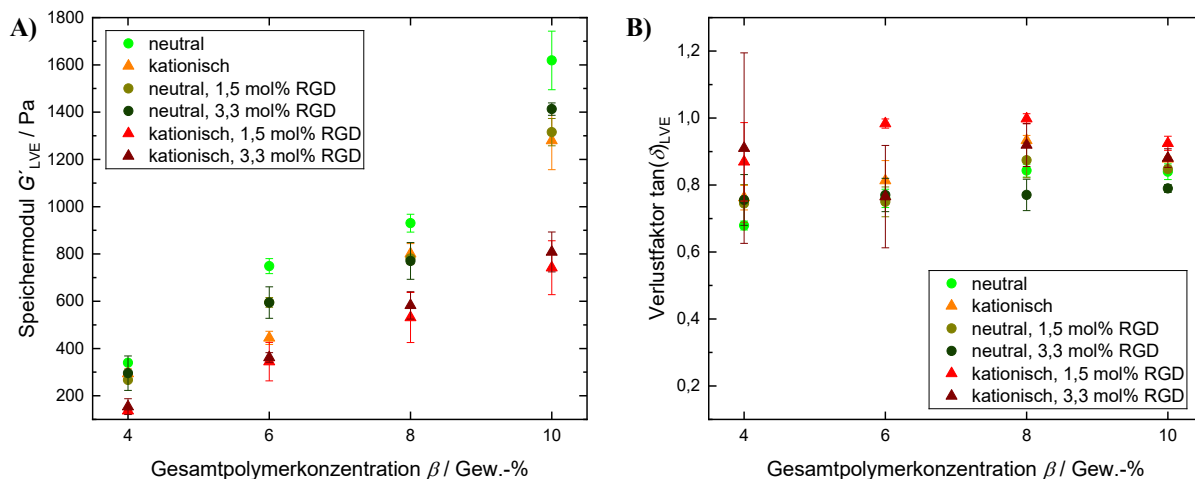


Abbildung 55: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} (A) und des Verlustfaktors $\tan(\delta)_{LVE}$ (B) der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele als Funktion der Gesamtpolymerkonzentration β bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

In den 3D-Zellexperimenten mit den thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen konnte die kationische Ladung bei den Hydrogelen ohne RGD-Peptid eine um 16-28 % erhöhte Proliferation der B16F1-Zellen bewirken (Abbildung 56). Durch den Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid verbesserte sich die Proliferation bei den kationischen Hydrogelen um weitere 24-45 % und bei den neutralen Hydrogelen um 46-94 %. In Bezug auf die Adhäsion konnte der Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid sowohl bei den neutralen als auch bei den kationischen Hydrogelen eine Verbesserung um bis zu 41 % hervorrufen. Die Erhöhung des RGD-Anteils im Polymer auf 3,3 mol% führte weder zu einer weiteren Verbesserung der Viabilität noch der Adhäsion. Folglich wurde mit dem Einbau von 1,5 mol% RGD-Peptid bereits der maximal mögliche Einfluss der RGD-Funktionalisierung auf die Proliferation und Adhäsion der B16F1-Zellen ausgeschöpft.

Die kationische Ladung besaß bei den nicht RGD-funktionalisierten Hydrogelen keinen signifikanten Effekt auf das Adhäsionsverhalten der B16F1-Zellen. Bei den RGD-haltigen Hydrogelen hingegen war durch den TMAEA-Einbau ein Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen zu verzeichnen. Dieser synergistische Effekt aus der Kombination von kationischer Ladung und RGD-Funktionalisierung erweist sich im Vergleich zur Literatur allerdings als marginal.

Die höchsten Viabilitäten und Anteile adhärenter B16F1-Zellen wurden in den 4 Gew.-%igen thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen beobachtet, was in Übereinstimmung mit der Literatur darin begründet ist, dass die B16F1-Zellen in weicheren Materialien eine bessere Möglichkeit zur Umstrukturierung ihrer Umgebung haben.^{272,277,278}

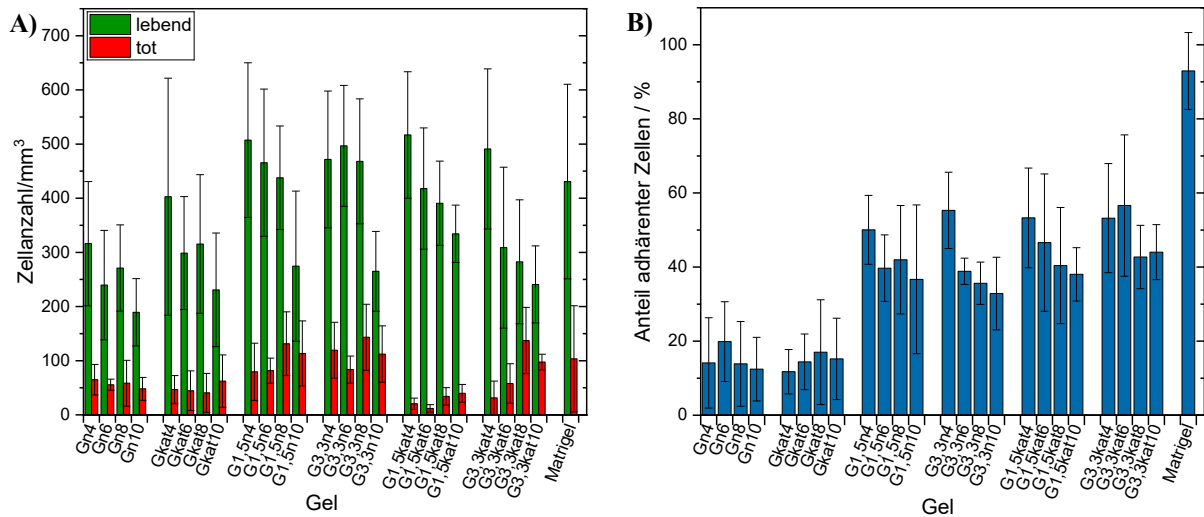
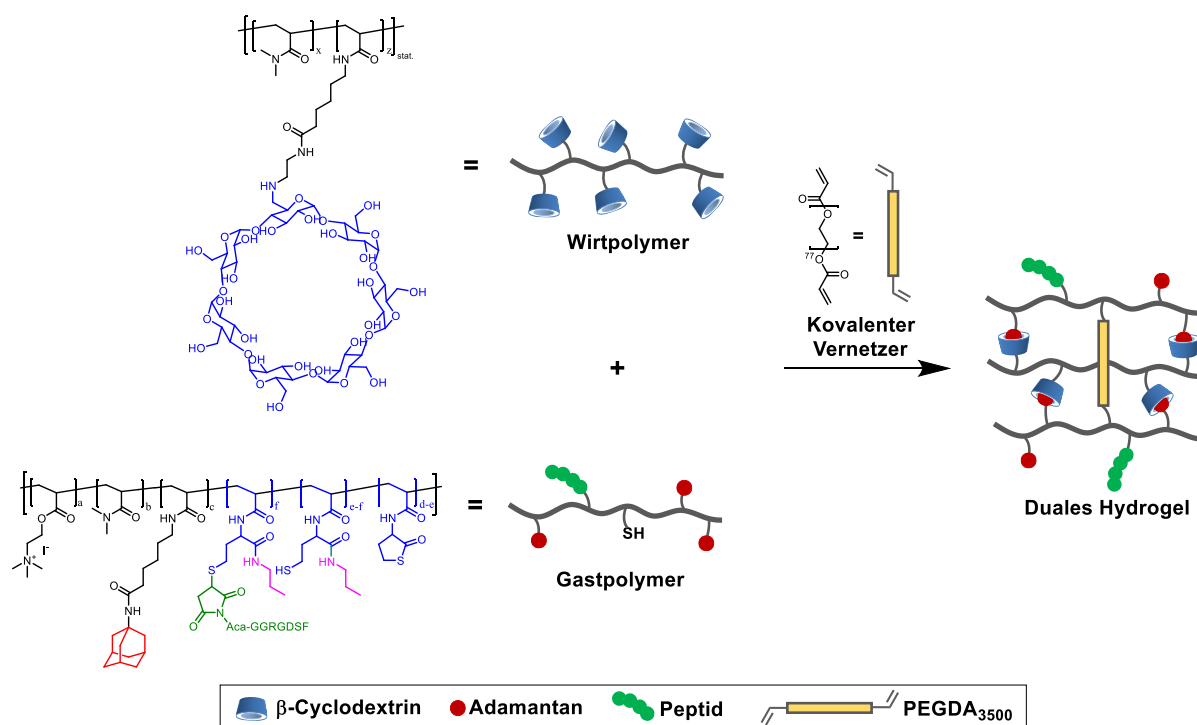


Abbildung 56: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation in den thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen bei 37 °C und 5 % CO₂.

In Kapitel 5 sollte die Kombination von Wirt-Gast-Vernetzung und kovalenter Vernetzung eine Erhöhung der Steifigkeiten der Hydrogele erbringen, damit ein breiteres Spektrum an Gewebesteifigkeiten zugänglich wird. Dafür wurden thiolactonhaltige Wirt-Gast-Hydrogele mit 2,3 mol% Wirt-Gast-Vernetzung zusätzlich über 3 mol% bzw. 6 mol% kovalente Vernetzungen vernetzt, indem die Thiolactonringe über eine Aminolyse geöffnet und die dabei entstehenden Thiole mit dem bifunktionellen Vernetzer Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA) über eine Thiol-MICHAEL-Addition umgesetzt wurden (Schema 23). Diese dual-vernetzten Hydrogele wurden in den vier Gesamtpolymerkonzentrationen 4, 6, 8 und 10 Gew.-% hergestellt. Außerdem wurden RGD-funktionalisierte duale Hydrogele mit 0,4 mol%, 0,8 mol% und 1,5 mol% RGD-Peptid in einer konstanten Gesamtpolymerkonzentration von 4 Gew.-% und einem konstanten Anteil kovalenter Vernetzung von 7 mol% synthetisiert.



Schema 23: Schematische Darstellung der Synthese eines dual-vernetzten Hydrogels aus einem thiolhaltigen Adamantan-Gastpolymer, einem β -Cyclodextrin-Wirtpolymer und einem PEGDA-Vernetzer.

Die rheologische Charakterisierung der dualen Hydrogele zeigte eine erfolgreiche Kombination der beiden Vernetzungsmethoden, da bei den dualen Hydrogelen mit 3 mol% kovalentem Vernetzer eine Steigerung der Steifigkeit auf das Neun- bis Zehnfache und eine deutliche Erhöhung der Elastizität im Vergleich zu physikalischen Kontrollgelen ermittelt wurde. Die Erhöhung des Anteils an kovalentem Vernetzer von 3 mol% auf 6 mol% führte allerdings zu keinem weiteren Anstieg der Steifigkeit und Elastizität der dualen Hydrogele. Insgesamt konnten duale Hydrogele mit Steifigkeiten von 497 ± 76 Pa bis 2754 ± 28 Pa (gemessen bei einer Frequenz von 1 Hz) hergestellt werden. Die Einstellung der Steifigkeiten der dualen Hydrogele basierte dabei vor allem auf der Änderung der Gesamtpolymerkonzentration.

Außerdem konnte den dualen Hydrogelen im Gegensatz zu kovalenten Kontrollgelen eine Fähigkeit zur Selbstheilung nachgewiesen werden, jedoch wurde die Regeneration der Steifigkeit im Vergleich zu den physikalischen Kontrollgelen um 17-78 % reduziert. Anders als bei den physikalischen Hydrogelen wurde bei den dualen Hydrogelen ein Anstieg der Selbstheilung mit sinkender Gesamtpolymerkonzentration festgestellt, der in der reduzierten Steifigkeit der niedriger konzentrierten Hydrogele begründet ist.

Die 3D-Zellexperimente mit den dualen Hydrogelen zeigten eine Verbesserung der Proliferation und Adhäsion von B16F1-Zellen mit steigendem physikalischen Charakter der Hydrogele. Durch den Einbau von RGD-Peptiden konnten sowohl die Viabilität als auch die Adhäsion verbessert werden, wodurch bei dem dualen Hydrogel mit dem größten RGD-Anteil von 1,5 mol% die maximale Adhäsion von 50 % der B16F1-Zellen erreicht wurde (Abbildung 57).

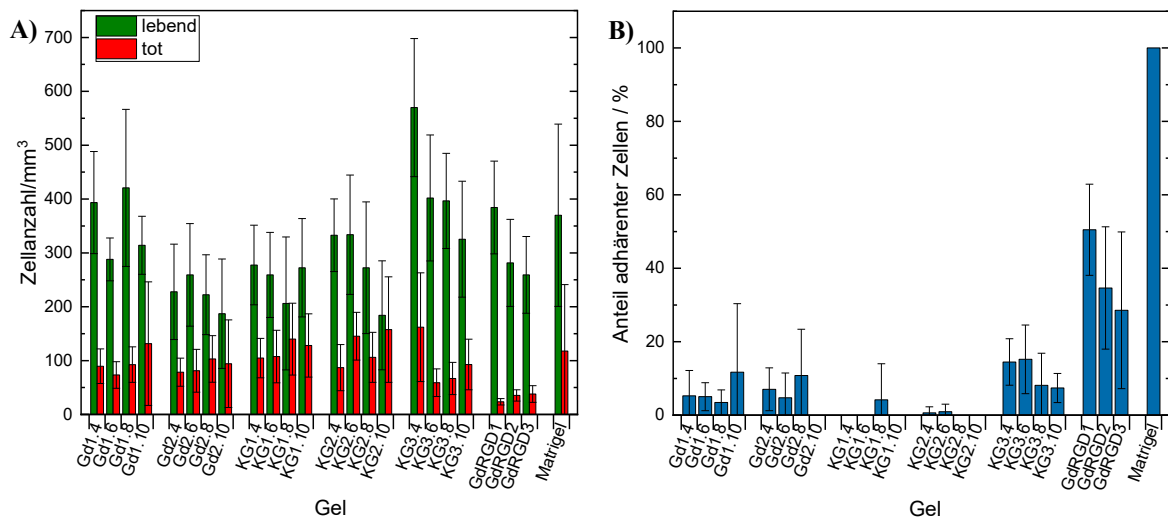


Abbildung 57: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in den dual-vernetzten Hydrogelen **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), den RGD-haltigen dualen Hydrogelen **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und den Kontrollgelen **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent).

Insgesamt konnten in dieser Arbeit selbstheilende Wirt-Gast-Hydrogele entwickelt werden, deren mechanische Eigenschaften sich über die Vernetzungsdichte und die Gesamtpolymerkonzentration gezielt einstellen lassen und die sowohl über eine Copolymerisation als auch über eine polymeranalogue Immobilisierung von Peptidliganden biofunktionalisiert werden können. Die Zytokompatibilität der hergestellten Hydrogele ist vergleichbar mit oder sogar besser als die der Matrigelkontrolle. Daher stellen die in dieser Arbeit hergestellten physikalischen und dualen Hydrogele potenzielle Ersatzmaterialien für herkömmliche Zellkulturmatrizes dar.

In Bezug auf die Adhäsionsförderung von B16F1-Zellen weisen die Hydrogele noch Optimierungsspielraum auf. Da die B16F1-Zellen in den weicheren 4 Gew.-%igen Hydrogelen

höhere Anteile adhärenter Zellen aufzeigten, könnte eine weitere Reduktion der Gesamtpolymerkonzentration die Adhäsion weiter fördern. Außerdem könnte die Erhöhung der TMAEA-Konzentration in Anbetracht von Literaturergebnissen^{166,184} zu einer Verbesserung der Adhäsion führen.

Erste erfolgreiche dreidimensionale Einbettungen von B16F1-Sphäroiden in 8 Gew.-%ige und 10 Gew.-%ige thiolactonhaltige Wirt-Gast-Hydrogele mit 2,3 mol% Wirt-Gast-Vernetzung eröffnen die Möglichkeit für weiterführende Studien des Verhaltens von B16F1-Sphäroiden in Hydrogelen mit verschiedenen Ladungen, Biofunktionalisierungen und mechanischen Eigenschaften.

Ausblickend wäre eine Verwendung von Thioether- β -CD-Derivaten, die eine weitere Erhöhung der Assoziationskonstante mit dem Gastmolekül ermöglichen, eine interessante Option. Dadurch könnte eine stärkere Vernetzung erreicht werden, die den Einsatz noch geringerer Vernetzungsdichten erlaubt und den Zellen somit mehr Freiraum für Migration und Proliferation bietet. Beispielsweise wurden mit Heptakis-6-sulfoethylsulfanyl-6-deoxy- β -CD Bindungsstärken von $> 10^6 \text{ M}^{-1}$ und eine verbesserte Löslichkeit in HEPES-Puffer im Vergleich zu β -CD ermittelt.³¹³

8. Experimenteller Teil

8.1 Materialien und Methoden

8.1.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. *N,N*-Dimethylformamid (DMF), 6-Aminohexansäure und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) wurden bei Carl Roth erworben. Dimethylsulfoxid (DMSO), 1,4-Dioxan, Hexan und 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) wurden bei Thermo Scientific Acros gekauft. Tetrahydrofuran (THF) wurde von Honeywell und Azobis(isobutyronitril) (AIBN) sowie 1,2-Ethylendiamin (EDA) von Merck bezogen. 1-Adamantylamin, Methyljodid (MeI), Ethylchlorformiat, *p*-Toluolsulfonylchlorid (*p*-TsCl), *n*-Propylamin, Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Poly(ethylenglykol) (MW 3400 g/mol, PEG₃₄₀₀) und *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) wurden bei Sigma Aldrich gekauft. DMA wurde vor Gebrauch frisch destilliert. *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexa-fluorophosphat (HBTU), Dithiothreitol (DTT), *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC · HCl) wurden bei abcr, 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V-70) bei Fujifilm Wako Chemicals, 2-(Dimethylamino)ethylacrylat (DMAEA) und β -Cyclodextrin (β -CD) bei TCI und Acryloylchlorid sowie Homocystein-Thiolacton-Hydrochlorid bei Thermo Scientific Alfa Aesar erworben. Natriumhydroxid (NaOH), Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und Triethylamin (Et₃N) wurden bei Grüssing gekauft. PBS-Puffer Tabletten wurden bei neoLab und Peptide bei Davids Biotechnologie erworben. Dialysemembranen stammten von Spectra/Por® und deuterierte Lösungsmittel wurden von Deutero bezogen. Lösungsmittel technischer Qualität wurden vor Gebrauch destillativ aufgereinigt. Wasser wurde mit einer StakPure Reinstwasseranlage aufbereitet.

8.1.2 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden mit Bruker FT-NMR-Geräten vom Typ AV 400 Avance III HD NanoBay (400 MHz), AV 500 Avance III HD (Prodigy) (500 MHz) oder Agilent Technologies DD2 (500 MHz) bei 298 K aufgenommen. Alle Spektren wurden in DMSO-*d*₆, Methanol-*d*₄ oder D₂O gemessen und über die Lösemittelsignale bei $\delta = 2,50$ ppm, $\delta = 3,31$ ppm bzw. $\delta = 4,79$ ppm referenziert. Die Multiplizitäten wurden mit folgenden Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, m = Multiplett.

8.1.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Dispersitäten D und die mittleren molaren Massen \bar{M}_n wurden mittels der GPC L-5000 LC Controller, 655A-11 Liquid Chromatograph der Firma *Merck Hitachi* ermittelt. Es wurde über eine Vorsäule (PSS GRAM) und zwei Hauptsäulen (PSS GRAM analytical 1000 Å und PSS GRAM analytical 30 Å) bei einer Durchflussrate von 1 mL/min gemessen. Die Temperatur der Säulen wurde über einen „Smartline“ Säulenthmostat der Firma Knauer konstant bei 35 °C gehalten. Die Probeninjektion erfolgte mit einem manuellen Probeninjektor mit 100 µL Fassungsvermögen. Die Detektion erfolgte mit einem RI-Detektor „Smartline 2300“ der Firma *Knauer*.

GPC-Messungen zur Überprüfung auf Überreste von β -CD-EDA wurden an einem Agilent 1260 Infinity Messsystem der Firma *PSS* durchgeführt. Es wurde eine Vorsäule des Typs GRAM sowie zwei Trennsäulen des Typs GRAM analytical 100 Å der Firma *PSS* verwendet. Die Kalibrierung erfolgte über Polystyrol- sowie PMMA-Standards der Firma *PSS*. Als Detektor wurde ein Brechungsindex- und ein UV-Detektor der Agilent 1260 Infinity-Serie eingesetzt. Das Messsystem verfügte über einen Autosampler, über den 100 µL Probe injiziert wurden. Die Messungen erfolgten mit einer Flussrate von 1 mL/min bei 50 °C. Das Laufmittel wurde kontinuierlich über einen online Entgaser der Firma *PSS GmbH* entgast.

Für die Probenpräparation wurden 3 mg der Polymere in 1 ml DMF mit LiBr (5 g/L) gelöst. Die Lösung wurde mit einem 0,22 µL-Spritzenvorsatzfilter mit einer Membran aus PTFE filtriert. Die Ergebnisse der Messung wurden aus einer Kalibrierung des Systems mit PMMA abgeleitet.

8.1.4 Rheologie

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele wurden in dieser Arbeit Methoden der Rheologie angewendet. Die Rheologie beschreibt das Fließ- und Deformationsverhalten von Materialien unter Einwirkung von äußeren Kräften und Verformungen.³¹⁴ Es wird zwischen ideal-viskosem und viskoelastischem Fließverhalten sowie ideal-elastischem und viskoelastischem Deformationsverhalten unterschieden. Das ideal-viskose Fließverhalten von Flüssigkeiten kann mithilfe des Dämpfer-Modells (Abbildung 58A) veranschaulicht werden. Beim Anlegen einer konstanten Schubkraft auf den Dämpferkolben, vergrößert sich der Kolbenweg stetig und die Flüssigkeit strömt durch den Spalt zwischen Dämpfer und Zylinderwand in den Zylinder ein. Die Schubkraft und die Kolbengeschwindigkeit sind proportional zueinander und der Proportionalitätsfaktor entspricht

der Viskosität der Flüssigkeit. Wenn keine Schubkraft mehr angelegt wird, bleibt der Dämpferkolben sofort an der erreichten Stelle stehen. Die Flüssigkeit bleibt somit nach dem Belastungs-Entlastungszyklus vollständig in dem deformierten Zustand zurück und weist keine Elastizität auf.

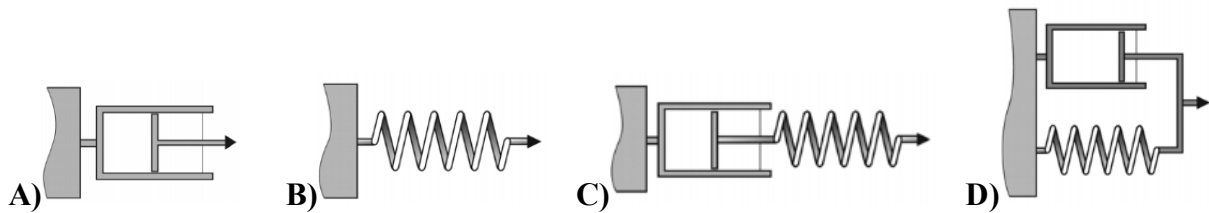


Abbildung 58: Simulation einer (A) ideal-viskosen Flüssigkeit mit dem Dämpfer-Modell, eines (B) ideal-elastischen Festkörpers mit dem Federmodell, einer (C) viskoelastischen Flüssigkeit mit dem MAXWELL-Modell und eines (D) viskoelastischen Festkörpers mit dem KELVIN-VOIGT-Modell.²⁸⁹

Der ideal-elastische Festkörper kann mithilfe des Federmodells (Abbildung 58B) simuliert werden. Unter Einwirkung einer konstanten Kraft auf die Feder, verformt sich die Feder sprunghaft. Die Kraft ist dabei proportional zur Deformation der Feder und der Proportionalitätsfaktor entspricht der Steifigkeit der Feder. Bei Entlastung stellt die Feder elastisch ihren Ausgangszustand wieder her.

Das Verhalten einer viskoelastischen Flüssigkeit lässt sich anhand des MAXWELL-Modells (Abbildung 58C), einer Kombination eines Dämpfers und einer Feder in Reihenschaltung, erklären. Wirkt eine konstante Kraft auf das MAXWELL-Modell, verformt sich zunächst die Feder sprunghaft bis sie eine konstante Deformation erreicht hat. Anschließend bewegt sich der Dämpferkolben kontinuierlich unter der Krafteinwirkung. Bei Entlastung formt sich die Feder sofort und vollständig zurück in den Ausgangszustand, während der Dämpferkolben bei seiner Auslenkung stehen bleibt. Das heißt, eine viskoelastische Flüssigkeit bleibt nach einem Belastungs-Entlastungszyklus teilweise deformiert.

Ein viskoelastischer Feststoff kann über das KELVIN-VOIGT-Modell, eine Kombination aus einer Feder und einem Dämpfer in Parallelschaltung, beschrieben werden (Abbildung 58D). Durch Krafteinwirkung verformen sich beide Komponenten gleichermaßen und kontinuierlich. Bei Entlastung ist die Feder bestrebt sich spontan und elastisch in den Ausgangszustand zurückzubewegen. Durch diese Antriebsenergie gelangen beide Komponenten in den Ausgangszustand zurück, dies findet allerdings durch die Anwesenheit des Dämpfers zeitlich verzögert statt. Ein viskoelastischer Festkörper weist folglich eine zeitverzögerte, aber vollständige Rückdeformation nach vorausgegangener Deformation auf.

Viskoelastische Festkörper, zu denen auch die Hydrogele gehören, werden über rheologische Oszillationsversuche untersucht.²⁸⁹ Bei Rheometern mit gekoppeltem Motor und Detektor, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, wird die Oszillation durch die Schwingung der Messgeometrie, z. B. dem Kegel oder der Platte, um die Rotationsachse vorgegeben. Die Grundlagen des Oszillationsversuchs werden in Folgenden anhand des Zwei-Platten-Modells zur Scherung einer Probe erklärt (Abbildung 59). Die obere, oszillierende Platte ist dabei über eine Schubstange an einem Antriebsrad befestigt, während die untere Platte stationär ist. Bei einer Drehung des Antriebsrads um 90° weist die obere Platte die maximale Auslenkung nach rechts und bei 270° nach links auf. Eine vollständige Umdrehung des Antriebsrads um 360° entspricht der Periodenlänge einer Sinusfunktion.

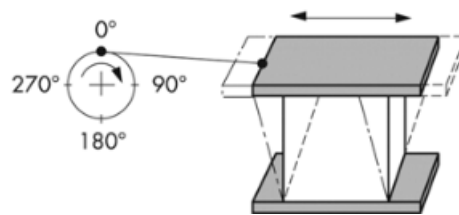


Abbildung 59: Das Zwei-Platten-Modell zur Scherung einer Probe bei einem Oszillationsversuch.²⁸⁹

Die im Folgenden beschriebenen rheologischen Parameter sind nur unter zwei Voraussetzungen genau definiert: 1) Die Probe besitzt Wandhaftung an beiden Platten. 2) Die Probe wird im kompletten Messspalt homogen deformiert.

Wird der Oszillationsversuch wie in dieser Arbeit mit Vorgabe der Deformation γ durchgeführt, wird vom Rheometer die zeitabhängige Deformation $\gamma(t)$ mit der Formel

$$\gamma(t) = \gamma_A \cdot \sin\omega t \quad (8)$$

vorgegeben. Dabei steht γ_A für die Deformationsamplitude, ω für die Kreisfrequenz und t für die Zeit. Die Kreisfrequenz kann ebenfalls über die Frequenz der Oszillation f mit der Gleichung 9 beschrieben werden:

$$\omega = 2\pi \cdot f \quad (9)$$

Als Antwort der Messprobe auf die Deformation wird die zeitabhängige Schubspannung $\tau(t)$ gemessen. Die Ergebniskurve $\tau(t)$ ist im Vergleich zur Vorgabekurve $\gamma(t)$ um den Phasenverschiebungswinkel δ verschoben, daraus ergibt sich die Gleichung 10, in der τ_A die Schubspannungsamplitude darstellt.

$$\tau(t) = \tau_A \cdot \sin(\omega t + \delta) \quad (10)$$

Eine vollständige Umdrehung des Antriebsrads in Abbildung 59 um 360° entspricht einer kompletten Schwingungsperiode der Funktionen $\gamma(t)$ und $\tau(t)$. Die entsprechenden Sinuskurven sind in Abbildung 60 dargestellt.

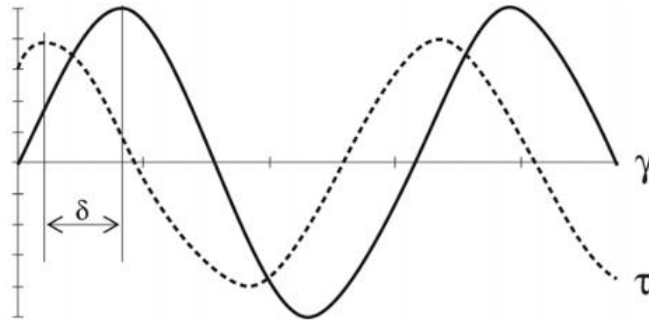


Abbildung 60: Darstellung der Sinuskurven der zeitabhängigen Funktionen $\gamma(t)$ und $\tau(t)$, die bei viskoelastischen Materialien zwar dieselbe Frequenz aufweisen, aber um den Phasenverschiebungswinkel δ verschoben sind.²⁸⁹

Im Falle einer ideal-elastischen Probe, also eines vollständig steifen Festkörpers entspricht die Antwort der Probe der vorgegebenen Deformation, d. h. der Phasenverschiebungswinkel $\delta = 0^\circ$ und $\tau(t)$ ist in Phase mit $\gamma(t)$:

$$\tau(t) = \tau_A \cdot \sin\omega t \quad (11)$$

Bei ideal-viskosem Verhalten ist $\delta = 90^\circ$ und bei viskoelastischem Verhalten $0^\circ < \delta < 90^\circ$. Bei der Untersuchung viskoelastischer Materialien zeigen die Ergebniskurven eine zeitliche Verzögerung zur Vorgabekurve, die in der Rheologie als Winkel ausgedrückt wird.

Beim Oszillationsversuch mit Vorgabe der Deformation γ werden vom Rheometer folglich lediglich zwei unabhängige Größen gemessen, die Schubspannung $\tau(t)$ und der Phasenverschiebungswinkel δ . Aus diesen Messgrößen werden das Speichermodul G' und das Verlustmodul G'' mithilfe eines Vektordiagramms (Abbildung 61) berechnet.

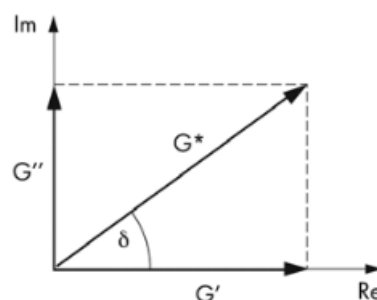


Abbildung 61: Vektordiagramm mit dem aus G' und G'' gebildeten Vektor G^* .²⁸⁹

Das komplexe Schubmodul G^* , das sich aus dem Quotienten der Schubspannung und der Vorgabekurve mit der Gleichung

$$G^* = \tau(t)/\gamma(t) \quad (12)$$

berechnen lässt, kann als Vektor aus G' , das den Realteil repräsentiert, und G'' , das den Imaginärteil repräsentiert, dargestellt werden:

$$G^* = G' + i \cdot G'' = \tau^*/\gamma^* = \tau_A/\gamma_A \cdot e^{i \cdot \delta} \quad (13)$$

τ^* und γ^* stellen dabei die komplexe Schubspannung und die komplexe Deformation dar. Mithilfe der eulerschen Formel und einem anschließenden Koeffizientenvergleich können G' und G'' in Abhängigkeit der Schubspannungs- und Deformationsamplitude sowie des Phasenverschiebungswinkels beschrieben werden, wobei sich die für die Messung wesentlichen Gleichungen 14 und 15 ergeben:

$$G' = (\tau_A/\gamma_A) \cdot \cos\delta \quad (14)$$

$$G'' = (\tau_A/\gamma_A) \cdot \sin\delta \quad (15)$$

Das Speichermodul G' ist ein Maß für die während des Scherprozesses im Material gespeicherte Deformationsenergie. Diese Energie wirkt nach der Entlastung als Triebfeder für die Rückdeformation. G' beschreibt daher das elastische Verhalten eines Materials.

Das Verlustmodul G'' steht für die durch Veränderung der Probenstruktur verbrauchte Energie während des Scherprozesses. Bei der Veränderung der Probenstruktur entstehen Reibungen zwischen den sich bewegenden Molekülen, durch die Energie in Form von Reibungswärme dissipiert. Materialien, die beim Scherprozess Energie verlieren, liegen anschließend in veränderter Form vor, daher wird durch G'' das viskose Verhalten eines Materials repräsentiert.

Aus dem Quotienten des Verlust- und des Speichermoduls lässt sich der Verlustfaktor $\tan\delta = G''/G'$ berechnen (Gleichung 16).

$$G''/G' = \sin\delta/\cos\delta = \tan\delta \quad (16)$$

$\tan\delta$ gibt folglich das Verhältnis zwischen viskosem und elastischem Anteil des Deformationsverhaltens an und wird zur Beschreibung des Flüssig-Zustandes (Sol-Zustandes, $\tan\delta > 1$), des Gel-Zustandes (festen Zustandes, $\tan\delta < 1$) und des Sol-Gel-Überganges ($\tan\delta = 1$) genutzt.^{25,289,315}

Zur rheologischen Charakterisierung physikalischer Hydrogele werden standardmäßig oszillatorische Amplitudentests und Frequenztests durchgeführt. Für die Durchführung dieser Tests wurde das Modular Compact Rheometer MCR 102 der Firma *Anton Paar* eingesetzt. Es wurde im Platte-Platte-System mit einem Spaltabstand von 0,1 mm gemessen. Die eingesetzte Platte der Firma *Anton Paar* hatte bei den Experimenten aus Abschnitt 3.2 einen Durchmesser von 25 mm und bei den übrigen Experimenten einen Durchmesser von 15 mm. Die Messtemperatur lag bei 25 °C. Die Amplitudentests wurden bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz (Kapitel 3 und 4) bzw. 1 Hz (Kapitel 5) in einem Scherdeformationsbereich von $\gamma = 0,1-450,0\%$ durchgeführt. Die Nachgebegrenzen γ_y wurden bei der Scherdeformation abgelesen, bei der das Speichermodul G' um 10 % von dem Mittelwert der vorherigen Messpunkte abwich. Die Frequenztests wurden bei einer konstanten Scherdeformation von $\gamma = 1,0\%$ in einem Frequenzbereich von $f = 0,1-100,0$ Hz durchgeführt. Die Selbstheilungstests wurden bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz (Kapitel 3 und 4) bzw. 1 Hz (Kapitel 5) und einer in 50 s Intervallen abwechselnden Scherdeformation γ von 0,5 % und 500,0 % durchgeführt. Die Messungen starteten mit einer Deformation von 0,5 % und dauerten insgesamt 450 s. Die Gelierzeiten t_{Gel} wurden mittels oszillatorischen Zeitmessungen über eine Zeitspanne von 30 min bei einer konstanten Frequenz f von 1 Hz und Scherdeformation γ von 1,0 % bestimmt. Alle Messungen wurden, falls nicht anders angegeben, in Duplikaten durchgeführt.

8.1.5 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Messungen in dieser Arbeit wurden mit dem UV/Vis-Spektrometer UV-6300PC der Firma *VWR* durchgeführt.

8.1.6 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem FT-IR-Spektrometer TENSOR 27 der Firma *Bruker* gemessen.

8.1.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM-Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop H-S4500 FEG der Firma *Hitachi* aufgenommen. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde von Herrn Frank Katzenberg im Zentrum für Elektronenmikroskopie und Materialforschung durchgeführt. Als Vorbereitung

für die REM-Aufnahmen wurden die Hydrogele gefriergetrocknet. Ein Stück des getrockneten Hydrogels wurde abgebrochen und mittels REM näher analysiert.

8.1.8 Hochauflösende Massenspektrometrie

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) wurde an einem Bruker compact-Gerät der Firma *Bruker* durchgeführt. Die Probe wurde über Elektrosprayionisation (ESI) ionisiert. Als Massenanalysator wurde ein QqTOF, eine LTQ Orbitrap oder eine LTQ Orbitrap XL der Firma *Thermo Scientific* eingesetzt. Die Proben wurden mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL in einem 1:1-Gemisch aus MeOH und H₂O gelöst und mit einem 0,22 µL-Spritzenvorsatzfilter filtriert.

8.1.9 Ellman's Assay

Für den Ellman's Assay wurde aus entgastem Ellman's Puffer (0,1 M Phosphatpuffer mit pH 8) eine Polymerstammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Außerdem wurde eine Stammlösung aus 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure in entgastem Ellman's Puffer (4 mg/mL) hergestellt. Für die Messproben wurden 1,25 mL vom entgastem Ellman's Puffer, 125 µL von der Polymerstammlösung und 25 µL von der Ellman's Reagenz-Stammlösung gemischt. Diese Proben wurden bei einer Wellenlänge von 412 nm mit einem UV-Vis-Spektrometer gemessen. Die Messproben wurden in Triplets hergestellt und jede Probe wurde dreimal gemessen.

8.1.10 Bestimmung der Quellwerte

Zur Bestimmung der Quellwerte wurden die Hydrogele mit 5 mL PBS-Puffer übergossen und für 24 h bei 37 °C aufbewahrt. Anschließend wurde deren Abtropfgewicht m_s gravimetrisch bestimmt. Nach Gefriertrocknung der Proben wurde deren Trockengewicht m_d gravimetrisch ermittelt und aus den ermittelten Werten unter Verwendung von Gleichung 7 der Quellwert Q_m berechnet.

8.1.11 Zellkulturmedien

COS-7-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (ohne L-Glutamin) der Firma PAN BIOTECH versetzt mit 10 %(v/v) fötalem Kälberserum (FBS), 1 %(v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 %(v/v) L-Glutamin kultiviert.

B16F1-Zellen wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium (mit L-Glutamin) von GIBCO™ versetzt mit 10 %(v/v) FBS kultiviert.

Für die Mikroskopieaufnahmen mit B16F1-Zellen wurde ein Mikroskopiepuffer bestehend aus RPMI-1640 (mit L-Glutamin und ohne Phenolrot) von GIBCO™, 10 %(v/v) FBS, 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 1 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂ verwendet.

8.1.12 Cell Counting Kit 8 (CCK-8) Assay

Mit dem Zellzählungs-Kit-8 (CCK-8) der Firma *Dojindo* wurde die Zytotoxizität der einzelnen Polymere gegenüber COS-7 Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die mittleren sechs Spalten einer Platte mit 96 Vertiefungen mit jeweils 100 µL Polymerlösung in DPBS gefüllt. Dabei wurde die Polymerkonzentration von einer 6er-Reihe zur nächsten halbiert. Die Konzentrationen betragen 8,00 mg/mL, 4,00 mg/mL, 2,00 mg/mL, 1,00 mg/mL, 0,50 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,13 mg/mL und 0,00 mg/mL. Als Referenz wurde die Polymerkonzentration von 0,00 mg/ml verwendet. Anschließend wurden drei der sechs Spalten mit jeweils 100 µL Zellsuspension (50.000 Zellen/mL DMEM) pro Vertiefung versetzt. Die restlichen drei Spalten wurden mit je 100 µL DMEM versetzt und dienten als Blindwerte für die jeweiligen Polymerkonzentrationen. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 10 µL CCK-8-Lösung in jede Kammer gegeben. Die Messung der Extinktion erfolgte nach einer weiteren Inkubation von 2 h bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einem Synergy HT Microplate Reader der Firma *BioTek*. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt. Die Messungen mit den Polymerkonzentrationen 8,00 mg/mL und 0,13 mg/mL wurden aufgrund starker Schwankungen nicht berücksichtigt.

8.1.13 3D-Zellexperimente und Lebend-Tot-Färbung

Für die 3D-Zellexperimente mit anschließender Leben-Tot-Färbung der B16F1-Zellen wurden zunächst die einzelnen Polymere in serumfreiem Mikroskopiepuffer gelöst. Die Polymerlösungen wurden so angesetzt, dass sie mit Zugabe von 20 µL Zellsuspension ($4,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL) insgesamt 300 µL Hydrogel ergaben. Die Polymerverhältnisse wurden analog zu den in den obigen Kapiteln beschriebenen Hydrogelsynthesen eingesetzt. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in serumfreiem Mikroskopiepuffer hergestellt. Für die Hydrogelpräparation wurde zunächst die Zellsuspension mit der Adamantan-Polymerlösung gemischt. Anschließend wurden die anderen Polymerlösungen hinzugegeben und mit einer

Pipette für hochviskose Flüssigkeiten der Firma *Gilson* gemischt. Die enger zulaufende Spitze der Pipettenspitze wurde zuvor abgeschnitten, um das mechanische Zerstören von Zellen zu minimieren. Sobald das Hydrogelgemisch eine Erhöhung der Viskosität gezeigt hat, wurden jeweils 50 μL des Hydrogels in drei Vertiefungen einer 384-Well-Platte gefüllt. Insgesamt wurden somit 150 μL des 300 μL -Hydrogelansatzes verbraucht. Der Überschuss an Hydrogel war notwendig, um mit der abgeschnittenen Pipettenspitze die gewünschte Hydrogelmenge aufnehmen zu können, ohne das Hydrogel zusammenkratzen zu müssen, da dies wiederum zur Zerstörung von Zellen geführt hätte. Als Referenz wurde die gleiche Anzahl an B16F1-Zellen in GelTrex einer Konzentration von 5 mg/mL in ebenfalls drei Vertiefungen der 384-Well-Platte ausplattiert. Für die Herstellung von GelTrex wurde das GelTrex-Konzentrat der Firma *Gibco* bei Raumtemperatur mit serumfreiem Mikroskopiepuffer verdünnt, mit der Zellsuspension gemischt und nach einer Wartezeit von 5-10 min in die Vertiefungen gefüllt. Nachdem alle Gele in die Platte eingefüllt waren, wurden sie zur vollständigen Gelierung für 15 min im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt. Danach wurden die Gele mit jeweils 40 μL des serumhaltigen Mikroskopiepuffers übergossen und für 24 h inkubiert. Diejenige Vertiefung der 384-Well-Platte, die nicht mit Gel gefüllt waren, wurden mit 80 μL *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gefüllt, um die Austrocknung der Gele zu minimieren.

Nach 24 h Inkubation wurden zur Untersuchung der Zellmorphologie Durchlichtmikroskopieaufnahmen durch 585 μm des Geles in Z-Richtung gemacht.

Anschließend wurden die B16F1-Zellen mit einem „Calcein AM/PI Double Staining Kit“ der Firma *Elabsience* gemäß der Herstellerangaben angefärbt. Bevor das Anfärbereagenz hinzugegeben werden konnte, wurden die Gele mit serumfreiem Mikroskopiepuffer gewaschen, um eine Reaktion des FBS mit dem Anfärbereagenz zu vermeiden. Dafür wurde zunächst der Überstand an serumhaltigem Mikroskopiepuffer über den Gelen aspiriert und gegen 40 μL serumfreien Mikroskopiepuffer ersetzt. Nach 45 min Wartezeit wurde der Vorgang wiederholt und für weitere 45 min gewartet. Anschließend wurden nach Aspiration des Überstandes 40 μL der Calcein AM/PI-Lösung auf die Gele gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten die lebenden Zellen durch Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 494 \text{ nm}$ und die toten Zellen durch Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 535 \text{ nm}$ erfasst werden. Für die Fluoreszenzaufnahmen wurden ebenfalls 585 μm der Gele in Z-Richtung an drei bis fünf verschiedenen Positionen im Gel betrachtet. Alle Mikroskopieaufnahmen wurden an einem OLYMPUS IX81 Mikroskop mit einem 20x-Objektiv und einem Standard-Fluoreszenz-Filter-Set gemacht.

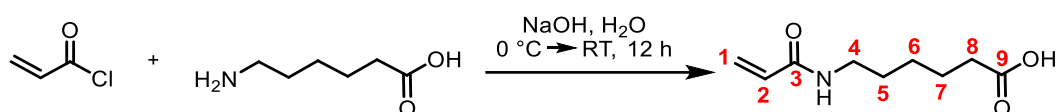
8.1.14 Herstellung und Einbettung von Sphäroiden

Für die Herstellung der Sphäroide aus B16F1-Zellen wurde zunächst eine 1 Gew.-%ige Agarlösung (1,5 g Agar in 150 mL PBS-Puffer) hergestellt und autoklaviert. Das autoklavierte Agar wurde in einer Mikrowelle erhitzt, um es in Lösung zu bringen, sodass die Lösung anschließend in einer 96-Well-Platte (50 μ L Agar pro Well) verteilt werden konnte. Nach Aushärten des Agars bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von einer Stunde wurden 2000-3000 B16F1-Zellen in 150 μ L serumhaltigem RPMI-1640 in die einzelnen Wells gefüllt. Anschließend wurde die befüllte 96-Well-Platte für ca. 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, sodass sich pro Well ein Sphäroid bildete. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Sphäroide mit einer mittleren Größe und möglichst runder Morphologie geerntet, indem sie mit einer Pipette vorsichtig von der Agarschicht abgesaugt wurden ohne Teile des Agars gleichzeitig einzusaugen. Die Sphäroide wurden in einem 15 mL-Zentrifugenröhrchen gesammelt und nachdem sie sich am Boden abgesetzt hatten, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und gegen einen Mikroskopiepuffer (siehe Abschnitt 8.1.10) ausgetauscht. Dabei wurden 120 μ L Mikroskopiepuffer pro Sphäroid hinzugegeben.

Um die Sphäroide anschließend in das physikalische Hydrogel einbetten zu können, wurden zunächst 270 μ L Hydrogel nach Vorschrift (Abschnitt 8.2, Präparation der Hydrogele) in serumfreiem Mikroskopiepuffer hergestellt. Davon wurden 100 μ L in einem Well einer μ -Slide-8-Well-ibiTreat-Glasbodenplatte der Firma *ibidi* verteilt. Anschließend wurden 30 μ L der Sphäroidsuspension mit 2-4 Sphäroiden so auf dem Hydrogel verteilt, dass die Sphäroide mit etwas Abstand voneinander vorlagen. Danach wurde das restliche Hydrogel auf den Sphäroiden verteilt und die 8-Well-Platte für 30 min im Inkubator aufbewahrt. Daraufhin wurden 160 μ L eines serumhaltigen Mikroskopiepuffers auf die Hydrogele aufgetragen und diese anschließend für 24 h inkubiert, bevor sie über Durchlichtmikroskopie an einem OLYMPUS IX81 Mikroskop mit einem 20x-Objektiv untersucht wurden.

8.2 Synthesevorschriften

Synthese von 6-*N*-Acrylamidohexansäure (HexAAm)

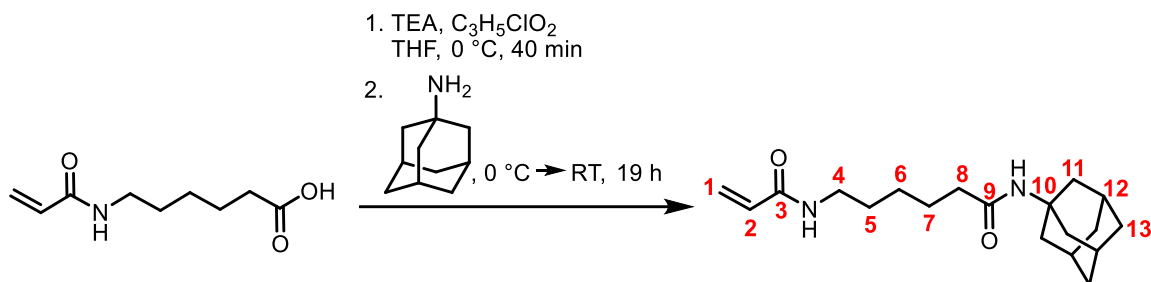


Für die Synthese von 6-*N*-Acrylamidohexansäure wurden 2,28 g NaOH (57,18 mmol, 1,5 Äq.) in 300 ml Wasser gelöst und 5,00 g 6-*N*-Aminohexansäure (38,12 mmol, 1,0 Äq.) hinzugegeben. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf 0 °C wurden 3,72 ml Acryloylchlorid (45,74 mmol, 1,2 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde dann mit 5 M HCl auf pH < 7 eingestellt und dreimal mit 250 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer 1:1-Mischung aus Cyclohexan und Ethylacetat umkristallisiert und über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert. Schließlich wurde das Produkt abfiltriert und dreimal mit einer 1:1-Mischung aus Cyclohexan und Ethylacetat gewaschen. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde 6-*N*-Acrylamidohexansäure (2,80 g, 15,12 mmol, 40 %) als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CD₃OD, 400 MHz): δ (ppm) 6,20-6,05 (m, 2H, H₂CCH, ^{trans}CH₂CH), 5,53 (dd, ³J = 8,6 Hz, ²J = 3,8 Hz, 1H, ^{cis}CH₂CH), 3,15 (t, ³J = 7,1 Hz, 2H, NHCH₂), 2,20 (t, ³J = 7,2 Hz, 2H, CH₂CONH), 1,59-1,41 (m, 4H, NHCH₂CH₂CH₂CH₂, NHCH₂CH₂), 1,34-1,23 (m, 2H, NHCH₂CH₂CH₂).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD₃OD, 101 MHz): δ (ppm) 177,5 (s, 1C, C9), 168,1 (s, 1C, C3), 132,1 (s, 1C, C2), 126,5 (s, 1C, C1), 40,3 (s, 1C, C4), 34,8 (s, 1C, C8), 30,1 (s, 1C, C5), 27,5 (s, 1C, C6), 25,7 (s, 1C, C7).

Synthese von 6-Acrylamido-*N*-(adamantan-1-yl)-hexanamid (AdHexAAm)



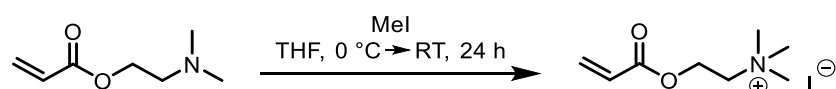
6-*N*-Acrylamidohexansäure (1,32 g, 7,12 mmol, 1,0 Äq.) und Triethylamin (0,99 ml, 7,12 mmol, 1,0 Äq.) wurden in 29 ml THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wurden 0,68 ml

(7,12 mmol, 1,0 Äq.) Ethylchlorformiat hinzugetropft und für 40 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 1,08 g (7,12 mmol, 1,0 Äq.) 1-Adamantanamin hinzugegeben und für 2 h bei niedriger Temperatur gerührt. Danach wurde für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abgefiltert und dreimal mit THF gewaschen. Das Filtrat wurde auf ein Viertel des Ausgangsvolumens eingengt und die doppelte Menge Hexan hinzugegeben, wodurch das Produkt ausgefällt wurde. Das Produkt wurde über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert, um es anschließend abzufiltrieren und mit Hexan zu waschen. 6-Acrylamido-*N*-(adamantan-1-yl)-hexanamid wurde im Hochvakuum getrocknet und als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 1,60 g (5,03 mmol, 71 %) isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz): δ (ppm) 6,26-6,16 (m, 2H, H_2CCH , $^{\text{trans}}\text{CH}_2\text{CH}$), 5,64 (dd, $^3J = 8,8$ Hz, $^2J = 3,4$ Hz, 1H, $^{\text{cis}}\text{CH}_2\text{CH}$), 3,25 (t, $^3J = 7,2$ Hz, 2H, NHCH_2), 2,11 (d, $^3J = 7,4$ Hz, 2H, CH_2CONH), 2,04 (s, 3H, $\text{C}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 2,01 (d, $^3J = 2,7$ Hz, 6H, $\text{C}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 1,74-1,68 (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 1,59 (quint, $^3J = 7,5$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,55 (quint, $^3J = 7,4$ Hz, 2H, NHCH_2CH_2), 1,39-1,31 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_3OD , 151 MHz): δ (ppm) 175,4 (s, 1C, C9), 168,1 (s, 1C, C3), 132,1 (s, 1C, C2), 126,4 (s, 1C, C1), 52,7 (s, 1C, C10), 42,3 (s, 3C, C11), 40,3 (s, 1C, C4); 37,8 (s, 1C, C8), 37,5 (s, 3C, C13), 30,9 (s, 3C, C12), 30,1 (s, 1C, C5), 27,4 (s, 1C, C6), 26,8 (s, 1C, C7).

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

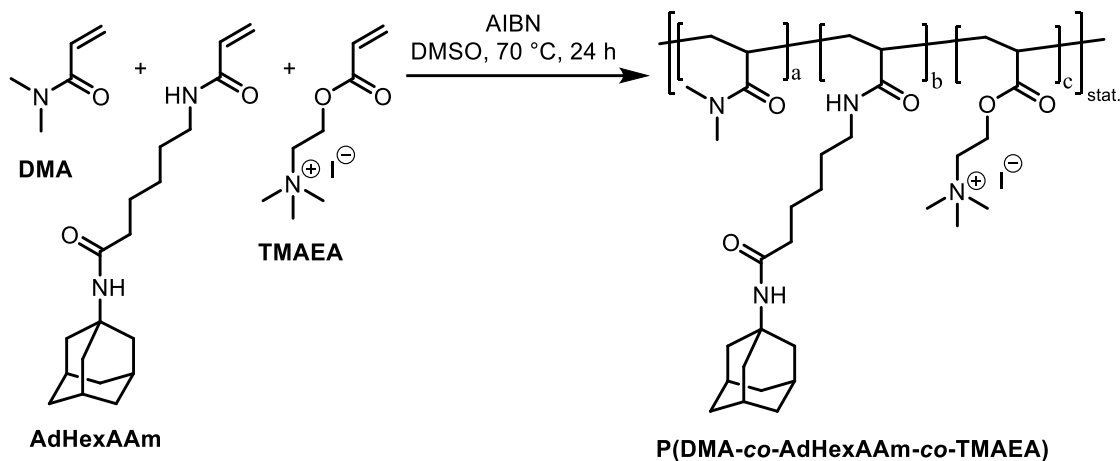


4,00 mL Dimethylaminoethylacrylat (26,34 mmol, 1,0 Äq.) wurden in 38 ml trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 1,80 mL Methyljodid (28,98 mmol, 1,1 Äq.) in 38 mL THF schnell hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und zweimal mit kaltem THF sowie zweimal mit kaltem Hexan gewaschen. Nach Trocknung des Filterkuchens im Hochvakuum wurde [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) (7,48 g, 26,24 mmol, 99 %) als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400 MHz): δ (ppm) 6,47 (dd, $^3J = 17,4$ Hz, $^2J = 1,0$ Hz, 1H, $^{\text{trans}}\text{CH}_2\text{CH}$), 6,27 (dd, $^3J = 17,1$, 10,6 Hz, 1H, H_2CCH), 6,08 (dd, $^3J = 10,5$, $^2J = 1,0$ Hz, 1H, $^{\text{cis}}\text{CH}_2\text{CH}$), 4,72-4,64 (m, 2H, OCH_2), 3,86-3,79 (m, 2H, OCH_2CH_2), 3,27 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (D₂O, 101 MHz): δ (ppm) 167,2 (s, 1C, C3), 133,3 (s, 1C, C1), 126,9 (s, 1C, C2), 64,6 (t, 1C, C5), 58,4 (s, 1C, C4), 53,9 (t, 3C, C6).

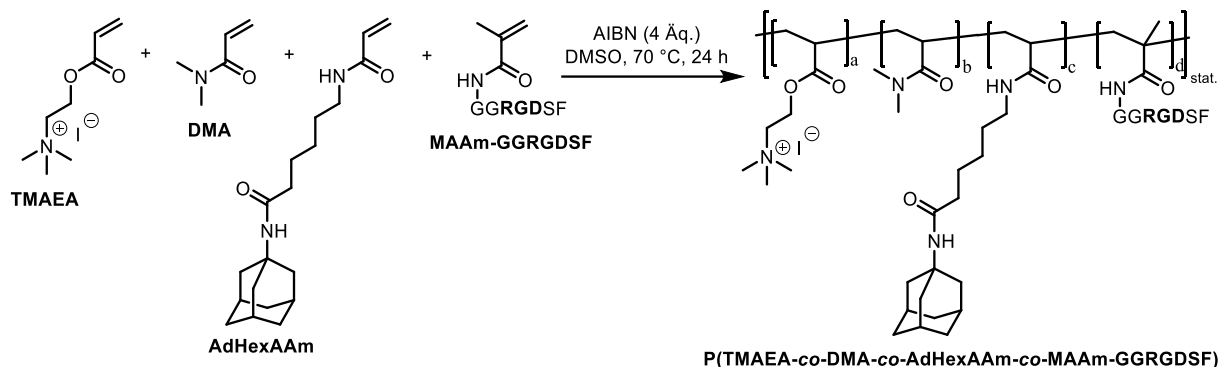
Synthese von P(DMA-*co*-AdHexAAm-*co*-TMAEA) (PAd1-PAd8)



Die Synthese der Gastpolymere P(DMA-*co*-AdHexAAm-*co*-TMAEA) wird beispielhaft anhand von Polymer **PAd3** beschrieben. Zunächst wurden die Monomere Dimethylacrylamid (0,91 mL, 8,88 mmol, 87,0 Äq.), AdHexAAm (0,26 g, 0,82 mmol, 8,0 Äq.) und TMAEA (0,15 g, 0,51 mmol, 5,0 Äq.) in 5,1 mL DMSO gelöst und für 20 min mit Argon entgast. Anschließend wurde AIBN (16,76 mg, 0,10 mmol, 1,0 Äq.) hinzugefügt und die Reaktionslösung für weitere 5 min mit Argon entgast. Die Reaktionslösung wurde im vorgeheizten Ölbad bei 70 °C über Nacht rühren gelassen. Anschließend wurde die Lösung für drei Tage (MWCO 1000 Da) gegen Wasser dialysiert, wobei das Wasser dreimal täglich gewechselt wurde. Durch Gefriertrocknung der Polymerlösung wurde P(DMA-*co*-AdHexAAm-*co*-TMAEA) als weißer Feststoff erhalten.

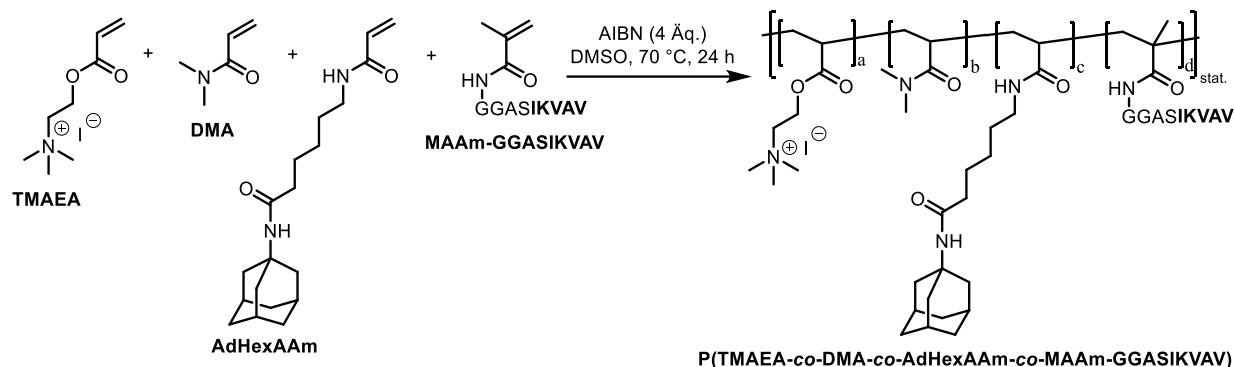
^1H -NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 4,41 (br s, 2H, OCH₂), 3,68 (br s, 2H, OCH₂CH₂), 3,20 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃) 3,11-2,60 (m, 115H, CONHCH₂, CON(CH₃)₂), 1,98 (s, 9H, CH₂CONHC(CH₂CHCH₂)₃), 1,90 (s, 10H, CONHC(CH₂CHCH₂)₃), 1,73-0,79 (m, 63H, RückgratCH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC(CH₂CHCH₂)₃).

Synthese von P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-MAAm-GGRGDSF) (PRGD1, PRGD2)



Die Synthese der RGD-funktionalisierten Gastpolymere **PRGD1** und **PRGD2** wird anhand von Polymer **PRGD2** beschrieben. Die Monomere AdHexAAm (60,0 mg, 0,2 mmol, 5,0 Äq.), DMA (0,3 mL, 3,2 mmol, 85,0 Äq.), TMAEA (53,7 mg, 0,2 mmol, 5,0 Äq.) und MAAm-GGRDGSF (143,7 mg, 0,2 mmol, 5,0 Äq.) wurden in 1,9 mL DMSO gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 20 min entgast. Im nächsten Schritt wurde AIBN (24,8 mg, 0,2 mmol, 4,0 Äq.) hinzugegeben und erneut für 5 min entgast. Danach wurde die Reaktionslösung für 24 h bei 70 °C gerührt. Die Aufreinigung erfolgte über eine eintägige Dialyse (MWCO 1000 Da) gegen Wasser. Nach anschließender Lyophilisierung konnte das Produkt P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-MAAm-GGRGDSF) als weißer Feststoff erhalten werden.

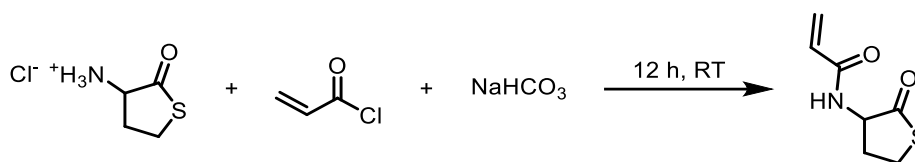
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,19 (s, 3H, Phenylgruppe), 4,39 (s, 2H, OCH₂), 3,68 (s, 2H, OCH₂CH₂), 3,19 (s, 9H, N⁺(CH₃)₃), 3,12-2,62 (m, 88H, CONHCH₂, CON(CH₃)₂), 1,98 (s, 4H, CH₂CONHC(CH₂CHCH₂)₃), 1,90 (s, 5H, CONHC(CH₂CHCH₂)₃), 1,78-0,57 (m, 43H, RückgratCH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CONHC(CH₂CHCH₂)₃).

**Synthese von P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-MAAm-GGASIKVAV)
(PIKVAV1, PIKVAV2)**


Die Synthese der IKVAV-funktionalisierten Gastpolymere **PIKVAV1** und **PIKVAV2** wird beispielhaft anhand von Polymer **PIKVAV1** beschrieben. Die Monomere AdHexAAm (60,0 mg, 0,2 mmol, 5,0 \u00c4q.), DMA (0,3 mL, 3,3 mmol, 87,7 \u00c4q.), TMAEA (53,7 mg, 0,2 mmol, 5,0 \u00c4q.) und MAAm-GGASIKVAV (62,2 mg, 0,1 mmol, 2,3 \u00c4q.) wurden in 1,8 mL DMSO gel\u00f6st. Anschließend wurde die Reaktionsl\u00f6sung f\u00fcr 20 min entgast. Im n\u00e4chsten Schritt wurde AIBN (24,8 mg, 0,2 mmol, 4,0 \u00c4q.) hinzugegeben und erneut f\u00fcr 5 min entgast. Danach wurde die Reaktionsl\u00f6sung f\u00fcr 24 h bei 70 °C ger\u00fchrt. Die Aufreinigung erfolgte \u00fcber eine eint\u00e4gige Dialyse (MWCO 1000 Da) gegen Wasser. Nach Lyophilisierung wurde das Produkt P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-MAAm-GGASIKVAV) als wei\u00dfer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 4,37 (s, 2H, OCH_2), 3,68 (s, 2H, OCH_2CH_2), 3,19 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 3,12-2,62 (m, 98H, CONHCH_2 , $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$), 1,98 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 1,90 (s, 5H, $\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 1,70-0,97 (m, 46H, R\u00fcckgratCH_2 , $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 0,82 (s, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (Valin), $\beta\text{-CH}_3$, $\gamma\text{-CH}_3$ (Isoleucin)).

Synthese von *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton (TLaAAm)

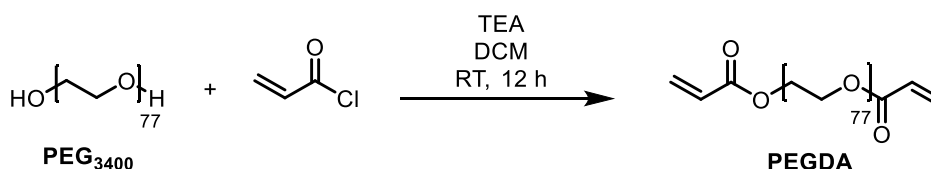


Homocystein-Thiolacton-Hydrochlorid (10,00 g, 62,09 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 140 mL H₂O/Dioxan 1:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt, bevor NaHCO₃ (27,33 g, 325,46 mmol, 5,0 Äq.) hinzugegeben und die Lösung für 30 min bei 0 °C gerührt wurde. Anschließend wurde Acryloylchlorid (11,70 g, 54,69 mmol, 2,0 Äq.) tropfenweise hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Brine (14 mL/g Thiolacton) hinzugegeben und die Mischung mit Ethylacetat extrahiert (3 x 28 mL/g Thiolacton). Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan umkristallisiert. Bei der anschließenden Filtration wurde der Rückstand mit wenig kaltem Dichlormethan gewaschen. *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton wurde als farblose Kristalle mit einer Ausbeute von 3,3 g (19,27 mmol, 30 %) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8,44 (d, ³*J* = 8,3 Hz, 1H, CHCONH), 6,20 (dd, ³*J* = 17,5, 9,9 Hz, 1H, CH₂CH), 6,10 (dd, ³*J* = 17,5 Hz, ²*J* = 2,3 Hz, 1H, ^{trans}CH₂CH), 5,64 (dd, ³*J* = 9,9 Hz, ²*J* = 2,3 Hz, 1H, ^{cis}CH₂CH), 4,68 (ddd, ³*J* = 12,6, 8,4, 7,0 Hz, 1H, HNCH), 3,42 (ddd, ³*J* = 11,9, 11,0, 5,4 Hz, 1H, SCH₂), 3,30 (ddd, ³*J* = 11,0, 7,0, 1,6 Hz, 1H, SCH₂), 2,47-2,33 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 2,18-2,04 (m, 1H, CHCH₂CH₂).

¹³C{¹H}-NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 205,8 (1C, C7), 165,0 (1C, C3), 131,5 (1C, C2), 126,6 (1C, C1), 58,6 (1C, C4), 30,7 (1C, C6), 27,2 (1C, C5).

Synthese von Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA)

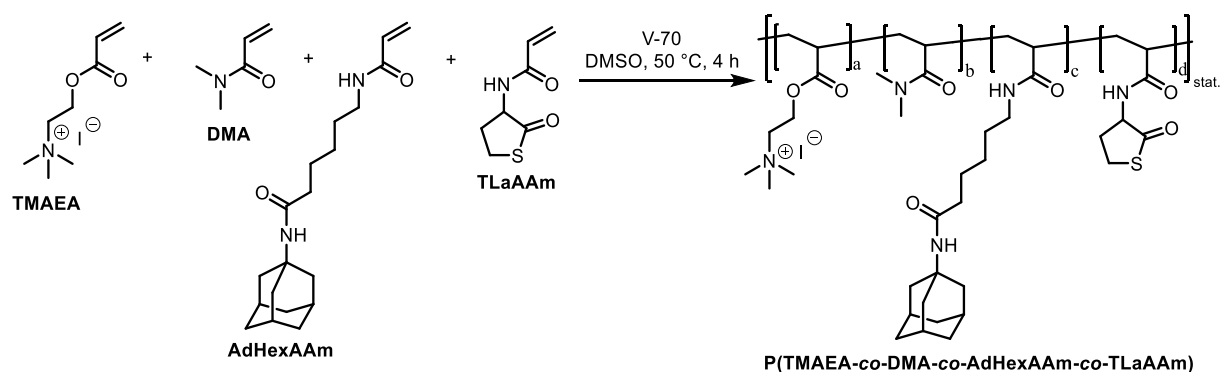


Polyethylenglykol (MW 3400 g/mol, PEG₃₄₀₀) (10,00 g, 2,90 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 75 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurde Triethylamin (586,9 mg, 804,0 μ L, 5,80 mmol, 2,0 Äq.) hinzugegeben und Acryloylchlorid (1064,8 mg, 959,2 μ L, 11,60 mmol, 4,0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt,

anschließend mit gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen und dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Die organische Phase wurde im Vakuum auf 15 mL einreduziert und in kaltem Diethylether gefällt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,1 g (2,02 mmol, 70 %) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 6,33 (dd, $^3J = 19,0$ Hz, $^2J = 1,9$ Hz, 1H, $^{\text{trans}}\text{CH}_2\text{CH}$), 6,20 (dd, $^3J = 19,0$, 9,8 Hz, 1H, CH_2CH), 5,95 (dd, $^3J = 9,8$ Hz, $^2J = 1,9$ Hz, 1H, $^{\text{cis}}\text{CH}_2\text{CH}$), 4,27-4,16 (m, 2H, COOCH_2), 3,73-3,60 (m, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2$), 3,60-3,40 (m, 156H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

Synthese von P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-TLaAAm) (PAd_n, PAd_{kat}, PAd_{kat}2)



Die Synthese der thiolactonhaltigen Polymere wird am Beispiel von Polymer **PAd_{kat}2** beschrieben. Dimethylacrylamid (5,00 mL, 48,47 mmol, 83,0 Äq.), AdHexAAm (0,37 g, 1,16 mmol, 2,0 Äq.), TLaAAm (1,00 g, 5,84 mmol, 10,0 Äq.) und TMAEA (0,83 g, 2,92 mmol, 5,0 Äq.) wurden in DMSO gelöst und für 20 min mit Argon entgast. Anschließend wurden 180,15 mg (0,58 mmol; 1,0 Äq.) 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70) hinzugefügt und für weitere 5 min mit Argon entgast. Die Reaktionslösung wurde dann im vorgeheizten Ölbad bei 50 °C für 4 h rühren gelassen. Anschließend wurde die Lösung für drei Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 1000 Da), wobei das Wasser dreimal täglich gewechselt wurde. Nach Gefriertrocknung wurde das Produkt als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 4,44 (br s, 19H, OCH_2CH_2 , NHCHCO), 3,68 (s, 10H, OCH_2), 3,40 (s, 9H, SCH_2), 3,20 (s, 45H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 3,11-2,65 (m, 509H, CONHCH_2 , $\text{CON}(\text{CH}_3)_2$), 1,99 (s, 12H, $\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$), 1,91 (s, 5H, $\text{NHCCH}_2\text{CHCH}_2$), 1,80-0,92 (m, 228H, $^{\text{Rückgrat}}\text{CH}_2$, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONHC}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_3$).

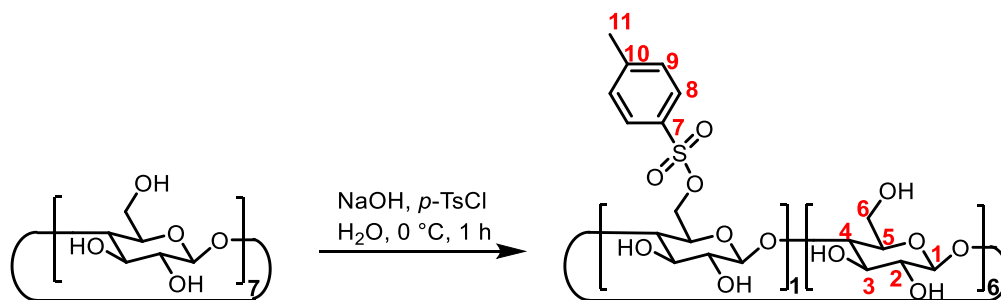
Polymeranalogue Öffnung des Thiolactonrings

Die polymeranalogue Öffnung des Thiolactonrings wird im Folgenden am Beispiel von **PAd_{katSH5}** beschrieben. Das Polymer P(TMAEA-*co*-DMA-*co*-AdHexAAM-*co*-TLAAM) (1,40 g, 0,11 mmol, 8,7 Äq. TLaAAM) wurde in 14 mL PBS-Puffer gelöst und mit Argon entgast. Anschließend wurden 0,42 mL *n*-Propylamin (5,08 mmol, 43,5 Äq.) zugetropft und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit einer Spatelspitze DTT versetzt und für weitere 10 min gerührt, bevor sie für zwei Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 1000 Da) und danach lyophilisiert wurde. Das Produkt P(TMAEA-*co*-DMA-*co*-AdHexAAM-*co*-TLAAMSH) wurde als weißer Feststoff erhalten.

Polymeranalogue Peptidfunktionalisierung

Die polymeranalogue Peptidfunktionalisierung der ringgeöffneten Gastpolymere wird an dieser Stelle beispielhaft für **PAd_{katSHRGD}** beschrieben. 300 mg des komplett geöffneten Gastpolymers **PAd_{katSH5}** wurden in 3 mL Wasser mit einem pH-Wert von 6,5-7,0 gelöst und anschließend für 10 min mit Argon entgast. Dann wurde das Peptid Mal-Aca-GGRGDSF (42,13 mg, 0,04 mmol, 2,2 Äq.) unter Argongegenstrom hinzugefügt. Die Reaktion lief für 72 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine Spatelspitze DTT dazugegeben und für weitere 10 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 5000 Da) und anschließend gefriergetrocknet.

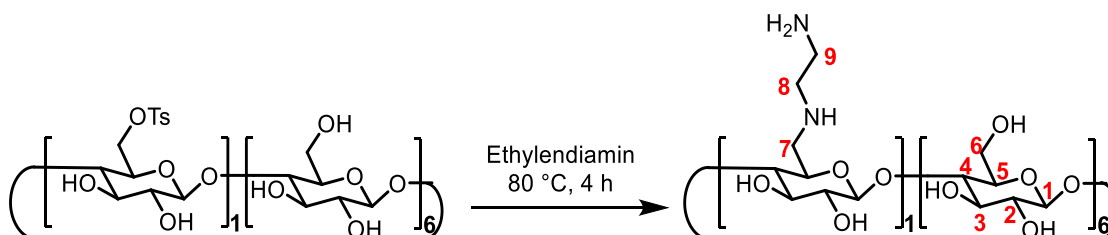
Für die Synthese der Polymere **PAd_{nSH2}** und **PAd_{katSH2}**, bei denen ein vollständiger Umsatz der Thiole das Ziel war, wurde ein weiterer Reaktionsschritt angeschlossen. Dieser Reaktionsschritt wird hier am Beispiel von **PAd_{katSH2}** beschrieben. Das zum Teil peptidfunktionalisierte Polymer **PAd_{katSH}** (1,12 g, 0,8 Äq. Thiol pro 100 Monomere, 0,07 mmol) wurde in einem Gemisch aus 5 mL DMSO und 10 mL Wasser mit einem pH-Wert von 6,5-7,0 gelöst und anschließend für 20 min mit Argon entgast. Dann wurde das Peptid Mal-Aca-GGRGDSF (100,01 mg, 0,11 mmol, 1,5 Äq.) hinzugefügt, der pH-Wert überprüft und erneut für 20 min entgast. Die Reaktion rührte anschließend für 5 h bei Raumtemperatur. Nach 3 h wurde eine 10 µL-Probe für die Durchführung eines Ellman's Assays genommen. Nach Ablauf der fünfständigen Reaktionszeit wurden 30,61 mg Maleimid (0,28 mmol, 4 Äq.) zur Reaktionslösung hinzugegeben und für 20 h gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für vier Tage gegen Wasser dialysiert (MWCO 8000 Da) und danach gefriergetrocknet.

Synthese von 6-O-Monosoyl-6-desoxy- β -cyclodextrin (β -CD-OTs)


β -Cyclodextrin (10,00 g, 8,81 mmol, 1,0 Äq.) wurde in 190 mL einer 0,4 M Natriumhydroxidlösung gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt, bevor 9,74 g *p*-Toluolsulfonylchlorid (51,1 mmol, 5,8 Äq.) zugegeben wurden. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde der Rückstand abfiltriert und einmal mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH < 7 eingestellt und 1 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde der Niederschlag abfiltriert und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum wurde 6-O-Monosoyl-6-desoxy- β -cyclodextrin (3,55 g, 2,75 mmol, 31 %) als weißer Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 7,74 (d, $^3J = 8,3$ Hz 2H, SCCH), 7,44 (d, $^3J = 8,0$ Hz, 2H, SCCHCH), 5,89-5,60 (m, 14H, sec. OH), 4,92-4,71 (m, 7H, OCHO), 4,58-4,13 (m, 6H, prim. OH), 3,79-3,41 (m, 28H, CHCHCHCH₂O), 3,36-3,14 (m, 14H, OCHCHCHCH), 2,43 (s, 3H, CCH₃).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 144,9 (s, 1C, C7), 132,7 (s, 1C, C10), 129,9 (s, 2C, C9), 127,6 (s, 2C, C8), 102,0 (s, 7C, C1), 81,5 (s, 7C, C4), 73,1-72,1 (m, 21C, C2, C3, C5), 59,9 (s, 7C, C6), 21,3 (s, 1C, C11).

Synthese von Mono-(6-ethandiamin-6-deoxy)- β -cyclodextrin (β -CD-EDA)


3,55 g β -CD-OTs (2,75 mmol, 1,0 Äq.) wurden in 66,0 ml Ethylendiamin (977,29 mmol, 355,0 Äq.) gelöst und 4 h bei 80 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in 35 ml MeOH:H₂O (1:1) gelöst und mit der 20-fachen Menge Aceton ausgefällt. Dieser Fällungsschritt wurde zweimal

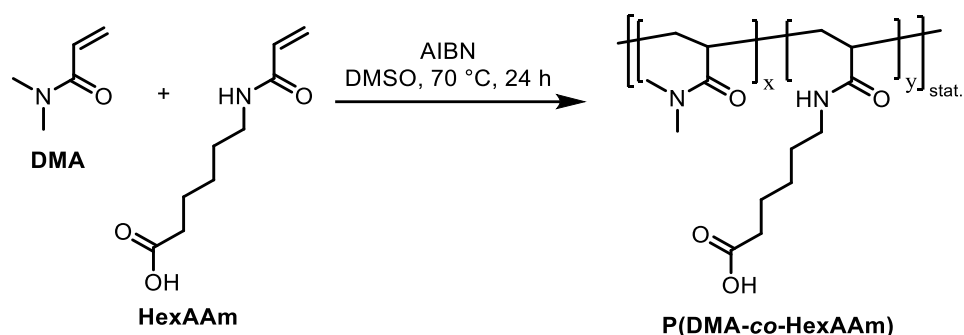
durchgeführt. Anschließend wurde der Niederschlag in 18 ml MeOH:H₂O (1:1) gelöst und in der 20-fachen Menge Aceton ausgefällt. Auch dieser Fällungsschritt wurde wiederholt. Das Produkt wurde schließlich unter vermindertem Druck getrocknet. Mono-(6-ethandiamin-6-desoxy)- β -cyclodextrin (2,80 g, 2,38 mmol, 87 %) wurde als weiß-helloranger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 5,71 (br s, 14H, OCHCHOHCHOH), 4,84 (s, 7H, OCH), 4,48 (br s, 6H, CHCH₂OH), 3,81-3,53 (m, 28H, CHCHCH₂OH), 3,49-3,33 (m, 14H, OCHCHCHCH), 2,99-2,56 (m, 6H, CH₂NHCH₂CH₂NH₂).

¹³C{¹H}-NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 102,0 (s, 7C, C1), 81,6 (s, 7C, C4), 73,4-71,8 (m, 21C, C2, C3, C5), 59,9 (s, 7C, C6), 54,0 (s, 2C, C8), 45,9 (s, 2C, C7), 40,9 (s, 2C, C9).

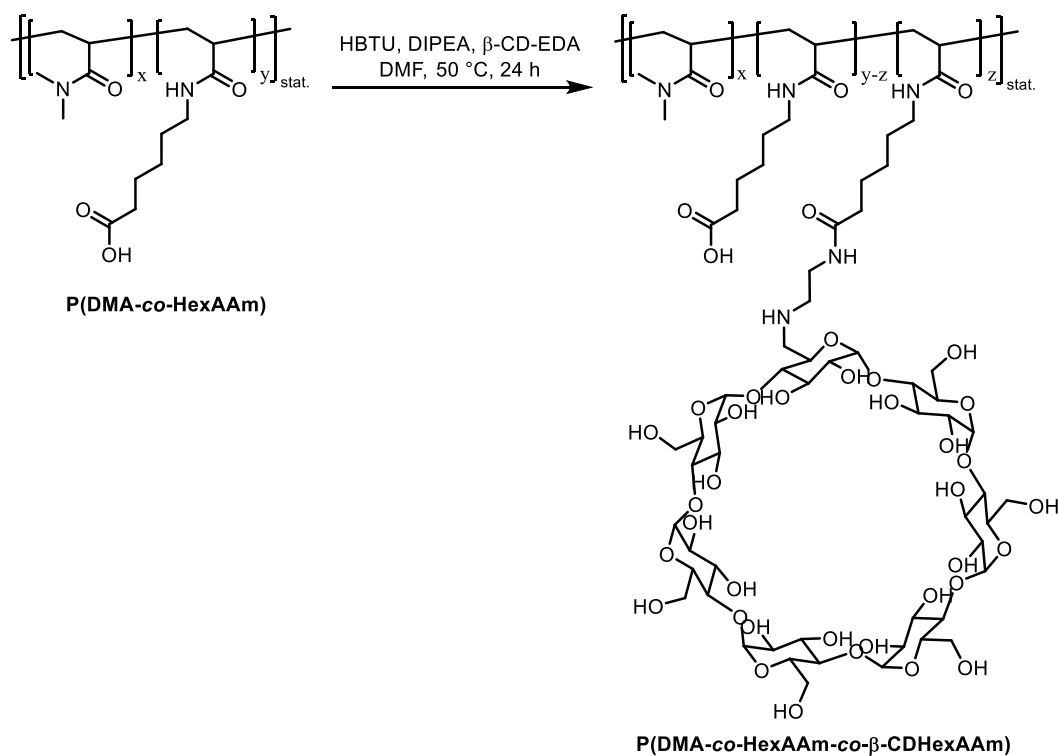
ESI-MS: Masse gefunden: $m/z = 1177,4341 [M+H]^+$

Synthese von P(DMA-*co*-HexAAm) (PPCD1-PPCD8)



Die Synthese der Präpolymere P(DMA-*co*-HexAAm) wird am Beispiel von **PPCD3** beschrieben. Die Monomere HexAAm (270,00 mg, 1,46 mmol, 10,1 Äq.) und DMA (1,34 mL, 12,96 mmol, 89,9 Äq.) wurden in 7,2 mL DMSO gelöst und 20 min lang mit Argon entgast. Anschließend wurde AIBN (23,70 mg, 0,14 mmol, 1,0 Äq.) zugegeben und die Lösung weitere 5 min mit Argon entgast. Die Reaktionslösung wurde über Nacht in einem vorgeheizten Ölbad bei 70 °C gerührt. Die Dialyse gegen Wasser für 1 d (MWCO 1 kDa) und die Gefriertrocknung ergaben P(DMA-*co*-HexAAm) als weißen Feststoff.

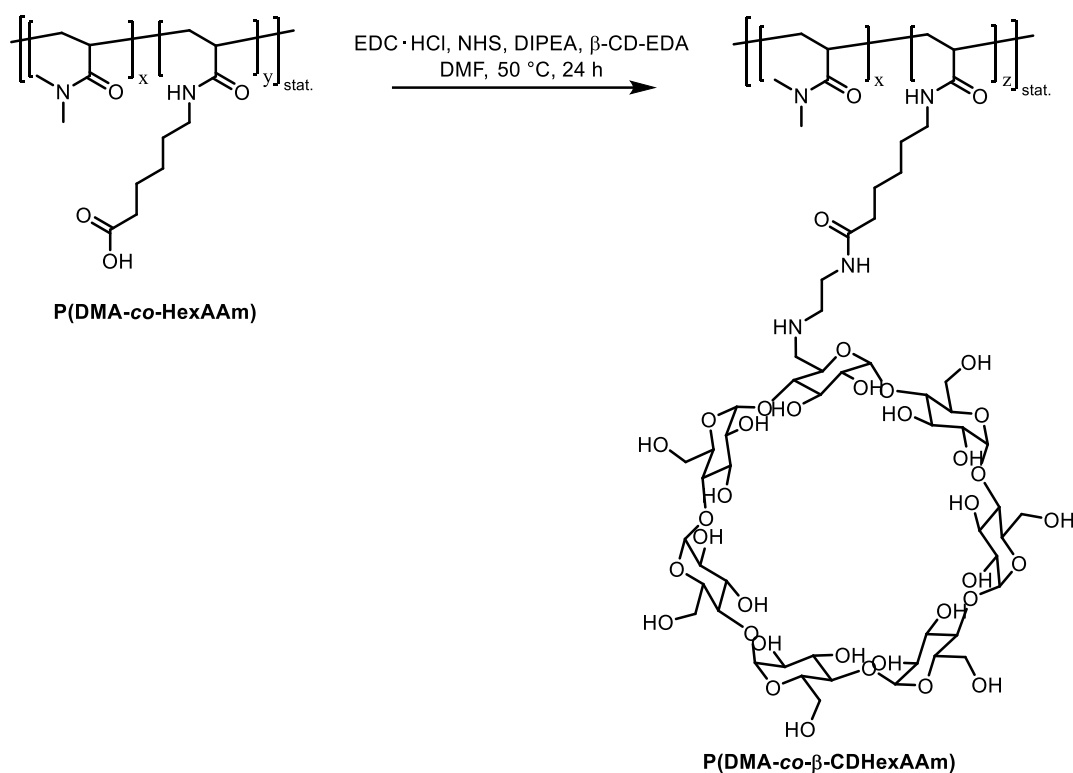
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3,16-2,63 (m, 49H, CONHCH₂, CON(CH₃)₂), 2,62-2,24 (m, 8H, ^{Rückgrat}CH), 2,19 (s, 2H, CH₂COOH), 1,76-0,86 (m, 22H, ^{Rückgrat}CH₂, NHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CO).

Synthese von P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm) (PCD1-PCD7)

Die Synthese der P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm)-Polymere **PCD1-PCD7** wird exemplarisch für **PCD3** beschrieben. 0,80 g (0,83 mmol HexAAm, 1,0 Äq.) **PPCD3** wurden in DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden HBTU (561,65 mg, 1,48 mmol, 2,0 Äq.), DIPEA (0,39 ml, 2,22 mmol, 3,0 Äq.) und β -CD-EDA (1045,94 mg, 0,89 mmol, 1,2 Äq.) zugegeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch 24 h lang auf 50 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck auf die Hälfte reduziert und 4 d lang gegen Wasser dialysiert (MWCO 5000 Da). Dabei wurde das Wasser dreimal täglich gewechselt. Die Gefriertrocknung ergab P(DMA-*co*-HexAAm-*co*- β -CDHexAAm) als hellorangenen Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 5,75 (br s, 14H, sec. OH), 4,84 (s, 7H, OCHO), 4,50 (s, 6H, prim. OH), 4,30-3,42 (m, 28H, CHCHCH₂OH), 3,22-2,64 (m, 78H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CONHCH₂CH₂NHCH₂, CON(CH₃)₂), 1,92-0,75 (m, 29H, RückgratCH₂, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂).

Synthese von P(DMA-co-β-CDHexAAm) (PCD8)



5,87 g des Präpolymers **PPCD8** (1,44 mmol, 1,0 Äq. HexAAm) wurden in einem ausgeheizten Schlenk Kolben in 587 mL trockenem DMF gelöst. Anschließend wurden 17,05 g (14,48 mmol, 10,0 Äq.) β-CD-EDA und 6,56 mL (37,67 mmol, 26,0 Äq.) DIPEA zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Danach wurden EDC · HCl (4,44 g, 23,18 mmol, 16,0 Äq.) und NHS (2,67 g, 23,18 mmol, 16,0 Äq.) zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 24 h bei 50 °C erhitzt. Die Lösung wurde dann auf die Hälfte reduziert und sieben Tage gegen Wasser dialysiert (8000 MWCO) und gefriergetrocknet. Das Produkt wurde als hellorangener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 6,10-5,46 (m, 35H, sec. OH), 4,84 (s, 18H, OCHO), 4,47 (s, 15H, prim. OH), 3,63 (s, 70H, NHCH₂CHCHCH), 3,12-2,64 (m, 605H, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CONHCH₂CH₂NHCH₂, CON(CH₃)₂), 1,82-0,76 (m, 215H, RückgratCH₂, CONHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂).

Präparation der Hydrogele

Für die Herstellung der Hydrogele aus Kapitel 3 wurden die Wirt- und Gastpolymere in Wasser gelöst. In den Kapiteln 4 und 5 wurden die Polymere für die Hydrogelsynthese in PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 gelöst. Die Wirt- und Gastpolymerlösungen wurden anschließend mit einem Vortex-Mixer und einem Spatel gemischt, bis sich ein homogenes Hydrogel bildete.

Alle Hydrogele wurden in einem Verhältnis von 1:1 der Adamantyl- und β -Cyclodextrin-Gruppen hergestellt. Bei den dualen Hydrogelen wurde PEGDA im Verhältnis 1:2 (PEGDA:Thiol) hinzugegeben. Um eine vollständige Vernetzung sicherzustellen, wurden alle Hydrogele vor der Charakterisierung über Nacht stehen gelassen. Die Polymerkonzentration bezieht sich auf den Gesamtgewichtsanteil aller Polymere im Hydrogel. Alle Hydrogele wurden, falls nicht anders angegeben, in Duplikaten hergestellt und charakterisiert.

9. Literaturverzeichnis

- (1) Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Nordmeier, E. H. *Makromolekulare Chemie*, 5th ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2014.
- (2) Alavi, S.; Thomas, S.; Sandeep, K. P.; Kalarikkal, N.; Varghese, J.; Yaragalla, S. *Polymers for Packaging Applications*; CRC Press, 2014.
- (3) Prete, S.; Dattilo, M.; Patitucci, F.; Pezzi, G.; Parisi, O. I.; Puoci, F. Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management. *J. Funct. Biomater.* **2023**, *14* (9), 455. <https://doi.org/10.3390/jfb14090455>.
- (4) Islam, S. U.; Butola, B. S. *Advanced Functional Textiles and Polymers: Fabrication, Processing and Applications*; John Wiley & Sons, 2019.
- (5) Williams, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29* (20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- (6) Langer, R.; Tirrell, D. A. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature* **2004**, *428* (6982), 487–492. <https://doi.org/10.1038/nature02388>.
- (7) De Jong, W. H.; Borm, P. J. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3* (2), 133–149. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>.
- (8) Palmaz, J. C. Biopolymers for Endovascular Use. *Semin. Interv. Radiol.* **2008**, *15*, 13–19. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1057053>.
- (9) Shen, Y.; Yu, X.; Cui, J.; Yu, F.; Liu, M.; Chen, Y.; Wu, J.; Sun, B.; Mo, X. Development of Biodegradable Polymeric Stents for the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomolecules* **2022**, *12* (9), 1245. <https://doi.org/10.3390/biom12091245>.
- (10) Sunny, M. C.; Sharma, C. P. Surface Modification of Corneal Contact Lens with Phosphoryl Choline by Glow Discharge. *Biomater. Artif. Cells. Immobilization Biotechnol.* **1991**, *19* (3), 599–612. <https://doi.org/10.3109/10731199109117839>.
- (11) Weeks, A.; Subbaraman, L. N.; Jones, L.; Sheardown, H. The Competing Effects of Hyaluronic and Methacrylic Acid in Model Contact Lenses. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2012**, *23* (8), 1021–1038. <https://doi.org/10.1163/092050611X569060>.
- (12) Jayakumar, A.; Jose, V. K.; Lee, J.-M. Hydrogels for Medical and Environmental Applications. *Small Methods* **2020**, *4* (3), 1900735. <https://doi.org/10.1002/smt.201900735>.
- (13) A. Hunt, J.; Chen, R.; Veen, T. van; Bryan, N. Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (33), 5319–5338. <https://doi.org/10.1039/C4TB00775A>.

- (14) Kawano, T.; Kidoaki, S. Elasticity Boundary Conditions Required for Cell Mechanotaxis on Microelastically-Patterned Gels. *Biomaterials* **2011**, *32* (11), 2725–2733. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.009>.
- (15) Lo, C.-M.; Wang, H.-B.; Dembo, M.; Wang, Y. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophys. J.* **2000**, *79* (1), 144–152. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5).
- (16) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- (17) Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* **2009**, *324* (5935), 1673–1677. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>.
- (18) Kehr, N. S.; Atay, S.; Ergün, B. Self-Assembled Monolayers and Nanocomposite Hydrogels of Functional Nanomaterials for Tissue Engineering Applications. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (4), 445–463. <https://doi.org/10.1002/mabi.201400363>.
- (19) Khademhosseini, A.; Vacanti, J. P.; Langer, R. Progress in Tissue Engineering. *Sci. Am.* **2009**, *300* (5), 64–71.
- (20) Cameron, Andrew. R.; Frith, Jessica. E.; Cooper-White, Justin. J. The Influence of Substrate Creep on Mesenchymal Stem Cell Behaviour and Phenotype. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 5979–5993. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.003>.
- (21) Chaudhuri, O.; Gu, L.; Darnell, M.; Klumpers, D.; Bencherif, S. A.; Weaver, J. C.; Huebsch, N.; Mooney, D. J. Substrate Stress Relaxation Regulates Cell Spreading. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 6365. <https://doi.org/10.1038/ncomms7365>.
- (22) Rubert Pérez, C. M.; Panitch, A.; Chmielewski, J. A Collagen Peptide-Based Physical Hydrogel for Cell Encapsulation. *Macromol. Biosci.* **2011**, *11* (10), 1426–1431. <https://doi.org/10.1002/mabi.201100230>.
- (23) Lin, C.-C.; Anseth, K. S. Controlling Affinity Binding with Peptide-Functionalized Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (14), 2325–2331. <https://doi.org/10.1002/adfm.200900107>.
- (24) Blümmel, J.; Perschmann, N.; Aydin, D.; Drinjakovic, J.; Surrey, T.; Lopez-Garcia, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P. Protein Repellent Properties of Covalently Attached PEG Coatings on Nanostructured SiO₂-Based Interfaces. *Biomaterials* **2007**, *28* (32), 4739–4747. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.038>.

-
- (25) Bolduan, P. Synthese Und Charakterisierung von Biologisch-Aktiven Hydrogelen Und Deren Anwendung in Der Stammzellforschung, Technische Universität Dortmund, Dortmund, 2018.
- (26) Hollister, S. J. Scaffold Engineering: A Bridge to Where? *Biofabrication* **2009**, *1*, 012001. <https://doi.org/DOI.10.1088/1758-5082/1/1/012001>.
- (27) Zagris, N. Extracellular Matrix in Development of the Early Embryo. *Micron* **2001**, *32* (4), 427–438. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00011-1](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00011-1).
- (28) Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The Extracellular Matrix at a Glance. *J. Cell Sci.* **2010**, *123* (24), 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- (29) Labat-Robert, J.; Bihari-Varga, M.; Robert, L. Extracellular Matrix. *FEBS Lett.* **1990**, *268* (2), 386–393. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81291-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81291-U).
- (30) Mecham, R. P. Overview of Extracellular Matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2012**, *57* (1), 10.1.1-10.1.16. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1001s57>.
- (31) Theocharis, A. D.; Skandalis, S. S.; Gialeli, C.; Karamanos, N. K. Extracellular Matrix Structure. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- (32) Halder, S. K.; Sapkota, A.; Milner, R. The Impact of Genetic Manipulation of Laminin and Integrins at the Blood–Brain Barrier. *Fluids Barriers CNS* **2022**, *19* (1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00346-8>.
- (33) Mas-Moruno, C.; Fraioli, R.; Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Kapp, T. G.; Kessler, H. A $\nu\beta$ 3- or A5 β 1-Integrin-Selective Peptidomimetics for Surface Coating. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (25), 7048–7067. <https://doi.org/10.1002/anie.201509782>.
- (34) Pätzold, F. Synthese Und Charakterisierung von Maßgeschneiderten Bioabbaubaren Hydrogelsystemen Für Eine Anwendung in Der Biomedizin., Technische Universität Dortmund, Dortmund, 2022.
- (35) *Hydrogels for 3D cell culture*. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/3d-hydrogels.html> (accessed 2018-11-04).
- (36) Centeno, E. G. Z.; Cimarosti, H.; Bithell, A. 2D versus 3D Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cultures for Neurodegenerative Disease Modelling. *Mol. Neurodegener.* **2018**, *13* (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0258-4>.
- (37) Ladoux, B.; Anon, E.; Lambert, M.; Rabodzey, A.; Hersen, P.; Buguin, A.; Silberzan, P.; Mège, R.-M. Strength Dependence of Cadherin-Mediated Adhesions. *Biophys. J.* **2010**, *98* (4), 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.10.044>.
-

- (38) McBeath, R.; Pirone, D. M.; Nelson, C. M.; Bhadriraju, K.; Chen, C. S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev. Cell* **2004**, *6* (4), 483–495. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00075-9).
- (39) Wilson, J. L.; McDevitt, T. C. Chapter 22 - Biofunctional Hydrogels for Three-Dimensional Stem Cell Culture. In *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*; Vishwakarma, A., Karp, J. M., Eds.; Academic Press: Boston, 2017; pp 345–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802734-9.00022-6>.
- (40) Kasper, C.; Egger, D.; Lavrentieva, A. *Basic Concepts on 3D Cell Culture*; Springer: Cham, 2021.
- (41) Risbridger, G. P. Human Cell Lines as Tools of Our Trade: “Laying It on the (Cell) Line.” *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29* (1), 1–2. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1376>.
- (42) Caliari, S. R.; Burdick, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat. Methods* **2016**, *13* (5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- (43) Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch. Med. Sci. AMS* **2018**, *14* (4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.
- (44) Luca, A. C.; Mersch, S.; Deenen, R.; Schmidt, S.; Messner, I.; Schäfer, K.-L.; Baldus, S. E.; Huckenbeck, W.; Piekorz, R. P.; Knoefel, W. T.; Krieg, A.; Stoecklein, N. H. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLOS ONE* **2013**, *8* (3), e59689. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059689>.
- (45) Thomas, M.; Willerth, S. M. 3-D Bioprinting of Neural Tissue for Applications in Cell Therapy and Drug Screening. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2017**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00069>.
- (46) Liang, K.; Hyun Bae, K.; Kurisawa, M. Recent Advances in the Design of Injectable Hydrogels for Stem Cell-Based Therapy. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (24), 3775–3791. <https://doi.org/10.1039/C9TB00485H>.
- (47) Glotzbach, K.; Stamm, N.; Weberskirch, R.; Faissner, A. Hydrogels Derivatized With Cationic Moieties or Functional Peptides as Efficient Supports for Neural Stem Cells. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00475>.
- (48) Sood, N.; Bhardwaj, A.; Mehta, S.; Mehta, A. Stimuli-Responsive Hydrogels in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Drug Deliv.* **2016**.

-
- (49) Stojkov, G.; Niyazov, Z.; Picchioni, F.; Bose, R. K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. *Gels* **2021**, *7* (4), 255. <https://doi.org/10.3390/gels7040255>.
- (50) Birla, R. *Introduction to Tissue Engineering. Applications and Challenges*; Wiley: Hoboken, 2014.
- (51) Ullah, F.; Othman, M. B. H.; Javed, F.; Ahmad, Z.; Akil, H. Md. Classification, Processing and Application of Hydrogels: A Review. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
- (52) Parenteau-Bareil, R.; Gauvin, R.; Berthod, F. Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials* **2010**, *3* (3), 1863–1887. <https://doi.org/10.3390/ma3031863>.
- (53) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (54) Collins, M. N.; Birkinshaw, C. Hyaluronic Acid Based Scaffolds for Tissue Engineering—A Review. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>.
- (55) Novikova, L. N.; Mosahebi, A.; Wiberg, M.; Terenghi, G.; Kellerth, J.-O.; Novikov, L. N. Alginate Hydrogel and Matrigel as Potential Cell Carriers for Neurotransplantation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *77A* (2), 242–252. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30603>.
- (56) Caliarì, S. R.; Burdick, J. A. A Practical Guide to Hydrogels for Cell Culture. *Nat. Methods* **2016**, *13* (5), 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- (57) Hughes, C. S.; Postovit, L. M.; Lajoie, G. A. Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture. *PROTEOMICS* **2010**, *10* (9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>.
- (58) Kleinman, H. K.; Martin, G. R. Matrigel: Basement Membrane Matrix with Biological Activity. *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15* (5), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>.
- (59) Peterson, N. C. From Bench to Cageside: Risk Assessment for Rodent Pathogen Contamination of Cells and Biologics. *ILAR J.* **2008**, *49* (3), 310–315. <https://doi.org/10.1093/ilar.49.3.310>.
- (60) Zhu, J.; Marchant, R. E. Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **2011**, *8* (5), 607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>.

- (61) Willerth, S. M.; Sakiyama-Elbert, S. E. *Combining Stem Cells and Biomaterial Scaffolds for Constructing Tissues and Cell Delivery*; Harvard Stem Cell Institute, 2008. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.1.1>.
- (62) Sawhney, A. S.; Pathak, C. P.; Hubbell, J. A. Bioerodible Hydrogels Based on Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol)-Co-Poly(.Alpha.-Hydroxy Acid) Diacrylate Macromers. *Macromolecules* **1993**, *26* (4), 581–587. <https://doi.org/10.1021/ma00056a005>.
- (63) Kraehenbuehl, T. P.; Zammaretti, P.; Van der Vlies, A. J.; Schoenmakers, R. G.; Lutolf, M. P.; Jaconi, M. E.; Hubbell, J. A. Three-Dimensional Extracellular Matrix-Directed Cardioprogenitor Differentiation: Systematic Modulation of a Synthetic Cell-Responsive PEG-Hydrogel. *Biomaterials* **2008**, *29* (18), 2757–2766. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.016>.
- (64) Lampe, K. J.; Mooney, R. G.; Bjugstad, K. B.; Mahoney, M. J. Effect of Macromer Weight Percent on Neural Cell Growth in 2D and 3D Nondegradable PEG Hydrogel Culture. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *94A* (4), 1162–1171. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32787>.
- (65) Bryant, S. J.; Anseth, K. S. Hydrogel Properties Influence ECM Production by Chondrocytes Photoencapsulated in Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *59* (1), 63–72. <https://doi.org/10.1002/jbm.1217>.
- (66) Tibbitt, M. W.; Anseth, K. S. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103* (4), 655–663. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
- (67) Cushing, M. C.; Anseth, K. S. Hydrogel Cell Cultures. *Science* **2007**, *316* (5828), 1133–1134. <https://doi.org/10.1126/science.1140171>.
- (68) Jia, J.; Coyle, R. C.; Richards, D. J.; Berry, C. L.; Barrs, R. W.; Biggs, J.; James Chou, C.; Trusk, T. C.; Mei, Y. Development of Peptide-Functionalized Synthetic Hydrogel Microarrays for Stem Cell and Tissue Engineering Applications. *Acta Biomater.* **2016**, *45*, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.006>.
- (69) Qiong Liu, S.; Tay, R.; Khan, M.; Ee, P. L. R.; L. Hedrick, J.; Yan Yang, Y. Synthetic Hydrogels for Controlled Stem Cell Differentiation. *Soft Matter* **2010**, *6* (1), 67–81. <https://doi.org/10.1039/B916705F>.
- (70) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (7), 1869–1879.
- (71) Poldervaart, M. T.; Goversen, B.; Ruijter, M. de; Abbadessa, A.; Melchels, F. P. W.; Öner, F. C.; Dhert, W. J. A.; Vermonden, T.; Alblas, J. 3D Bioprinting of Methacrylated

- Hyaluronic Acid (MeHA) Hydrogel with Intrinsic Osteogenicity. *PLOS ONE* **2017**, *12* (6), e0177628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177628>.
- (72) Spearman, B. S.; Agrawal, N. K.; Rubiano, A.; Simmons, C. S.; Mobini, S.; Schmidt, C. E. Tunable Methacrylated Hyaluronic Acid-Based Hydrogels as Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108* (2), 279–291. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36814>.
- (73) Xiao, W.; Qu, X.; Li, J.; Chen, L.; Tan, Y.; Li, K.; Li, B.; Liao, X. Synthesis and Characterization of Cell-Laden Double-Network Hydrogels Based on Silk Fibroin and Methacrylated Hyaluronic Acid. *Eur. Polym. J.* **2019**, *118*, 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.040>.
- (74) Krishna, O. D.; Kiick, K. L. Protein- and Peptide-Modified Synthetic Polymeric Biomaterials. *Pept. Sci.* **2010**, *94* (1), 32–48. <https://doi.org/10.1002/bip.21333>.
- (75) Sosnik, A.; Sefton, M. V. Semi-Synthetic Collagen/Ploxamine Matrices for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2005**, *26* (35), 7425–7435. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.086>.
- (76) Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V. Biomedical Applications of Hydrogels: A Review of Patents and Commercial Products. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.
- (77) Blanco, M. D.; Bernardo, M. V.; Teijón, C.; Sastre, R. L.; Teijón, J. M. Transdermal Application of Bupivacaine-Loaded Poly(Acrylamide(A)-Co-Monomethyl Itaconate) Hydrogels. *Int. J. Pharm.* **2003**, *255* (1), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00036-X).
- (78) Blanco, M. D.; Guerrero, S.; Teijón, C.; Olmo, R.; Pastrana, L.; Katime, I.; Teijón, J. M. Preparation and Characterization of Nanoparticulate Poly(N-Isopropylacryl- Amide) Hydrogel for the Controlled Release of Anti-Tumour Drugs. *Polym. Int.* **2008**, *57* (11), 1215–1225. <https://doi.org/10.1002/pi.2457>.
- (79) Raymond, S.; Weintraub, L. Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Science* **1959**, *130* (3377), 711–711. <https://doi.org/10.1126/science.130.3377.711.a>.
- (80) O'Brien-Simpson, N. M.; Ede, N. J.; Brown, L. E.; Swan, J.; Jackson, D. C. Polymerization of Unprotected Synthetic Peptides: A View toward Synthetic Peptide Vaccines. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119* (6), 1183–1188. <https://doi.org/10.1021/ja962707k>.

- (81) MacDonald, D.; Breton, R.; Sutcliffe, R.; Walker, J. Uses and Limitations of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) to Categorize Substances on the Canadian Domestic Substance List as Persistent and/or Bioaccumulative, and Inherently Toxic to Non-Human Organisms. *SAR QSAR Environ. Res.* **2002**, *13* (1), 43–55. <https://doi.org/10.1080/10629360290002082>.
- (82) Dimitrov, S. D.; Dimitrova, N. C.; Walker, J. D.; Veith, G. D.; Mekenyan, O. G. Bioconcentration Potential Predictions Based on Molecular Attributes – an Early Warning Approach for Chemicals Found in Humans, Birds, Fish and Wildlife. *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22* (1), 58–68. <https://doi.org/10.1002/qsar.200390005>.
- (83) Altin, H.; Kosif, I.; Sanyal, R. Fabrication of “Clickable” Hydrogels via Dendron–Polymer Conjugates. *Macromolecules* **2010**, *43* (8), 3801–3808. <https://doi.org/10.1021/ma100292w>.
- (84) Hodgson, S. M.; McNelles, S. A.; Abdullahu, L.; Marozas, I. A.; Anseth, K. S.; Adronov, A. Reproducible Dendronized PEG Hydrogels via SPAAC Cross-Linking. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (12), 4054–4059. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01115>.
- (85) Cruz-Acuña, R.; Quirós, M.; Farkas, A. E.; Dedhia, P. H.; Huang, S.; Siuda, D.; García-Hernández, V.; Miller, A. J.; Spence, J. R.; Nusrat, A.; García, A. J. Synthetic Hydrogels for Human Intestinal Organoid Generation and Colonic Wound Repair. *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19* (11), 1326–1335. <https://doi.org/10.1038/ncb3632>.
- (86) Weaver, J. D.; Headen, D. M.; Hunckler, M. D.; Coronel, M. M.; Stabler, C. L.; García, A. J. Design of a Vascularized Synthetic Poly(Ethylene Glycol) Macroencapsulation Device for Islet Transplantation. *Biomaterials* **2018**, *172*, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.04.047>.
- (87) Smith, L. J.; Taimoory, S. M.; Tam, R. Y.; Baker, A. E. G.; Bintah Mohammad, N.; Trant, J. F.; Shoichet, M. S. Diels–Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (3), 926–935. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01715>.
- (88) Boehnke, N.; Cam, C.; Bat, E.; Segura, T.; Maynard, H. D. Imine Hydrogels with Tunable Degradability for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2015**, *16* (7), 2101–2108. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00519>.
- (89) Sallouh, O.; Weberskirch, R. Facile Formation of Hydrogels by Using Functional Precursor Polymers and the Chemoselective Staudinger Coupling. *Polymer* **2016**, *86*, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.01.066>.

-
- (90) Deng, Z.; Guo, Y.; Zhao, X.; Ma, P. X.; Guo, B. Multifunctional Stimuli-Responsive Hydrogels with Self-Healing, High Conductivity, and Rapid Recovery through Host–Guest Interactions. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (5), 1729–1742. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00008>.
- (91) M. Sangeetha, N.; Maitra, U. Supramolecular Gels: Functions and Uses. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (10), 821–836. <https://doi.org/10.1039/B417081B>.
- (92) Osman, S. K.; Brandl, F. P.; Zayed, G. M.; Teßmar, J. K.; Göpferich, A. M. Cyclodextrin Based Hydrogels: Inclusion Complex Formation and Micellization of Adamantane and Cholesterol Grafted Polymers. *Polymer* **2011**, *52* (21), 4806–4812. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.07.059>.
- (93) Schwarz, U. *Kräfte Und Elastizität in Der Zelladhäsion*; Tätigkeitsbericht; Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung, 2003; p 6. https://www.mpikg.mpg.de/70349/Schwarz_2003_gen.PDF.
- (94) Wei, Z.; Hai Yang, J.; Zhou, J.; Xu, F.; Zrínyi, M.; H. Dussault, P.; Osada, Y.; Mei Chen, Y. Self-Healing Gels Based on Constitutional Dynamic Chemistry and Their Potential Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (23), 8114–8131. <https://doi.org/10.1039/C4CS00219A>.
- (95) Amendola, V.; Meneghetti, M. Self-Healing at the Nanoscale. *Nanoscale* **2009**, *1* (1), 74–88. <https://doi.org/10.1039/B9NR00146H>.
- (96) South, A. B.; Lyon, L. A. Autonomic Self-Healing of Hydrogel Thin Films. *Angew. Chem.* **2010**, *122* (4), 779–783. <https://doi.org/10.1002/ange.200906040>.
- (97) Taylor, D. L.; in het Panhuis, M. Self-Healing Hydrogels. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (41), 9060–9093. <https://doi.org/10.1002/adma.201601613>.
- (98) Utrera-Barrios, S.; Verdejo, R.; A. López-Manchado, M.; Santana, M. H. Evolution of Self-Healing Elastomers, from Extrinsic to Combined Intrinsic Mechanisms: A Review. *Mater. Horiz.* **2020**, *7* (11), 2882–2902. <https://doi.org/10.1039/D0MH00535E>.
- (99) Jing, Y.; Yang, B.; Yuan, W.; Han, S.; Song, L.; Ye, M.; Zhang, Z.-Y.; Bian, L. Dynamic Cell-Adaptable Hydrogels with a Moderate Level of Elasticity Promote 3D Development of Encapsulated Cells. *Appl. Mater. Today* **2021**, *22*, 100892. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100892>.
- (100) Pek, Y. S.; Wan, A. C. A.; Ying, J. Y. The Effect of Matrix Stiffness on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in a 3D Thixotropic Gel. *Biomaterials* **2010**, *31* (3), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.057>.
-

- (101) Schwarz, U. S.; Balaban, N. Q.; Riveline, D.; Bershadsky, A.; Geiger, B.; Safran, S. A. Calculation of Forces at Focal Adhesions from Elastic Substrate Data: The Effect of Localized Force and the Need for Regularization. *Biophys. J.* **2002**, *83* (3), 1380–1394. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)73909-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)73909-X).
- (102) Radvar, E.; Azevedo, H. S. Supramolecular Peptide/Polymer Hybrid Hydrogels for Biomedical Applications. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (1), 1800221. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800221>.
- (103) *Matrigel - an overview | ScienceDirect Topics*. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/matrigel> (accessed 2024-10-20).
- (104) Klouda, L.; Mikos, A. G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68* (1), 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.02.025>.
- (105) Stamm, N. Synthese Und Charakterisierung von Funktionalisierten Hydrogel Matrices Und Deren Anwendung in Der Kultivierung von Neuralen Stammzellen, Technische Universität Dortmund, Dortmund, 2023.
- (106) Andersen, T.; Auk-Emblem, P.; Dornish, M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* **2015**, *4* (2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>.
- (107) Rodell, C. B.; Mealy, J. E.; Burdick, J. A. Supramolecular Guest–Host Interactions for the Preparation of Biomedical Materials. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (12), 2279–2289. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00483>.
- (108) Xue, K.; Liow, S. S.; Karim, A. A.; Li, Z.; Loh, X. J. A Recent Perspective on Noncovalently Formed Polymeric Hydrogels. *Chem. Rec.* **2018**, *18* (10), 1517–1529. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800015>.
- (109) Omar, J.; Ponsford, D.; Dreiss, C. A.; Lee, T.-C.; Loh, X. J. Supramolecular Hydrogels: Design Strategies and Contemporary Biomedical Applications. *Chem. – Asian J.* **2022**, *17* (9), e202200081. <https://doi.org/10.1002/asia.202200081>.
- (110) Li, Y.; Li, J.; Zhao, X.; Yan, Q.; Gao, Y.; Hao, J.; Hu, J.; Ju, Y. Triterpenoid-Based Self-Healing Supramolecular Polymer Hydrogels Formed by Host–Guest Interactions. *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22* (51), 18435–18441. <https://doi.org/10.1002/chem.201603753>.
- (111) Wang, S.; Ong, P. J.; Liu, S.; Thitsartarn, W.; Tan, M. J. B. H.; Suwardi, A.; Zhu, Q.; Loh, X. J. Recent Advances in Host-Guest Supramolecular Hydrogels for Biomedical Applications. *Chem. – Asian J.* **2022**, *17* (18), e202200608. <https://doi.org/10.1002/asia.202200608>.

- (112) Mohamadhoseini, M.; Mohamadnia, Z. Supramolecular Self-Healing Materials via Host-Guest Strategy between Cyclodextrin and Specific Types of Guest Molecules. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *432*, 213711. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213711>.
- (113) Appel, E. A.; Loh, X. J.; Jones, S. T.; Biedermann, F.; Dreiss, C. A.; Scherman, O. A. Ultrahigh-Water-Content Supramolecular Hydrogels Exhibiting Multistimuli Responsiveness. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (28), 11767–11773. <https://doi.org/10.1021/ja3044568>.
- (114) Jain, M.; Nowak, B. P.; Ravoo, B. J. Supramolecular Hydrogels Based on Cyclodextrins: Progress and Perspectives. *ChemNanoMat* **2022**, *8* (5), e202200077. <https://doi.org/10.1002/cnma.202200077>.
- (115) Szejtli, J. ChemInform Abstract: Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Cheminform* **2010**, *29*. <https://doi.org/10.1002/chin.199839312>.
- (116) Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M.; Takaha, T. Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1787–1802. <https://doi.org/10.1021/cr9700181>.
- (117) Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Weinheim, 2006. <https://doi.org/10.1002/3527608982>.
- (118) Loftsson, T.; Duchêne, D. Cyclodextrins and Their Pharmaceutical Applications. *Int. J. Pharm.* **2007**, *329* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.044>.
- (119) Schauer, S. Untersuchungen Zu Cyclodextrinkomplexen von Typischen Nichtsteroidalen Antiphlogistika, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, 2011.
- (120) Biedermann, F.; Uzunova, V. D.; Scherman, O. A.; Nau, W. M.; De Simone, A. Release of High-Energy Water as an Essential Driving Force for the High-Affinity Binding of Cucurbit[n]Urils. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (37), 15318–15323. <https://doi.org/10.1021/ja303309e>.
- (121) Pharr, D. Y.; Fu, Z. Sheng.; Smith, T. K.; Hinze, W. L. Solubilization of Cyclodextrins for Analytical Applications. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (3), 275–279. <https://doi.org/10.1021/ac00178a018>.
- (122) Gloe, K.; Gloe, D.; Heßke, Dipl.-C.; Lindoy, L. Supramolekulare Chemie: Vom Einzelmolekül Zur Komplexen Funktionseinheit. *Wiss. Z. Tech. Univ. Dresd.* **5620071-2** 32 - 38.

- (123) Liu, B.; Zhou, H.; Zhou, S.; Yuan, J. Macromolecules Based on Recognition between Cyclodextrin and Guest Molecules: Synthesis, Properties and Functions. *Eur. Polym. J.* **2015**, *65*, 63–81. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.01.017>.
- (124) Nalluri, S. K. M.; Voskuhl, J.; Bultema, J. B.; Boekema, E. J.; Ravoo, B. J. Light-Responsive Capture and Release of DNA in a Ternary Supramolecular Complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (41), 9747–9751. <https://doi.org/10.1002/anie.201103707>.
- (125) Isnin, R.; Salam, C.; Kaifer, A. E. Bimodal Cyclodextrin Complexation of Ferrocene Derivatives Containing N-Alkyl Chains of Varying Length. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (1), 35–41. <https://doi.org/10.1021/jo00001a009>.
- (126) Cromwell, W. C.; Bystrom, K.; Eftink, M. R. Cyclodextrin-Adamantanecarboxylate Inclusion Complexes: Studies of the Variation in Cavity Size. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89* (2), 326–332. <https://doi.org/10.1021/j100248a029>.
- (127) Liu, L.; Guo, Q.-X. Novel Prediction for the Driving Force and Guest Orientation in the Complexation of α - and β -Cyclodextrin with Benzene Derivatives. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (17), 3461–3467. <https://doi.org/10.1021/jp984545f>.
- (128) Charumanee, S.; Titwan, A.; Sirithunyalug, J.; Weiss-Greiler, P.; Wolschann, P.; Viernstein, H.; Okonogi, S. Thermodynamics of the Encapsulation by Cyclodextrins. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81* (4), 523–529. <https://doi.org/10.1002/jctb.1525>.
- (129) Biedermann, F.; Nau, W. M.; Schneider, H.-J. The Hydrophobic Effect Revisited—Studies with Supramolecular Complexes Imply High-Energy Water as a Noncovalent Driving Force. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (42), 11158–11171. <https://doi.org/10.1002/anie.201310958>.
- (130) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>.
- (131) Ross, P. D.; Rekharsky, M. V. Thermodynamics of Hydrogen Bond and Hydrophobic Interactions in Cyclodextrin Complexes. *Biophys. J.* **1996**, *71* (4), 2144–2154. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79415-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79415-8).
- (132) Loftsson, T.; Brewster, M. E.; Másson, M. Role of Cyclodextrins in Improving Oral Drug Delivery. *Am. J. Drug Deliv.* **2004**, *2* (4), 261–275. <https://doi.org/10.2165/00137696-200402040-00006>.
- (133) Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6* (2), 43. <https://doi.org/10.1208/pt060243>.

- (134) Hirayama, F.; Uekama, K. Cyclodextrin-Based Controlled Drug Release System. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36* (1), 125–141. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00058-1).
- (135) Fang, G.; Yang, X.; Chen, S.; Wang, Q.; Zhang, A.; Tang, B. Cyclodextrin-Based Host–Guest Supramolecular Hydrogels for Local Drug Delivery. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *454*, 214352. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214352>.
- (136) Xu, J.; Xue, Y.; Hu, G.; Lin, T.; Gou, J.; Yin, T.; He, H.; Zhang, Y.; Tang, X. A Comprehensive Review on Contact Lens for Ophthalmic Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2018**, *281*, 97–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.020>.
- (137) Harada, A.; Okada, M.; Li, J.; Kamachi, M. Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of Poly(Propylene Glycol) with Cyclodextrins. *Macromolecules* **1995**, *28* (24), 8406–8411. <https://doi.org/10.1021/ma00128a060>.
- (138) Yu, B.; Zhan, A.; Liu, Q.; Ye, H.; Huang, X.; Shu, Y.; Yang, Y.; Liu, H. A Designed Supramolecular Cross-Linking Hydrogel for the Direct, Convenient, and Efficient Administration of Hydrophobic Drugs. *Int. J. Pharm.* **2020**, *578*, 119075. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119075>.
- (139) Peng, L.; Zhang, H.; Feng, A.; Huo, M.; Wang, Z.; Hu, J.; Gao, W.; Yuan, J. Electrochemical Redox Responsive Supramolecular Self-Healing Hydrogels Based on Host–Guest Interaction. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (19), 3652–3659. <https://doi.org/10.1039/C5PY00296F>.
- (140) Yang, B.; Wei, K.; Loebel, C.; Zhang, K.; Feng, Q.; Li, R.; Wong, S. H. D.; Xu, X.; Lau, C.; Chen, X.; Zhao, P.; Yin, C.; Burdick, J. A.; Wang, Y.; Bian, L. Enhanced Mechanosensing of Cells in Synthetic 3D Matrix with Controlled Biophysical Dynamics. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 3514. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23120-0>.
- (141) Liu, G.; Yuan, Q.; Hollett, G.; Zhao, W.; Kang, Y.; Wu, J. Cyclodextrin-Based Host–Guest Supramolecular Hydrogel and Its Application in Biomedical Fields. *Polym. Chem.* **2018**, *9* (25), 3436–3449. <https://doi.org/10.1039/C8PY00730F>.
- (142) Highley, C. B.; Rodell, C. B.; Burdick, J. A. Direct 3D Printing of Shear-Thinning Hydrogels into Self-Healing Hydrogels. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2015**, *27* (34), 5075–5079. <https://doi.org/10.1002/adma.201501234>.
- (143) Irina Popescu, E.; Aricov, L.; Mocanu, S.; Matei, I.; Hristea, E.; Baratoiu, R.; Leonties, A.; Petcu, C.; Alexandrescu, E.; Ionita, G. Subtle Influence on Alginate Gel Properties through Host–Guest Interactions between Covalently Appended Cyclodextrin and

- Adamantane Units. *New J. Chem.* **2021**, *45* (18), 8083–8091. <https://doi.org/10.1039/D1NJ01278A>.
- (144) Jia, Y.-G.; Jin, J.; Liu, S.; Ren, L.; Luo, J.; Zhu, X. X. Self-Healing Hydrogels of Low Molecular Weight Poly(Vinyl Alcohol) Assembled by Host–Guest Recognition. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (2), 626–632. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01707>.
- (145) Nakahata, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Redox-Responsive Self-Healing Materials Formed from Host–Guest Polymers. *Nat. Commun.* **2011**, *2* (1), 511. <https://doi.org/10.1038/ncomms1521>.
- (146) Ren, P.; Wang, F.; Bernaerts, K. V.; Fu, Y.; Hu, W.; Zhou, N.; Dai, J.; Liang, M.; Zhang, T. Self-Assembled Supramolecular Hybrid Hydrogels Based on Host–Guest Interaction: Formation and Application in 3D Cell Culture. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (10), 6768–6778. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00711>.
- (147) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Harada, A. Highly Elastic Supramolecular Hydrogels Using Host–Guest Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *Macromolecules* **2013**, *46* (11), 4575–4579. <https://doi.org/10.1021/ma400695p>.
- (148) Tan, L.; Liu, Y.; Ha, W.; Ding, L.-S.; Peng, S.-L.; Zhang, S.; Li, B.-J. Stimuli-Induced Gel–Sol Transition of Multi-Sensitive Supramolecular β -Cyclodextrin Grafted Alginate/Ferrocene Modified Pluronic Hydrogel. *Soft Matter* **2012**, *8* (21), 5746–5749. <https://doi.org/10.1039/C2SM25084E>.
- (149) Ooi, H. W.; Kocken, J. M. M.; Morgan, F. L. C.; Malheiro, A.; Zoetebier, B.; Karperien, M.; Wieringa, P. A.; Dijkstra, P. J.; Moroni, L.; Baker, M. B. Multivalency Enables Dynamic Supramolecular Host–Guest Hydrogel Formation. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (6), 2208–2217. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00148>.
- (150) Himmelein, S.; Lewe, V.; A. Stuart, M. C.; Jan Ravoo, B. A Carbohydrate-Based Hydrogel Containing Vesicles as Responsive Non-Covalent Cross-Linkers. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (3), 1054–1058. <https://doi.org/10.1039/C3SC52964A>.
- (151) Rodell, C. B.; Kaminski, A. L.; Burdick, J. A. Rational Design of Network Properties in Guest–Host Assembled and Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (11), 4125–4134. <https://doi.org/10.1021/bm401280z>.
- (152) Kakuta, T.; Takashima, Y.; Nakahata, M.; Otsubo, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Preorganized Hydrogel: Self-Healing Properties of Supramolecular Hydrogels Formed by Polymerization of Host–Guest-Monomers That Contain Cyclodextrins and Hydrophobic Guest Groups. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (20), 2849–2853. <https://doi.org/10.1002/adma.201205321>.

- (153) Wei, K.; Zhu, M.; Sun, Y.; Xu, J.; Feng, Q.; Lin, S.; Wu, T.; Xu, J.; Tian, F.; Li, G.; Bian, L. Robust Biopolymeric Supramolecular “Host–Guest Macromer” Hydrogels Reinforced by in Situ Formed Multivalent Nanoclusters for Cartilage Regeneration. *Macromolecules* **2016**, *49* (3), 866–875. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.5b02527>.
- (154) Wei, K.; Chen, X.; Li, R.; Feng, Q.; Bian, L. Multivalent Host–Guest Hydrogels as Fatigue-Resistant 3D Matrix for Excessive Mechanical Stimulation of Encapsulated Cells. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (20), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02196>.
- (155) Rodell, C. B.; MacArthur Jr., J. W.; Dorsey, S. M.; Wade, R. J.; Wang, L. L.; Woo, Y. J.; Burdick, J. A. Shear-Thinning Supramolecular Hydrogels with Secondary Autonomous Covalent Crosslinking to Modulate Viscoelastic Properties In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (4), 636–644. <https://doi.org/10.1002/adfm.201403550>.
- (156) Rodell, C. B.; Wade, R. J.; Purcell, B. P.; Dusaj, N. N.; Burdick, J. A. Selective Proteolytic Degradation of Guest–Host Assembled, Injectable Hyaluronic Acid Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1* (4), 277–286. <https://doi.org/10.1021/ab5001673>.
- (157) Jeong, S. H.; Cheong, S.; Kim, T. Y.; Choi, H.; Hahn, S. K. Supramolecular Hydrogels for Precisely Controlled Antimicrobial Peptide Delivery for Diabetic Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (13), 16471–16481. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c00191>.
- (158) Ren, P.; Wei, D.; Ge, X.; Wang, F.; Liang, M.; Dai, J.; Xu, L.; Zhang, T. Injectable Supramolecular Hydrogels Based on Host–Guest Interactions with Cell Encapsulation Capabilities. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, *628*, 127338. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127338>.
- (159) Xu, Y.; Cui, M.; Patsis, P. A.; Günther, M.; Yang, X.; Eckert, K.; Zhang, Y. Reversibly Assembled Electroconductive Hydrogel via a Host–Guest Interaction for 3D Cell Culture. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (8), 7715–7724. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19482>.
- (160) Soltani, S.; Emadi, R.; Haghjooy Javanmard, S.; Kharaziha, M.; Rahmati, A.; Thakur, V. K.; Lotfian, S. Development of an Injectable Shear-Thinning Nanocomposite Hydrogel for Cardiac Tissue Engineering. *Gels* **2022**, *8* (2), 121. <https://doi.org/10.3390/gels8020121>.

- (161) Sisso, A. M.; Boit, M. O.; DeForest, C. A. Self-Healing Injectable Gelatin Hydrogels for Localized Therapeutic Cell Delivery. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2020**, *108* (5), 1112–1121. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36886>.
- (162) Sun, L.; Ouyang, J.; She, Z.; Li, R.; Zeng, F.; Yao, Z.; Wu, S. Injectable-Hydrogel-Based Tissue Sealant for Hemostasis, Bacteria Inhibition, and Pro-Angiogenesis in Organ Bleeding Wounds and Therapeutic Outcome Monitoring Via NIR-II Optical Imaging. *Adv. Healthc. Mater.* **2024**, *13* (12), 2303997. <https://doi.org/10.1002/adhm.202303997>.
- (163) Bezold, M. G.; Dollinger, B. R.; DeJulius, C. R.; Keech, M. C.; Hanna, A. R.; Kittel, A. R.; Yu, F.; Gupta, M. K.; D'Arcy, R.; Brunger, J. M.; Duvall, C. L. Shear-Thinning Hydrogel for Allograft Cell Transplantation and Externally Controlled Transgene Expression. *Biomaterials* **2025**, *314*, 122812. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2024.122812>.
- (164) Bellocq, N. C.; Kang, D. W.; Wang, X.; Jensen, G. S.; Pun, S. H.; Schlupe, T.; Zepeda, M. L.; Davis, M. E. Synthetic Biocompatible Cyclodextrin-Based Constructs for Local Gene Delivery to Improve Cutaneous Wound Healing. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (6), 1201–1211. <https://doi.org/10.1021/bc0498119>.
- (165) Che, Y.; Gaitzsch, J.; Liubimtsev, N.; Zschoche, S.; Bauer, T.; Appelhans, D.; Voit, B. Double Cross-Linked Supramolecular Hydrogels with Tunable Properties Based on Host–Guest Interactions. *Soft Matter* **2020**, *16* (29), 6733–6742. <https://doi.org/10.1039/D0SM00833H>.
- (166) Stamm, N.; Glotzbach, K.; Faissner, A.; Weberskirch, R. Concentration Dependent Effect of Quaternary Amines on the Adhesion of U251-MG Cells. *Gels* **2022**, *8* (12), 827. <https://doi.org/10.3390/gels8120827>.
- (167) Mihajlovic, M.; Fermin, L.; Ito, K.; Nostrum, C. F. van; Vermonden, T. Hyaluronic Acid-Based Supramolecular Hydrogels for Biomedical Applications. *Multifunct. Mater.* **2021**, *4* (3), 032001. <https://doi.org/10.1088/2399-7532/ac1c8a>.
- (168) Braun, D. Origins and Development of Initiation of Free Radical Polymerization Processes. *Int. J. Polym. Sci.* **2009**, *2009* (1), 893234. <https://doi.org/10.1155/2009/893234>.
- (169) Simò-Alfonso, E.; Gelfi, C.; Sebastiano, R.; Citterio, A.; Righetti, P. G. Novel acrylamido monomers with higher hydrophilicity and improved hydrolytic stability: II. Properties of N-acryloylaminopropanol. *ELECTROPHORESIS* **1996**, *17* (4), 732–737. <https://doi.org/10.1002/elps.1150170419>.

- (170) Bo, Y.; Zhang, L.; Wang, Z.; Shen, J.; Zhou, Z.; Yang, Y.; Wang, Y.; Qin, J.; He, Y. Antibacterial Hydrogel with Self-Healing Property for Wound-Healing Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, *7* (11), 5135–5143. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00719>.
- (171) Weng, L.; Gouldstone, A.; Wu, Y.; Chen, W. Mechanically Strong Double Network Photocrosslinked Hydrogels from *N,N*-Dimethylacrylamide and Glycidyl Methacrylated Hyaluronan. *Biomaterials* **2008**, *29* (14), 2153–2163. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.012>.
- (172) Pidhatika, B.; Zhao, N.; Zinggeler, M.; Ruhe, J. Surface-Attached Dual-Functional Hydrogel for Controlled Cell Adhesion Based on Poly(*N,N*-Dimethylacrylamide). *J. Polym. Res.* **2019**, *26* (3), 69. <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1728-2>.
- (173) Koopmans, C.; Ritter, H. Formation of Physical Hydrogels via Host–Guest Interactions of β -Cyclodextrin Polymers and Copolymers Bearing Adamantyl Groups. *Macromolecules* **2008**, *41* (20), 7418–7422. <https://doi.org/10.1021/ma801202f>.
- (174) Wang, J.; Xu, Y.; Wang, Y.; Liu, J.; Xu, J.; Li, L.; Nguyen, H.-T.; Pham, D.-T.; F. Lincoln, S.; Guo, X. Bridged-Cyclodextrin Supramolecular Hydrogels: Host–Guest Interaction between a Cyclodextrin Dimer and Adamantyl Substituted Poly(Acrylate)s. *RSC Adv.* **2015**, *5* (57), 46067–46073. <https://doi.org/10.1039/C5RA06163F>.
- (175) Kretschmann, O.; Steffens, C.; Ritter, H. Cyclodextrin Complexes of Polymers Bearing Adamantyl Groups: Host–Guest Interactions and the Effect of Spacers on Water Solubility. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2708–2711. <https://doi.org/10.1002/anie.200603753>.
- (176) Khalili, A. A.; Ahmad, M. R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (8), 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- (177) Lauffenburger, D. A.; Wells, A. Getting a Grip: New Insights for Cell Adhesion and Traction. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3* (5), E110–E112. <https://doi.org/10.1038/35074631>.
- (178) Balaban, N. Q.; Schwarz, U. S.; Rivelino, D.; Goichberg, P.; Tzur, G.; Sabanay, I.; Mahalu, D.; Safran, S.; Bershadsky, A.; Addadi, L.; Geiger, B. Force and Focal Adhesion Assembly: A Close Relationship Studied Using Elastic Micropatterned Substrates. *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3* (5), 466–472. <https://doi.org/10.1038/35074532>.
- (179) Tan, S.; Wu, T.; Zhang, D.; Zhang, Z. Cell or Cell Membrane-Based Drug Delivery Systems. *Theranostics* **2015**, *5* (8), 863–881. <https://doi.org/10.7150/thno.11852>.

- (180) Yavin, E.; Yavin, Z. Attachment and Culture of Dissociated Cells from Rat Embryo Cerebral Hemispheres on Polylysine-Coated Surface. *J. Cell Biol.* **1974**, *62* (2), 540–546.
- (181) Blau, A. Cell Adhesion Promotion Strategies for Signal Transduction Enhancement in Microelectrode Array *in Vitro* Electrophysiology: An Introductory Overview and Critical Discussion. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2013**, *18* (5), 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.07.005>.
- (182) Pätzold, F.; Stamm, N.; Kamps, D.; Specht, M.; Bolduan, P.; Dehmelt, L.; Weberskirch, R. Synthesis and Characterization of Cationic Hydrogels from Thiolated Copolymers for Independent Manipulation of Mechanical and Chemical Properties of Cell Substrates. *Macromol. Biosci.* **2022**, *22* (5), 2100453. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100453>.
- (183) Glotzbach, K.; Stamm, N.; Weberskirch, R.; Faissner, A. Cationic Hydrogels Modulate Neural Stem and Progenitor Cell Proliferation and Differentiation Behavior in Dependence of Cationic Moiety Concentration in 2D Cell Culture. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2024**. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01668>.
- (184) Sallouh, M.; Jarocki, M.; Sallouh, O.; Degen, P.; Faissner, A.; Weberskirch, R. The Synergistic Effect of Cationic Moieties and GRGDSF-Peptides in Hydrogels on Neural Stem Cell Behavior. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17* (3). <https://doi.org/10.1002/mabi.201600178>.
- (185) Ikura, R.; Ikemoto, Y.; Osaki, M.; Yamaguchi, H.; Harada, A.; Takashima, Y. Preparation of Hydrophilic Polymeric Materials with Movable Cross-Linkers and Their Mechanical Property. *Polymer* **2020**, *196*, 122465. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122465>.
- (186) Tan, L.; Li, J.; Liu, Y.; Zhou, H.; Zhang, Z.; Deng, L. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin-Conjugated Alginate Hydrogel for Controlled Release of Hydrocortisone Acetate in Response to Mechanical Stimulation. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2015**, *30* (6), 584–599. <https://doi.org/10.1177/0883911515590494>.
- (187) Guo, X.; Wang, J.; Li, L.; Pham, D.-T.; Clements, P.; Lincoln, S. F.; May, B. L.; Chen, Q.; Zheng, L.; Prud'homme, R. K. Tailoring Polymeric Hydrogels through Cyclodextrin Host–Guest Complexation. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31* (3), 300–304. <https://doi.org/10.1002/marc.200900560>.
- (188) Phadke, A.; Zhang, C.; Arman, B.; Hsu, C.-C.; Mashelkar, R. A.; Lele, A. K.; Tauber, M. J.; Arya, G.; Varghese, S. Rapid Self-Healing Hydrogels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (12), 4383–4388. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201122109>.

- (189) Yamada, K.; Fujita, E.; Nishimura, S.-I. High Performance Polymer Supports for Enzyme-Assisted Synthesis of Glycoconjugates. *Carbohydr. Res.* **1997**, *305* (3), 443–461. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10051-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10051-9).
- (190) Sak, H. β -Cyclodextrin-Basierte N-Heterocyclische Carben- Gold(I)-Komplexe, 2018. <http://hdl.handle.net/2003/37123> <http://dx.doi.org/10.17877/DE290R-19119> (accessed 2024-06-18).
- (191) Raoov, M.; Mohamad, S.; Abas, M. R. Synthesis and Characterization of β -Cyclodextrin Functionalized Ionic Liquid Polymer as a Macroporous Material for the Removal of Phenols and As(V). *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (1), 100–119. <https://doi.org/10.3390/ijms15010100>.
- (192) Kang, Y.; Zhou, L.; Li, X.; Yuan, J. β -Cyclodextrin-Modified Hybrid Magnetic Nanoparticles for Catalysis and Adsorption. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21* (11), 3704–3710. <https://doi.org/10.1039/C0JM03513K>.
- (193) Banerjee, S. S.; Chen, D.-H. Magnetic Nanoparticles Grafted with Cyclodextrin for Hydrophobic Drug Delivery. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (25), 6345–6349. <https://doi.org/10.1021/cm702278u>.
- (194) Lee, H. J.; Le, P. T.; Kwon, H. J.; Park, K. D. Supramolecular Assembly of Tetronic–Adamantane and Poly(β -Cyclodextrin) as Injectable Shear-Thinning Hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (21), 3374–3382. <https://doi.org/10.1039/C9TB00072K>.
- (195) Ma, X.; Zhou, N.; Zhang, T.; Hu, W.; Gu, N. Self-Healing pH-Sensitive Poly[(Methyl Vinyl Ether)-*Alt*-(Maleic Acid)]-Based Supramolecular Hydrogels Formed by Inclusion Complexation between Cyclodextrin and Adamantane. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *73*, 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.039>.
- (196) Murphy, M. C.; Jones, D. T.; Jack, C. R.; Glaser, K. J.; Senjem, M. L.; Manduca, A.; Felmlee, J. P.; Carter, R. E.; Ehman, R. L.; Huston, J. Regional Brain Stiffness Changes across the Alzheimer’s Disease Spectrum. *NeuroImage Clin.* **2016**, *10*, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.12.007>.
- (197) Marinelli, J. P.; Levin, D. L.; Vassallo, R.; Carter, R. E.; Hubmayr, R. D.; Ehman, R. L.; McGee, K. P. Quantitative Assessment of Lung Stiffness in Patients with Interstitial Lung Disease Using MR Elastography. *J. Magn. Reson. Imaging* **2017**, *46* (2), 365–374. <https://doi.org/10.1002/jmri.25579>.
- (198) Guimarães, C. F.; Gasperini, L.; Marques, A. P.; Reis, R. L. The Stiffness of Living Tissues and Its Implications for Tissue Engineering. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5* (5), 351–370. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>.

- (199) Besner, S.; Scarcelli, G.; Pineda, R.; Yun, S.-H. In Vivo Brillouin Analysis of the Aging Crystalline Lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2016**, *57* (13), 5093–5100. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20143>.
- (200) Owusu-Nkwantabisah, S.; Gillmor, J. R.; Switalski, S. C.; Slater, G. L. An Autonomous Self-Healing Hydrogel Based on Surfactant-Free Hydrophobic Association. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134* (19). <https://doi.org/10.1002/app.44800>.
- (201) Rus, D.; Tolley, M. T. Design, Fabrication and Control of Soft Robots. *Nature* **2015**, *521* (7553), 467–475. <https://doi.org/10.1038/nature14543>.
- (202) Kim, S.-H.; Chu, C.-C. Synthesis and Characterization of Dextran–Methacrylate Hydrogels and Structural Study by SEM. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49* (4), 517–527. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(20000315\)49:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(20000315)49:4<517::AID-JBM10>3.0.CO;2-8).
- (203) Aikawa, K.; Matsumoto, K.; Uda, H.; Tanaka, S.; Shimamura, H.; Aramaki, Y.; Tsuchiya, S. Hydrogel Formation of the pH Response Polymer Polyvinylacetal Diethylaminoacetate (AEA). *Int. J. Pharm.* **1998**, *167* (1), 97–104. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00057-X).
- (204) La Verde, V.; Dominici, P.; Astegno, A. Determination of Hydrodynamic Radius of Proteins by Size Exclusion Chromatography. *Bio-Protoc.* **2017**, *7* (8), e2230. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2230>.
- (205) Cruise, G. M.; Scharp, D. S.; Hubbell, J. A. Characterization of Permeability and Network Structure of Interfacially Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Hydrogels. *Biomaterials* **1998**, *19* (14), 1287–1294. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00025-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00025-8).
- (206) Gan, T.; Zhang, Y.; Guan, Y. In Situ Gelation of P(NIPAM-HEMA) Microgel Dispersion and Its Applications as Injectable 3D Cell Scaffold. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1410–1415. <https://doi.org/10.1021/bm900022m>.
- (207) Onuma, K.; Kanzaki, N. Size Distribution and Intermolecular Interaction of Laminin-1 in Physiological Solutions. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (42), 11799–11804. <https://doi.org/10.1021/jp0355298>.
- (208) Zustiak, S. P.; Durbal, R.; Leach, J. B. Influence of Cell-Adhesive Peptide Ligands on Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Physical, Mechanical and Transport Properties. *Acta Biomater.* **2010**, *6* (9), 3404–3414. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.040>.
- (209) Luong, T. D.; Zoughaib, M.; Garifullin, R.; Kuznetsova, S.; Guler, M. O.; Abdullin, T. I. In Situ Functionalization of Poly(Hydroxyethyl Methacrylate) Cryogels with

- Oligopeptides via β -Cyclodextrin–Adamantane Complexation for Studying Cell-Instructive Peptide Environment. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (2), 1116–1128. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01059>.
- (210) Hong, K. H.; Song, S.-C. 3D Hydrogel Stem Cell Niche Controlled by Host–Guest Interaction Affects Stem Cell Fate and Survival Rate. *Biomaterials* **2019**, *218*, 119338. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119338>.
- (211) Edelbrock, A. N.; Clemons, T. D.; Chin, S. M.; Roan, J. J. W.; Bruckner, E. P.; Álvarez, Z.; Edelbrock, J. F.; Wek, K. S.; Stupp, S. I. Superstructured Biomaterials Formed by Exchange Dynamics and Host–Guest Interactions in Supramolecular Polymers. *Adv. Sci.* **2021**, *8* (8), 2004042. <https://doi.org/10.1002/advs.202004042>.
- (212) Redondo-Gómez, C.; Abdouni, Y.; Becer, C. R.; Mata, A. Self-Assembling Hydrogels Based on a Complementary Host–Guest Peptide Amphiphile Pair. *Biomacromolecules* **2019**, *20* (6), 2276–2285. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00224>.
- (213) Redondo-Gómez, C.; Padilla-Lopategui, S.; Azevedo, H. S.; Mata, A. Host–Guest-Mediated Epitope Presentation on Self-Assembled Peptide Amphiphile Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6* (9), 4870–4880. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00549>.
- (214) Dhand, A. P.; Davidson, M. D.; Galarraga, J. H.; Qazi, T. H.; Locke, R. C.; Mauck, R. L.; Burdick, J. A. Simultaneous One-Pot Interpenetrating Network Formation to Expand 3D Processing Capabilities. *Adv. Mater.* **2022**, *34* (28), 2202261. <https://doi.org/10.1002/adma.202202261>.
- (215) Kim, I. L.; Mauck, R. L.; Burdick, J. A. Hydrogel Design for Cartilage Tissue Engineering: A Case Study with Hyaluronic Acid. *Biomaterials* **2011**, *32* (34), 8771–8782. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.073>.
- (216) Yang, F.; Williams, C. G.; Wang, D.; Lee, H.; Manson, P. N.; Elisseeff, J. The Effect of Incorporating RGD Adhesive Peptide in Polyethylene Glycol Diacrylate Hydrogel on Osteogenesis of Bone Marrow Stromal Cells. *Biomaterials* **2005**, *26* (30), 5991–5998. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.018>.
- (217) Weber, L. M.; Hayda, K. N.; Haskins, K.; Anseth, K. S. The Effects of Cell–Matrix Interactions on Encapsulated β -Cell Function within Hydrogels Functionalized with Matrix-Derived Adhesive Peptides. *Biomaterials* **2007**, *28* (19), 3004–3011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.005>.

- (218) Jongpaiboonkit, L.; King, W. J.; Murphy, W. L. Screening for 3D Environments That Support Human Mesenchymal Stem Cell Viability Using Hydrogel Arrays. *Tissue Eng. Part A* **2009**, *15* (2), 343–353. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0096>.
- (219) Yamada, K. M.; Kennedy, D. W. Amino Acid Sequence Specificities of an Adhesive Recognition Signal. *J. Cell. Biochem.* **1985**, *28* (2), 99–104. <https://doi.org/10.1002/jcb.240280203>.
- (220) Salinas, C. N.; Anseth, K. S. The Influence of the RGD Peptide Motif and Its Contextual Presentation in PEG Gels on Human Mesenchymal Stem Cell Viability. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2008**, *2* (5), 296–304. <https://doi.org/10.1002/term.95>.
- (221) Li, X.; Liu, X.; Josey, B.; Chou, C. J.; Tan, Y.; Zhang, N.; Wen, X. Short Laminin Peptide for Improved Neural Stem Cell Growth. *STEM CELLS Transl. Med.* **2014**, *3* (5), 662–670. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0015>.
- (222) Jain, R.; Roy, S. Controlling Neuronal Cell Growth through Composite Laminin Supramolecular Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6* (5), 2832–2846. <https://doi.org/10.1021/acsbio.2019.03019>.
- (223) Yang, Y.-H.; Khan, Z.; Ma, C.; Lim, H. J.; Smith Callahan, L. A. Optimization of Adhesive Conditions for Neural Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells Using Hydrogels Functionalized with Continuous Ile-Lys-Val-Ala-Val Concentration Gradients. *Acta Biomater.* **2015**, *21*, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.04.031>.
- (224) Rigby, A. D. M.; Alipio, A. R.; Chiaradia, V.; Arno, M. C. Self-Healing Hydrogel Scaffolds through PET-RAFT Polymerization in Cellular Environment. *Biomacromolecules* **2023**, *24* (7), 3370–3379. <https://doi.org/10.1021/acsbio.2023.00043>.
- (225) Yeh, J.-C.; Hsu, Y.-T.; Su, C.-M.; Wang, M.-C.; Lee, T.-H.; Lou, S.-L. Preparation and Characterization of Biocompatible and Thermoresponsive Micelles Based on Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-N,N-Dimethylacrylamide) Grafted on Polysuccinimide for Drug Delivery. *J. Biomater. Appl.* **2014**, *29* (3), 442–453. <https://doi.org/10.1177/0885328214533736>.
- (226) Gluzman, Y. SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants. *Cell* **1981**, *23*, 175–182.
- (227) Ishiyama, M.; Miyazono, Y.; Sasamoto, K.; Ohkura, Y.; Ueno, K. A Highly Water-Soluble Disulfonated Tetrazolium Salt as a Chromogenic Indicator for NADH as Well as Cell Viability. *Talanta* **1997**, *44* (7), 1299–1305. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00017-9).

- (228) *GESTIS-Stoffdatenbank*. <https://gestis.dguv.de/data?name=027810> (accessed 2024-07-29).
- (229) *GESTIS-Stoffdatenbank*. <https://gestis.dguv.de/data?name=491020&lang=en> (accessed 2024-07-29).
- (230) *B16-F1 Cells*. Cytion. <https://www.cytion.com/B16-F1-Cells/400122> (accessed 2024-09-24).
- (231) Wagner, J. *Optogenetic Manipulation of Cell Contraction Signal Network Dynamics in Tumor Spheroids*, Universität Duisburg-Essen, Essen, 2023.
- (232) Abbadessa, A.; Landín, M.; Oude Blenke, E.; Hennink, W. E.; Vermonden, T. Two-Component Thermosensitive Hydrogels: Phase Separation Affecting Rheological Behavior. *Eur. Polym. J.* **2017**, *92*, 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.029>.
- (233) Oudshoorn, M. H. M.; Rissmann, R.; Bouwstra, J. A.; Hennink, W. E. Synthesis and Characterization of Hyperbranched Polyglycerol Hydrogels. *Biomaterials* **2006**, *27* (32), 5471–5479. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.030>.
- (234) B. Rodell, C.; B. Highley, C.; H. Chen, M.; N. Dusaj, N.; Wang, C.; Han, L.; A. Burdick, J. Evolution of Hierarchical Porous Structures in Supramolecular Guest–Host Hydrogels. *Soft Matter* **2016**, *12* (37), 7839–7847. <https://doi.org/10.1039/C6SM01395C>.
- (235) Kuo, C. K.; Ma, P. X. Ionically Crosslinked Alginate Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering: Part 1. Structure, Gelation Rate and Mechanical Properties. *Biomaterials* **2001**, *22* (6), 511–521. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00201-5).
- (236) Karatas, G. *Dual-Vernetzte, Selbstheilende Hydrogele Mittels Wirt Gast-Vernetzungen Auf β -Cyclodextrin Basis Für 3D Zellanwendungen*; Masterarbeit; TU Dortmund: Dortmund, 2023.
- (237) Dehn, S.; Chapman, R.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. Synthetic Strategies for the Design of Peptide/Polymer Conjugates. *Polym. Rev.* **2011**, *51* (2), 214–234. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.566404>.
- (238) Das, A.; Theato, P. Activated Ester Containing Polymers: Opportunities and Challenges for the Design of Functional Macromolecules. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1434–1495. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00291>.
- (239) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol-Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. - Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573. <https://doi.org/10.1002/anie.200903924>.

- (240) Salinas, C. N.; Anseth, K. S. Mixed Mode Thiol - Acrylate Photopolymerizations for the Synthesis of PEG - Peptide Hydrogels. *Macromolecules* **2008**, *41* (16), 6019–6026. <https://doi.org/10.1021/ma800621h>.
- (241) Sun, Y.; Liu, H.; Cheng, L.; Zhu, S.; Cai, C.; Yang, T.; Yang, L.; Ding, P. Thiol Michael Addition Reaction: A Facile Tool for Introducing Peptides into Polymer-Based Gene Delivery Systems. *Polym. Int.* **2018**, *67* (1), 25–31. <https://doi.org/10.1002/pi.5490>.
- (242) Ravi, S.; Krishnamurthy, V. R.; Caves, J. M.; Haller, C. A.; Chaikof, E. L. Maleimide-Thiol Coupling of a Bioactive Peptide to an Elastin-like Protein Polymer. *Acta Biomater.* **2012**, *8* (2), 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.10.027>.
- (243) Azagarsamy, M. A.; Anseth, K. S. Bioorthogonal Click Chemistry: An Indispensable Tool to Create Multifaceted Cell Culture Scaffolds. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2* (1), 5–9. <https://doi.org/10.1021/mz300585q>.
- (244) Henríquez, C.; Bueno, C.; Lissi, E. A.; Encinas, M. V. Thiols as Chain Transfer Agents in Free Radical Polymerization in Aqueous Solution. *Polymer* **2003**, *44* (19), 5559–5561. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(03\)00581-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(03)00581-0).
- (245) Katayama, H.; Hojo, H. The Phenacyl Group as an Efficient Thiol Protecting Group in a Peptide Condensation Reaction by the Thioester Method. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (26), 4405–4413.
- (246) Kragulj, E. J.; Gustafson, J. L.; Grotjahn, D. B. A Convenient Method for Regeneration of Free Thiol from a Tert-Butyl Thioether. *Synlett* **2007**, *2007*, 2851–2854. <https://doi.org/10.1055/s-2007-991091>.
- (247) Espeel, P.; Goethals, F.; Du Prez, F. E. One-Pot Multistep Reactions Based on Thiolactones: Extending the Realm of Thiol-Ene Chemistry in Polymer Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (6), 1678–1681.
- (248) Lin'kova, M. G.; Kuleshova, N. D.; Knunyants, I. L. Thiolactones. *Russ. Chem. Rev.* **1964**, *33* (10), 493–507. <https://doi.org/10.1070/rc1964v033n10abeh001473>.
- (249) Finkelstein, M. B.; Anders, M. W.; Dekant, W.; Kende, A. S. α -Thiolactones as Novel Intermediates in the Cysteine Conjugate β -Lyase-Catalyzed Bioactivation of Bromine-Containing Cysteine S-Conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (37), 9590–9591. <https://doi.org/10.1021/ja00142a038>.
- (250) Espeel, P.; Du Prez, F. E. One-Pot Multi-Step Reactions Based on Thiolactone Chemistry: A Powerful Synthetic Tool in Polymer Science. *Eur. Polym. J.* **2015**, *62*, 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.008>.

- (251) Espeel, P.; Goethals, F.; Stamenović, M. M.; Petton, L.; Du Prez, F. E. Double Modular Modification of Thiolactone-Containing Polymers: Towards Polythiols and Derived Structures. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (4), 1007–1015. <https://doi.org/10.1039/c2py00565d>.
- (252) Nguyen, L.-T. T.; Gokmen, M. T.; Du Prez, F. E. Kinetic Comparison of 13 Homogeneous Thiol–X Reactions. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (22), 5527. <https://doi.org/10.1039/c3py00743j>.
- (253) Kantlehner, M.; Schaffner, P.; Finsinger, D.; Meyer, J.; Jonczyk, A.; Diefenbach, B.; Nies, B.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as Well as Bone Formation. *ChemBioChem* **2000**, *1* (2), 107–114. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20000818\)1:2<107::AID-CBIC107>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20000818)1:2<107::AID-CBIC107>3.0.CO;2-4).
- (254) König, W.; Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem. Ber.* **1970**, *103* (3), 788–798. <https://doi.org/10.1002/cber.19701030319>.
- (255) Riftel, W. Pharmacology of Hormonal Polypeptides and Proteins. *Adv. Exper. Med. Biology* **1968**, *2*, 35.
- (256) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631. <https://doi.org/10.1039/B701677H>.
- (257) Jensen, K. J.; Alsina, J.; Songster, M. F.; Vágner, J.; Albericio, F.; Barany, G. Backbone Amide Linker (BAL) Strategy for Solid-Phase Synthesis of C-Terminal-Modified and Cyclic Peptides^{1,2,3}. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5441–5452. <https://doi.org/10.1021/ja974116f>.
- (258) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (259) Reinicke, S.; Espeel, P.; Stamenović, M. M.; Du Prez, F. E. Synthesis of Multi-Functionalized Hydrogels by a Thiolactone-Based Synthetic Protocol. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (18), 5461–5470. <https://doi.org/10.1039/c4py00468j>.
- (260) Espeel, P.; Du Prez, F. E. One-Pot Multi-Step Reactions Based on Thiolactone Chemistry: A Powerful Synthetic Tool in Polymer Science. *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd January 1, 2015, pp 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.008>.
- (261) Cleland, W. W. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups*. *Biochemistry* **1964**, *3* (4), 480–482. <https://doi.org/10.1021/bi00892a002>.

- (262) Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, 82 (1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- (263) Riener, C. K.; Kada, G.; Gruber, H. J. Quick Measurement of Protein Sulfhydryls with Ellman's Reagent and with 4,4'-Dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373 (4), 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>.
- (264) Nair, D. P.; Podgórski, M.; Chatani, S.; Gong, T.; Xi, W.; Fenoli, C. R.; Bowman, C. N. The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry. *Chem. Mater.* **2014**, 26 (1), 724–744. <https://doi.org/10.1021/cm402180t>.
- (265) Xi, W.; Wang, C.; Kloxin, C. J.; Bowman, C. N. Nitrogen-Centered Nucleophile Catalyzed Thiol-Vinylsulfone Addition, Another Thiol-Ene “Click” Reaction. *ACS Macro Lett.* **2012**, 1 (7), 811–814. <https://doi.org/10.1021/mz3001918>.
- (266) Wong, R. S. H.; Ashton, M.; Dodou, K. Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. *Pharmaceutics* **2015**, 7 (3), 305–319. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7030305>.
- (267) Huang, S.; Ingber, D. E. The Structural and Mechanical Complexity of Cell-Growth Control. *Nat. Cell Biol.* **1999**, 1 (5), E131. <https://doi.org/10.1038/13043>.
- (268) DeMali, K. A.; Burrige, K. Coupling Membrane Protrusion and Cell Adhesion. *J. Cell Sci.* **2003**, 116 (12), 2389–2397. <https://doi.org/10.1242/jcs.00605>.
- (269) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed.; Garland Science, Taylor & Francis Group: New York, 2015.
- (270) De Clerck, L. S.; Bridts, C. H.; Mertens, A. M.; Moens, M. M.; Stevens, W. J. Use of Fluorescent Dyes in the Determination of Adherence of Human Leucocytes to Endothelial Cells and the Effect of Fluorochromes on Cellular Function. *J. Immunol. Methods* **1994**, 172 (1), 115–124. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90384-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90384-0).
- (271) Kaneshiro, E. S.; Wyder, M. A.; Wu, Y.-P.; Cushion, M. T. Reliability of Calcein Acetoxy Methyl Ester and Ethidium Homodimer or Propidium Iodide for Viability Assessment of Microbes. *J. Microbiol. Methods* **1993**, 17 (1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(93\)80010-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(93)80010-4).
- (272) Liu, J.; Tan, Y.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Xu, P.; Chen, J.; Poh, Y.-C.; Tang, K.; Wang, N.; Huang, B. Soft Fibrin Gels Promote Selection and Growth of Tumorigenic Cells. *Nat. Mater.* **2012**, 11 (8), 734–741. <https://doi.org/10.1038/nmat3361>.

- (273) Janmey, P. A.; Miller, R. T. Mechanisms of Mechanical Signaling in Development and Disease. *J. Cell Sci.* **2011**, *124* (1), 9–18. <https://doi.org/10.1242/jcs.071001>.
- (274) Trappmann, B.; Gautrot, J. E.; Connelly, J. T.; Strange, D. G. T.; Li, Y.; Oyen, M. L.; Cohen Stuart, M. A.; Boehm, H.; Li, B.; Vogel, V.; Spatz, J. P.; Watt, F. M.; Huck, W. T. S. Extracellular-Matrix Tethering Regulates Stem-Cell Fate. *Nat. Mater.* **2012**, *11* (7), 642–649. <https://doi.org/10.1038/nmat3339>.
- (275) Brandl, F.; Sommer, F.; Goepferich, A. Rational Design of Hydrogels for Tissue Engineering: Impact of Physical Factors on Cell Behavior. *Biomaterials* **2007**, *28* (2), 134–146. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.017>.
- (276) Lee, K.; Chen, Y.; Li, X.; Wang, Y.; Kawazoe, N.; Yang, Y.; Chen, G. Solution Viscosity Regulates Chondrocyte Proliferation and Phenotype during 3D Culture. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7* (48), 7713–7722. <https://doi.org/10.1039/C9TB02204J>.
- (277) Azagarsamy, M. A.; Marozas, I. A.; Spaans, S.; Anseth, K. S. Photoregulated Hydrazone-Based Hydrogel Formation for Biochemically Patterning 3D Cellular Microenvironments. *ACS Macro Lett.* **2016**, *5* (1), 19–23. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.5b00682>.
- (278) R. Arkenberg, M.; D. Nguyen, H.; Lin, C.-C. Recent Advances in Bio-Orthogonal and Dynamic Crosslinking of Biomimetic Hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8* (35), 7835–7855. <https://doi.org/10.1039/D0TB01429J>.
- (279) Wei, Z.; Lewis, D. M.; Xu, Y.; Gerecht, S. Dual Cross-Linked Biofunctional and Self-Healing Networks to Generate User-Defined Modular Gradient Hydrogel Constructs. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (16), 1700523. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700523>.
- (280) Huebsch, N.; Arany, P. R.; Mao, A. S.; Shvartsman, D.; Ali, O. A.; Bencherif, S. A.; Rivera-Feliciano, J.; Mooney, D. J. Harnessing Traction-Mediated Manipulation of the Cell/Matrix Interface to Control Stem-Cell Fate. *Nat. Mater.* **2010**, *9* (6), 518–526. <https://doi.org/10.1038/nmat2732>.
- (281) Zhang, J.; Tokatlian, T.; Zhong, J.; Ng, Q. K.; Patterson, M.; Lowry, B.; Carmichael, S. T.; Segura, T. Physically Associated Synthetic Hydrogels with Long-Term Covalent Stabilization for Cell Culture and Stem Cell Transplantation. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2011**, *23* (43), 5098. <https://doi.org/10.1002/adma.201103349>.
- (282) Chu, Y.; Huang, L.; Hao, W.; Zhao, T.; Zhao, H.; Yang, W.; Xie, X.; Qian, L.; Chen, Y.; Dai, J. Long-Term Stability, High Strength, and 3D Printable Alginate Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering Application. *Biomed. Mater.* **2021**, *16* (6), 064102. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac2595>.

- (283) Wang, Z.; An, G.; Zhu, Y.; Liu, X.; Chen, Y.; Wu, H.; Wang, Y.; Shi, X.; Mao, C. 3D-Printable Self-Healing and Mechanically Reinforced Hydrogels with Host–Guest Non-Covalent Interactions Integrated into Covalently Linked Networks. *Mater. Horiz.* **2019**, *6* (4), 733–742. <https://doi.org/10.1039/C8MH01208C>.
- (284) Loebel, C.; Rodell, C. B.; Chen, M. H.; Burdick, J. A. Shear-Thinning and Self-Healing Hydrogels as Injectable Therapeutics and for 3D-Printing. *Nat. Protoc.* **2017**, *12* (8), 1521–1541. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.053>.
- (285) Kimura, T.; Aoyama, T.; Nakahata, M.; Takashima, Y.; Tanaka, M.; Harada, A.; Urayama, K. Time–Strain Inseparability in Multiaxial Stress Relaxation of Supramolecular Gels Formed via Host–Guest Interactions. *Soft Matter* **2022**, *18* (26), 4953–4962. <https://doi.org/10.1039/D2SM00285J>.
- (286) Jeong, D.; Joo, S.-W.; Shinde, V. V.; Jung, S. Triple-Crosslinked β -Cyclodextrin Oligomer Self-Healing Hydrogel Showing High Mechanical Strength, Enhanced Stability and pH Responsiveness. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *198*, 563–574. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.117>.
- (287) Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; Schubert, U. S. Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (36), 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- (288) Zhu, J. Bioactive Modification of Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels for Tissue Engineering. *Biomaterials* **2010**, *31* (17), 4639–4656. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.044>.
- (289) Mezger, T. G. *Das Rheologie Handbuch: 5., überarbeitete Auflage*; FARBE UND LACK, 2016.
- (290) Lieleg, O.; Claessens, M. M. A. E.; Luan, Y.; Bausch, A. R. Transient Binding and Dissipation in Cross-Linked Actin Networks. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101* (10), 108101. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.108101>.
- (291) Takeno, H.; Nakamura, W. Structural and Mechanical Properties of Composite Hydrogels Composed of Clay and a Polyelectrolyte Prepared by Mixing. *Colloid Polym. Sci.* **2013**, *291* (6), 1393–1399. <https://doi.org/10.1007/s00396-012-2871-z>.
- (292) Takeno, H.; Nakamura, A. Effects of Molecular Mass of Polymer on Mechanical Properties of Clay/Poly (Ethylene Oxide) Blend Hydrogels, and Comparison between Them and Clay/Sodium Polyacrylate Blend Hydrogels. *Colloid Polym. Sci.* **2019**, *297* (4), 641–649. <https://doi.org/10.1007/s00396-019-04476-8>.

- (293) Takeno, H.; Sato, C. Effects of Molecular Mass of Polymer and Composition on the Compressive Properties of Hydrogels Composed of Laponite and Sodium Polyacrylate. *Appl. Clay Sci.* **2016**, *123*, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.01.030>.
- (294) Gu, S.; Cheng, G.; Yang, T.; Ren, X.; Gao, G. Mechanical and Rheological Behavior of Hybrid Cross-Linked Polyacrylamide/Cationic Micelle Hydrogels. *Macromol. Mater. Eng.* **2017**, *302* (12), 1700402. <https://doi.org/10.1002/mame.201700402>.
- (295) Zhang, X.; Ding, Y.; Zhang, G.; Li, L.; Yan, Y. Preparation and Rheological Studies on the Solvent Based Acrylic Pressure Sensitive Adhesives with Different Crosslinking Density. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2011**, *31* (7), 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2011.07.004>.
- (296) Liu, J.; Soo Yun Tan, C.; Lan, Y.; Scherman, O. A. Toward a Versatile Toolbox for Cucurbit[n]Uril-Based Supramolecular Hydrogel Networks through in Situ Polymerization. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2017**, *55* (18), 3105–3109. <https://doi.org/10.1002/pola.28667>.
- (297) Guo, M.; Wu, Y.; Xue, S.; Xia, Y.; Yang, X.; Dzenis, Y.; Li, Z.; Lei, W.; T. Smith, A.; Sun, L. A Highly Stretchable, Ultra-Tough, Remarkably Tolerant, and Robust Self-Healing Glycerol-Hydrogel for a Dual-Responsive Soft Actuator. *J. Mater. Chem. A* **2019**, *7* (45), 25969–25977. <https://doi.org/10.1039/C9TA10183G>.
- (298) George Thuruthel, T.; Bosman, A. W.; Hughes, J.; Iida, F. Soft Self-Healing Fluidic Tactile Sensors with Damage Detection and Localization Abilities. *Sensors* **2021**, *21* (24), 8284. <https://doi.org/10.3390/s21248284>.
- (299) Karvinen, J.; Kellomäki, M. Characterization of Self-Healing Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. Polym. J.* **2022**, *181*, 111641. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111641>.
- (300) Liu, S. Q.; Tian, Q.; Hedrick, J. L.; Po Hui, J. H.; Rachel Ee, P. L.; Yang, Y. Y. Biomimetic Hydrogels for Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Neocartilage. *Biomaterials* **2010**, *31* (28), 7298–7307. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.001>.
- (301) Hockney, S.; Parker, J.; Turner, J. E.; Todd, X.; Todryk, S.; Gieling, R. G.; Hilgen, G.; Simoes, D. C. M.; Pal, D. Next Generation Organoid Engineering to Replace Animals in Cancer Drug Testing. *Biochem. Pharmacol.* **2023**, *213*, 115586. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115586>.

- (302) Sprüssel, A. Entwicklung von organo-typischen In vitro-Kultursystemen des kolorektalen Karzinoms und einer auf ihnen basierenden multi-funktionellen Medikamententestplattform, Universität Hamburg, Hamburg, 2009.
- (303) Albertson, D. G.; Collins, C.; McCormick, F.; Gray, J. W. Chromosome Aberrations in Solid Tumors. *Nat. Genet.* **2003**, *34* (4), 369–376. <https://doi.org/10.1038/ng1215>.
- (304) Pickl, M.; Ries, C. H. Comparison of 3D and 2D Tumor Models Reveals Enhanced HER2 Activation in 3D Associated with an Increased Response to Trastuzumab. *Oncogene* **2009**, *28* (3), 461–468. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.394>.
- (305) Pal, D.; Blair, H. J.; Elder, A.; Dormon, K.; Rennie, K. J.; Coleman, D. J. L.; Weiland, J.; Rankin, K. S.; Filby, A.; Heidenreich, O.; Vormoor, J. Long-Term in Vitro Maintenance of Clonal Abundance and Leukaemia-Initiating Potential in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Leukemia* **2016**, *30* (8), 1691–1700. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.79>.
- (306) Bates, R. C.; Edwards, N. S.; Yates, J. D. Spheroids and Cell Survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2000**, *36* (2), 61–74. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(00\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(00)00077-9).
- (307) Calori, I. R.; Alves, S. R.; Bi, H.; Tedesco, A. C. Type-I Collagen/Collagenase Modulates the 3D Structure and Behavior of Glioblastoma Spheroid Models. *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, *5* (2), 723–733. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01138>.
- (308) Yamada, M.; Hori, A.; Sugaya, S.; Yajima, Y.; Utoh, R.; Yamato, M.; Seki, M. Cell-Sized Condensed Collagen Microparticles for Preparing Microengineered Composite Spheroids of Primary Hepatocytes. *Lab. Chip* **2015**, *15* (19), 3941–3951. <https://doi.org/10.1039/C5LC00785B>.
- (309) Miao, Y.; Sun, Y. B.; Liu, B. C.; Jiang, J. D.; Hu, Z. Q. Controllable Production of Transplantable Adult Human High-Passage Dermal Papilla Spheroids Using 3D Matrigel Culture. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20* (17–18), 2329–2338. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0547>.
- (310) Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeo, Y.; Yang, X.; Yeh, J.; Eng, G.; Blumling, J.; Wang, C.-F.; Kohane, D. S.; Langer, R. Micromolding of Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel for Spheroid Microarray and Co-Cultures. *Biomaterials* **2006**, *27* (30), 5259–5267. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.044>.
- (311) Kuwashima, Y.; Yamada, T.; Saio, M.; Takami, T. Formation and Growth of Multicellular Spheroids in Media Containing Low Concentrations of Agarose. *Cancer Lett.* **1993**, *71* (1), 31–33. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(93\)90093-O](https://doi.org/10.1016/0304-3835(93)90093-O).
- (312) Li, M.; Fu, T.; Yang, S.; Pan, L.; Tang, J.; Chen, M.; Liang, P.; Gao, Z.; Guo, L. Agarose-Based Spheroid Culture Enhanced Stemness and Promoted Odontogenic Differentiation

- Potential of Human Dental Follicle Cells in Vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **2021**, 57 (6), 620. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00591-5>.
- (313) Schwarz, D. H. Wirt-Gast-Komplexe Zwischen Cyclodextrin Hyaluronsäure-Polymeren Und Adamantylierten Proteinen Für Den Zielgerichteten Transport von Steroidwirkstoffen, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2018.
- (314) Schröder, T. *Rheologie der Kunststoffe: Theorie und Praxis*; Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2020.
- (315) Meichsner, G.; Mezger, T. G.; Schröder, J.-. *Lackeigenschaften Messen Und Steuern : Rheologie - Grenzflächen - Kolloide*; Vincentz Network: Hannover, 2016.

10. Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adamantan
AdHexAAm	6-(Acrylamido)- <i>N</i> -adamantylhexanamid
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
Äq	Äquivalent
<i>c</i>	Konzentration
CCK-8	<i>Cell Counting Kit-8</i>
CD	Cyclodextrin
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
<i>D</i>	Dispersität
<i>d</i>	Tage
DMA	Dimethylacrylamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
EtOAc	Ethylacetat
exp.	experimentell
EZM	extrazelluläre Matrix
<i>g</i>	Gramm
GPC	Gelpermeationschromatographie
<i>h</i>	Stunde
HexAAm	6- <i>N</i> -Acrylamidohexansäure
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
HOBt	Hydroxybenzotriazol
Hz	Hertz
<i>M</i>	Molar
mg	Milligramm

MHz	Megahertz
min	Minuten
μmol	Mikromol
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mol%	Molprozent
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
PEG	Poly(ethylen glycol)
PEGDA	Poly(ethylen glycol)diacrylat
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
ppm	<i>Parts per million</i>
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -Toluolsulfonsäurechlorid
Q_m	Quellwert
<i>t</i>	Zeit
t_{Gel}	Gelierzzeit
<i>T</i>	Temperatur
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
TEA	Triethylamin
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TMAEA	[2-Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid
TLaAAm	<i>N</i> -Acryloylhomocystein- γ -thiolacton

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Interaktion der RGD- und IKVAV-Sequenzen mit den Integrinen in der Zellmembran (modifiziert aus ³²).	3
Abbildung 2: Kultivierung von Zellen auf einem 2D Hydrogel (links) und in einem 3D Hydrogel (rechts) in Anlehnung an WILSON <i>et al.</i> ³⁹	4
Abbildung 3: Übersicht über einige Klassifizierungsmöglichkeiten von Hydrogelen. ⁵¹	6
Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Cyclodextrinen. ¹¹⁷	11
Abbildung 5: Molekülstruktur von α -, β - und γ -Cyclodextrin.	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wirt-Gast-Hydrogelsysteme auf β -Cyclodextrin-Basis in Anlehnung an FANG <i>et al.</i> ¹³⁵	17
Abbildung 7: Darstellung der von YANG <i>et al.</i> entwickelten Hyaluronsäure-Hydrogele, die über Adamantan/ β -CD-Komplexe bzw. Cholin säure/ β -CD-Komplexe vernetzt und zur 3D-Einbettung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) verwendet wurden. ¹⁴⁰	18
Abbildung 8: Zusammensetzung der β -Cyclodextrin- und Adamantan-Polymere für die Herstellung von Wirt-Gast-Hydrogelen.	25
Abbildung 9: FTIR-Spektren des Präpolymers PPCD2 , des Wirtpolymers PCD2 und von β -CD-EDA.	29
Abbildung 10: Freie radikalische Polymerisation von DMA, AdHexAAm und TMAEA zum Gastpolymer P(DMA- <i>co</i> -AdHexAAm- <i>co</i> -TMAEA) und ein exemplarisches ¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) des Gastpolymers PAd3 mit den Zuordnungen der Signale.	31
Abbildung 11: Bilder der Wirt-Gast-Hydrogele G1-G12 im <i>Vial-Inversion</i> -Test (A) und des Hydrogeles G11 zur Verdeutlichung der Transparenz (B).	33
Abbildung 12: Amplitudentests der Hydrogele G1-G4 mit 3,1 mol% Vernetzer (A), G5-G8 mit 4,4 mol% Vernetzer (B) und G9-G12 mit 7,6 mol% Vernetzer (C) gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	34
Abbildung 13: Mittelwerte des Speichermoduls G' (A) und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) der Hydrogele G1-G12 als Funktion der Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	35
Abbildung 14: Frequenztests der Wirt-Gast-Hydrogele G1-G4 mit 3,1 mol% Vernetzer (A), G5-G8 mit 4,4 mol% Vernetzer (B) und G9-G12 mit 7,6 mol% Vernetzer (C) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % und 25 °C.	37

Abbildung 15: Exemplarischer Selbstheilungstest von G4 gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C (A). Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 und der Verlustfaktor $\tan\delta$ in den Erholungsphasen bestimmt aus den Selbstheilungstest der Hydrogele G1-G4 mit 3,1 mol% Vernetzer (A), G5-G8 mit 4,4 mol% Vernetzer (B) und G9-G12 mit 7,6 mol% Vernetzer (C).	39
Abbildung 16: REM-Aufnahmen der Hydrogelmorphologie des gefriergetrockneten Hydrogels G4 in 1000-facher (links) und 2000-facher Vergrößerung (rechts).	41
Abbildung 17: Exemplarisches $^1\text{H-NMR}$ des RGD-funktionalisierten Polymers PRGD2 in DMSO- d_6 (400 MHz).	46
Abbildung 18: $^1\text{H-NMR}$ des IKVAV-funktionalisierten Polymers PIKVAV2 in DMSO- d_6 (400 MHz).	47
Abbildung 19: Amplitudentests (links) gemessen bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und Frequenztests (rechts) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.	50
Abbildung 20: Selbstheilungstests der (A) RGD-funktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogele (GRGD1 und GRGD2), (B) IKVAV-funktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogele (GIKVAV1 und GIKVAV2) und (C) des Kontrollgels GK gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	53
Abbildung 21: REM-Bilder der gefriergetrockneten Hydrogele (A) GRGD1 , (B) GRGD2 , (C) GIKVAV1 , (D) GIKVAV2 und (E) GK	56
Abbildung 22: Zellviabilität von COS-7-Zellen bestimmt über CCK-8-Assays nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO_2) in (A) den Adamantan-Polymeren PAd5-PAd8 und (B) den β -Cyclodextrin-Polymeren PCD5-PCD7 in verschiedenen Polymerkonzentrationen c relativ zur Kontrolle in normalem Zellkulturmedium.	61
Abbildung 23: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) einem 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogel mit 3,3 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; orangener Kreis = Zelle nicht in der fokussierten Ebene) und am Boden eines (B) 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogels mit 7,5 mol% Vernetzung.	63
Abbildung 24: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) einem 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogel mit 2,9 mol% RGD im Gastpolymer und 2,5 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; übrige Zellen liegen ober- und unterhalb der fokussierten Ebene) und (B) am Boden eines 4 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogels mit 2,9 mol% RGD im Gastpolymer und 5,5 mol% Vernetzung.	65

Abbildung 25: Molekülstrukturen von α -, β -, γ - und δ -Thiolacton.	68
Abbildung 26: Zusammensetzung der vier verschiedenen thiolactonhaltigen Gastpolymere und des Wirtpolymers.	70
Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Wirtpolymers PCD8 in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).	73
Abbildung 28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der neutralen und kationischen thiolactonhaltigen Gastpolymere PAd_n (600 MHz) und PAd_{kat} (400 MHz) in $\text{DMSO-}d_6$ mit der Markierung der Signale, über die die Zusammensetzung ermittelt wurde.	76
Abbildung 29: Exemplarisches $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des RGD-funktionalisierten Gastpolymers PAd_{kat}RGD2 in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz) mit der Markierung der Signale, über die der Molanteil an RGD im Polymer berechnet wurde.	82
Abbildung 30: Amplitudentests der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele gemessen bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und 25 °C.	88
Abbildung 31: Mittelwerte des Speichermoduls G' (A), des Verlustfaktors $\tan\delta_{\text{LVE}}$ (B) und der Nachgebrenze γ_y der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele als Funktion der Gesamtpolymerkonzentration β bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	89
Abbildung 32: Frequenztests der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C.	92
Abbildung 33: Visualisierung der selbstheilenden Eigenschaften der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele am Beispiel von Hydrogel Gn8 , welches in Originalfarbe, rot eingefärbt und schwarz eingefärbt hergestellt, dann zusammengeschoben und nach der Selbstheilung auseinandergezogen wurde.	95
Abbildung 34: REM-Aufnahmen des gefriergetrockneten Hydrogels G3,3kat10 in 130-facher (links) und 500-facher (rechts) Vergrößerung.	99
Abbildung 35: Ausbildung einer Protrusion bei einer adhären Zelle. ²⁶⁹	97
Abbildung 36: Repräsentative Durchlichtaufnahme von B16F1-Zellen in dem Hydrogel G1,5kat4 mit gelber Markierung der adhären Zellen.	98
Abbildung 37: Repräsentative 3D-Projektion von B16F1-Zellen in dem neutralen, mit 3,3 mol% RGD-funktionalisierten Hydrogel G3,3n6 mit Lebend-Tot-Färbung nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 . Die lebenden B16F1-Zellen sind mit Calcein AM (grün) und die toten Zellen mit PI (rot) angefärbt.	99
Abbildung 38: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation in den thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen	

bei 37 °C und 5 % CO₂. (c_{RGD} im Gel, 1,5 mol% RGD: 4 Gew.-% = 2,4 µmol/mL; 6 Gew.-% = 3,6 µmol/mL; 8 Gew.-% = 4,8 µmol/mL; 10 Gew.-% = 6,0 µmol/mL; c_{RGD} im Gel, 3,3 mol% RGD: 4 Gew.-% = 5,0 µmol/mL; 6 Gew.-% = 7,5 µmol/mL; 8 Gew.-% = 10,0 µmol/mL; 10 Gew.-% = 12,6 µmol/mL; c_{TMAEA} im Gel: 4 Gew.-% = 8,5 µmol/mL; 6 Gew.-% = 12,8 µmol/mL; 8 Gew.-% = 17,0 µmol/mL; 10 Gew.-% = 21,3 µmol/mL).100

Abbildung 39: ¹H-NMR-Spektrum des RGD-funktionalisierten, thiolhaltigen Gastpolymers **PAd_{kat}SHRGD** in D₂O (500 MHz) mit der Markierung der Signale, über die der Molanteil an RGD im Polymer berechnet wurde.111

Abbildung 40: Amplitudentests der dual-vernetzten Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), der RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und der Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) gemessen bei einer konstanten Frequenz *f* von 10 Hz und 25 °C.116

Abbildung 41: Auftragungen der Mittelwerte des Speichermoduls *G'*_{LVE} (**A**, **B**), des Verlustfaktors *tanδ*_{LVE} (**C**, **D**) und der Nachgebgränze *γ_y* (**E**, **F**) gegen die Gesamtpolymerkonzentration *β* für die dualen Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und die Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) und gegen die Peptidkonzentration für die RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) ermittelt über Amplitudentests (*f* = 1 Hz, 25 °C).118

Abbildung 42: Frequenztests der dual-vernetzten Hydrogele **Gd1.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und **Gd2.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), der RGD-haltigen dualen Hydrogele **GdRGD1-3** (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und der Kontrollgele **KG1.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), **KG2.4-10** (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und **KG3.4-10** (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent) gemessen bei einer konstanten Scherdeformation *γ* von 1 % bei 25 °C.121

Abbildung 43: Visualisierung der selbstheilenden Eigenschaften des dualen Hydrogels **Gd2.4** im Vergleich zu dem kovalenten Kontrollgel **KG2.4** durch Zusammenschieben und anschließendes Auseinanderziehen der Hydrogelstücke.124

Abbildung 44: Exemplarische Auftragung des Speichermoduls *G'* und des Verlustmoduls *G''* gegen die Zeit *t* für das (**A**) duale Hydrogel **Gd1.4** (2 mol% Wirt-Gast, 3 mol% kovalent) und das (**B**) kovalente Kontrollgel **KG2.10** (0 mol% Wirt-Gast, 6 mol% kovalent) aufgenommen

direkt nach dem Mischen der Polymerlösungen zur Bestimmung der Gelierzeit bei einer Scherdeformation von $\gamma = 1\%$, einer Frequenz von $f = 1$ Hz und einer Temperatur von $25\text{ }^\circ\text{C}$	125
Abbildung 45: Auftragung der Quellwerte Q_m gegen die Gesamtpolymerkonzentration β für die dual-vernetzten Hydrogele Gd1.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und Gd2.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und die Kontrollgele KG1.4-10 (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) (A) sowie die Auftragung der Quellwerte Q_m gegen den RGD-Anteil im Polymer für die RGD-haltigen dualen Hydrogele GdRGD1-3 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) bestimmt nach 24-stündiger Quellung in PBS-Puffer bei $37\text{ }^\circ\text{C}$	127
Abbildung 46: REM-Aufnahmen der gefriergetrockneten Hydrogele Gd1.4 (A), Gd2.10 (B), Gd2.8 (C), Gd2.6 (D), Gd2.4 (E), GdRGD1 (F), KG1.4 (G), KG2.4 (H), KG3.10 (I).	131
Abbildung 47: Auftragung der Zellviabilität von COS-7-Zellen gegen die Polymerkonzentration der Polymere PCD8 , PAd_{kat}2 , PAd_{kat}SH3 , PAd_{kat}SH4 und PAd_{kat}SHRGD nach 24 h Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 bestimmt mittels CCK-8-Assay.	129
Abbildung 48: Repräsentative 3D-Projektion von B16F1-Zellen in dem dualen Hydrogel Gd1.8 (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) mit Lebend-Tot-Färbung nach 24 h Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 . Die lebenden B16F1-Zellen sind mit Calcein AM (grün) und die toten Zellen mit PI (rot) angefärbt.	131
Abbildung 49: Beispielhafte Durchlichtaufnahmen von B16F1-Zellen in den Hydrogelen (A) KG3.4 (2 mol% Wirt-Gast, 0 mol% kovalent), (B) GdRGD2 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 0,8 mol% RGD), (C) GdRGD1 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 1,5 mol% RGD), (D) GdRGD3 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent; 0,4 mol% RGD), (F) Gd1.4 (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), (G) KG1.4 (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), (H) Gd2.4 (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), (I) KG1.4 (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und (E/J) Matrigel nach 24 h Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 mit gelber Markierung der adhärenen Zellen.	132
Abbildung 50: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenen von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 in den dual-vernetzten Hydrogelen Gd1.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und Gd2.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), den RGD-haltigen dualen Hydrogelen GdRGD1-3 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und den Kontrollgelen KG1.4-10 (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), KG2.4-10 (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und KG3.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent).	133

Abbildung 51: Darstellung der Vorgehensweise bei der dreidimensionalen Einbettung von B16F1-Sphäroiden in die Wirt-Gast-Hydrogele KG3.4-10	139
Abbildung 52: Durchlichtaufnahmen mit 20-facher Vergrößerung von B16F1-Sphäroiden in (A) KG3.4 (4 Gew.-%), (B) KG3.6 (6 Gew.-%), (C) KG3.8 (8 Gew.-%) und (D) KG3.10 (10 Gew.-%) nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO ₂	140
Abbildung 53: Mittelwerte des Speichermoduls G' (A) und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) der Hydrogele G1-G12 als Funktion der Vernetzungsdichte und Gesamtpolymerkonzentration bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	144
Abbildung 54: Zusammensetzung der vier verschiedenen thiolactonhaltigen Gastpolymere und des Wirtpolymers.	146
Abbildung 55: Mittelwerte des Speichermoduls G' (A) und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ (B) der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele als Funktion der Gesamtpolymerkonzentration β bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests gemessen bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.	148
Abbildung 56: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation in den thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogelen bei 37 °C und 5 % CO ₂	149
Abbildung 57: Die Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen bestimmt über eine Lebend-Tot-Färbung (A) und der Anteil adhärenter von lebenden Zellen (B) ermittelt über Durchlichtmikroskopie nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO ₂ in den dual-vernetzten Hydrogelen Gd1.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent) und Gd2.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent), den RGD-haltigen dualen Hydrogelen GdRGD1-3 (2 mol% Wirt-Gast; 7 mol% kovalent) und den Kontrollgelen KG1.4-10 (0 mol% Wirt-Gast; 3 mol% kovalent), KG2.4-10 (0 mol% Wirt-Gast; 6 mol% kovalent) und KG3.4-10 (2 mol% Wirt-Gast; 0 mol% kovalent).	151
Abbildung 58: Simulation einer (A) ideal-viskosen Flüssigkeit mit dem Dämpfer-Modell, eines (B) ideal-elastischen Festkörpers mit dem Federmodell, einer (C) viskoelastischen Flüssigkeit mit dem MAXWELL-Modell und eines (D) viskoelastischen Festkörpers mit dem KELVIN-VOIGT-Modell. ²⁸⁹	155
Abbildung 59: Das Zwei-Platten-Modell zur Scherung einer Probe bei einem Oszillationsversuch. ²⁸⁹	156

Abbildung 60: Darstellung der Sinuskurven der zeitabhängigen Funktionen $\gamma(t)$ und $\tau(t)$, die bei viskoelastischen Materialien zwar dieselbe Frequenz aufweisen, aber um den Phasenverschiebungswinkel δ verschoben sind.²⁸⁹157

Abbildung 61: Vektordiagramm mit dem aus G' und G'' gebildeten Vektor G^* .²⁸⁹157

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eigenschaften von α -, β - und γ -Cyclodextrinen.	12
Tabelle 2: Assoziationskonstanten K_a einiger Gastmoleküle mit α -, β - und γ -Cyclodextrinen.	14
Tabelle 3: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Präpolymere PPCD1-PPCD3 und der Gastpolymere PCD1-PCD3	29
Tabelle 4: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Copolymere PAd1-PAd3.	32
Tabelle 5: Gesamtpolymerkonzentration β und Zusammensetzung der Hydrogele G1-G12	33
Tabelle 6: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der RGD- und IKVAV-funktionalisierten Gastpolymere PRGD1/2 und PIKVAV1/2 , des Kontrollpolymers PAd4 , des Präpolymers PPCD4 und des Wirtpolymers PCD4	48
Tabelle 7: Gesamtpolymerkonzentration β und Zusammensetzung der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.	49
Tabelle 8: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ im LVE-Bereich und der Nachgebrenze γ_y in den Amplitudentests sowie der Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} in den Frequenztests der peptidfunktionalisierten Hydrogele und des unfunktionalisierten Kontrollgels.	51
Tabelle 9: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die peptidfunktionalisierten Hydrogele und das unfunktionalisierte Kontrollgel.	54
Tabelle 10: Theoretische und experimentelle Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Gastpolymere PAd5-PAd8 und der Wirtpolymere PCD5-PCD7	58
Tabelle 11: Vorhandensein einer dreidimensionalen Verteilung der Zellen in Wirt-Gast-Hydrogelen mit verschiedenen Vernetzeranteilen und Gesamtpolymerkonzentrationen β	64
Tabelle 12: Die verwendeten Reaktionsbedingungen zur Optimierung der polymeranalogen β -CD-Kupplung in DMF als Lösungsmittel bei einer Reaktionszeit von 24 h sowie die Zusammensetzungen der erhaltenen Test-Polymere P(DMA-co-HexAAm-co- β -CDHexAAm).	72
Tabelle 13: Die über den ELLMAN'S Assay bestimmten Thiolanteile und zur Ringöffnungsreaktion hinzugegebenen Äquivalente n -Propylamin für die kationischen und neutralen thiolactonhaltigen Gastpolymere. Die Reaktionen wurden jeweils in PBS-Puffer	

(pH = 7,4) bei Raumtemperatur (RT) unter Ausschluss von Sauerstoff mit einer Reaktionszeit von 24 h durchgeführt.80

Tabelle 14: Die über den ELLMAN'S Assay und die ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmten Thiolanteile und bei der Thiol-MICHAEL-Addition eingesetzten Polymere sowie hinzugegebenen Äquivalente Mal-Aca-GGRGDSF und verwendeten Reaktionstemperaturen T und -zeiten t für die kationischen und neutralen thiolactonhaltigen Gastpolymere.83

Tabelle 15: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der letztendlich weiterverwendeten Adamantan- und β -CD-Copolymere.85

Tabelle 16: Zusammensetzung der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele mit und ohne Kationik und mit jeweils drei verschiedenen RGD-Anteilen in den Gesamtpolymerkonzentrationen β 4, 6, 8 und 10 Gew.-%.86

Tabelle 17: Die Frequenzen an den Sol-Gel-Übergängen f_{co} ermittelt aus den Frequenztests gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % und 25 °C für die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele.93

Tabelle 18: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele.94

Tabelle 19: Theoretische und experimentell ermittelte Zusammensetzung, mittlere molare Masse \bar{M}_n und Dispersität D der Adamantan-Copolymere.110

Tabelle 20: Zusammensetzung der dual-vernetzten Hydrogele und der Kontrollhydrogele. ...117

Tabelle 21: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 für die dualen Hydrogele und die physikalischen Kontrollgele.123

Tabelle 22: Die Gelierzeiten t_{Gel} der dualen Hydrogele und kovalenten Kontrollgele ermittelt über oszillatorische Zeitmessungen bei einer Scherdeformation von $\gamma = 1$ %, einer Frequenz von $f = 1$ Hz und einer Temperatur von 25 °C.126

13. Schemataverzeichnis

Schema 1: Synthese eines <i>in-situ</i> vernetzten Hydrogels modifiziert aus ⁷⁶	8
Schema 2: Schematische Darstellung des hydrophoben Effektes bei der Bildung eines Wirt-Gast-Komplexes eines Cyclodextrins (modifiziert aus ¹¹⁹).	15
Schema 3: Schematische Darstellung der physikalischen (A) und dualen (B) Hydrogelsysteme dieser Arbeit.	21
Schema 4: Synthese und ¹ H-NMR-Spektren (DMSO- <i>d</i> ₆) der Wirtpolymere PCD1-PCD3 mit der Zuordnung der Signale, über die die Polymerzusammensetzung bestimmt wurde und die Synthese von β-CD-EDA über β-CD-OTs.	27
Schema 5: Synthese des Monomers AdHexAAm aus HexAAm und Adamantylamin nach Aktivierung der Carboxylgruppe mit Ethylchlorformiat.	30
Schema 6: Schematische Darstellung der Hydrogelsynthese aus wässrigen Wirt- und Gastpolymerlösungen.	32
Schema 7: Visualisierung der Selbstheilung von G4 . Der mit Phenolrot angefärbte und der nicht angefärbte Teil des Hydrogels G4 wurden vereint und nach wenigen Sekunden Wartezeit mit einer Pinzette angehoben.	40
Schema 8: Schematische Darstellung der Synthese von peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen aus einem β-CD-Polymer und RGD- bzw. IKVAV-funktionalisierten Ad-Polymeren.	45
Schema 9: Reduktion des CCK-8-Assay-Anfärbereagenzes WST-8 zu WST-8-Formazan durch die Aktivität der Dehydrogenase in lebenden Zellen mithilfe des Elektronenüberträgers 1-Methoxy PMS. ²²⁷	59
Schema 10: Darstellung der Präparation der Wirt-Gast Hydrogele für 3D-Zellexperimente. ..	62
Schema 11: Syntheseroute zur Darstellung der neutralen und kationischen Gastpolymere ohne RGD-Peptid (PAd_n und PAd_{kat}) sowie der neutralen und kationischen Gastpolymere mit RGD-Peptid (PAd_nRGD2 und PAd_{kat}RGD2) über eine Aminolyse als Zwischenschritt.	74
Schema 12: Mechanismus der polymeranalogen Thiolactonringöffnung mit <i>n</i> -Propylamin. ..	77
Schema 13: Schematische Darstellung der reduktiven Disulfidspaltung durch DTT unter basischen Bedingungen.	78
Schema 14: Reaktion des ELLMAN's Reagenzes DTNB mit einem Thiol bei einem pH-Wert von 8 zu einem Äquivalent NTB ²⁻ . ²⁶³	79
Schema 15: Mechanismus der Thiol-MICHAEL-Addition zur Peptidimmobilisierung am ringgeöffneten Polymer. ²⁶⁵	81

Schema 16: Schematische Darstellung der Synthese eines dual-vernetzten Hydrogeles aus einem thiolhaltigen Adamantan-Gastpolymer, einem β -Cyclodextrin-Wirtpolymer und einem PEGDA-Vernetzer.	108
Schema 17: (A) Thiolactonringöffnung am Gastpolymer PAd_{kat}2 über eine Aminolyse mit drei verschiedenen Mengen an <i>n</i> -Propylamin zur Darstellung von PAd_{kat}3/4/5 und (B) die anschließende RGD-Peptid-Funktionalisierung von PAd_{kat}5	109
Schema 18: Darstellung des PEGDA-Vernetzers.	112
Schema 19: Schematische Darstellung der Präparation der dual-vernetzten Hydrogele.	113
Schema 20: Vernetzung der Gastpolymere mit PEGDA über die Thiol-MICHAEL-Addition.	113
Schema 21: Zusammensetzung der β -Cyclodextrin- und Adamantan-Polymere für die Herstellung von Wirt-Gast-Hydrogelen.	143
Schema 22: Schematische Darstellung der Synthese von peptidfunktionalisierten Wirt-Gast-Hydrogelen aus einem β -CD-Polymer und RGD- bzw. IKVAV-funktionalisierten Ad-Polymeren.	145
Schema 23: Schematische Darstellung der Synthese eines dual-vernetzten Hydrogeles aus einem thiolhaltigen Adamantan-Gastpolymer, einem β -Cyclodextrin-Wirtpolymer und einem PEGDA-Vernetzer.	150

14. Anhang

Tabelle A1: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} , des Verlustmoduls G''_{LVE} und des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$ sowie die Mittelwerte der Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} in den Frequenztests der Hydrogele **G1-G12**.

Hydrogel	G'_{LVE} / Pa^a	G''_{LVE} / Pa^a	$\tan\delta_{LVE}^a$	f_{co} / Hz^b
G1	233 ± 41	184 ± 33	0,79 ± 0,00	8 ± 1
G2	644 ± 94	554 ± 69	0,86 ± 0,02	13 ± 1
G3	687 ± 167	611 ± 162	0,90 ± 0,02	12 ± 3
G4	829 ± 79	745 ± 67	0,90 ± 0,01	7 ± 2
G5	195 ± 38	145 ± 30	0,74 ± 0,01	- ^c
G6	626 ± 77	438 ± 21	0,70 ± 0,06	- ^c
G7	777 ± 37	592 ± 19	0,68 ± 0,06	- ^c
G8	1010 ± 102	693 ± 95	0,68 ± 0,02	- ^c
G9	156 ± 14	61 ± 8	0,39 ± 0,02	- ^c
G10	677 ± 0	257 ± 16	0,38 ± 0,02	- ^c
G11	975 ± 263	402 ± 72	0,42 ± 0,04	- ^c
G12	1240 ± 171	517 ± 4	0,42 ± 0,05	- ^c

^a bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und 25 °C; ^b bestimmt über Frequenztests gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C; ^c kein Schnittpunkt im gemessenen Frequenzbereich.

Tabelle A2: Prozentuale Erholung des Speichermoduls G' im Vergleich zu Zyklus 0 der Wirt-Gast-Hydrogele **G1-G12**.

Hydrogel	Selbstheilung von G' / % ^a				
	Zyklus 0	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
G1	100	50 ± 16	31 ± 23	26 ± 26	25 ± 23
G2	100	65 ± 3	56 ± 3	49 ± 2	47 ± 2
G3	100	69 ± 8	58 ± 10	52 ± 10	46 ± 12
G4	100	75 ± 7	67 ± 7	64 ± 3	61 ± 8
G5	100	27 ± 27	16 ± 16	16 ± 16	12 ± 12
G6	100	49 ± 3	40 ± 3	42 ± 4	36 ± 4
G7	100	55 ± 5	44 ± 2	42 ± 5	44 ± 6
G8	100	62 ± 0	49 ± 1	37 ± 3	32 ± 2
G9	100 ^b	32 ^b	20 ^b	6 ^b	8 ^b
G10	100 ^b	38 ^b	35 ^b	36 ^b	28 ^b
G11	100	31 ± 2	26 ± 0	24 ± 2	21 ± 1
G12	100	42 ± 11	31 ± 7	26 ± 7	25 ± 8

^a bestimmt über oszillatorische Zeitmessungen bei abwechselnd geringer (0,5 %) und hoher (500,0 %) Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C. Das Speichermodul G' im Zyklus 0 wurde auf 100 % gesetzt und die prozentuale Erholung von G' in den nachfolgenden Zyklen mit geringer Scherdeformation wurde im Verhältnis zu Zyklus 0 berechnet; ^b die Werte wurden aus nur einer Messung ermittelt.

Tabelle A3: Mittelwerte des Verlustfaktors $\tan\delta$ der Hydrogele **G1-G12** bestimmt aus den Zyklen mit einer Scherdeformation von 0,5 % in den Selbstheilungstests. ^a

Hydrogel	$\tan\delta$				
	Zyklus 0	Zyklus 1	Zyklus 2	Zyklus 3	Zyklus 4
G1	0,95 ^b	0,88 ^b	0,99 ^b	1,05 ^b	1,12 ^b
G2	0,84 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,91 ± 0,02	0,95 ± 0,03	0,98 ± 0,04
G3	0,94 ± 0,00	0,97 ± 0,01	1,04 ± 0,03	1,10 ± 0,05	1,17 ± 0,09
G4	0,89 ± 0,00	0,89 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,93 ± 0,02
G5	0,98 ^b	0,80 ^b	1,13 ^b	1,26 ^b	1,64 ^b
G6	0,70 ± 0,01	0,72 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,80 ± 0,03	0,85 ± 0,04
G7	0,77 ± 0,03	0,81 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,90 ± 0,04	0,91 ± 0,03
G8	0,72 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,76 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,84 ± 0,00
G9	0,42 ± 0,08	0,67 ± 0,33	1,01 ± 0,63	3,64 ± 3,25	2,61 ± 2,25
G10	0,39 ^b	0,38 ^b	0,4 ^b	0,43 ^b	0,39 ^b
G11	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,06	0,45 ± 0,10	0,46 ± 0,12	0,47 ± 0,12
G12	0,41 ± 0,05	0,43 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,07

^a bestimmt über oszillatorische Zeitmessungen bei abwechselnd geringer (0,5 %) und hoher (500,0 %) Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C; ^b die Werte wurden aus nur einer Messung ermittelt.

Tabelle A4: Zellviabilität relativ zur Kontrolle in den Gastpolymeren **PAd4** bis **PAd7** und den Wirtpolymeren **PCD5** bis **PCD6**.

Konzentration <i>c</i> / mg/mL	Relative Zellviabilität / %						
	PAd4	PAd5	PAd6	PAd7	PCD4	PCD5	PCD6
0,125	91 ± 6	100 ± 19	82 ± 14	76 ± 7	86 ± 3	88 ± 1	95 ± 6
0,250	98 ± 7	94 ± 2	94 ± 17	56 ± 17	95 ± 11	92 ± 20	89 ± 6
0,500	86 ± 2	104 ± 15	111 ± 6	58 ± 3	91 ± 7	97 ± 17	97 ± 0
1,000	91 ± 6	114 ± 11	98 ± 15	42 ± 6	97 ± 2	138 ± 14	105 ± 5
2,000	93 ± 4	87 ± 3	90 ± 5	52 ± 6	104 ± 12	130 ± 28	91 ± 9
4,000	78 ± 2	91 ± 24	96 ± 3	37 ± 2	98 ± 27	127 ± 12	131 ± 15
8,000	86 ± 17	69 ± 8	80 ± 1	30 ± 1	86 ± 5	84 ± 5	96 ± 3
0,000 (Kontrolle)	100	100	100	100	100	100	100

^a bestimmt durch CCK-8-Assays von COS-7-Zellen nach 24 h Inkubation in der jeweiligen Polymerlösung bei 5 % CO₂ und 37 °C.

Tabelle A5: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} , des Verlustmoduls G''_{LVE} , des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$, der Nachgebgränze γ_y und der Frequenz am Sol-Gel-Übergang f_{co} im Frequenztest der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele.

Hydrogel	G'_{LVE} / Pa^a	G''_{LVE} / Pa^a	$\tan\delta_{LVE}^a$	$\gamma_y / \%^a$	f_{co} / Hz^b
Gn4	341 ± 8	230 ± 2	0,68 ± 0,01	72 ± 8	3,5 ± 0,2
Gn6	755 ± 38	566 ± 2	0,76 ± 0,03	63 ± 38	3,8 ± 0,0
Gn8	930 ± 39	783 ± 51	0,84 ± 0,02	130 ± 29	4,4 ± 0,0
Gn10	1616 ± 121	1353 ± 62	0,84 ± 0,02	95 ± 32	3,9 ± 0,3
Gkat4	305 ± 30	220 ± 29	0,74 ± 0,02	84 ± 44	7,2 ± 0,2
Gkat6	447 ± 28	360 ± 25	0,81 ± 0,06	136 ± 50	6,4 ± 0,2
Gkat8	801 ± 43	744 ± 29	0,93 ± 0,01	159 ± 0	7,7 ± 0,1
Gkat10	1280 ± 123	1120 ± 99	0,88 ± 0,01	130 ± 30	6,1 ± 0,0
G1,5n4	267 ± 5	193 ± 18	0,74 ± 0,06	143 ± 16	2,8 ± 0,4
G1,5n6	595 ± 21	446 ± 42	0,75 ± 0,04	151 ± 51	3,4 ± 0,3
G1,5n8	781 ± 2	681 ± 38	0,87 ± 0,05	90 ± 11	2,9 ± 0,5
G1,5n10	1316 ± 58	1115 ± 61	0,85 ± 0,01	82 ± 19	3,0 ± 0,0
G3,3n4	296 ± 73	224 ± 83	0,76 ± 0,08	180 ± 21	1,7 ± 0,1
G3,3n6	594 ± 67	451 ± 23	0,77 ± 0,05	101 ± 1	1,8 ± 0,1
G3,3n8	770 ± 78	596 ± 95	0,77 ± 0,05	111 ± 48	2,1 ± 0,2
G3,3n10	1413 ± 26	1114 ± 3	0,79 ± 0,01	65 ± 15	2,2 ± 0,0
G1,5kat4	136 ± 3	115 ± 15	0,87 ± 0,12	119 ± 40	4,5 ± 0,3
G1,5kat6	345 ± 81	339 ± 85	0,98 ± 0,01	111 ± 48	6,4 ± 0,2
G1,5kat8	531 ± 106	527 ± 97	0,99 ± 0,01	130 ± 30	7,9 ± 1,5
G1,5kat10	742 ± 114	686 ± 120	0,92 ± 0,02	75 ± 25	11,8 ± 1,8
G3,3kat4	154 ± 33	116 ± 3	0,91 ± 0,28	70 ± 57	5,3 ± 0,8
G3,3kat6	362 ± 20	269 ± 40	0,77 ± 0,15	95 ± 64	6,2 ± 2,3
G3,3kat8	582 ± 58	534 ± 90	0,92 ± 0,06	132 ± 69	7,1 ± 0,5
G3,3kat10	808 ± 84	709 ± 52	0,88 ± 0,03	111 ± 48	6,0 ± 0,2

^a bestimmt im LVE-Bereich der Amplitudentests bei einer konstanten Frequenz f von 10 Hz und 25 °C; ^b bestimmt über Frequenztests gemessen bei einer konstanten Scherdeformation γ von 1 % bei 25 °C.

Tabelle A6: Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen pro mm³ und der prozentuale Anteil adhärenter von lebenden Zellen in den thiolactonhaltigen Hydrogelen und in Matrigel nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

Hydrogel	Zellanteil / % ^a		Zellanzahl/mm ³ ^a		Adhärente Zellen / % ^b
	lebend	tot	lebend	tot	
Gn4	83 ± 8	17 ± 8	316 ± 115	65 ± 28	14 ± 12
Gn6	81 ± 7	19 ± 7	240 ± 101	56 ± 10	20 ± 11
Gn8	82 ± 11	18 ± 11	271 ± 80	58 ± 42	14 ± 11
Gn10	80 ± 9	20 ± 9	189 ± 62	48 ± 21	12 ± 9
Gkat4	90 ± 7	10 ± 7	403 ± 219	47 ± 26	12 ± 6
Gkat6	87 ± 10	13 ± 10	299 ± 104	45 ± 36	14 ± 8
Gkat8	89 ± 10	11 ± 10	315 ± 128	41 ± 36	17 ± 14
Gkat10	79 ± 15	21 ± 15	231 ± 105	62 ± 48	15 ± 11
G1,5n4	86 ± 8	14 ± 8	507 ± 143	80 ± 53	50 ± 9
G1,5n6	85 ± 5	15 ± 5	466 ± 136	82 ± 23	40 ± 9
G1,5n8	77 ± 9	23 ± 9	438 ± 96	131 ± 59	42 ± 15
G1,5n10	71 ± 15	29 ± 15	275 ± 139	113 ± 60	37 ± 20
G3,3n4	80 ± 8	20 ± 8	472 ± 126	119 ± 52	55 ± 10
G3,3n6	86 ± 5	14 ± 5	497 ± 112	84 ± 25	39 ± 4
G3,3n8	77 ± 9	23 ± 9	468 ± 115	143 ± 61	36 ± 6
G3,3n10	70 ± 11	30 ± 11	265 ± 74	112 ± 52	33 ± 10
G1,5kat4	96 ± 2	4 ± 2	517 ± 117	21 ± 11	53 ± 13
G1,5kat6	97 ± 2	2 ± 2	418 ± 112	12 ± 7	47 ± 19
G1,5kat8	92 ± 4	8 ± 4	391 ± 78	34 ± 16	40 ± 16
G1,5kat10	89 ± 4	11 ± 4	334 ± 53	40 ± 16	38 ± 7
G3,3kat4	94 ± 6	6 ± 6	491 ± 148	31 ± 31	53 ± 15
G3,3kat6	84 ± 11	16 ± 11	309 ± 149	58 ± 36	57 ± 19
G3,3kat8	67 ± 13	33 ± 13	283 ± 114	137 ± 61	43 ± 9
G3,3kat10	71 ± 7	29 ± 7	241 ± 71	98 ± 14	44 ± 7
Matrigel	81 ± 16	19 ± 16	431 ± 180	104 ± 98	93 ± 10

^a bestimmt über Lebend-Tot-Färbung; ^b bestimmt über Durchlichtmikroskopie.

Tabelle A7: Mittelwerte des Speichermoduls G'_{LVE} , des Verlustmoduls G''_{LVE} , des Verlustfaktors $\tan\delta_{LVE}$, der Nachgebrenze γ_y und der Quellwerte Q_m der dualen Hydrogele und der dazugehörigen kovalenten und physikalischen Kontrollgele.

Hydrogel	G'_{LVE} / Pa^a	G''_{LVE} / Pa^a	$\gamma_y / \%^a$	$\tan\delta_{LVE}^a$	Q_m^b
Gd1.4	497 ± 76	167 ± 19	47 ± 0	0,337 ± 0,014	46 ± 12
Gd1.6	1420 ± 48	455 ± 17	42 ± 5	0,321 ± 0,001	29 ± 7
Gd1.8	2400 ± 164	707 ± 39	47 ± 0	0,295 ± 0,004	23 ± 1
Gd1.10	2754 ± 28	772 ± 42	54 ± 6	0,281 ± 0,013	22 ± 2
Gd2.4	550 ± 80	183 ± 17	38 ± 0	0,335 ± 0,018	23 ± 1
Gd2.6	1066 ± 36	336 ± 5	42 ± 5	0,316 ± 0,015	22 ± 0
Gd2.8	2147 ± 74	596 ± 20	42 ± 5	0,278 ± 0,000	21 ± 0
Gd2.10	2416 ± 5	592 ± 61	42 ± 5	0,245 ± 0,025	20 ± 3
GdRGD1	591 ± 8	159 ± 5	42 ± 5	0,270 ± 0,005	18 ± 1
GdRGD2	549 ± 16	145 ± 4	27 ± 3	0,264 ± 0,001	22 ± 1
GdRGD3	506 ± 51	149 ± 15	34 ± 4	0,295 ± 0,000	24 ± 6
KG1.4	459 ± 3	2 ± 0	2 ± 0	0,004 ± 0,000	22 ± 0
KG1.6	1600 ± 358	4 ± 2	1 ± 0	0,003 ± 0,000	18 ± 0
KG1.8	2445 ± 81	5 ± 1	2 ± 1	0,002 ± 0,000	16 ± 0
KG1.10	3828 ± 23	8 ± 1	1 ± 0	0,002 ± 0,000	15 ± 1
KG2.4	392 ± 34	3 ± 0	3 ± 1	0,008 ± 0,001	31 ± 7
KG2.6	1069 ± 74	3 ± 0	2 ± 1	0,003 ± 0,000	26 ± 5
KG2.8	2423 ± 402	9 ± 2	1 ± 0	0,004 ± 0,000	22 ± 0
KG2.10	3908 ^c	11 ^c	1 ^c	0,003 ^c	19 ± 4
KG3.4	58 ± 17	69 ± 21	124 ± 29	1,170 ± 0,017	-
KG3.6	139 ± 5	162 ± 7	76 ± 0	1,172 ± 0,006	-
KG3.8	242 ± 9	273 ± 9	60 ± 0	1,129 ± 0,008	-
KG3.10	313 ± 21	346 ± 15	54 ± 6	1,107 ± 0,026	-

^a bestimmt über Amplitudentests bei einer konstanten Frequenz f von 1 Hz und einer Temperatur von 25 °C; ^b nach 24 h Quellung in PBS-Puffer bei 37 °C; ^c Werte wurden aus nur einer Messung bestimmt.

Tabelle A8: Zellviabilität relativ zur Kontrolle in den thiolactonhaltigen Gastpolymeren **PAd_{kat2}**, **PAd_{katSH3}**, **PAd_{katSH4}** und **PAd_{katSHRGD}** und dem Wirtpolymer **PCD8**.

Konzentration <i>c</i> / mg/mL	Relative Zellviabilität / %				
	PAd_{kat2}	PAd_{katSH3}	PAd_{katSH4}	PAd_{katSHRGD}	PCD8
0,250	85 ± 9	83 ± 3	85 ± 7	104 ± 8	88 ± 2
0,500	103 ± 19	87 ± 8	81 ± 3	115 ± 21	89 ± 2
1,000	99 ± 20	79 ± 6	86 ± 3	92 ± 15	111 ± 19
2,000	102 ± 11	115 ± 1	104 ± 29	70 ± 14	91 ± 14
4,000	84 ± 6	88 ± 22	113 ± 10	48 ± 5	81 ± 6
0,000 (Kontrolle)	100	100	100	100	100

^a bestimmt durch CCK-8-Assays von COS-7-Zellen nach 24 h Inkubation in der jeweiligen Polymerlösung bei 5 % CO₂ und 37 °C.

Tabelle A9: Anzahl lebender und toter B16F1-Zellen pro mm³ und der prozentuale Anteil adhärenter von lebenden Zellen in den dualen Hydrogelen, den entsprechenden kovalenten und physikalischen Kontrollgelen und in Matrigel nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

Hydrogel	Zellanteil / % ^a		Zellanzahl/mm ³ ^a		Adhärente Zellen / % ^b
	lebend	tot	lebend	tot	
Gd1.4	81 ± 6	19 ± 6	393 ± 95	90 ± 32	5 ± 7
Gd1.6	80 ± 6	20 ± 6	288 ± 40	73 ± 25	5 ± 4
Gd1.8	81 ± 6	19 ± 6	421 ± 146	93 ± 33	3 ± 3
Gd1.10	75 ± 15	25 ± 15	314 ± 54	132 ± 115	12 ± 19
Gd2.4	73 ± 9	27 ± 9	228 ± 89	79 ± 26	7 ± 6
Gd2.6	76 ± 11	24 ± 11	259 ± 95	81 ± 40	5 ± 7
Gd2.8	68 ± 9	32 ± 9	222 ± 74	103 ± 43	11 ± 13
Gd2.10	68 ± 14	32 ± 14	187 ± 102	94 ± 81	0 ± 0
GdRGD1	94 ± 2	6 ± 2	384 ± 86	24 ± 6	50 ± 12
GdRGD2	88 ± 4	12 ± 4	282 ± 81	35 ± 11	35 ± 17
GdRGD3	87 ± 5	13 ± 5	259 ± 71	38 ± 15	29 ± 21
KG1.4	72 ± 10	28 ± 10	277 ± 74	105 ± 37	0 ± 0
KG1.6	71 ± 12	29 ± 12	259 ± 79	107 ± 49	0 ± 0
KG1.8	59 ± 11	41 ± 11	206 ± 123	140 ± 67	4 ± 10
KG1.10	68 ± 8	32 ± 8	272 ± 91	128 ± 59	0 ± 0
KG2.4	80 ± 9	20 ± 9	333 ± 67	87 ± 43	1 ± 2
KG2.6	69 ± 5	31 ± 5	334 ± 111	145 ± 44	1 ± 2
KG2.8	70 ± 13	30 ± 13	272 ± 122	106 ± 46	0 ± 0
KG2.10	55 ± 18	45 ± 18	184 ± 101	158 ± 98	0 ± 0
KG3.4	79 ± 7	21 ± 7	570 ± 128	162 ± 101	14 ± 6
KG3.6	87 ± 5	13 ± 5	402 ± 117	59 ± 26	15 ± 9
KG3.8	86 ± 6	14 ± 6	397 ± 88	67 ± 30	8 ± 9
KG3.10	78 ± 8	22 ± 8	325 ± 108	93 ± 47	7 ± 4
Matrigel	79 ± 14	21 ± 14	370 ± 169	118 ± 123	100 ± 0

^a bestimmt über Lebend-Tot-Färbung; ^b bestimmt über Durchlichtmikroskopie.

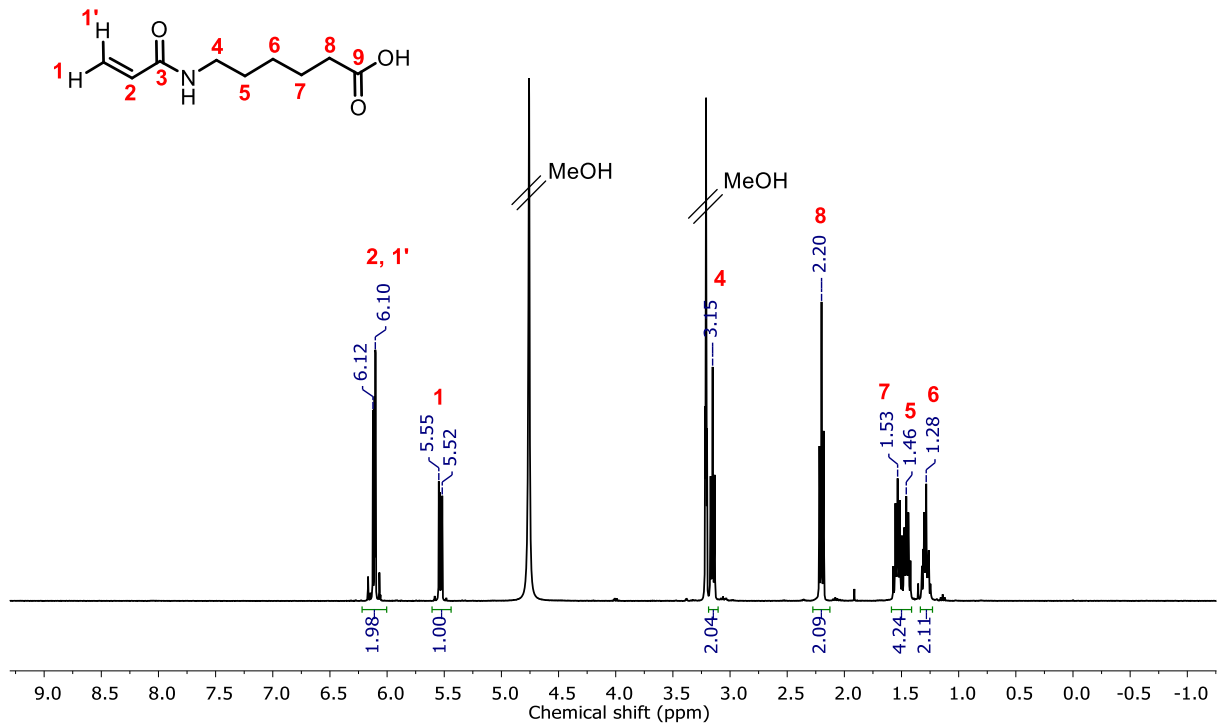


Abbildung A1: ^1H -NMR von 6-*N*-Acrylamidohexansäure (HexAAm) in CD_3OD (400 MHz).

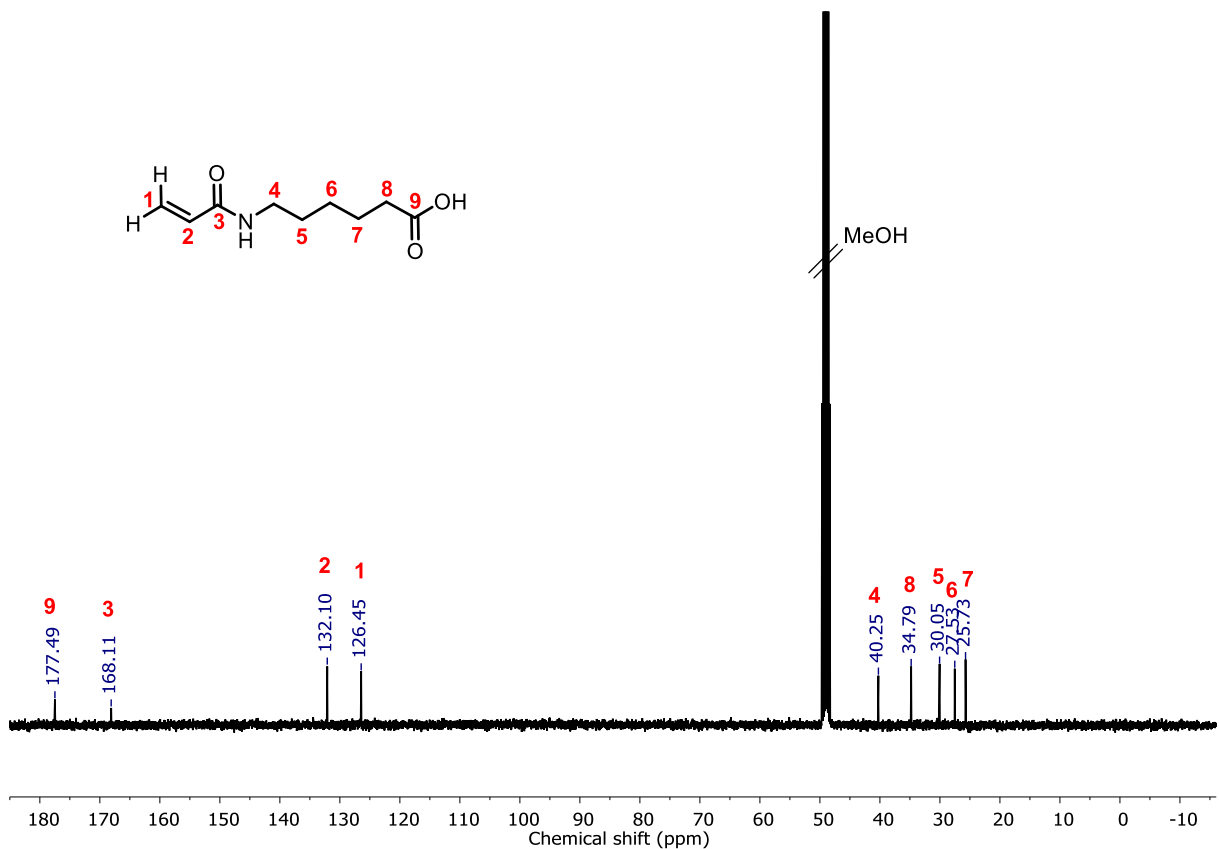


Abbildung A2: ^{13}C -NMR von 6-*N*-Acrylamidohexansäure (HexAAm) in CD_3OD (101 MHz).

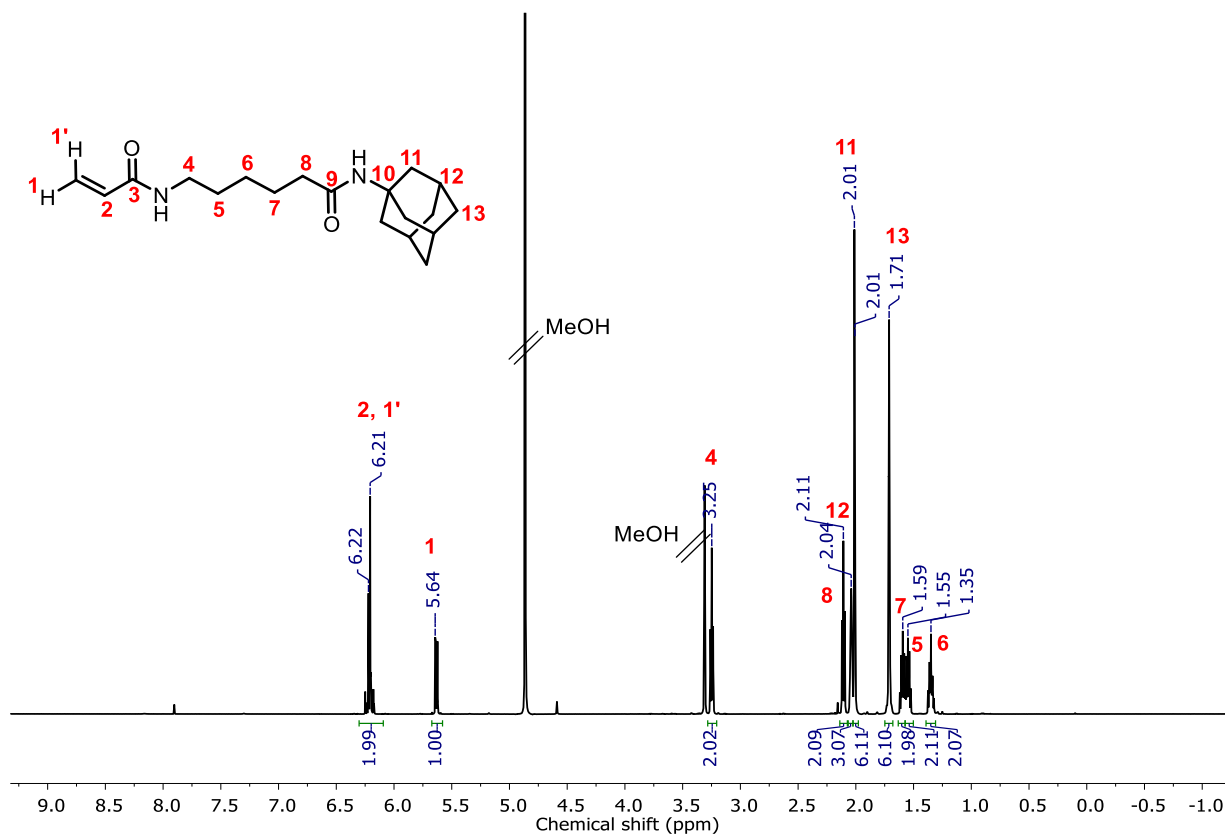


Abbildung A3: $^1\text{H-NMR}$ von 6-Acrylamido-*N*-(adamantan-1-yl)-hexanamid (AdHexAAM) in CD_3OD (400 MHz).

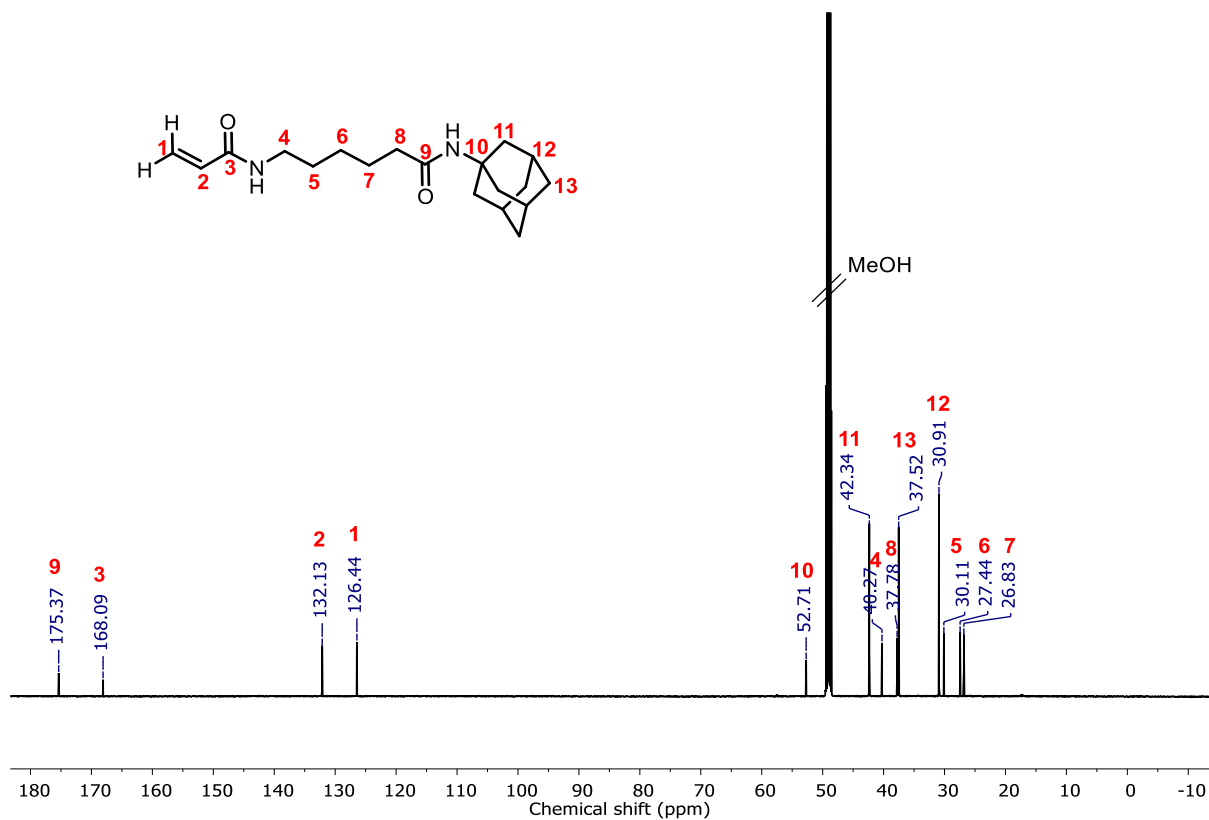


Abbildung A4: $^{13}\text{C-NMR}$ von 6-Acrylamido-*N*-(adamantan-1-yl)-hexanamid (AdHexAAM) in CD_3OD (151 MHz).

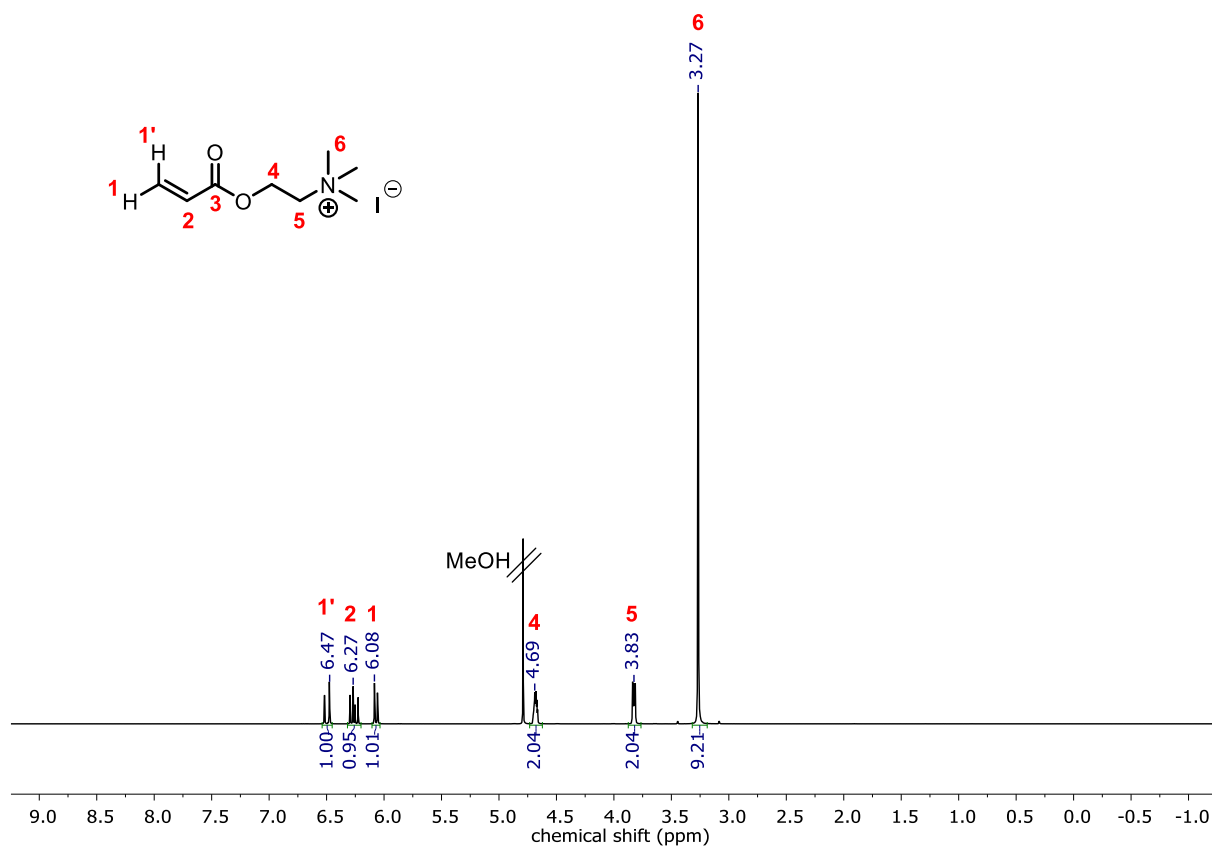


Abbildung A5: ¹H-NMR von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) in D₂O (400 MHz).

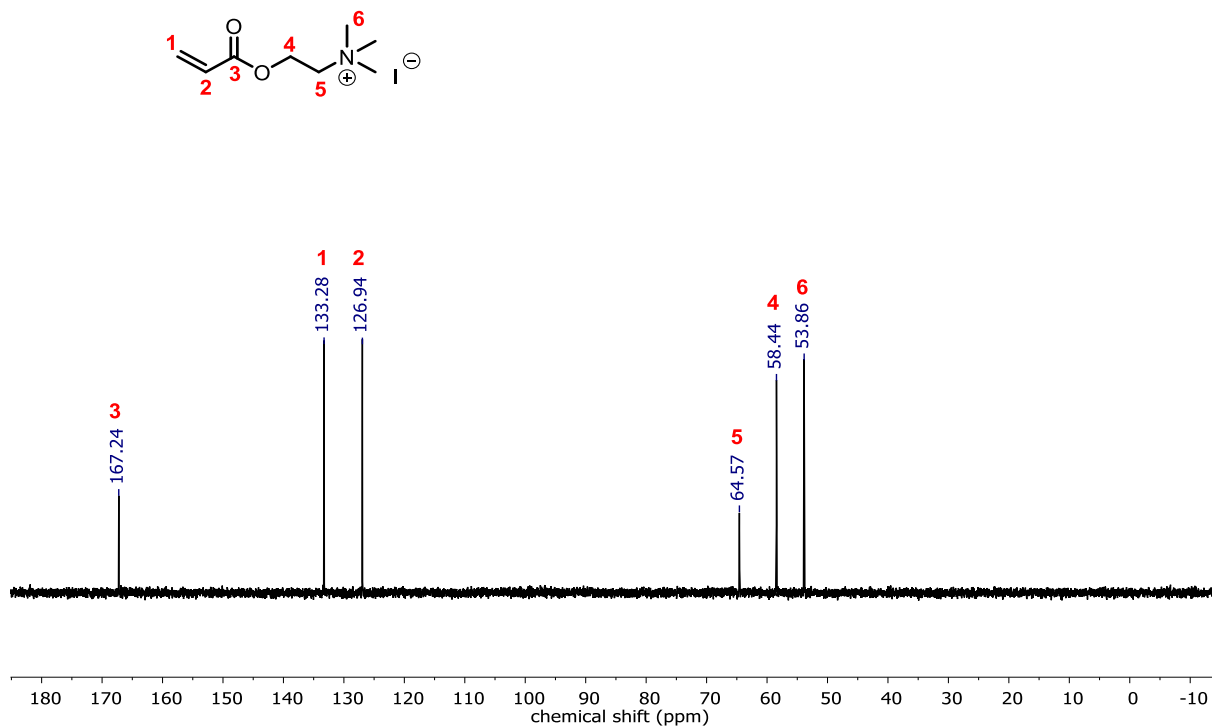


Abbildung A6: ¹³C-NMR von [2-(Acryloyloxy)ethyl]trimethylammoniumiodid (TMAEA) in D₂O (101 MHz).

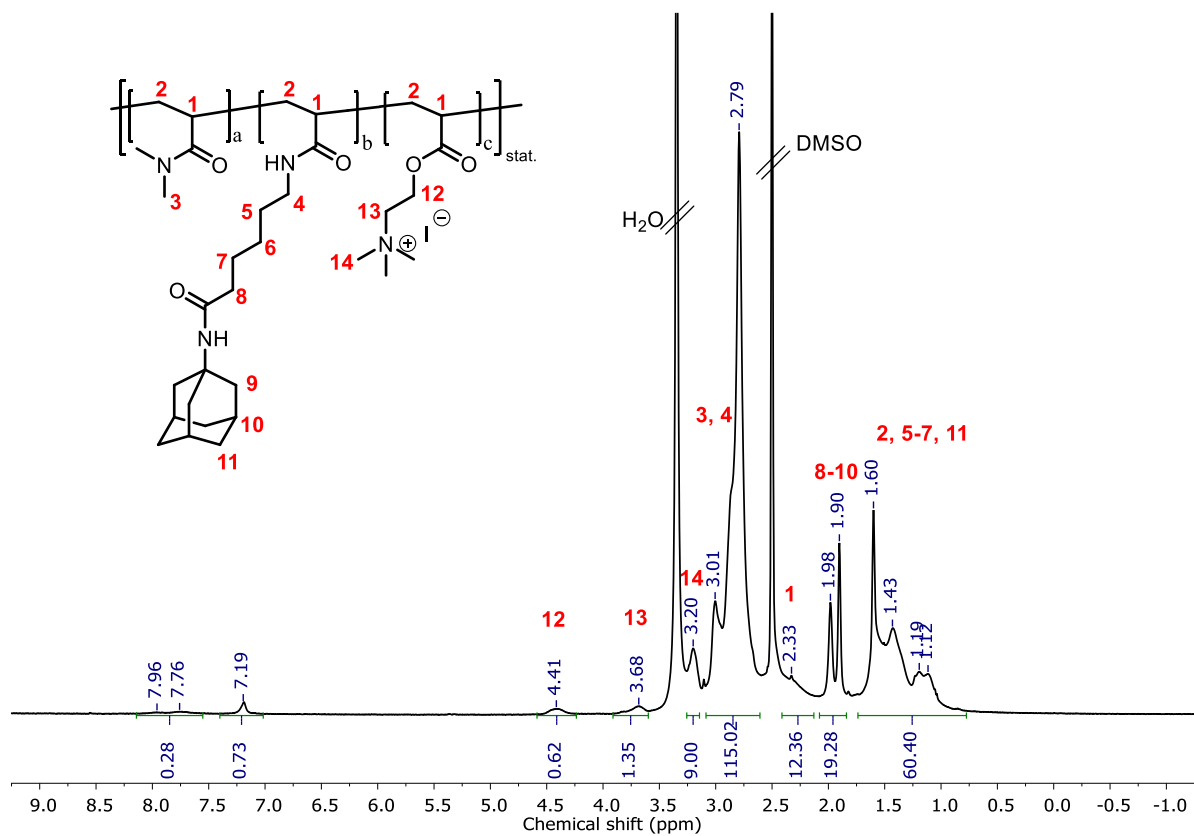


Abbildung A7: $^1\text{H-NMR}$ von P(DMA-co-AdHexAAm-co-TMAEA) PAD3 in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

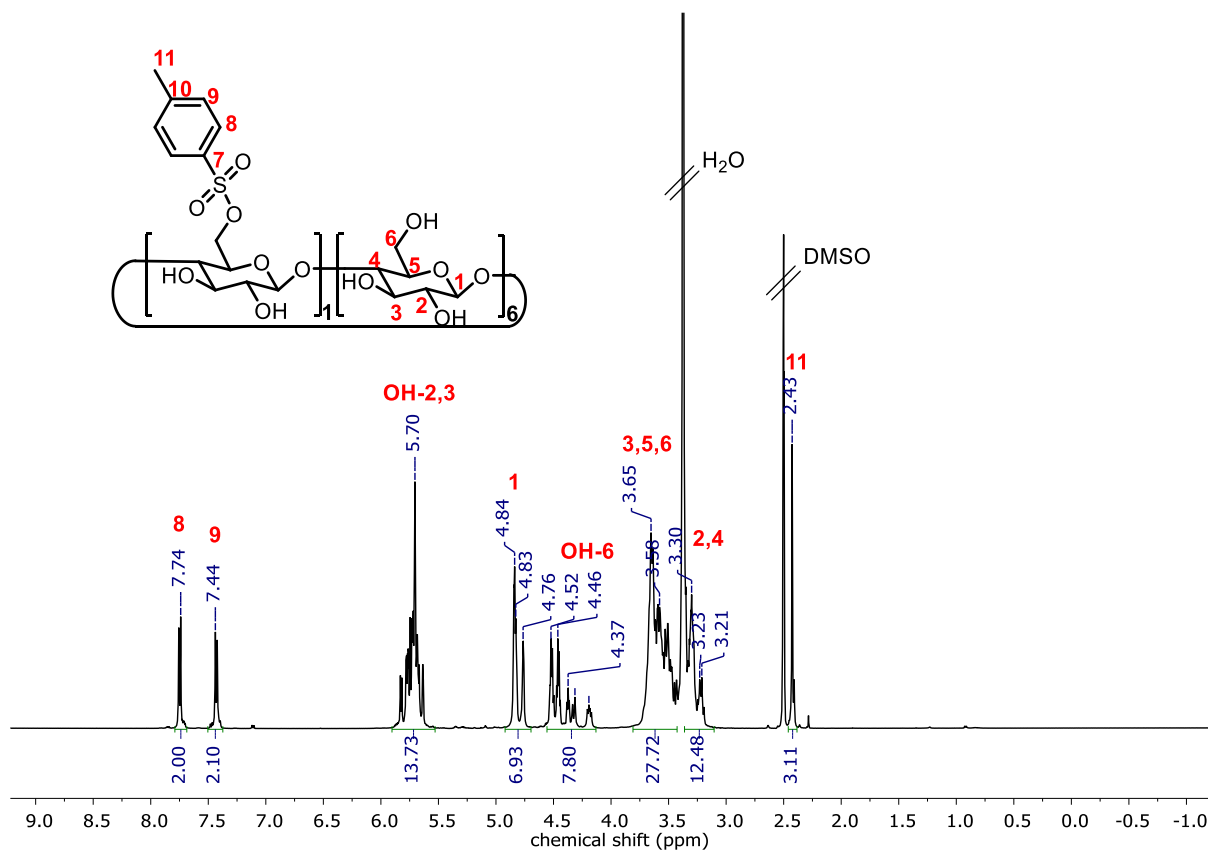


Abbildung A8: $^1\text{H-NMR}$ von 6-O-Monosyl-6-desoxy- β -cyclodextrin (β -CD-OTs) in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

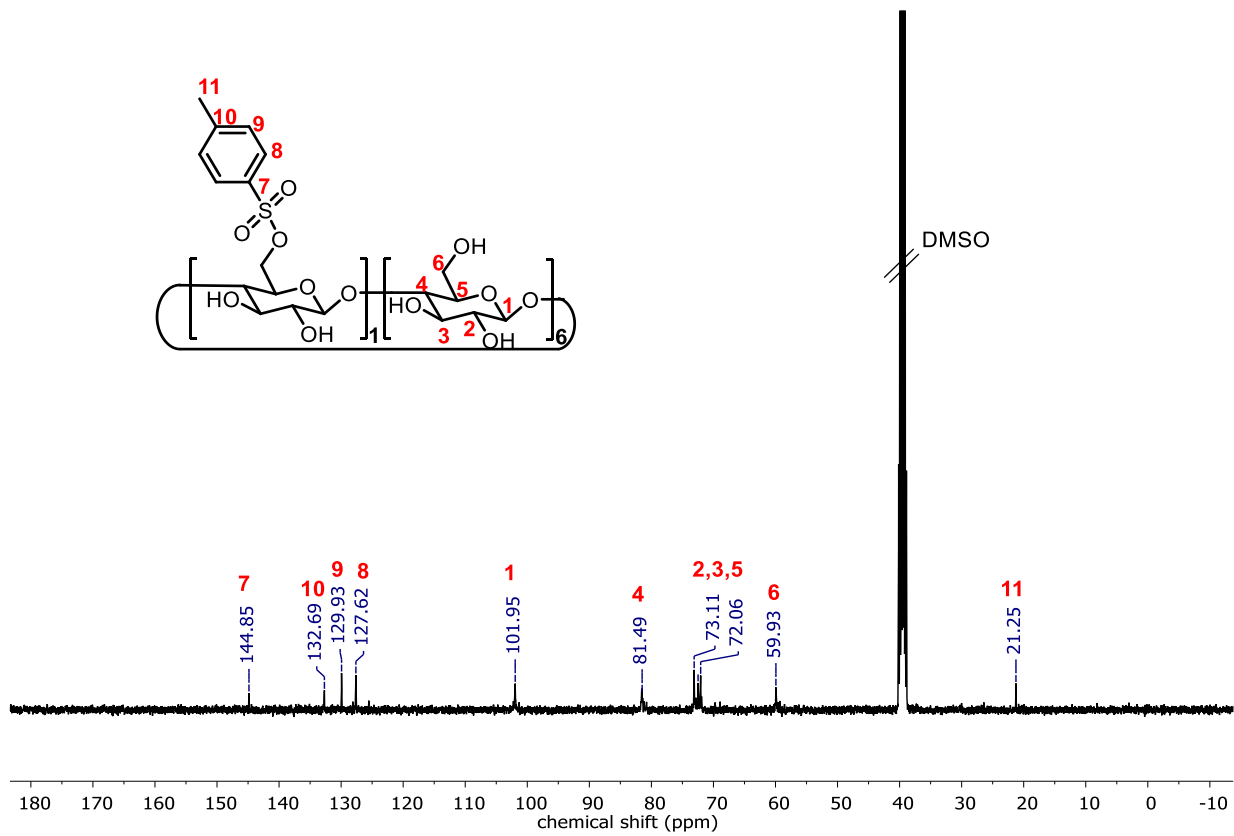


Abbildung A9: ^{13}C -NMR von 6-O-Monosulfol-6-desoxy- β -cyclodextrin (β -CD-OTs) in $\text{DMSO-}d_6$ (101 MHz).

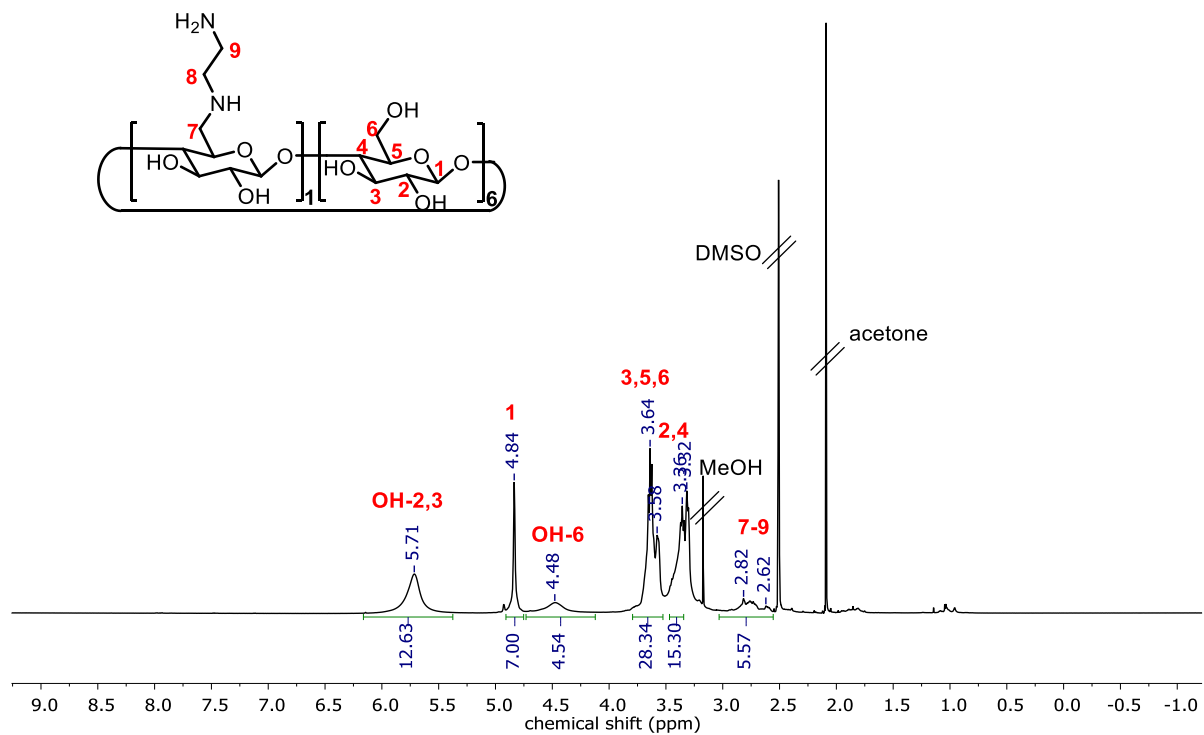


Abbildung A10: ^1H -NMR von Mono-(6-ethandiamin-6-deoxy)- β -cyclodextrin (β -CD-EDA) in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

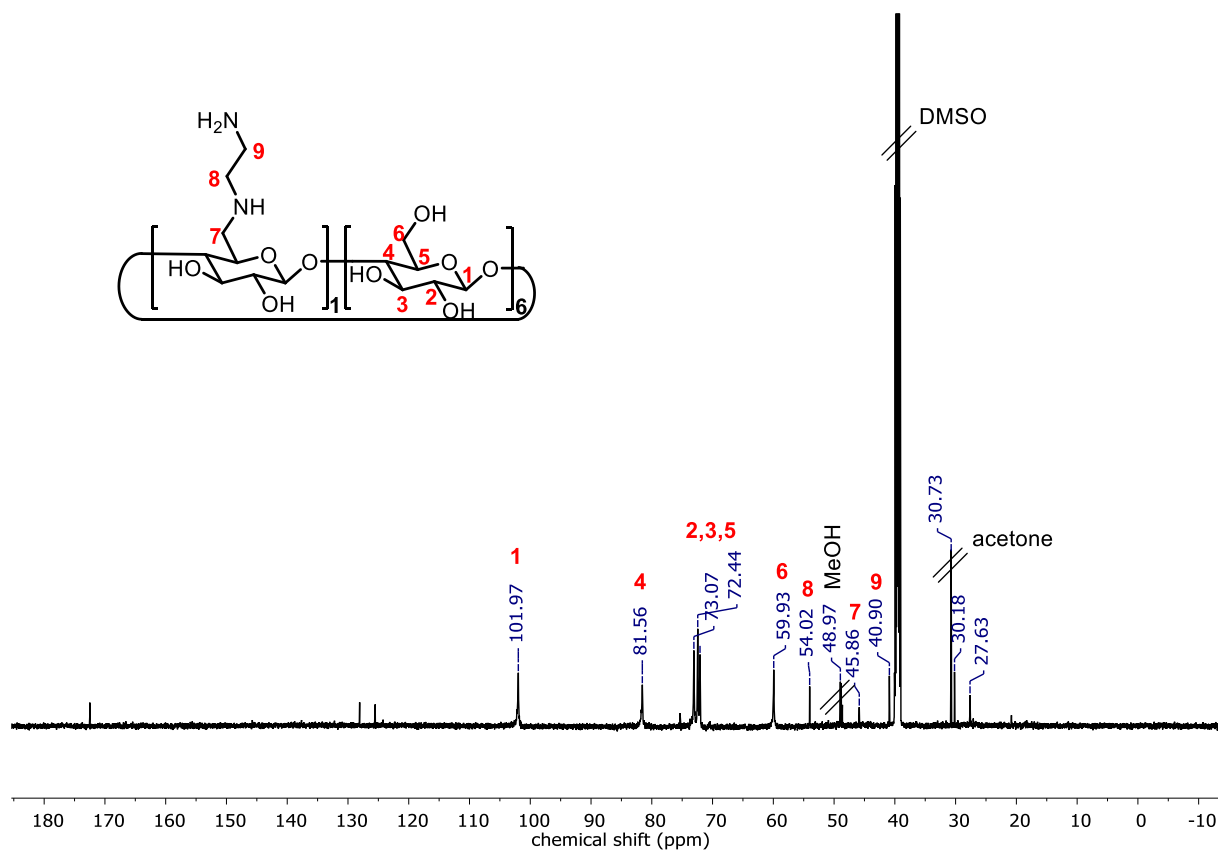


Abbildung A11: ^{13}C -NMR von Mono-(6-ethandiamin-6-deoxy)-β-cyclodextrin (β-CD-EDA) in $\text{DMSO-}d_6$ (151 MHz).

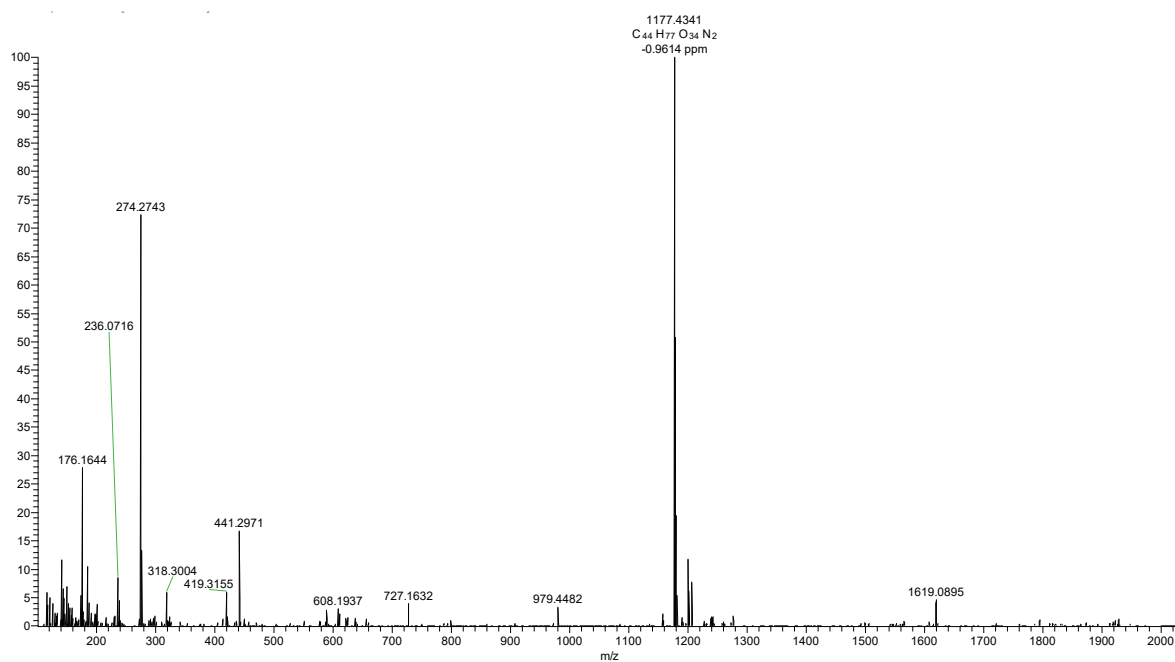


Abbildung A12: Massenspektrum von Mono-(6-ethandiamin-6-deoxy)-β-cyclodextrin (β-CD-EDA).

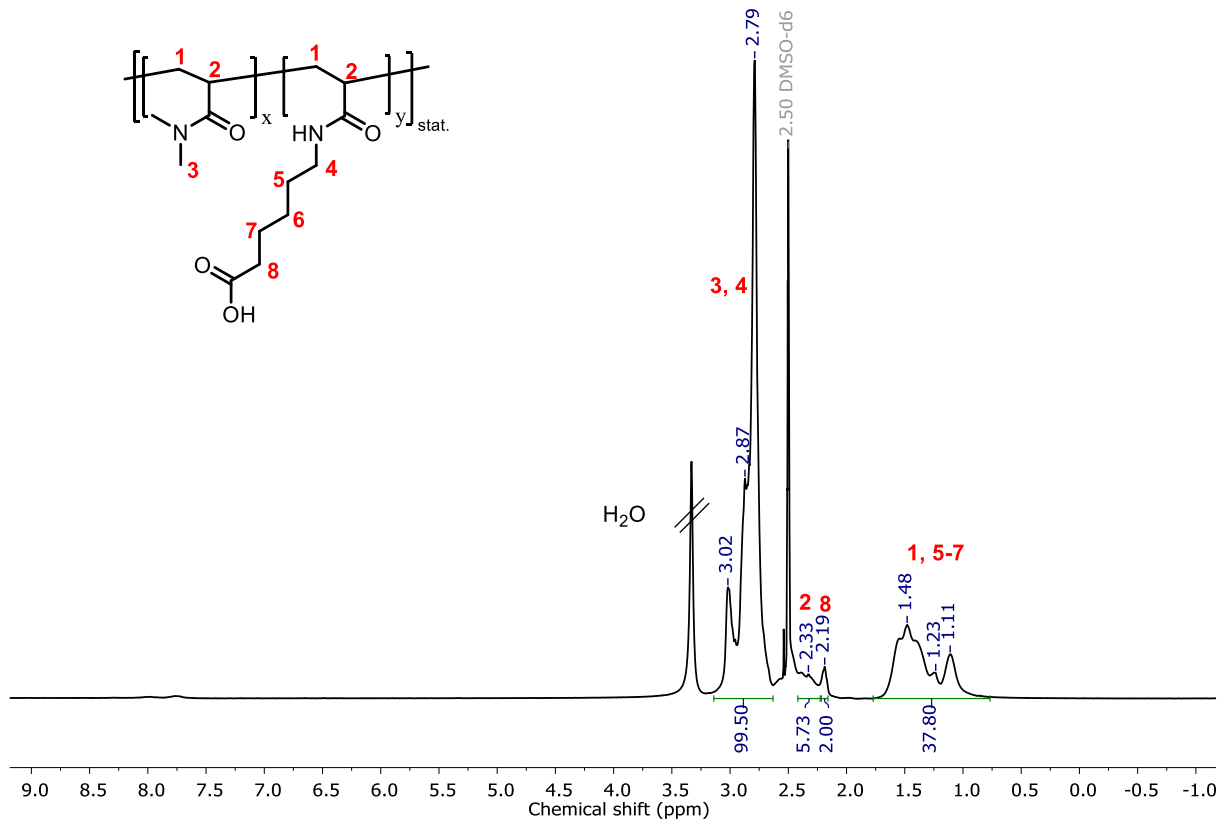


Abbildung A13 ¹H-NMR von P(DMA-co-HexAAm) PPCD1 in DMSO-d₆ (400 MHz).

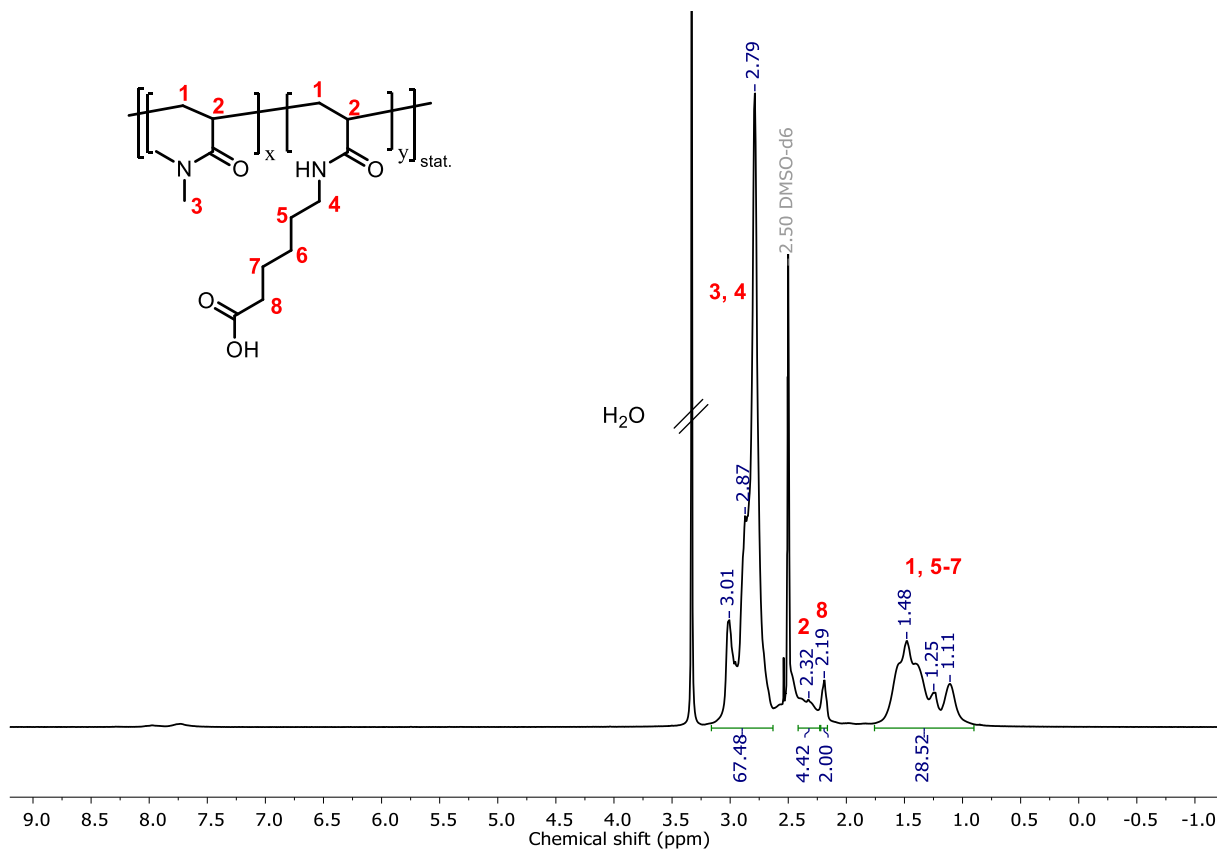


Abbildung A14: ¹H-NMR von P(DMA-co-HexAAm) PPCD2 in DMSO-d₆ (400 MHz).

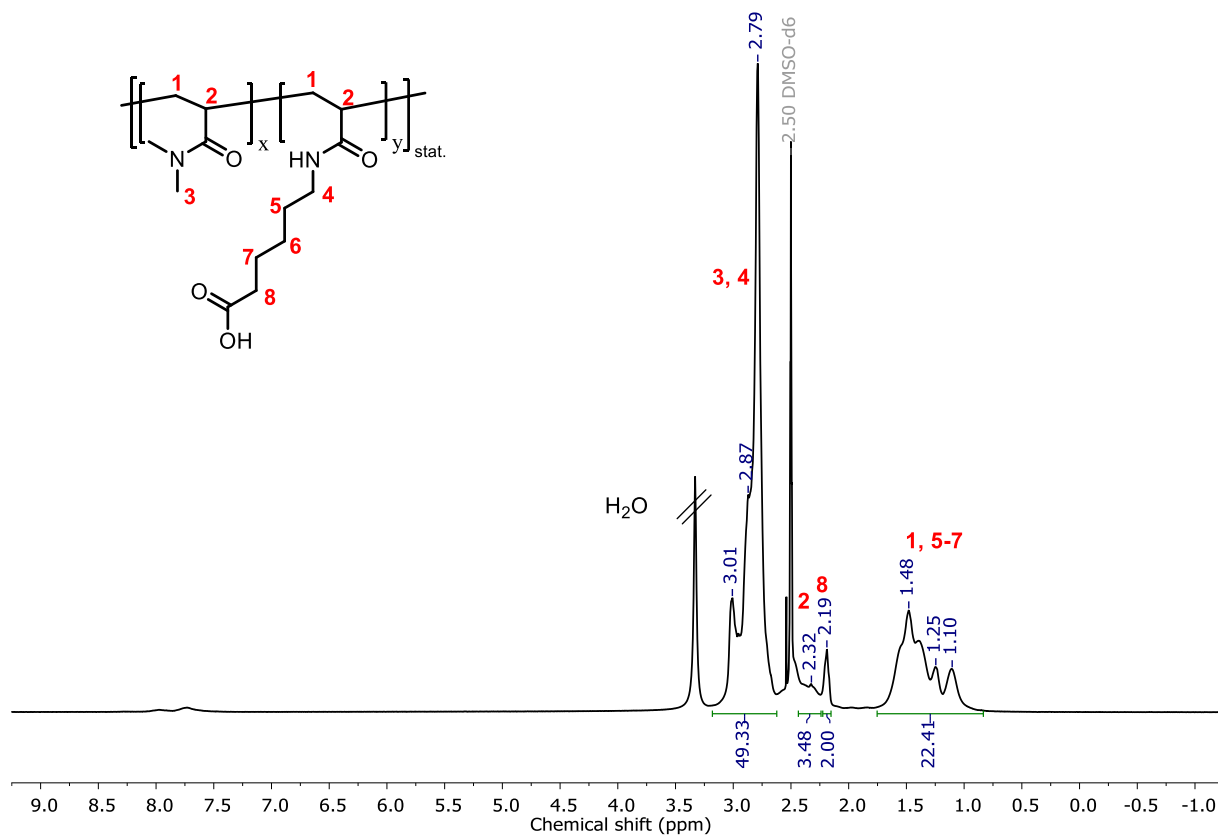


Abbildung A15: $^1\text{H-NMR}$ von P(DMA-*co*-HexAAm) PPCD3 in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

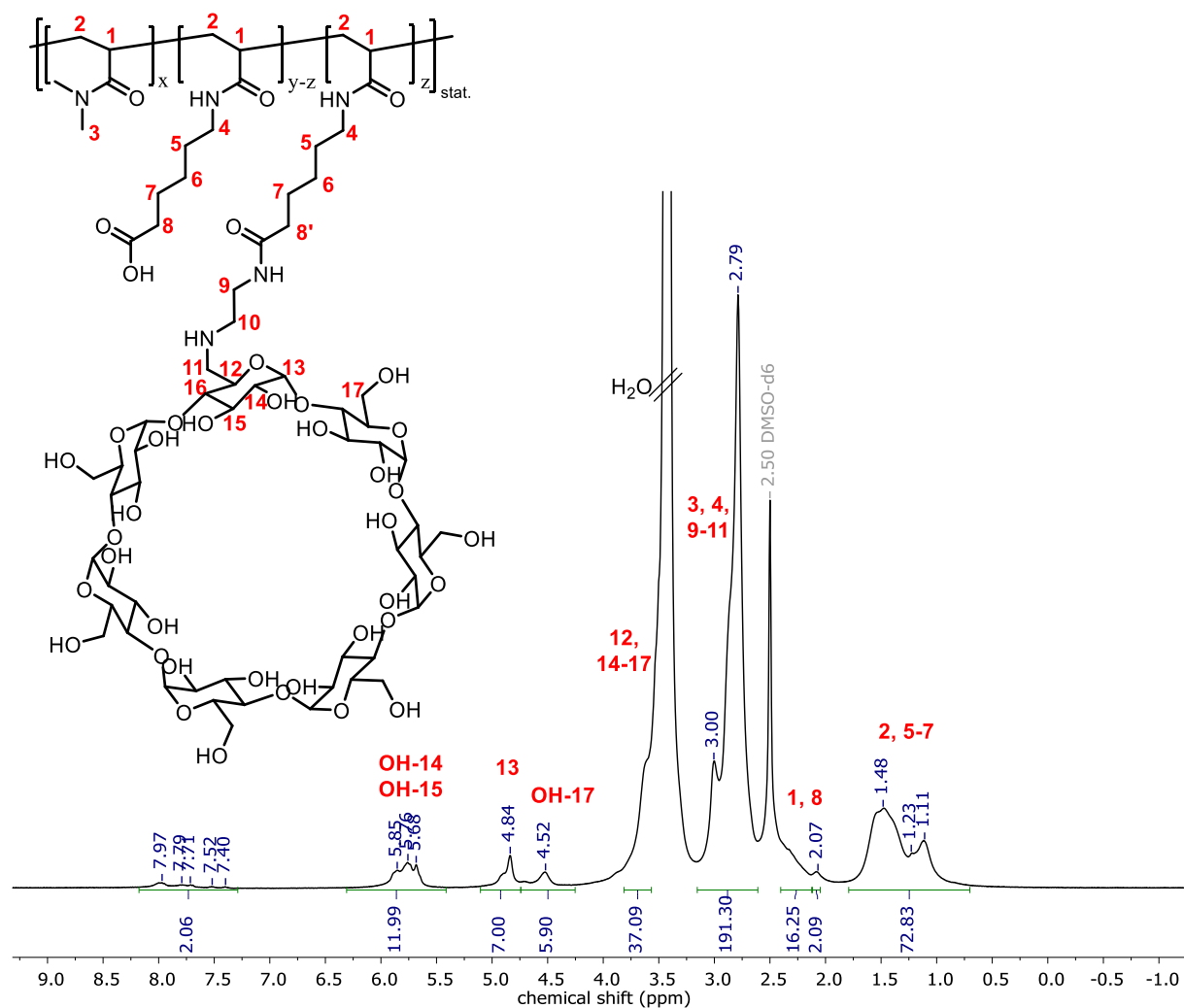


Abbildung A16: ¹H-NMR von P(DMA-co-HexAAm-co-β-CDHexAAm) PCD1 in DMSO-d₆ (400 MHz).

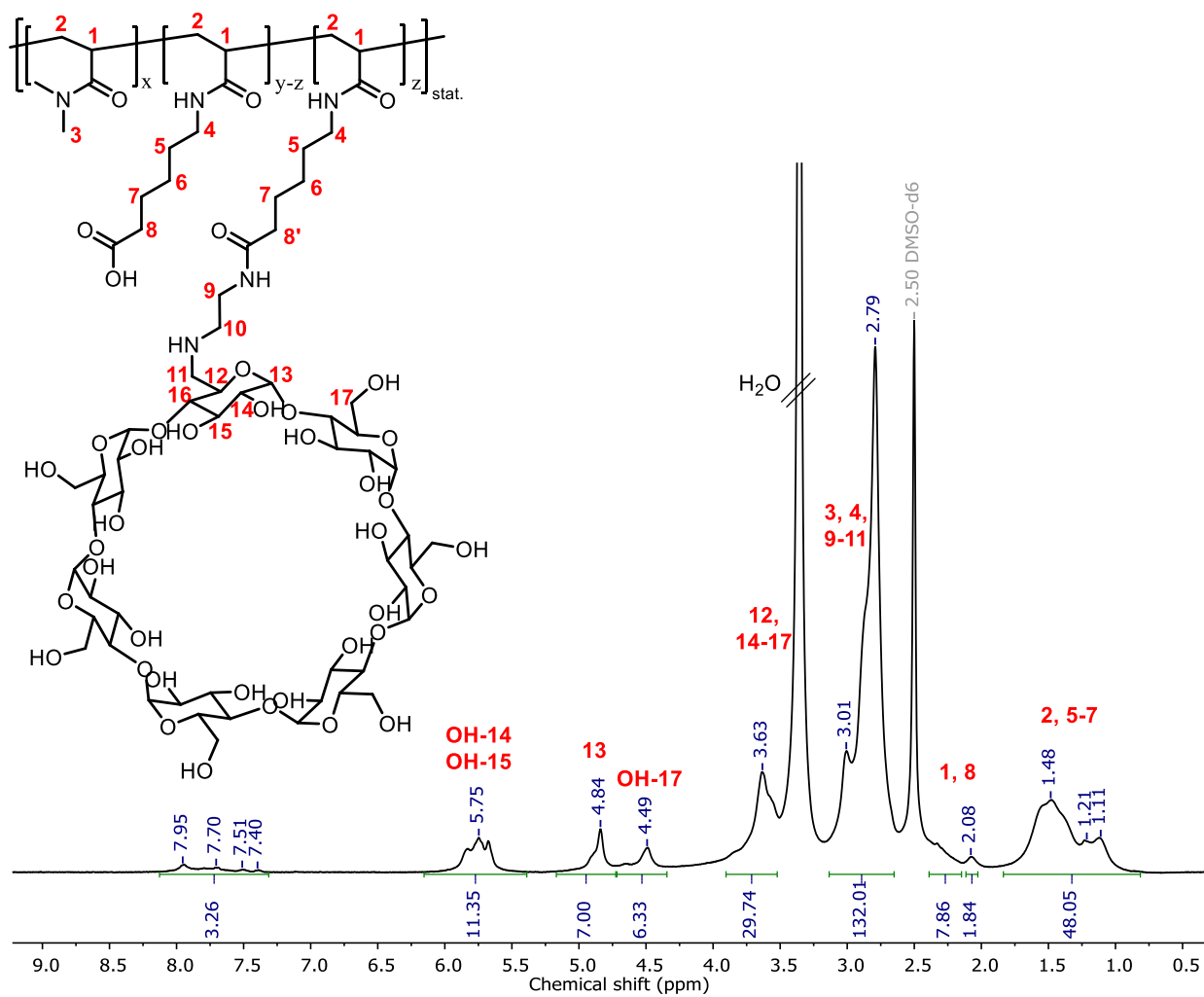


Abbildung A17: $^1\text{H-NMR}$ von P(DMA-co-HexAAm-co- β -CDHexAAm) PCD2 in DMSO- d_6 (400 MHz).

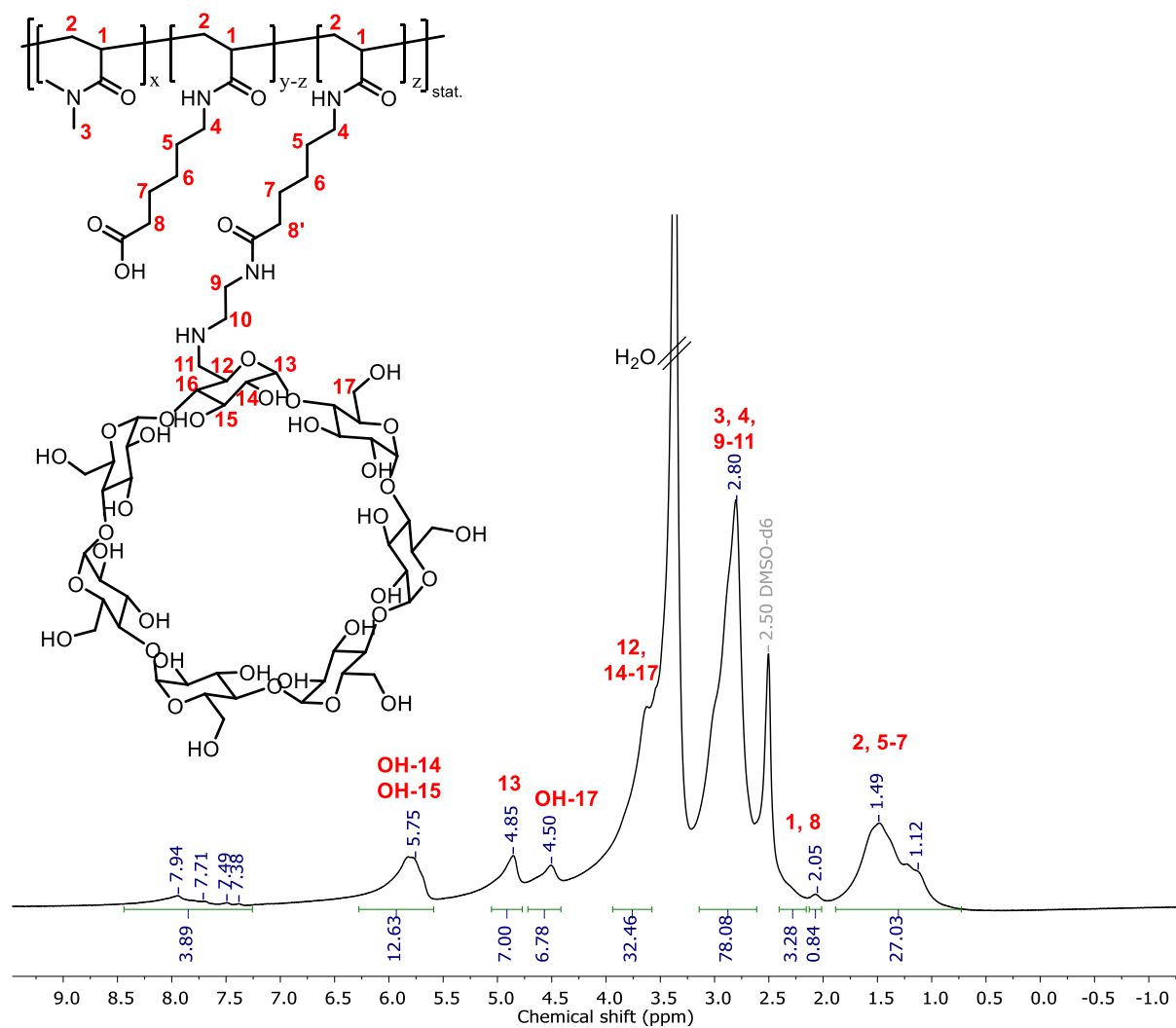


Abbildung A18: ¹H-NMR von P(DMA-co-HexAAm-co-β-CDHexAAm) PCD3 in DMSO-d₆ (600 MHz).

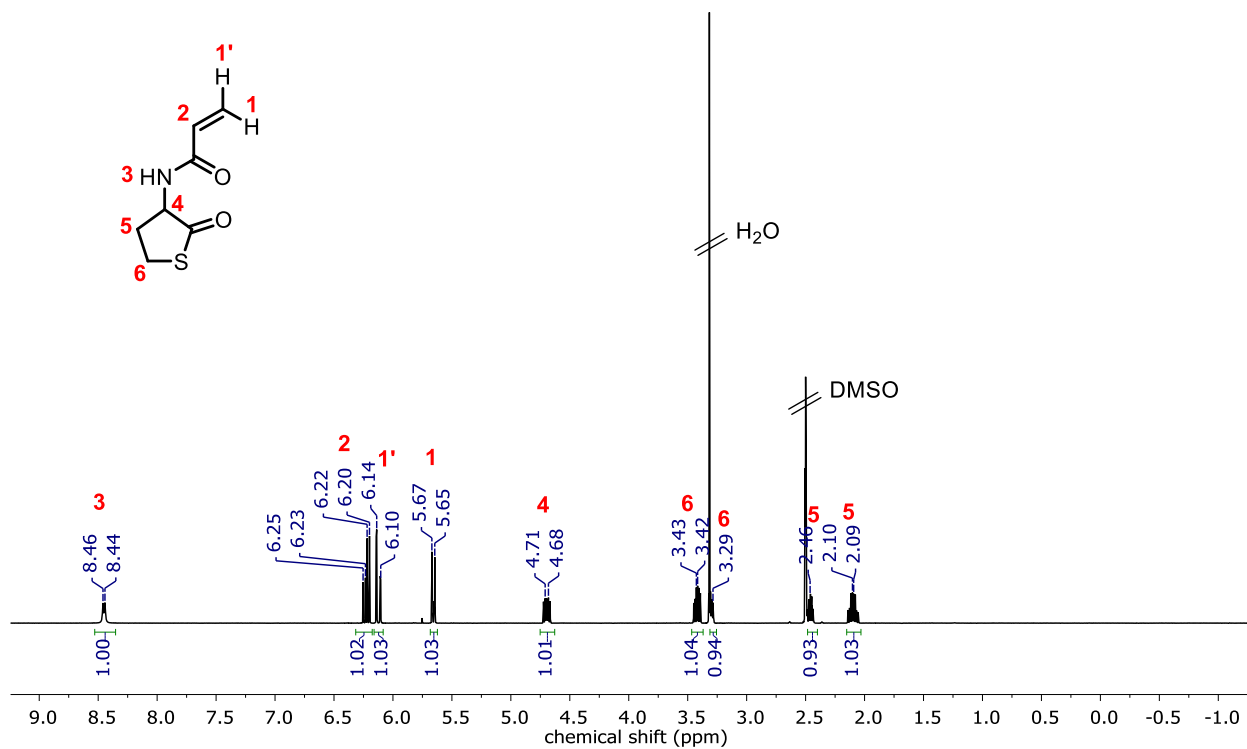


Abbildung A19: $^1\text{H-NMR}$ von *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

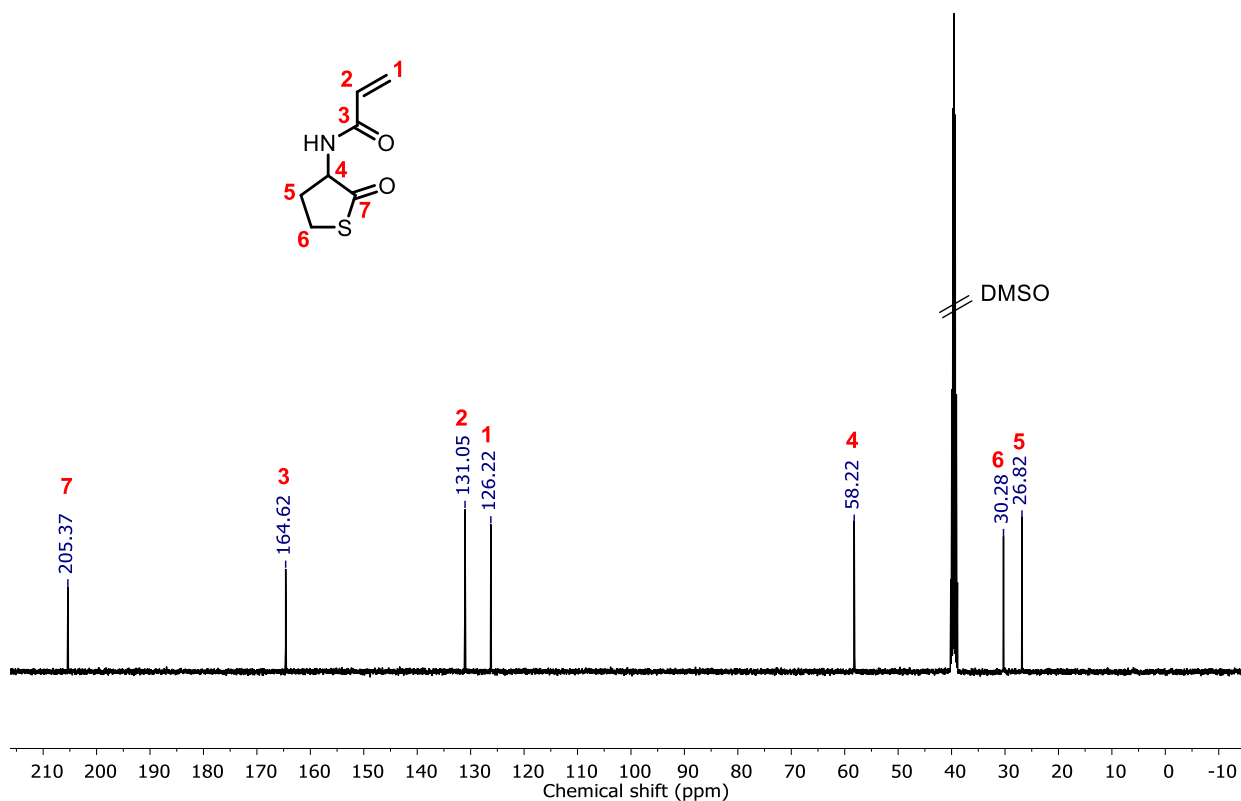


Abbildung A20: $^{13}\text{C-NMR}$ von *N*-Acryloylhomocystein- γ -thiolacton in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

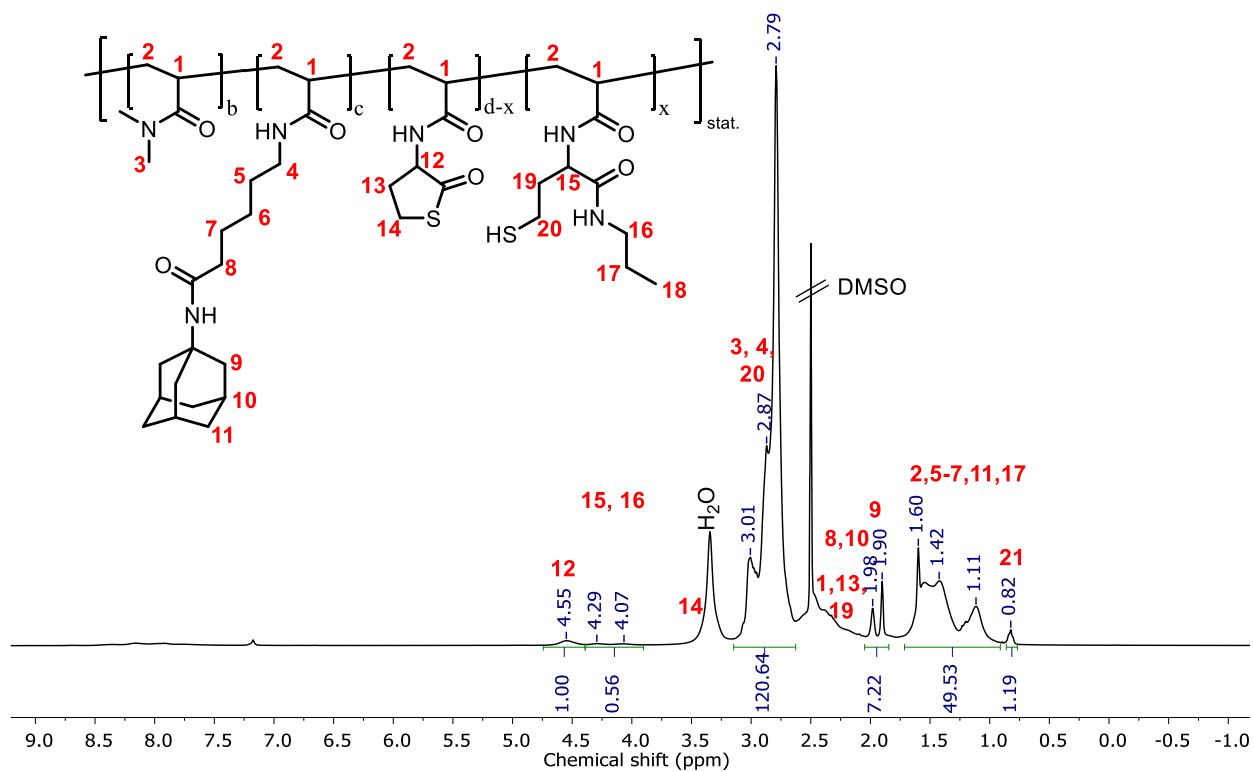


Abbildung A21: $^1\text{H-NMR}$ von $\text{P(DMA-co-AdHexAAm-co-TLaAAm-co-TLaAAmSH) PAd}_{n\text{SH}2}$ in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

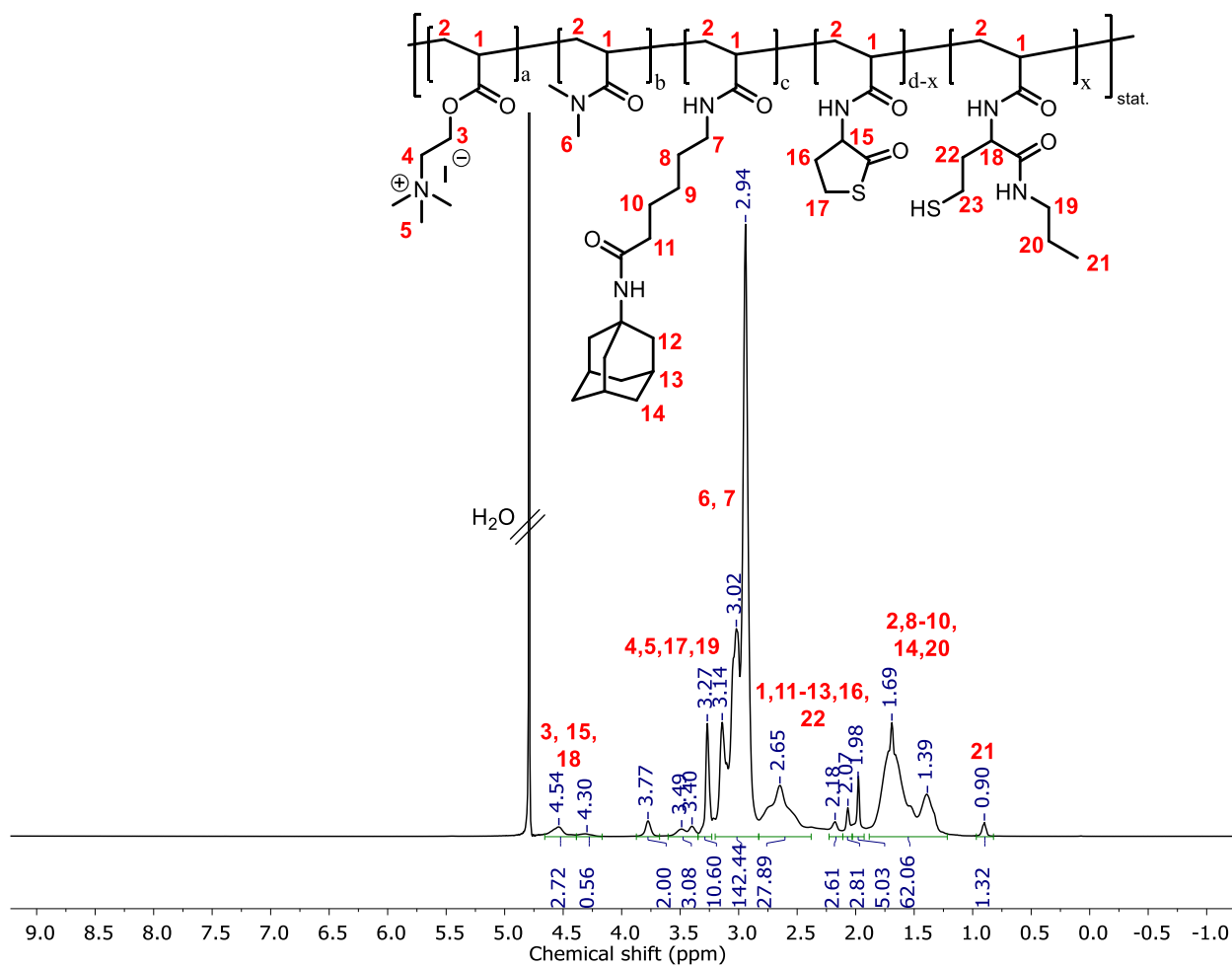


Abbildung A22: $^1\text{H-NMR}$ von $\text{P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAM-co-TLaAAM-co-TLaAAMSH)}$
PA_{katSH}2 in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

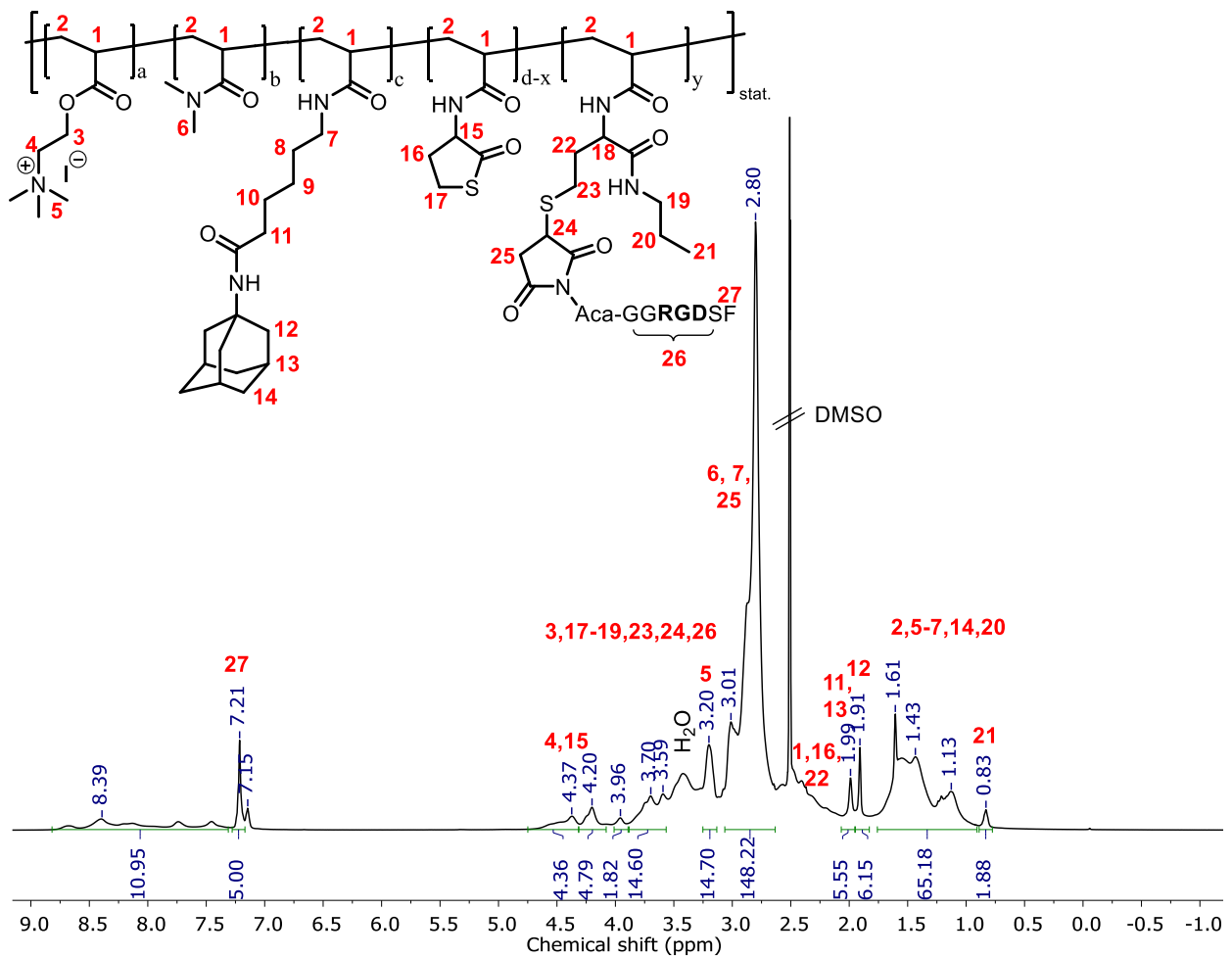


Abbildung A23: $^1\text{H-NMR}$ von $\text{P}(\text{TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAm-co-TLaAAm-co-TLaAAmRGD}) \text{PAd}_{\text{katRGD}2}$ in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

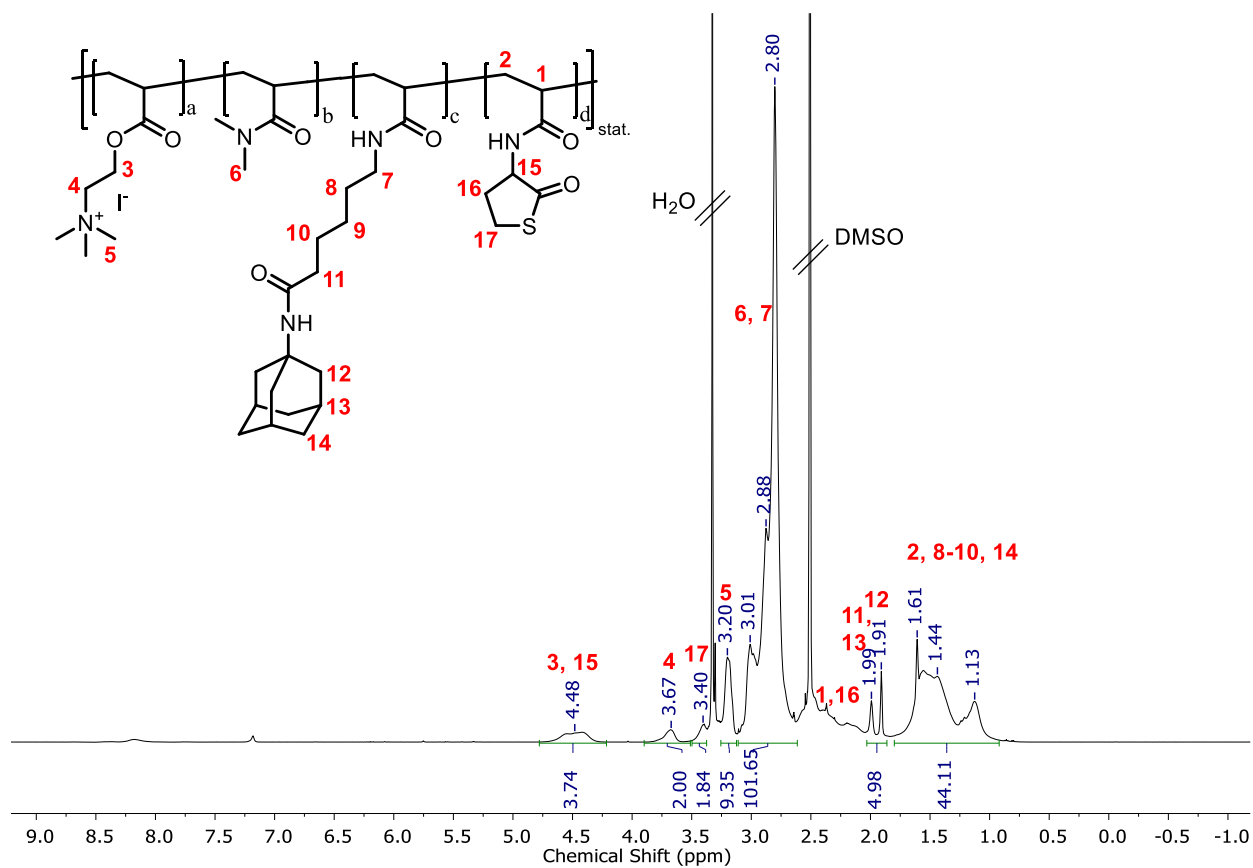


Abbildung A24: $^1\text{H-NMR}$ von $\text{P(TMAEA-co-DMA-co-AdHexAAM-co-TLaAAM)}$ $\text{PAD}_{\text{kat}2}$ in $\text{DMSO-}d_6$ (500 MHz).

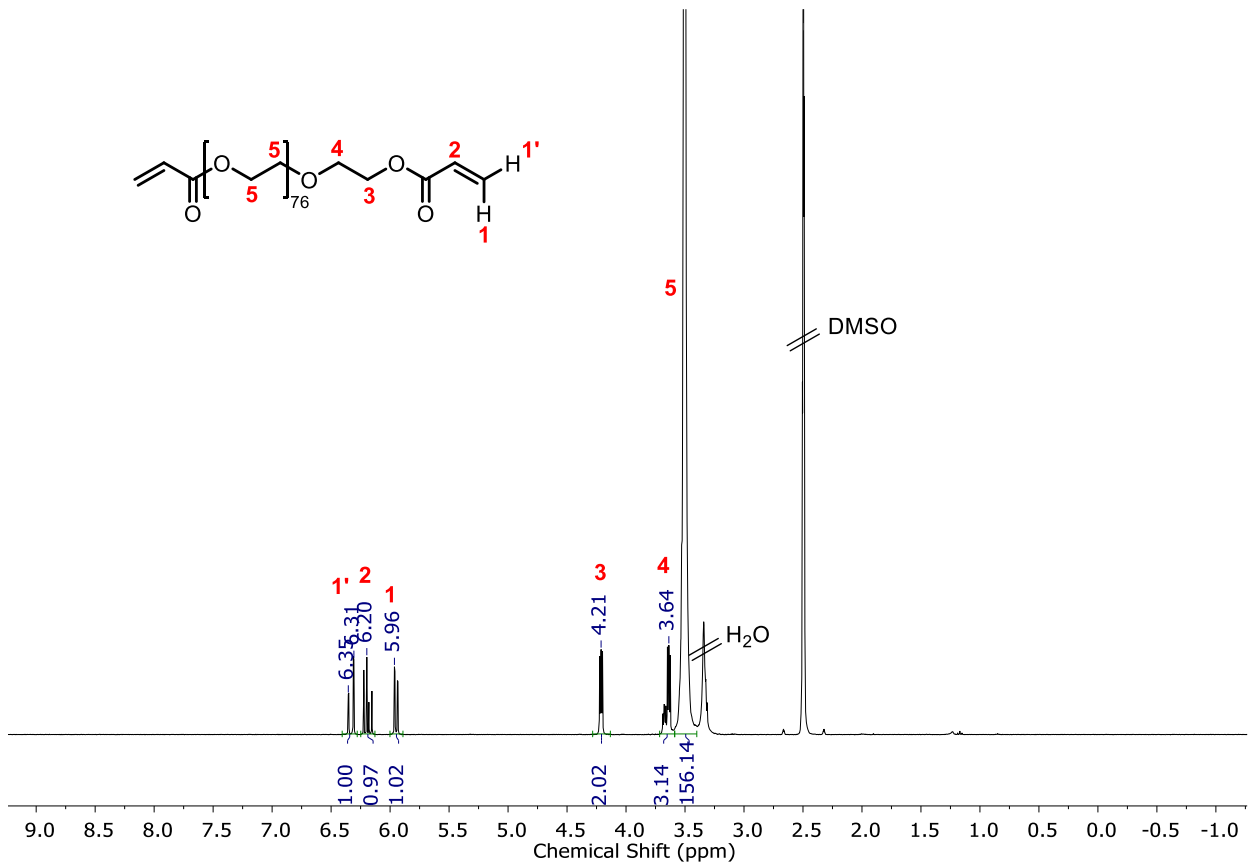


Abbildung A25: $^1\text{H-NMR}$ von PEGDA in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz).

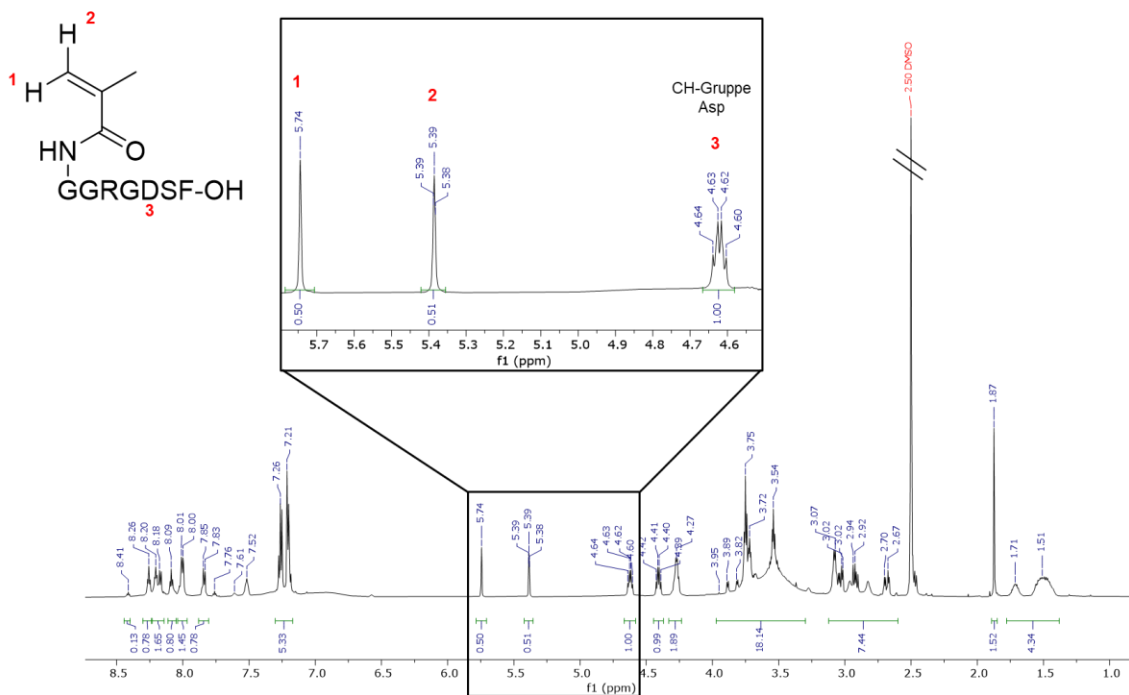


Abbildung A26: $^1\text{H-NMR}$ von Methacrylamid-GGRGDSF (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

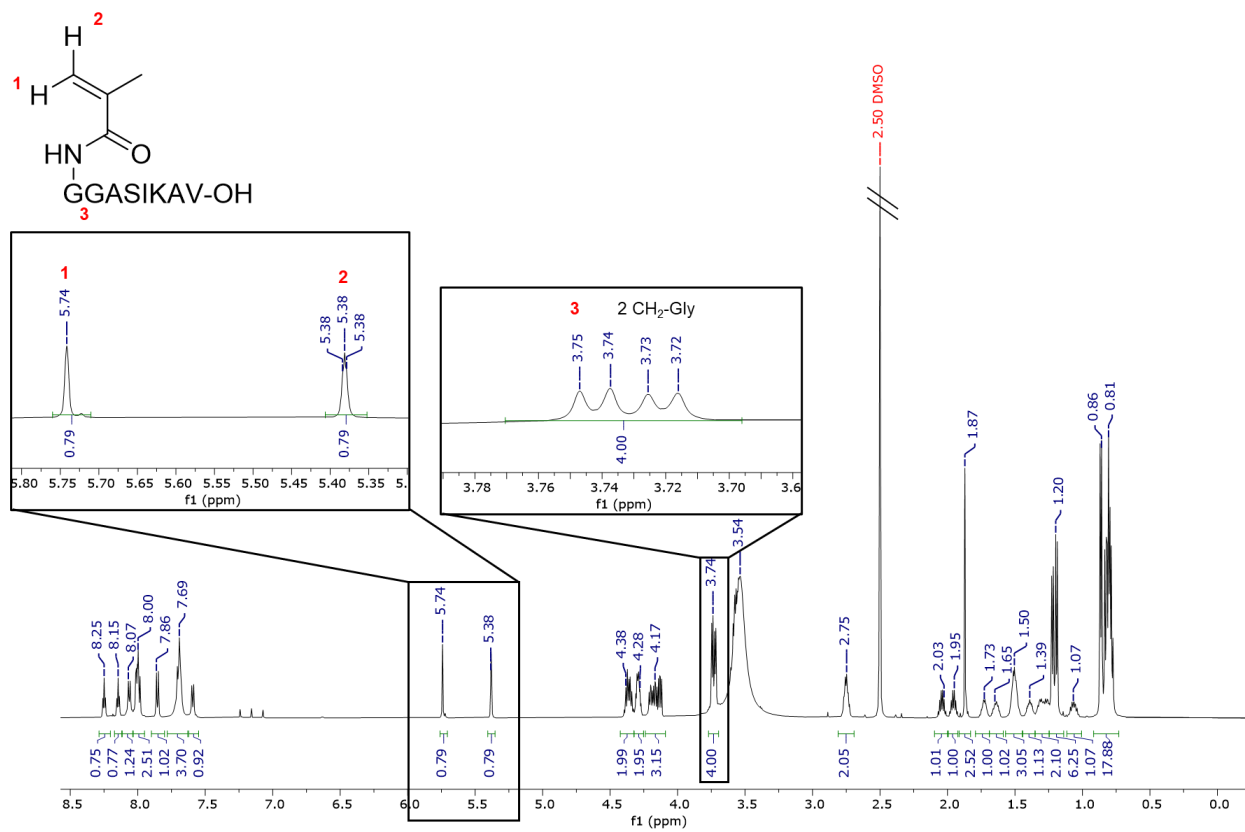


Abbildung A27: ¹H-NMR von Methacrylamid-GGASIKVAV (600 MHz, DMSO-*d*₆).

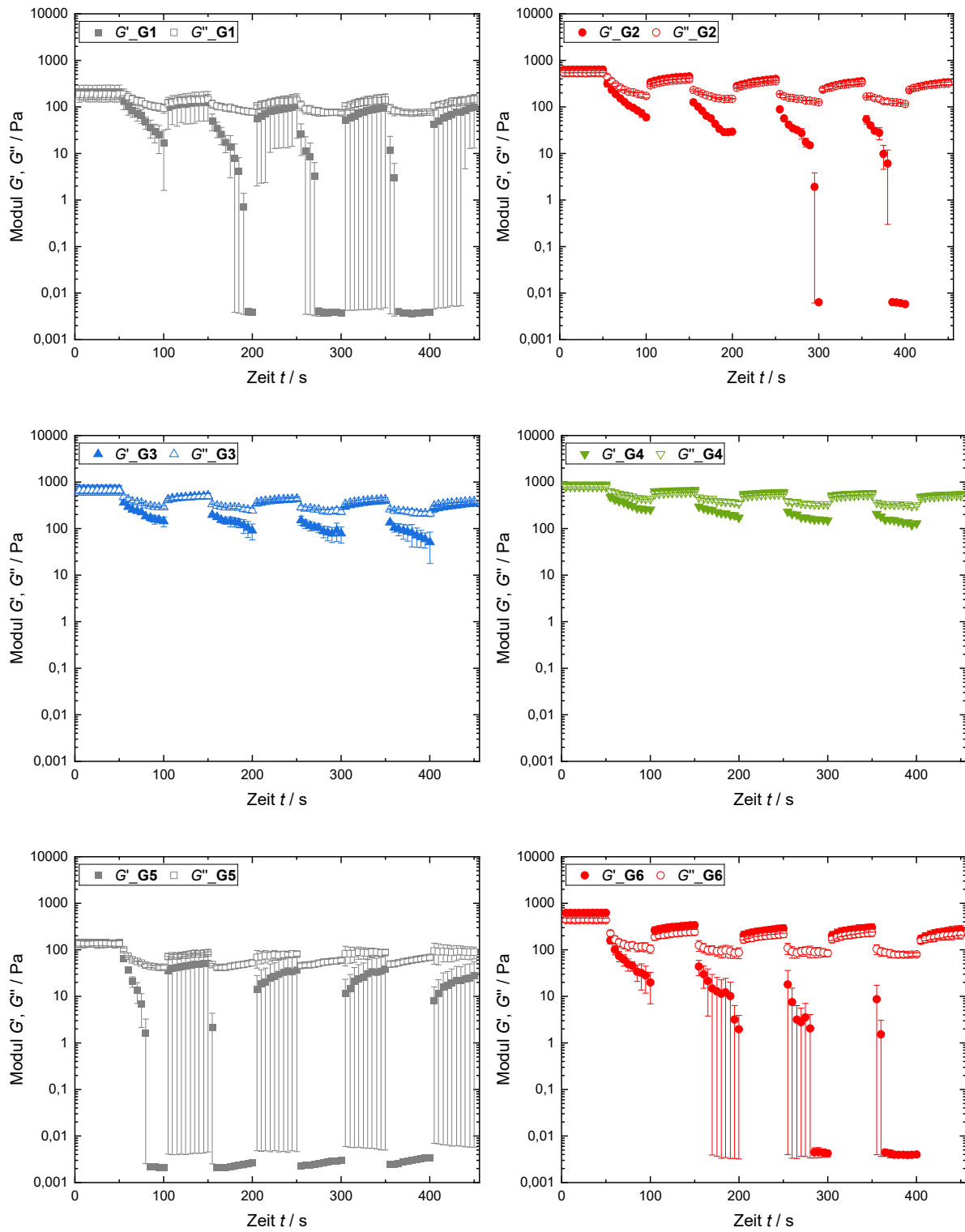


Abbildung A28: Selbstheilungstests von G1-G6 gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

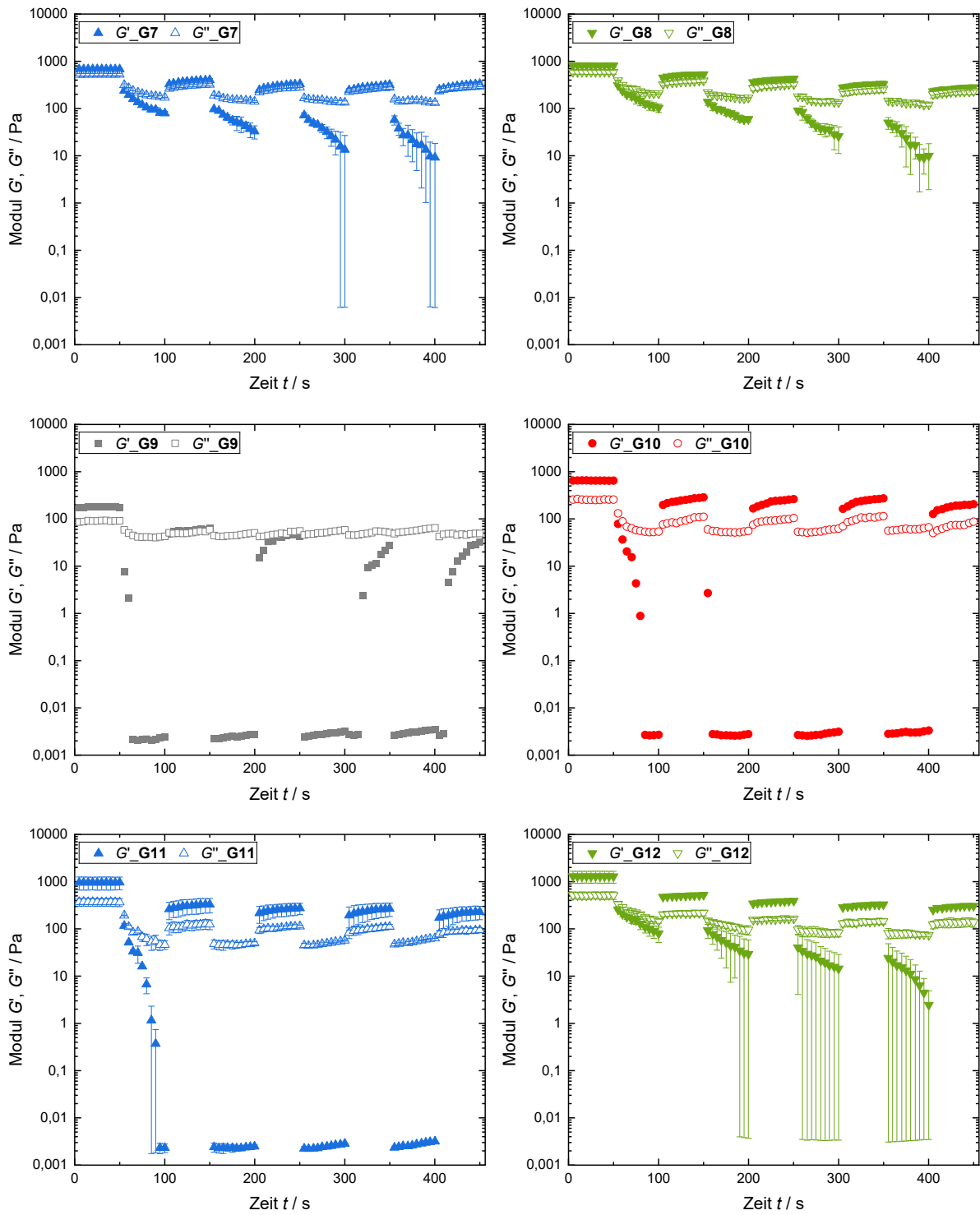


Abbildung A29: Selbstheilungstests von G7-G12 gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation und einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

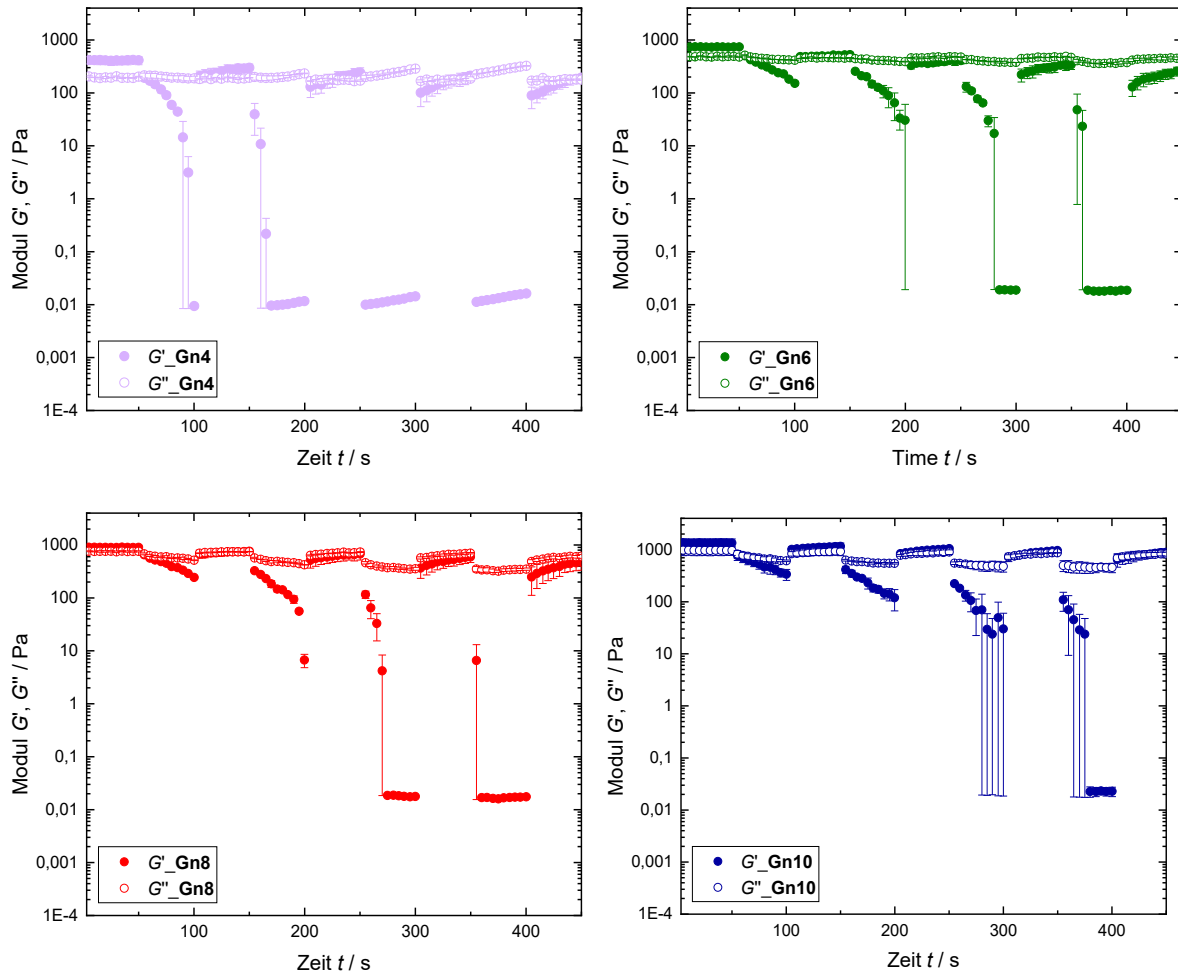


Abbildung A30: Selbstheilungstests von **Gn4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

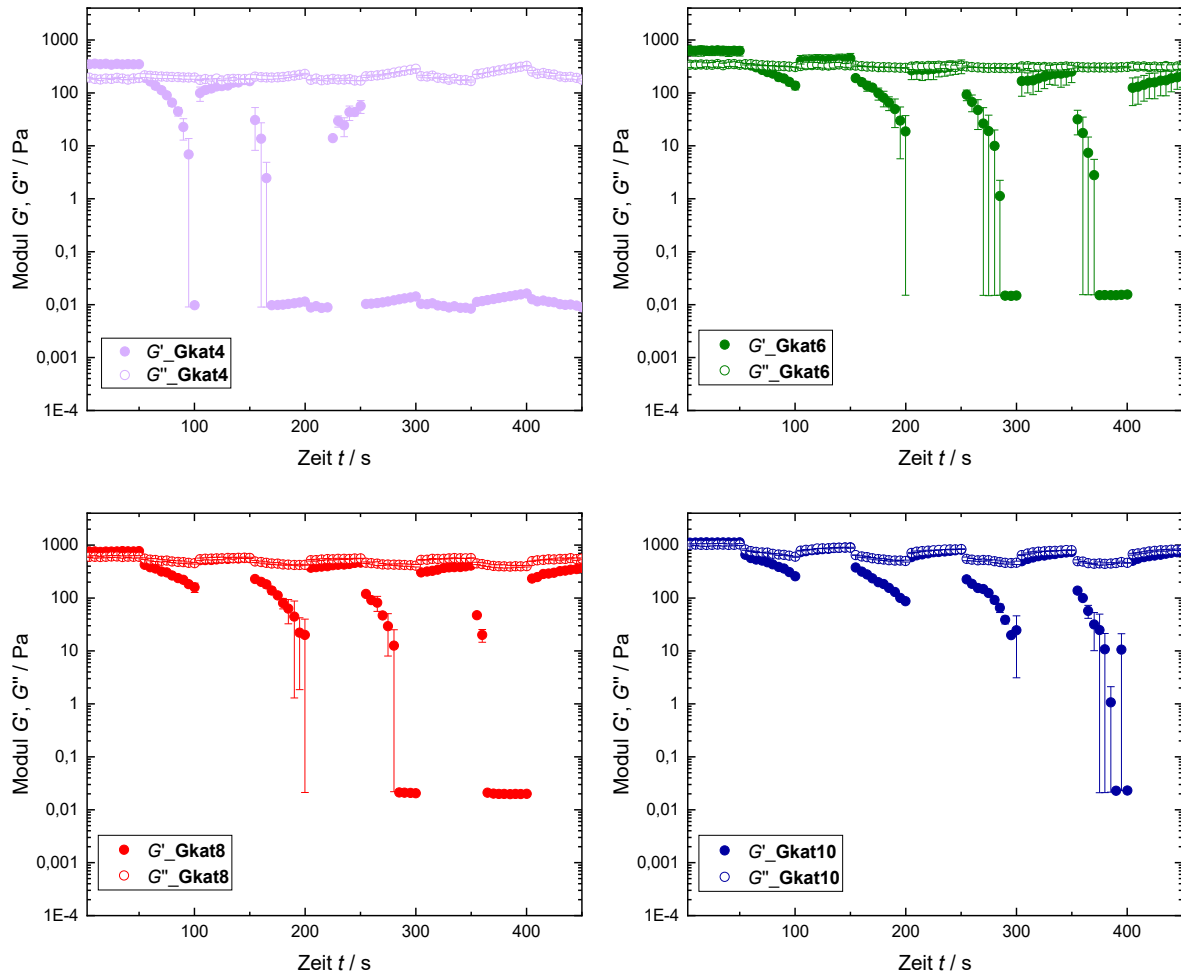


Abbildung A31: Selbstheilungstests von **Gkat4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

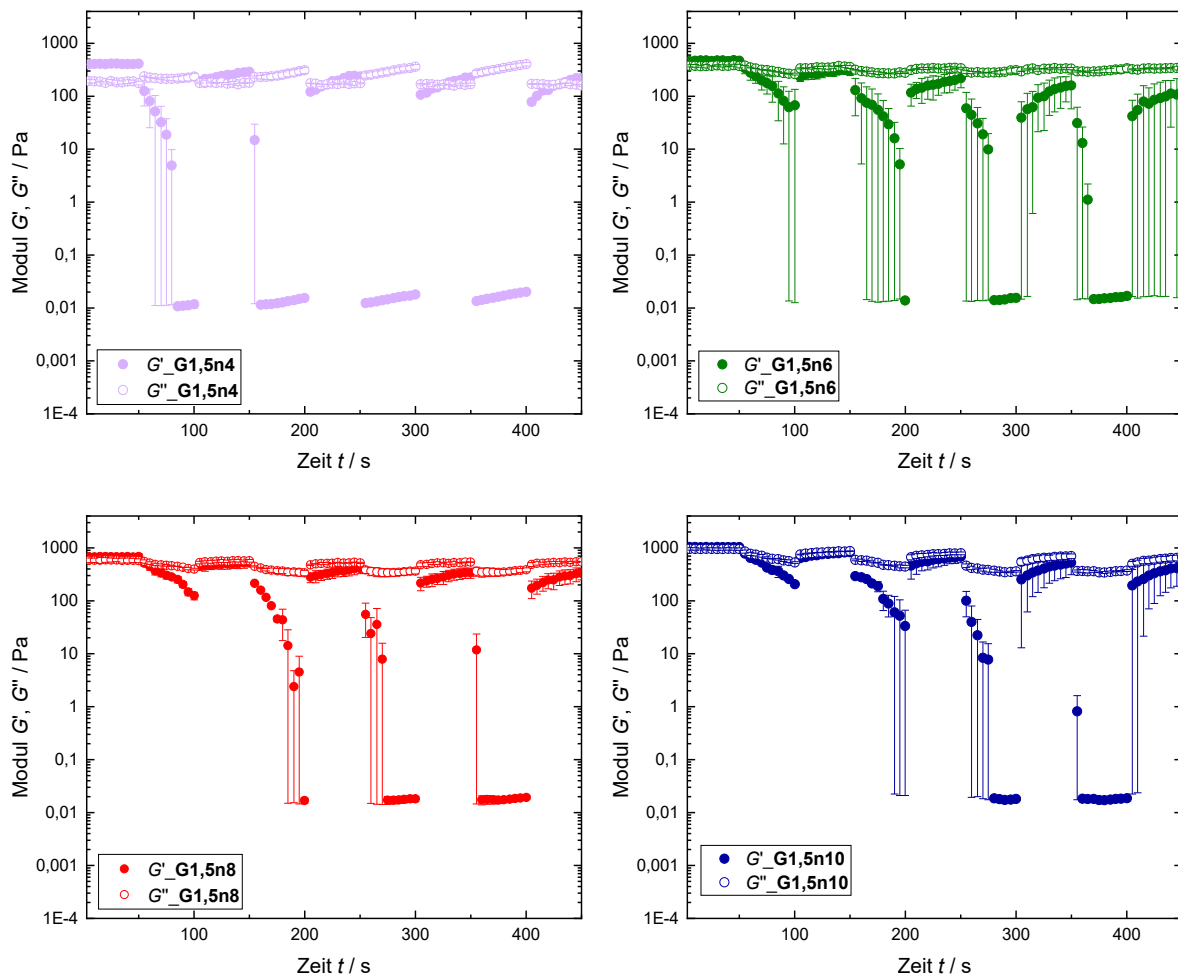


Abbildung 32: Selbstheilungstests von **G1,5n4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

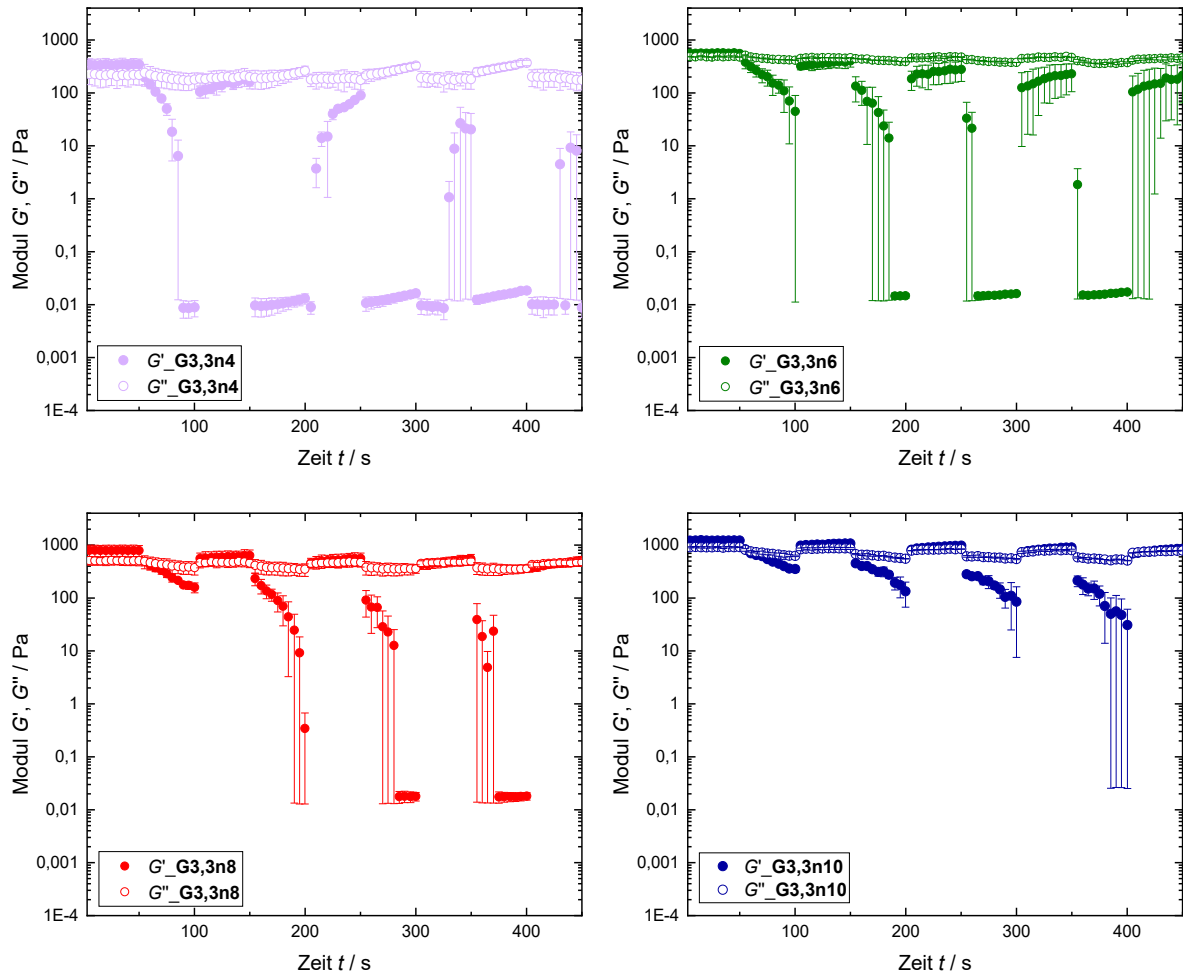


Abbildung A33: Selbstheilungstests von **G3,3n4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

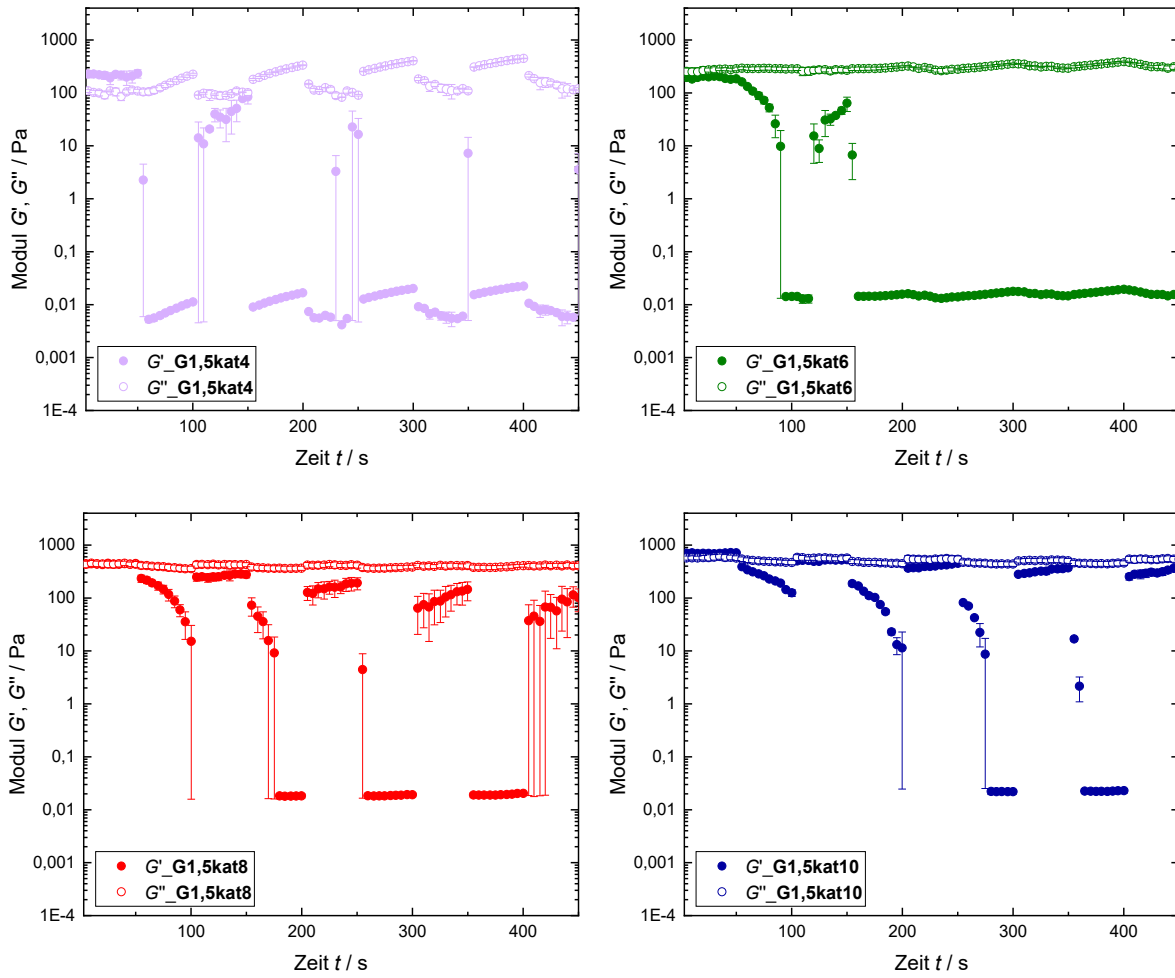


Abbildung A34: Selbstheilungstests von **G1,5kat4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

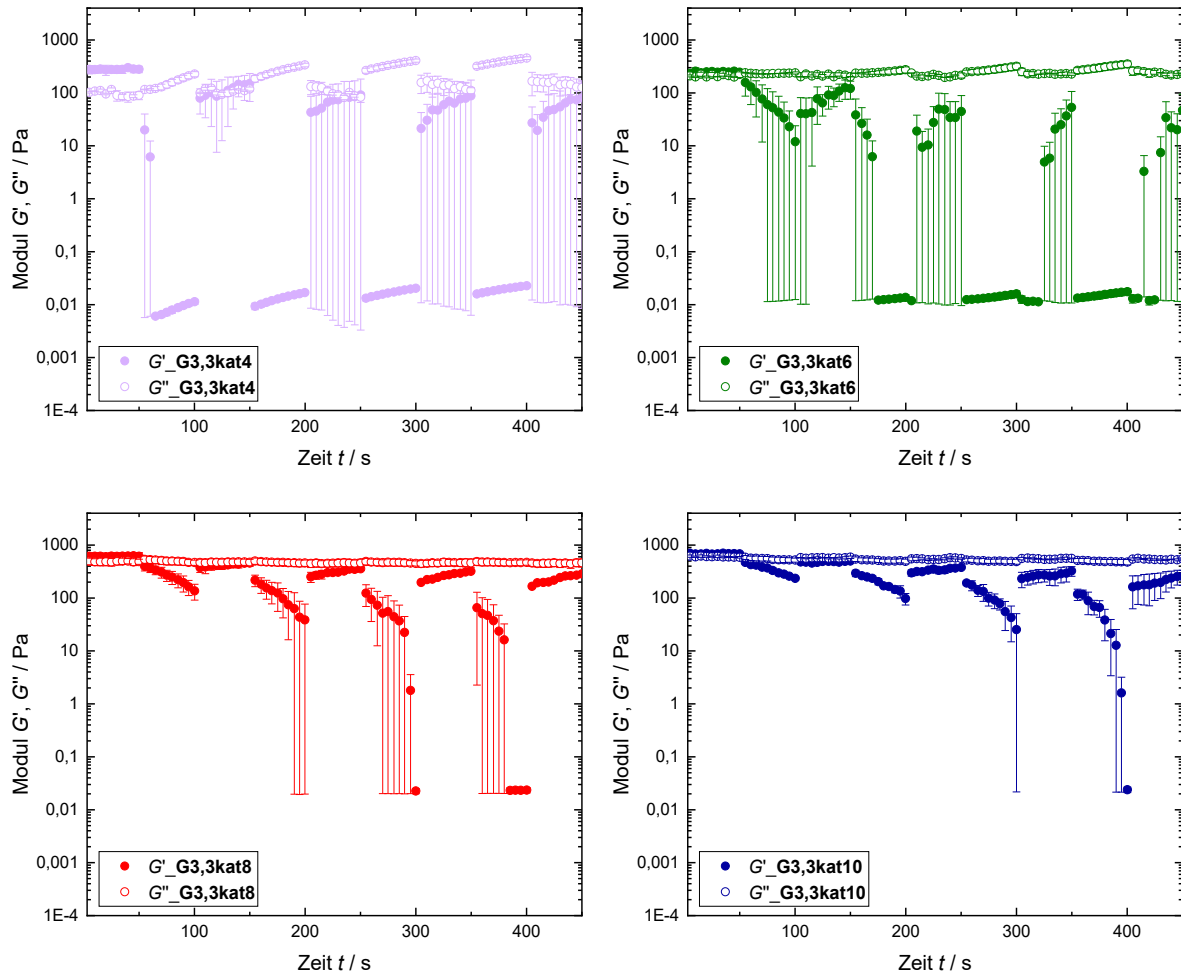


Abbildung A35: Selbstheilungstests von **G3,3kat4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 10 Hz und 25 °C.

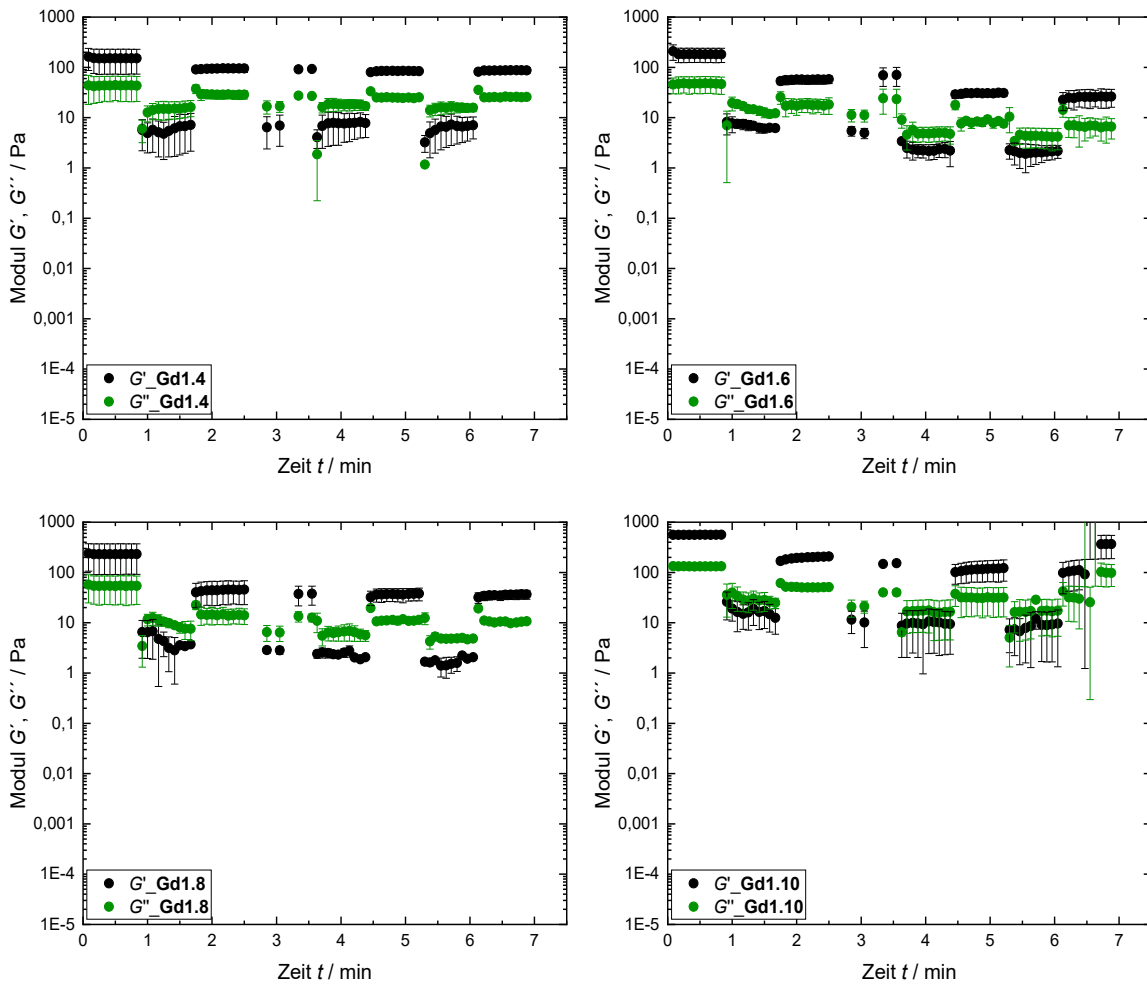


Abbildung A36: Selbstheilungstests von **Gd1.4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 25 °C.

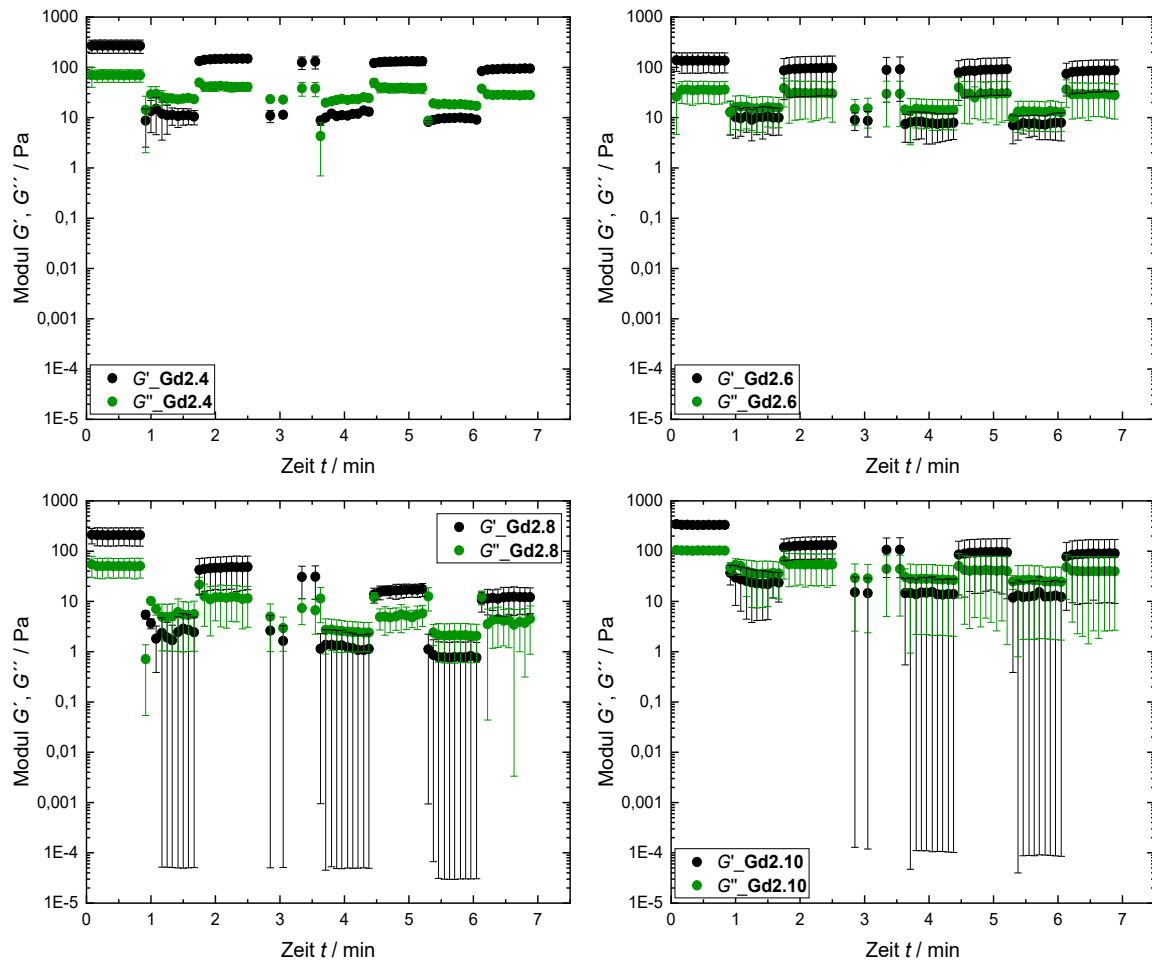


Abbildung A37: Selbstheilungstests von **Gd2.4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 25 °C.

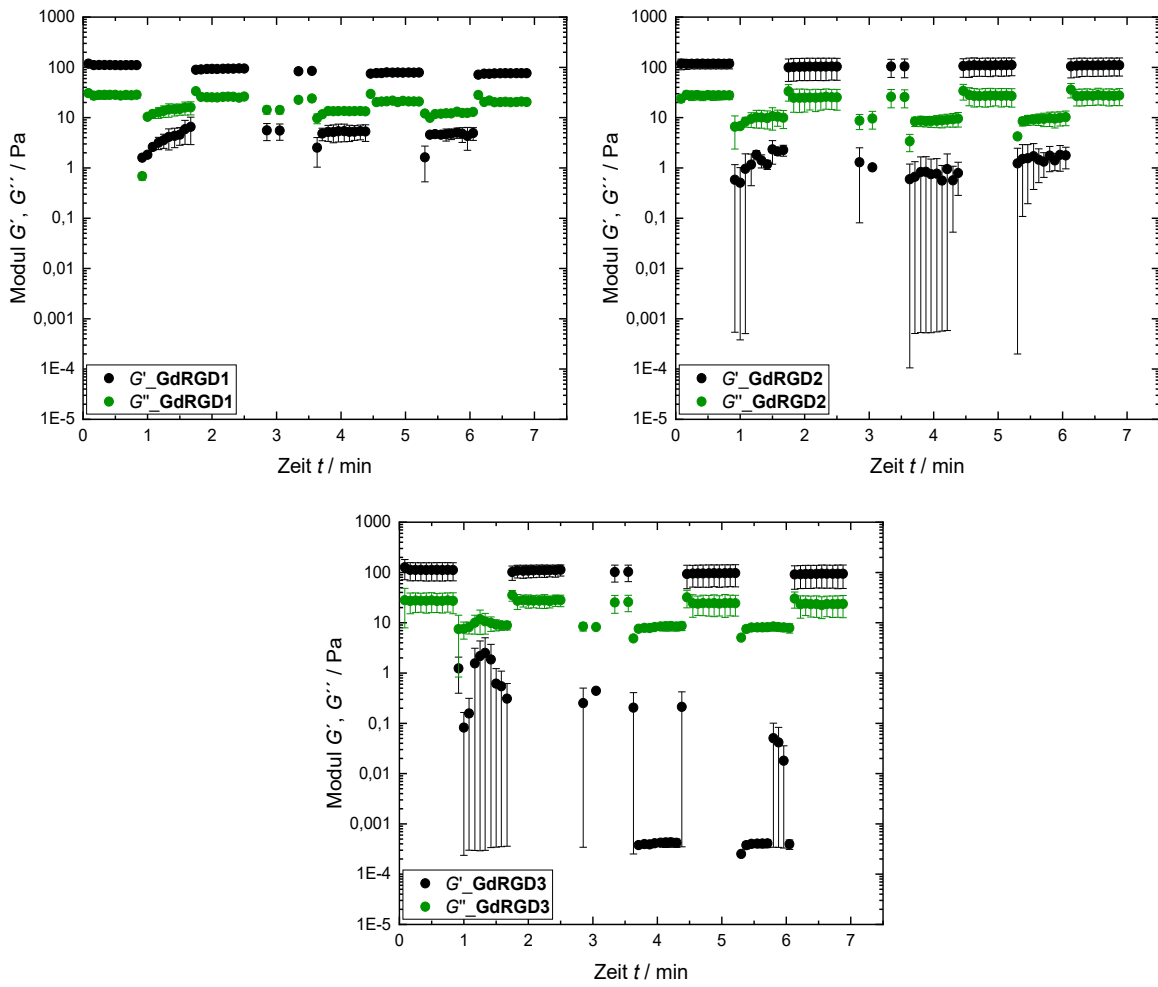


Abbildung A38: Selbstheilungstests von **GdRGD1-3** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 25 °C.

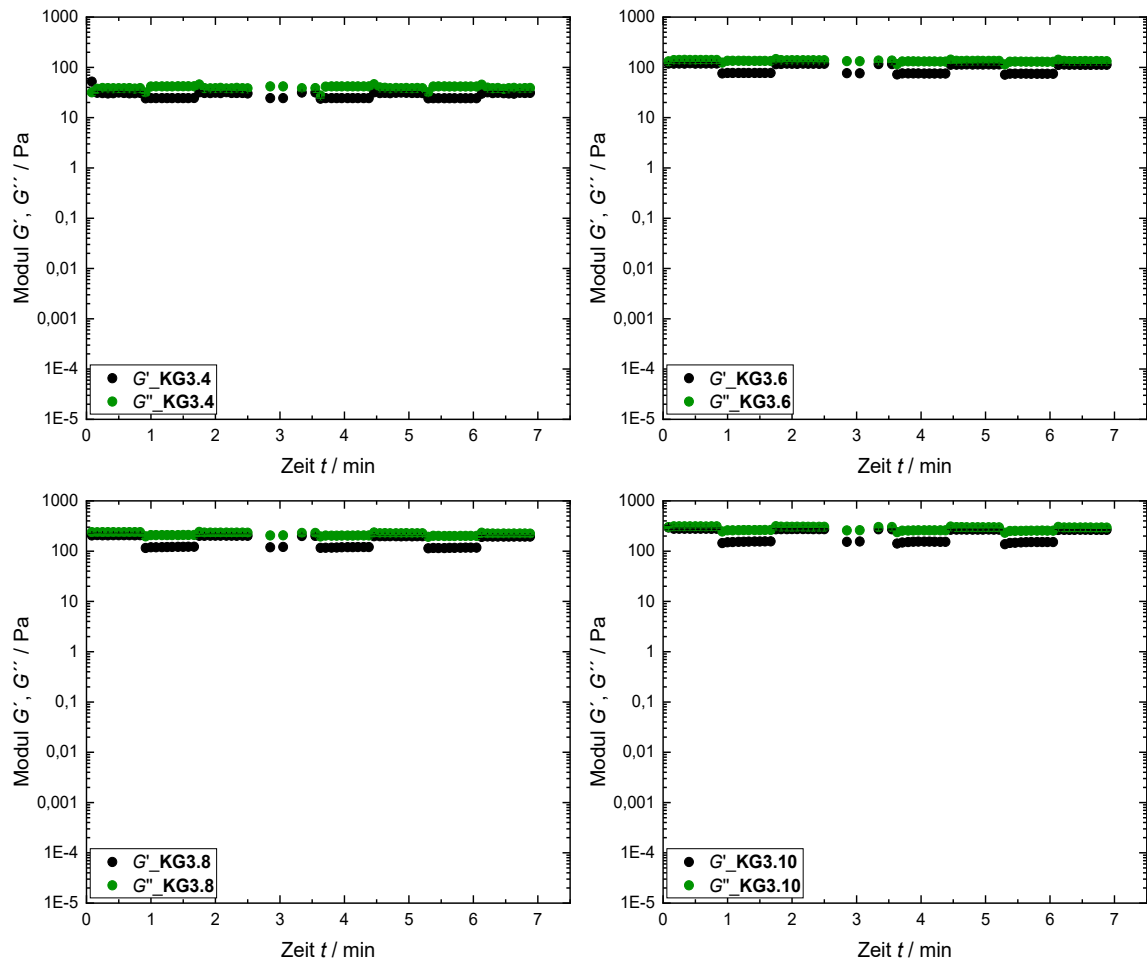


Abbildung A39: Selbstheilungstests von **KG3.4-10** gemessen bei abwechselnd 0,5 % und 500,0 % Scherdeformation, einer konstanten Frequenz von 1 Hz und 25 °C.

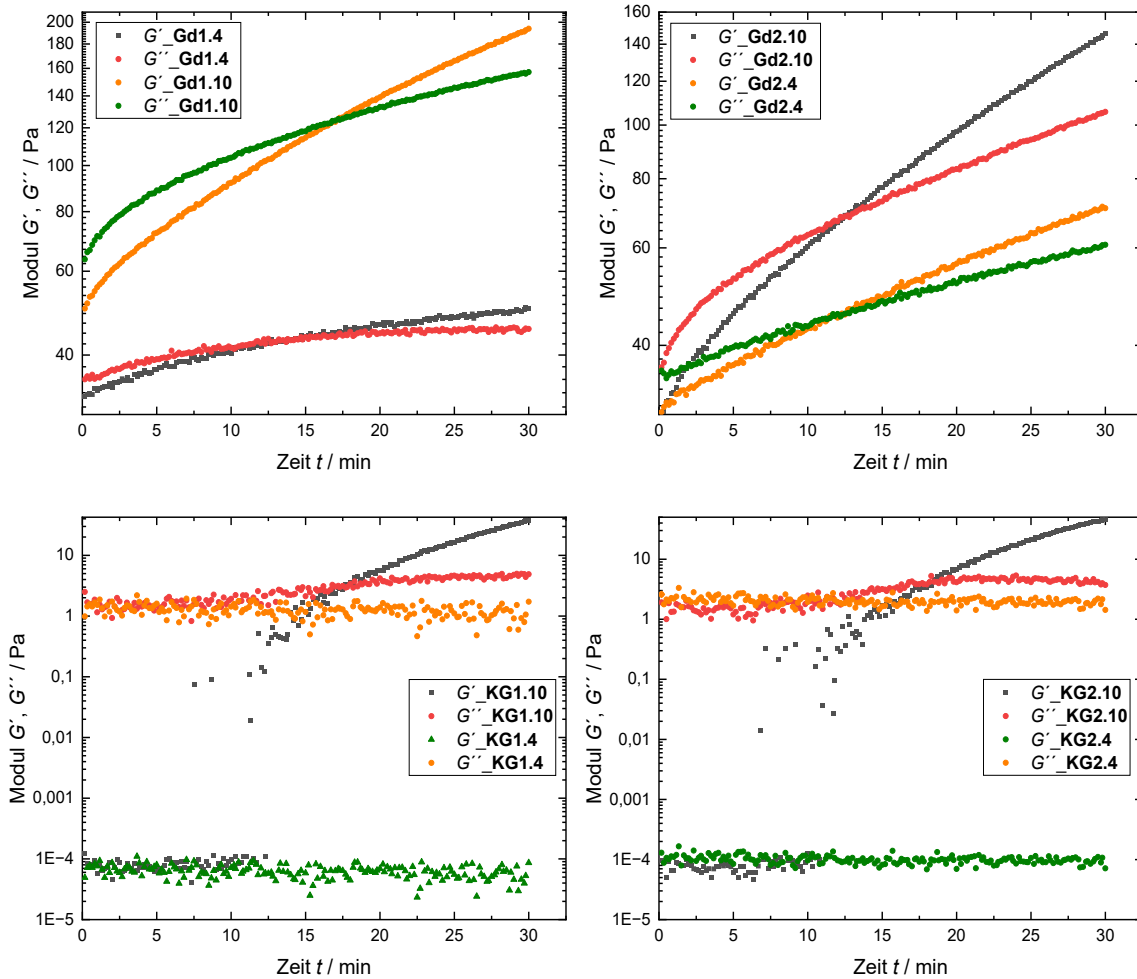


Abbildung A40: Auftragung des Speichermoduls G' und des Verlustmoduls G'' gegen die Zeit t für die dualen Hydrogele **Gd1.4** und **Gd1.10** (2 mol% Wirt-Gast, 3 mol% kovalent) sowie **Gd2.4** und **Gd2.10** (2 mol% Wirt-Gast, 6 mol% kovalent) und die kovalenten Kontrollgele **KG1.4** und **KG1.10** (0 mol% Wirt-Gast, 3 mol% kovalent) sowie **KG2.4** und **KG2.10** (0 mol% Wirt-Gast, 6 mol% kovalent) aufgenommen direkt nach dem Mischen der Polymerlösungen zur Bestimmung der Gelierzeit bei einer Scherdeformation von $\gamma = 1\%$, einer Frequenz von $f = 1$ Hz und einer Temperatur von $25\text{ }^\circ\text{C}$.

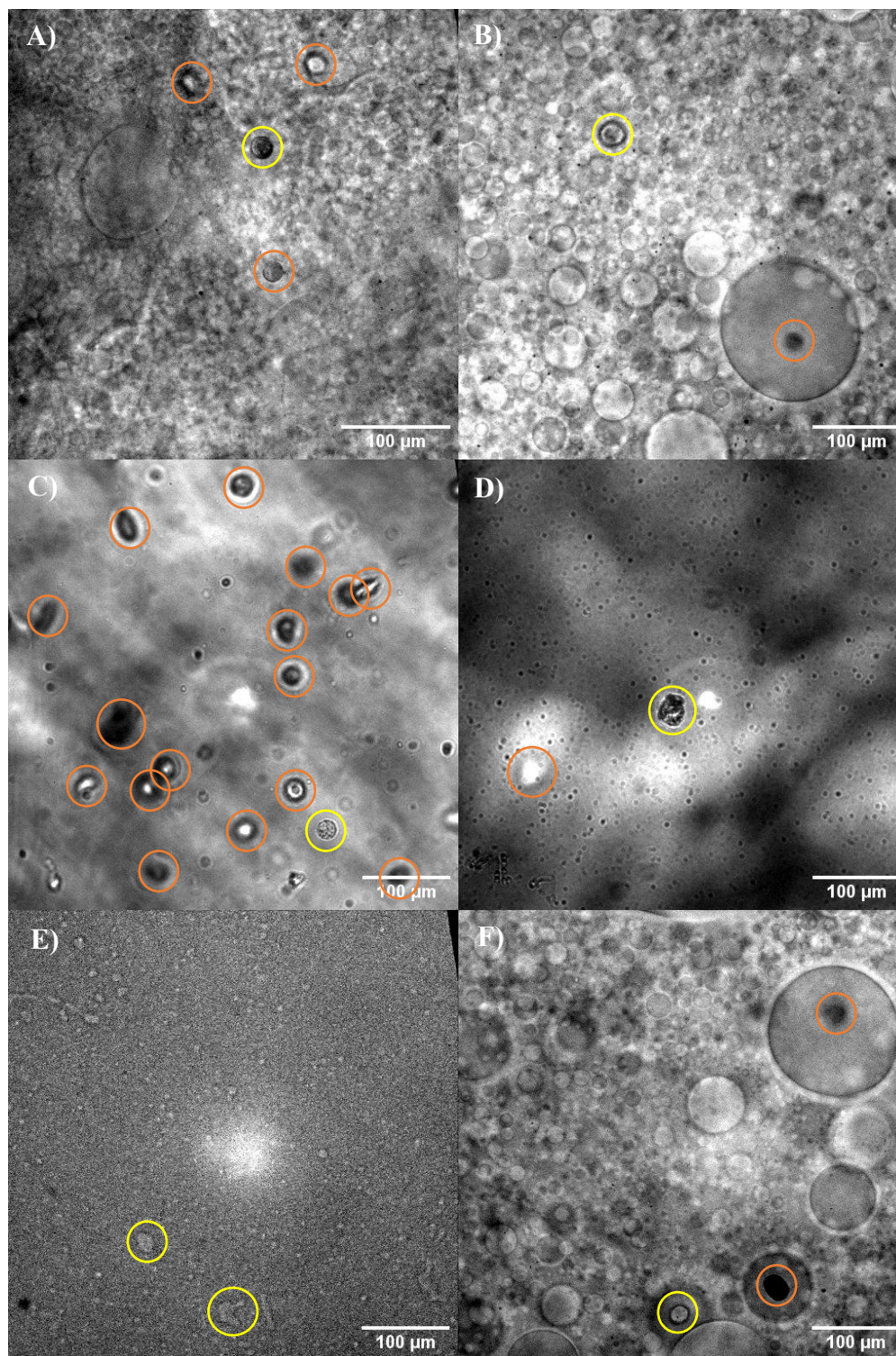


Abbildung A41: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) 4 Gew.-%igen, (B) 6 Gew.-%igen (C) 8 Gew.-%igen und (D) 10 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogelen mit 3,3 mol% Vernetzung sowie (E) am Boden eines 4 Gew.-%igen und (F) in einem 6 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogel mit 4,8 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; orangener Kreis = Zelle nicht in der fokussierten Ebene).

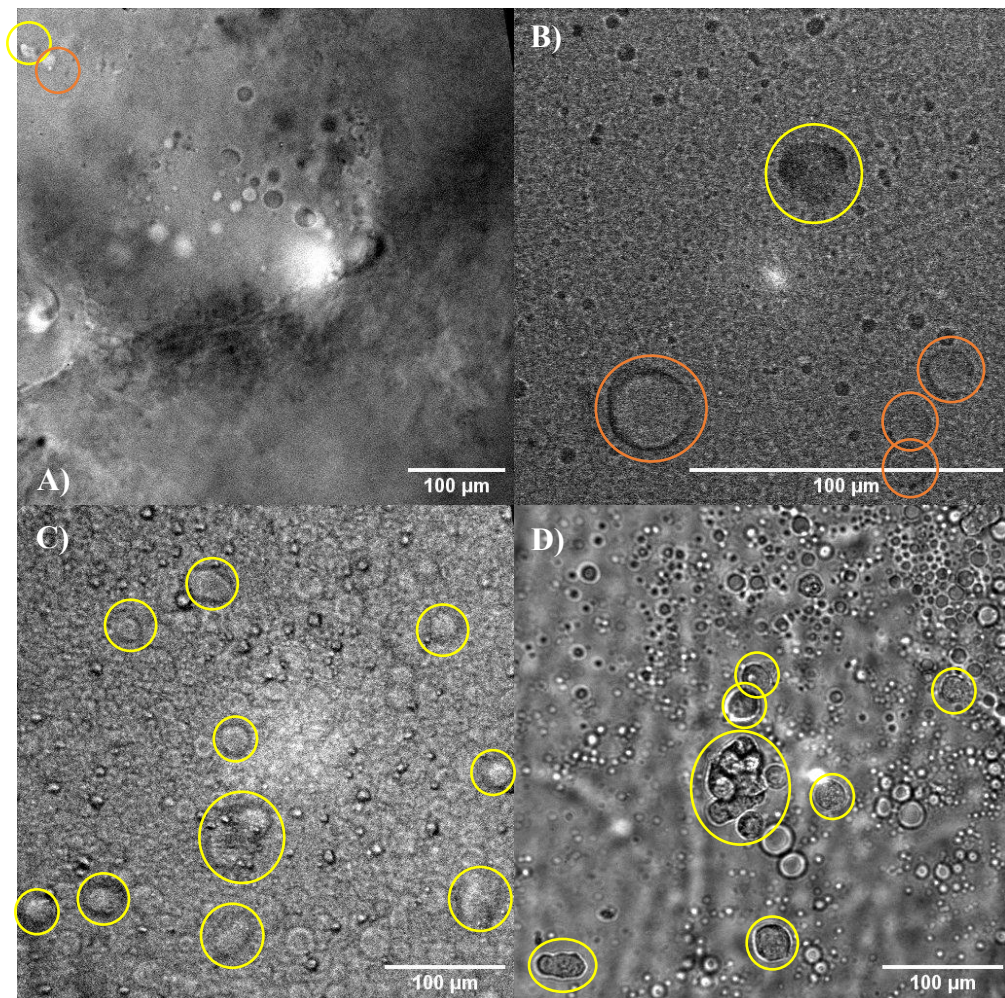


Abbildung A42: Durchlichtmikroskopieaufnahmen in (A) 8 Gew.-%igen und (B) 10 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogelen mit 4,8 mol% Vernetzung sowie am Boden von (C) 4 Gew.-%igen und (D) 6 Gew.-%igen Wirt-Gast-Hydrogelen mit 7,5 mol% Vernetzung (gelber Kreis = Zelle im Fokus; orangener Kreis = Zelle nicht in der fokussierten Ebene).

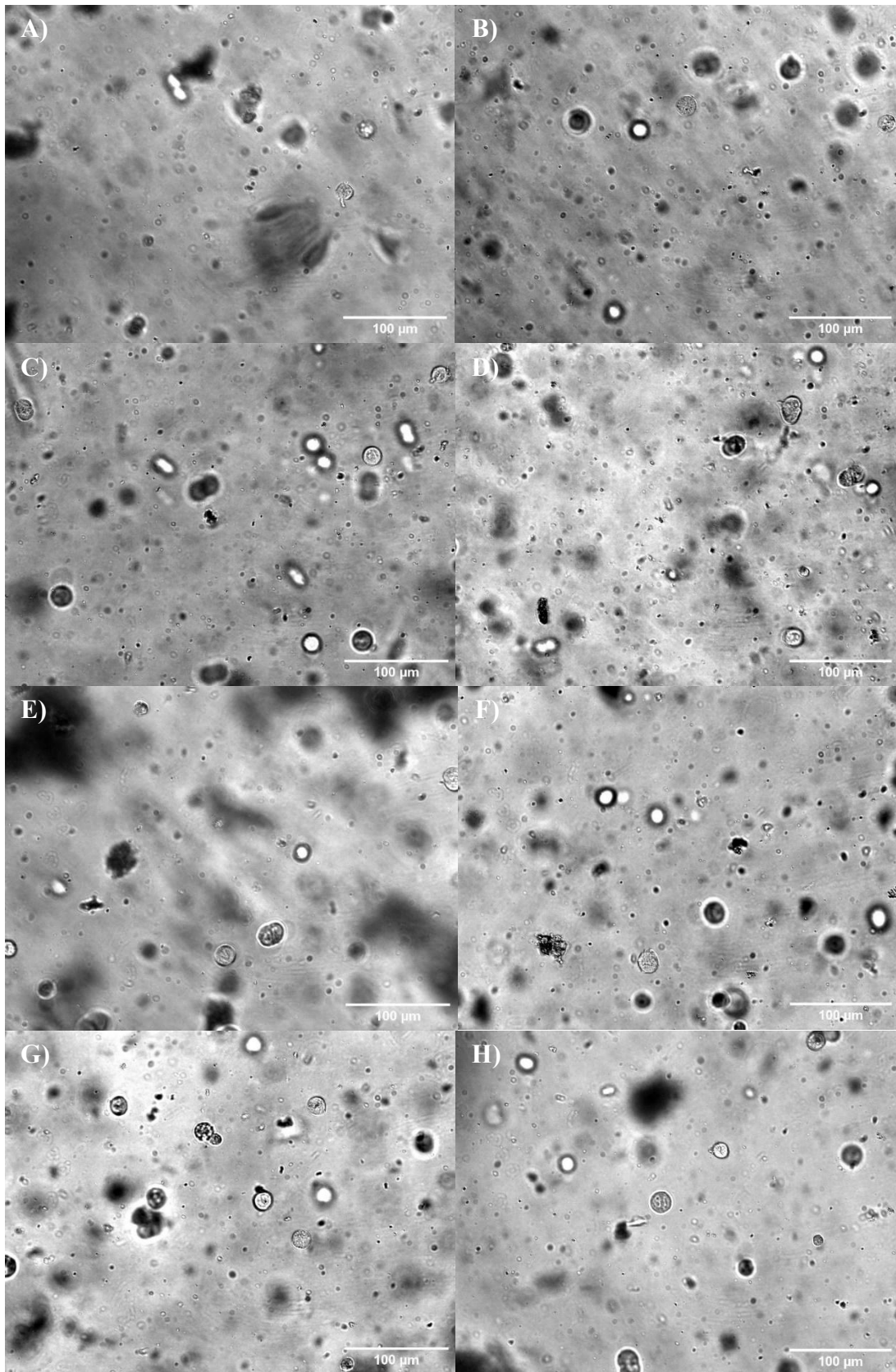


Abbildung A43: Durchlichtaufnahmen der thiolactonhaltigen Wirt-Gast-Hydrogele **Gn4-10** (A-D) und **Gkat4-10** (E-H).

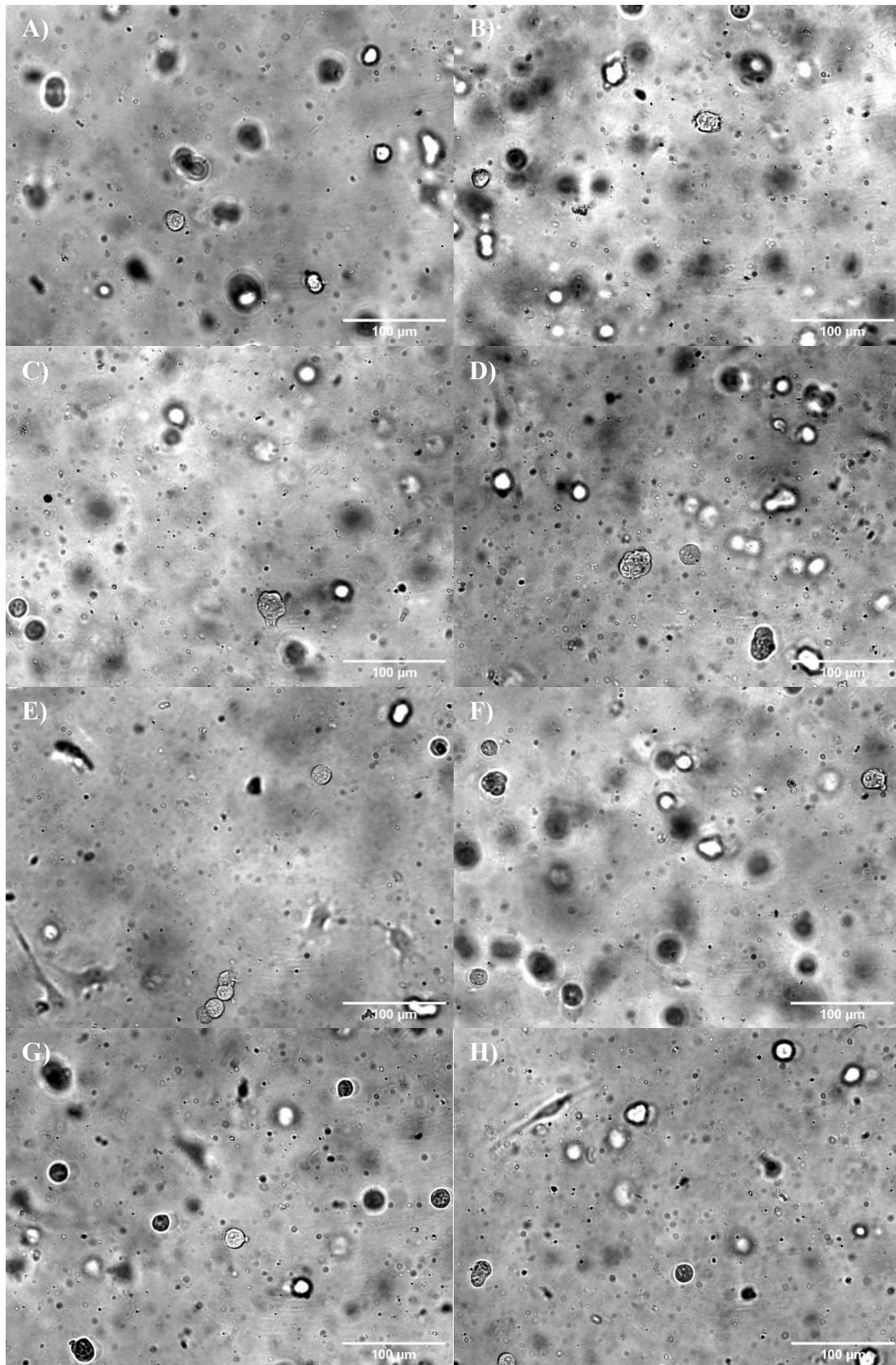


Abbildung A44: Durchlichtaufnahmen der RGD-funktionalisierten neutralen Wirt-Gast-Hydrogele **G1,5n4-10** (A-D) und **G3,3n4-10** (E-H).

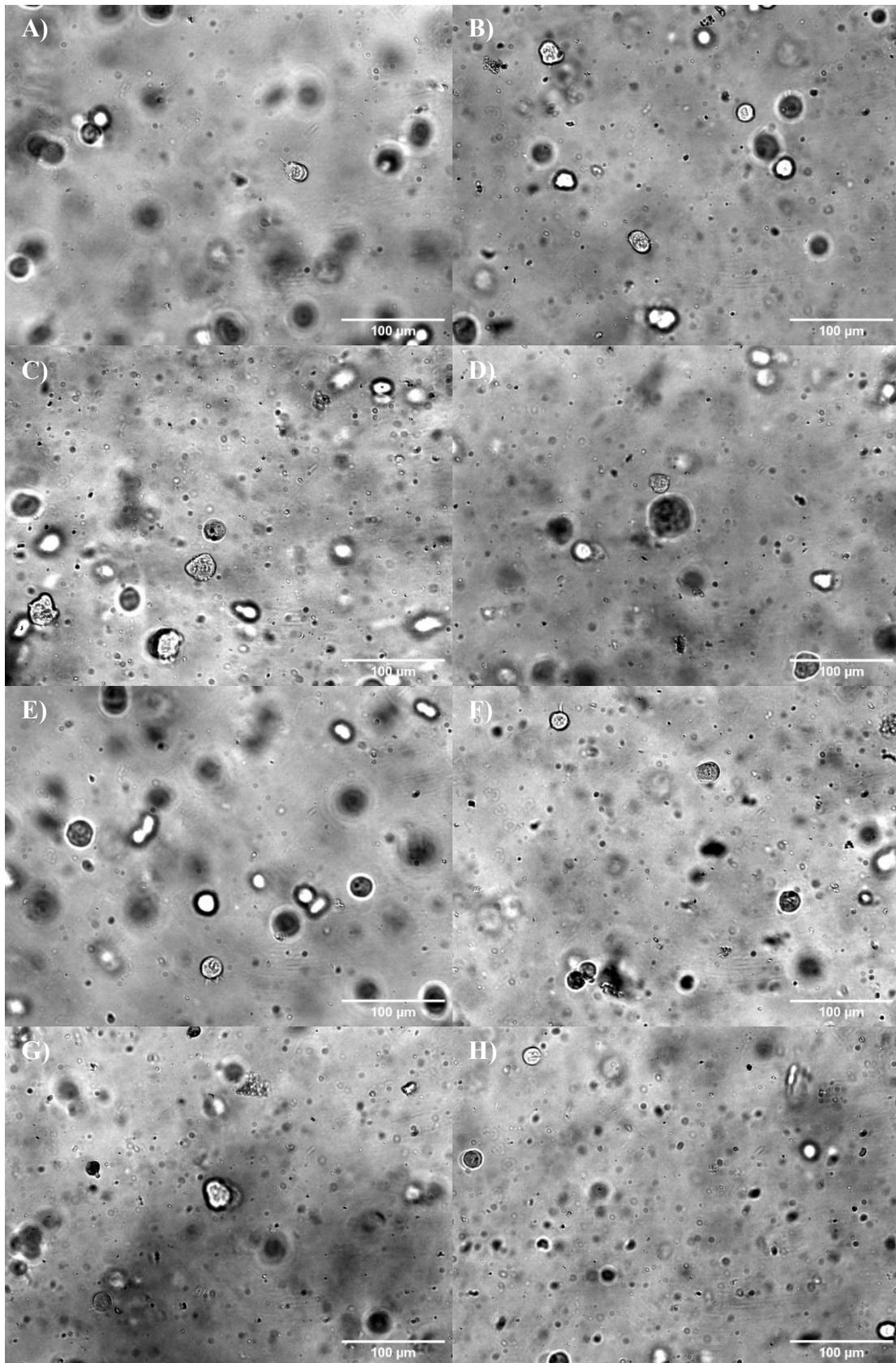


Abbildung A45: Durchlichtaufnahmen der RGD-funktionalisierten kationischen Wirt-Gast-Hydrogele **G1,5kat4-10 (A-D)** und **G3,3kat4-10 (E-H)**.

Eidesstattliche Versicherung

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)