

**Synthese und Charakterisierung von  
maßgeschneiderten bioabbaubaren Hydrogelsystemen  
für eine Anwendung in der Biomedizin.**

**Dissertation**

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

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

Vorgelegt von  
**Florian Pätzold**  
aus Dortmund

Dortmund, 2022



Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Weberskirch an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund im Zeitraum von Oktober 2017 bis zum März 2022 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

F. Pätzold, N. Stamm, D. Kamps, M. Specht, P. Bolduan, L. Dehmelt, R. Weberskirch, *Macromol. Biosci.* **2022**, 2100453.

1 Gutachter: Prof. Ralf Weberskirch

2 Gutachter: Prof. Jörg Tiller

Eingereicht am 28.03.2022



## Danksagungen

Ich danke *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* für die Ermöglichung dieser Arbeit und für das stets aufgebrachte Interesse an dieser. Aufgrund des mir gegenüber aufgebrachten Vertrauens und der Freiheiten im Entwickeln neuartiger Systeme, war es mit erst möglich diese zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen.

Herrn *Prof. Dr. Jörg Tiller* danke ich herzlich für die erneute Übernahme des Korreferats. Seiner Arbeitsgruppe, ins Besondere Herrn *Volker Brandt*, danke ich für die fachmännische Beratung und Anfertigung der in dieser Arbeit aufgeführten REM-Aufnahmen. Zusätzlich danke ich den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, insbesondere *Bastian Grabe* und *Prof. Dr. Wolf Hiller*, für die Aufnahme von DOSY-NMR-Spektren und der Hilfe bei deren Auswertung und Interpretation.

Ein großer Dank gilt auch *Dr. Patrick Bolduan*, welcher durch seine Forschung und Betreuung einen wichtige Grundstein für das Erstellen dieser Arbeit gelegt hat. Des Weiteren danke ich *Dr. Leif Dehmelt* und vor allem *Dominic Kamps*, welche mir mit Fachkunde und Freundlichkeit geholfen haben, einige elementare Hürden in dieser Arbeit zu überwinden.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Nils Stamm, Max Jopen, Wiebke Schnettger, Janick Weßelmann, Yannik Olszowy, Marvin Dieter, Dr. David Pelzer, Dr. Christian Gramse* und *Dr. Hanne Braun-Streb* welche mir nicht nur in fachlichen Fragen zur Seite standen, sondern auch für eine fantastische Atmosphäre, während und abseits der Arbeitszeiten, gesorgt haben. Ich danke auch den Mitarbeitern der Fakultät *Silvia Lessing, Andrea Bokelmann, Katja Weber* und *Andreas Hammer*, welche stets hilfreich und freundlich waren.

Ich danke den zahlreichen Studenten, welche im Rahmen von Praktika und Abschlussarbeiten zur Vervollständigung dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei möchte ich vor allem *Johanna Keil, Maria Specht* und *Lorenzo Hiltmann* lobend erwähnen.

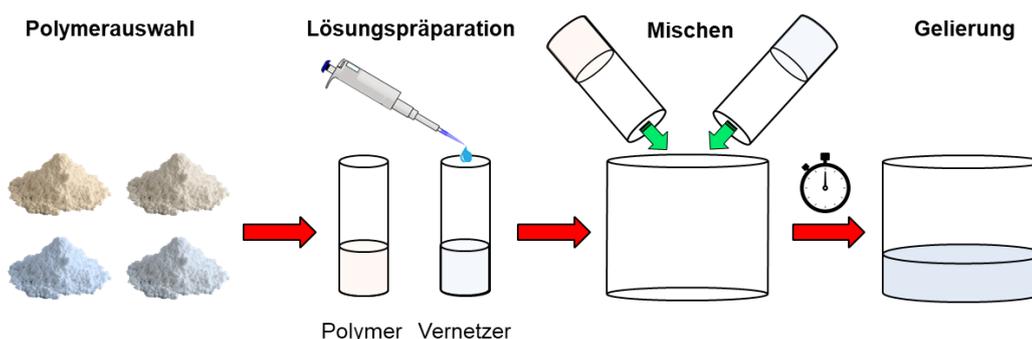
Am Ende möchte ich auch meinen Freunden, meiner Familie und ganz besonders meiner Verlobten *Andrea* danken, welche mich stets unterstützt haben und mir auch in den Zeiten des Stresses und der Zweifel zur Seite standen. Dafür danke ich euch von ganzem Herzen.



## Kurzfassung

Hydrogele finden aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften nicht nur im Alltag eine Anwendung, sondern stellen auch die Grundlage für einen Großteil des Lebens in Form von tierischem und pflanzlichem Gewebe dar. Hydrogele, in Form der extrazellulären Matrix, übernehmen dabei nicht nur die Aufgabe als tragendes Gerüst für die Zellen, sondern beeinflussen aufgrund der auftretenden Zell-Matrix-Wechselwirkungen auch verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration und Differenzierung. In der biomedizinischen Forschung wurde das Potential der Hydrogele als bioaktive Trägermaterialien erkannt und bezüglich einer Vielzahl potenzieller Anwendungen beforscht.

Diese Arbeit widmete sich der Entwicklung von biokompatiblen Hydrogelsystemen für die Anwendung in der biomedizinischen Forschung als künstliche extrazelluläre Matrices. Dabei wurden synthetische, biofunktionalisierte, thiolhaltige Präpolymere auf der Basis von 4-Acryloylmorpholin und *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin verwendet, welche durch den Einsatz von verschiedenen polymeren Vernetzern zu einem Netzwerk verbunden wurden. Neben der Verwendung von Poly(ethylenglykol)-basierten Vernetzern wurden auch neuentwickelte, bioabbaubare Systeme auf der Basis von Poly(2-oxazolinen) zur Herstellung der Hydrogele verwendet. Durch die Variation verschiedener Vernetzer und Gelkonzentrationen war es im Rahmen dieser Arbeit dabei nicht nur möglich, Hydrogele mit einer variablen Steifigkeit von 0,1 bis 51 kPa herzustellen, sondern auch deren hydrolytisches Abbauverhalten zu steuern, sodass Abbauzeiten von einigen Tagen bis hin zu Monaten realisiert werden konnten. Mithilfe von Zellexperimenten war es nicht nur möglich die Biokompatibilität der neu entwickelten Systeme zu verifizieren, es konnten auch erste Untersuchungen bezüglich des Adhäsionsverhaltens von Zellen an die Geloberfläche mithilfe von COS-7-Zellen durchgeführt werden.

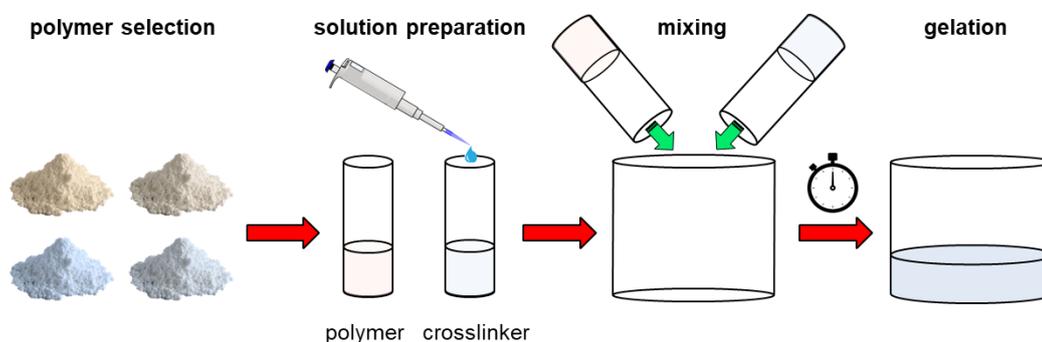




## Abstract

Due to their diverse properties, hydrogels are not only used in everyday life, but also form the basis for a large part of life in the form of animal and plant tissue. In the form of the extracellular matrix, hydrogels not only act as a support scaffold for cells, but also influence various cellular processes such as proliferation, migration and differentiation due to the cell-matrix interactions that occur. In biomedical research, the potential of hydrogels as bioactive carrier materials has been recognized and explored with respect to a variety of potential applications.

This work was dedicated to the development of biocompatible hydrogel systems for application in biomedical research as artificial extracellular matrices. Synthetic biofunctionalized thiol-containing prepolymers based on 4-acryloylmorpholine and *N,N'*-bis(methacryloyl)cystamine were used, which were linked into a network by the use of various polymeric crosslinkers. In addition to the use of poly(ethylene glycol)-based crosslinkers, newly developed biodegradable systems based on poly(2-oxazolines) were also used to prepare the hydrogels. By varying different crosslinkers and gel concentrations, it was not only possible to produce hydrogels with variable stiffness from 0.1 to 51 kPa, but also to control their hydrolytic degradation behavior in such a way that degradation times of several days to months could be realized. Cell experiments were used not only to verify the biocompatibility of the newly developed systems, but also to perform initial studies on the adhesion behavior of cells to the gel surface with COS-7 cells.





# Inhaltsverzeichnis

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Einleitung .....   | 1  |
| 1.1.   | Polymere in der Medizin.....                                   | 1  |
| 1.1.1. | Geweberegeneration .....                                       | 1  |
| 1.1.2. | Materialanforderungen zur Zellkultivierung.....                | 3  |
| 1.2.   | Hydrogele.....   | 4  |
| 1.2.1. | Natürliche und synthetische Hydrogele .....                    | 5  |
| 1.2.2. | Physikalische und chemische Hydrogele.....                     | 6  |
| 1.2.3. | Abbaubare Hydrogelsysteme .....                                | 7  |
| 1.3.   | Thiolhaltige Polymere.....                                     | 9  |
| 1.4.   | Die extrazelluläre Matrix .....                                | 10 |
| 1.4.1. | Integrine .....  | 11 |
| 1.4.2. | Integrinspezifität .....                                       | 13 |
| 1.4.3. | Integrinaffine Liganden .....                                  | 14 |
| 2.     | Aufgabenstellung und Zielsetzung .....                         | 15 |
| 3.     | Hydrogele auf der Basis von Polyethylenglykol-Vernetzern ..... | 17 |
| 3.1.   | Aufbau des Hydrogelsystems .....                               | 17 |
| 3.2.   | Synthese der thiolhaltigen Präpolymere .....                   | 20 |
| 3.2.1. | <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....                          | 21 |
| 3.2.2. | Ellman's Assay .....   | 23 |
| 3.2.3. | Vollständige Polymerdaten .....                                | 24 |
| 3.3.   | Synthese und Charakterisierung der Hydrogele .....             | 26 |
| 3.3.1. | Rheologie und Quellverhalten .....                             | 27 |
| 3.3.2. | Einfluss der Vernetzeräquivalente .....                        | 32 |
| 3.3.3. | Einfluss der Gelkonzentration.....                             | 36 |
| 3.3.4. | Einfluss der kationischen Komponente .....                     | 41 |
| 3.3.5. | Gelmorphologie .....   | 44 |
| 3.3.6. | Abbauverhalten der PEGDA-Gele.....                             | 48 |
| 3.4.   | Einsatz in Zellexperimenten .....                              | 49 |
| 3.4.1. | Validierung der Biokompatibilität .....                        | 53 |
| 3.4.2. | Untersuchung des Adhäsionsverhalten .....                      | 56 |
| 3.5.   | Zusammenfassung PEG-Vernetzer .....                            | 61 |
| 4.     | Hydrogele auf der Basis von Polyoxazolinvernetzern.....        | 65 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.1.   | Aufbau des Hydrogelsystems .....                       | 65  |
| 4.1.1. | Eine Alternative zu Poly(ethylenglykol) .....          | 65  |
| 4.1.2. | Poly(2-oxazoline).....                                 | 66  |
| 4.1.3. | Hydrogele auf der Basis von Poly(2-oxazolinen).....    | 68  |
| 4.1.4. | Kationische Ringöffnungspolymerisation .....           | 69  |
| 4.2.   | Synthese und Charakterisierung der Polyoxazoline ..... | 72  |
| 4.2.1. | Erste „proof-of-concept“ Polymere .....                | 74  |
| 4.2.2. | Charakterisierung der Oxazolinpolymere .....           | 74  |
| 4.3.   | Erste Oxazolin-vernetzte Hydrogele.....                | 77  |
| 4.3.1. | Steifigkeit und Quellverhalten .....                   | 78  |
| 4.4.   | Optimierung des Vernetzersystems .....                 | 83  |
| 4.4.1. | Alternative Endgruppenfunktionalitäten.....            | 83  |
| 4.4.1. | DOSY-NMR-Spektroskopie .....                           | 91  |
| 4.4.2. | Evaluation der neuen Vernetzer.....                    | 94  |
| 4.5.   | Variation der Vernetzerparameter.....                  | 98  |
| 4.5.1. | Einfluss der Vernetzerlänge .....                      | 99  |
| 4.5.2. | Einsatz von Copolymeren .....                          | 105 |
| 4.5.3. | Einsatz von bifunktionellen Vernetzern.....            | 110 |
| 4.5.1. | Vergleich der Eigenschaften mit der Literatur.....     | 117 |
| 4.6.   | Gemischte Vernetzersysteme .....                       | 119 |
| 4.7.   | Gelmorphologie .....                                   | 122 |
| 4.8.   | Einsatz in Zellexperimenten .....                      | 124 |
| 4.8.1. | Untersuchung in 2D-Experimenten .....                  | 124 |
| 4.8.2. | Validierung der Biokompatibilität .....                | 128 |
| 4.8.3. | Untersuchung in 3D-Experimenten .....                  | 131 |
| 4.8.4. | Einfluss des Abbauverhaltens auf die Zellen.....       | 132 |
| 4.9.   | Zusammenfassung Oxazolinvernetzer .....                | 138 |
| 5.     | Zusammenfassung und Ausblicke .....                    | 140 |
| 6.     | Experimenteller Teil .....                             | 146 |
| 6.1.   | Allgemeines .....                                      | 146 |
| 6.1.1. | Hilfssoftware.....                                     | 146 |
| 6.1.2. | NMR-Spektroskopie .....                                | 146 |
| 6.1.3. | Gel-Permeations-Chromatographie .....                  | 146 |
| 6.1.4. | RP-HPLC .....  | 146 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 6.1.5. | UV-Vis-Spektroskopie.....   | 147 |
| 6.1.6. | Rheologie .....   | 147 |
| 6.1.7. | Ellman's Assay .....  | 147 |
| 6.1.8. | Rasterelektronenmikroskopie .....   | 148 |
| 6.1.9. | Live-Dead-Färbung.....  | 148 |
| 6.2.   | Monomersynthesen .....  | 149 |
| 6.2.1. | <i>N,N'</i> -Bis(methacryloyl)cystamin .....  | 149 |
| 6.2.2. | Trimethylaminoethylacrylat.....   | 149 |
| 6.2.3. | Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA <sub>3500</sub> ) .....   | 150 |
| 6.2.4. | 1,2-Bis(Maleimido)ethan .....   | 151 |
| 6.2.5. | 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]dec-8-en-3,5-dion .....  | 151 |
| 6.2.6. | (4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> )-2-(5-hydroxypentyl)-3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -tetrahydro-1 <i>H</i> -4,7-epoxyisoindol-1,3(2 <i>H</i> )-dion..... | 152 |
| 6.2.7. | 5-((4 <i>R</i> ,7 <i>S</i> )-1,3-dioxo-1,3,3 <i>a</i> ,4,7,7 <i>a</i> -hexahydro-2 <i>H</i> -4,7-epoxyisoindol-2-yl)pentyl-acrylat .....      | 152 |
| 6.2.8. | 5-Maleimido-pentyl-acrylat .....  | 153 |
| 6.3.   | Festphasensynthese .....  | 154 |
| 6.4.   | Polymersynthesen .....  | 155 |
| 6.4.1. | Synthese der thiolhaltigen Präpolymere .....  | 155 |
| 6.4.2. | Peptidfunktionalisierung .....  | 156 |
| 6.4.3. | Oxazolinpolymere.....   | 157 |
| 6.5.   | Hydrogelpräparation .....   | 158 |
| 6.5.1. | Präparation für die Zellexperimente .....   | 159 |
| 7.     | Anhang.....   | 160 |
| 7.1.   | Abkürzungsverzeichnis.....  | 160 |
| 7.2.   | Abbildungsverzeichnis.....  | 162 |
| 7.3.   | Schemataverzeichnis .....   | 169 |
| 7.4.   | Tabellenverzeichnis .....   | 170 |
| 7.5.   | Gleichungsverzeichnis .....   | 171 |
| 7.6.   | Literaturverzeichnis .....  | 173 |
| 7.7.   | Ergänzende Daten .....  | 183 |
| 7.8.   | NMR-Spektren .....  | 187 |
| 7.9.   | Mikroskopieaufnahmen .....  | 204 |
| 7.10.  | Eidesstattlicher Versicherung .....   | 214 |



# 1. Einleitung

## 1.1. Polymere in der Medizin

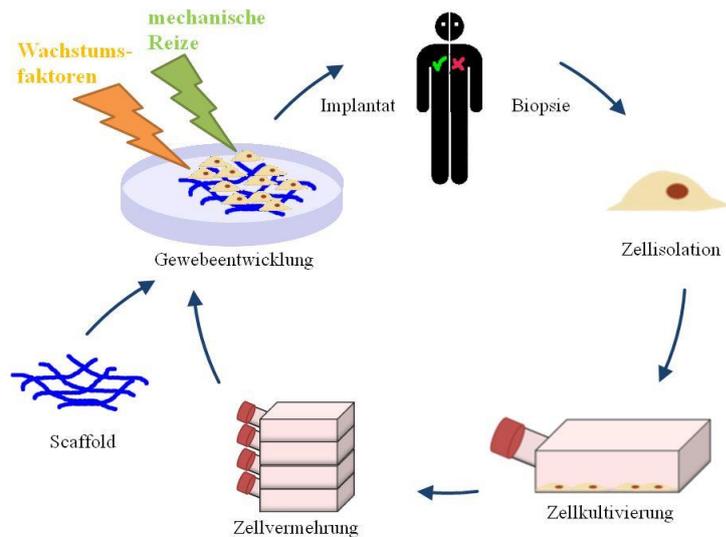
Polymere Materialien sind heutzutage aus dem täglichen Gebrauch nicht mehr wegzudenken. Sie finden in den verschiedensten Formen Anwendung im Alltag, zum Beispiel als Getränkeflaschen, Mülltüten oder Kleidungsstücke.<sup>[1]</sup> Aber nicht nur dort gehört die Verwendung von Polymeren zur Normalität, auch in der Medizin werden heutzutage eine Vielzahl an polymeren Materialien genutzt. Seit Mitte der 90er Jahre wird unter anderem Polymethylmethacrylat (PMMA) als Knochenzement, Polyvinylchlorid (PVC) als Blutbeutel oder Polypropylen (PP) als Nahtmaterial verwendet.<sup>[2]</sup> Diese Polymere wurden zu Beginn ohne besondere Anpassung hinsichtlich ihrer medizinischen Applikation verwendet, was ihre Anwendbarkeit beschränkte. Bei der Verwendung von Polymeren *in vitro* zum Beispiel werden besondere Anforderungen an die Polymere gestellt, hinsichtlich der Biokompatibilität, der mechanischen Stabilität, sowie der Bioabbaubarkeit.<sup>[2-4]</sup>

Neben der Nutzung als Verpackungsmaterial oder Prothesen, können Polymere auch zum Transport von Wirkstoffen verwendet werden, beispielsweise in Form von polymeren Nanopartikeln oder Liposomen.<sup>[2,5,6]</sup> Durch das Einschließen von medizinischen Wirkstoffen in Nanopartikeln oder Liposomen können diese vor ihrem frühzeitigen Abbau im Organismus geschützt werden und gleichzeitig durch aktives oder passives Targeting der Partikel in bestimmten Regionen angereichert werden.<sup>[5,6]</sup>

Eine weitere Anwendung von Polymeren in der Medizin ist die Kultivierung von Zellen zur Geweberegeneration mithilfe von synthetisch hergestellten Hydrogelen.<sup>[4,7,8]</sup>

### 1.1.1. Geweberegeneration

Die Geweberegeneration (engl.: *tissue engineering*) beschreibt die Herstellung von biologischem Gewebe durch die gezielte Kultivierung von Zellen.<sup>[9]</sup> Um dies zu realisieren, werden einem Patienten Zellen entnommen, *in vitro* kultiviert und auf ein Trägermaterial (engl.: *scaffold*) aufgebracht, welches den Zellen als unterstützende Matrix dient. Auf dem *scaffold* bilden die Zellen durch die Applikation von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Reizen ein funktionsfähiges Gewebe aus, welches dem Patienten implantiert werden kann (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Darstellung des Vorgangs bei der Geweberegeneration.<sup>[10]</sup>

Die ersten Berichte über eine klinische Anwendung kamen Anfang der 1980er Jahre auf, welche Fibroblastenzellen und Keratinozyten genutzt haben, um neues Hautgewebe zu gewinnen.<sup>[11]</sup> 1987 publizierte VACANTI *et al.* ihre Arbeit, in welcher es ihnen erstmals möglich war Chondrozyten auf einem Polyglycolsäure-Trägermaterial zu kultivieren und einer lebenden Maus zu implantieren.<sup>[12]</sup> Beim Einsatz dieses künstlichen Ohrs kam es dabei nicht nur zu keinen Abstoßungsreaktionen, es war auch die Ausbildung von ersten Blutgefäßen durch den lebenden Organismus festzustellen. WAKITANI *et al.* beschrieben 1989 erstmals die Verwendung von Kollagen-Hydrogelen, welche durch das Einlagern von Chondrozyten genutzt werden konnten, um freigelegte Gelenkoberflächen von Hasen zu regenerieren.<sup>[13]</sup> Diese ersten Arbeiten haben gezeigt, dass es für die erfolgreiche Bildung des Gewebes notwendig ist, ein geeignetes Trägermaterial zu verwenden. Dieses sollte die Architektur und die physiochemischen Eigenschaften der natürlichen Gewebematrix imitieren, um die zellulären Aktivitäten, wie Migration, Proliferation und Differenzierung zu unterstützen.<sup>[14–16]</sup> In der Geweberegeneration finden drei Hauptklassen von Biomaterialien Anwendung: Keramiken, Biopolymere und synthetische Polymere.<sup>[14,17]</sup> Keramiken, wie zum Beispiel Hydroxylapatit und Kalziumphosphat, werden aufgrund ihrer hohen mechanischen Stabilität und Festigkeit als poröse Trägermaterialien zur Regeneration von Knochengewebe verwendet.<sup>[18,19]</sup> Da Keramikmaterialien jedoch über eine geringe Flexibilität und hohe Sprödigkeit verfügen, ist ihre Anwendung in der Geweberegeneration begrenzt. Biopolymere finden aufgrund ihrer hohen Variabilität in mechanischen und biologischen Eigenschaften eine breite Anwendung als Materialien in der Geweberegeneration. Nanofasern aus Hyaluronsäure werden beispielweise als

Trägermaterial zur Regeneration von neuralem Gewebe verwendet,<sup>[20]</sup> wohingegen Kollagen-basierte Gewebe zur Regeneration von Hautzellen genutzt werden.<sup>[7]</sup> Synthetische Polymere sind hinsichtlich ihrer Eigenschaften, wie die Biopolymere, sehr vielseitig, haben jedoch oft den Vorteil, dass sie günstig und in großen Mengen herstellbar sind.<sup>[15]</sup> Als Beispiel dienen Netzwerke aus Polycaprolacton und Polyethylenglykol, welche in der Forschung bereits genutzt werden um Herzgewebe zu generieren.<sup>[16,21]</sup>

Unabhängig von der späteren Anwendung, ist bei der Wahl des Materials zur Zellkultivierung zu berücksichtigen, dass dieses auf die Anforderungen der Zellen angepasst werden kann.

### **1.1.2. Materialanforderungen zur Zellkultivierung**

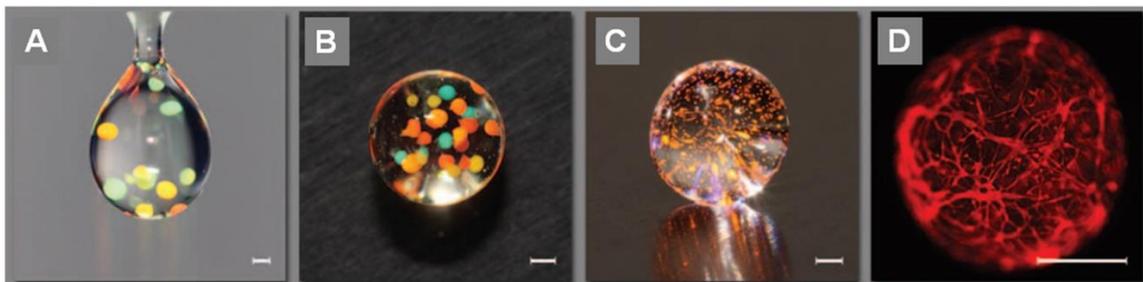
Um als Materialien in der Zellkultivierung Anwendung zu finden, müssen diese verschiedenen Anforderungen entsprechen, welche sich auf ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften beziehen. Eine der wichtigsten Anforderungen die ein Material dabei erfüllen muss, ist die Biokompatibilität, d.h. die Eigenschaft keine toxischen, immunologischen oder anderweitig negativen Effekte auf Zellen aufzuweisen.<sup>[7,22]</sup> Eine weitere wichtige Anforderung ist die Stabilität der Materialien. Da das Trägermaterial den Zellen über einen längeren Zeitraum als unterstützende Matrix dienen soll, ist es von Interesse, dass es unter den notwendigen Kultivierungsbedingungen stabil ist. Sollen die Materialien zur Implantation von neuem Gewebe genutzt werden ist jedoch auch eine Bioabbaubarkeit dieser von großem Interesse, um mögliche Risiken bezüglich der Langzeit-Biokompatibilität zu reduzieren.<sup>[11,23]</sup> Die Abbaugeschwindigkeit der Matrix, sollte dabei optimalerweise eine ähnliche Geschwindigkeit aufweisen, wie die Regenerationsrate des neuen Gewebes nach der Transplantation. Dabei gilt es zu beachten, dass ein zu schneller Abbau der Materialien zu einem Mangel an mechanischer Stabilität führt, wodurch dysfunktionales Gewebe entstehen kann.

Zur Optimierung eines Materials auf bestimmte Zelltypen, sollte es möglich sein, die Festigkeit dieses zu kontrollieren und es chemisch zu modifizieren.<sup>[24]</sup> Durch den Einbau von Signalmolekülen oder die Immobilisierung von Proteinen können Zell-Matrix-Interaktionen verstärkt werden, was zu einer verbesserten Zellmigration und Proliferation führen kann.<sup>[8,25]</sup> Neben den chemischen Eigenschaften sind auch die architektonischen Eigenschaften der Materialien von großer Bedeutung. Durch die Verwendung von porösen

Strukturen kann dabei nicht nur der Diffusions-bedingte Transport von Nährstoffen gewährleistet werden, sondern ermöglicht den Zellen auch eine dreidimensionale Migration innerhalb der Strukturen.<sup>[23]</sup> Eine Art von Zellen, welche aufgrund ihrer potenten Eigenschaften für die Anwendung in einer Vielzahl neuer Therapien von hohem Interesse ist, sind die sogenannten Stammzellen.<sup>[26,27]</sup> Für einen Einsatz in der Geweberegeneration haben sich Hydrogele als eine der wohl vielversprechendsten Materialklassen herausgestellt.<sup>[28]</sup>

## 1.2. Hydrogele

Hydrogele sind Netzwerke hydrophiler Polymerketten, welche große Mengen Wasser absorbieren können, ohne sich dabei in diesem zu lösen. Hydrogele sind im Alltag allgegenwärtig da sie einen Großteil von tierischen und pflanzlichen Geweben ausmachen.<sup>[29]</sup> Aufgrund der hohen Menge an eingeschlossenem Wasser können Hydrogele viskoelastische Eigenschaften aufweisen, die denen von natürlichen Geweben sehr ähnlich sind, was sie für eine Vielzahl von Anwendungen interessant macht.<sup>[8,22,30]</sup> Zusätzlich ist es aufgrund ihres Bildungsmechanismus oftmals möglich Hydrogele in jede denkbare Form zu bringen, wodurch sie sich auf ihre spezielle Anwendung hin anpassen lassen (Abbildung 2).

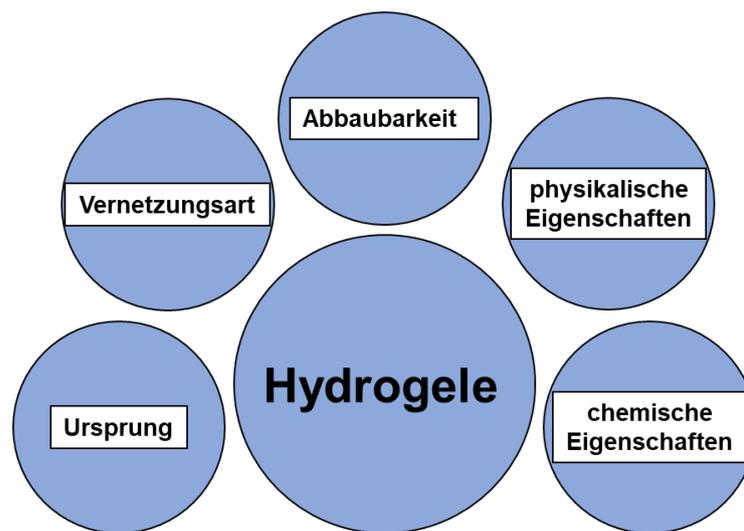


**Abbildung 2:** Übersicht über einige Hydrogele als Plattformen für eine biomedizinische Anwendung; **A:** Mikrogele in einer Suspension, welche verschiedene immobilisierte, farbcodierte Moleküle enthält; **B:** Ein Mikrogele, welches weitere kleine, farbcodierte Mikrogele enthält; **C:** Fluoreszenz-markierte Zellen in einem Mikrogele eingeschlossen; **D:** Fibroblast-Zellen eingeschlossen in einem semi-synthetischen PEG-Fibrinogen Mikrogele; Maßstabsleisten entsprechen 500  $\mu\text{m}$  (modifiziert aus <sup>[31]</sup>).

Die akademische Forschung begann Anfang der 1930er Jahre und beschäftigte sich zunächst mit der Herstellung einfacher polymerer Netzwerke, welche jedoch zumeist nicht als Hydrogelsysteme angedacht waren.<sup>[32]</sup> 1960 veröffentlichten WICHTERLE und LIM dann eine Arbeit in der sie ein System beschrieben haben, welches aus vernetztem Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) bestand und in der Gegenwart von Wasser zur Bildung von

transparenten, elastischen Gelen führte.<sup>[33]</sup> Dieses erste System legte damals einen Grundstein und ebnete den Weg für die Forschung, im Bereich der biomedizinischen Hydrogele, wie wir sie heute kennen.<sup>[34]</sup>

Hydrogele lassen sich bezüglich ihrer Eigenschaften in verschiedene Kategorien unterteilen (Abbildung 3). Dabei werden die Hydrogele vor allem bezüglich ihres Ursprungs (natürlich oder synthetisch) sowie ihrer Vernetzungsart (chemisch oder physikalisch) unterschieden.<sup>[34]</sup>



**Abbildung 3:** Klassifizierung von Hydrogelen bezüglich ihrer Eigenschaften (modifiziert aus <sup>[34]</sup>).

### 1.2.1. Natürliche und synthetische Hydrogele

Aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, finden aktuell vor allem natürliche Hydrogele aus Alginaten, Hyaluronsäuren und basalmembranartige Matrizen, wie Matrigel®, in der Medizin Anwendung.<sup>[35]</sup> Aufgrund des natürlichen Ursprungs der verwendeten Biopolymere, können diese oftmals von Zellen, durch das Ausschütten von verschiedenen Enzymen, abgebaut werden, was vor allem bezüglich *in vivo* Anwendungen ein großer Vorteil sein kann.<sup>[36]</sup> Diese natürlichen Materialien haben jedoch den Nachteil, dass aufgrund der Gewinnung aus biologischen Prozessen, zwischen verschiedenen Chargen eine Variabilität hinsichtlich ihrer Zusammensetzung auftreten kann.<sup>[37]</sup> Zusätzlich besteht die Gefahr, dass Krankheitserreger und immunologisch wirksame Metaboliten, welche während der Gewinnung der Materialien entstanden sind, sich auch nach Aufreinigung in diesen wiederfinden lassen.<sup>[8]</sup> Bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften weisen

natürliche Hydrogele, vor allem in zellulärer Umgebung, hohe Abbauraten auf, wodurch ihre mechanische Stabilität vor allem bezüglich einer Langzeitanwendung meist gering ist.<sup>[38]</sup> Als Alternative zu diesen natürlichen Hydrogelen ist es daher von Interesse, synthetische Systeme zu entwickeln, welche nicht nur über eine hohe Biokompatibilität verfügen, sondern auch die natürliche Zellproliferation unterstützen und erhöhen.<sup>[3,8]</sup>

Synthetische Hydrogelsysteme, basierend auf beispielsweise Polyethylenglykol und Polyacrylamiden, finden in der Forschung bereits eine breite Anwendung, haben jedoch oft den Nachteil, dass sie nicht nur keine Bioaktivität aufweisen, sondern auch toxische oder immunologische Reaktion auslösen können.<sup>[24,39,40]</sup> Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen ist die Herstellung von Präpolymeren, welche vor der weiteren Verarbeitung zu Hydrogelen, mit bioaktiven Molekülen wie Peptiden funktionalisiert werden.<sup>[30,41]</sup> Die Verwendung von solchen Präpolymeren hat den Vorteil, dass diese sich ausgiebig charakterisieren lassen, womit Hydrogele mit genau bekannten Zusammensetzung hergestellt werden können.<sup>[8]</sup>

Eine zusätzliche Klasse von Hydrogelen sind die sogenannten semi-synthetischen Systeme, welche versuchen die Vorteile von synthetischen und natürlichen Polymeren zu verbinden.<sup>[42]</sup> Bei diesen Systemen werden natürliche Makromoleküle, wie Kollagen, Hyaluronsäure oder Chitosan, mit synthetischen Polymeren verbunden.<sup>[31]</sup> Die Verbindung kann dabei über verschiedene Mechanismen erfolgen, zum Beispiel durch Copolymerisation, Disulfidvernetzung oder Michael-Addition. Durch das zusätzliche Vernetzen von natürlichen Hydrogelen kann die mechanische Stabilität der Systeme erhöht werden und ihr biologischer Abbau verlangsamt werden. Trotzdem bestehen die entstehenden semi-synthetischen Gele immer noch zu einem Großteil aus natürlichen Proteinen und Zuckern, was für eine hohe Biokompatibilität der Systeme sorgt.

Neben der Unterscheidung bezüglich des Ursprungs der Hydrogele, können diese auch bezüglich ihrer Vernetzungsart, in chemische und physikalische Hydrogele, unterteilt werden.

### **1.2.2. Physikalische und chemische Hydrogele**

Hydrogele lassen sich, hinsichtlich der Art ihres Zusammenhalts, in physikalische und chemische Hydrogele unterteilen. Physikalische Hydrogele zeichnen sich dadurch aus, dass die Polymerketten im Gel nicht kovalent miteinander verbunden sind. Der Zusammenhalt

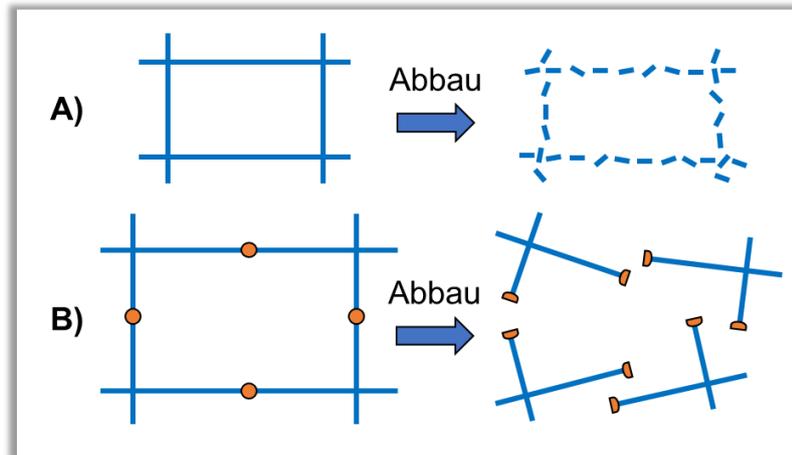
des Netzwerks beruht auf ionischen und/oder hydrophoben Wechselwirkungen, der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Ketten oder durch Verschlaufungen der Ketten ineinander.<sup>[1]</sup> Die Verwendung von physikalischen Hydrogelen hat den Vorteil, dass genau charakterisierte Polymerketten eingesetzt werden können, wodurch die genauen Zusammensetzungen der Systeme bekannt sind. Ein weiterer Vorteil von physikalischen Hydrogelen ist, dass kein zusätzliches Vernetzungsreagenz verwendet werden muss, welches toxische oder immunologische Reaktionen hervorrufen kann. Physikalisch vernetzte Hydrogele haben jedoch den Nachteil, dass sie meist über eine geringere mechanische Stabilität verfügen und diese stark von der Konzentration der Polymere abhängt.

Bei chemischen Hydrogelen basiert die Stabilität auf einer kovalenten Vernetzung von Polymerketten.<sup>[2]</sup> Dabei kann die Vernetzung entweder direkt bei der Polymerisation durch Verwendung von bifunktionellen Monomeren ausgebildet werden (*in-situ* Vernetzung) oder durch Kopplung zweier Präpolymere miteinander (nachträgliche Vernetzung).<sup>[43–45]</sup> Die Synthese von *in-situ*-vernetzten Hydrogelen hat den Vorteil, dass sie oftmals sehr schnell und einfach durchzuführen ist, die dabei erhaltenen Netzwerke sich jedoch hinsichtlich ihrer Zusammensetzung nur schwer charakterisieren lassen, da sie nach der Polymerisation nicht mehr löslich sind. Gleichzeitig müssen *in-situ*-vernetzte Hydrogele sehr sorgfältig gereinigt werden, um jegliche Rückstände an Monomeren oder organischen Lösungsmitteln zu entfernen. Um die Vorteile der einfachen und schnellen Synthese von *in-situ*-Gelen mit denen der nachträglichen Vernetzung zu kombinieren, können reversibel spaltbare Vernetzer, wie zum Beispiel das Disulfid-funktionalisierte Monomer *N,N'*-Bis(acryloyl)cystamin (BAC), verwendet werden

### **1.2.3. Abbaubare Hydrogelsysteme**

In Abhängigkeit ihres strukturellen Aufbaus und ihres Anwendungsgebiets, lassen sich Hydrogele in abbaubare und nicht abbaubare Systeme unterscheiden. Nicht abbaubare Systeme, wie zum Beispiel verschiedene Polyether- oder Polyamid-basierte Systeme werden vor allem dann verwendet, wenn ein Abbau der Materialien für eine Anwendung explizit nicht gewünscht ist, wie zum Beispiel bei einigen Implantaten.<sup>[46,47]</sup> Abbaubare Hydrogele lassen sich bezüglich des Abbaumechanismus in hydrolytisch- und enzymatisch-abbaubare Systeme unterscheiden. Ihr Haupteinsatz ist dabei in der Geweberegeneration, als unterstützende Matrizen für Zellen, oder im

Wirkstofftransport.<sup>[48,49]</sup> Der Abbau von Systemen kann, in Abhängigkeit der chemischen Struktur, entweder entlang der Polymerrückgrate erfolgen, oder an einzelnen labilen Punkten im Netzwerk (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Schematischer Vergleich zwischen den verschiedenen Abbaumechanismen von Hydrogelen, bezogen auf den Ort des Abbaus; **A)** Abbau des Netzwerks entlang der Polymerrückgrate; **B)** Abbau des Netzwerks nur an einzelnen labilen Positionen (orange).

Beispiele für Systeme, welche einen Abbau innerhalb des Rückgrates aufweisen sind verschiedene Polylactide (hydrolytisch) oder Polypeptide (enzymatisch).<sup>[50]</sup> Dabei gilt es vor allem bei der Verwendung von synthetischen Hydrogelen zu berücksichtigen, dass die entstehenden Abbauprodukte potentiell zytotoxische Eigenschaften aufweisen können und daher bei *in vivo* Anwendungen zu einer Schädigung des Organismus führen können. Um dies zu vermeiden, werden oftmals Hydrogelsysteme entwickelt, welche nur an bestimmten Stellen im Netzwerk einen Abbau erfahren können. Der Einbau dieser „Sollbruchstellen“ ins Netzwerk kann beispielsweise über labile Esterfunktionalitäten (hydrolytisch) oder spezielle Matrix-Metalloproteinase-sensitive Peptidsequenzen erfolgen.<sup>[51,52]</sup> Ein Beispiel für ein solches System wurde von LUTOLF *et al.* 2008 publiziert und bestand aus vierarmigen Poly(ethylenglykol)acrylaten, welche durch eine Michael-Addition mit thiofunktionierten Peptid-Vernetzern verbunden wurden.<sup>[52]</sup> Diese Peptid-Vernetzer wiesen, aufgrund der gewählten Aminosäuresequenzen, unterschiedlich starke Hydrophilie auf, wodurch sich der Hydrolyse-bedingte Abbau kontrollieren lies. Ein Vorteil der Verwendung von einzelnen, labilen Positionen in den Netzwerken ist, dass beim Abbau dieser keine niedermolekularen Abbauprodukte entstehen, sondern nur makromolekulare Polymerfragmente, welche oftmals keine zytotoxischen Eigenschaften aufweisen. Ähnlich wie LUTOLF *et al.* nutzen viele Systeme in der Literatur das Vernetzen, von thiohaltigen

Polymeren mittels einer Michael-Addition, um gezielt labile Funktionalitäten in Polymernetzwerke einzubauen.<sup>[52–54]</sup>

### 1.3. Thiolhaltige Polymere

Die Arbeitsgruppe von HANSEN veröffentlichte 1976 eine Arbeit über ein Acrylat-basiertes Hydrogelsystem für die Gelelektrophorese von RNA.<sup>[55]</sup> In dem Polymersystem verwendeten sie einen disulfidfunktionalisierten Vernetzer, das *N,N'*-Bis(acryloyl)cystamin (**BAC**) (Abbildung 5), welches es ermöglichte das Hydrogel nach der Elektrophorese durch die Zugabe von 2-Mercaptoethanol zu spalten, wodurch die aufgetrennte RNA zurückgewonnen werden konnte. Dieses BAC wurde in weiteren Arbeiten von HANSEN *et al.* genutzt um Hydrogelsysteme für die *in-vitro* Anwendung zu entwickeln.<sup>[56]</sup>

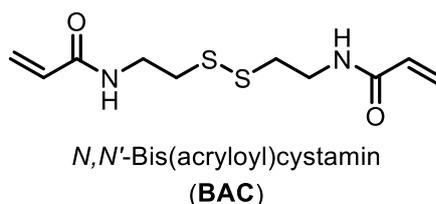


Abbildung 5 Struktur des bifunktionellen Monomers BAC.

Ein Vorteil der Verwendung von Disulfidbrücken zur Vernetzung von Polymernetzwerken ist die Möglichkeit, diese durch die Zugabe eines Reduktionsmittels (z.B. Dithiothreitol, **DTT**) zu spalten, wobei die Disulfidbrücken zu Thiolgruppen reduziert werden (Abbildung 6).<sup>[57–59]</sup>

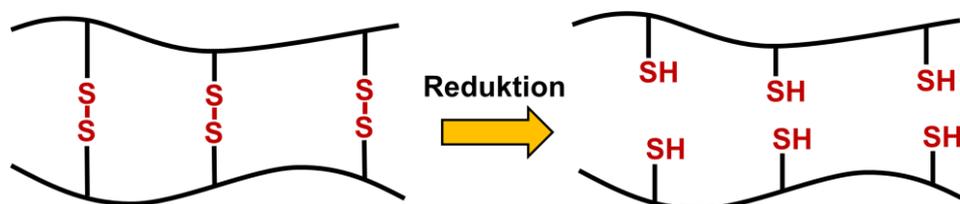


Abbildung 6: Reduktive Spaltung von Disulfidbrücken zwischen zwei Polymerketten.

Die dadurch vorliegenden Polymerketten sind im Gegensatz zu den Polymernetzwerken löslich, wodurch sie sich gut aufreinigen lassen und durch verschiedene analytische Methoden, wie NMR-Spektroskopie oder Gel-Permeations-Chromatographie, untersucht werden können.<sup>[58]</sup> Die freien Thiolgruppen können zusätzlich genutzt werden um mithilfe einer Michael-Addition nachträglich eine Funktionalisierung der Polymere durchzuführen.

Dabei ist es möglich eine Vielzahl verschiedener Moleküle zu immobilisieren, wie zum Beispiel bioaktive Peptide, oder Fluorophore (Abbildung 7).<sup>[45]</sup>



Abbildung 7: Funktionalisierung von thiolhaltigen Polymeren.

Durch Nutzung eines reversibel spaltbaren Disulfidvernetzers ist es somit möglich thiolhaltige Polymere herzustellen, welche über eine definierte Zusammensetzung verfügen und sich vielseitig modifizieren lassen. Durch das Einführen von verschiedenen bioaktiven Molekülen können eine Reihe unterschiedlicher bioaktiver Polymere hergestellt werden, welche dann als eine Art Polymerbibliothek genutzt werden könnten. Eine mögliche Anwendung für solche Polymere wäre der Einsatz in der Herstellung von biofunktionalisierten Hydrogelsystemen, welche als eine Art künstlicher extrazellulärer Matrix Anwendung finden könnten.

## 1.4. Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (**EZM**) ist ein nicht zelluläres, dreidimensionales Netzwerk, welches Zellen in natürlichem Gewebe umschließt.<sup>[60]</sup> Sie besteht, in Abhängigkeit des Gewebetyps, aus verschiedenen Bestandteilen, wobei vor allem Kollagene, Elastin, Laminine, Fibronectin und unterschiedliche Glykoproteine den Hauptanteil ausmachen (Abbildung 8).

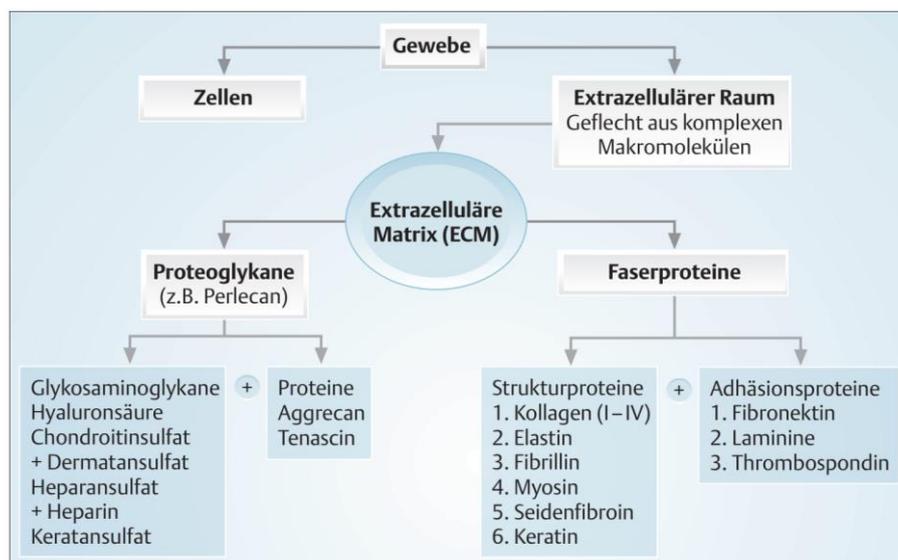


Abbildung 8: Übersicht über die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.<sup>[61]</sup>

Die EZM dient den Zellen im Gewebe nicht nur als mechanische Stütze, sondern hat auch einen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Wachstum, Migration und Differenzierung.<sup>[62,63]</sup> Den Hauptteil der EZM machen Faserproteine wie das Kollagen aus, von dem aktuell über 14 verschiedene Typen bekannt sind.<sup>[63]</sup> Durch ihre trippel-helikale Struktur bilden Kollagene große Fasern aus, welche die mechanische Steifigkeit der EZM maßgeblich bestimmen.<sup>[64]</sup> Da viele Gewebetypen für ihre Funktion auch von ihrer Elastizität abhängig sind (Lunge, Blutgefäße, Herz), stellt Elastin die zweitwichtigste Art von strukturgebenden Faserproteinen in der EZM dar.<sup>[60]</sup>

Zum Aufbau von dreidimensionalen Strukturen in einem Gewebe ist die Interaktion zwischen Zellen und der EZM von elementarer Bedeutung.<sup>[65]</sup> Auch wenn fast alle EZM-Bestandteile in gewissem Maße mit den Proteinen von Zelloberflächen interagieren, so gibt es einige Komponenten, die dies besonders effektiv tun, die sogenannten Adhäsionsproteine (Fibronektin, Laminin).<sup>[61]</sup> Verantwortlich für die erhöhte Zell-Matrix Interaktion dieser Proteine sind spezielle Aminosäuresequenzen an der Oberfläche dieser Proteine. Ein prominentes Beispiel für eine solche Sequenz ist die sogenannte RGD-Sequenz des Fibronektins.<sup>[66]</sup> Die RGD-Sequenz hat dabei nicht nur einen Einfluss auf die Viabilität, Proliferation und das Migrationsverhalten der Zellen, sondern führt vor allem zur Zelladhäsion, indem es von den Integrinen auf der Zelloberfläche erkannt wird.<sup>[67]</sup>

### **1.4.1. Integrine**

Integrine gehören zu den wichtigsten und am besten erforschten Zelladhäsionsrezeptoren einer Zelle.<sup>[68]</sup> Sie sind heterodimere, bidirektionale Transmembranproteine, welche aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Aktuell sind 24 verschiedene Integrinsubtypen bekannt, welche sich jeweils aus einer von 18 verschiedenen  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen.<sup>[66,69,70]</sup> Beim Menschen befinden sich auf nahezu jedem Zelltyp verschiedene Integrinsubtypen, welche ein wichtiges Bindeglied zwischen der Zelle und Proteinen der EZM darstellen (Abbildung 9).<sup>[70,71]</sup>

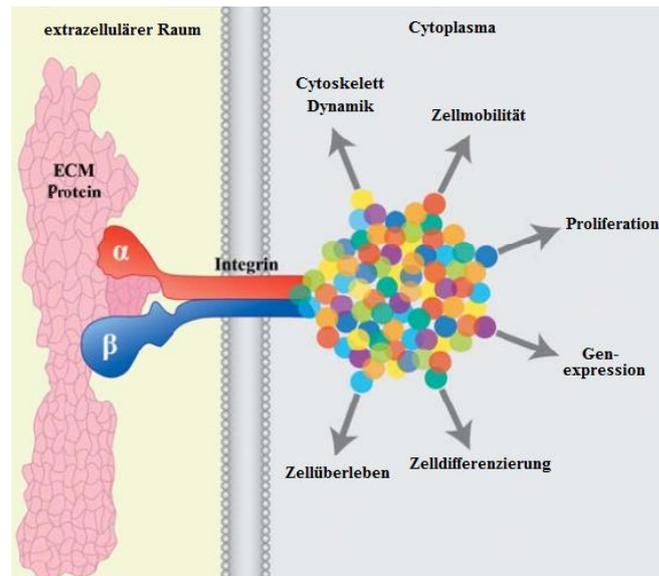


Abbildung 9 Übersicht über den Aufbau und die Funktionen eines Integrins. (Modifiziert aus [70])

Die grundlegende Affinität von Integrinen gegenüber extrazellulären Liganden werden über zwei verschiedene Mechanismen gesteuert. Eine Art der Aktivierung ist die sogenannte „Inside-out“-Aktivierung, wobei interzelluläre Salzbrücken zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der zytoplasmatischen Domäne der Integrine aufgelöst werden. Dies führt zu einer Destabilisierung des Ruhezustands des Integrins, wodurch es in seine aktive Form überführt wird (Abbildung 10).<sup>[72]</sup>

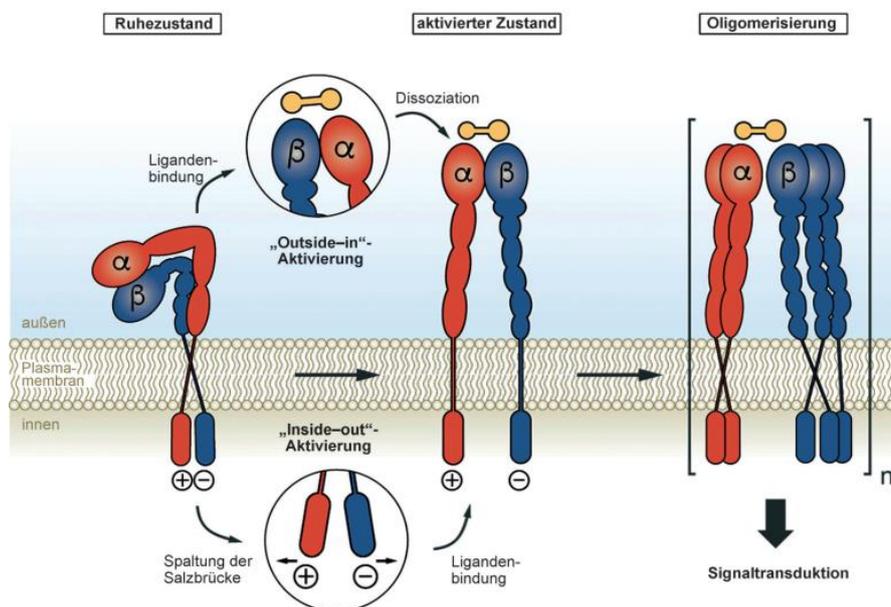
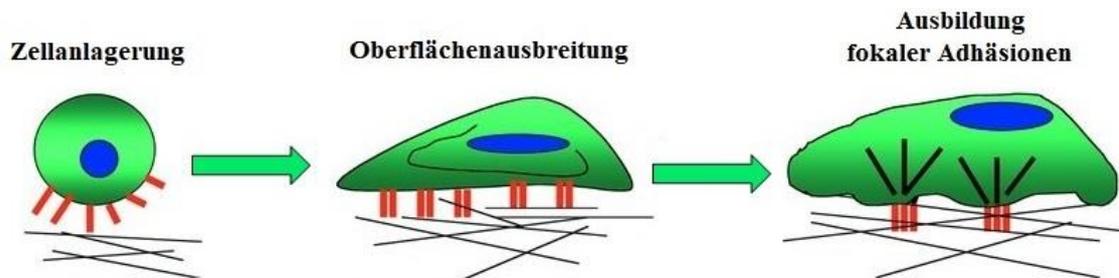


Abbildung 10 Darstellung der Mechanismen der Integrin-vermittelten Zelladhäsion.<sup>[69]</sup>

Integrine können ebenfalls durch die Bindung eines extrazellulären Liganden aktiviert werden. Dieser zweite Mechanismus wird als „Outside-in“-Aktivierung bezeichnet. Beide Formen der Aktivierung basieren auf einer Trennung der transmembranen Helices

zwischen den beiden Integrinuntereinheiten, welche zu einer Oligomerisierung und interzellulären Phosphorylierung der jeweiligen Untereinheiten führt.<sup>[66,68,73]</sup> Über eine dieser beiden Aktivierungsmechanismen ist es Integrinen möglich, Zell-Zell oder Zell-EZM Adhäsion zu vermitteln. Die integrinvermittelte Zelladhäsion läuft über vier grundlegende Schritte ab (Abbildung 11). Im ersten Schritt der Zellanlagerung baut die Zelle einen Kontakt zum Bindungspartner auf und es kommt zur Ausbildung erster Integrin-Liganden-Bindungen. Im zweiten Schritt beginnt die Zelle ihre Plasmamembran entlang der Bindungsoberfläche auszubreiten, wodurch die Zelle sich verflacht. Während des dritten Schrittes, der Organisation des interzellulären Aktinzytoskeletts, ordnen sich eine Vielzahl von Aktinfasern zu einer sogenannten Stressfaser zusammen. Der letzte Schritt der Zelladhäsion ist die Ausbildung von fokalen Adhäsionen, welche das Aktin-Zytoskelett der Zelle mit dem extrazellulären Liganden fest verbinden.<sup>[66,74]</sup>



**Abbildung 11** Darstellung einer Integrin vermittelten Zelladhäsion an eine Oberfläche.<sup>[66]</sup>

Fokale Adhäsionen bestehen aus den bei der Aktivierung oligomerisierten Integrinuntereinheiten und über 50 verschiedenen angelagerten Molekülen, wie zum Beispiel Lipiden oder fokalen Adhäsionskinasen.<sup>[66,69]</sup> Über fokale Adhäsionen können Zellen, die durch intramolekulare Aktin-faserkontraktion aufgebaute mechanische Kraft auf Bestandteile der EZM übertragen, wodurch es der Zelle möglich ist sich zu bewegen.<sup>[75,76]</sup>

## 1.4.2. Integrinspezifität

Die Kombination der Integrinuntereinheiten bestimmt die Ligandenspezifität des Integrins. So zeigen Integrine des Typs  $\alpha_v\beta_3$  eine hohe Bindungsaffinität gegenüber einer Vielzahl von Proteinen der EZM, wie zum Beispiel Fibronectin, Vitronectin, Stepaschin und Thrombospondin. Gleichzeitig gibt es auch Proteine der EZM, die gegenüber einer Vielzahl verschiedener Integrin-subtypen eine Bindungsaffinität aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist das Protein Fibronectin.<sup>[66,69]</sup> Untersuchungen an solchen integrin-affinen Proteinen haben gezeigt, dass die Bindung an Integrine hauptsächlich durch kleine Erkennungssequenzen auf den Proteinen hervorgerufen werden. Diese Erkennungssequenzen bestehen dabei aus

einigen wenigen Aminosäuren.<sup>[4,66]</sup> Die bekannteste und am besten erforschte Erkennungssequenz ist die RGD-Sequenz des Fibronektins.<sup>[69]</sup>

### 1.4.3. Integrinaffine Liganden

Das RGD-Motiv, abgeleitet aus den Ein-Buchstaben Codes der drei Aminosäuren Arginin (**R**), Glycin (**G**) und Asparaginsäure (**D**), wurde 1984 von PIERSCHBACHER und ROUSLATHI als essentielle Peptidsequenz zur Zelladhäsion von Fibronektin identifiziert.<sup>[77]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass RGD an etwa die Hälfte aller bekannten Integrinsubtypen anbindet, wodurch es zwar nicht die universelle Zellerkennungssequenz ist, jedoch trotzdem das Adressieren eines breiten Spektrums an Integrinsubtypen ermöglicht.<sup>[4,66]</sup>

Auch wenn das RGD-Motiv an sich für seine Bindungsaffinität gegenüber Integrinen bekannt war, machten frühe Studien bereits deutlich, dass die reine RGD-Sequenz außerhalb eines Proteins keinerlei Aktivität gegenüber Integrinen aufweist.<sup>[77]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass neben den drei zentralen Aminosäuren des RGD-Motivs auch die räumliche Anordnung dieser eine wichtige Rolle spielt. Das Hinzufügen von weiteren flankierenden Aminosäuren als Umgebung für die RGD-Sequenz führte zu einer räumlichen Strukturierung, wodurch eine deutliche Steigerung der Bindungsaffinität gegenüber Integrinen erreicht werden konnte. Die verschiedenen RGD-Peptide wiesen dabei nicht nur verschiedene Aktivitäten, sondern auch Selektivitäten gegenüber bestimmten Integrinsubtypen auf.<sup>[66,68,78]</sup>

Alternativ zur Verwendung von Peptidsequenzen, welche in den integrinaffinen Regionen von natürlichen Proteinen identifiziert wurden, können auch synthetisch hergestellte Moleküle als Integrinliganden verwendet werden, die sogenannten Peptidmimetika.<sup>[79]</sup>

## 2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung des von BOLDUAN eingeführten thiolhaltigen Polymersystems als Grundlage der Hydrogelsynthese für eine Anwendung in 2D- und 3D-Zellexperimenten.<sup>[80]</sup> Die Arbeit gliedert sich in zwei Hauptteile auf, welche sich hauptsächlich in der Anwendung zwei verschiedener Vernetzersysteme zur Ausbildung der Polymernetzwerke unterscheiden.

Im ersten Ergebniskapitel dieser Arbeit (Kapitel 3, Seite 17 ff.) sollte die Verwendung eines Poly(ethylenglykol)-basierten Vernetzers zur Ausbildung von Hydrogelen untersucht werden. Dabei stand, neben der Herstellung und Charakterisierung der thiolhaltigen Präpolymere und des Vernetzers, die Optimierung des Herstellungsprozesses der Hydrogele im Vordergrund. Um später eine möglichst genaue Kontrolle über die Eigenschaften der hergestellten Hydrogele zu erhalten, sollte der Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Geleigenschaften untersucht und quantifiziert werden. Mithilfe des Wissens über die Kontrolle der Geleigenschaften sollte das Hydrogelsystem dann erste Anwendung in exemplarischen Zellexperimenten an COS-7-Zellen finden. Dabei galt es, neben der Verifizierung der Biokompatibilität des Systems, auch den Einfluss der Geleigenschaften auf das Adhäsionsverhalten der Zellen zu untersuchen.

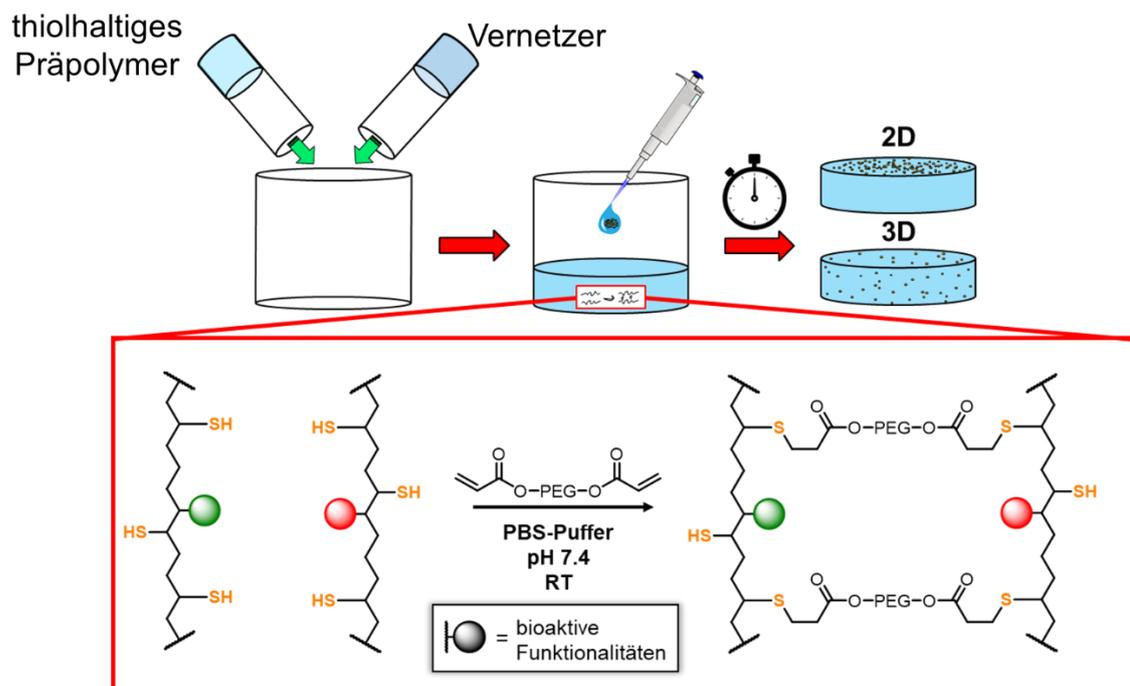
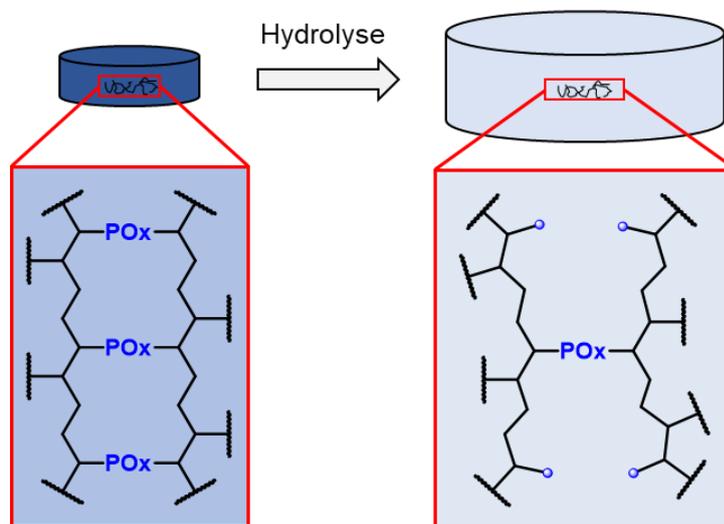


Abbildung 12: Überblick über das verwendete Hydrogelsystem und den allgemeinen Ablauf der Gelpräparation.

Im zweiten Ergebniskapitel (Kapitel 4, Seite 65 ff.) sollte ein neues Vernetzersystem auf der Basis von Poly(2-oxazolin) hergestellt und charakterisiert werden. Dabei galt es die Charakteristika der kationischen Ringöffnungspolymerisation zu nutzen, um hydrolytisch labile Funktionalitäten in die Vernetzer einzubauen, sodass diese unter Zellkulturbedingungen Abbauverhalten aufweisen. Um dies zu realisieren, sollte zuerst ein geeignetes Polymersystem etabliert und dessen Synthese optimiert werden. Mithilfe der neuen Vernetzer sollten dann Hydrogele hergestellt und charakterisiert werden, wobei der Einfluss des Vernetzers auf die mechanischen Eigenschaften und das Abbauverhalten der erhaltenen Gele im Vordergrund stand. Im Anschluss galt es dann die Biokompatibilität der Systeme, sowie deren Abbauprodukte, zu überprüfen und die Eignung der Systeme für eine Zellanwendung in 2D und 3D zu verifizieren.



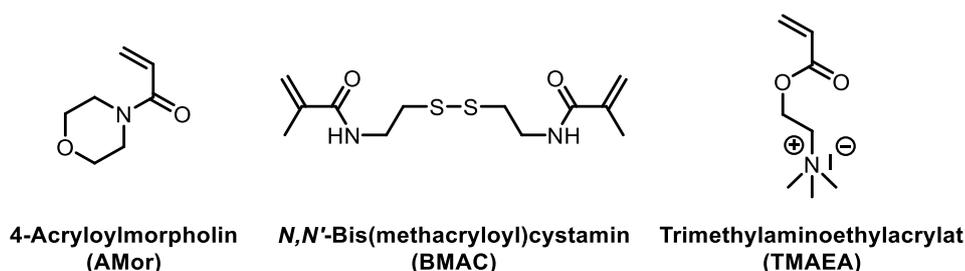
**Abbildung 13:** Beispielhafte Darstellung für den hydrolytischen Abbau eines Oxazolinvernetzers in einem Hydrogel; **POx** = Poly(oxazolin)-Vernetzer.

### 3. Hydrogele auf der Basis von Polyethylenglykol-Vernetzern

#### 3.1. Aufbau des Hydrogelsystems

Das in dieser Arbeit verwendete thiolhaltige Polymersystem basiert auf der Arbeit von PATRICK BOLDUAN, welches er im Rahmen seiner Dissertation beschrieben hat.<sup>[80]</sup> Seine Arbeit behandelt die Entwicklung und Verwendung eines acrylatbasierten Hydrogelsystems, welches durch den Einsatz von disulfidhaltigen Monomeren reversibel gespalten und vernetzt werden konnte. Im Nachfolgenden wird noch einmal auf die Charakteristika des Systems eingegangen, indem die allgemeine Herstellung der Polymere beschrieben und die Funktion der einzelnen Komponenten erläutert wird.

Die in dieser Arbeit verwendeten thiolhaltigen Präpolymere bestehen alle aus einer Kombination an drei unterschiedlichen Monomeren (Abbildung 14).

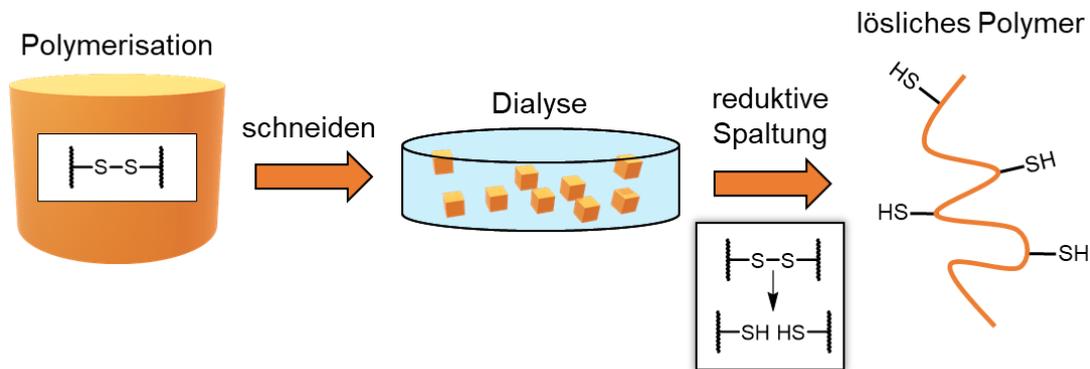


**Abbildung 14:** Übersicht über die Struktur der Monomere, welche zur Herstellung der thiolhaltigen Präpolymere verwendet wurden.

Als Hauptmonomer wurde 4-Acryloylmorpholin (**AMor**) verwendet, welches durch seine hydrophilen Eigenschaften für eine gute Wasserlöslichkeit der entstandenen Polymere sorgte, gleichzeitig aber auch eine hohe Löslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmitteln gewährleistete.<sup>[80,81]</sup> Vorhergegangene Studien an AMor-Polymeren haben zusätzlich gezeigt, dass diese ähnliche Eigenschaften wie Poly(ethylenglykol) bezüglich der Hydrolysestabilität sowie dem allgemeinen Aggregationsverhalten in Lösung aufweisen.<sup>[82]</sup> Die Verwendung von AMor sollte somit Polymere hervorbringen, welche sich gut in wässrigen Medien lösen und für die bioorthogonale Vernetzung in Anwesenheit von lebenden Zellen geeignet sind. Gleichzeitig sollte die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln die Option für diverse polymeranalogue Funktionalisierungsreaktionen offenhalten.

Als zweites Monomer wurde *N,N*-Bis(methacryloyl)cystamin (**BMAC**) verwendet. Dieses Monomer führt aufgrund seiner Bifunktionalität bei Polymerisationen zur Ausbildung von

Vernetzungspunkten. Die daraus resultierenden Netzwerke sind jedoch durch die Reduzierbarkeit der enthaltenen Disulfidbrücken spaltbar, wodurch die zunächst entstandenen Netzwerke in einzelne Polymerketten überführt werden können.<sup>[56,81,83]</sup> Das allgemeine Vorgehen bei der Verwendung solcher Polymere und die damit einhergehenden Vorteile werden im Nachfolgenden beschrieben (Abbildung 15).



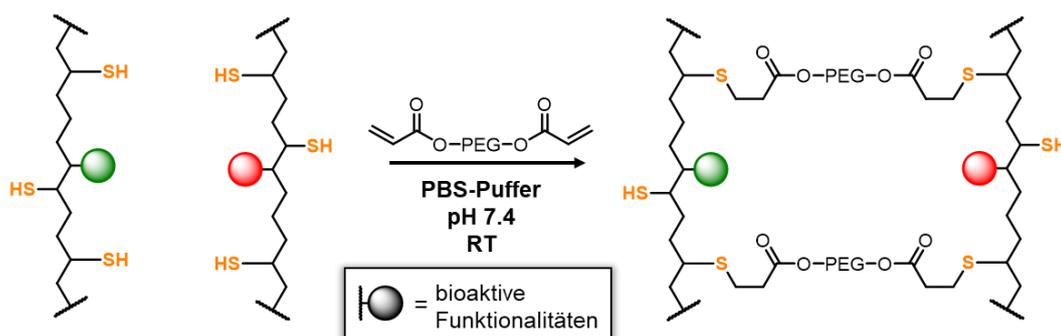
**Abbildung 15:** Übersicht über ein mögliches Vorgehen bei der Nutzung von disulfidhaltigen Vernetzern.

Zunächst werden die verwendeten Monomere polymerisiert, wodurch unlösliche Netzwerke entstehen. Diese Netzwerke werden dann mit einem Skalpell in kleinere Stücke geschnitten und für mehrere Tage gegen Wasser dialysiert. Durch die Dialyse werden Rückstände an Lösungsmitteln, Monomeren und kürzere unvernetzte Polymerketten aus dem Netzwerk entfernt. Die somit aufgereinigten Netzwerke werden dann unter Anwendung einer reduktiven Spaltung aufgetrennt, wodurch einzelne lösliche Polymerketten entstehen. Diese Polymerketten können dann mithilfe verschiedener analytischer Verfahren zum Beispiel hinsichtlich ihres Molekulargewichts oder ihrer Zusammensetzung untersucht werden. Durch das Vorhandensein von freien Thiolgruppen ist es möglich, die vorhandenen Präpolymere weiter zu funktionalisieren. Die Funktionalisierung erfolgt dabei meist mittels einer Michael-Addition, durch welche beispielsweise bioaktive Moleküle wie Peptide<sup>[84]</sup> oder Peptidmimetika<sup>[85]</sup> an den Polymeren immobilisiert werden. Durch die Nutzung dieser Funktionalisierungstechnik ist es möglich, aus einigen wenigen Polymeren ganze Bibliotheken an biofunktionalisierten Polymeren herzustellen, welche dann im Anschluss je nach Bedarf zu Hydrogelen mit den verschiedensten Eigenschaften vernetzt werden können.

Als drittes Monomer wurde Trimethylaminoethylacrylat (TMAEA) verwendet. Dieses Monomer verfügt über eine quartäre Ammonium-Endgruppe, wodurch es eine permanente kationische Ladung trägt. Durch das Einbauen dieses Monomers können somit Polymere erzeugt werden, welche in Abhängigkeit der Menge an TMAEA verschiedene

Konzentrationen an kationischer Ladung in die späteren Netzwerke einbringen können. Positiv geladene Substrate sind dafür bekannt, durch ihre Wechselwirkung mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Phospholipide in der Zellmembran die Zell-Substrat-Interaktion zu fördern und dadurch die Adhäsion der Zellen an die Substratoberfläche zu erhöhen.<sup>[38,86,87]</sup> Um dies zu nutzen werden kommerziell erhältliche Kultivierungsplatten für Zellen oft mit kationischen Polymeren, wie Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin, beschichtet.<sup>[88,89]</sup> In vorhergegangenen Studien war es SALLOUH und JAROCKI *et al.* zusätzlich möglich, einen synergistischen Effekt der kationischen Ladung in Kombination mit einem RGD-Peptid zu beobachten, welcher zu einer Erhöhung der Zelladhäsion von embryonalen neuralen Stammzellen an biofunktionalisierte Hydrogele geführt hat.<sup>[90]</sup>

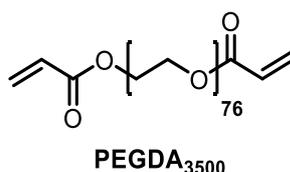
Durch die Nutzung und Kombination dieser drei Monomere sollten im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl verschiedener thiolhaltiger Präpolymere hergestellt werden. Durch ihre Variation im Thiolgehalt, Kationikanteil sowie der Funktionalisierung mit Peptiden sollten sie genutzt werden, um eine kleine Polymerbibliothek aufzubauen, welche im späteren Teil dieser Arbeit zum schnellen und effektiven Screening von verschiedenen Parametern in Zellexperimenten genutzt werden kann. Im Gegensatz zum Hauptfokus der Arbeit von BOLDUAN sollte die Vernetzung der Präpolymere im Rahmen dieser Arbeit nicht über die Reoxidation und Wiederherstellung der Disulfidbrücken erfolgen, sondern durch den Einsatz von Michael-Akzeptor-endgruppenfunktionalisierten Polymeren in einer Michael-Addition (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Hydrogelsystems. Thiolhaltige biofunktionalisierte Präpolymere werden mittels Michael-Addition von PEGDA vernetzt.

Im ersten Teil dieser Arbeit liegt der Fokus dabei auf der Ausbildung und Untersuchung von Hydrogelnetzwerken, welche durch die Vernetzung mit Poly(ethylenglykol)diacrylat (**PEGDA**) hergestellt wurden. PEGDA ist in der Literatur ein weit verbreitetes und ausgiebig untersuchtes Polymer. Es findet dabei vor allem aufgrund seiner guten Biokompatibilität und seiner geringen Affinität bezüglich nicht-spezifischer

Proteinadsorption eine breite Anwendung in der Herstellung von Hydrogelen.<sup>[16,91–93]</sup> Um einen eventuellen cytotoxischen Einfluss von PEGDA in späteren Zellexperimenten möglichst auszuschließen, wurden im Rahmen der nachfolgenden Experimente ausschließlich PEGDA mit einem Molekulargewicht im Mittel von 3500 g/mol verwendet (**PEGDA<sub>3500</sub>**) (Abbildung 17). Aufgrund seines hohen Molekulargewichts liegt PEGDA<sub>3500</sub> deutlich oberhalb der in der Literatur angenommenen Aufnahmegrenze von Zellen von 1000 g/mol, wodurch es zu keiner Aufnahme in Zellen und möglicher Zelltoxizität kommen sollte.<sup>[94]</sup>

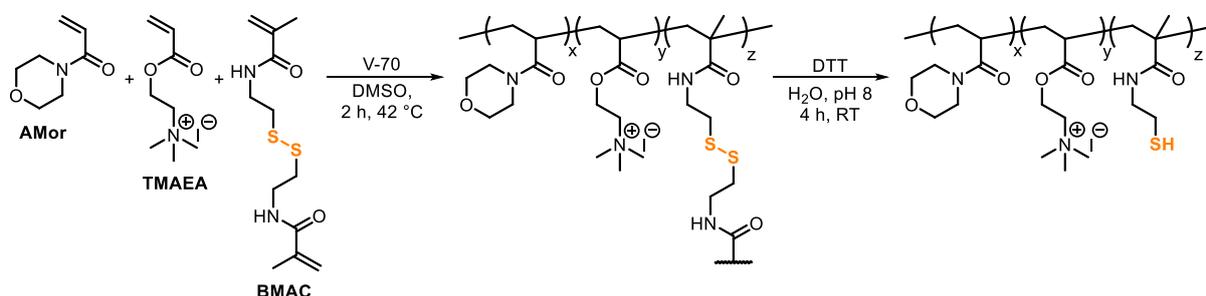


**Abbildung 17:** Strukturformel des Vernetzers PEGDA<sub>3500</sub>.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete PEGDA<sub>3500</sub> wurde durch eine Schotten-Bauman-Reaktion zwischen PEG ( $M_n = 3400$  g/mol) und Acryloylchlorid selbst hergestellt und charakterisiert. Dadurch konnte, im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Produkten, eine gleichbleibend hohe Qualität des verwendeten **PEGDA<sub>3500</sub>** gewährleistet werden.

### 3.2. Synthese der thiolhaltigen Präpolymere

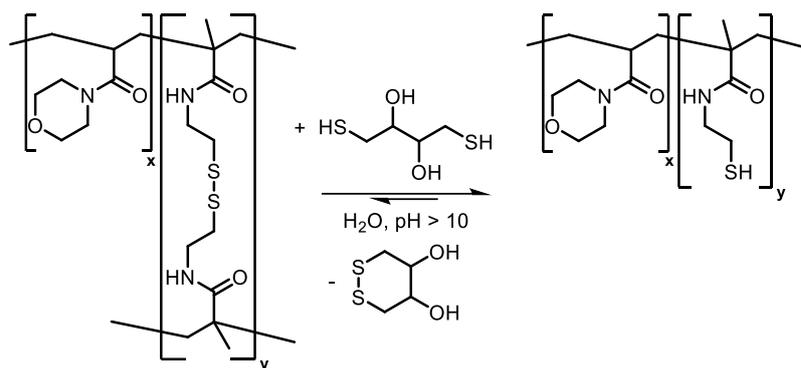
Die Synthese der thiolhaltigen Präpolymere erfolgte über drei grundlegende Hauptschritte wie zuvor unter 3.1 beschrieben und ist im Folgenden noch einmal schematisch dargestellt (Schema 1).



**Schema 1:** Syntheschema der thiolhaltigen Präpolymere.

Der erste Schritt war die Umsetzung der Monomere in einer freien radikalischen Copolymerisation. Durch die Bifunktionalität des BMACs wurden dabei direkt Netzwerke gebildet, welche im Lösungsmittel bereits gelartige Strukturen ausbildeten. Im zweiten

Schritt wurden die entstandenen Gele in kleine Stücke geschnitten und für mindestens drei Tage gegen Wasser dialysiert, wobei das Wasser mindestens zwei Mal am Tag gewechselt wurde. Durch diesen Prozess sollte Sorge getragen werden, dass jegliche Reste an organischen Lösungsmitteln, Monomeren, sowie kurzen, niedermolekularen Polymerketten aus den Gelen entfernt wurden. Nach der Aufreinigung der Netzwerke wurden die Disulfidbrücken der Netzwerke reaktiv durch den Einsatz von Dithiothreitol (**DTT**) gespalten (Schema 2).



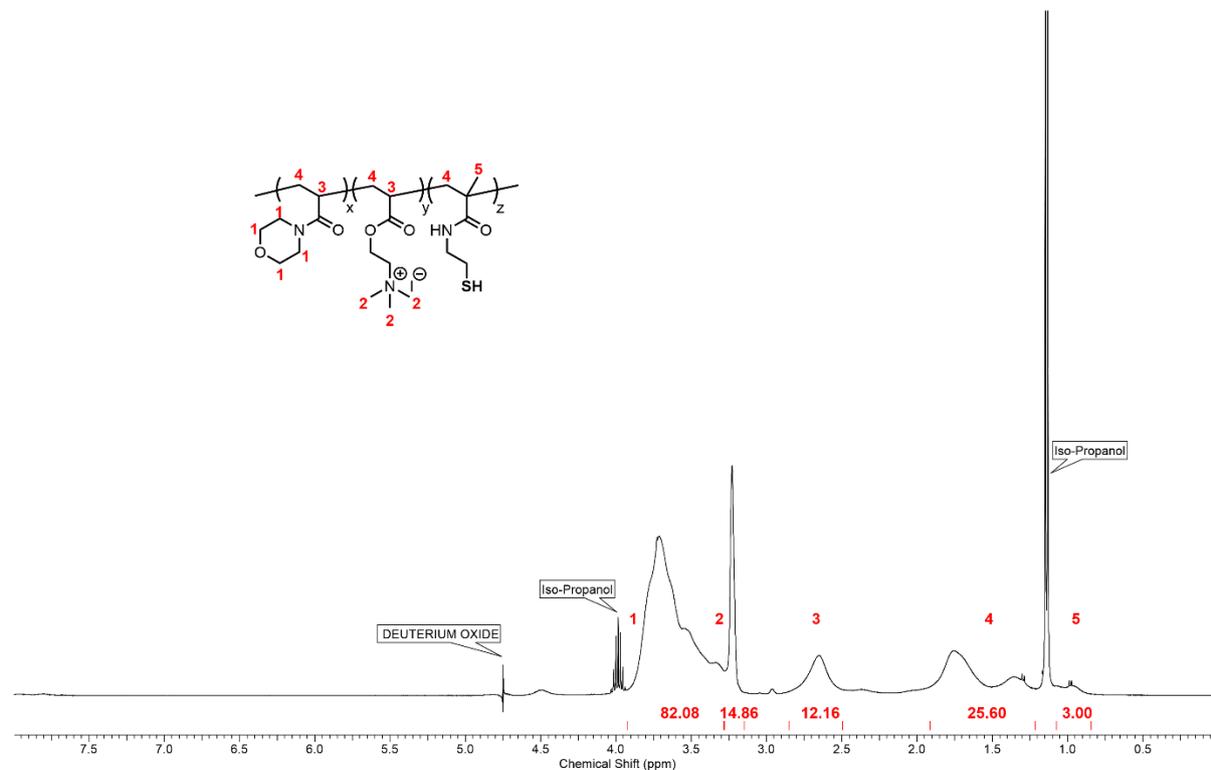
**Schema 2:** Reaktionsschema der reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken mit DTT.

Die nach der Spaltung erhaltenen Polymere lagen nun als einzelne Ketten vor, wodurch sie in diversen Lösungsmitteln löslich waren. Dies erlaubte eine ausgiebige Charakterisierung der Polymere hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihres Thiolgehalts, ihres Molekulargewichts sowie ihrer Dispersität. Im Rahmen dieser Arbeit werden im Nachfolgenden fünf Polymere mit unterschiedlicher Zusammensetzung beschrieben und charakterisiert. Zur besseren Übersicht werden zunächst die Verfahren zur Charakterisierung der Systeme beschrieben, um im Anschluss eine vollständige Auflistung der Polymerdaten darzustellen (siehe Absatz 3.2.3).

### 3.2.1. <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Die Charakterisierung der Polymerzusammensetzung erfolgte mithilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie. Dafür wurde jedem Monomer ein charakteristisches Signal zugeordnet und diese dann, unter Berücksichtigung der dem Signal zugehörigen Anzahl an Wasserstoffatomen, ins Verhältnis zueinander gesetzt (Abbildung 18). Dem AMor wurde dabei das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3,3 bis 3,9 ppm zugeordnet (**1**), welches durch die acht Wasserstoffatome des Morpholinrings hervorgebracht wurde. Dem TMAEA war ein schmales Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3,18 bis 3,27 ppm zuzuordnen (**2**), welches den neun Wasserstoffatomen der Methylgruppen am

quartären Stickstoffatom entsprach. Dem BMAC konnte ein Signal bei einer chemischen Verschiebung bei 0,85 bis 1,07 ppm zugeordnet werden (**5**), welches durch die drei Wasserstoffatome der Methylgruppe im Rückgrat des Polymers hervorgebracht wurden.



**Abbildung 18:** Beispielhaftes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines thiolhaltigen Präpolymers mit kationischer Ladung in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Um die Zusammensetzung der Polymere zu bestimmen, wurden die Signale der jeweiligen Monomere integriert und auf die Anzahl der ihnen zugeordneten Wasserstoffatome normiert (Gleichung 1). Am Beispiel des oben aufgeführten Signals **1** für AMor (Abbildung 18) ergibt sich ein normiertes Signal  $S_{\text{AMor}} = 10,26$  durch  $P_{\text{AMor}} = 82,08$  und  $n(\text{H})_{\text{AMor}} = 8$ . Analog dazu ergeben sich aus den Signalen **2** und **5** Werte von  $S_{\text{TMAEA}} = 1,65$  und  $S_{\text{BMAC}} = 0,5$ .

$$S_x = \frac{P_x}{n(\text{H})_x}$$

$S_x$ : normiertes Signal Monomers x  
 $P_x$ : integriertes Signal des Monomers x  
 $n(\text{H})_x$ : zugehörige Wasserstoffatome des Signals x

**Gleichung 1:** Normierung der Integralflächen der Monomersignale auf die Anzahl an zugeordneten Wasserstoffatomen.

Durch das Einsetzen der Werte für die normierten Signale in Gleichung 2 konnte dann der Anteil der einzelnen Monomere und die daraus resultierende Polymerzusammensetzung bestimmt werden.

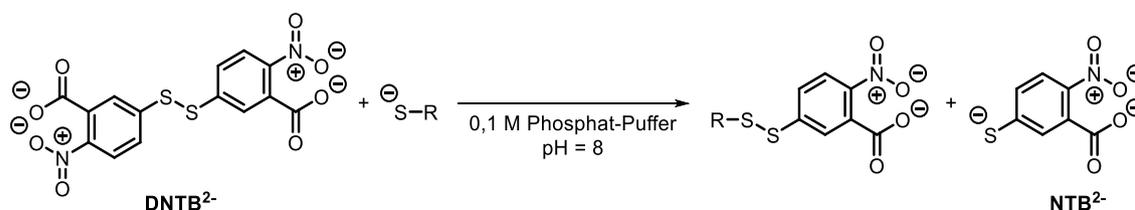
$$\text{Anteil Monomer } x \text{ [\%]} = \frac{S_x}{\sum_{k=x}^n S_k} \cdot 100$$

**Gleichung 2:** Berechnung der Monomeranteile aus den normierten  $^1\text{H-NMR}$ -Signalen.

Für das oben aufgeführte Beispiel ergibt sich somit eine Polymerzusammensetzung von 82,7% AMor, 13,3% TMAEA und 4% BMAC.

### 3.2.2. Ellman's Assay

Das Ellman's Assay ist eine kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Thiolgruppen in Lösung, welche 1958 von GEORGE L. ELLMAN publiziert wurde.<sup>[95]</sup> Die Bestimmung der Konzentration der Thiofunktionalitäten an den Polymere erfolgt dabei indirekt über die Umsetzung dieser mit dem sogenannten Ellman's Reagenz 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (**DTNB<sup>2-</sup>**) (Schema 3).



**Schema 3:** Umsetzung von **DTNB<sup>2-</sup>** mit einer Thiofunktionalität unter Freisetzung eines 2-Nitro-5-thiobenzoat-Anions.<sup>[95]</sup>

Bei der quantitativen Umsetzung von **DTNB<sup>2-</sup>** mit einer Thiofunktionalität kommt es zur Ausbildung eines gemischten Disulfids und zur Freisetzung eines 2-Nitro-5-thiobenzoat-Anions (**NTB<sup>2-</sup>**). Bei dem **NTB<sup>2-</sup>**-Anion handelt es sich um einen gelben Farbstoff, welcher eine charakteristische Absorption bei einer Wellenlänge von 412 nm aufweist. Diese erlaubt eine quantitative Bestimmung der Konzentration des **NTB<sup>2-</sup>** mittels UV-Vis-Spektroskopie und der Anwendung des LAMBERT-BEER'SCHEN Gesetzes.

Mithilfe von Gleichung 3 können aus den gemessenen Extinktionswerten, unter Berücksichtigung der Einwaage und Verdünnung, die Menge an Thiofunktionalitäten im Polymer berechnet werden.<sup>[95]</sup>

$$Y_{\text{SH}} = \frac{(E_{412} \cdot f \cdot d)}{(\varepsilon_{412} \cdot \beta)}$$

$Y_{\text{SH}}$ : Thiolbeladung Polymer [mmol mg<sup>-1</sup>]

$E_{412}$ : Extinktion bei 412 nm

$f$ : Verdünnungsfaktor

$d$ : Schichtdicke der Küvette [cm]

$\varepsilon_{412}$ : Extinktionskoeffizient bei 412 nm [mL mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>]

$\beta$ : Massenkonzentration Polymer [mg mL<sup>-1</sup>]

**Gleichung 3:** Berechnung des Thiolgehalts der Polymere aus den Ergebnissen des Ellman's Assays.

### 3.2.3. Vollständige Polymerdaten

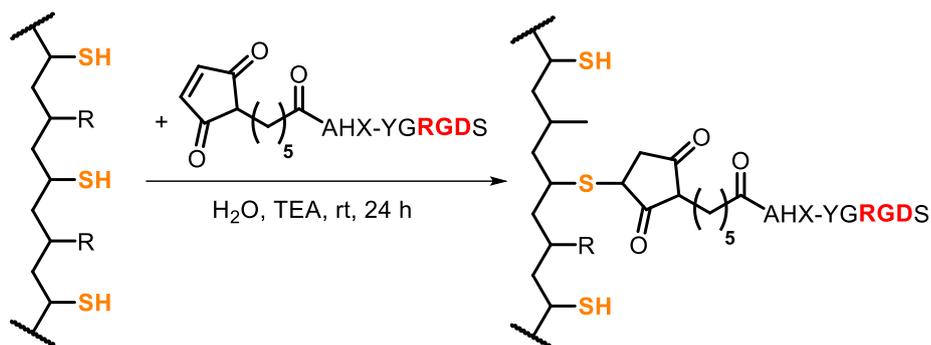
Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Polymere beschrieben, welche in späteren Experimenten Anwendung fanden. Diese wurden, gemäß den oben beschriebenen Methoden, synthetisiert (Abschnitt 3.2) und charakterisiert (Abschnitt 3.2.1; 3.2.2). Die vollständigen Daten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die analytischen Daten der Copolymere **P<sub>SH1</sub>** bis **P<sub>SH5</sub>**.

| Polymer          | AMor/TMAEA/BMAC [mol%] |                                 | $M_n^c$ [g/mol] | $D^c$          | $Y_{\text{SH}}$ [mmol/g] |                       |
|------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|-----------------------|
|                  | Theorie <sup>a</sup>   | <sup>1</sup> H-NMR <sup>b</sup> |                 |                | Theorie <sup>d</sup>     | gemessen <sup>e</sup> |
| P <sub>SH1</sub> | 96/0/4                 | 95,9/0/4,1                      | 21200           | 2,28           | 0,546                    | 0,574                 |
| P <sub>SH2</sub> | 64/32/4                | 64,6/31,6/3,8                   | 17900           | 2,52           | 0,424                    | 0,398                 |
| P <sub>SH3</sub> | 32/64/4                | 41,1/55,2/3,7                   | 14300           | 2,18           | 0,317                    | 0,287                 |
| P <sub>SH4</sub> | 0/96/4                 | 0/95,8/3,7                      | - <sup>f</sup>  | - <sup>f</sup> | 0,292                    | 0,297                 |
| P <sub>SH5</sub> | 93,5/0/6,5             | 93,4/0/6,6                      | 33200           | 2,70           | 0,862                    | 0,893                 |

**a:** ermittelt aus den in der Polymerisation eingesetzten Äquivalenten der Monomere; **b:** ermittelt durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie; **c:** ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard; **d:** ermittelt aus den in der Polymerisation eingesetzten Äquivalenten der Monomere unter Berücksichtigung von Gleichung 3; **e:** ermittelt durch Ellman's Assay unter Verwendung von Gleichung 3; **f:** Polymer konnte aufgrund der Unlöslichkeit im GPC-Laufmittel nicht gemessen werden.

Um bei der späteren Gelbildung eine möglichst freie Kontrolle über die Konzentration an kationischen Funktionalitäten zu haben, wurden vier Polymere mit einem variierenden TMAEA-Anteil hergestellt (**P<sub>SH1-4</sub>**). Dabei wurden TMAEA-Anteile von 0 mol% bis 95,8 mol% realisiert. Ein zusätzliches Polymer (**P<sub>SH5</sub>**) wurde mit einem leicht erhöhten BMAC-Anteil von 6,6 mol% hergestellt, wodurch eine erhöhte Menge an freien Thiofunktionalitäten an dem Polymer vorlag. Diese erhöhte Thiolmenge wurde zur Funktionalisierung mit dem bioaktiven RGD-Peptid genutzt, indem ein Teil der Thiofunktionalitäten des Polymers in einer Michael-Addition mit einem Maleimid-funktionalisiertem Peptid umgesetzt wurde (Schema 4).



**Schema 4:** Beispielhaftes Schema für die partielle Funktionalisierung eines Präpolymers mit einem RGD-Peptid.

Die in Tabelle 1 dargestellten Daten zeigen, dass die ermittelten Zusammensetzungen der Polymere gut mit den theoretisch erwarteten Werten übereinstimmten. Lediglich  $P_{SH3}$  zeigte eine leichte Abweichung bezüglich des AMor/TMAEA-Anteils ( $\pm 10$  mol%), welche jedoch für die weiteren Experimente keine großen Probleme darstellte.

Die mittels GPC bestimmten molaren Massen der Polymere lagen in einem Bereich zwischen 33,2 kg/mol und 14,3 kg/mol. Auffällig war dabei, dass die Molmasse der Polymere mit steigendem TMAEA-Gehalt abnahm. Als möglicher Grund dafür wurde die Beschaffenheit der verwendeten GPC-Säulen und des Laufmittels vermutet. Es hat sich gezeigt, dass mit steigendem TMAEA-Anteil die Löslichkeit des Polymers im GPC-Laufmittel (DMF + 5% LiBr) zunehmend abnahm. Durch die abnehmende Löslichkeit war es wahrscheinlich, dass sich ein Teil der längeren Polymerketten nicht richtig gelöst hat und durch das Filtrieren der Probe vor dem Auftragen auf die GPC abgetrennt wurde. Dies zeigte sich vor allem bei Polymer  $P_{SH4}$ , welches sich kaum mehr in dem Laufmittel lösen ließ, und somit nicht auf die GPC-Säule aufgetragen werden konnte. Die dadurch erhaltenen Elugramme könnten einer gewissen Massendiskriminierung unterlegen haben, wodurch die ermittelten Molmassen geringer ausgefallen sein könnten als es der Realität entsprach. Zusätzlich wurden die Retentionszeiten der Polymere mit einer Kalibriergeraden eines PMMA-Standards verglichen, welcher aufgrund seiner neutralen Ladung mit steigendem TMAEA-Anteil der hergestellten Polymere immer weniger geeignet für die Messung war. Durch die spätere Vernetzung der Polymere sollte deren Molmasse keinen negativen Effekt auf die erhaltenen Gele haben, solange die Molmasse nicht zu gering ist und statistisch gesehen nicht genug Thiole an einer Kette vorhanden sind, um eine effektive Vernetzung der Ketten untereinander zu gewährleisten. Die Dispersitäten der Polymere lagen in einem Bereich von 2,18 und 2,7, und entsprachen somit den in der Regel erhaltenen Werten für eine freie radikalische Polymerisation.<sup>[96]</sup>

Bei der Betrachtung der Thiolbeladung ( $Y_{SH}$ ) wurden die mittels Ellman's Assay ermittelten Werte mit denen verglichen, welche sich durch die theoretisch eingesetzten Verhältnisse der Monomere ergeben hätten. Dabei konnten für alle fünf Polymere sehr hohe Übereinstimmungen zwischen den theoretischen und den gemessenen Werten festgestellt werden.

### 3.3. Synthese und Charakterisierung der Hydrogele

Durch die Herstellung der verschiedenen Polymere konnte eine Polymerbibliothek aufgebaut werden. Diese sollte nun zur Herstellung verschiedener Hydrogelsysteme verwendet werden. Das allgemeine Vorgehen zur Präparation der Gele ist dabei im Nachfolgenden dargestellt (Abbildung 19).

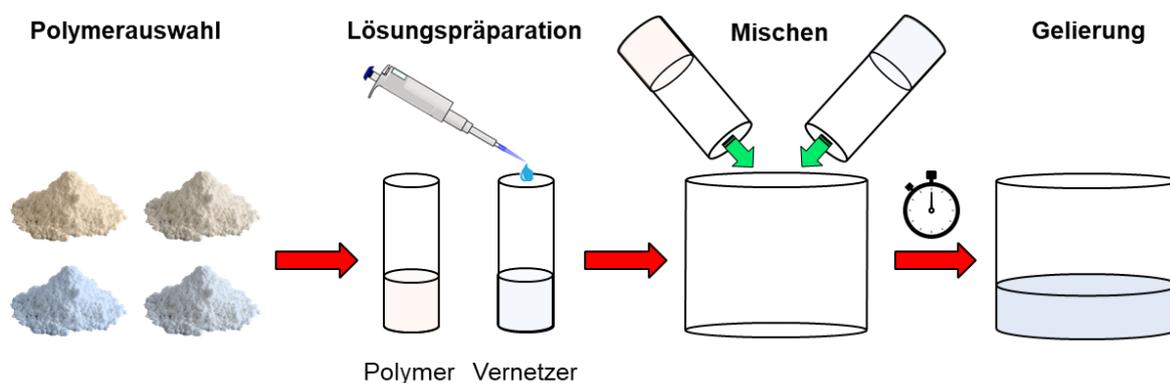


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Hydrogelpräparation.

Zur Herstellung der Hydrogele wurden zunächst Stammlösungen der verschiedenen thioleffunktionalisierten Präpolymere (**P<sub>SH1-4</sub>**), sowie des Vernetzers **PEGDA<sub>3500</sub>** durch das Lösen in 0,01 M PBS-Puffer hergestellt. Diese Lösungen wurden dann auf einen pH-Wert von 7,4 nachjustiert, um einen kontrollierten Ablauf der Michael-Addition zu gewährleisten. Entsprechend der gewünschten Eigenschaften der späteren Hydrogele wurden dann Aliquots der jeweiligen Präpolymerstammlösungen kombiniert, um die fertigen Präpolymerlösungen zu erhalten. Diese wurden dann mit einem Aliquot der **PEGDA<sub>3500</sub>**-Stammlösung vermischt und in eine zylindrische Vertiefung überführt. Durch das Mischen der Lösungen konnte die Reaktion zwischen den Thiolen der Präpolymere und den Acrylatgruppen des **PEGDA<sub>3500</sub>** ablaufen, wodurch eine Vernetzung der Polymere und die damit einhergehende Gelierung stattfand. Um den vollständigen Ablauf der Reaktion zu gewährleisten, wurden die Gele für zwölf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gele wurden dabei mit etwas Parafilm abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Hydrogele aus den zylindrischen Vertiefungen gelöst und vor der weiteren Untersuchung für mindestens 24 Stunden bei 37 °C in 0,01 M PBS-Puffer inkubiert. Die Gele wurden dann bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften (Stabilität, E-Modul) sowie ihrer Quelleigenschaften und ihres Gelanteils untersucht.

### 3.3.1. Rheologie und Quellverhalten

Um die Gele hinsichtlich ihrer Festkörpereigenschaften zu charakterisieren, wurden Oszillationsexperimente mithilfe eines Rheometers durchgeführt. Bei diesen Experimenten wird eine Schubspannung in sinusförmigen Amplituden auf das Gel appliziert (Gleichung 4), was, in Abhängigkeit des viskosen Anteils des Gels, zu einer verzögerten Scherantwort führt (Gleichung 5).<sup>[97,98]</sup>

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega \cdot t) \text{ mit } \tau = \frac{F}{A}$$

$\tau$ : Schubspannung  
 $\omega$ : Winkelfrequenz  
 $t$ : Zeit  
 $F$ : Kraft  
 $A$ : Fläche

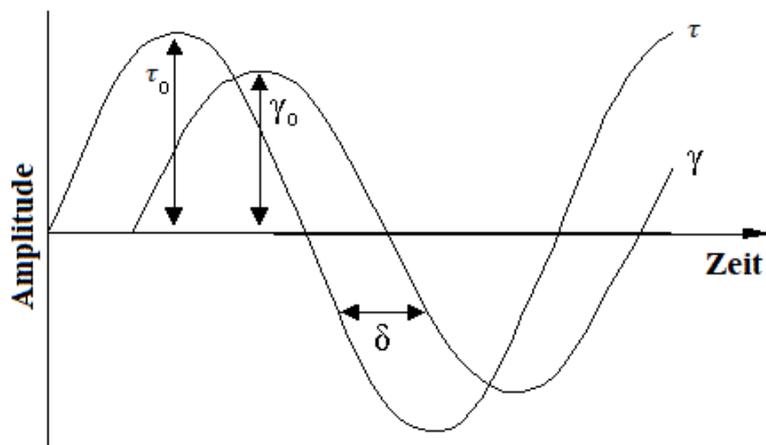
**Gleichung 4:** Sinusförmige Schubspannung, welche auf das Gel appliziert wird.

$$\gamma(t) = \tau_0 \cdot (\sin(\omega \cdot t + \delta))$$

$\gamma$ : Scherantwort  
 $\delta$ : Phasenwinkel

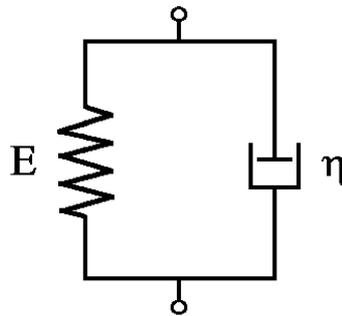
**Gleichung 5:** Die durch die Gele übertragene Scherantwort.

Die Scherantwort  $\gamma$  ist um den Phasenwinkel  $\delta$  ( $0^\circ < \delta < 90^\circ$ ) verschoben, welcher als Maß für das Verhältnis zwischen den viskosen und den elastischen Eigenschaften eines Materials dient (Abbildung 20).



**Abbildung 20** Übersicht über das Verhalten einer sinusförmigen Amplitude einer angelegten Schubspannung sowie deren Scherantwort in einem rheologischen Oszillationsexperiment (modifiziert aus <sup>[99]</sup>).

Bei einem ideal-viskosen Material kommt es zu einer maximalen Verzögerung der Scherantwort, was zu einem Phasenwinkel von  $90^\circ$  führt. Diese Materialien werden als NEWTON'sche Flüssigkeiten bezeichnet und über das sogenannte NEWTON-Modell beschrieben. Bei einem ideal-elastischen Material beträgt der Phasenwinkel aufgrund der direkten Scherantwort  $0^\circ$ . Diese Materialien werden mithilfe des HOOK'schen Modells beschrieben. Für jegliche Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  wird von einem viskoelastischen Material gesprochen, welches sich durch verschiedene Modelle, wie zum Beispiel das KELVIN-Modell oder das MAXWELL-Modell, beschreiben lassen. Da das KELVIN-Modell vor allem das Verhalten von viskoelastischen Festkörpern zeichnet, wird es im nachfolgenden näher betrachtet.<sup>[1,48,100]</sup>



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung des KELVIN-Modells.

Beim KELVIN-Modell werden sowohl die ideal-viskosen als auch die ideal-elastischen Eigenschaften eines Materials betrachtet. Dafür werden das HOOK'sche Modell und das NEWTON'sche Modell parallelgeschaltet. Durch das Anlegen einer Schubspannung auf einen Festkörper reagieren nun beide Modelle gleichzeitig. Der HOOK'sche Teil des Modells reagiert wie eine elastische Feder, wohin gegen der NEWTON'sche Teil die Feder bremst und es nur zu einer zeitlich verzögerten Verformung des Festkörpers kommt. Dieser Zusammenhang lässt sich dabei wie folgend beschreiben (Gleichung 6):<sup>[98]</sup>

$$\tau_0(t) = \tau_H + \tau_N$$

$\tau_0$ : Gesamtschubspannung  
 $\tau_H$ : Schubspannung HOOK'scher Teil  
 $\tau_N$ : Schubspannung NEWTON'scher Teil

**Gleichung 6:** Beschreibung der Gesamtschubspannung im KELVIN-Modell.

Bezüglich des HOOK'schen Teils kann über das HOOK'sche Modell unter Berücksichtigung von Gleichung 4 der Zusammenhang zur Scherantwort des Systems hergestellt werden (Gleichung 7).

$$\tau_H(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t)$$

$G_H$ : Schubmodul der HOOK'schen Feder  
 $\gamma_0$ : Deformationsamplitude

**Gleichung 7:** Beschreibung des HOOK'schen Teils der Schubspannung.

Der NEWTON'sche Teil der Schubspannung lässt sich wie folgend beschreiben (Gleichung 8):

$$\tau_N(t) = \eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

$\eta$ : Viskosität

**Gleichung 8:** Beschreibung des NEWTON'schen Teils der Schubspannung.

Durch die Parallelschaltung der beiden Teile im KELVIN-Modell ergibt sich daher für die Gesamtschubspannung folgende Beziehung (Gleichung 9):

$$\tau_0(t) = G_H \cdot \gamma_0 \cdot \sin(\omega \cdot t) + \eta \cdot \gamma_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

**Gleichung 9:** Ausführliche Beschreibung des Gesamtschubs unter Berücksichtigung der beiden parallel geschalteten Teile.

Eine weitere bezeichnende Größe ist das komplexe Schubmodul  $G^*$  welcher sich wie folgend beschreiben lässt (Gleichung 10):

$$G^* = G' + i \cdot G'' = \frac{\tau^*}{\gamma^*} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot e^{i \cdot \delta}$$

$G^*$ : komplexer Schubmodul  
 $G'$ : Speichermodul  
 $G''$ : Verlustmodul  
 $\tau^*$ : komplexe Schubspannung  
 $\gamma^*$ : komplexe Schubantwort

**Gleichung 10:** Beschreibung des komplexen Schubmoduls.

Ausgehend von Gleichung 10 können dann mithilfe der EULER'schen Formel das Speichermodul  $G'$  (Gleichung 11) und das Verlustmodul  $G''$  (Gleichung 12) in Abhängigkeit der Schubspannung und der Deformationsamplitude dargestellt werden.

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \cos(\delta)$$

**Gleichung 11:** Beschreibung des Speichermoduls.

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cdot \sin(\delta)$$

**Gleichung 12:** Beschreibung des Verlustmoduls.

Das Speichermodul beschreibt dabei die elastische Komponente und das Verlustmodul beschreibt die viskose Komponente der untersuchten Materialien. In der Literatur wird daher oftmals auch der sogenannte Verlustfaktor  $\tan(\delta)$ , welcher sich als Quotient von  $G''$  und  $G'$  darstellen lässt, verwendet (Gleichung 13).

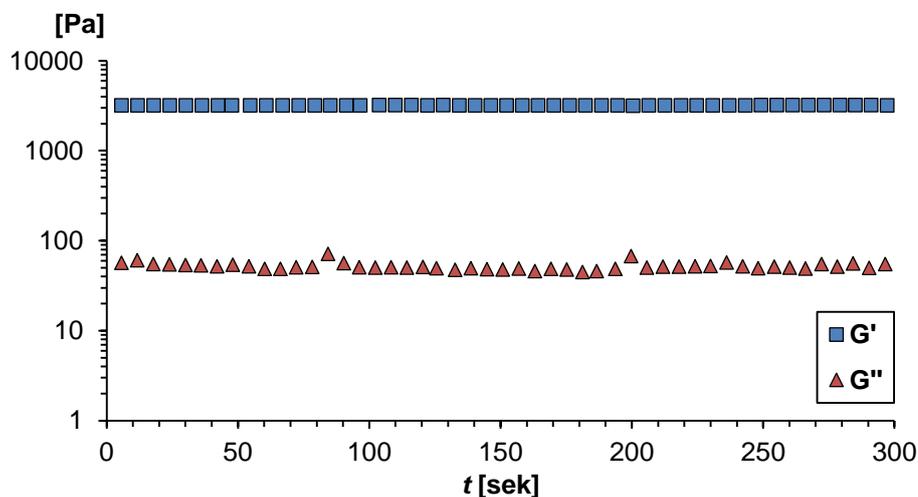
$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$

$\tan(\delta)$ : Verlustfaktor

**Gleichung 13:** Beschreibung des Verlustfaktors.

Im Allgemeinen wird bei einem  $\tan(\delta)$  von kleiner als 1 von einem eher elastischen Material und bei einem  $\tan(\delta)$  von größer als 1 von einem eher viskosen Material gesprochen. Bei der Betrachtung von Hydrogelen in rheologischen Experimenten kann ein Material erst als „Gel“ bezeichnet werden, wenn der Verlustfaktor dieser kleiner als 1 ist. Bei einem Verlustfaktor oberhalb von 1 kann als solches nicht von einem „Gel“ gesprochen werden.<sup>[100]</sup>

Die in dieser Arbeit hergestellten Hydrogele wurden nach einer Inkubationszeit von mindestens 24 Stunden bei 37 °C in 0,01 M PBS-Puffer auf das Rheometer überführt und für circa fünf Minuten bei konstanter Schubspannung von 1% Normalkraft und 1% Deformation untersucht. Zum Nachweis der mechanischen Stabilität der Gele wurden die Ergebnisse dieser Messungen für  $G'$  und  $G''$  gegen die Zeit aufgetragen. Dies wurde im Nachfolgenden beispielhaft anhand eines verwendeten Hydrogelsystems dargestellt (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Beispielhafte Messdaten eines rheologischen Oszillationsexperiments für ein PEGDA-vernetztes Hydrogel mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL.

Wie in der Abbildung zu erkennen, waren die Werte für das Speichermodul und das Verlustmodul über den gesamten Zeitraum der Messung konstant. Dies hat gezeigt, dass die Gele auch bei leichter mechanischer Belastung vollständig stabil geblieben sind. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass der Wert für das Speichermodul deutlich größer war als der Wert des Verlustmoduls, wodurch hier definitionsgemäß ein Gel vorlag.

Eine weitere Größe, welche oftmals als Kennwert in der Literatur verwendet wird, ist das sogenannte YOUNG'sche Modul oder auch Elastizitätsmodul (**E-Modul**).<sup>[101]</sup> Es kann mithilfe des Speichermoduls unter Verwendung der nachfolgenden Gleichung 14 berechnet werden.

$$E = 2(1 + \nu) \cdot G'$$

$E$ : Elastizitätsmodul  
 $\nu$ : Poisson-Zahl

**Gleichung 14:** Beschreibung des E-Moduls unter Verwendung der Poisson-Zahl.

Die hierbei auftretende Größe der Poisson-Zahl wird für Hydrogele als 0,5 angenommen.<sup>[98]</sup> Dadurch kann die Gleichung 14 durch das Einsetzen von  $\nu = 0,5$  weiter vereinfacht werden, wodurch sich für die Berechnung des E-Moduls aus dem Speichermodul folgende finale Gleichung ergibt.

$$E = 3 \cdot G'$$

**Gleichung 15:** Vereinfachte Beschreibung des E-Moduls.

Zusätzlich zu den rheologischen Untersuchungen wurde auch das Quellverhalten der Gele untersucht. Dieses erlaubt eine bessere Einschätzung des Vernetzungsgrades und der Hydrophilie der Hydrogele. Die Ermittlung des Quellwertes (Gleichung 16) erfolgte dabei über die Bestimmung des Gewichts des Gels im vollständig gequollenen Zustands sowie des Gels im vollständig getrockneten Zustands.<sup>[102]</sup>

$$Q = \frac{W_G - W_T}{W_T}$$

$Q$ : Quellwert  
 $W_G$ : Gewicht Gel (gequollen)  
 $W_T$ : Gewicht Gel (trocken)

**Gleichung 16:** Beschreibung des Quellwertes.

Als Letztes wurde der Gelanteil der erhaltenen Hydrogele untersucht. Dabei wurde das Gewicht der getrockneten Hydrogele nach einer vollständigen Quellung in Wasser über mindestens 24 Stunden mit dem Trockengewicht der eingesetzten polymeren Komponenten verglichen (Gleichung 17).<sup>[103]</sup>

$$\text{Gelanteil} = \frac{W_T}{W_P}$$

$W_T$ : Gewicht Gel (trocken)  
 $W_P$ : Gewicht Gel (trocken; vor Gelbildung)

**Gleichung 17:** Beschreibung des Gelanteils.

Die Betrachtung des Gelanteils eines Hydrogels erlaubt die Einschätzung der Vernetzungseffizienz bei der Gelbildung. Niedrige Werte für den Gelanteil weisen auf eine unvollständige Vernetzung der Polymerketten untereinander oder eine geringe Stabilität des gebildeten Netzwerks im gewählten Lösungsmittel hin.<sup>[104]</sup>

### 3.3.2. Einfluss der Vernetzeräquivalente

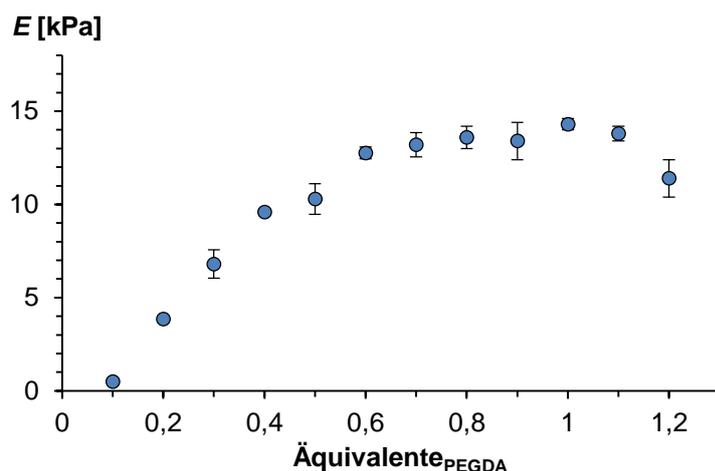
Die zur Herstellung der Hydrogele verwendeten zwei Komponenten, thiolhaltiges Präpolymer und **PEGDA<sub>3500</sub>**, erfüllten zwei verschiedene Funktionen. Das Präpolymer soll aufgrund seiner Funktionalisierung mit kationischer Ladung oder Peptiden für eine Erhöhung der Zell-Gel-Interaktion sorgen. Das PEGDA hingegen wurde vor allem aufgrund seiner biologisch inerten Eigenschaften gewählt und dient lediglich zur Ausbildung der stabilen Netzwerke. Durch den Einsatz des PEGDAs in den Netzwerken kommt es zwangsweise zur Verringerung der Konzentration an bioaktiven Funktionalitäten im Vergleich zu den reinen Präpolymeren. Um ein optimal funktionalisiertes Netzwerk zu erhalten, war es daher von Interesse, möglichst geringe Mengen an PEGDA zur Vernetzung der Präpolymere einzusetzen. Dabei galt es jedoch, die mechanische Integrität der Netzwerke nicht zu vernachlässigen. Um einen möglichen negativen Einfluss von freien Acrylat-Endgruppen des **PEGDA<sub>3500</sub>** in späteren Zellexperimenten zu minimieren, war es wünschenswert einen möglichst hohen Umsatz dieser Endgruppen bei der Vernetzung zu erreichen. Um die optimalen Äquivalente an **PEGDA<sub>3500</sub>** im Verhältnis zu der Menge an Thioleffunktionalitäten der Präpolymere zu finden, wurde ein breites Screening unter Verwendung des Präpolymers **PSH1** durchgeführt (Tabelle 2). Die Äquivalente geben dabei das Verhältnis von Acrylat-Endgruppen des **PEGDA<sub>3500</sub>** zu Thioleffunktionalitäten des Präpolymers wieder. Die Analyse der Gele erfolgte dabei wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.3.1).

**Tabelle 2:** Übersicht über die Daten der Hydrogele mit verschiedenen Äquivalenten an PEGDA-Vernetzer.

| Äquivalente <sup>a</sup> | $E^b$ [kPa]    | $Q^c$          | Gelanteil <sup>d</sup> [%] |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| 0,1                      | $0,5 \pm 0,05$ | $35,5 \pm 1,2$ | $27 \pm 9$                 |
| 0,2                      | $3,8 \pm 0,1$  | $16,9 \pm 1,2$ | $48 \pm 5$                 |
| 0,3                      | $6,8 \pm 0,8$  | $13,1 \pm 0,4$ | $54 \pm 3$                 |
| 0,4                      | $9,6 \pm 0,1$  | $11,6 \pm 0,2$ | $75 \pm 1$                 |
| 0,5                      | $10,3 \pm 0,8$ | $11 \pm 0,5$   | $85 \pm 4$                 |
| 0,6                      | $12,7 \pm 0,3$ | $10,4 \pm 0,2$ | $89 \pm 1$                 |
| 0,7                      | $13,2 \pm 0,7$ | $10,0 \pm 0,1$ | $94 \pm 1$                 |
| 0,8                      | $13,6 \pm 0,6$ | $9,7 \pm 0,1$  | $90 \pm 2$                 |
| 0,9                      | $13,4 \pm 1$   | $9,6 \pm 0,1$  | $93 \pm 3$                 |
| 1                        | $14,3 \pm 0,3$ | $9,2 \pm 0,1$  | $91 \pm 2$                 |
| 1,1                      | $13,8 \pm 0,4$ | $9,1 \pm 0,4$  | $93 \pm 2$                 |
| 1,2                      | $11,4 \pm 1$   | $9,4 \pm 0,4$  | $90 \pm 4$                 |

**a:** Äquivalente an Acrylat-Endgruppen des PEGDA<sub>3500</sub> im Verhältnis zu der Menge an Thiofunktionalitäten des Präpolymers  $P_{SH1}$ ; **b:** ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; **c:** ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer für 24 h bei RT; **d:** Gewicht der getrockneten Gele ermittelt nach Quellung in H<sub>2</sub>O für 48 h bei RT.

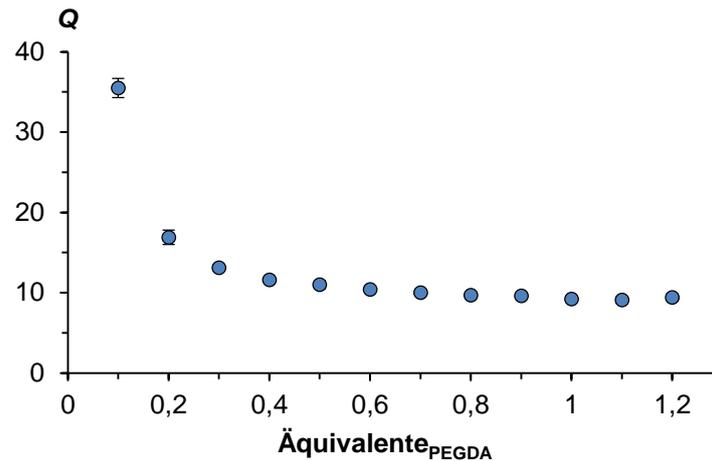
Zunächst wurde das E-Modul als Maß für die Steifigkeit der Systeme betrachtet (Abbildung 23). Dabei ließ sich deutlich erkennen, dass bei der Verwendung von geringen Äquivalenten an **PEGDA<sub>3500</sub>** von 0,1 bis 0,3 sehr weiche Gele entstanden sind. Das E-Modul der Gele war mit Werten von 0,5 kPa bis 6,8 kPa, im Vergleich zu den Gelen mit höheren Äquivalenten an PEGDA, niedrig. Dies war auf die vermutlich unvollständige Vernetzung der der Präpolymerketten untereinander zurückzuführen. Durch den Einsatz von 0,1 bis 0,3 Äquivalenten **PEGDA<sub>3500</sub>** wurde theoretisch nur 10% (0,1 Äq.) bis 30% (0,3 Äq.) der vorhandenen Thiole vernetzt. Aufgrund der geringen Molmasse der Präpolymere von 14 bis 21 kg/mol trägt statistisch gesehen (unter Berücksichtigung des BMAC-Anteils der Polymere von 4 mol%) jede Polymerkette nur 10 bis 16 Thiofunktionalitäten. Wenn nun nur ein Bruchteil dieser Funktionalitäten durch PEGDA vernetzt wird, kann dies schon in der Theorie zu einer unvollständigen Vernetzung der Präpolymere führen, bei welcher nicht alle Polymerketten Teil des großen Polymernetzwerkes sind. Zusätzlich gibt es auch noch die Möglichkeit, dass einzelne PEGDA-Ketten zwei Thiole des gleichen Präpolymers vernetzen, was zu einer intramolekularen Vernetzung führt. Diese Vernetzungen tragen nicht zur Stabilität des Netzwerkes bei und haben zusätzlich auch PEGDA-Moleküle „verbraucht“, welche somit nicht mehr zur Bildung von intermolekularen Vernetzungen zur Verfügung standen.



**Abbildung 23:** Übersicht über das E-Modul der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA<sub>3500</sub>.

Durch das sukzessive Erhöhen der Menge an **PEGDA<sub>3500</sub>** konnte eine stetig zunehmende Steifigkeit der Gele beobachtet werden. Hierbei wurde nun eine zunehmende Menge der Thiofunktionalitäten der einzelnen Ketten vernetzt, wodurch statistisch gesehen die vollständige Einbindung sämtlicher Polymerketten in das entstehende Netzwerk immer wahrscheinlicher wurde. Ab einem Wert von 0,7 bis 0,8 Äquivalenten kam diese Zunahme zum Erliegen und es trat eine Art Plateauwert bezüglich des E-Moduls ein. Im Bereich von 0,7 bis 1,1 Äquivalente waren die gemessenen Werte, unter Berücksichtigung der Abweichungen, mehr oder weniger konstant. Ab diesem Bereich konnte davon ausgegangen werden, dass fast alle Präpolymerketten in das Netzwerk eingebunden waren, wodurch die Steifigkeit kaum noch weiter zunahm.

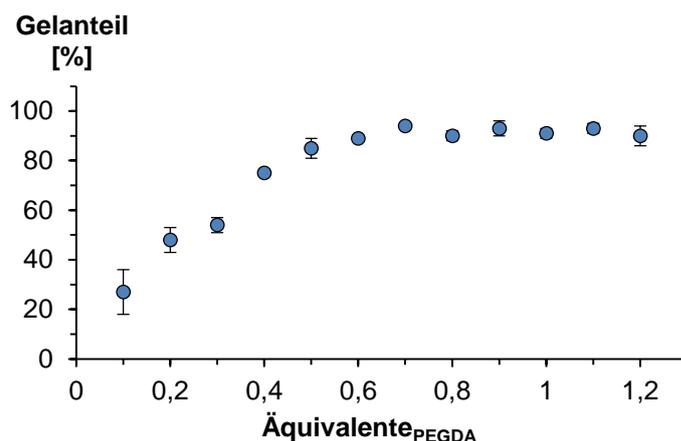
Bei der Verwendung von 1,2 Äquivalenten war dann eine Abnahme der Gelsteifigkeit festzustellen. Dies war vermutlich auf den Überschuss an Acrylatendgruppen des **PEGDA<sub>3500</sub>** zurückzuführen. Die Verwendung des Überschusses könnte dazu geführt haben, dass einige PEGDA-Ketten zwar einseitig bereits an ein Thiol gebunden haben, jedoch kein zweites Thiol mehr zur Verfügung stand. Dadurch wurden erneut Bindungspunkte geschaffen, welche nicht zur Stabilität des Netzwerkes beigetragen haben, was zu einem verringerten E-Modul geführt hat.



**Abbildung 24:** Übersicht über die Quellwerte ( $Q$ ) der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA<sub>3500</sub>.

Bei der Betrachtung des Einflusses der Äquivalente auf den Quellwert konnten ähnliche Beobachtung gemacht werden wie bezüglich des E-Moduls (Abbildung 24). Bei niedrigen PEGDA-Äquivalenten wiesen die Gele einen sehr hohen Quellgrad auf von bis zu 35 auf. Dies ist für chemisch vernetzte Hydrogele sehr hoch und spricht für eine unvollständige Vernetzung dieser.<sup>[104–106]</sup> Mit zunehmenden Vernetzeräquivalenten nimmt die Quellung aufgrund der zunehmenden Vernetzungseffizienz ab. Die Veränderung des Quellwertes stagniert ab einem Wert von 0,7 bis 0,8 PEGDA-Äquivalente zunehmend und nähert sich einem Quellwert von 9 nur noch sehr langsam an. Die Verwendung eines Überschusses an PEGDA (1,1 und 1,2 Äq.) führte zu keiner signifikanten Erhöhung des Quellwertes obwohl eine, durch die Abnahme der Steifigkeit indizierte, geringeren Vernetzungseffizienz vorgelegen haben könnte.

Als Letztes wurde noch der Gelgehalt der hergestellten Gele untersucht (Abbildung 25). Die bei vorhergegangenen Untersuchungen aufgestellten Vermutungen bezüglich der Vernetzungseffizienz bei der Verwendung unterschiedlicher PEGDA-Äquivalente haben sich hier erneut verfestigt.



**Abbildung 25:** Übersicht über den Gelanteil der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA<sub>3500</sub>.

Bei der Anwendung niedriger Äquivalente (0,1 bis 0,6 Äq.) wiesen die untersuchten Gele einen Gelanteil auf, welcher teilweise deutlich unterhalb von 90% lag. Dies wies erneut auf unvollständige Vernetzung hin, wodurch vermutlich einzelne un- oder teilvernetzte Polymerketten beim Quellen aus den Gelen heraus diffundiert sind. Analog zu den bisherigen Ergebnissen zeigte auch der Quellwert ein lokales Maximum bei einem Wert von etwas über 90. Eine weitere Erhöhung des Gelanteils konnte im Rahmen der gewählten Bedingungen nicht erreicht werden, was allerdings den Erwartungen entsprach. Durch den Verlust von kleinen Gelresten beim Überführen der Gele zum Quellen oder durch Polymerlösungsrückstände beim Gießen der Gele war es nur selten möglich, Gelanteile von über 90% zu erreichen, weswegen die hier erreichten Maximalwerte von knapp über 90% sehr zufriedenstellend waren.

Durch den Vergleich der verschiedenen Werte untereinander konnte festgestellt werden, dass bei dem Einsatz von 0,7 bis 0,8 Äquivalenten an **PEGDA<sub>3500</sub>** die besten Werte bezüglich einer effektiven Vernetzung erhalten wurden. Um die Menge der in den Präpolymeren vorhandenen Funktionalitäten möglichst wenig zu verdünnen, wurden die Gele in sämtlichen nachfolgenden Experimenten mit einem Vernetzerendgruppen/Thiofunktionalitäten-Verhältnis von 0,7 hergestellt.

### 3.3.3. Einfluss der Gelkonzentration

Um einen besseren Überblick darüber zu bekommen, welche E-Module mit dem verwendeten System erreicht werden können, wurde eine Reihe an Gelen mit variabler Gelkonzentration angesetzt (Tabelle 3). Diese Untersuchungen wurden zum Teil schon von BOLDUAN durchgeführt, sollten an dieser Stelle jedoch mit den angepassten Äquivalenten

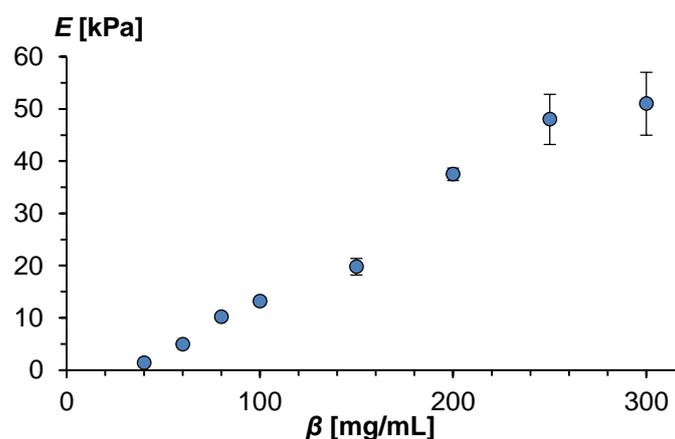
wiederholt werden.<sup>[80]</sup> Für die Testreihe wurden Gele mit einer Konzentration von 20 bis 300 mg/mL angesetzt. Theoretisch wären Gele mit einer höheren Konzentration denkbar gewesen, jedoch haben diese in vorhergegangenen Experimenten eine hohe Inhomogenität aufgewiesen. Dies war auf die zunehmende Viskosität der verwendeten Polymerlösungen zurückzuführen, welche eine gleichmäßige Durchmischung und das Überführen der Lösungen in die Gelkammern deutlich erschwerte.

**Tabelle 3:** Übersicht über die Daten der Hydrogele mit unterschiedlicher Gelkonzentration.

| $\beta^a$ [mg/mL] | $E^b$ [kPa]    | $Q^c$          | Gelanteil <sup>d</sup> [%] |
|-------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| 20                | - <sup>e</sup> | - <sup>e</sup> | - <sup>e</sup>             |
| 40                | 1,4 ± 0,2      | 20,1 ± 0,5     | 92 ± 6                     |
| 60                | 4,9 ± 0,3      | 13,4 ± 0,1     | 88 ± 6                     |
| 80                | 10,2 ± 0,4     | 10,8 ± 0,1     | 96 ± 2                     |
| 100               | 13,2 ± 0,7     | 10,0 ± 0,1     | 94 ± 1                     |
| 150               | 19,8 ± 1,6     | 8,5 ± 0,2      | 79 ± 3                     |
| 200               | 37,5 ± 1,2     | 7,2 ± 0,1      | 80 ± 2                     |
| 250               | 48,0 ± 4,8     | 6,5 ± 0,1      | 79 ± 1                     |
| 300               | 51,0 ± 6       | 6,1 ± 0,1      | 79 ± 2                     |

**a:** Ergibt sich aus der eingesetzten Masse an thiolhaltigem Präpolymer und Vernetzpolymer; **b:** ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; **c:** ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer für 24 h bei RT; **d:** Gewicht der getrockneten Gele ermittelt nach Quellung in H<sub>2</sub>O für 48 h bei RT; **e:** keine stabilen Gele konnten gebildet werden.

Die Untersuchung der Hydrogele erfolgte analog zu dem vorhergegangenen Experiment, wobei erneut das E-Modul (Abbildung 26), der Quellwert (Abbildung 27) sowie der Gelanteil (Abbildung 28) untersucht wurden.

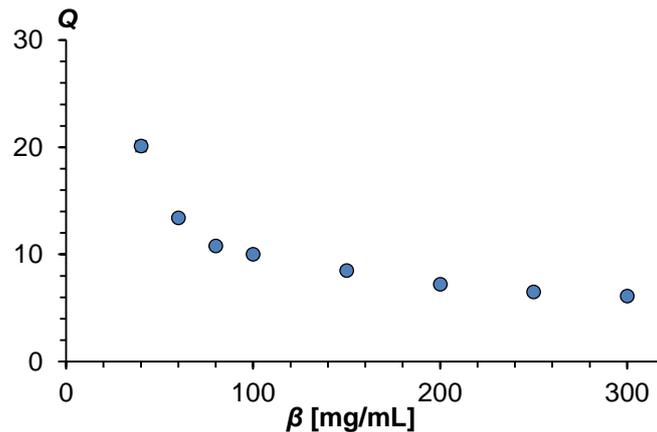


**Abbildung 26:** Übersicht über das E-Modul der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration.

Bei der Betrachtung des E-Moduls ließ sich ein stetiger Anstieg der Steifigkeit bei zunehmender Gelkonzentration feststellen. Dies deckte sich mit den Erwartungen, da bei steigender Konzentration der Polymerketten beim Gelierungsprozess diese nicht nur in

ihrer Anzahl mehr werden, sondern räumlich gesehen auch näher beieinander liegen. Bei sehr niedrigen Gelkonzentration liegen nur wenige Polymerketten in Lösung vor, welche teilweise auch noch weit voneinander entfernt sind. Während der Vernetzung werden diese Ketten dann teilweise vernetzt, wodurch sie nach und nach immer mehr Bewegungsfreiheit in Lösung verlieren. Dadurch wird es im Laufe der Vernetzung zunehmend unwahrscheinlicher für zwei reaktionsfähige Funktionalitäten in Kontakt zu kommen, wodurch es bei niedrigen Polymerkonzentrationen teilweise zur unvollständigen Vernetzung kommen kann. Dies konnte bei dem Hydrogel mit einer Konzentration von 20 mg/mL beobachtet werden. Während der Vernetzung konnte zwar grundlegend eine durch die Zunahme der Viskosität festzustellende Gelierung beobachtet werden, jedoch wiesen die erhaltenen Gele nach Ablauf der Inkubationszeit von zwölf Stunden kaum mechanische Stabilität auf und wurden als Folge dessen vor der Charakterisierung verworfen. Bei höheren Gelkonzentrationen kommt es, neben der zunehmenden Vernetzungseffizienz zwischen den einzelnen Polymerketten, auch immer mehr zur Ausbildung von inter- und intramolekularen Verschlaufungen.<sup>[98,107,108]</sup> Diese Verschlaufungen wirken dabei als zusätzliche physikalische Vernetzungspunkte, wodurch die Vernetzungsdichte der Hydrogele zunimmt und ihre Steifigkeit steigt. Bei höheren Gelkonzentrationen (250 und 300 mg/mL) wurde ein signifikanter Anstieg der Abweichung zwischen den einzelnen Gelen einer Konzentration verzeichnet. Dies war vermutlich auf die zunehmende Viskosität der Proben zurückzuführen, welche eine homogene Durchmischung und Überführung der Proben vor Einsetzen der Gelierung (~ 1 Minute) erschwerte.

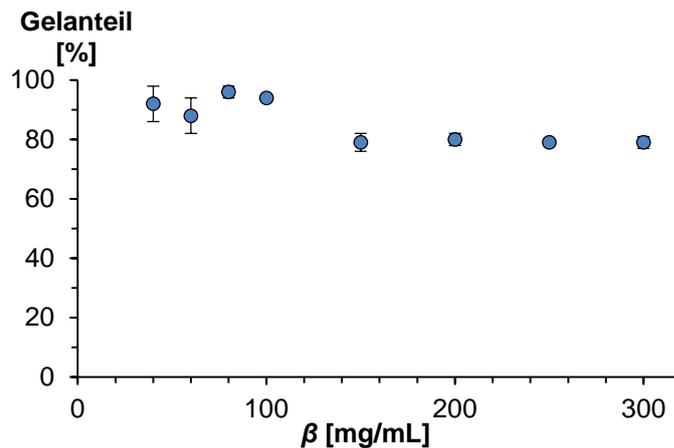
Zusammengefasst konnten durch die Variation der allgemeinen Gelkonzentration E-Module erreicht werden, welche einen breiten Bereich zwischen 1,4 und 51 kPa abgedeckt haben. Dieser Bereich entspricht der Festigkeit vieler verschiedener natürlicher Gewebetypen und könnte als solcher für die Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen dienen.<sup>[109]</sup>



**Abbildung 27:** Übersicht über die Quellwerte der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration.

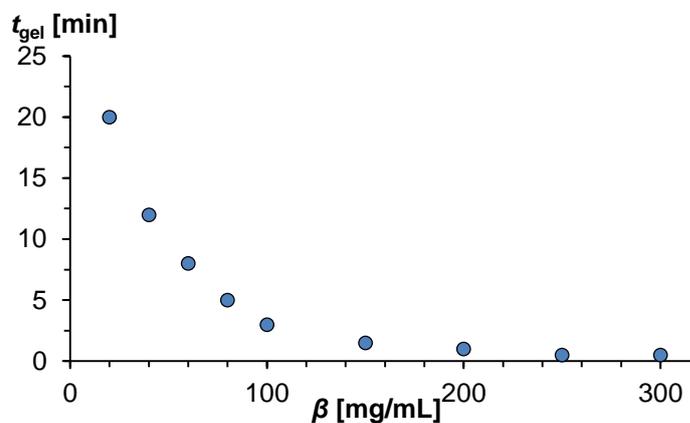
Bezüglich der Quellwerte war eine vergleichbare Entwicklung wie bei der Steifigkeit zu beobachten (Abbildung 27). Bei zunehmender Gelkonzentration kam es zu einer stetigen Verringerung des Quellwertes der Gele. Dies war, wie oben beschrieben, auf die zunehmende Vernetzungseffizienz und das zunehmende Auftreten von Verschlaufungen zurückzuführen, wodurch die Netzwerke engmaschiger wurden und weniger Wasser eindringen konnte. Die Quellwerte lagen in Abhängigkeit der Gelkonzentration zwischen 20,1 (40 mg/mL) und 6,1 (300 mg/mL).

Bei der Betrachtung der Gelanteile ließen sich bei den untersuchten Proben Werte von 79% bis 96% ermitteln (Abbildung 28). Vor allem die Gele mit einer geringen Konzentration wiesen einen Gelanteil von um die 90% auf, auch wenn bei den Gelen mit einer Konzentration 40 und 60 mg/mL eine relativ große Abweichung ( $\pm 6\%$ ) zwischen den einzelnen Proben festzustellen war. Bei den höheren Gelkonzentrationen (150 bis 300 mg/mL) lag der Gelanteil nur noch bei Werten um die 80%. Dies war vermutlich auf höhere Verluste beim Überführen oder der teilweisen Gelierung während der Durchmischung der Gele zurückzuführen. Die dadurch auftretenden Inhomogenitäten könnten zur Ausbildung kleiner isolierter Gelbrocken geführt haben, welche nicht vollständig mit dem Hauptnetzwerk verbunden waren und durch auftretende mechanische Belastungen beim Überführen oder Messen der Proben zu Verlusten in der späteren Geltrockenmasse geführt haben. Trotz dieser leichten Abweichungen vom Optimum konnten für alle untersuchten Gelkonzentrationen hohe Gelanteile festgestellt werden.



**Abbildung 28:** Übersicht über den Gelanteil der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration.

Zusätzlich zur Untersuchung der drei oben genannten Parameter wurde auch die Gelierungszeit ( $t_{\text{gel}}$ ) der Gele in Abhängigkeit ihrer Gelkonzentration aufgezeichnet (Abbildung 29). Um in späteren 3D-Zellexperimenten Anwendung zu finden, wäre eine möglichst geringe Gelierungszeit (< 10 Minuten) wünschenswert, damit die einzuschließenden Zellen nicht während der Gelierung auf den Boden der Gellösung absinken. Gleichzeitig darf die Gelbildung auch nicht zu schnell sein (mindestens 1 Minute), da sonst die Gele nicht schnell genug angemischt und überführt werden können. Die Bestimmung der Gelierungszeit erfolgte über einen Tube Inversion Test.



**Abbildung 29:** Übersicht über die Gelierungszeit ( $t_{\text{gel}}$ ) der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration.

Die gemessenen Gelierungszeiten lagen in einem Bereich zwischen 20 Minuten und knapp 30 Sekunden. Die Gele mit einer geringen Gelkonzentration (20 bis 40 mg/mL) wiesen dabei einen  $t_{\text{gel}}$  von über 10 Minuten auf und wären als solche für eine Anwendung in 3D-Zellexperimenten nur mäßig geeignet. Die hochkonzentrierten Gele (250 und 300 mg/mL) hingegen wiesen eine sehr niedrige Gelierungszeit von weniger als einer Minute auf, was zwar für einen schnellen Einschluss der Zellen sorgen, die Handhabung der Gele jedoch

deutlich erschweren würde. Für alle anderen Gele (60 bis 200 mg/mL) lag der Wert für  $t_{\text{gel}}$  in einem Bereich zwischen 1 und 8 Minuten und wäre somit für spätere Experimente geeignet.

### 3.3.4. Einfluss der kationischen Komponente

Nachdem die Einflüsse der allgemeinen Gelkonzentration untersucht wurden, war es von Interesse, die Wirkung des Kationikanteils auf die Geleigenschaften zu untersuchen. Um eine möglichst gute Einschätzung über die zu erwartenden Geleigenschaften machen zu können, wäre es wünschenswert, wenn die Veränderung der Kationikkonzentration ( $c_{\text{kat}}$ ) einen möglichst geringen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Gele hätte. Zur Überprüfung dessen wurde eine Reihe Gele ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ) mit einer Kationikkonzentration zwischen 0 bis 335  $\mu\text{mol/mL}$  hergestellt (Tabelle 4). Die 335  $\mu\text{mol/mL}$  beziehen sich dabei auf die Konzentration der Gellösung vor dem Quellen und entsprachen der höchsten Konzentration, welche unter Verwendung der hergestellten Polymere möglich war.

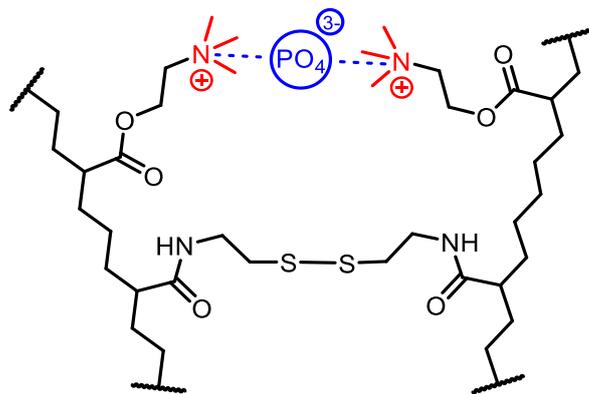
**Tabelle 4:** Übersicht über die Daten der Hydrogele mit unterschiedlicher Kationikkonzentration.

| $c_{\text{kat}}^{\text{a}}$ [ $\mu\text{mol/mL}$ ] | $E^{\text{b}}$ [kPa] | $Q^{\text{c}}$ |
|--|----------------------|----------------|
| 0  | $7,2 \pm 0,2$        | $12,8 \pm 0,2$ |
| 60   | $7,4 \pm 0,3$        | $11,5 \pm 0,5$ |
| 115  | $7,8 \pm 0,7$        | $10,7 \pm 0,6$ |
| 170  | $8,4 \pm 0,5$        | $12,0 \pm 0,7$ |
| 225  | $8,9 \pm 0,5$        | $11,7 \pm 0,2$ |
| 280  | $9,1 \pm 0,4$        | $12,1 \pm 0,3$ |
| 335  | $10,3 \pm 0,7$       | $12,0 \pm 0,4$ |

**a:** ergibt sich aus dem Volumen des Gels und der eingesetzten Menge an kationischem Polymer bei der Vernetzung; **b:** ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; **c:** ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer für 24 h bei RT

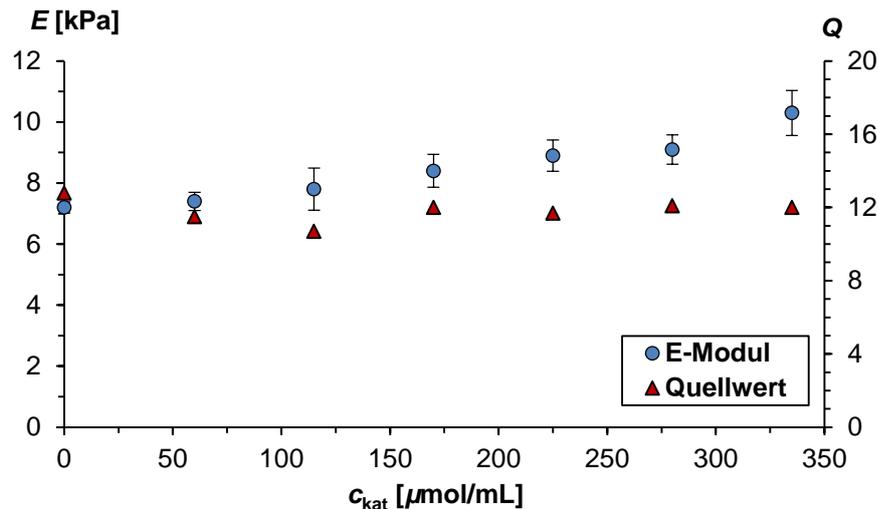
Um mögliche Varianzen zwischen den einzelnen Polymeren zu minimieren, wurden die untersuchten Hydrogele durch Mischen der Polymere **P<sub>SH1</sub>** (0 mol% TMAEA) und **P<sub>SH4</sub>** (96 mol% TMAEA) hergestellt. Die dabei erhaltenen Gele wurden hinsichtlich ihres E-Moduls sowie ihrer Quelleigenschaften untersucht (Abbildung 31). Die Untersuchung des Gelanteils wurde nur stichpunktartig für zwei Gele mit einer Kationikkonzentration von 115  $\mu\text{mol/mL}$  (Gelanteil 89%) und 225  $\mu\text{mol/mL}$  (Gelanteil 91%), durchgeführt und wies auf eine hohe Vernetzungseffizienz hin.

Der Vergleich der E-Module der einzelnen Gele zeigte, dass eine Erhöhung der Kationikkonzentration zu erhöhter Steifigkeit der Systeme führte (Tabelle 4, Abbildung 31). Der dabei beobachtete Unterschied zwischen den Gelen mit der niedrigsten Konzentration (7,2 kPa) und der höchsten Konzentration (10,3 kPa) lag bei ungefähr 30% im E-Modul. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Steifigkeit der Systeme könnte auf die Ausbildung von Ion-Ion-Wechselwirkungen zwischen den quartären Ammoniumgruppen des TMAEA und den Phosphatgruppen des PBS-Puffers zurückzuführen sein (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Darstellung eines temporären Vernetzungspunktes durch Ion-Ion-Wechselwirkung.

Diese Vermutung basierte dabei auf verschiedenen Anwendungen in der Literatur.<sup>[110–112]</sup> NIE *et al.* beispielsweise nutzte die Wechselwirkung zwischen quartären Ammoniumgruppen, welche auf Nanopartikeln immobilisiert waren, um Phosphatmoleküle effektiv aus Lösungsmitteln zu entfernen.<sup>[110]</sup> Daher ist es denkbar, dass diese Wechselwirkungen zur Ausbildung von temporären und reversiblen Ammonium-Phosphat-Ammonium-Bindungen in den Gelen geführt haben. Diese Bindungen wirkten dann als zusätzliche Vernetzungspunkte in den Netzwerken, was zu einer Zunahme im E-Modul geführt hat (Abbildung 31). Eine weitere mögliche Erklärung für die Zunahme der Steifigkeit bei zunehmender TMAEA-Konzentration war die gegenseitige Abstoßung der kationischen Ammoniumgruppen innerhalb des Gels.<sup>[113]</sup> Durch die Abstoßung der kationischen Gruppen untereinander könnte es, vor allem bei hohen Konzentrationen, zu einer Verringerung der Bewegungsfreiheit der Polymerketten im Netzwerk gekommen sein und als Folge dessen zu einer Erhöhung der Gelsteifigkeit.



**Abbildung 31:** Übersicht über das E-Modul und die Quellwerte der Gele in Abhängigkeit ihrer Kationikkonzentration.

Im Gegensatz zur Steifigkeit der Systeme konnten beim Quellverhalten keine signifikanten Änderungen in Abhängigkeit der Kationikkonzentration festgestellt werden. Die größten Unterschiede gab es zwischen den Gelen mit  $c_{\text{kat}}$  von  $0 \mu\text{mol/mL}$  ( $Q = 12,8 \pm 0,2$ ) und  $115 \mu\text{mol/mL}$  ( $Q = 10,7 \pm 0,6$ ), wobei die Unterschiede, unter Beachtung der Abweichungen, auch durch leichte Verluste/Ungenauigkeiten beim Überführen, Vermessen oder Einwiegen der Gele entstanden sein könnten. Trotz der konstanten Quellwerte der Gele war es denkbar, dass hier zwei entgegengesetzt wirkende Effekte aufgetreten sind. Die zusätzlich auftretenden physikalischen Vernetzungspunkte durch die Ammonium-Phosphat-Wechselwirkung könnten die Vernetzungsdichte der Gele erhöht haben, was in einer Verringerung des Quellwertes resultiert hätte. Gleichzeitig würde das Einführen steigender Mengen an quartären Ammoniumgruppen mit ihrer permanenten positiven Ladung zu einer Erhöhung der Hydrophilie der hergestellten Netzwerke führen, wodurch der Quellwert in der Regel zunehmen würde.<sup>[14]</sup> Da die erhaltenen Quellwerte, unabhängig von der Kationikkonzentration, relativ konstant waren wurde an dieser Stelle auf weitere Untersuchungen verzichtet.

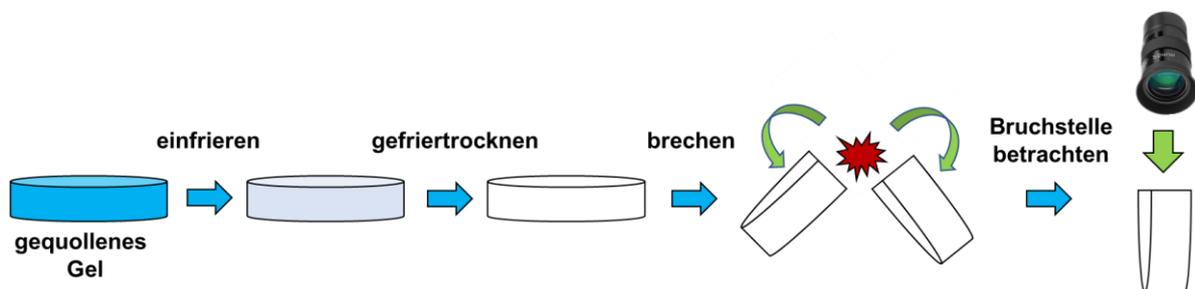
Zusammenfassend konnte bezüglich des Einflusses der Kationikkonzentration auf die Geleigenschaften festgestellt werden, dass durch das Einbringen erhöhter Mengen an TMAEA die Steifigkeit der Gele zunahm, ohne dabei einen signifikanten Einfluss auf das Quellverhalten der Gele zu haben. In zukünftigen Experimenten sollte dies berücksichtigt werden, falls Hydrogele mit bestimmten E-Modulen hergestellt werden sollen und eventuell Anpassungen hinsichtlich der Gelkonzentration getroffen werden.

### 3.3.5. Gelmorphologie

Um einen Überblick über die Morphologie und damit beinhaltenden porösen Strukturen der Hydrogele zu erhalten, sollten diese mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie (**REM**) genauer untersucht werden.

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Oberfläche einer Probe mit einem durch eine Ablenkspule gelenkten Primärelektronenstrahl abgerastert. Durch Wechselwirkungen des Primärelektronenstrahls mit der Probenoberfläche kommt es zur Emission von Sekundärelektronen, Rückstreuелеktronen, Kathodolumineszenz und charakteristischer Röntgenstrahlung. Diese Emissionen werden dabei für jeden Rasterpunkt von einem Detektor erfasst und, nach Verstärkung der Helligkeit, auf einen Monitor projiziert. Ein großer Vorteil von REM ist die große Tiefenschärfe der Messmethode, wodurch sich untersuchte Oberflächen sehr plastisch darstellen lassen und einen guten Eindruck über die genauen Beschaffenheiten bieten.<sup>[115]</sup>

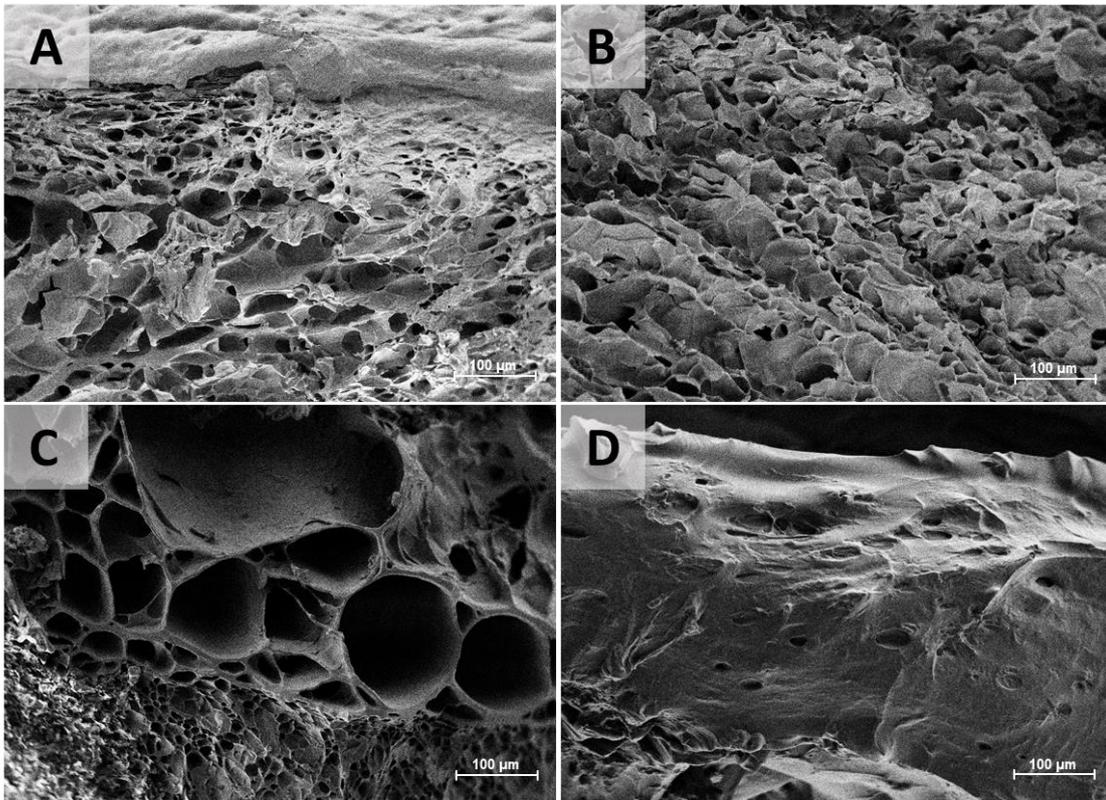
Um die Hydrogele mithilfe der REM zu untersuchen, wurden diese gemäß dem nachfolgenden Ablauf (Abbildung 32) präpariert.



**Abbildung 32:** Übersicht über den Vorgang zur Präparation der Hydrogele für die Rasterelektronenmikroskopie.

Vor der Untersuchung in REM-Experimenten wurden die Hydrogele für mindestens 24 Stunden in Wasser inkubiert, um eine vollständige Quellung dieser zu gewährleisten. Die vollständig gequollenen Gele wurden dann mithilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren, um sie anschließend im Hochvakuum zu gefriertrocknen. Da bezüglich einer 3D-Anwendung vor allem die poröse innere Struktur der Gele von Interesse war, wurden die vollständig getrockneten Gele vor der Überführung in das Rasterelektronenmikroskop noch einmal durch das Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und in der Mitte durchgebrochen. Dadurch sollte ein möglichst gerader Bruch entlang der Mitte des Gels entstehen, welcher im Anschluss untersucht wurde. Um eventuell auftretende Unterschiede zwischen den verschiedenen Gelsystemen zu erkennen, wurde eine Reihe Hydrogele mit

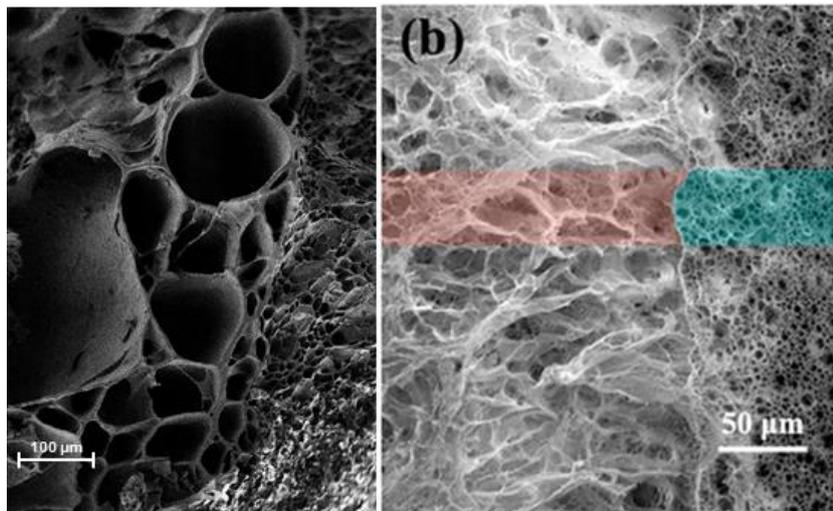
verschiedenen Gelkonzentrationen und Kationikkonzentrationen untersucht. Die Ergebnisse der REM-Experimente sind in Abbildung 33 exemplarisch aufgeführt.



**Abbildung 33:** REM-Bilder von Querschnitten verschiedener PEGDA-vernetzter Hydrogele; Eigenschaften der einzelnen Hydrogele wie folgend: **A:**  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $\beta = 150 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 225 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **D:**  $\beta = 200 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 335 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ .

Bei der Betrachtung der beiden Gele ohne TMAEA (**A**, **B**), konnten homogene Systeme mit einer feinen Porung festgestellt werden. Die Porengröße der beiden Systeme lag dabei zwischen  $10$  und  $30 \text{ }\mu\text{m}$  für den Großteil der Poren.

Die REM-Bilder von Gel **C**, wiesen im Vergleich zu den ersten beiden Gelen deutliche Unterschiede bezüglich der Homogenität der Systeme auf. Manche Bereiche des Gels wiesen eine sehr große Porung auf mit Poren mit mehr als  $60 \text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser. Gleichzeitig lagen einige Bereiche vor, welche sehr feinporig waren, mit Porengrößen von durchschnittlich weniger als  $10 \text{ }\mu\text{m}$  im Durchmesser. Die erhaltenen Strukturen weisen Ähnlichkeiten auf zu den Strukturen, welche XIAO *et al.* bei der Untersuchung ihrer pseudo-interpenetrierenden Doppelnetzwerke feststellen konnten.<sup>[116,117]</sup>

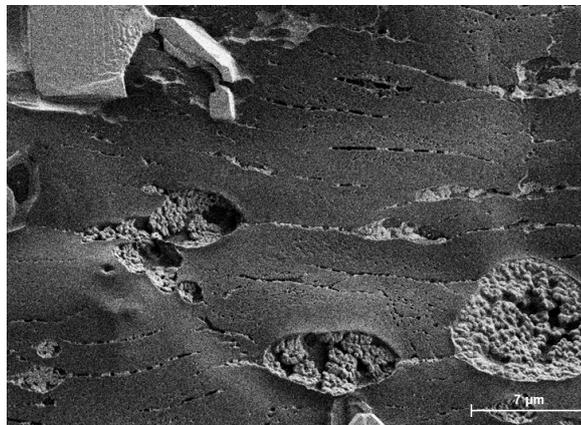


**Abbildung 34:** Vergleich von REM-Bildern zweier Hydrogelsysteme; **links:** PEGDA-vernetztes Hydrogelsystem mit Eigenschaften:  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 225 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **rechts:** pseudo-interpenetrierendes zwei-Phasen Hydrogelsystem von XIAO *et al.*; **roter Bereich:** geringe Konzentration an zwitterionischem Monomer; **blauer Bereich:** erhöhte Konzentration an zwitterionischem Monomer. (Teilausschnitt aus <sup>[117]</sup>)

In der oben aufgeführten Abbildung (Abbildung 34) ist ein REM-Bild eines Hydrogels von XIAO *et al.* (rechts) neben einem in dieser Arbeit hergestellten Hydrogel (links) dargestellt. XIAO *et al.* haben in ihrer Arbeit durch die Copolymerisation eines Zwitterionischen Monomers mit *N*-Isopropylacrylamid *N,N'*-Methylenbisacrylamid die Ausbildung eines Zwei-Phasen Hydrogelsystems feststellen können.<sup>[117]</sup> Die eine Phase wies dabei eine deutlich erhöhte Menge der zwitterionischen Monomere auf, welche durch Ion-Ion-Wechselwirkungen untereinander physikalische Vernetzungspunkte ausgebildet haben. Da diese Interaktion schon während der Polymerisation präsent war, kam es zu der Phasenbildung innerhalb des Gels. Die zwei Phasen sind in der oben aufgeführten Abbildung (Abbildung 34; links) mit den zwei Farben Rot - für die Bereiche mit geringer Konzentration an zwitterionische Komponente - und Blau - für den Bereich mit hoher Konzentration an zwitterionischer Komponente - markiert worden. Durch die zusätzlichen physikalischen Vernetzungspunkte im blauen Bereich wurde in diesem ein deutlich enger vernetztes System erhalten, welches als Folge dessen eine geringere Porengröße aufwies als der rote Bereich. Durch den Vergleich der Morphologie des Hydrogels von XIAO mit dem in dieser Arbeit hergestellten Gel ließen sich einige Ähnlichkeiten feststellen. In dem PEGDA-vernetzten System aus dieser Arbeit gibt es ebenfalls einen grob- und einen feinporigen Bereich. Dieser feinporige Bereich könnte, analog zu dem System von XIAO, durch Ion-Ion-Wechselwirkungen entstanden sein, welche bereits bei der Untersuchung des Einflusses der Kationikkonzentration auf die mechanischen Eigenschaften vermutet wurden (Abschnitt 3.3.4). An dieser Stelle konnte die Ausbildung zusätzlicher

physikalischer Vernetzungspunkte durch Ion-Ion-Wechselwirkungen ebenfalls nicht direkt nachgewiesen werden, jedoch ließen die gemachten Beobachtungen erneut auf diese schlussfolgern. Alternative Erklärungen für das Auftreten der verschiedenen Phasenbereiche im untersuchten Hydrogel könnte eine unzureichende Durchmischung der Präpolymerlösungen bei der Präparation der Hydrogele oder das Auftrennen der einzelnen Phasen während der Gelierung, sein.

Die Bilder von Gel **D** wiesen eine sehr kompakte Struktur auf, welche keine sichtbaren Pore enthielt. Dies war auf deutliche Probleme beim Gefriertrocknen der Hydrogelproben zurückzuführen. Auch nach mehreren Versuchen war es nicht möglich eine Probe des Hydrogelsystem **D** zu trocknen, ohne dass sich diese zu einer kompakten Struktur zusammengezogen hatte. Als Grund dafür wurde das Auftreten von Salzkristallen vermutet, welche sich durch Interaktion zwischen den kationischen Kopfgruppen des TMAEAs und Rückständen des Phosphatpuffers aus der Gelierung gebildet haben könnten. Diese Vermutung schien sich durch das Betrachten der REM-Aufnahme eines weiteren Hydrogels mit einer Zusammensetzung analog zu der des Systems **D** zu bestätigen (Abbildung 35).



**Abbildung 35** REM-Bild eines PEGDA-vernetzten Hydrogels, welches kristalline Strukturen aufweist; Eigenschaften des Hydrogels:  $\beta = 200 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 335 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ .

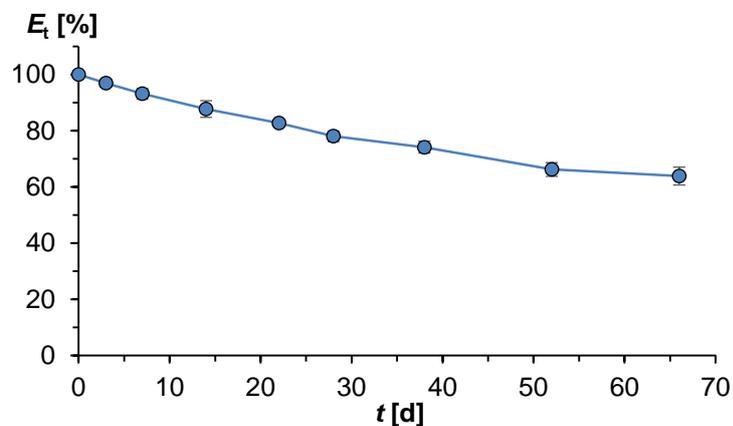
Die Aufnahmen wiesen Rissen und Kavitäten auf, welche mit kleinen kristallinen Strukturen gefüllt waren. Diese Kristalle konnten auch nach mehrtägigem Quellen in Wasser nicht entfernen werden und ließen eine genauere Betrachtung der Morphologie von Hydrogelen mit einer hohen Gel- und Kationikkonzentration nicht zu.

Trotz der teilweise für verschiedene Bedingungen auftretende Anomalien, konnte die poröse Morphologie der Gele als solche nachgewiesen und genauer betrachtet werden. Die erhaltenen Strukturen sollten trotz der detaillierten Aufnahmen durch REM stets mit

Vorbehalten betrachtet werden, da sie möglicherweise eine verfälschte Struktur aufweisen können. Durch das Gefriertrocknen der Gele kommt es, bedingt durch die Ausbildung von Eiskristallen oder mechanischem Stress durch die Trocknung selbst, zur Veränderung der Morphologie der Gele, welche sich von der realen Morphologie in Lösung unterscheidet.

### 3.3.6. Abbauverhalten der PEGDA-Gele

Da PEGDA durch seine Acrylatfunktionalitäten über zwei terminale hydrolysierbare Esterfunktionalitäten verfügt, wäre es denkbar, dass dieses zu einem Abbau der Systeme unter physiologischen Bedingungen führt. Dieser Abbau wurde schon von verschiedenen Quellen für PEGDA beschrieben und wurde als solches in den nachfolgenden Experimenten erwartet.<sup>[118,119]</sup> Um mögliche Veränderungen der mechanischen Geleigenschaften beim Einsatz in Zellexperimenten zu überprüfen, wurde ein Abbauxperiment mit einem exemplarischen Hydrogelsystem durchgeführt. Das gewählte System sollte dabei Eigenschaften aufweisen, wie sie auch in den nachfolgenden Zellexperimenten zum Einsatz kommen sollten. Dazu wurde eine Reihe von Gelen mit einer Gelkonzentration von  $\beta = 100$  mg/mL und einer  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$  hergestellt und untersucht (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** Abbaudiagramm eines PEGDA-ernetzten Hydrogels mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL und  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ . Das E-Modul der Gele zum Zeitpunkt  $t$  ( $E_t$ ) wurde gegen den Ausgangs E-Modul bei  $t = 0$  ( $E_0$ ) normalisiert aufgetragen. Abbau erfolgte in 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C.

Aufgrund der gewählten Eigenschaften (geringere Gelkonzentration und hohe Hydrophilie durch TMAEA) sollte die Abbaugeschwindigkeit, im Vergleich zu anderen denkbaren Kombinationen (hohe Gelkonzentration und/oder kein TMAEA), relativ hoch sein. Für den Abbau wurden die Gele bei 37 °C in 0,01 M PBS-Puffer inkubiert, wobei der Puffer mindestens einmal pro Woche gewechselt wurde. Um den Abbau zu erfassen, wurde das

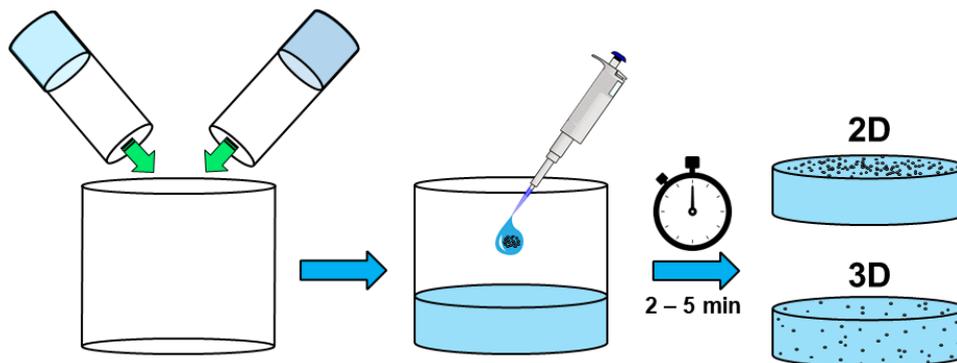
E-Modul der Gele zum Zeitpunkt  $t$  gemessen ( $E_t$ ) und ins Verhältnis zum Ausgangs-E-Modul zum Zeitpunkt  $t = 0$  ( $E_0$ ) gesetzt.

Die Auswertung der Abbauxperimente haben einen leichten und stetigen Abbau der PEGDA-Gele über einen Zeitraum von etwas mehr als zwei Monaten gezeigt. Die Abbaugeschwindigkeit lag dabei über den gesamten Zeitraum der Messung bei etwas mehr als 0,5% Verlust im E-Modul pro Tag. Diese Beobachtung decken sich in etwa mit den Werten, welche in der Literatur für verschiedene Systeme (0,8% – 1,2% pro Tag) unter ähnlichen Bedingungen beschrieben werden.<sup>[118,119]</sup> Durch die Vernetzung mit **PEGDA<sub>3500</sub>** wurden somit Gele erhalten, welche bei einem physiologischen pH-Wert einen stetigen Abbau durch Hydrolyse erfahren. Dieser Abbau war dabei jedoch sehr gering und führte innerhalb der ersten 14 Tage nur zu einem Verlust von etwas mehr als 10% des ursprünglichen E-Moduls. Beim Einsatz in den nachfolgenden Zellexperimenten wurden die mit **PEGDA<sub>3500</sub>** vernetzten Gele aufgrund der kurzen Experimentzeiträume von maximal sieben Tagen als nicht abbaubar betrachtet.

### 3.4. Einsatz in Zellexperimenten

Durch den Einsatz der Hydrogele in Zellexperimenten sollten einige wichtige Erkenntnisse, wie die Biokompatibilität der Systeme und das allgemeine Verhalten der Zellen gegenüber den Gelen, gewonnen werden. Um eine gleichbleibende Qualität der Gele zu gewährleisten, sollte dafür ein gleichbleibender Prozess zur Gelherstellung genutzt werden. Es galt dabei die Präparation der Gele für 2D- und 3D-Experimente zu differenzieren. Der in den anschließenden Experimenten verwendete Prozess wurde im Nachfolgenden schematisch dargestellt (Abbildung 37).

Im ersten Schritt wurden verschiedene Stammlösungen der zu verwendenden Präpolymere und **PEGDA<sub>3500</sub>** in 0,01 M PBS-Puffer angesetzt, wie auch zuvor in Abschnitt 3.3 beschrieben. Aliquote der Präpolymerstammlösungen wurden dann, in Abhängigkeit der gewünschten Geleigenschaften, miteinander kombiniert und gegebenenfalls noch mit PBS-Puffer verdünnt.



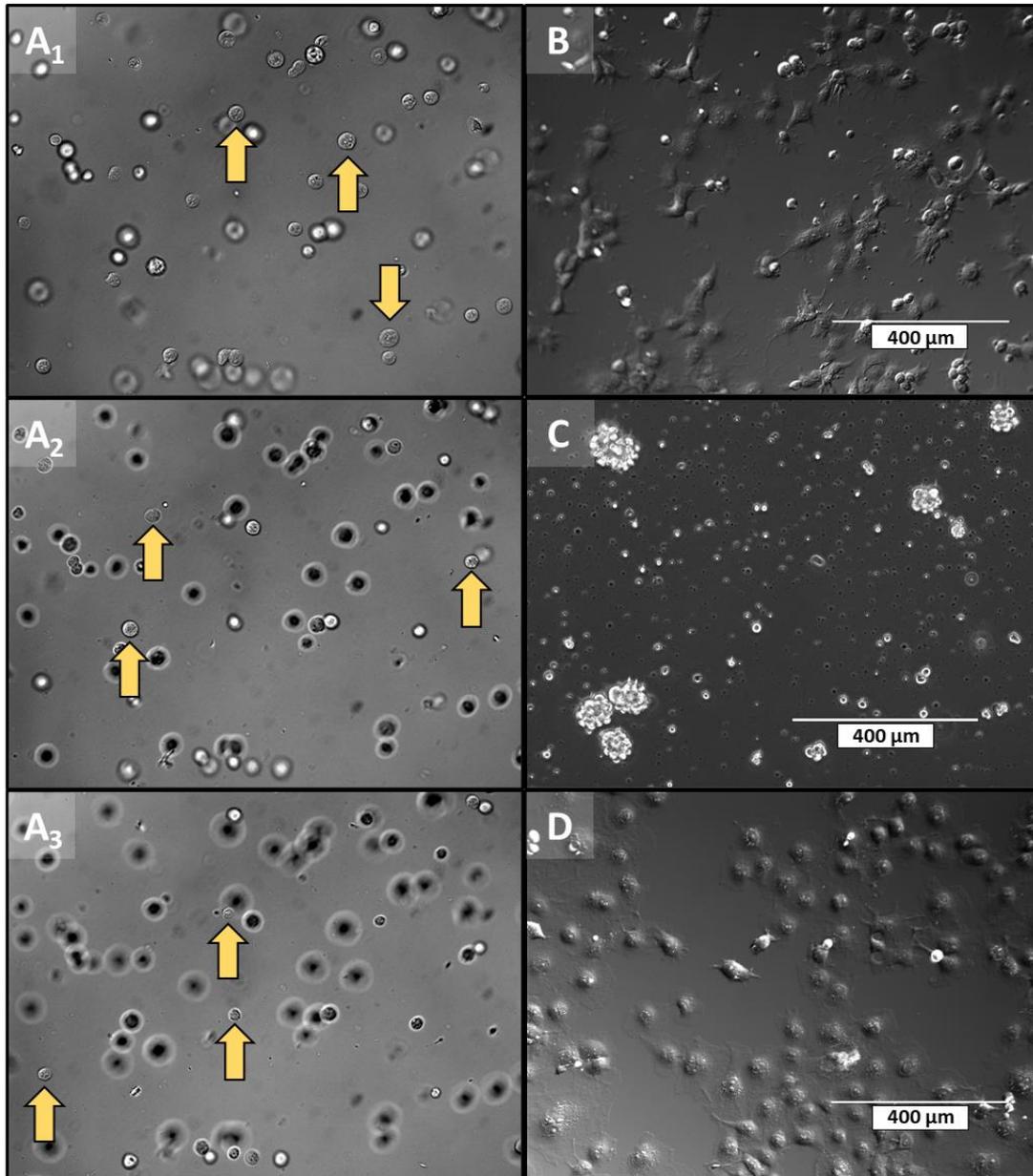
**Abbildung 37:** Übersicht über die Präparation der Hydrogele für die Zellexperimente.

Für eine 2D-Anwendung wurden die fertig gemischten Präpolymerlösungen mit einem Aliquot der **PEGDA<sub>3500</sub>**-Stammlösung vermischt und in die Vertiefung eines  $\mu$ -Dish (35 mm)<sup>[120]</sup> der Firma Ibidi überführt. Um eine möglichst gerade Geloberfläche zu erhalten, wurde versucht, die Vertiefung möglichst effizient und gleichmäßig auszufüllen. Um dies zu erreichen, wurden Gelvolumina von maximal 200  $\mu$ L verwendet. Die Präparation der Gele erfolgte in der Regel mindestens zwei Stunden vor der Auftragung der Zellen. Zur Auftragung wurde ein Milliliter eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 100.000 bis 120.000 Zellen pro Milliliter Medium verwendet. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei 37 °C wurde dem  $\mu$ -Dish ein zusätzlicher Milliliter Kultur-Medium hinzugefügt. Die Gele wurden danach bis zur weiteren Untersuchung bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Für eine 3D-Anwendung wurde den gemischten Präpolymerlösungen ein Aliquot einer hoch konzentrierten Zellsuspension (400k bis Zellen pro mL) zugegeben, was 35k bis 40k Zellen pro Gel entsprach. Das Gemisch wurde dann vorsichtig mit einer Pipette durchmischt. Durch das zeitnahe hinzufügen, mischen und überführen der Hydrogelmischung in ein  $\mu$ -Dish, sollte eine möglichst geringe Belastung für die Zellen gewährleistet werden. Die Gele wurden anschließend für 20 Minuten bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und danach mit 2 mL Nährmedium überschichtet. Sie wurden dann bis zur weiteren Untersuchung bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Untersuchung des Einflusses der Hydrogele auf Zellen wurden COS-7 Zellen gewählt. COS-7-Zellen sind durch Transformation immortalisierte Zellen aus den CV-1-Zellen einer afrikanischen grünen Meerkatze, welche 1970 erstmals von GLUZMAN beschrieben wurden.<sup>[121]</sup> Sie sind fibroblastenähnliche Zellen, welche ursprünglich aus dem Nierengewebe stammen. Die COS-7-Zellen sind adhärent wachsende Zellen und werden daher oftmals zur Überprüfung der Zelladhäsion an Oberflächen oder der Biokompatibilität

von Systemen verwendet.<sup>[122,123]</sup> Um einen allgemeinen Eindruck über die Eignung der verwendeten Hydrogelsysteme für die Anwendung in Zellexperimenten zu bekommen, wurde eine Auswahl verschiedener 2D- und 3D-Zellexperimente mit unterschiedlichen Hydrogelen durchgeführt (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen in Kontakt mit einigen PEGDA-Hydrogelen nach 24 h Inkubation unter Kulturbedingungen; **A**<sub>1-3</sub>: Zoom durch verschiedene Ebene eines 3D Hydrogels mit den Eigenschaften:  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 90 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ; Die Pfeile heben einzelne Zellen, welche sich in den jeweiligen Ebenen im Fokus befinden, hervor; **B**: Adhärenzte Zellen auf einem 2D PEGDA-Hydrogel; **C**: Nicht adhärenzte Zellen über einem 2D PEGDA-Hydrogel; **D**: Adhärenzte Zellen auf einer behandelten Zellkulturplatte aus Polystyrol.

Zunächst wurden die Bilder der Zellen betrachtet, welche in ein 3D-Hydrogel eingeschlossen wurden (Abbildung 38, **A**<sub>1-3</sub>). Es konnte eine große Menge Zellen festgestellt werden, welche keine morphologischen Besonderheiten aufwiesen. Der

Vergleich mit anderen literaturbekannten Systemen hat gezeigt, dass COS-7-Zellen in 3D in der Regel nach 24 Stunden Inkubation keine morphologisch auffälligen Strukturen ausbilden.<sup>[124,125]</sup> Zusätzlich war zu erkennen, dass die eingeschlossenen COS-7-Zellen gleichmäßig in allen drei Dimensionen des Gels verteilt waren. Um dies zu verdeutlichen, zeigen die Bilder **A<sub>1</sub>** bis **A<sub>3</sub>** die gleiche Position eines Hydrogel, bei welchem auf drei verschiedene Ebenen fokussiert wurde. Die eingesetzten Pfeile sollten dabei einige Zellen hervorheben, welche sich in der jeweiligen Ebene im Fokus befinden. Die gleichmäßige Verteilung der Zellen zeigte, dass die angewendete präparative Methodik zur Herstellung der Hydrogele für 3D-Experimente geeignet war. Dieses Experiment wurde analog für mehrere Hydrogelsysteme mit variierender Gel- und Kationkonzentration durchgeführt und analysiert. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Hydrogelen erkannt werden, weder in der Verteilung der Zellen noch in der Morphologie.

Neben den 3D-Experimenten wurden auch verschiedene 2D-Experimente mit den COS-7-Zellen durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls ein breites Spektrum an Hydrogelen mit verschiedenen Geleigenschaften untersucht. In der oben aufgeführten Abbildung 38 wurden exemplarisch zwei Hydrogele mit signifikant unterschiedlichen Ergebnissen dargestellt. Das erste Gel (Abbildung 38, **B**) zeigt ein Hydrogel ( $\beta = 200 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 90 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ), auf welchem eine deutliche und gleichmäßige Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden konnte. Die Adhäsion wurde dabei qualitativ durch die Betrachtung der Zellmorphologie ermittelt. Adhärirte COS-7-Zellen legen sich dabei eng an die gebundene Oberfläche an und weisen eine verbreiterte Oberfläche auf.<sup>[124,126]</sup> Zum Vergleich wurde ein Kontrollbild von einigen COS-7-Zellen auf einer behandelten Zellkulturplatte aus Polystyrol (Abbildung 38, **D**) aufgeführt. Das Bild **C** zeigt ein Negativbeispiel für ein Hydrogelsystem ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ), auf welchem keine signifikante Adhäsion der Zellen festgestellt werden konnte. Die geringere Steifigkeit sowie der Mangel an kationischen Ladungen scheinen, im Vergleich zum Hydrogel in Bild **B**, die Adhäsion der Zellen an das Gel zu verhindern oder zumindest nicht signifikant zu begünstigen.

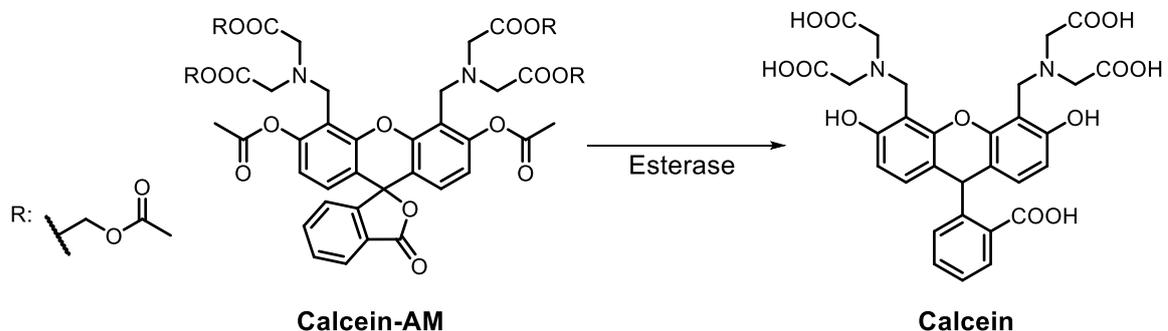
Aus diesen ersten Untersuchungen ließen sich einige Erkenntnisse für die nachfolgenden Experimente gewinnen. Zum einen konnte die Eignung der Präparationsmethodik sowohl für 2D- als auch für 3D-Experimente verifiziert werden. Zum anderen ließ sich eine von den Eigenschaften der Hydrogele abhängige, adhäsionsfördernde Wirkung gegenüber der COS-7-Zellen in 2D-Anwendung feststellen. An dieser Stelle konnten aus den bisherigen

Experimenten noch keine genauen Aussagen über die wirkliche Biokompatibilität der verwendeten Hydrogele getroffen werden. Dies sollte in den nachfolgenden Experimenten mit Hilfe einer Live-Dead-Färbung ergänzt werden. Zusätzlich galt es, einen besseren Überblick über die adhäsionsfördernden Eigenschaften der Gele zu erhalten und diese eventuell auch auf bestimmte Parameter und Grenzwerte einschränken zu können.

### 3.4.1. Validierung der Biokompatibilität

Zur Überprüfung der Biokompatibilität sollte eine Live-Dead-Färbung der Zellen in Kontakt mit den Gelen nach 24 Stunden Inkubationszeit durchgeführt werden. Dafür wurde das „Live/Dead Cell Staining Kit II“ der Firma PromoCell verwendet. Das Kit enthielt dabei die beiden Färbereagenzien Calcein-Acetoxy-methylester (**Calcein-AM**) für das Anfärben von lebenden Zellen und Ethidium Homodimer III (**EthD-III**) für das Anfärben von toten Zellen. Die Funktionsweise der beiden Färbereagenzien lässt sich dabei wie nachfolgend beschreiben.

Das Calcein-AM wird als nicht fluoreszente Verbindung dem Zellmedium zugefügt. Wenn es dann von den Zellen aufgenommen wird, werden die diversen Esterfunktionalitäten in der Verbindung durch Esterasen gespalten, wodurch das freie Calcein erhalten wird (Schema 5). Dieses ist nun in der Lage durch seine freien Esterfunktionalitäten Calciumionen in der Zelle zu chelatisieren, wodurch ein grün fluoreszierender Komplex gebildet wird, welcher die Zelle dann als solche „anfärbt“. Da die für die Esterspaltung benötigten Esterasen in toten Zellen nicht vorkommen, werden auf diese Art nur die lebendigen Zellen bei der Verwendung von Calcein-AM angefärbt.



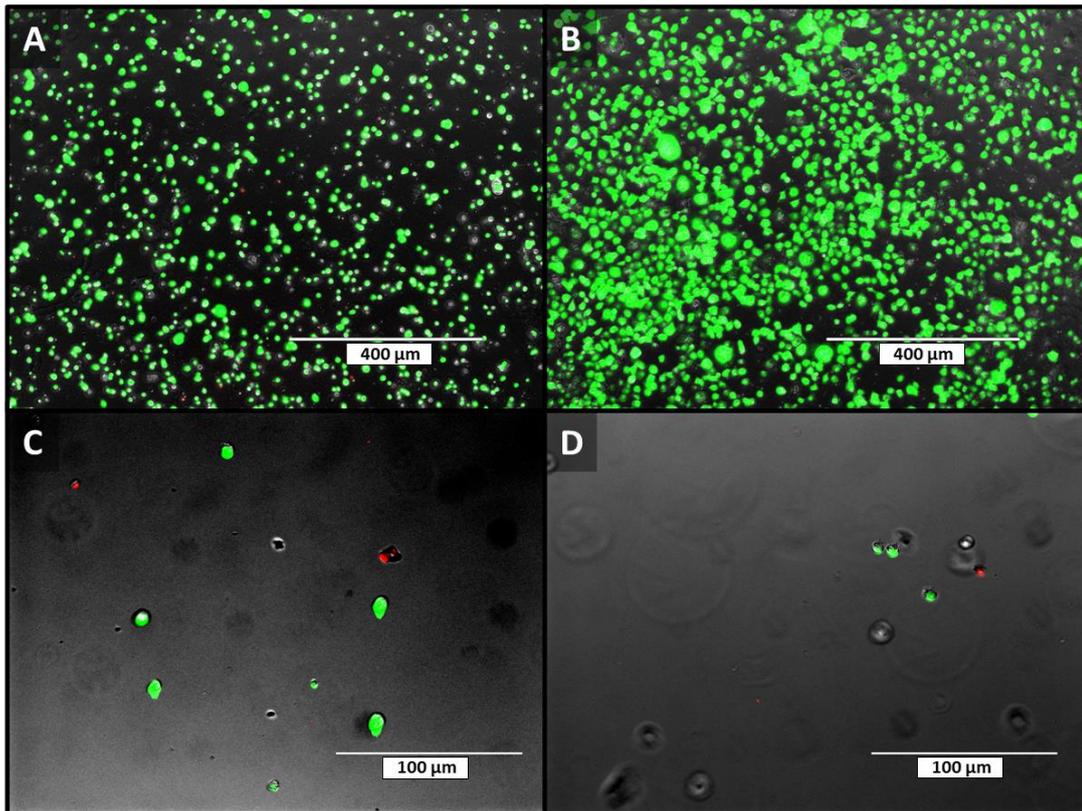
**Schema 5:** Reaktionsschema der Esterspaltung durch Esterasen im Inneren von lebendigen Zellen.<sup>[127]</sup>

Um die toten Zellen von den lebenden unterscheiden zu können, wurde das EthD-III verwendet. EthD-III ist eine Dimervariante des bekannten Ethidiumbromids und wird zur Anfärbung von DNA und RNA verwendet.<sup>[127]</sup> Die Färbewirkung von EthD-III beruht

dabei auf der Interkalation des Farbstoffs zwischen die Nucleobasen der DNA/RNA-Stränge, wodurch sich das Anregungsspektrum des EthD-III verändert und die Verbindung fluoreszieren kann. Da das EthD-III nicht zellgängig ist, wird es von lebenden Zellen nicht aufgenommen und kann als Folge dessen den Zellkern dieser nicht „anfärben“. Bei toten Zellen hingegen ist die Zellmembran beschädigt, wodurch das EthD-III in diese eindringen kann und es zur „Rotfärbung“ des Zellkerns kommt.

Zur Überprüfung der Biokompatibilität der Systeme wurden die 2D- und 3D-Zellexperimente mit einer weiten Auswahl an Hydrogelen wiederholt. Das Vorgehen zur Präparation war dabei analog zu dem der zuvor durchgeführten Experimente (Abschnitt 3.4). Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Nährmedium über den Gelen teilweise entfernt und mit einer Färbelösung aus den beiden Färbereagenzien, Calcein-AM und EthD-III, ersetzt. Die Zellen wurden dann für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Mikroskopieren der 3D-Experimente wurde die Färbelösung dann noch durch eine PBS-Pufferlösung ersetzt, um mögliche Störungen durch die Färbelösung zu vermeiden. Eine detaillierte Beschreibung des Vorgehens mit genauen Volumina und Konzentrationen ist im Experimentalteil dieser Arbeit aufgeführt (Abschnitt 6.1.9). Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der Biokompatibilitätsexperimente anhand einiger exemplarischer Bilder beschrieben und diskutiert (Abbildung 39).

Zunächst wurden die Bilder aus den 2D-Experimenten betrachtet. Wie schon in den vorhergegangenen Untersuchungen, konnte auf einigen Hydrogelen keine signifikante Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden (Abbildung 39, A). Die Zellen wiesen eine runde, kugelige Morphologie auf und zeigten leichte Bewegungen beim Verändern der Position des Mikroskops. Dies wies stark darauf hin, dass die Zellen hauptsächlich im Medium über dem Gel getrieben sind und nicht an der Oberfläche gebunden waren. Dadurch, dass nur ein Teil des Mediums vor dem Anfärben mit dem Live-Dead-Kit entfernt wurde, konnte zumindest ein qualitativer Überblick über das Verhältnis zwischen toten und lebenden Zellen gewonnen werden.



**Abbildung 39:** Exemplarische Bilder der Zellen nach der Anfärbung mit einem Life-Dead-Kit. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit EthD-III (rot) angefärbt; **A:** 2D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **B:** 2D-PEGDA-Gel,  $\beta = 200 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 90 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **C:** 3D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 0 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ ; **D:** 3D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{kat}} = 90 \text{ }\mu\text{mol/mL}$ .

Durch die Betrachtung von Bild **A** ließ sich erkennen, dass ein Großteil der über dem Gel treibenden Zellen grün leuchtete, was auf ihre Lebensfähigkeit schließen ließ. Vereinzelt konnten auch einige rote, tote Zellen beobachtet werden, jedoch war ihre Anzahl im Vergleich zu den lebenden Zellen sehr gering. Aufgrund der Beobachtung, dass die Zellen zum Großteil nicht an der Oberfläche gebunden schienen, war es denkbar, dass die Ergebnisse des Experiments durch das Entfernen eines Teils des Mediums vor der Anfärbung verfälscht worden sind. Da vor allem die toten Zellen keinerlei Interaktionen mit der Geloberfläche eingehen sollten, hätte es denkbar sein können, dass diese vermehrt mitsamt eines Teils des Mediums entfernt worden sind. Unabhängig davon konnten nach dem Anfärben noch eine große Menge an lebendigen Zellen festgestellt werden, sodass von einer grundlegend guten Biokompatibilität der Systeme ausgegangen werden konnte. Dies zeigte sich vor allem bei der Betrachtung des Bildes **B** von einem Hydrogel, auf welchem eine deutliche Menge an adhärenierten Zellen sichtbar war (Abbildung 39). Die Oberfläche des Gels war mit lebenden (grün) Zellen nahezu übersät. Die allgemeine Zellzahl schien im Vergleich zu Bild **A** hier auch deutlich höher gewesen zu sein. Dies ließ sich durch die an der Geloberfläche adhärenierten Zellen erklären, welche beim Entfernen des Nährmediums

vor dem Anfärben fest an der Geloberfläche anhafteten und als Folge dessen nicht abgesaugt wurden. Auf Bild **B** konnten vereinzelte tote (rot) Zellen beobachtet werden, die Anzahl war jedoch im Vergleich zu den lebenden Zellen sehr gering.

Für die 3D-Experimente wurden ebenfalls Bilder nach der Live-Dead-Färbung aufgenommen und ausgewertet (Abbildung 39, **C** und **D**). Auch wenn sich die Gele auf den Bildern **C** und **D** bezüglich ihrer Kationikkonzentration unterschieden, so zeigten sie beide vergleichbare Ergebnisse. Erneut konnte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen drei Dimensionen der Hydrogele festgestellt werden, was für eine erfolgreiche Präparation sprach. Die Auswertung der Live-Dead-Färbung zeigte, dass der Großteil der in den Gelen eingeschlossenen Zellen lebendig war. Da es bei den Aufnahmen der Fluoreszenz, aufgrund der Dicke der Gele, teilweise zu starker Lichtstreuung kam, sind auf den ausgewählten Bildern **C** und **D** nur die Färbung einzelner Zellen in der gewählten Fokusebene zu erkennen. Im Vergleich zu den Bildern **A** und **B** ließen sich in den 3D-Gelen eine höhere Anzahl an toten Zellen feststellen. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass es im Vergleich zu den 2D-Gelen zum Einschluss jeglicher lebender und toter Zellen gekommen ist. Vor allem bezüglich der toten Zellen wurden bei der Gelbildung auch solche Zellen mit eingeschlossen, welche bereits in der verwendeten Zellsuspension tot waren oder durch die bei der Gelpräparation auftretenden, Kräfte zerstört wurden. Jene Zellen hätten in den 2D-Experimenten beim Wechseln der Medien zumindest zum Teil entfernt werden können, jedoch war dies bei den 3D-Experimenten nicht möglich. Aufgrund dieser Erkenntnis konnte auch bei den untersuchten 3D-Hydrogelen von einer hohen Biokompatibilität ausgegangen werden. Es war an dieser Stelle somit möglich, qualitativ die hohe Biokompatibilität der verwendeten Hydrogelsysteme sowohl für eine 2D- als auch eine 3D-Anwendung zu verifizieren.

### 3.4.2. Untersuchung des Adhäsionsverhalten

In den vorhergegangenen Voruntersuchungen sowie den Biokompatibilitätsexperimenten konnten zum Teil deutliche Unterschiede bezüglich der Adhäsion von Zellen an die Oberfläche von 2D-Hydrogelen (Abbildung 38, **B** und **C**) festgestellt werden. Die verwendeten Systeme unterschieden sich dabei hauptsächlich in Bezug auf ihre Steifigkeit (**E-Modul**) sowie ihrer Kationikkonzentration ( $c_{\text{kat}}$ ). Um eine Übersicht zu bekommen, welchen Einfluss diese zwei Parameter auf die Adhäsion von COS-7-Zellen an die Geloberfläche haben, wurde eine Reihe verschiedener Hydrogele mit variabler Steifigkeit

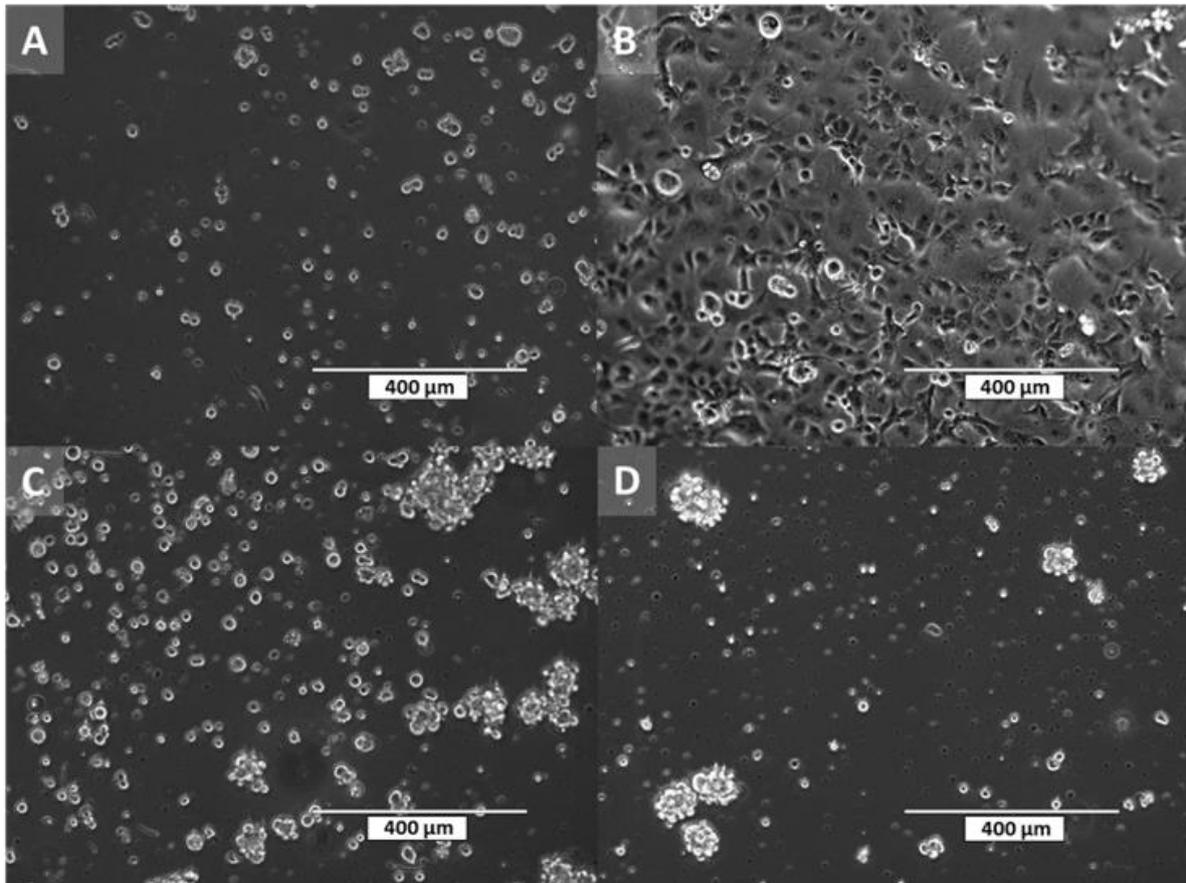
und Kationikkonzentration hergestellt (Tabelle 5). Diese wurden mit einer COS-7-Zellsuspension benetzt und im Anschluss für 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Auswertung der Experimente erfolgte im Anschluss qualitativ durch die Betrachtung der Proben mit einem Durchlichtmikroskop (Abbildung 40). Bezüglich der Steifigkeit der Systeme wurden drei verschiedene Bereiche für das E-Modul durch das Anpassen der allgemeinen Gelkonzentration eingestellt und untersucht. Die drei Bereiche wiesen dabei Werte für das E-Modul von ungefähr 8 kPa, 16 kPa und 25 kPa auf. Damit wurden Hydrogele mit E-Modulen erhalten, welche einen breiten Bereich verschiedener natürlicher Gewebetypen abdeckten.<sup>[109,128]</sup> Bezüglich der Kationikkonzentration wurden Werte zwischen 0 und 333  $\mu\text{mol/mL}$  eingestellt. Dieser Bereich wurde weit aufgespannt, da es zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschätzbar war, welche Konzentrationen für eine Begünstigung der Zelladhäsion notwendig sein würden.

**Tabelle 5:** Übersicht über die Daten der zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens eingesetzten Hydrogele.

| $E^a$ [kPa] | $c_{\text{kat}}^b$ [ $\mu\text{mol/mL}$ ] | Adhäsion <sup>c</sup> |
|-------------|---|-----------------------|
| 8,7 ± 0,3   | 0   | nein                  |
| 8,5 ± 0,3   | 90  | nein                  |
| 8,8 ± 0,2   | 180                                       | nein                  |
| 8,1 ± 0,7   | 333                                       | nein                  |
| 16,2 ± 0,3  | 0   | nein                  |
| 16,4 ± 0,3  | 45  | ja                    |
| 14,7 ± 0,5  | 90  | ja                    |
| 16,2 ± 0,4  | 180                                       | ja                    |
| 24,3 ± 0,3  | 0   | nein                  |
| 25,5 ± 0,4  | 45  | ja                    |
| 25,6 ± 0,3  | 90  | ja                    |
| 26,3 ± 0,6  | 180                                       | ja                    |

**a:** ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; **b:** ermittelt aus dem Volumen des Gels und der eingesetzten Menge an kationischem Polymer bei der Vernetzung; **c:** Adhäsion der Zellen qualitativ nachgewiesen durch Betrachtung der Zellmorphologie 24 h nach Auftragung der Zellen.

Bei der Betrachtung der Zellen nach 24 Stunden Inkubation konnten die Ergebnisse der Experimente in zwei Kategorien unterteilt werden. Der ersten Kategorie konnten dabei jene Gele zugeordnet werden, bei welchen die COS-7-Zellen keine oder beinahe keine Adhäsion an die Geloberfläche aufgewiesen haben. Die zweite Kategorie von Hydrogelen waren jene, auf denen die Oberflächen der Gele fast vollständig mit adhärennten COS-7-Zellen bedeckt waren. Um die qualitative Auswertung exemplarisch zu erläutern, wurden im Nachfolgenden einige Aufnahmen dargestellt, welche das Vorgehen zur Einordnung in die beiden Kategorien erläutern sollte (Abbildung 40).



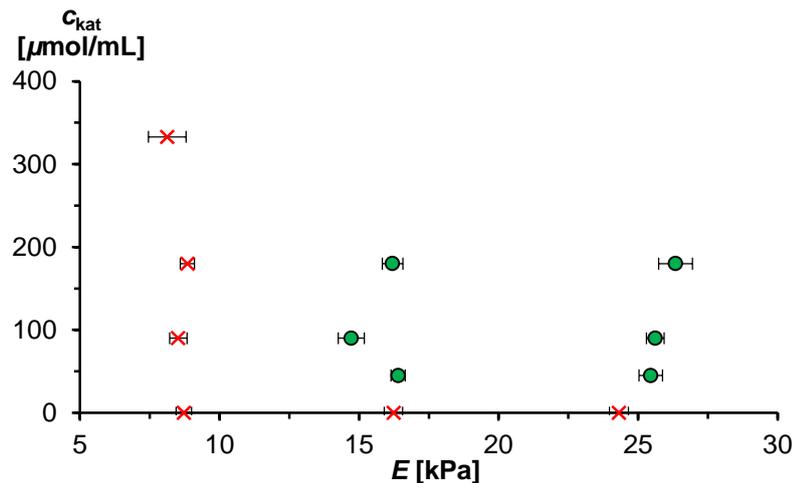
**Abbildung 40:** Exemplarische Bilder der COS7 Zellen auf verschiedenen Hydrogelen 24 h nach aufbringen der Zellen; Eigenschaften der Gele: (A)  $E = 8,5$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ , (B)  $E = 16,4$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 45$   $\mu\text{mol/mL}$ , (C)  $E = 8,7$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ , (D)  $E = 16,2$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ .

Bei der Betrachtung des ersten Hydrogels **A** ( $E = 8,5$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ) konnte keine signifikante Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden. Die Zellen wiesen eine kleine, runde Morphologie auf und waren sichtbar nicht an der Geloberfläche gebunden. Die Zellen lagerten sich dabei vereinzelt zu kleineren Aggregaten zusammen. Die fehlende Adhäsion und das Aggregieren der Zellen wiesen darauf hin, dass die Eigenschaften der Geloberfläche außerhalb der Bereiche lagen, welche eine Adhäsion der Zellen an die Oberfläche erlaubt hätten. Im Kontrast zum Hydrogel **A** war auf den Aufnahmen des Hydrogels **B** ( $E = 16,4$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 45$   $\mu\text{mol/mL}$ ) ein komplett gegensätzliches Bild zu erkennen. Die Oberfläche des Gels war beinahe vollständig mit Zellen bedeckt, welche durch ihre gestreckte und verflochte Form auf eine deutliche Adhäsion an die Geloberfläche hinwiesen.<sup>[123]</sup> Vereinzelt ließen sich Zellen feststellen, welche nur teilweise oder gar nicht an die Geloberfläche gebunden waren. Dies war vermutlich auf die bei den Experimenten eingesetzte Anzahl an Zellen zurückzuführen, welche, im Vergleich zur Oberfläche der hergestellten Hydrogele, mit ungefähr 140.000 Zellen sehr hoch war. Die vorhandene Geloberfläche war dadurch beinahe vollständig

besetzt, wodurch es den übrigen Zellen nicht mehr möglich gewesen ist, noch eine freie Stelle zu finden und an diese zu adhären.

Die Bilder der Gele **C** ( $E = 8,7$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ) und **D** ( $E = 16,2$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ), zeigten erneut keine signifikante Adhäsion der COS-7-Zellen an die Oberfläche der verwendeten Hydrogele. Im Unterschied zu Gel **A** konnte bei den Gelen **C** und **D** jedoch eine deutlich höhere Anzahl an aggregierten Zellen festgestellt werden. Dies könnte eventuell auf die Abwesenheit der kationischen Ladung in diesen Gelen zurückgeführt werden, welche eine Zell-Gel-Interaktion unterstützt hätte. Auf den Bildern von Gel **D** ließen sich, neben einer erhöhten Anzahl an Zellaggregaten, auch eine große Menge kleiner, „dunkler“ Zellen oder Zellkompartimente feststellen, bei welchen es sich vermutlich um abgestorbene Zellen gehandelt hat. Die Möglichkeit für Zellen mit ihrer Umgebung zu wechselwirken, ist ein elementarer Bestandteil für die Steuerung von Prozessen innerhalb der Zellen und dem allgemeinen Überleben über einen längeren Zeitraum.<sup>[128–130]</sup> Ohne die Möglichkeit mit einer Oberfläche zu interagieren suchen Zellen einander, um mechanotransduktive Prozesse einzuleiten.<sup>[129]</sup> Es war somit davon auszugehen, dass die Menge an aggregierten Zellen in den durchgeführten Experimenten im Zusammenhang mit der auftretenden Zell-Gel-Interaktion gestanden hat. Je weniger davon stattgefunden hat, desto mehr Zellaggregation konnte beobachtet werden.

Der Vergleich der Bilder von Gel **A**, **C** und **D** konnte dabei als erster Hinweis gesehen werden, dass die Anwesenheit von kationischen Funktionalitäten (Gel **A**) zu einer leicht erhöhten Zell-Gel-Interaktion geführt hat. Um einen besseren Überblick über die Ergebnisse der jeweiligen Adhäsionsexperimente zu bekommen, wurden die Beobachtungen bezüglich der Adhäsion, in Abhängigkeit der eingestellten Hydrogeleigenschaften, in Abbildung 41 noch einmal zusammengefasst dargestellt.



**Abbildung 41:** Übersicht über die Ergebnisse der Zelladhäsionsexperimente in Abhängigkeit der Hydrogeleigenschaften.

Bei Betrachtung der Ergebnisse war zu erkennen, dass es eine deutliche Abhängigkeit der Zelladhäsion von der Steifigkeit der Gele sowie deren kationischen Funktionalisierung gab. Bei den Gelen, welche geringe E-Module ( $\sim 8$  kPa) besaßen, konnte, unabhängig von der Kationikkonzentration, keine signifikante Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden. Die Vermutung war, dass die Geloberfläche zu weich war, um den Zellen als angemessene Adhäsionsgrundlage zu dienen. Selbst durch das Einbringen größerer Mengen an kationischer Funktionalisierung konnte die geringe Festigkeit der Gele an dieser Stelle nicht ausgeglichen werden. Ähnliche Beobachtungen konnten XIA *et al.* in ihrer Arbeit mit COS-7-Zellen machen.<sup>[131]</sup> XIA *et al.* entwickelten ein Komposithydrogelsystem aus Graphenoxid und Poly(*N*-isopropylacrylamid), welches eine temperaturabhängige Steuerung der Gelsteifigkeit erlaubt. Ihr Vorgehen war dabei, COS-7-Zellen auf der Oberfläche ihrer Gele ( $E = 13 - 15$  kPa) zu kultivieren, um große, breitflächige Zell-Tücher zu erzeugen. Durch das Verringern der Temperatur der Systeme konnte dann eine Abnahme der Gelsteifigkeit erreicht werden ( $E = 3 - 5$  kPa), wodurch die Zell-Tücher nicht mehr an der Oberfläche der Gele adhärten. Die Tücher lösten sich dadurch selbstständig von der Geloberfläche ab und konnten als großflächiges Konstrukt isoliert und betrachtet werden. XIA *et al.* haben somit ein, von der Steifigkeit der Systeme abhängiges, Adhäsionsverhalten der COS-7-Zellen beschrieben, welches sich mit den Beobachtungen aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gedeckt hat. Dies galt dabei nicht nur für das Adhäsionsverhalten von COS-7-Zellen gegenüber weichen Gelen, sondern konnte teilweise auch für die restlichen Gele beobachtet werden. In unserem Fall war es jedoch nicht ausreichend, nur die Steifigkeit der Gele zu erhöhen, um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen.

Bei der Betrachtung der Hydrogele mit mittlerer ( $\sim 16$  kPa) und hoher ( $\sim 25$  kPa) Steifigkeit konnte ohne die Anwesenheit von kationischen Funktionalitäten ( $c_{\text{kat}} = 0 \mu\text{mol/mL}$ ) keine signifikante Adhäsion der COS-7-Zellen an der Geloberfläche beobachtet werden. Dies änderte sich jedoch deutlich, sobald kationische Polymere bei der Herstellung der Gele verwendet wurden. Bereits das Einbringen geringer Mengen an kationischer Ladung ( $c_{\text{kat}} = 45 \mu\text{mol/mL}$ ) führte zu einer deutlichen Verbesserung des Adhäsionsverhaltens. Zwischen den einzelnen Gelen, auf welchen Zelladhäsion beobachtet werden konnte, gab es qualitativ jedoch kaum Unterschiede festzustellen, da die Oberflächen der Gele fast vollständig mit Zellen bedeckt waren. Die kationischen Ladungen an der Oberfläche der Gele ermöglichten es vermutlich, die Passivität der Gele zu überwinden und eine für die Zelladhäsion notwendige Zell-Oberflächen-Interaktion zu gewährleisten. Die kationische Ladung des TMAEA erfüllt somit in dem hier verwendeten System eine vergleichbare Funktion wie das Graphenoxid in der Arbeit von XIA *et al.*, welches durch seine Oberflächenladung und Struktur für eine Erhöhung der Zell-Oberflächen-Wechselwirkung sorgt.<sup>[131,132]</sup>

Zusammengefasst ließen sich, bezüglich des Adhäsionsverhaltens von COS-7-Zellen an die Oberfläche der verwendeten Hydrogelsysteme, grobe Grenzwerte feststellen, welche es zu überschreiten galt. Dabei sollte für eine signifikante Adhäsion der Zellen Gele hergestellt werden, welche über eine Steifigkeit von mindestens  $E = 15$  kPa und einer Konzentration an kationischen Funktionalitäten von  $c_{\text{kat}} = 45 \mu\text{mol/mL}$  verfügen. Die dabei festgestellten Grenzwerte galten an dieser Stelle jedoch nur für die Arbeit mit COS-7-Zellen und müssten als solche vor der Arbeit mit anderen Zelltypen erneut überprüft und quantifiziert werden.

### 3.5. Zusammenfassung PEG-Vernetzer

Mittels freier radikalischer Polymerisation war es möglich sechs verschiedene thiolhaltige Präpolymere auf der Basis von 4-Acryloylmorpholin, *N,N*-Bis(methacryloyl)cystamin und Trimethylaminoethylacrylat herzustellen und mithilfe von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, GPC und dem Ellman's Assay zu charakterisieren. Diese Polymere konnten dann mithilfe der bioorthogonalen Michael-Addition, unter Verwendung von **PEGDA<sub>3500</sub>** als Vernetzer, zur Synthese verschiedener Hydrogele genutzt werden. Um den allgemeinen Herstellungsprozess zu optimieren, wurden Untersuchungen bezüglich der Vernetzungsreaktion durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass durch die Verwendung

von 0,7 Äquivalenten an **PEGDA<sub>3500</sub>** Gele mit einer guten Steifigkeit und einem hohen Gelanteil von bis zu 94% erhalten werden konnten.

Um in nachfolgenden Experimenten die Eigenschaften der Hydrogele besser vorhersagen zu können, wurde der Einfluss der Gelkonzentration ( $\beta$ ) und der Kationikkonzentration ( $c_{\text{kat}}$ ) auf die Systeme untersucht. Bei der Untersuchung der Gelkonzentration (20 bis 300 mg/mL) zeigte sich ein annäherungsweise linearer Zusammenhang zwischen der Steifigkeit der Systeme und ihrer Konzentration. Allein durch die Variation der Gelkonzentration war es dabei möglich, Hydrogele mit einem E-Modul im Bereich von 1,4 kPa ( $\beta = 2$  mg/mL) bis 51 kPa ( $\beta = 300$  mg/mL) herzustellen. Der Einsatz von kationischen Polymeren in der Gelherstellung führte, im Vergleich zu den ungeladenen Systemen, zu einer Zunahme der Steifigkeit der Systeme. Der dabei festgestellte Anstieg des E-Moduls lag in Abhängigkeit der Kationikkonzentration bei bis zu 30% ( $c_{\text{kat}} = 335$   $\mu\text{mol/mL}$ ), was auf die Ausbildung von physikalischen Vernetzungspunkten, durch Ion-Ion-Wechselwirkungen zurückzuführen war. Zusätzlich zum Einfluss der einzelnen Parameter auf die mechanischen Eigenschaften der Gele wurde auch die Gelmorphologie mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Dabei konnten zum Großteil feinporige homogene Systeme beobachtet werden, mit Porengrößen zwischen 10 und 30  $\mu\text{m}$ . Durch das Einbringen größerer Mengen kationischer Polymere kam es zu Inhomogenitäten innerhalb der Systeme, welche sich ebenfalls auf Ion-Ion-Wechselwirkungen zurückführen ließen.

Mithilfe der ausgiebig charakterisierten Gelsysteme konnten Zellexperimente an COS-7-Zellen durchgeführt werden. Dabei war es möglich, die Biokompatibilität der Systeme für eine 2D- und 3D-Anwendung mithilfe einer Live-Dead-Färbung zu bestätigen. Bezüglich der 3D-Zellexperimente konnte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in allen drei Dimensionen der Gele festgestellt werden. Die Zellen wiesen dabei eine gesunde Morphologie und Viabilität nach 24 Stunden Inkubationszeit auf. Bei den 2D-Zellexperimenten konnte nach 24 Stunden ebenfalls eine hohe Viabilität der Zellen festgestellt werden. Bei der Betrachtung des Adhäsionsverhaltens der COS-7-Zellen an die Oberflächen der Hydrogele zeigte sich, in Abhängigkeit der Geleigenschaften, starke Unterschiede. Bei näherer Untersuchung dieses Verhaltens war es möglich, spezifische Grenzwerte für eine erfolgreiche Adhäsion von COS-7-Zellen zu ermitteln. In Einklang mit der Literatur<sup>[131]</sup> konnte dabei eine Grenzsteifigkeit von  $E = \sim 15$  kPa formuliert werden. Bezüglich der kationischen Funktionalisierung reichte eine geringe Konzentration von

$c_{\text{kat}} = 45 \mu\text{mol/mL}$  bereits aus, um eine nahezu vollständige Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche zu gewährleisten.

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hydrogelsystem konnten somit erfolgreich eingesetzt werden. Neben einer guten Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften konnte auch die für weitere Anwendungen notwendige Biokompatibilität der Systeme in 2D und 3D verifiziert werden. Der Einfluss der Geleigenschaften auf das Adhäsionsverhalten von COS-7-Zellen konnte erstmalig qualitativ untersucht werden, bedarf jedoch in Zukunft weiterer Forschung, vor allem in Bezug auf alternative Zelllinien. Zusätzlich wurden im Rahmen dieses Kapitels noch keine weiteren Forschungen bezüglich der Langzeitkultivierung von Zellen getätigt. Dies galt es im Nachfolgenden noch zu klären.

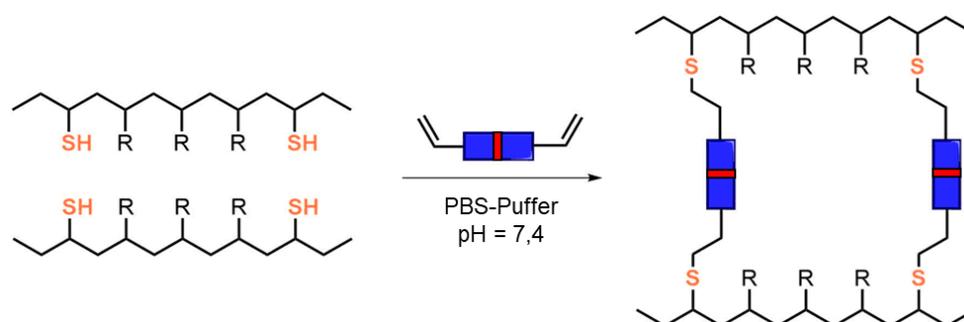


## 4. Hydrogele auf der Basis von Polyoxazolinvernetzern

### 4.1. Aufbau des Hydrogelsystems

Die Grundlage für die Herstellung der Oxazolin-vernetzten Hydrogele stellte erneut das thiolhaltige Polymersystem von BOLDUAN dar, welches er im Rahmen seiner Dissertation beschrieben hat.<sup>[80]</sup> Die Synthese und Charakterisierung dieser Polymere wurden im vorhergegangenen Teil dieser Arbeit (Kapitel 3.2, Seite 20 ff.) bereits beschrieben und daher in diesem Kapitel nicht erneut betrachtet.

Der Fokus in diesem Teil der Arbeit lag auf der Entwicklung eines neuen Vernetzersystems, welches, beim Einsatz in der Hydrogelsynthese, zur Bildung von hydrolytisch abbaubaren Hydrogelen führen sollte. Die Gelbildung sollte, analog zu den zuvor behandelten PEGDA-Systemen, durch eine Michael-Addition zwischen den Thiofunktionalitäten der Präpolymere und den Michael-Akzeptor-Endgruppen der Vernetzerpolymere erfolgen. Durch das Einführen von hydrolytisch labilen Endgruppen werden dabei Vernetzer gebildet, welche später als Sollbruchstellen für den Hydrogelabbau dienen. Eine Übersicht über den allgemeinen Aufbau dieses System ist in Abbildung 42 schematisch dargestellt.



**Abbildung 42:** Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Hydrogelsystems; **blau** = Poly(oxazolin)-Rückgrat; **rot** = hydrolytisch labile Funktionalitäten.

#### 4.1.1. Eine Alternative zu Poly(ethylenglykol)

Poly(ethylenglykol) (**PEG**) findet aufgrund seiner hohen Biokompatibilität und seiner Stealth-Eigenschaften eine breite Anwendung in der Medizin.<sup>[133]</sup> Einer der Hauptnutzen von PEG ist dabei die Funktionalisierung von Wirkstoffen oder Wirkstoffträgern um deren Abbau durch Enzyme zu behindern und dadurch die Verweilzeit im Blutkreislauf zu erhöhen. PEG ist aufgrund stabilen Polyether-Rückgrats nicht bioabbaubar und es wird davon ausgegangen, dass PEG-Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa vom

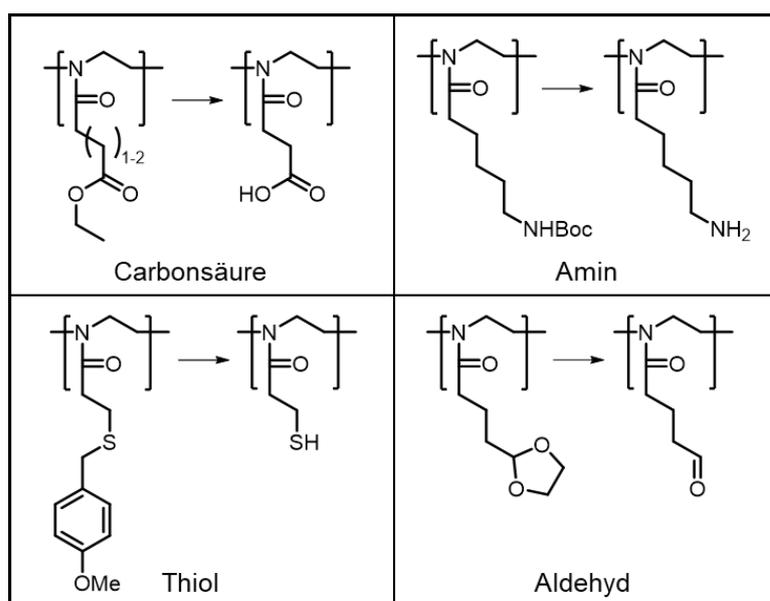
Körper einfach über den Urin ausgeschieden werden.<sup>[49,133]</sup> Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es kaum Langzeitstudien, welche sich mit der Akkumulation von PEG-Rückständen aus Konjugaten beschäftigen, wodurch aus toxikologischer Sicht von diesen ein Risiko ausgehen könnte.<sup>[134,135]</sup> Zusätzlich dazu mehren sich in den letzten Jahren Beobachtungen bezüglich des Auftretens von PEG-Antikörpern im Menschen.<sup>[136–138]</sup> Diese Antikörper werden von einer stetig zunehmenden Menge an Menschen gebildet und sind eine Reaktion auf die vermehrte Verwendung von PEG in verschiedenen Anwendungen des Alltags, wie beispielsweise als Zusatz in Nahrungsmitteln oder Kosmetika.<sup>[138,139]</sup> Bei Menschen, deren Körper diese PEG-Antikörper ausgebildet haben, kann es durch die Aufnahme von PEG aus Alltagsprodukten zum Auftreten von anaphylaktischen Reaktionen wie Hautreizungen oder Fieber kommen.<sup>[134,137,138,140]</sup> Aufgrund dieser Probleme war es von Interesse, für zukünftige Anwendungen alternative Systeme zum etablierten PEG zu finden.

### **4.1.2. Poly(2-oxazoline)**

Die neuartigen Vernetzerpolymere sollten auf der Basis von Poly(2-oxazolin) hergestellt werden. Die Herstellung von Poly(2-oxazolin) mithilfe einer kationischen Ringöffnungspolymerisation wurden erstmals Mitte der 1960er Jahre von vier unterschiedlichen Forschungsgruppen beschrieben und findet seitdem eine breite Anwendung in der Forschung.<sup>[141,142]</sup> Die ersten Untersuchungen fokussierten sich dabei darauf, Poly(2-oxazolin) zu entwickeln, welche als Stabilisatoren, Tenside oder als Duroplasten Einsatz finden sollten.<sup>[143,144]</sup> Aufgrund der Amidfunktionalitäten in den Seitenketten der Oxazolin, wodurch sie auch als Pseudopeptide bezeichnet werden, wurde im Laufe der Zeit auch ihr Potential für eine biomedizinische Anwendung näher untersucht.<sup>[145]</sup> Eine der Hauptanwendungen dabei war die Bindung von Poly(2-oxazolin) an verschiedenste bioaktive Moleküle wie Proteine, Wirkstoffe oder liposomale Doppelschichten.<sup>[146–148]</sup> Die Oxazolin zeigten dabei eine hohe Biokompatibilität und Stealth-Eigenschaften auf, welche große Ähnlichkeiten zu denen von PEG aufwiesen.<sup>[149,150]</sup> Eine weitere Anwendung von Poly(2-oxazolin) war der Einsatz im Wirkstofftransport in Form von Mizellen oder liposomalen Systemen. Dabei wurde vor allem die Fähigkeit der kationischen Ringöffnungspolymerisation genutzt, gezielt amphiphile Blockcopolymere von Poly(2-oxazolin) herzustellen.<sup>[151,152]</sup> Da Poly(2-oxazolin), ähnlich wie PEG, als nicht bioabbaubar betrachtet werden, besteht der Verdacht das es beim Einsatz *in vitro* zur Akkumulation der Polymere kommen kann, was

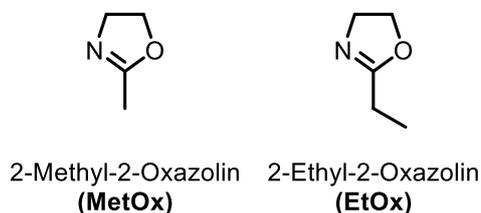
möglicherweise zur einer Schädigung des Organismus führen kann.<sup>[153]</sup> Um diese Problematik zu Umgehen wird mittlerweile versucht Polyoxazoline herzustellen, welche durch Modifikation oder Kombination mit anderen Polymersystemen Bioabbaubarkeit aufweisen.<sup>[154]</sup> Ein Beispiel für ein solches System wurde 2020 von GÖPPERT *et al.* beschrieben.<sup>[153]</sup> Sie verwendeten dabei Poly(2-ethyl-oxazoline) welche sie über mehrere Reaktionsschritte hydrolysiert, partiell oxidiert und anschließend reacyliert haben. Die dadurch erhaltenen Polymere wiesen ein Amid-*co*-Oxazolin-Rückgrat auf und waren unter sauren sowie enzymatischen Bedingungen abbaubar. Neben den zuvor beschriebenen Anwendungen, wurde in den letzten Jahren auch immer mehr die Verwendung von Poly(2-oxazolin) in der Herstellung von Hydrogelen für eine biomedizinische Anwendung untersucht.<sup>[106,155]</sup>

Bei der Synthese von Poly(2-oxazolin) kann auf eine breite Auswahl verschiedener Oxazolinmonomere zurückgegriffen werden, welche über verschiedene Seitenkettenfunktionalitäten verfügen und somit maßgeblich die Eigenschaften der Polymere beeinflussen können.<sup>[142,156]</sup> Aufgrund der vielfältigen Seitenketten der 2-Oxazoline besteht auch großes Potential für Modifikationen der Polymere nach Ablauf der Polymerisation. So können zum Beispiel Monomere polymerisiert werden, welche in den Seitenketten geschützte Funktionalitäten wie Carbonsäuren, Aldehyde, Amine oder Thiole enthalten. Diese Funktionalitäten können nach der Polymerisation entschützt und im Anschluss für weitere Modifikationen verwendet werden.<sup>[148]</sup>



**Abbildung 43:** Übersicht über verschiedene Reaktionen zur Entschützung reaktiver Funktionalitäten in Poly(2-oxazolin)-Seitenketten (modifiziert aus <sup>[148]</sup>).

Eine weitere Möglichkeit für das nachträgliche Funktionalisieren von Poly(2-oxazolin) ist das Einbringen von Monomeren mit Vinyl- oder Alkynylgruppen, welche dann beispielsweise in Klick-Reaktionen umgesetzt werden können.<sup>[155]</sup>



**Abbildung 44:** Strukturformeln der beiden Monomere 2-Methyl-2-oxazolin und 2-Ethyl-2-oxazolin.

Auch wenn es unter den 2-Oxazolinen eine Vielzahl bekannter und untersuchter Monomere zur Polymersynthese gibt, so finden vor allem das 2-Methyl-2-oxazolin (**MetOx**) und das 2-Ethyl-2-oxazolin (**EtOx**) in der biomedizinischen Forschung Anwendung (Abbildung 44).<sup>[142]</sup> Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (**PEtOx**) zeichnet sich durch seinen amphiphilen Charakter aus, welcher für eine gute Löslichkeit in wässrigen und organischen Lösungsmitteln sorgt. Das Poly(2-methyl-2-oxazolin) (**PMetOx**) stellt im Vergleich zum PEtOx eine etwas hydrophilere Alternative dar und findet in der Forschung ähnlich oft Anwendung wie das PEtOx.<sup>[150,157]</sup>

### 4.1.3. Hydrogele auf der Basis von Poly(2-oxazolin)

Die ersten Oxazolin-basierten Hydrogelsysteme, welche in der Literatur beschrieben wurden, sind verschiedene Systeme von CHUJO *et al.* in den Jahren 1989 bis 1993. Die dabei postulierten Systeme basierten auf PMetOx und verwendeten verschiedene Techniken zur Vernetzung, wie zum Beispiel *in situ* durch die Verwendung von bifunktionellen Oxazolinmonomeren<sup>[158]</sup>, koordinativ durch Bipyridin-funktionalisiertes PMetOx<sup>[159]</sup>, photochemisch durch Anthracen-funktionalisierte Polymere<sup>[160]</sup> oder oxidativ durch die Ausbildung von Disulfidbrücken.<sup>[161]</sup> Basierend auf den Arbeiten von CHUJO *et al.* wurden im Laufe der Jahre viele weitere Systeme entwickelt, welche sich bezüglich des Zeitpunktes ihrer Vernetzung unterscheiden lassen.

Eine Art von Hydrogelsystemen waren dabei solche, welche schon bei der Polymerisation selbst durch die Verwendung von bifunktionellen Oxazolinmonomeren vernetzt werden. Der Fokus dieser Arbeiten lag vor allem auf der Untersuchung verschiedener Vernetzer-Monomere, wobei die Längen und die Arten der Abstandshalter-Moleküle variiert wurde.<sup>[106,162]</sup> Diese Systeme konnten auch in ersten Zellexperimenten an Fibroblasten-Zellen getestet und ihre

teilweise sehr gute Biokompatibilität verifiziert werden. Die Hauptnachteile dieser Systeme waren vor allem die geringe Kontrolle über die Netzwerkstruktur sowie die Toxizität der eingesetzten Monomere, welche für eine 3D-Anwendung problematisch sind.<sup>[157]</sup> Um diese Probleme zu umgehen, wurde die zweite Art von Hydrogelen durch die nachträgliche Vernetzung von Oxazolin-Präpolymeren gebildet. Als Beispiel dafür kann ein System von LORSON *et al.* genannt werden, in welchem Block-Copolymere aus 2-*N*-Propyl-2-oxazin und MetOx verwendet wurden, um thermogelierende Hydrogele zu bilden.<sup>[163]</sup> Da die Polymerlösungen erst oberhalb einer Temperatur von 28 °C Gele ausgebildet haben, konnten die Polymere mit einer Zellsuspension gemischt und in 3D-Formen gedruckt werden. Die erhaltenen Hydrogele wiesen dabei eine, für thermogelirte Gele, hohe Steifigkeit von  $G' > 1000$  Pa auf.

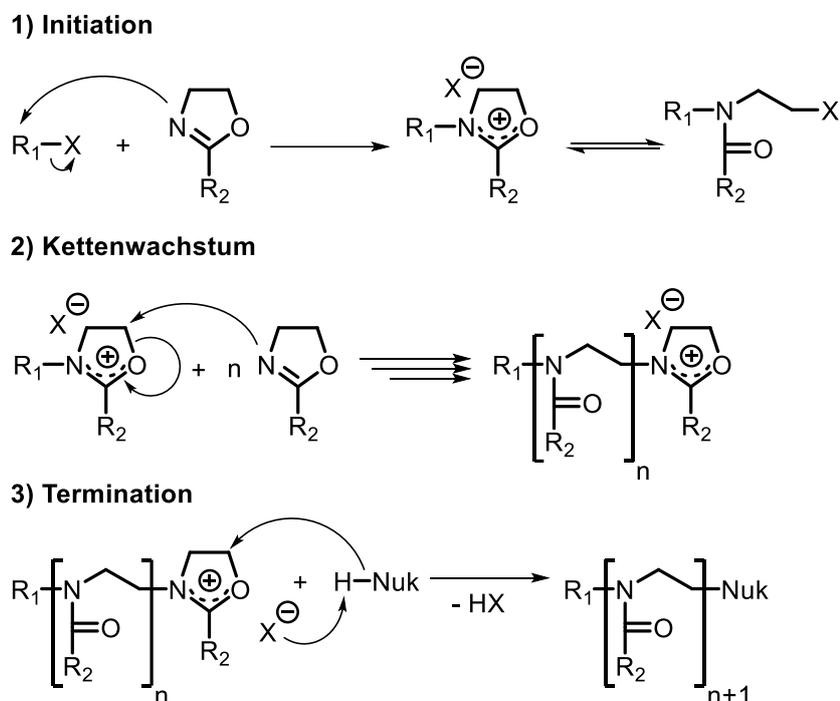
Ein System, welches auf eine nachträgliche kovalente Vernetzung von Oxazolin-Präpolymeren setzt, wurde 2017 von LUEF *et al.* beschrieben.<sup>[164]</sup> Sie nutzen dabei Copolymere aus 2-Ethyl-2-oxazolin, 2-Nonyl-2-oxazolin und 2-Dec-9'-enyl-2-oxazolin. Die Vinyl-Seitenketten des 2-Dec-9'-enyl-2-oxazolins wurden dann nachträglich durch den hydrolysierbaren Vernetzer Ethylenglykol-bis-mercaptoessigsäure photovernetzt. Dadurch wurden Hydrogele erhalten, welche über eine definierte Komposition verfügten und gute mechanische Eigenschaften aufwiesen. Ein ähnliches System wurde auch von YOU *et al.* beschrieben, welche vinyl-funktionalisierte Poly(2-oxazoline) mit Matrix-Metalloprotease-sensitiven Peptiden vernetzt haben.<sup>[165]</sup> Die dadurch erhaltenen Hydrogele wiesen nicht nur eine gute Bioabbaubarkeit auf, sondern konnten auch in ersten *in vitro* Experimenten erfolgreich eingesetzt werden.

#### 4.1.4. Kationische Ringöffnungspolymerisation

Die kationische Ringöffnungspolymerisation (*engl.*: cationic ring opening polymerization; **CROP**) gehört zu den lebenden Polymerisationsarten, welche erstmals 1956 von SZWARC beschrieben wurde.<sup>[166]</sup> Der Mechanismus der Reaktion lässt sich in drei Hauptschritte gliedern und ist im Nachfolgenden mechanistisch dargestellt (Abbildung 45).

Der erste Schritt der Polymerisation ist die Initiation (**1**), bei welcher das Stickstoffatom des Oxazolins nukleophil an das elektrophile Zentrum des Initiatormoleküls (**R<sub>1</sub>-X**) angreift und sich ein zyklisches, kationisches Zwischenprodukt bildet. Als Initiatoren können zum Beispiel starke Brønsted-Säuren (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), Lewis-Säuren (AlCl<sub>3</sub>),

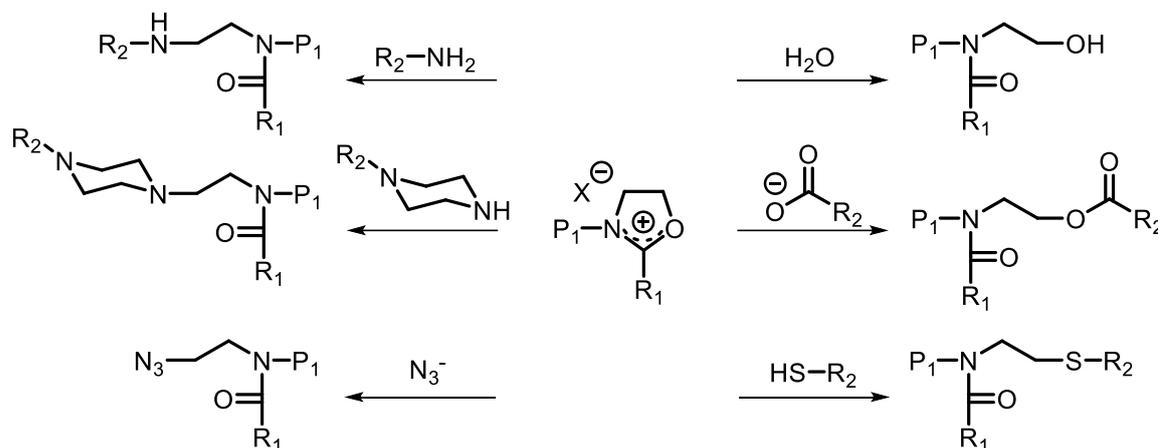
Sulfonsäureester (Methyltriflat), Vinylhalogenide (1,4-Dibrom-2-buten) oder Benzylhalogenide (Benzylbromid) verwendet werden. Bei einer idealen lebenden Polymerisation läuft die Initiation schnell und vollständig ab, wodurch alle Polymerketten gleichzeitig gestartet werden.



**Abbildung 45:** Mechanismus der kationischen Ringöffnungspolymerisation von 2-Oxazolinen; Nuk = Nukleophil.<sup>[148]</sup>

Beim zweiten Schritt der Polymerisation, dem Kettenwachstum (2), greifen immer wieder Stickstoffatome von Oxazolin-Monomeren das elektrophile Zentrum der wachsenden Polymerkette an. Da die Geschwindigkeit dieses Schrittes, im Vergleich zur Initiation, sehr niedrig ist, kann davon ausgegangen werden, dass alle Ketten mit der gleichen Geschwindigkeit wachsen. Dadurch ist es möglich, mittels CROP Polymere mit einem definierten Molekulargewicht zu erhalten. Nachdem alle vorhandenen Monomere in die Polymerketten eingebaut wurden, sind die Ketten weiterhin als Polymerkationen aktiv. Durch die Zugabe von weiterem Monomer können die Ketten entsprechend des Kettenwachstumsmechanismus weiterwachsen. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um Blockcopolymere mit definierten Monomerblöcken aufzubauen und so besondere Polymereigenschaften zu erzeugen. Der letzte Schritt der Reaktion ist der Terminationsschritt (3). Hierbei findet durch Zugabe eines Nukleophils (Wasser, Amine, Carbonsäuren) ein nukleophiler Angriff an das elektrophile Zentrum des Polymerkations statt. Aufgrund dieses Terminationsmechanismus ist es von elementarer Bedeutung, dass die CROP unter inerten Bedingungen durchgeführt wird, da jegliche Rückstände von

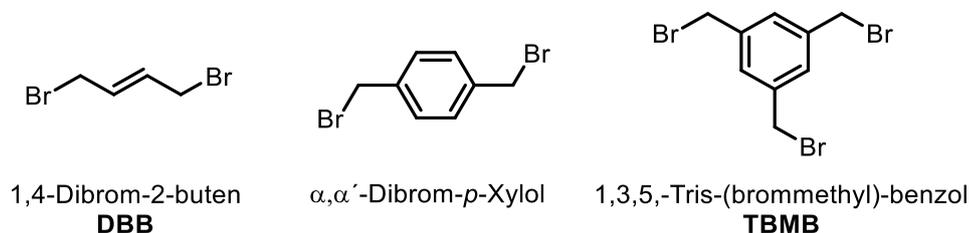
Wasser aus der Luft zu einer sofortigen Beendigung der Polymerisation führen würde. Gleichzeitig erlaubt der nukleophile Charakter des Polymerkations das gezielte Einführen von bestimmten Endgruppenfunktionalitäten. Eine Übersicht über eine Auswahl an verschiedenen nukleophilen Gruppen, welche für die Endgruppenfunktionalisierung genutzt werden können, sind im Nachfolgenden dargestellt (Abbildung 46).<sup>[148]</sup>



**Abbildung 46:** Übersicht über eine Auswahl verschiedener Terminierungsreaktionen bei einer CROP.<sup>[148]</sup>

Das Einführen von zusätzlichen funktionellen Gruppen in einer CROP kann dabei nicht nur über die Terminationsreaktion erfolgen, sondern auch durch das Verwenden von speziellen Initiator-molekülen. Als Beispiel dafür kann das Pent-4-yn-1-yl-triflat genannt werden, welches durch seine terminale Alkynyl-Funktionalität eine Möglichkeit für nachträgliche Funktionalisierungsreaktionen bietet.<sup>[167]</sup>

Durch die Verwendung von multifunktionalen Initiatoren ist es möglich, mit der CROP mehrarmige Polymerketten herzustellen. Initiatoren, die dabei Anwendung finden, sind beispielsweise das 1,4-Dibrom-2-buten (**DBB**)<sup>[168]</sup>,  $\alpha,\alpha'$ -Dibrom-*p*-Xylol<sup>[169]</sup> oder 1,3,5,-Tris-(brommethyl)-benzol (**TBMB**)<sup>[151]</sup> (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Beispiele für multifunktionelle Initiatoren.

## 4.2. Synthese und Charakterisierung der Polyoxazoline

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Oxazolin-basierte Vernetzer hergestellt und charakterisiert werden. Das allgemeine Schema der Synthesen ist in der Abbildung 48 dargestellt.

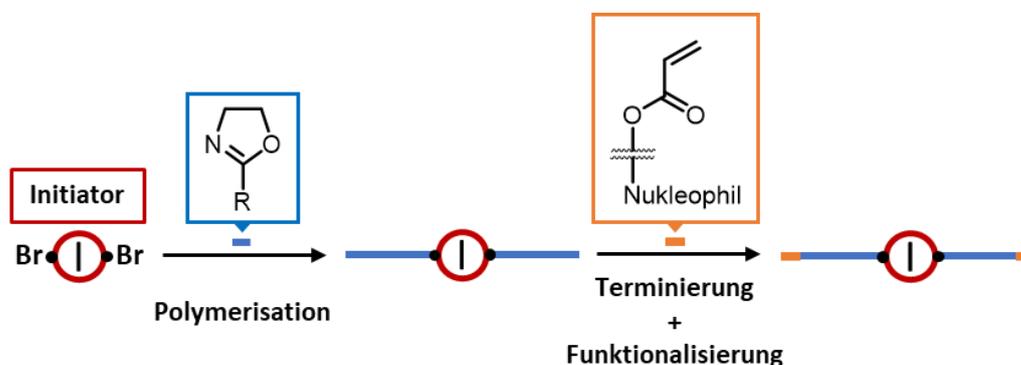
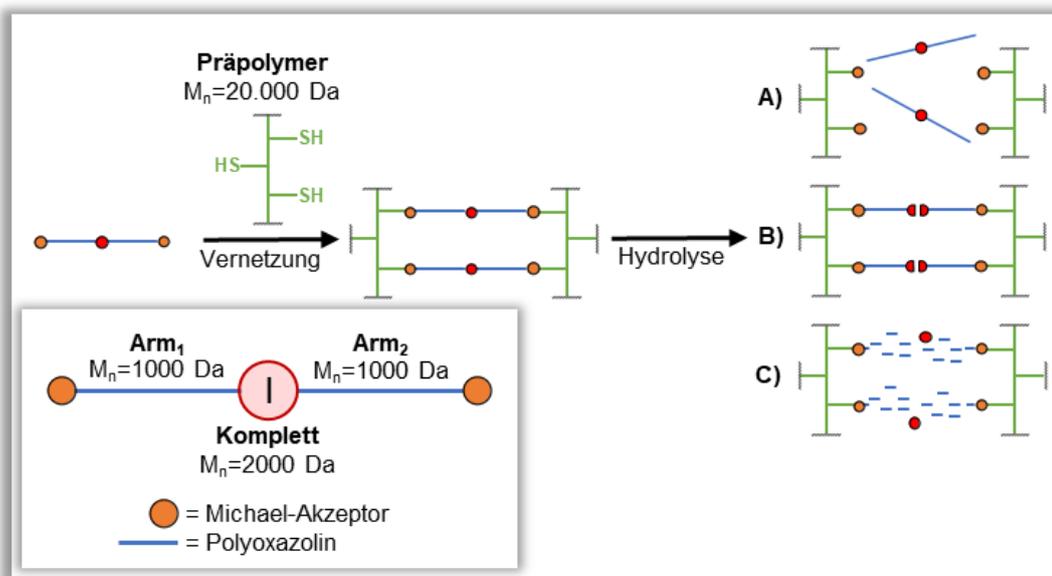


Abbildung 48: Schematische Übersicht über die Synthese der Oxazolin-basierten Vernetzer.

Der erste Schritt der Synthese war die Polymerisation der Oxazolinmonomere. Dabei wurde über die Wahl des Initiators die Anzahl der Arme der späteren Polymerketten vorgegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Initiatoren DBB (bifunktionell) und TBMB (trifunktionell) verwendet. Die Initiatoren wurden dann in einer CROP mit verschiedenen 2-Oxazolinen umgesetzt, wobei hauptsächlich das EtOx Anwendung gefunden hat. Nach dem vollständigen Ablauf der Polymerisation sollten die Polymerketten dann durch Zugabe eines Nukleophils terminiert werden. Die für den späteren Abbau der Vernetzer verantwortlichen hydrolytisch labilen Funktionalitäten sollten hierdurch in das Polymer eingeführt werden. Falls die zur späteren Vernetzung notwendigen Michael-Akzeptor-Endgruppen durch die Terminierungsreaktion nicht direkt eingeführt werden, sollte dies im Anschluss durch eine nachträgliche Funktionalisierung der Polymerketten erfolgen.

Durch das Einführen der hydrolyselabilen Funktionalitäten in die Endgruppen der Oxazolinvernetzer sollte sichergestellt werden, dass die mittels Hydrolyse entstehenden Polymerfragmente ein möglichst hohes Molekulargewicht besitzen. Dadurch könnte eine Zellgängigkeit der Fragmente verhindert werden, sodass diese in späteren Zellexperimenten möglichst keinen toxischen Einfluss aufweisen. Ein alternativer Ansatz wäre es gewesen, die hydrolytisch-spaltbare Funktionalität über den Initiator einzuführen. Zur Verdeutlichung der Vorgehensweise wurde eine Übersicht über die verschiedenen Alternativen im Nachfolgenden dargestellt (Abbildung 49).



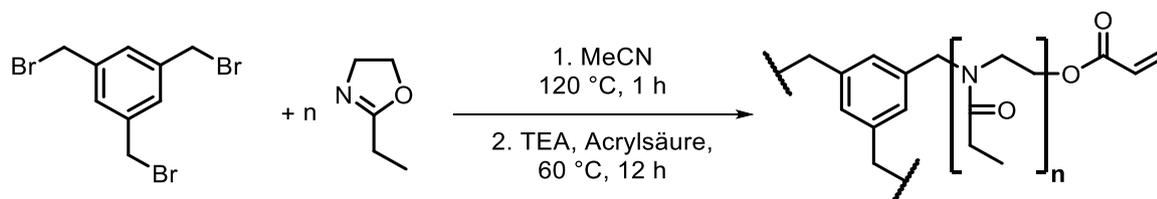
**Abbildung 49:** Vergleich der Hydrolyseprodukte von verschiedenen aufgebauten Vernetzersystemen; **A)** Hydrolyse erfolgt an den Endgruppen des Vernetzers; **B)** Hydrolyse erfolgt am Initiator der Vernetzer; **C)** Hydrolyse erfolgt entlang des Polymerrückgrats der Vernetzer.

In der Abbildung 49 sind drei verschiedene Szenarien für eine Hydrolyse der Polymernetzwerke aufgeführt, welche sich bezüglich der Position der hydrolyselabilen Funktionalitäten unterscheiden. In dem Beispiel wurde ein bifunktionaler Vernetzer verwendet, wobei jeder Polymerarm ein Molekulargewicht von 1000 Da aufweist. In Szenario **A** befinden sich die hydrolyselabilen Funktionalitäten an der Endgruppe des Vernetzers. Dies führt dazu, dass es bei einer Hydrolyse der Vernetzer zur Bildung von zwei verschiedenen Fragmenten kommt. Das eine Fragment wäre das thiolhaltige Präpolymer mit einem Molekulargewicht von 20 kDa und das andere das abgespaltene Vernetzerpolymer mit einem Molekulargewicht von 2 kDa. Beide Fragmente überschreiten damit das in der Literatur beschriebene maximale Molekulargewicht zur Aufnahme durch Zellen von 1000 g/mol und sollten somit toxikologisch unbedenklich sein.<sup>[94]</sup> In Szenario **B** befinden sich die hydrolyselabilen Funktionalitäten im Initiatormolekül. Dadurch wird bei der Hydrolyse der Vernetzer nur eine Art von Fragmenten erhalten, welche aus dem thiolhaltigen Präpolymer mit einem Polymerarm des Vernetzers bestehen. Diese Fragmente würden ein Molekulargewicht von über 20 kDa aufweisen und wären daher ebenfalls nicht zellgängig. Um das Freisetzen von niedermolekularen Nebenprodukten zu vermeiden, muss bei diesem Ansatz sichergestellt werden, dass die verwendeten Initiatoren nur an genau einer Stelle gespalten werden. Daher ist dieses Design nur für bifunktionelle Vernetzersysteme sinnvoll und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter behandelt. In Szenario **C** befinden sich die hydrolyselabilen Funktionalitäten im Rückgrat der

Vernetzpolymeren. Bei der Hydrolyse dieser Systeme käme es zur Freisetzung von vielen kleinen Polymerfragmenten, welche sehr geringe Molekulargewichte aufweisen würden und daher vermutlich zellgängig wären. Ein solcher Ansatz wäre jedoch nur sinnvoll, wenn die niedermolekularen Abbauprodukte selbst nicht zelltoxisch sind, wie das bei Poly(lactiden) der Fall ist.<sup>[170]</sup> Zusätzlich ist es aufgrund der Struktur der 2-Oxazoline und dem Mechanismus der CROP nur schwer möglich, hydrolyselabile Funktionalitäten in das Rückgrat der Polymere einzuführen.

#### 4.2.1. Erste „proof-of-concept“ Polymere

Um die Eignung des Systems zur Herstellung von Polymeren zu überprüfen und einen ersten Eindruck über die Vernetzung mit Oxazolinpolymeren zu erhalten, sollte zunächst ein „proof-of-concept“ Polymersystem hergestellt und charakterisiert werden. Dafür wurde TBMB als Initiator verwendet und mit EtOx in einer CROP umgesetzt. Zur Termination der Polymerisation sollte Acrylsäure verwendet werden. Die dabei eingeführte Acrylat-Endgruppe dient dabei nicht nur als Michael-Akzeptor in der Michael-Addition zur Vernetzung, sondern besitzt auch einen vermeintlich hydrolysierbaren Ester (Schema 6). Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung der Reaktion ist im Experimententeil dieser Arbeit (Absatz 6.4.3, Seite 157ff.) aufgeführt.



Schema 6: Syntheschema der „proof-of-concept“ Vernetzpolymeren.

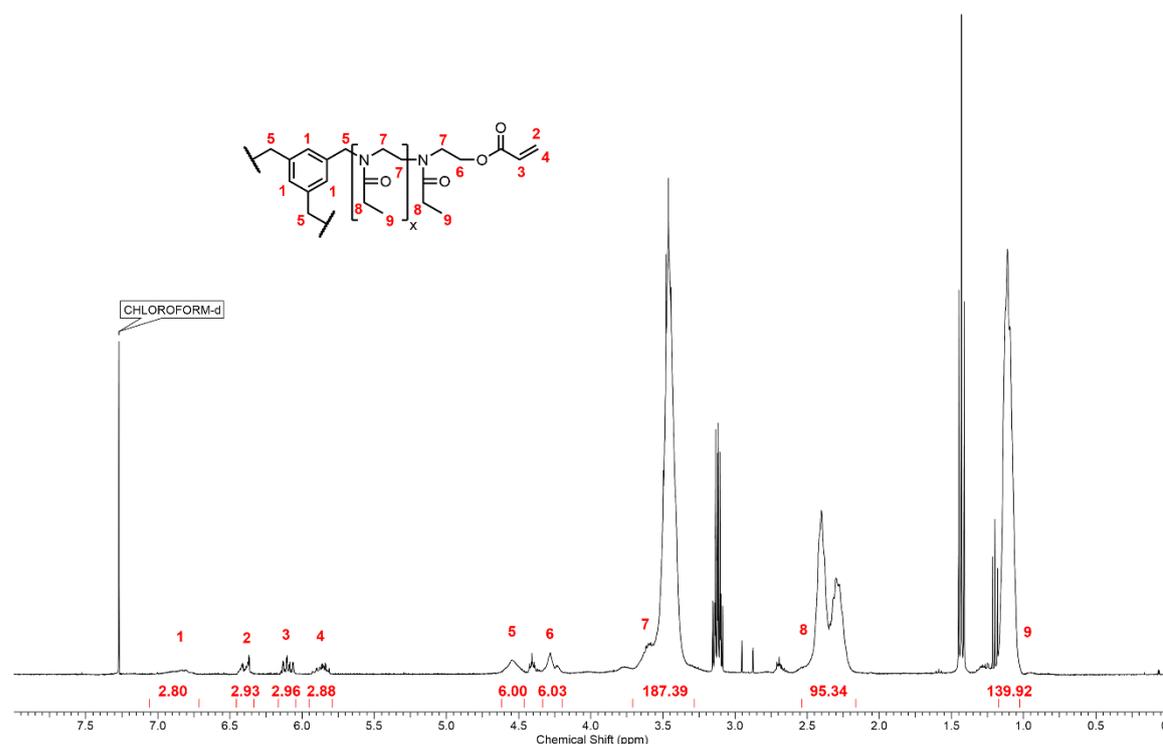
Um einen ersten Eindruck über das Vernetzersystem zu erhalten, sollten drei Vernetzer hergestellt werden, welche sich hinsichtlich der Anzahl ihrer EtOx-Wiederholungseinheiten unterscheiden. Die Charakterisierung der erhaltenen Polymere wird im Nachfolgenden genauer beschrieben.

#### 4.2.2. Charakterisierung der Oxazolinpolymere

Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mithilfe der Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) und der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie. Bei der GPC wurde die

Retentionszeit der Polymere mit der Retentionszeit eines Poly(methylmethacrylat)-Standards verglichen.

Die Bestimmung der Polymerzusammensetzung, des durchschnittlichen Molekulargewichts und der Endgruppenfunktionalisierung erfolgte mithilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Als Beispiel wurde dafür im Nachfolgenden das Spektrum eines Acrylat-funktionalisierten trifunktionellen Oxazolinpolymers dargestellt (Abbildung 50).



**Abbildung 50:** Exemplarisches  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eines Acrylat-funktionalisierten trifunktionellen Polyoxazolins in  $\text{CDCl}_3$ .

Zur Bestimmung der Polymerzusammensetzung und des Molekulargewichts, wurde das Signal der  $\text{CH}_2$ -Wasserstoffatome (**8**) der Ethyloxazolin-Seitenketten bei 2 bis 2,5 ppm mit dem normierten Signal der benzylichen  $\text{CH}_2$ -Wasserstoffatome (**5**) des Initiators TBMB bei 4,45 bis 4,65 ppm verglichen. Mithilfe des Verhältnisses konnte dann unter Verwendung der nachfolgenden Gleichung 18 das Molekulargewicht der Polymere ermittelt werden.

$$M_n = \frac{S_{\text{EtOx}} \cdot M_{\text{EtOx}}}{S_{\text{Initiator}}} + M_{\text{Initiatorrest}} + X \cdot M_{\text{Endgruppe}}$$

$S_{\text{EtOx}}$ : normiertes Signal der CH<sub>2</sub>-Wasserstoffatome der EtOx-Seitenkette

$S_{\text{Initiator}}$ : normiertes Signal des Initiators

$M_{\text{EtOx}}$ : Molekulargewicht von 2-Ethyl-2-oxazolin

$M_{\text{Initiatorrest}}$ : Molekulargewicht des Initiators ohne Bromatome

$M_{\text{Endgruppe}}$ : Molekulargewicht der eingeführten Endgruppenmoleküle

X: Anzahl der reaktiven Funktionalitäten des Initiators

**Gleichung 18:** Berechnung des Molekulargewichts der Oxazolinvernetzer.

Die Ermittlung der Endgruppenfunktionalisierungsraten erfolgte durch den Vergleich des gemittelten Signals der drei vinylischen Wasserstoffatome (**2**, **3**, **4**) der Acrylat-Endgruppen (5,8 - 5,95 ppm; 6,05 - 6,15 ppm; 6,35 - 6,45 ppm) mit dem Signal der benzylicischen Wasserstoffatome (**5**) des Initiators unter Anwendung der nachfolgenden Gleichung 19.

$$F [\%] = \frac{S_{\text{Vinyl}}}{S_{\text{Initiator}}} \cdot 100$$

F: Funktionalisierungsgrad der Oxazolinvernetzer

$S_{\text{Vinyl}}$ : gemitteltes, normiertes Signal der Vinyl-Wasserstoffatome der Endgruppenmoleküle

**Gleichung 19:** Berechnung des Funktionalisierungsgrads der Oxazolinvernetzer.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Polymere wurde in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6:** Übersicht über die ermittelten Daten der „proof-of-concept“ Polymere.

| Polymer | EtOx-Einheiten <sup>a</sup><br>(Theorie) | F <sup>b</sup><br>[%] | $M_n^{\text{NMR c}}$<br>[g/mol] | $M_n^{\text{GPC d}}$<br>[g/mol] | $D^d$ |
|---------|--|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| POx-1   | 12 (10)                                  | 92                    | 1500                            | 2900                            | 1,14  |
| POx-2   | 23 (20)                                  | 93                    | 2600                            | 3300                            | 1,14  |
| POx-3   | 32 (30)                                  | 98                    | 3500                            | 4400                            | 1,12  |

a: ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren durch den Vergleich der Signale der EtOx-Seitenkette und des Initiators; b: Endgruppenfunktionalisierungsrate der Vernetzer ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 19; c: ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 18; d: ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard.

Die Betrachtung der Ergebnisse der Charakterisierung zeigte, dass die Synthese der Polymere im Allgemeinen erfolgreich war. Die Anzahl der ermittelten EtOx-Einheiten lag etwas über den theoretisch erwarteten Werten. Dies war vermutlich auf leichte Verunreinigungen im Initiator zurückzuführen, wodurch es zu einer Veränderung der Stöchiometrie gekommen ist. Die Quantifizierung der Endgruppenfunktionalisierungsraten ergab hohe Funktionalisierungsgrade der Polymere zwischen 92% und 98%. Die mittels GPC ermittelten Molekulargewichte der Polymere wichen teilweise deutlich von den

mittels  $^1\text{H-NMR}$  bestimmten Molekulargewichten ab. Dies war vor allem bei **POx-1** deutlich zu erkennen, bei welchem das Molekulargewicht aus der GPC-Messung (2900 g/mol) fast doppelt so hoch war wie das Molekulargewicht, welches mittels  $^1\text{H-NMR}$  ermittelt wurde (1500 g/mol). Die starken Unterschiede konnten auf zwei unterschiedliche Probleme zurückgeführt werden. Zum einen waren die verwendeten PMMA-Standards in der GPC nicht optimal, da diese strukturell und chemisch deutliche Unterschiede zu Polyoxazolin aufweisen und sich die zur Berechnung des Molekulargewichts erhaltenen Retentionszeiten der Polymere daher nur zum Teil mit denen des Standards vergleichen ließen. Zum anderen überlagerten sich die Signale der Polymere mit den niedrigen Molmassen teilweise stark mit dem Abbruchsignal der GPC-Messung, wodurch keine klar getrennten Signale vorlagen. Diese Signale konnten daher nur sehr unpräzise integriert werden, wodurch es vermutlich zu einer Diskriminierung der kürzeren Polymerketten gekommen ist. Die Dispersitäten der untersuchten Polymere lagen zwischen 1,12 bis 1,14 und entsprachen somit Werten, welche im Bereich der Erwartungen lagen für Polymere, die mittels einer CROP hergestellt wurden.<sup>[171,172]</sup>

Die vollständig charakterisierten Polyoxazoline sollten nun im Anschluss auf ihre Eignung als Vernetzer für die Herstellung von Hydrogelen hin untersucht werden.

### **4.3. Erste Oxazolin-vernetzte Hydrogele**

Die Herstellung und Charakterisierung der Oxazolin-vernetzten Hydrogele erfolgte analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.3. Zusammenfassend werden Stammlösungen von verschiedenen thiolhaltigen Präpolymeren und den Oxazolinvernetzern in 0,01 M PBS-Puffer angesetzt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. In Abhängigkeit der gewünschten Hydrogeleigenschaften können beliebig funktionalisierte Präpolymerlösungen kombiniert werden, um zum Beispiel bestimmte Kationkonzentrationen in den späteren Hydrogelen zu realisieren. Diese Präpolymerlösungen werden dann mit einem Aliquot einer Vernetzerlösung gemischt und in eine zylindrische Vertiefung überführt. Nach einiger Zeit setzt dann die Michael-Addition zwischen den Thiofunktionalitäten der Präpolymere und der Michael-Akzeptor-Endgruppen der Vernetzerpolymere ein, wodurch es zur Vernetzung der Polymere kommt und die Gelbildung eintritt. Die Gele werden abgedeckt und für einige Stunden bei

Raumtemperatur inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Gelierung vollständig ablaufen kann. Im Anschluss werden die fertigen Hydrogele aus den Vertiefungen gelöst und vor der Charakterisierung für 24 Stunden gequollen. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen PEGDA-vernetzten Systemen wurden die Oxazolin-vernetzten Hydrogele in einem 0,01 M PBS-Puffer gequollen, dessen pH-Wert im Nachhinein auf 7,0 eingestellt wurde. Dadurch sollte verhindert werden, dass es zu einer vermehrten Hydrolyse der terminalen Esterfunktionalitäten des Vernetzers kommt, bevor die Hydrogele hinsichtlich ihrer Steifigkeit und ihres Quellverhaltens untersucht werden konnten.

### 4.3.1. Steifigkeit und Quellverhalten

Die drei „proof-of-concept“-Polymere **POx-1**, **POx-2** und **POx-3** wurden zur Vernetzung des zuvor in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen thiolhaltigen Präpolymers **P<sub>SH1</sub>** ( $M_n = 21,2$  kg/mol; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) verwendet. Alle Gele wurden als Triplikate mit einer Gelkonzentration von  $\beta = 100$  mg/mL hergestellt. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Gele sind im Nachfolgenden aufgeführt (Tabelle 7). Um die Eigenschaften der neuen Hydrogelsysteme besser mit denen der PEGDA-vernetzten Hydrogele vergleichen zu können, wurde ein Hydrogel bestehend aus **P<sub>SH1</sub>** und **PEGDA<sub>3500</sub>** ( $\beta = 100$  mg/mL) ebenfalls aufgeführt. Auffällig beim Herstellen der Gele war, dass die Zeit bis zum Eintreten der Gelierung (optisch überprüft durch tube-inversion-Test) mit über 15 Minuten, für die gewählte Konzentration hoch war. Die erhaltenen Gele waren nach Ablauf der Inkubationszeit jedoch durchgehend stabil, sodass sie ohne weitere Probleme charakterisiert werden konnten.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Daten der ersten Oxazolin-vernetzten Hydrogele.

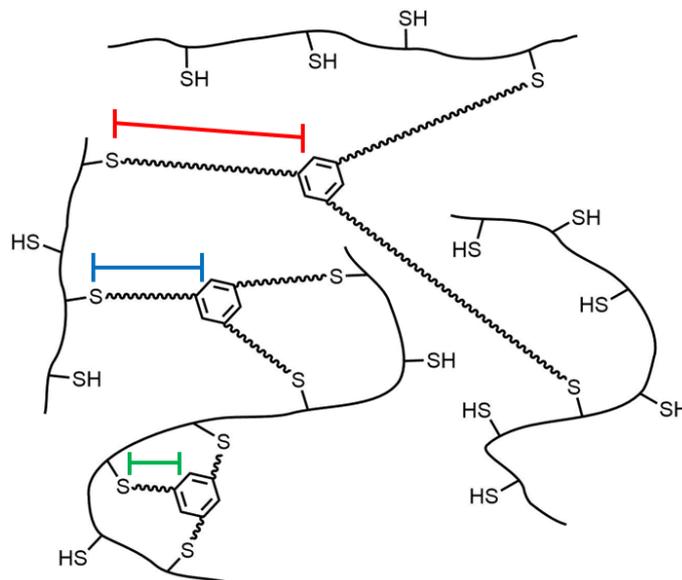
| Vernetzer             | $E^a$ [kPa]    | $Q^b$          | Gelanteil <sup>c</sup> [%] |
|-----------------------|----------------|----------------|----------------------------|
| POx-1                 | $2,7 \pm 0,2$  | $13,2 \pm 0,4$ | $86 \pm 2$                 |
| POx-2                 | $3,4 \pm 0,2$  | $12,5 \pm 0,1$ | $87 \pm 1$                 |
| POx-3                 | $4,0 \pm 0,1$  | $12,1 \pm 0,2$ | $90 \pm 3$                 |
| PEGDA <sub>3500</sub> | $13,2 \pm 0,7$ | $10,0 \pm 0,1$ | $94 \pm 1$                 |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt; c: ermittelt nach Quellung in H<sub>2</sub>O für 48 h bei rt.

Bei der Betrachtung der Eigenschaften ließen sich Hydrogele mit einem E-Modul zwischen 2,7 und 4 kPa feststellen. Diese Werte waren, vor allem im Vergleich zu den vorher untersuchten PEGDA-Systemen, relativ gering. Der direkteste Vergleich zu den PEGDA-Systemen konnte bei den Hydrogelen durchgeführt werden, welche mit **POx-3** vernetzt

wurden, da dieses ein nahezu identisches Molekulargewicht wie **PEGDA<sub>3500</sub>** ( $M_{n, POx-3} = 3500$  g/mol) aufwiesen. Die Steifigkeit des PEGDA-Systems war im Vergleich zum **POx-3** um mehr als den Faktor 3 größer und wies somit eine deutlich höhere mechanische Stabilität auf. Dabei galt es zu beachten, dass auch wenn beide Vernetzer ein vergleichbares Molekulargewicht aufwiesen, sie sich doch deutlich bezüglich ihrer Struktur unterschieden. **PEGDA<sub>3500</sub>** besaß im Durchschnitt 76 Wiederholungseinheiten in seinem Polymerrückgrat, welches in einer linearen Kette als bifunktionaler Vernetzer fungierte. **POx-3** hingegen wies im Durchschnitt 32 Wiederholungseinheiten auf, was selbst bei einer linearen Anordnung in einer Kette in weniger als der Hälfte der Länge des **PEGDA<sub>3500</sub>** resultiert hätte. Da die Wiederholungseinheiten beim **POx-3** jedoch zusätzlich über drei Polymerarme verteilt waren, konnte bei diesem statistisch gesehen von einem End-zu-End Abstand zweier Kettenenden von durchschnittlich 21 Wiederholungseinheiten ausgegangen werden. Dadurch würde sich eine effektive Kettenlänge für die Vernetzung ergeben, welche etwas mehr als einem Viertel der Länge des **PEGDA<sub>3500</sub>** entsprach. Diese erhöhte Kettenlänge des **PEGDA<sub>3500</sub>** sorgte daher vermutlich für eine wesentlich effektivere Vernetzung der thiolhaltigen Präpolymere, bei welcher ein höherer Anteil der Acrylat-Endgruppen umgesetzt und weniger intramolekulare Vernetzungen ausgebildet wurden.

Dieser Einfluss der Kettenlänge auf die Steifigkeit der Hydrogelsysteme konnte ebenfalls beim Vergleich der einzelnen POx-Vernetzer untereinander beobachtet werden. **POx-1** besaß mit durchschnittlich 12 Wiederholungseinheiten die kürzeste Kettenlänge, was zum geringsten E-Modul der Hydrogele von 2,7 kPa führte. Die Hydrogele des mit durchschnittlich 23 Wiederholungseinheiten langen **POx-2** wiesen bereits eine um 26% erhöhte Steifigkeit von 3,4 kPa auf und die Hydrogele aus **POx-3** waren mit einem E-Modul von 4 kPa um 48% steifer als die **POx-1**-Gele. Der Vergleich der einzelnen Oxazolinvernetzer untereinander zeigte somit erneut, dass kürzere Vernetzerlängen zu geringeren mechanischen Festigkeiten der entstehenden Hydrogele führten. Um diesen Effekt noch einmal genauer zu erläutern, wurde im Nachfolgenden eine schematische Darstellung der Vernetzungsreaktion zwischen einem thiolhaltigen Präpolymer und einigen Oxazolinvernetzern mit unterschiedlicher Länge aufgeführt (Abbildung 51). Die dabei aufgeführten Oxazolinvernetzer können zum besseren Verständnis sinngemäß als die drei zuvor beschriebenen Vernetzer **POx-1 (grün)**, **POx-2 (blau)** und **POx-3 (rot)** betrachtet werden.



**Abbildung 51:** Schematische Darstellung des Einflusses der Vernetzerlänge auf die Vernetzungseffizienz; **rot** = langer Vernetzerarm; **blau** = mittellanger Vernetzerarm; **grün** = kurzer Vernetzerarm.

In der Abbildung 51 sollte die Bindungsfindung in Abhängigkeit der Vernetzerlänge etwas überspitzt dargestellt werden. Beim längsten Vernetzer (**rot**) ist die Ausbildung von Vernetzungspunkten mit drei unterschiedlichen Präpolymerketten gut möglich. Auch wenn bereits ein oder zwei Vernetzerarme an Thiolen gebunden sind, was zu einer deutlichen Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Vernetzers führt, besitzt der dritte Arm aufgrund seiner Länge noch genug Reichweite, um potenziell ein drittes unterschiedliches Präpolymer in seiner Nähe zu erreichen und an dieses zu binden. Dieses Szenario würde in einer optimalen Vernetzung der Präpolymere durch den Vernetzer resultieren. Beim Vernetzer mit mittlerer Länge (**blau**) ändert sich diese Situation bereits etwas. Durch die Bindung an ein Präpolymer verringert sich die Beweglichkeit des Vernetzers deutlich, wodurch die ihm zur Verfügung stehende Anzahl an Thiolen reichweitenbedingt, ebenfalls abnimmt. Es können weniger intermolekulare Vernetzungen stattfinden und die Anzahl an intramolekularen Michael-Additionen nimmt zu. Dieser Effekt würde beim Einsatz des kürzesten der drei Vernetzer (**grün**) noch einmal verstärkt auftreten, wodurch kaum noch intermolekulare Vernetzungen mehr ausgebildet werden und die mechanische Stabilität der Systeme deutlich abnehmen würde. Die gewählte Darstellung ist im Vergleich zu den hergestellten Vernetzern **POx-1**, **POx-2** und **POx-3** etwas überspitzt, sollte jedoch die zugrundeliegende These bezüglich des Einflusses der Vernetzerlänge auf die mechanische Stabilität der Hydrogele unterstützen.

Die Vermutung, dass die kürzere Länge der Oxazolinvernetzer, im Vergleich zum **PEGDA<sub>3500</sub>**, zu einer weniger effektiven Vernetzung führt, wird durch die Betrachtung der

Quellwerte der Hydrogelsysteme weiter verstärkt. Die mittels POx-Vernetzung hergestellten Hydrogele weisen alle einen erhöhten Quellwert (12,1 – 13,2) im Vergleich zu den PEGDA-Gelen (10) auf, wobei der Grad der Quellung mit zunehmender Vernetzerlänge abnimmt. Auch der Vergleich des Gelanteils weist auf eine vollständigere Vernetzung der Hydrogele mit zunehmender Länge der Oxazolinvernetzer hin. Der Unterschied zwischen den einzelnen Oxazolinvernetzern war, mit einem Wert von 86% für den kürzesten und 90% für den längsten Vernetzer, jedoch relativ gering.

Zusammenfassend ließen sich mechanisch stabile Hydrogelsysteme herstellen, welche jedoch im Vergleich zu den zuvor beschriebenen PEGDA-Systemen eine geringe Steifigkeit aufweisen. Nach der Charakterisierung der Hydrogele galt es nun, die Abbaubarkeit dieser zu verifizieren. Um die Bedingungen in einer Zellkultur möglichst gut nachzuahmen, wurden die Gele in einem 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C inkubiert. Die Erfassung des Abbaus erfolgte analog zu dem Vorgehen in Abschnitt 3.3.6 indem der E-Modul der Gele zum Zeitpunkt  $t$  ( $E_t$ ) prozentual ins Verhältnis zum Ausgangs-E-Modul ( $E_0$ ) gesetzt wurde (Abbildung 52). Die Auswertung sollte einen Eindruck davon liefern, ob die erhaltenen Systeme ein schnelles und konstantes Abbauverhalten aufweisen.

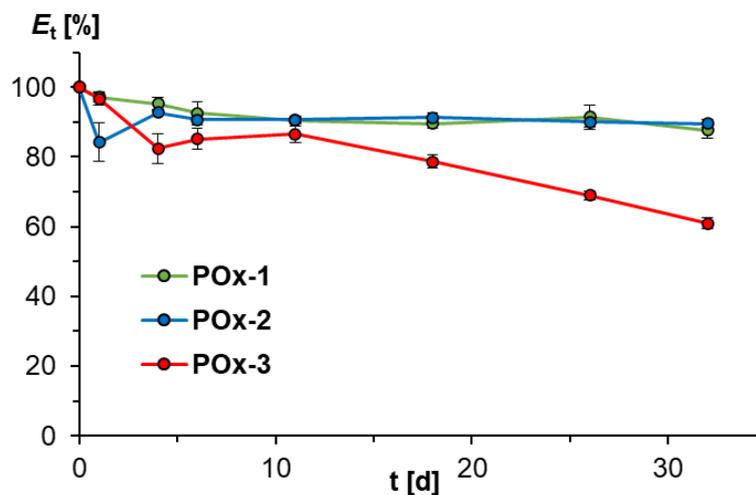


Abbildung 52: Abbaugraphen der Hydrogele aus den Oxazolinvernetzern **POx-1**, **POx-2** und **POx-3**.

Die Betrachtung der Abbauxperimente zeigte, dass die erhaltenen Hydrogele keinen oder einen nur sehr schwachen Abbau aufzeigten. Vor allem die Hydrogele aus den beiden kurzkettigeren Vernetzern **POx-1** und **POx-2** wiesen nach über 30 Tagen Inkubationszeit einen Verlust im E-Modul von gerade einmal knapp über 20% gegenüber des  $E_0$  auf (vollständige Daten im Anhang, Abschnitt 7.7, Seite 183). Die Abbauraten dieser beiden Gelsysteme lagen nach 32 Tagen bei durchschnittlich 0,2% des ursprünglichen  $E_0$  pro Tag

( $E_0/d$ ). Diese Abbauraten waren sehr gering und lagen sogar deutlich unter der Abbaurate des PEGDA-Systems, welche in Abschnitt 3.3.6 untersucht wurde, von ungefähr 0,5%  $E_0/d$

Eine mögliche Erklärung für diese niedrigen Abbauraten könnten die geringeren Längen der Vernetzerketten gewesen sein, welche bei der Vernetzung zu sehr engmaschigen Netzwerken geführt haben. Durch diese dichte Vernetzung könnte es zu einer verringerten Zugänglichkeit der Esterfunktionalitäten gekommen sein, was die Hydrolyse dieser behindert und als Folge dessen den Abbau verlangsamt hat. Zusätzlich könnte auch die allgemeine Hydrophilie der Vernetzerketten eine Rolle gespielt haben, da die beiden kurzen Vernetzer **POx-1** und **POx-2** aufgrund der vergleichsweise geringen Anzahl an hydrophilen EtOx-Wiederholungseinheiten nicht besonders hydrophil gewesen sind. Dadurch wäre es denkbar gewesen, dass sich einige hydrophobe Bereiche der Polymerketten partiell zusammengelagert und die vorliegenden Esterfunktionalitäten somit zusätzlich abgeschirmt haben. Ein ähnliches Verhalten konnten LUTOLF *et al.* in ihrer Arbeit mit PEG-co-Peptid-Konjugaten beobachten.<sup>[52]</sup> Sie konnten dabei zeigen, dass es durch den Einsatz von hydrophoberen Aminosäuren in den verbindenden Peptiden zu einer Verringerung der Hydrolysegeschwindigkeit der labilen Esterfunktionalitäten gekommen ist. Es war möglich, die Abbaugeschwindigkeit ihrer Systeme zu kontrollieren, indem sie die Hydrophilie der Peptide durch die Auswahl von unterschiedlich hydrophoben Aminosäuren einstellten.

Die Hydrogele, welche durch die Vernetzung mit dem langkettigen **POx-3** hergestellt wurden, wiesen im Vergleich zu den anderen beiden Systemen eine erhöhte Abbaurate auf. Nach 32 Tagen konnte eine durchschnittliche Abbaurate von über 1,2% pro Tag festgestellt werden. Diese zunehmende Abbaurate ließ sich vermutlich auf die, durch die größere Anzahl an EtOx-Wiederholungseinheiten bedingte, erhöhte Hydrophile und Kettenlänge des **POx-3** zurückführen. Diese könnte für eine weitmaschigere Vernetzung der Polymerketten und eine hydrophilere Umgebung der labilen Esterfunktionalitäten gesorgt haben.

Die Ergebnisse dieser ersten „proof-of-concept“-Systeme konnten eine allgemeine Eignung der Oxazolinvernetzer zur Herstellung von hydrolytisch abbaubaren Hydrogelsystemen bestätigen. Grundlegend konnten mechanisch stabile Hydrogele erhalten werden, welche ein gewisses Abbauverhalten durch Hydrolyse aufwiesen. Allerdings galt es an dieser Stelle, das System weiterzuentwickeln und hinsichtlich einer

späteren Anwendung in Zellexperimenten zu verbessern. Zum einen wäre es wünschenswert, ein breiteres Spektrum an Steifigkeiten realisieren zu können. Zum anderen ist das bisher festgestellte Abbauverhalten, vor allem hinsichtlich einer späteren Anwendung in Zellexperimenten, deutlich zu gering. Dafür sollten weitere Vernetzersysteme mit alternativen Zusammensetzungen und Endgruppen hergestellt und untersucht werden.

## **4.4. Optimierung des Vernetzersystems**

Die ersten „proof-of-concept“-Systeme waren zwar grundlegend funktionabel, wiesen jedoch noch einige Schwächen auf, welche es im Nachfolgenden zu beheben galt. Ein Fokus sollte dabei auf der Untersuchung alternativer Endgruppen der Vernetzer liegen. Die zuvor verwendeten Acrylat-Endgruppen konnten zwar erfolgreich zur Vernetzung der thiolhaltigen Präpolymere verwendet werden und haben auch ein gewisses Abbauverhalten aufgewiesen, jedoch war dieser Abbau sehr langsam und wäre für die weitere Forschung von geringem Interesse gewesen. Zusätzlich schien die Vernetzung mithilfe der Acrylat-Endgruppen relativ langsam abzulaufen ( $t_{\text{Gel}} > 15$  Minuten) was in Bezug auf eine spätere 3D-Verkapselung von Zellen zu Problemen führen könnte.

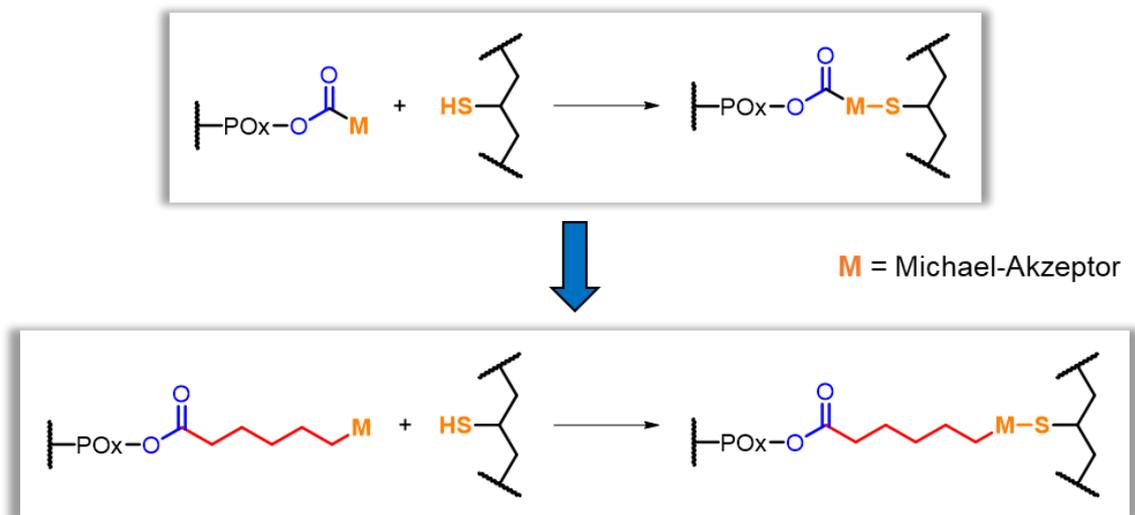
Zusätzlich zu der Untersuchung von alternativen Endgruppenfunktionalitäten sollte auch der Einfluss der Kettenlänge, alternativer Monomere, sowie der Einsatz von bifunktionellen Oxazolinvernetzern im Nachfolgenden näher betrachtet werden.

### **4.4.1. Alternative Endgruppenfunktionalitäten**

Durch das Einführen von alternativen Endgruppenfunktionalitäten sollten zwei Probleme gleichzeitig angegangen werden. Zum einen sollte durch das Einführen eines besser zugänglichen Esters der hydrolytische Abbau erleichtert werden und die Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele als Folge dessen zunehmen. Zum anderen sollten die Acrylat-Endgruppen durch einen reaktiveren Michael-Akzeptor ersetzt werden, um die Vernetzungsgeschwindigkeit zu erhöhen und somit die Gelierungszeit zu verringern.

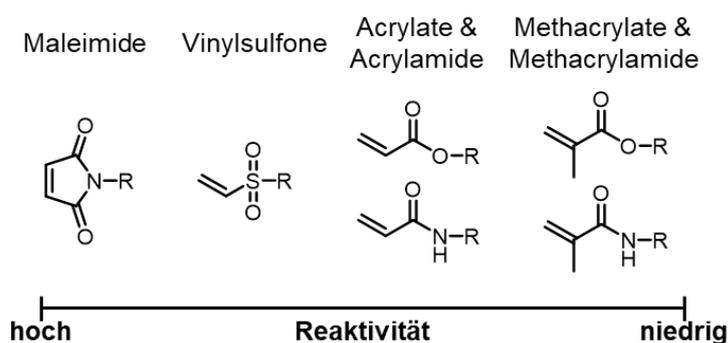
Um den hydrolytisch labilen Ester zugänglicher zu machen, sollte dieser räumlich weiter von der Bindungsstelle mit dem thiolhaltigen Präpolymer entfernt werden. Vorhergegangene Arbeiten an einem alternativen System, welches in dieser Arbeit nicht

weiter beschrieben wurde, haben gezeigt, dass durch die Positionierung der Esterfunktionalitäten möglichst weit entfernt vom Vernetzungspunkt die Geschwindigkeit der Hydrolyse signifikant erhöht werden konnte. Um dies zu realisieren, sollten einige CH<sub>2</sub>-Einheiten als Abstand zwischen dem Ester und der Michael-Akzeptor-Endgruppe fungieren. Eine grafische Veranschaulichung dieser Idee ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53:** Schematische Darstellung des Ansatzes zur Verbesserung der Zugänglichkeit des hydrolytisch labilen Esters; **blau** = hydrolytisch labiler Ester, **rot** = Abstandshalter, **orange** = Michael-Akzeptor.

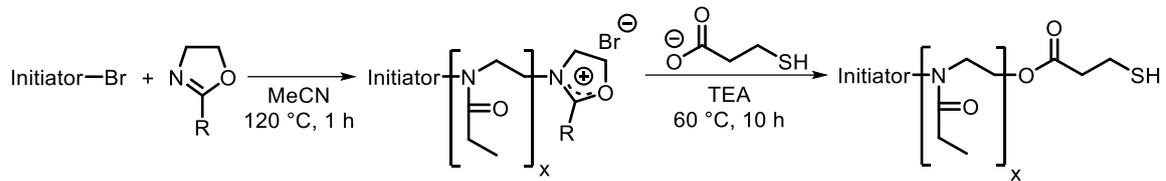
Bezüglich der Endgruppe sollte vom Acrylat zu einem reaktiveren Michael-Akzeptor gewechselt werden. Der Vergleich der Reaktivitäten von verschiedenen Michael-Akzeptor-Funktionalitäten hat gezeigt, dass sich Acrylate eher im Mittelfeld befinden (Abbildung 54).<sup>[173]</sup>



**Abbildung 54:** Vergleich der Reaktivitäten verschiedener Michael-Akzeptor-Funktionalitäten. (Modifiziert aus <sup>[173]</sup>)

Um die Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion der Oxazolinvernetzer zu erhöhen, sollte der Wechsel von den Acrylat-Endgruppen zu den reaktiveren Maleimid- oder Vinylsulfon-Endgruppen untersucht werden. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Erhöhung der Zugänglichkeit der Ester sollte die Einführung der Endgruppe dabei über zwei Schritte erfolgen. Im ersten Schritt sollten die Oxazolinmonomere einer Polymerisation unterzogen

werden, welche im Anschluss durch Zugabe von 3-Mercaptopropionsäure terminiert wurde (Schema 7).



**Schema 7:** Syntheschema des ersten Schrittes der optimierten Oxazolinvernetzersynthese.

Durch diese Reaktion konnten Polyoxazolin-Präpolymere (**PO<sub>x</sub>-SH**) erhalten werden, welche über labile Ester- und terminale Thiolfunktionalitäten verfügten. Diese können dann im Anschluss zunächst einer ausgiebigen Charakterisierung, bezüglich Zusammensetzung und Endgruppenfunktionalisierungsrate, unterzogen werden. Zur Erläuterung des Vorgehens bei der Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurde im Nachfolgenden das Spektrum eines trifunktionellen PO<sub>x</sub>-SH aus PEtOx dargestellt (Abbildung 55). Die Bestimmung der Zusammensetzung erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben durch den Vergleich der Signale der CH<sub>2</sub>-Einheiten der Oxazolin-Seitenketten (**6**) mit den Signalen der benzyllischen CH<sub>2</sub>-Einheiten des Initiators (**2**). Die Quantifizierung der Endgruppenfunktionalitäten erfolgte über den Vergleich der Signale der CH<sub>2</sub>-Einheiten der terminalen Mercaptopropionsäure (**5**) und der benzyllischen CH<sub>2</sub>-Einheiten des Initiators (**2**).

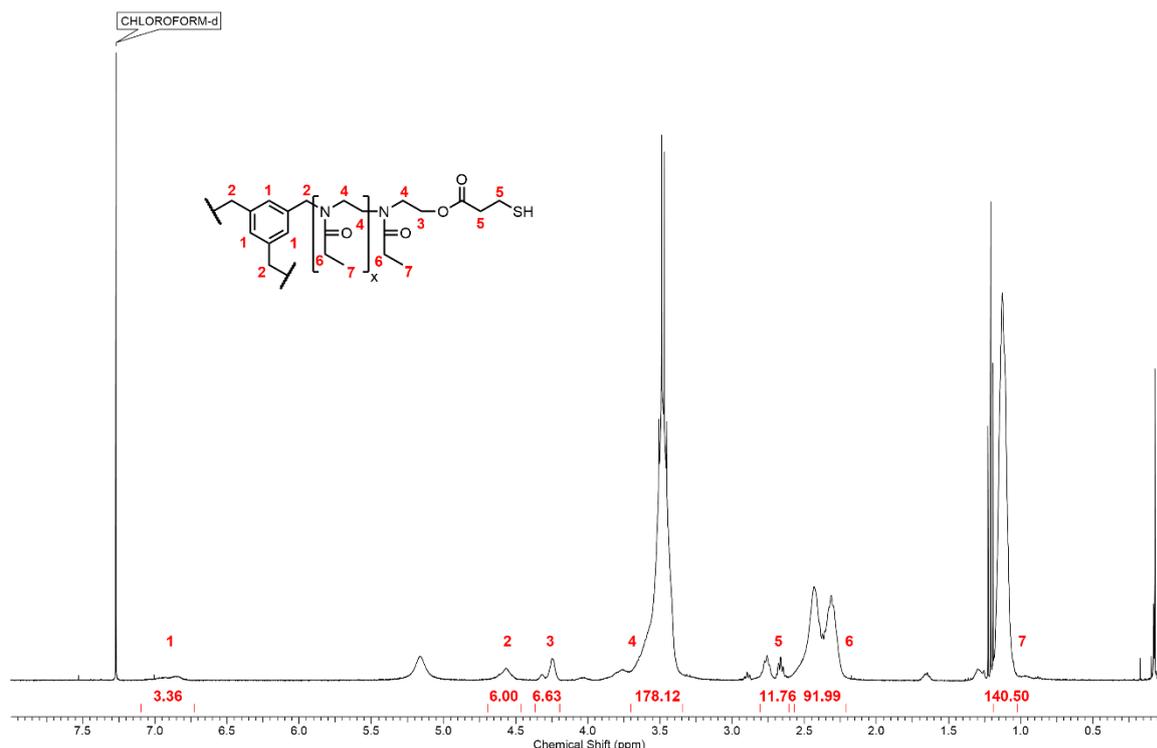


Abbildung 55: Beispielhaftes <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines trifunktionellen PO<sub>x</sub>-SH aus PEtOx in CDCl<sub>3</sub>.

Aufgrund der terminalen Thiolfunktionalität können diese PO<sub>x</sub>-SH als Basis für die Einführung beliebiger Michael-Akzeptor-Endgruppen genutzt werden. Um am Ende einen funktionsfähigen Vernetzer zu erhalten, sollten die PO<sub>x</sub>-SH mit bifunktionellen Michael-Akzeptor-Molekülen (Abbildung 56) umgesetzt werden. Die eine Seite der reaktiven Moleküle sollte dabei mit den terminalen Thiolfunktionalitäten des PO<sub>x</sub>-SH reagieren, sodass die zweite Michael-Akzeptor-Funktionalität dann für die spätere Vernetzung der thiolhaltigen Präpolymere bei der Gelbildung zur Verfügung steht.

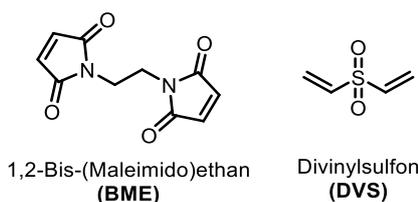
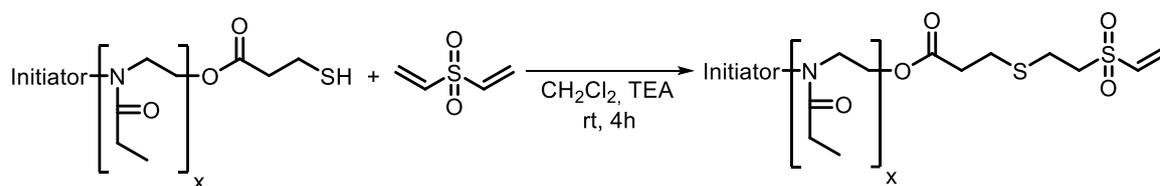


Abbildung 56: Struktur der beiden bifunktionellen Michael-Akzeptor-Moleküle.

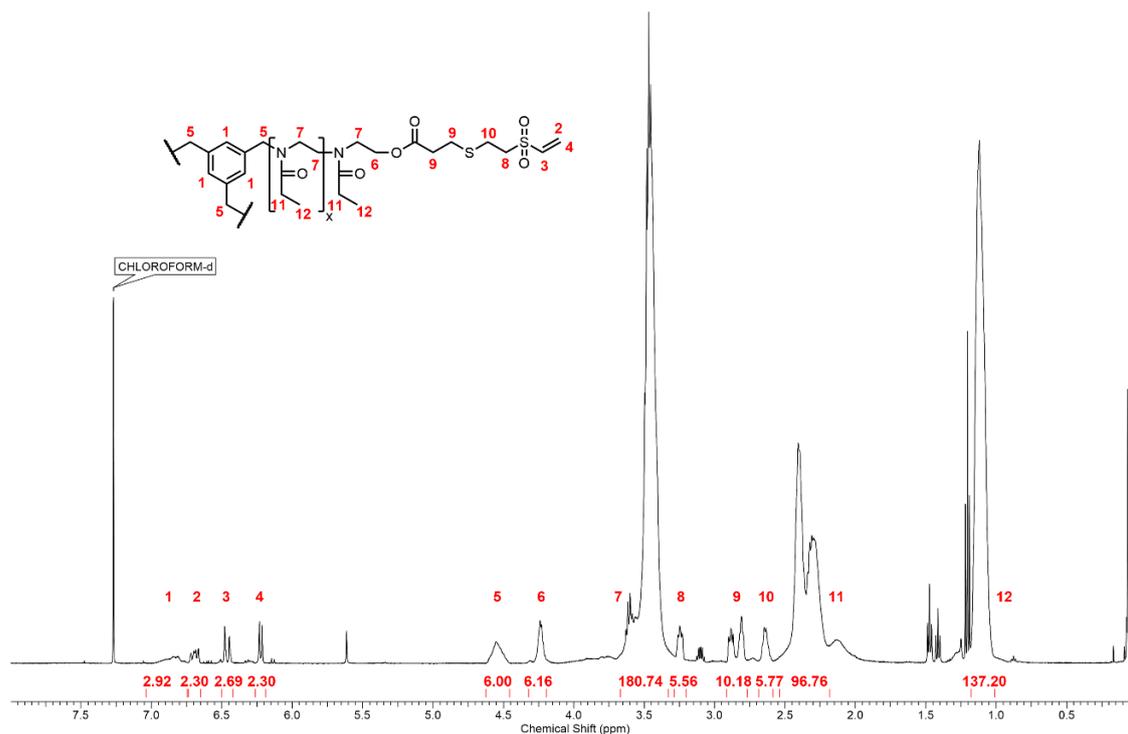
Die beiden für die Funktionalisierung gewählten Moleküle waren 1,2-Bis(Maleimido)ethan (BME) und Divinylsulfon (DVS). Diese sollten aufgrund ihrer erhöhten Reaktivität als Michael-Akzeptoren zum einen für eine effektive Funktionalisierung der PO<sub>x</sub>-SH sorgen und gleichzeitig eine schnellere Vernetzung bei der späteren Gelbildung ermöglichen. Das Reaktionsschema der Funktionalisierung wurde im Nachfolgenden exemplarisch für eine DVS-Funktionalisierung dargestellt (Schema 8). Die Reaktion mit BME erfolgte analog zu

dem dargestellten Schema mit BME anstatt DVS als Reaktand und Dimethylformamid (DMF) als Lösungsmittel.



**Schema 8:** Reaktionsschema der Funktionalisierung von POx-SH mit DVS.

Bei der Reaktionsführung wurde darauf geachtet, dass die mögliche Nebenreaktion der Reaktion von zwei POx-SH an ein bifunktionelles Michael-Akzeptor-Molekül möglichst unterbunden wird. Dafür wurde ein Überschuss des Funktionalisierungsreagenz vorgelegt und das POx-SH langsam zugetropft. Durch den Überschuss an Funktionalisierungsreagenz und der hohen Reaktivität dieses in einer Michael-Addition sollten die terminalen Thiolfunktionalitäten direkt von ungebundenem Funktionalisierungsreagenz umgesetzt werden und eine Vernetzung dadurch vermieden werden.



**Abbildung 57:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des POx-DVS in CDCl<sub>3</sub>.

Das zuvor untersuchte POx-SH wurde durch die Reaktion zu DVS-funktionalisiertem POx (POx-DVS) und Maleimid-funktionalisiertem POx (POx-MI) umgesetzt. Die Bestätigung des Erfolges der Funktionalisierungsreaktion wurde im Anschluss an die Aufarbeitung

mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Abbildung 57) ( $^1\text{H-NMR}$  des **POx-MI** im Anhang; Seite 198, NMR 23) durchgeführt.

Die Quantifizierung der Endgruppenfunktionalisierungsrate erfolgte durch den Vergleich der Signale der vinylischen Protonen der Vinylsulfon- (**2, 3, 4**) beziehungsweise Maleimid-Endgruppen mit den benzylicischen Protonen (**5**) des Initiators. Die Daten der funktionalisierten Polymere **POx-DVS** und **POx-MI** wurden in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8:** Übersicht über die Daten der beiden funktionalisierten Oxazolinvernetzer **POx-DVS** und **POx-MI**.

| Polymer | EtOx-<br>Einheiten <sup>a</sup> | <i>F</i> <sup>b</sup><br>[%] | $M_n^{\text{NMR c}}$<br>[g/mol] | $M_n^{\text{GPC d}}$<br>[g/mol] | $\bar{D}^d$ |
|---------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------|
| POx-DVS | 48                              | 81                           | 5500                            | 5900                            | 1,11        |
| POx-MI  | 48                              | 82                           | 5900                            | 6400                            | 1,11        |

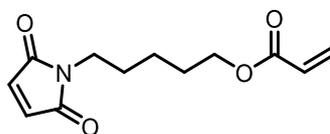
**a:** ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren durch den Vergleich der Signale der EtOx-Seitenkette und des Initiators; **b:** ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unter Anwendung von Gleichung **19**; **c:** ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unter Anwendung von Gleichung 18; **d:** ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard.

Durch die Betrachtung der Daten der beiden Vernetzer war ersichtlich, dass die Synthese als solches erfolgreich abgelaufen ist. Beide Polymere wiesen eine Endgruppenterminierungsrate von über 81% auf, was für eine ausreichende Vernetzung in den nachfolgenden Experimenten sorgen sollte. Nichtsdestotrotz sollten die Reaktionsbedingungen weiter optimiert werden, sodass Funktionalisierungsraten von über 90% realisiert werden können. Die Molekulargewichte der Polymere, welche mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und GPC ermittelt wurden, stimmten im Rahmen der Abweichungen durch die Verwendung von nicht optimalen Standards bei der GPC überein. Auch die Dispersitäten der Polymere lagen mit einem Wert von 1,11 im Rahmen dessen, was von Polymeren, welche mittels einer CROP hergestellt wurden, erwartet werden konnte und wurde zusätzlich als Beweis gesehen, dass die Vernetzung der einzelnen POx-SH-Ketten während der Funktionalisierungsreaktion erfolgreich unterbunden werden konnte, da dies zu einem signifikantem Anstieg der Dispersitäten und der Molekulargewichte geführt hätte.<sup>[172,174]</sup>

Die beiden neuen Oxazolinvernetzer **POx-DVS** und **POx-MI** sollten nach der Charakterisierung nun genutzt werden, um durch die Vernetzung des thiolhaltigen Präpolymers **Psh1** ( $M_n = 21,2 \text{ kg/mol}$ ; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) Hydrogele herzustellen und ihre Eigenschaften bezüglich der mechanischen Stabilität und des Abbauverhaltens zu evaluieren. Bei der Verwendung von **POx-MI** als Vernetzer in der

Hydrogelherstellung war es jedoch nicht möglich, homogene Hydrogele zu erhalten. Dies war auf die sehr hohe Reaktivität der Maleimid-Endgruppen zurückzuführen. Bereits beim Zugeben des Aliquots der POx-MI-Stammlösung war eine spontane Bildung von Gelklumpen festzustellen, welche sich auch durch nachträgliches Mischen der Hydrogel-Lösung nicht mehr homogenisieren ließen. Auch das Anpassen des pH-Wertes auf einen Wert von 7 konnte die Reaktivität der Maleimid-Endgruppen nicht genug verringern, um eine spontane Gelierung zu verhindern. Selbst wenn es möglich gewesen wäre, die Hydrogel-Lösung zumindest teilweise zu homogenisieren, wäre die sehr hohe Gelierungsgeschwindigkeit in Bezug auf eine spätere Anwendung in Zellexperimenten nicht praktikabel gewesen.

Um eine Alternative zu dem oben beschriebenen DVS zu haben, sollte an dieser Stelle zunächst ein neues Endgruppenmolekül für die Funktionalisierung hergestellt und angewendet werden. Aufgrund der Ergebnisse der vorhergegangenen Experimente wurde ein hybrides Funktionalisierungsreagenz entwickelt, das 5-Maleimido-pentyl-acrylat (**MaPenA**), welches über zwei verschiedene terminale Michael-Akzeptor-Endgruppen verfügte (Abbildung 58).

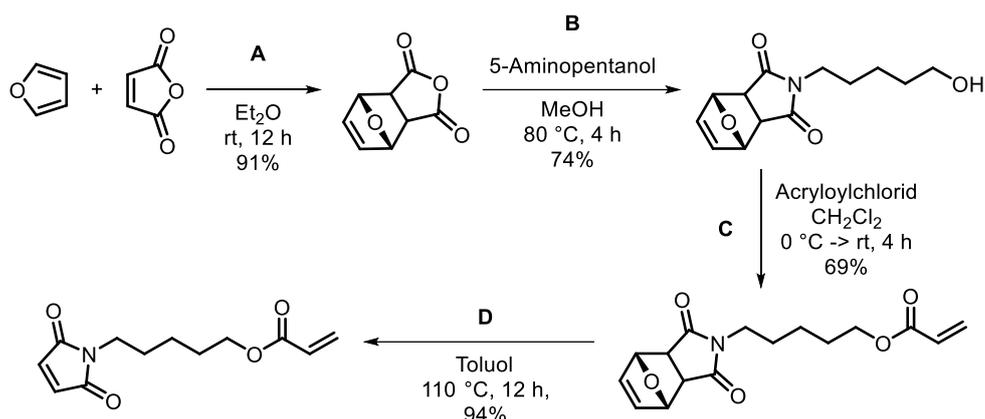


5-Maleimido-pentyl-acrylat  
(**MaPenA**)

**Abbildung 58:** Struktur des alternativen Funktionalisierungsreagenz 5-Maleimido-pentyl-acrylat (**MaPenA**).

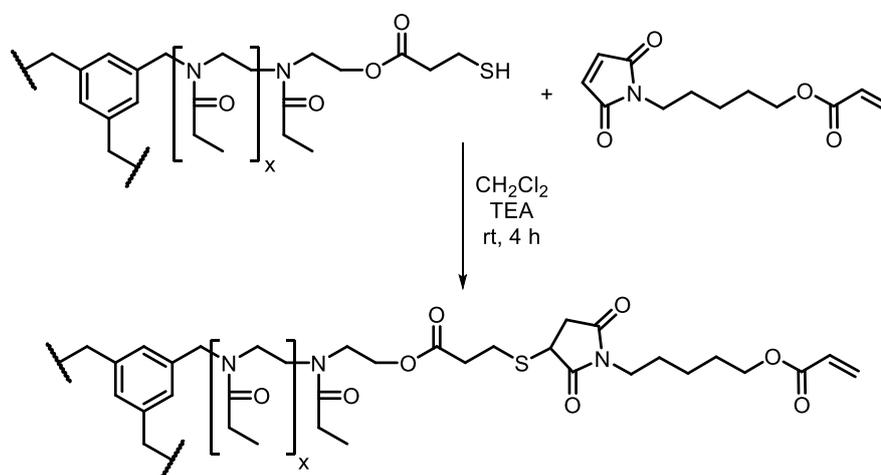
Die Idee bei dieser Verbindung war es, die hohe Reaktivität der Maleimid-Gruppe zu nutzen, um die Funktionalisierungsreaktion an den terminalen Thiolfunktionalitäten des **POx-SH** durchzuführen und dadurch eine quantitative Umsetzung dieser zu erreichen. Die verbleibenden terminalen Acrylatfunktionalitäten des MaPenA sollten dann zur Vernetzung der thiolhaltigen Präpolymere genutzt werden. Durch die im Vergleich zum Maleimid geringere Reaktivität der Acrylatfunktionalitäten sollte die Gelierungsgeschwindigkeit bei der Hydrogelbildung verringert werden und dadurch die Herstellung von homogenen Hydrogelen ermöglicht werden.

Die Synthese des MaPenA erfolgte über vier Syntheseschritte, welche in Schema 9 aufgeführt wurden.



**Schema 9:** Reaktionsschema zur Synthese von 5-Maleimido-pentyl-acrylat (MaPenA).

Im ersten Schritt der Synthese (**A**) wurde Maleinsäureanhydrid geschützt, damit es in den nachfolgenden Schritten nicht zu ungewünschten Michael-Additionen kommt. Dafür wurde das Maleinsäureanhydrid in einer Diels-Alder-Reaktion mit Furan umgesetzt. Das geschützte Anhydrid wurde im zweiten Reaktionsschritt (**B**) in einer Kondensationsreaktion mit 5-Aminopentanol zum korrespondierenden geschützten 5-Maleimido-pentanol umgesetzt. Der dritte Reaktionsschritt (**C**) war die Umsetzung des primären Alkohols unter Schotten-Baumann-Bedingungen zum geschützten 5-Maleimido-pentyl-Acrylat. Dieses wurde im letzten Reaktionsschritt (**D**) durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion zum gewünschten Produkt 5-Maleimido-pentyl-acrylat umgesetzt.



**Schema 10:** Reaktionsschema der Funktionalisierung des **POx-SH** mit MaPenA, um das **POx-MaPenA** zu erhalten.

Das MaPenA wurde zur Funktionalisierung des **POx-SH** in einer Michael-Addition eingesetzt, um den MaPenA-funktionalisierten Vernetzer (**POx-MaPenA**) zu erhalten (Schema 10). Der Erfolg der Reaktion wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie überprüft (Abbildung 59).

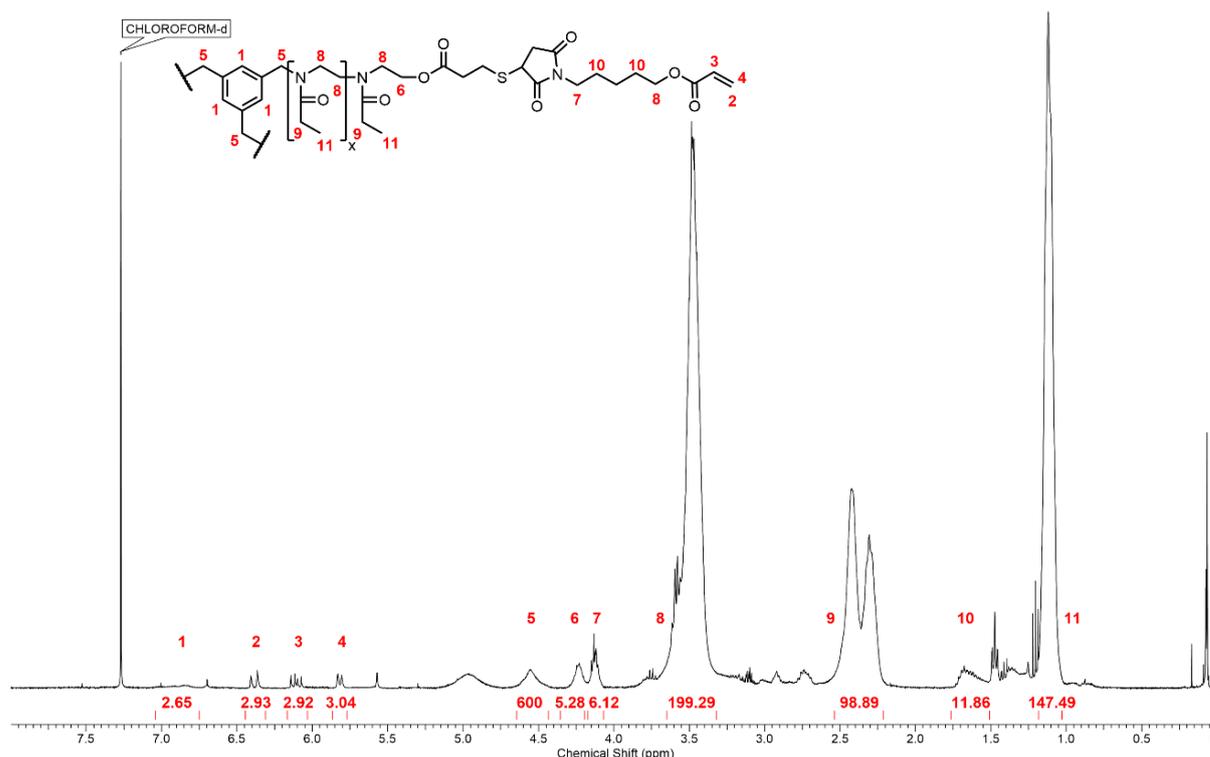


Abbildung 59:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des **POx-MaPenA** in  $\text{CDCl}_3$ .

Für die Quantifizierung der Endgruppenfunktionalitäten wurden die Signale der vinylicen Wasserstoffatome (**2**, **3**, **4**) der Acrylat-Endgruppen mit dem Signal der benzylicen Wasserstoffatome (**5**) des Initiators verglichen. Zusätzlich zum  $^1\text{H-NMR}$  wurde das Molekulargewicht und die Dispersität des Polymers mittels GPC untersucht. Die Auswertung der Analytik ergab dabei für das **POx-MaPenA** folgende Werte: EtOx-Einheiten = 48,  $M_n^{\text{NMR}} = 5900 \text{ g/mol}$ ,  $M_n^{\text{GPC}} = 6200 \text{ g/mol}$ ,  $D = 1,11$ ,  $F = 98\%$ .

Zusätzlich zu der zuvor beschriebenen Analytik sollte auch festgestellt werden, ob das in der Funktionalisierung eingesetzt MaPenA auch wirklich an das Polymer gebunden war oder ob das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum lediglich ungebundene Rückstände des Reagenzes aufgezeigt hat. Um dies zu überprüfen, wurde eine Probe des **POx-MaPenA** mithilfe eines 2D-DOSY-NMRs untersucht.

#### 4.4.1. DOSY-NMR-Spektroskopie

Die diffusionsgeordnete Spektroskopie (*engl.*: Diffusion Ordered Spectroscopy; **DOSY**) ist eine weiterentwickelte NMR-Technik, welche erstmals 1992 von *et al.* beschrieben wurde.<sup>[175]</sup> Bei einem DOSY-NMR wird, im Gegensatz zu einem regulären NMR, ein graduelles Magnetfeld verwendet.<sup>[176]</sup> In einem normalen NMR-Experiment mit homogenen Magnetfeld sind die Spins aller Moleküle in einer kohärenten Phase. Bei der

Verwendung eines graduellen Magnetfeldes hingegen ist die Phase der einzelnen Spins von ihrer transversalen Position abhängig, wodurch die Spins räumlich phasencodiert sind. Unter der Annahme, dass in der untersuchten Probe keine Translationsdiffusion stattfinden würde, könnte die räumliche Phasencodierung durch die Anwendung eines zweiten Gradientenimpulses mit umgekehrter Polarität vollständig negiert werden, ohne einen Verlust des Signals im NMR zu verursachen. Sollte es jedoch zu einer Translationsdiffusion eines Teilchens kommen, ist der zweite Gradientenimpuls nicht in der Lage, die Phase dieses Teilchens wieder auszugleichen, wodurch es zu einer Abschwächung des NMR-Signals kommt. Die Intensität eines solchen Signals in einem DOSY-Experiment lässt sich dabei wie folgend beschreiben:

$$I = I_0^{-D\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\gamma^2 g^2 \delta^2}$$

$I$ : Intensität in Anwesenheit eines externen Gradientenimpulses

$I_0$ : Intensität in Abwesenheit eines externen Gradientenimpulses

$D$ : Diffusionskoeffizient

$\Delta$ : Diffusionszeitraum

$\gamma$ : Gyromagnetisches Verhältnis

$\delta$ : Dauer des Gradientenimpuls

$g$ : Amplitude des Gradientenimpulses

**Gleichung 20:** Beschreibung der Signalintensität eines NMR-Signals in Anwesenheit eines externen Gradientenimpulses.

Durch eine exponentielle Anpassung der Intensität  $I$  an die Gleichung 20 kann der Diffusionskoeffizient  $D$  des dem korrespondierenden Signal zugehörigen Teilchens bestimmt werden. Unter Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 21) wäre es zusätzlich möglich, den hydrodynamischen Radius des dem Signal zugehörigen Moleküls zu bestimmen.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_0}$$

$k_B$ : Boltzmann-Konstante

$T$ : Temperatur

$\eta$ : dynamische Viskosität des Lösungsmittels

$R_0$ : hydrodynamischer Radius

**Gleichung 21:** Stokes-Einstein-Gleichung.

Bei der Darstellung eines DOSY-NMRs wird ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum gegen die Diffusionskoeffizienten der jeweiligen Signale aufgetragen, um dadurch ein 2D-Spektrum zu erhalten. Dadurch ist es möglich zu erkennen, welche Signale einen vergleichbaren Diffusionskoeffizienten aufweisen und als Folge dessen zu der gleichen Verbindung gehören. Zur Überprüfung der erfolgreichen Immobilisierung des MaPenA and das **POx-SH** wurde ein DOSY-NMR des vermeidlichen **POx-MaPenA** aufgenommen (Abbildung 60). In dem dargestellten Spektrum wurde auf der X-Achse das  $^1\text{H}$ -Spektrum

der Probe aufgeführt, entsprechende Diffusionskoeffizienten wurden auf der Y-Achse aufgetragen. Die roten Flächen stellen dabei die Schnittpunkte zwischen den jeweiligen Signalen aus dem  $^1\text{H}$ -Spektrum und dem dementsprechend ermittelten Diffusionskoeffizienten dar. Bei der Betrachtung des DOSY-NMRs war zu erkennen, dass die Signale der EtOx-Wiederholungseinheiten (**A**, **B**, **C**) des Polymers einen ähnlichen Bereich an Diffusionskoeffizienten aufwiesen von um die  $2 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ . Dadurch war zu erkennen, dass die Signale der Wiederholungseinheiten alle einer Art von Polymer mit einer engen Molmassenverteilung zuzuordnen waren. Bei einem Polymer mit einer breiten Molmassenverteilung wäre der Bereich der den jeweiligen Signalen der Wiederholungseinheiten zugeordneten Diffusionskoeffizienten wesentlich breiter gewesen. Hätte ein Gemisch aus beispielsweise zwei Polymeren mit unterschiedlichen Molekulargewichten aber vergleichbarer Zusammensetzung vorgelegen, so wären zwei komplett unterschiedliche Diffusionskoeffizienten-Bereiche erkennbar gewesen.

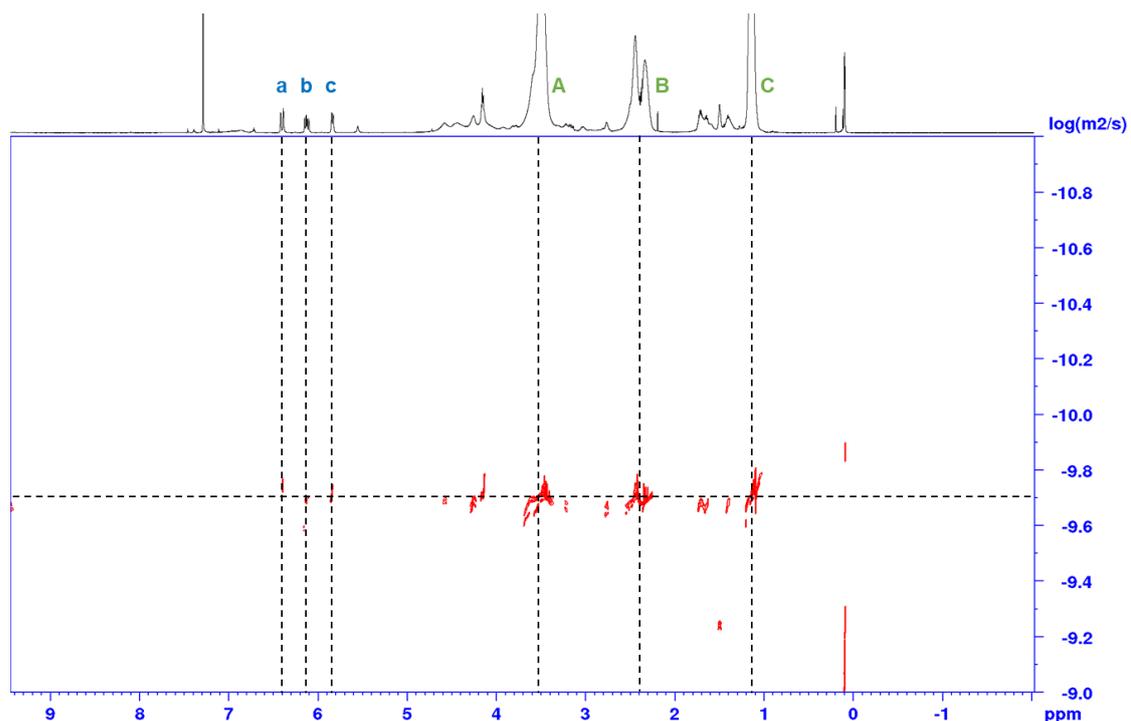


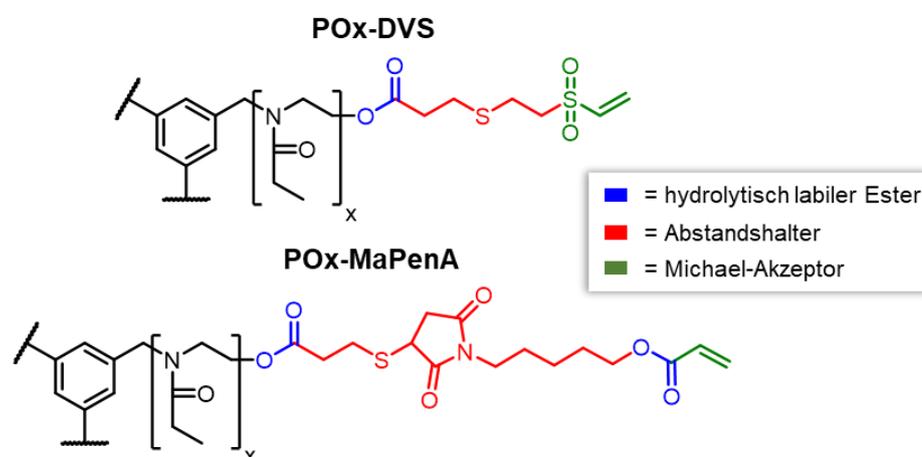
Abbildung 60: Bearbeitetes DOSY-NMR-Spektrum des **POx-MaPenA**.

Um zu überprüfen, ob die im  $^1\text{H}$ -NMR gemessenen Acrylat-Signale (**a**, **b**, **c**) am Polymer immobilisiert waren, wurde die Diffusionskoeffizienten dieser mit denen der EtOx-Wiederholungseinheiten (**A**, **B**, **C**) verglichen. Da die Signale einen vergleichbaren Diffusionskoeffizienten wie die Signale der EtOx-Einheiten aufgewiesen haben, konnte von einer erfolgreichen Immobilisierung gesprochen werden. Um den Erfolg der Herstellung des **POx-DVS** zu verifizieren, wurde ein DOSY-NMR gemessen und

ausgewertet (Abschnitt 7.8, Seite 199). Die Auswertung des Spektrums konnte den ebenfalls erfolgreichen Ablauf der Herstellung des **POx-DVS** bestätigen.

#### 4.4.2. Evaluation der neuen Vernetzer

Als Ergebnis der Weiterentwicklung der ersten „proof-of-concept“-Vernetzersysteme konnten die beiden Vernetzer **POx-DVS** und **POx-MaPenA** erfolgreich hergestellt und charakterisiert werden. Dabei wurde die Endgruppen der Vernetzer angepasst, um die zuvor unter Abschnitt 4.4 beschriebenen Strukturelemente erfolgreich einzubauen (Abbildung 61).



**Abbildung 61:** Übersicht über die Struktur der neuen Vernetzerpolymere **POx-DVS** und **POx-MaPenA**.

Um ihren Einfluss auf die späteren Hydrogele zu evaluieren, sollten sie in den nachfolgenden Experimenten zur Vernetzung des thiolhaltigen Präpolymers **PSH1** ( $M_n = 21,2 \text{ kg/mol}$ ; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) verwendet werden. Die Herstellung der Gele sollte analog zu der zuvor beschriebenen Prozedur (Abschnitt 4.3, Seite 77) erfolgen. Dabei wurden Hydrogele mit zwei unterschiedlichen Gewichtskonzentrationen von  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$  und  $200 \text{ mg/mL}$  hergestellt. Um den vorzeitigen hydrolytischen Abbau der Esterfunktionalitäten zu verringern, wurden die Hydrogele nach der Gelierung in einem 0,01 M PBS-Puffer gequollen, dessen pH-Wert nachträglich auf 7 eingestellt worden ist. Die Gele wurden im Anschluss auf ihre Steifigkeit sowie ihr Quellverhalten hin untersucht (Tabelle 9). Zum Vergleich wurden auch die zuvor ermittelten Daten der Hydrogele aus **POx-3** ( $M_n^{\text{NMR}} = 3,5 \text{ kg/mol}$ , EtOx-Einheiten = 32) sowie **PEGDA<sub>3500</sub>** aufgeführt.

**Tabelle 9:** Übersicht über die Eigenschaften der Hydrogele aus den Vernetzern **POx-DVS** und **POx-MaPenA**.

| Vernetzer             | $\beta$ [mg/mL] | $E^a$ [kPa]    | $Q$              |
|-----------------------|-----------------|----------------|------------------|
| POx-DVS               | 100             | $2,4 \pm 0,1$  | $13,2 \pm 0,3^b$ |
|                       | 200             | $10,0 \pm 0,5$ | $9,1 \pm 0,1^b$  |
| POx-MaPenA            | 100             | $2,3 \pm 0,2$  | $13,3 \pm 0,5^b$ |
|                       | 200             | $11,0 \pm 0,1$ | $8,6 \pm 0,4^b$  |
| POx-3                 | 100             | $4,0 \pm 0,1$  | $12,1 \pm 0,2^b$ |
| PEGDA <sub>3500</sub> | 100             | $13,2 \pm 0,7$ | $10,0 \pm 0,1^c$ |
|                       | 200             | $37,5 \pm 1,2$ | $7,2 \pm 0,1^c$  |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt; c: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7,4 für 24 h bei rt.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Vernetzung des thiolhaltigen Präpolymers mit den beiden neuen Vernetzern **POx-DVS** und **POx-MaPenA** zur Bildung von stabilen Hydrogelen geführt hat. Die E-Module der dabei erhaltenen Gele lagen bei 2,3 und 2,4 kPa für die niedriger konzentrierten Gele ( $\beta = 100$  mg/mL) und bei 10 und 11 kPa für die höher konzentrierten Gele ( $\beta = 200$  mg/mL). Der Vergleich der neuen Hydrogele mit denen, welche zuvor mit dem Vernetzer **POx-3** hergestellt worden sind, zeigte eine Abnahme des E-Moduls der neuen Systeme um 33% (**POx-DVS**) bis 40% (**POx-MaPenA**).

Diese Verringerung der Gelsteifigkeit konnte als möglicher Hinweis für eine erhöhte Hydrolyselabilität der neuen Vernetzer gesehen werden. Da die Vernetzungsreaktion bei einem leicht alkalischen pH-Wert von 7,4 durchgeführt wurde wäre es denkbar gewesen, dass ab diesem Zeitpunkt bereits die Hydrolyse einiger Vernetzer-Endgruppen eingesetzt hat. Auch wenn die Gele nach der Vernetzung zum Quellen in eine Pufferlösung überführt wurden, welche nachträglich auf einen pH-Wert von 7 eingestellt worden ist, musste davon ausgegangen werden, dass während der Reaktionszeit von 8 bis 10 Stunden, welche einen möglichst vollständigen Umsatz der Funktionalitäten in einer Michael-Addition gewährleisten sollten, bei einem pH-Wert von 7,4 ein hydrolytischer Abbau stattgefunden hat. Diese Vermutung schien sich beim Vergleich der Quellwerte der Hydrogele weiter zu bestärken. Die Hydrogele, welche mit **POx-DVS** und **POx-MaPenA** vernetzt wurden, wiesen erhöhte Quellwerte von 13,2 und 13,3 auf, im Vergleich zu den Gelen aus POx-3 mit einem Quellwert von 12,1. Diese erhöhte Quellung wies auf eine weniger dichte oder unvollständigere Vernetzung hin, welche ebenfalls durch die Hydrolyse der Vernetzer verursacht worden sein könnte. Ein weiterer Faktor, welcher zu der geringeren Gelsteifigkeit geführt haben könnte, war die leicht verringerte

Endgruppenfunktionalisierungsrate des **POx-DVS** von 81%. Auch wenn die Stöchiometrie der beiden Hydrogelkomponenten vor der Vernetzung entsprechend den ermittelten Endgruppenfunktionalisierungsraten angepasst wurde, musste davon ausgegangen werden, dass statistisch gesehen ein Teil der eingesetzten Vernetzer nicht trifunktionell war, sondern nur bi- oder monofunktionell. Diese Vernetzer mit unvollständiger Endgruppenfunktionalisierung, könnten für eine weniger enge Vernetzung der Polymerketten gesorgt haben und würden bei einer möglichen Hydrolyse, im Vergleich zu den vollständig funktionalisierten Vernetzern, früher zu einem Vernetzungsverlust führen.

Auch wenn die Hydrogele, welche mit den neuen Vernetzern **POx-DVS** und **POx-MaPenA** hergestellt worden sind, über einen geringeren E-Modul verfügten als die zuvor hergestellten Hydrogele, so konnte dies doch als möglicher Erfolg gesehen werden, da es ein Indiz für eine deutlich höhere Abbaugeschwindigkeit der Gele war. Diese galt es nun durch Abbauexperimente zu verifizieren. Dafür wurden die Hydrogele wie zuvor in Abschnitt 3.3.6 (Seite 48) beschrieben in 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C inkubiert. Das E-Modul der Gele zum Zeitpunkt  $t$  ( $E_t$ ) wurde prozentual ins Verhältnis gesetzt zum E-Modul zum Zeitpunkt  $t = 0$  ( $E_0$ ). Die Experimente wurden für die Gele aus den Vernetzern **POx-DVS (blau)** und **POx-MaPenA (orange)** für beide Gelkonzentrationen durchgeführt (Abbildung 62).

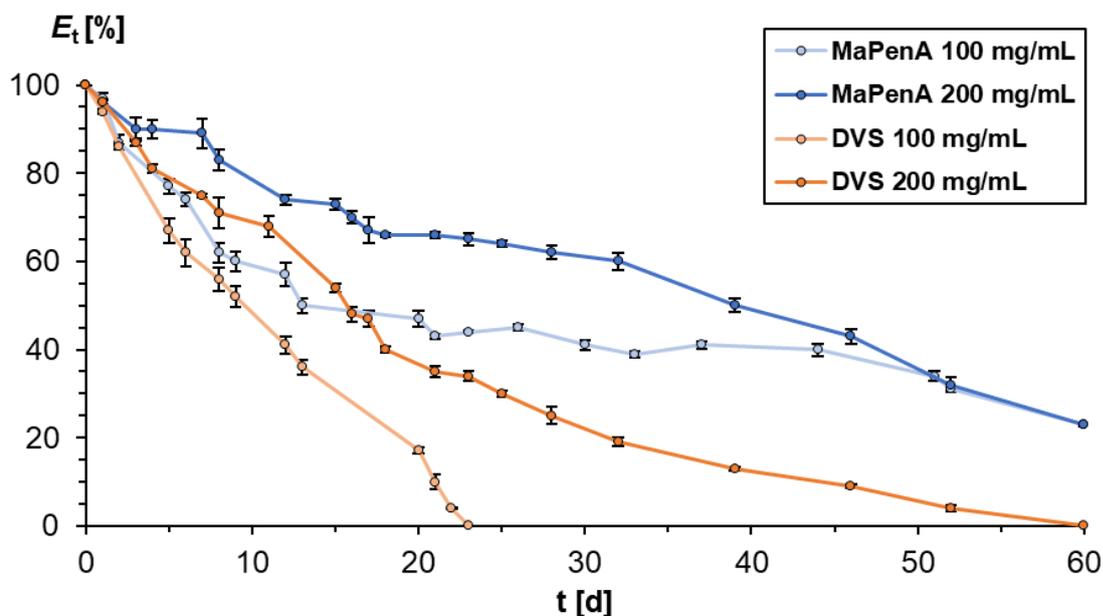


Abbildung 62: Abbaugraphen der Hydrogele aus den Oxazolinvernetzern **POx-DVS** und **POx-MaPenA**.

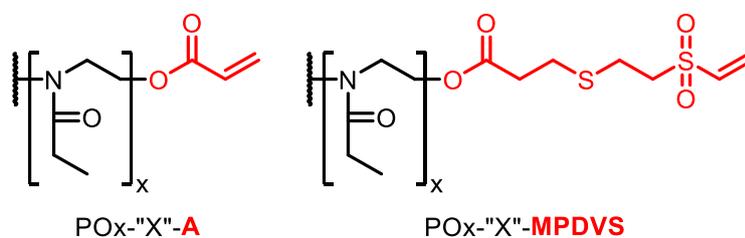
Die Ergebnisse der Abbauexperimente haben gezeigt, dass die Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele deutlich gesteigert werden konnte im Vergleich zu den zuvor untersuchten

Systemen (POx-1, POx-2, POx-3, Abbildung 52, Seite 81). Vor allem die Hydrogele aus **POx-DVS** zeigten einen deutlichen Hydrolyse-bedingten Abbau auf von durchschnittlich 4,3% (DVS 100 mg/mL) und 1,7% pro Tag (DVS 200 mg/mL). Selbst für die höher konzentrierten Hydrogele lag die Abbaugeschwindigkeit somit deutlich über dem zuvor ermittelten Wert für **POx-3** von 1,2% pro Tag.

Für die Hydrogele, welche mit **POx-MaPenA** vernetzt wurden, ergaben sich für beide Gelkonzentrationen über den Messzeitraum von 60 Tagen Abbaugeschwindigkeiten von 1,3% pro Tag. Auffällig dabei war, dass vor allem die Hydrogele aus **POx-MaPenA** innerhalb der ersten 20 Tage einen deutlich schnelleren Abbau aufgewiesen haben (2,65% bei 100 mg/mL und 1,7% bei 200 mg/mL) als danach. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei der Polymerisation trotz der sehr engen Molmassenverteilung einige Polymerketten entstehen, welche länger sind als der Durchschnitt. Entsprechend der zuvor aufgestellten Hypothese, dass eine höhere Kettenlänge zu hydrophileren Polymeren mit zugänglicheren Esterfunktionalitäten führt, könnte dies als mögliche Erklärung für diese Beobachtung dienen. Analog zu den Gelen aus **POx-MaPenA** konnte bei den Hydrogelen aus **POx-DVS** ( $\beta = 200$  mg/mL) ein ähnliches Verhalten festgestellt werden. Die Gele wiesen eine Abbaurrate von 3,1% pro Tag innerhalb der ersten 21 Tage auf, welche danach auf 0,9% für den Rest der Messungen gefallen ist. Der Abbau der Systeme ließ sich dadurch in zwei verschiedene Phasen unterteilen, welche sich bezüglich ihrer Abbaugeschwindigkeiten unterschieden. In der ersten Phase wurden zunächst die Vernetzerketten hydrolysiert, welche etwas länger als der Durchschnitt waren. Sie waren etwas hydrophiler und hatten zugänglichere Esterfunktionalitäten, was zu einem schnellen Abbau geführt hat. In der zweiten Phase wurde das Netzwerk nun hauptsächlich von den kürzeren Vernetzerketten zusammengehalten, welche dementsprechend hydrophober waren und über weniger zugängliche Ester verfügten. Dies resultierte in niedrigeren Abbaugeschwindigkeiten, welche eher mit der Abbaugeschwindigkeit der zuvor untersuchten Hydrogele aus **POx-3** vergleichbar waren. Diese Beobachtungen deckten sich zum Teil mit den Untersuchungen von BOWMAN *et al.*, welche festgestellt haben, dass der Einbau von unterschiedlich langen hydrolytischen labilen Ester-Einheiten in ihre PEG-Netzwerke, zu einer exponentiell verlangsamt Hydrolyse dieser führte.<sup>[177,178]</sup> Die Hydrolyse der untersuchten Netzwerke lief dabei zu Beginn sehr schnell ab, jedoch wurde der vollständige Abbau gegen Ende der Untersuchungen durch einzelne hydrophobere Ester-Einheiten signifikant verlangsamt.

Zusammengefasst ließ sich somit sagen, dass es möglich war, durch die Optimierung der Endgruppenfunktionalitäten der Vernetzersysteme, Hydrogele herzustellen, welche eine deutlich erhöhte Abbaugeschwindigkeit aufgewiesen haben. Vor allem das neu entwickelte Vernetzersystem **POx-DVS** schien, bezüglich einer späteren Anwendung in Zellexperimenten, sehr vielversprechend zu sein. Durch die Erhöhung der Hydrolyselabilität kam es jedoch zu einer Verringerung der Steifigkeit der Hydrogele, welches sich in späteren Experimenten durch den Einsatz höherer Gelkonzentrationen ausgleichen lassen könnte.

Durch das erfolgreiche Etablieren der hydrolytisch labilen Endgruppe des **POx-DVS** konnten nun in den nachfolgenden Experimenten zwei unterschiedliche Endgruppensysteme angewendet werden (Abbildung 63).



**Abbildung 63:** Struktur der beiden etablierten Endgruppen (rot) für die Oxazolinvernetzersynthese.

Zum einen wurden die Acrylat-Endgruppen (als **POx-''X''-A** bezeichnet) angewendet, die für die Herstellung stabiler Hydrogele genutzt werden können und einen langsamen hydrolytischen Abbau aufweisen. Als Alternative dazu wurde die Mercaptopropionsäure-Divinylsulfon-Endgruppe (als **POx-''X''-MPDVS** bezeichnet) angewendet, welche Hydrolyse bedingt zu etwas weniger steifen Gelen führt, welche dafür eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit aufweisen.

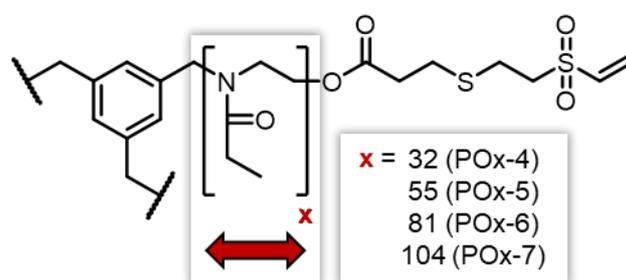
## 4.5. Variation der Vernetzparameter

Durch das Einführen der alternativen Vernetzer-Endgruppe (**MPDVS**) war es erstmals möglich, Hydrogele mit einer erhöhten Abbaugeschwindigkeit herzustellen. Um in zukünftigen Arbeiten im Optimalfall bereits vor der Synthese eine Vorhersage über die späteren Hydrogeleigenschaften treffen zu können, galt es den Einfluss weiterer Vernetzparameter genauer zu untersuchen. Dafür sollte der Einfluss der Vernetzparameter genauer zu untersuchen. Dafür sollte der Einfluss der Vernetzparameter genauer zu untersuchen. Dafür sollte der Einfluss der Vernetzparameter genauer zu untersuchen.

der Einsatz von bifunktionellen Vernetzern und Copolymerrückgrate genauer untersucht werden.

### 4.5.1. Einfluss der Vernetzerlänge

Basierend auf den vorhergegangenen Untersuchungen mit **PO<sub>x</sub>-DVS** sollte der Einfluss der Kettenlänge des Vernetzers auf die mechanischen Eigenschaften und das Abbauverhalten untersucht werden. Dazu wurden zunächst vier verschiedene Oxazolinvernetzer mit variierenden EtOx-Wiederholungseinheiten hergestellt und charakterisiert (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Struktur der untersuchten Oxazolinvernetzer mit variierenden EtOx-Wiederholungseinheiten.

Die Daten für die hergestellten Vernetzer wurden in der nachfolgenden Tabelle 10 aufgeführt.

**Tabelle 10:** Übersicht über die Daten der Oxazolinvernetzer mit variierenden Kettenlängen.

| Polymer                  | EtOx-Einheiten <sup>a</sup> | <i>F</i> <sup>b</sup> [%] | <i>M<sub>n</sub></i> <sup>NMR c</sup> [g/mol] | <i>M<sub>n</sub></i> <sup>GPC d</sup> [g/mol] | <i>D</i> <sup>d</sup> |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---|---|-----------------------|
| PO <sub>x</sub> -4-MPDVS | 32                          | 85                        | 3600  | 3900  | 1,13                  |
| PO <sub>x</sub> -5-MPDVS | 55                          | 87                        | 6600  | 7500  | 1,14                  |
| PO <sub>x</sub> -6-MPDVS | 81                          | 79                        | 7700  | 9300  | 1,20                  |
| PO <sub>x</sub> -7-MPDVS | 104                         | 84                        | 11100   | 11000   | 1,13                  |

**a:** ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren durch den Vergleich der Signale der EtOx-Seitenkette und des Initiators; **b:** ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 19; **c:** ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 18; **d:** ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard.

Die Synthese der Vernetzer mit variierenden EtOx-Wiederholungseinheiten konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Molekulargewichte und Dispersitäten der Polymere waren im Rahmen der Erwartungen. Die Endgruppenfunktionalisierungsraten lagen mit Werten von 79% bis 87% in einem Bereich, welcher für eine Anwendung in der Hydrogelherstellung ausreichend war. Die etwas niedrigere Funktionalisierungsrate des **PO<sub>x</sub>-6-MPDVS** von 79% sowie die leichte Erhöhung des mittels GPC bestimmten

Molekulargewichts und Dispersität, waren ein Hinweis darauf, dass es bei der Funktionalisierung der Vernetzer-Präpolymere mit DVS zu einer partiellen Vernetzung gekommen ist. Diese Vernetzung schien jedoch nur zu einem geringen Maße stattgefunden zu haben, wodurch das erhaltene Polymer trotzdem als Vernetzer in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt werden konnte.

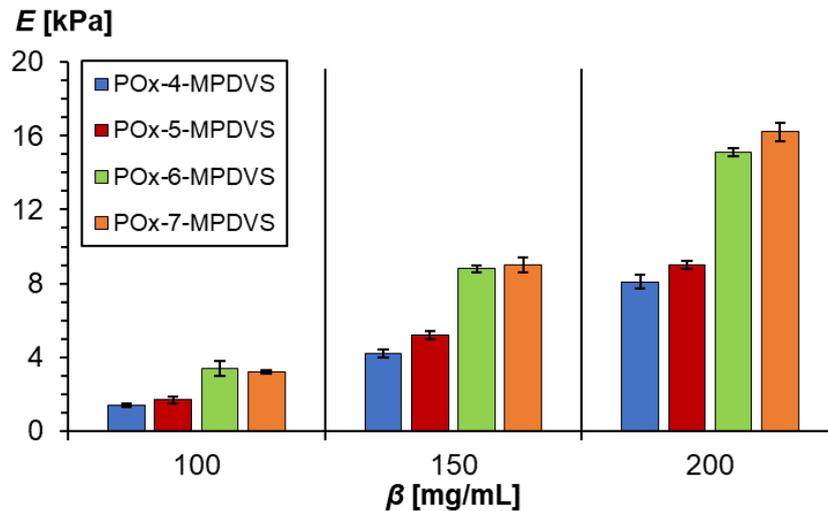
Die erhaltenen Polymere wurden zur Vernetzung des in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen thiolhaltigen Präpolymers **PSH1** ( $M_n = 21,2 \text{ kg/mol}$ ; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) verwendet. Es wurden Hydrogele aus den vier Vernetzern in drei unterschiedlichen Gelkonzentrationen ( $\beta = 100/150/200 \text{ mg/mL}$ ) hergestellt und bezüglich ihrer mechanischen Eigenschaften und ihres Quellverhaltens untersucht. Die dabei ermittelten Daten wurden in der nachfolgenden Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11:** Übersicht über die Eigenschaften der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierenden Kettenlängen.

| Vernetzer                | $\beta$ [mg/mL] | $E^a$ [kPa] | $Q^b$     |
|--------------------------|-----------------|-------------|-----------|
| PO <sub>x</sub> -4-MPDVS | 100             | 1,4 ± 0,1   | 8,5 ± 0,2 |
|                          | 150             | 4,2 ± 0,2   | 5,1 ± 0,1 |
|                          | 200             | 8,1 ± 0,4   | 4,1 ± 0,2 |
| PO <sub>x</sub> -5-MPDVS | 100             | 1,7 ± 0,2   | 8,1 ± 0,1 |
|                          | 150             | 5,2 ± 0,2   | 4,9 ± 0,2 |
|                          | 200             | 9,0 ± 0,2   | 3,3 ± 0,2 |
| PO <sub>x</sub> -6-MPDVS | 100             | 3,4 ± 0,4   | 8,6 ± 0,2 |
|                          | 150             | 8,8 ± 0,2   | 5,2 ± 0,1 |
|                          | 200             | 15,1 ± 0,2  | 3,9 ± 0,2 |
| PO <sub>x</sub> -7-MPDVS | 100             | 3,2 ± 0,1   | 9,3 ± 0,2 |
|                          | 150             | 9,0 ± 0,4   | 5,4 ± 0,1 |
|                          | 200             | 16,2 ± 0,5  | 4,0 ± 0,3 |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt.

Um den Vergleich der E-Module der verschiedenen Hydrogele visuell anschaulicher zu gestalten, wurden diese in der nachfolgenden Abbildung 65 grafisch dargestellt.



**Abbildung 65:** Übersicht über die E-Module der Hydrogele aus den Vernetzern mit unterschiedlichen Vernetzerlängen.

Der Vergleich der einzelnen E-Module zeigte, dass durch den Einsatz von Vernetzern mit längeren Polymerarmen Hydrogele erhalten wurden, welche über eine erhöhte Steifigkeit verfügten. Vor allem die Gele aus den Vernetzern **POx-6-MPDVS** und **POx-7-MPDVS** wiesen eine deutlich erhöhte Steifigkeit auf im Vergleich zu den kurzkettigen Vernetzern. Die Hydrogele ( $\beta = 100$  mg/mL) aus **POx-6-MPDVS** zum Beispiel waren mit einem E-Modul von 3,4 kPa um gut 100% steifer als die Gele aus **POx-7-MPDVS** mit einem E-Modul von 1,7 kPa. Im Vergleich der Hydrogele aus den beiden kurzkettigen Vernetzern, wiesen die Gele aus **POx-5-MPDVS** um 11% ( $\beta = 200$  mg/mL) bis 22% ( $\beta = 100$  mg/mL) erhöhte Steifigkeit auf. Der Unterschied der Gelsteifigkeit zwischen den Hydrogelen aus den beiden langkettigen Vernetzern (**POx-7-MPDVS/POx-8-MPDVS**) war weniger signifikant und lag für alle untersuchten Konditionen bei weniger als 10%.

Als mögliche Erklärung für die Erhöhung der Hydrogelsteifigkeit bei der Verwendung von langkettigen Vernetzerketten konnte erneut die erhöhte Vernetzungseffizienz gesehen werden, wie sie bereits in Abschnitt 4.3.1 (Seite 78 ff) beschrieben wurde. Kurzgefasst führte eine höhere Kettenlänge der Vernetzer zu flexibleren Polymerarmen mit erhöhter Reichweite. Diese erhöhte Reichweite ermöglichte im Laufe der Vernetzungsreaktion die Ausbildung von intermolekularen Vernetzungspunkten, welche einen positiven Beitrag zur effektiven Vernetzung der Hydrogele leisteten. Bei den kurzkettigen Vernetzern hingegen kam es im Laufe der Vernetzung durch die geringere Reichweite der Vernetzerarme vermutlich zu einem verringerten Umsatz der Funktionalitäten oder zur vermehrten Ausbildung von intramolekularen Vernetzungspunkten (Abbildung 51, Seite 80). Diese

intramolekularen Vernetzungspunkte verbrauchten dadurch reaktive Kettenenden, ohne einen signifikanten Beitrag zur Stabilität des Netzwerks zu leisten.

Bezüglich des Quellwertes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Vernetzerlängen festgestellt werden. Durch die vermutlich Vernetzungseffizienz-bedingten Unterschiede im E-Modul der Hydrogele wären zwischen den verschiedenen Vernetzerlängen größere Unterschiede zu erwarten gewesen. Die Gele aus den kürzeren Vernetzern (**POx-4-MPDVS/POx-5-MPDVS**) wiesen wahrscheinlich eine weniger effiziente Vernetzung und dementsprechend eine weniger hohe Vernetzungsdichte auf, was im Vergleich zu den langkettigen Vernetzern in einer erhöhten Quellung resultierte. Gleichzeitig hätte die geringere Länge der Vernetzer aber auch zur Ausbildung eines engmaschigeren Netzwerkes geführt, da der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Vernetzungspunkten kürzer gewesen wäre als beim Einsatz eines langkettigen Vernetzers. Bei den Hydrogelen aus den langkettigen Vernetzern (**POx-6-MPDVS/POx-7-MPDVS**) kam es vermutlich zum Auftreten der gegenteiligen Effekte. Hier führte die erhöhte Kettenlänge zu einer effektiveren Vernetzungsreaktion, was in dichter vernetzten Hydrogelen resultierte. Gleichzeitig war jedoch der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Vernetzungspunkten erhöht, was zur Ausbildung von weitmaschigeren Netzwerken geführt hat. Diese beiden gegensätzlichen Effekte haben dazu geführt, dass die Quellwerte der Hydrogele aus den verschiedenen Vernetzern innerhalb der gleichen Gelkonzentration ähnliche Werte aufgewiesen haben.

Neben dem Einfluss der Vernetzerlänge auf die mechanischen Eigenschaften und das Quellverhalten galt es auch, die Veränderungen des Abbauverhaltens der Gele zu untersuchen. Dafür wurden die erhaltenen Hydrogele in Abbaupexperimenten, analog zu Abschnitt 3.3.6 (Seite 48), untersucht. Aufgrund der hohen Menge an Daten wurden die Ergebnisse zur besseren Übersicht in der Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Übersicht über die Daten der Abbauxperimente der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Vernetzerlänge.

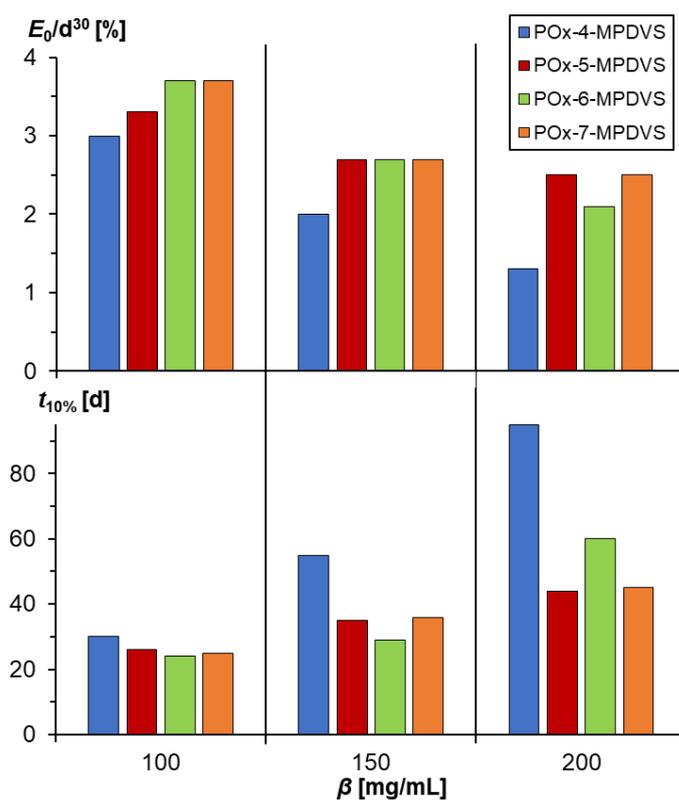
| Vernetzer                | $\beta$ [mg/mL] | $t_{50\%}^a$ [d] | $t_{10\%}^b$ [d] | $E_0/d^{30c}$ [%] |
|--------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| PO <sub>x</sub> -4-MPDVS | 100             | 10               | 30               | 3,0               |
|                          | 150             | 24               | 55               | 2,0               |
|                          | 200             | 37               | - <sup>d</sup>   | 1,3               |
| PO <sub>x</sub> -5-MPDVS | 100             | 12               | 26               | 3,3               |
|                          | 150             | 17               | 35               | 2,7               |
|                          | 200             | 23               | 44               | 2,5               |
| PO <sub>x</sub> -6-MPDVS | 100             | 13               | 24               | 3,7               |
|                          | 150             | 14               | 29               | 2,7               |
|                          | 200             | 19               | 60               | 2,1               |
| PO <sub>x</sub> -7-MPDVS | 100             | 10               | 25               | 3,7               |
|                          | 150             | 14               | 36               | 2,7               |
|                          | 200             | 15               | 45               | 2,5               |

**a:** Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  50% des  $E_0$  entsprach; **b:** Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  10% des  $E_0$  entsprach; **c:** gemittelte prozentuale Abnahme des E-Moduls im Vergleich zum  $E_0$  innerhalb der ersten 30 Tage der Messung; **d:** konnte nicht ermittelt werden, da der  $E_t$  bis zum Ende der Messung ( $t = 95$  d) noch über 10% des  $E_0$  lag.

Um die erhaltenen Ergebnisse der Abbauxperimente in numerische Werte umzusetzen, wurden für die untersuchten Gele im Nachfolgenden die drei Kennzahlen  $t_{50\%}$ ,  $t_{10\%}$ , sowie  $E_0/d^{30d}$  verwendet. Die beiden ersten Werte beschreiben die Zeit  $t$ , nach welcher die Hydrogele einen E-Modul erreicht haben, welcher 50% ( $t_{50\%}$ ) beziehungsweise 10% ( $t_{10\%}$ ) ihres ursprünglichen E-Moduls ( $E_0$ ) entsprachen. Der Wert  $t_{50\%}$  wurde gewählt, da bei der späteren Anwendung der Hydrogele in Zellexperimenten unter anderem das Verhalten der Zellen in Abhängigkeit des E-Moduls untersucht werden könnte. Bei einer Verringerung der Steifigkeit um die Hälfte des Ursprungswertes wäre es daher denkbar, dass eine Reaktion der Zellen auf diese Veränderung sichtbar wäre. Der Wert  $t_{10\%}$  sollte im nachfolgenden Vergleich den Zeitpunkt repräsentieren, an welchem die Gele kaum noch mechanische Stabilität aufwiesen. Alternativ dazu wäre auch ein Wert  $t_{0\%}$  denkbar gewesen, bei welchem die Hydrogele vollständig abgebaut vorgelegen hätten, jedoch wiesen einige Gelsysteme einen Abbau auf, welcher nicht vollständig oder gegen Ende des Messzeitraums nur noch sehr langsam erfolgte, sodass die Werte des  $t_{0\%}$  eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen erschwert hätten. Der Wert  $E_0/d^{30}$  beschreibt die durchschnittliche Abnahme des E-Moduls im Vergleich zum Ausgangs-E-Modul ( $E_0$ ) pro Tag innerhalb der ersten 30 Tage des Messzeitraums. Dieser Wert sollte einen Vergleich der prozentualen Abbauraten der Hydrogele ermöglichen. Da einige untersuchte Systeme gegen Ende des Messzeitraums einem signifikant langsameren Abbau unterlagen, wurde für eine bessere Vergleichbarkeit der Werte die Abbauraten innerhalb

der ersten 30 Tage ermittelt. Die gewählten Werte dienen nur dem qualitativen Vergleich der einzelnen Gele untereinander. Für einen detaillierteren Vergleich müssten die Abbaugraphen der einzelnen Gele direkt miteinander verglichen werden (siehe Abschnitt 7.7, Seite 183ff).

Um einen Eindruck über die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gelen zu erhalten, wurden die Werte für  $t_{10\%}$  und  $E_0/d^{30}$  in der Abbildung 66 gegen die Gelkonzentration aufgetragen.



**Abbildung 66:** Übersicht über die  $t_{10\%}$  und die Abbaurrate  $E_0/d^{30}$  der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierenden Vernetzertlängen.

Bezüglich der Abbaurrate innerhalb der ersten 30 Tage konnte festgestellt werden, dass diese mit zunehmender Kettenlänge ebenfalls zugenommen hat. Als Beispiel lag der Wert für  $E_0/d^{30}$  der Hydrogele ( $\beta = 100$  mg/mL) aus **POx-7-MPDVS** bei 3,7% und somit 23% über dem von den Hydrogelen aus **POx-4-MPDVS** von 3%. Auffällig war, dass die Gele aus dem Vernetzer **POx-4-MPDVS** über alle Konzentrationen hinweg eine unterdurchschnittlich hohe Abbaurrate aufgewiesen haben. Dies hat sich vor allem bei den Hydrogelen mit einer Gelkonzentration von 200 mg/mL gezeigt, welche auch nach 95 Tagen keinen vollständigen Abbau aufgewiesen haben. Diese Beobachtung konnte mit den Ergebnissen aus den Abbauxperimenten der ersten Oxazolin-vernetzten Hydrogelen

(Abbildung 52, Seite 81) verglichen werden. Bereits in diesen Experimenten hat sich gezeigt, dass kürzere Polymerarme vermutlich zu einer engmaschigeren Vernetzung geführt haben, wodurch die Zugänglichkeit der labilen Esterfunktionalitäten verringert und als Folge dessen der Abbau der Gele sehr stark verlangsamt wurde.<sup>[52]</sup> Der Vergleich der langkettigen Vernetzer (**POx-5/6/7-MPDVS**) hat gezeigt, dass oberhalb einer bestimmten Länge (in diesem Fall 55 EtOx-Einheiten) die Zunahme der Abbaugeschwindigkeit stagnierte. Unabhängig von der Gelkonzentration waren die Unterschiede der drei Systeme deutlich weniger signifikant als zwischen den langkettigen Systemen (**POx-5/6/7-MPDVS**) und dem kurzkettigen System (**POx-4-MPDVS**).

Beim Vergleich der Hydrogele mit verschiedenen Gelkonzentrationen ließ sich feststellen, dass die höher konzentrierten Gele eine deutlich geringere Abbaugeschwindigkeit aufwiesen. Dies lag im Rahmen der Erwartungen, da die höheren Gelkonzentrationen zur Ausbildung von dichteren Netzwerken geführt haben, wodurch die Zugänglichkeit der labilen Esterfunktionalitäten verringert worden ist und der Hydrolyse-bedingte Abbau dementsprechend verlangsamt wurde.

Aus den Ergebnissen der Abbauxperimente lässt sich zusammenfassend feststellen, dass sich die Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele durch die Länge der Vernetzerpolymere anpassen lässt. Es konnte beobachtet werden, dass ab einer Vernetzerlänge von 55 EtOx-Wiederholungseinheiten die Zunahme der Abbaugeschwindigkeit deutlich stagnierte. Der Einsatz von kurzkettigen Vernetzern (32 EtOx-Einheiten) sollte bezüglich einer Anwendung in Zellexperiment vermieden werden, da die erhaltenen Systeme eine Vernetzungseffizienz-bedingte geringe Steifigkeit und eine niedrige Abbaugeschwindigkeit aufgewiesen haben.

#### **4.5.2. Einsatz von Copolymeren**

Eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften der Vernetzer zu verändern, war der Einsatz von Copolymersystemen. Der Gedanke dabei war, das amphiphile EtOx durch das hydrophilere MetOx zu ersetzen, wodurch die erhaltenen Vernetzer hydrophiler werden sollten. Dies sollte dann für eine bessere Solvatisierung der Ketten in Wasser sorgen und dadurch die Hydrolyse-bedingte Abbaugeschwindigkeit erhöhen. Um den Einfluss der Copolymerzusammensetzung mit den vorhergegangenen Systemen vergleichen zu können, sollten erneut dreiarmlige Oxazolinvernetzer mit TBMB als Initiator hergestellt werden. Als

Endgruppe wurde die MPDVS-Endgruppe gewählt, da diese in den vorhergegangenen Experimenten zu einer erhöhten Abbaugeschwindigkeit geführt hatte.

Im Nachfolgenden sollte eine Reihe von EtOx/MetOx-Copolymeren mit einem MetOx-Anteil von bis zu 100 mol% hergestellt und charakterisiert werden. Bei der Aufarbeitung der Polymere traten jedoch einige Probleme auf, welche zu Ausbeuten von teilweise unter 10% geführt haben. Beim Einsatz von 3-Mercaptopropionsäure (MPP) als Terminationsreagenz in der CROP müssen die Polymere nach der Polymerisation mehrfach mit verschiedenen wässrigen Lösungen gewaschen werden, um Rückstände des MPPs zu entfernen. Die zunehmende Hydrophilie der Polymere bei steigendem MetOx-Anteil führte dazu, dass die Polymere beim Waschen von der organischen in die wässrige Phase gewechselt haben und sich somit nicht mehr von den MPP-Resten trennen ließen. Um trotzdem einen ersten Eindruck über den Einfluss der Copolymerzusammensetzung auf die späteren Hydrogele zu erhalten, wurden drei unterschiedliche Vernetzersysteme mit einem MetOx-Anteil von bis zu 45 mol% hergestellt und miteinander verglichen (Abbildung 67).

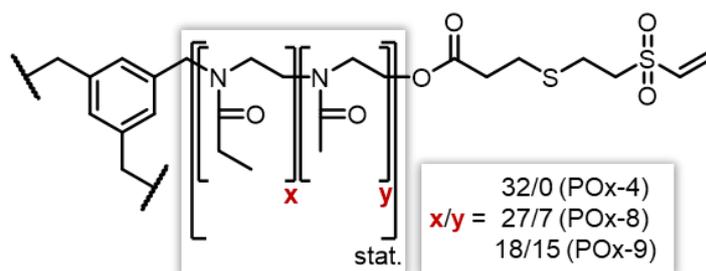


Abbildung 67: Struktur der Oxazolinvernetzer mit variierender Copolymerzusammensetzung.

Die drei Polymere (**POx-4-MPDVS**, **POx-8-MPDVS** und **POx-9-MPDVS**) wurden analog zu den vorhergegangenen Experimenten hergestellt. Die Quantifizierung der Zusammensetzung erfolgte mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, indem die Signale der  $\text{CH}_2$ -Einheiten des EtOx (**11**) und die Signale der  $\text{CH}_3$ -Einheiten des MetOx (**12**) mit den benzylicchen Signalen des Initiators (**5**) verglichen wurden (Abbildung 68).

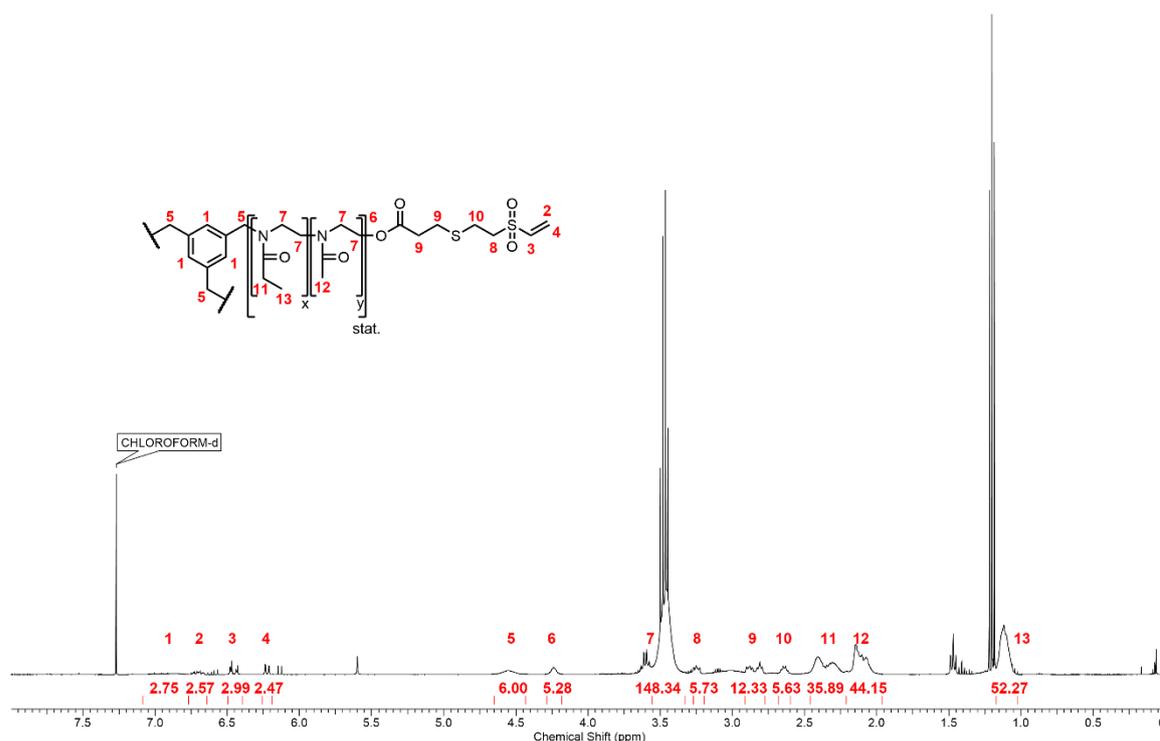


Abbildung 68:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **PO<sub>x</sub>-9-MPDVS** in  $\text{CDCl}_3$ .

Zusätzlich zu der Bestimmung der Zusammensetzung wurde auch das Molekulargewicht sowie die Dispersität der Oxazolinvernetzer mittels GPC ermittelt. Die vollständigen Ergebnisse der Charakterisierung wurden in der nachfolgenden Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Übersicht über die Daten der Oxazolinvernetzer mit variierender Copolymerzusammensetzung.

| Polymer                  | EtOx/MetOx <sup>a</sup> | $F^b$<br>[%] | $M_n^{\text{NMR } c}$<br>[g/mol] | $M_n^{\text{GPC } d}$<br>[g/mol] | $D^d$ |
|--------------------------|-------------------------|--------------|----------------------------------|----------------------------------|-------|
| PO <sub>x</sub> -4-MPDVS | 32/0                    | 85           | 3600                             | 3900                             | 1,13  |
| PO <sub>x</sub> -8-MPDVS | 27/7                    | 84           | 3600                             | 3800                             | 1,12  |
| PO <sub>x</sub> -9-MPDVS | 18/15                   | 82           | 3400                             | 4100                             | 1,09  |

a: ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren durch den Vergleich der Signale der EtOx- und MetOx-Seitenketten und des Initiators; b: ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unter Anwendung von Gleichung 19; c: ermittelt aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren unter Anwendung von Gleichung 18; d: ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard.

Beim Betrachten der Daten der Charakterisierung konnte festgestellt werden, dass die Synthese der neuen Systeme erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Polymere wiesen eine vergleichbare Länge von 32 bis 34 Wiederholungseinheiten auf und besaßen eine niedrige Dispersität. Der Vergleich der Molekulargewichte, welche mittels  $^1\text{H-NMR}$  und GPC bestimmt wurden, wiesen hohe Übereinstimmungen auf. Lediglich bei **PO<sub>x</sub>-9-MPDVS** war ein deutlicher Unterschied des ermittelten Molekulargewichts von ungefähr 700 g/mol festzustellen. Dieser Unterschied kam vermutlich durch den erhöhten MetOx-Anteil des Polymers zustande. Da die Bestimmung des Molekulargewichts bei der GPC

durch den Vergleich mit einem Polymer-Standard erfolgte, ist die Genauigkeit der Messung stark vom verwendeten Standard abhängig. Aufgrund der im Vergleich zum MetOx geringeren Hydrophilie des PMMA waren die zur Berechnung des Molekulargewichts verwendeten Kalibrierfunktionen vermutlich wenig geeignet für MetOx-Polymere, was zu den Unterschieden zwischen den NMR- und GPC-Ergebnissen geführt hat.

Die aufgeführten Polymere wurden im Anschluss zur Herstellung von Hydrogelen mit einer Gelkonzentration von 100, 150 und 200 mg/mL genutzt. Als thiolhaltiges Präpolymer wurde hierbei das zuvor in Abschnitt 3.2.3 (Seite 24 ff.) beschriebene **PSH1** ( $M_n = 21,2$  kg/mol; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) verwendet. Nach Ablauf der Vernetzungsreaktion wurden die Gele für 24 Stunden in 0,01 M PBS-Puffer gequollen, welcher nachträglich auf einen pH-Wert von 7 eingestellt worden ist. Die Gele wurden im Anschluss bezüglich ihrer Steifigkeit und ihres Quellverhaltens untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in der Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14:** Übersicht über die Daten der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung.

| Vernetzer                | $\beta$ [mg/mL] | $E^a$ [kPa] | $Q^b$     |
|--------------------------|-----------------|-------------|-----------|
| PO <sub>x</sub> -4-MPDVS | 100             | 1,4 ± 0,1   | 8,5 ± 0,2 |
|                          | 150             | 4,2 ± 0,2   | 5,1 ± 0,1 |
|                          | 200             | 8,1 ± 0,4   | 4,1 ± 0,2 |
| PO <sub>x</sub> -8-MPDVS | 100             | 1,2 ± 0,1   | 9,1 ± 0,3 |
|                          | 150             | 4,5 ± 0,3   | 5,5 ± 0,1 |
|                          | 200             | 8,9 ± 0,5   | 4,4 ± 0,1 |
| PO <sub>x</sub> -9-MPDVS | 100             | 1,4 ± 0,2   | 9,7 ± 0,1 |
|                          | 150             | 4,2 ± 0,2   | 5,3 ± 0,1 |
|                          | 200             | 8,7 ± 0,4   | 4,2 ± 0,2 |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt.

Der Vergleich der E-Module der verschiedenen Gele hat gezeigt, dass diese innerhalb der gleichen Gelkonzentration vergleichbare Werte aufwiesen, mit Unterschieden von maximal 10%. Dies hat gezeigt, dass das Einbringen eines MetOx-Anteils in den Vernetzer von bis zu 45 mol% zu keiner signifikanten Veränderung der Gelsteifigkeit führt. Bei der Betrachtung der Quellwerte der Hydrogele ließ sich ein ähnliches Verhalten feststellen. Die Quellwerte der Gele aus dem Vernetzer mit dem höchsten MetOx-Anteil (**PO<sub>x</sub>-9-MPDVS**) waren im Vergleich zum reinen EtOx-Vernetzer (**PO<sub>x</sub>-4**) zwar um gut 14% höher, jedoch war dies nur bei einer einzelnen Gelkonzentration ( $\beta = 100$  mg/mL) der Fall, wodurch hier eher von einer Ausnahme auszugehen war.

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Hydrophilie der Vernetzer einen Einfluss auf das Abbauverhalten der Gele hat, wurde dieses in Abbauxperimenten in 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden im Nachfolgenden für die Gele mit einer Konzentration von 100 und 200 mg/mL aufgeführt (Tabelle 15, Abschnitt 7.7 Seite 185 ff.).

**Tabelle 15:** Übersicht über die Daten der Abbauxperimente der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung.

| Vernetzer   | $\beta$ [mg/mL] | $t_{50\%}^a$ [d] | $t_{10\%}^b$ [d] | $E_0/d^{30c}$ [%] |
|-------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| POx-4-MPDVS | 100             | 10               | 30               | 3,0               |
|             | 200             | 37               | - <sup>d</sup>   | 1,3               |
| POx-8-MPDVS | 100             | 16               | 33               | 2,7               |
|             | 200             | 33               | 91               | 1,8               |
| POx-9-MPDVS | 100             | 14               | 23               | 3,7               |
|             | 200             | 19               | 58               | 2,4               |

**a:** Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  50% des  $E_0$  entspricht; **b:** Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  10% des  $E_0$  entspricht; **c:** gemittelte prozentuale Abnahme des E-Moduls im Vergleich zum  $E_0$  innerhalb der ersten 30 Tage der Messung; **d:** konnte nicht ermittelt werden, da der  $E_t$  bis zum Ende der Messung ( $t = 95$  d) noch über 10% des  $E_0$  lag.

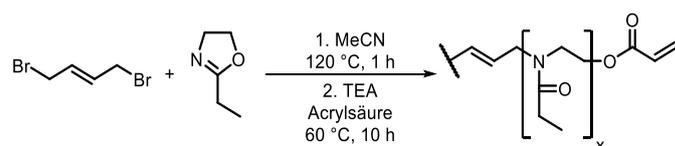
Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Abbauxperimente war es möglich, deutliche Unterschiede zwischen den Werten der verschiedenen Hydrogele festzustellen. Die Abbaugeschwindigkeit der Gele innerhalb der ersten 30 Tage ( $E_0/d^{30}$ ) ist mit zunehmendem MetOx-Anteil im Vernetzer signifikant gestiegen. Dies wurde vor allem bei den Ergebnissen der Gele mit erhöhter Gelkonzentration ( $\beta = 200$  mg/mL) deutlich. So lag die Abbaugeschwindigkeit ( $E_0/d^{30}$ ) beim Vernetzer mit 45% MetOx-Anteil (**POx-9-MPDVS**) mit einem Wert von 2,4% fast 85% über dem Wert vom Vernetzer ohne MetOx-Anteil (**POx-4-MPDVS**) von 1,3%. Dies wurde als Zeichen dafür gesehen, dass die erhöhte Hydrophilie der Vernetzerketten zu einer gesteigerten Solvatisierung geführt hat, was eine schnellere Hydrolyse der Hydrogele verursachte. Bei den Gelen mit einer geringeren Gelkonzentration ( $\beta = 100$  mg/mL) war dieser Unterschied zwischen den Vernetzern mit hohem (**POx-9-MPDVS**) und keinem MetOx-Anteil (**POx-4-MPDVS**) ebenfalls erkennbar (Zunahme des  $E_0/d^{30}$  um 23%), jedoch war dieser deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den höher konzentrierten Gelen. Vermutlich war dies auf die, durch die Konzentration bedingte, niedrigere Netzwerkdicke der Hydrogele zurückzuführen, welche eine bessere Solvatisierung der Ketten erlaubte, was sich auch in der stärkeren Quellung der Hydrogele widerspiegelte.

Durch den Einsatz von Copolymeren war es somit möglich Vernetzpolymere herzustellen, welche durch ihre erhöhte Hydrophilie einen stärkeren hydrolytischen Abbau aufwiesen. Da die mechanische Stabilität der Hydrogele dabei jedoch nicht negativ beeinflusst wurde, kann der Einsatz von Copolymeren als eine weitere Möglichkeit betrachtet werden, die Abbaugeschwindigkeit der Systeme zu kontrollieren.

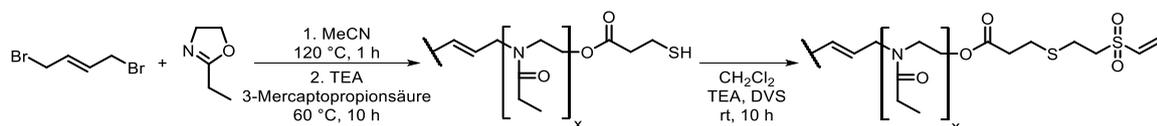
### 4.5.3. Einsatz von bifunktionellen Vernetzern

Als weitere Möglichkeit, die Vernetzeigenschaften zu modifizieren, wurde die Synthese und der Einsatz von bifunktionellen Vernetzpolymeren evaluiert. Durch den Wechsel von tri- zu bifunktionellen Vernetzern wäre es denkbar gewesen, dass der Einsatz der bifunktionellen Polymere zur Ausbildung von weitmaschigeren Netzwerken führt. Diese erhöhte Maschenweite sollte dann eine bessere Zugänglichkeit der hydrolytisch labilen Esterfunktionalitäten der Vernetzer ermöglichen und in einem schnelleren Abbau resultieren.

Zur Synthese wurde erneut das amphiphile EtOx als Monomer gewählt und in einer CROP mit 1,4-Dibrom-2-buten (**DBB**) umgesetzt. Die Terminierung erfolgt dabei entweder durch den Einsatz von Acrylsäure (Schema 11) zur Erzeugung von Acrylat-Endgruppen, oder durch den Einsatz von 3-Mercaptopropionsäure und anschließender Funktionalisierung mit DVS zur Erzeugung von MPDVS-Endgruppen (Schema 12).



**Schema 11:** Syntheschema der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit Acrylat-Endgruppe.



**Schema 12:** Syntheschema der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit MPDVS-Endgruppe.

Im Anschluss an die Synthese wurden die erhaltenen Polymere mithilfe von  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und GPC bezüglich ihres Molekulargewicht, Endgruppenfunktionalisierungsrate und Dispersität charakterisiert. Die Ermittlung der Zusammensetzung und der Funktionalisierungsrate im  $^1\text{H-NMR}$  erfolgte dabei durch den

Vergleich des Signals der allylischen CH-Gruppen des Initiators (**4**) mit dem CH<sub>2</sub>-Signal der EtOx-Seitenketten (**8**) und den allylischen Wasserstoffatomen der Michael-Akzeptor-Endgruppe (**1, 2, 3**) (Abbildung 69).

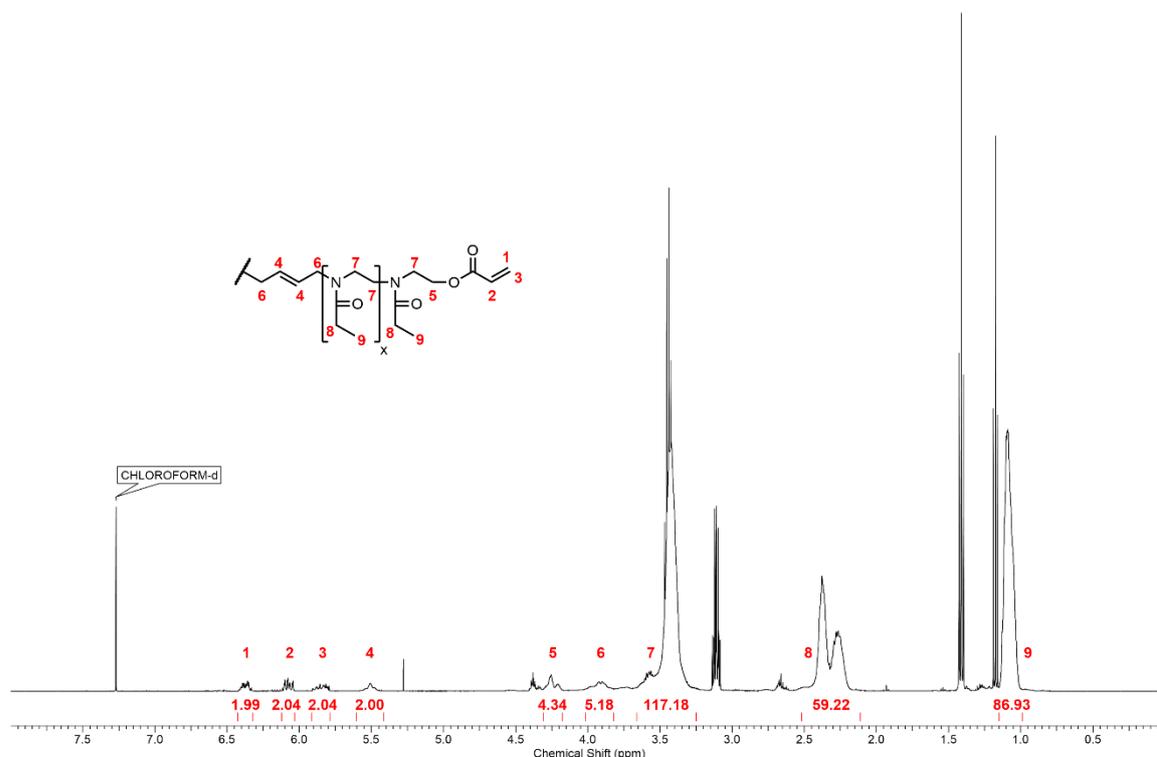


Abbildung 69: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-10 in CDCl<sub>3</sub>.

Basierend auf der Auswertung wurden die Daten und die Struktur der erhaltenen bifunktionellen Oxazolinvernetzer im Nachfolgenden zusammengefasst (Tabelle 16, Abbildung 70).

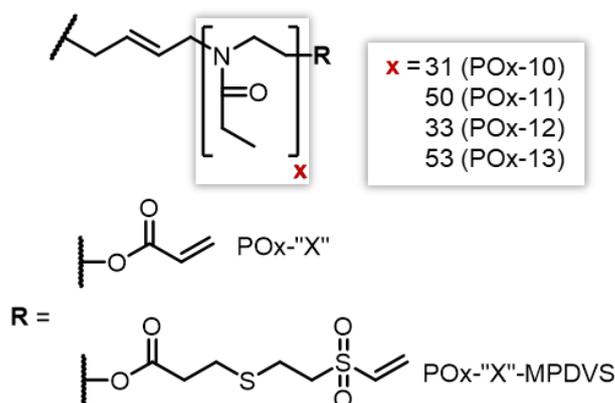
Tabelle 16: Übersicht über die Daten der bifunktionellen Oxazolinvernetzer.

| Polymer      | EtOx-Einheiten <sup>a</sup> | F <sup>b</sup> [%] | M <sub>n</sub> <sup>NMR c</sup> [g/mol] | M <sub>n</sub> <sup>GPC d</sup> [g/mol] | D <sup>d</sup> |
|--------------|-----------------------------|--------------------|---|---|----------------|
| POx10        | 31                          | quant.             | 3300                                    | 3500                                    | 1,09           |
| POx11        | 50                          | 99                 | 5200                                    | 5600                                    | 1,11           |
| POx-12-MPDVS | 33                          | 77                 | 3800                                    | 4400                                    | 1,16           |
| POx-13-MPDVS | 53                          | 82                 | 5800                                    | 6300                                    | 1,13           |

a: ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren durch den Vergleich der Signale der EtOx- und MetOx-Seitenketten und des Initiators; b: Endgruppenfunktionalisierungsrate der Vernetzer ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 19; c: ermittelt aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren unter Anwendung von Gleichung 18; d: ermittelt durch GPC mit DMF + 5 g/L LiBr als Eluent und einem PMMA-Standard.

Die Auswertung der analytischen Daten hat ergeben, dass die Synthese der bifunktionellen Vernetzer erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die ermittelten Molekulargewichte der Polymere aus NMR und GPC stimmten, unter Berücksichtigung der zuvor bereits mehrfach beobachteten Abweichungen durch die Verwendung eines für Polyoxazoline nicht

optimalen Polymerstandards, gut überein und die Dispersitäten der Polymere lagen mit Werten von unter 1,2 im Rahmen der Erwartungen für Polymere, welche mittels einer CROP hergestellt wurden.<sup>[171]</sup> Bei der Betrachtung der Endgruppenfunktionalisierungsrate der beiden Vernetzer mit Acrylat-Endgruppe (**POx-10/11**) konnten zum Teil quantitative Umsetzungsraten ermittelt werden, was für eine optimale Terminierung gesprochen hat. Bei den Vernetzern mit MPDVS-Endgruppe (**POx-12/13-MPDVS**) lag die Funktionalisierungsrate bei 77% und 82%. Als mögliche Erklärung dafür könnte eine nicht vollständige Termination der Polymere durch die 3-Mercaptopropionsäure sein. Die dadurch verringerten Funktionalisierungsraten könnten durch die unerwünschte Nebenreaktion bei der DVS-Funktionalisierung, bei welcher zwei Thiol-Endgruppen durch ein DVS-Molekül miteinander vernetzt werden, weiter verringert worden sein. Zusätzlich wäre es denkbar, dass es beim Aufarbeiten der Polymere nach der DVS-Funktionalisierung durch mehrere Waschvorgänge mit verschiedenen wässrigen Lösungen zur Hydrolyse einiger Esterfunktionalitäten gekommen ist, was zu einem zusätzlichen Verlust an Endgruppen geführt hätte. Da die Endgruppenfunktionalisierungsraten der Vernetzer mit MPDVS-Endgruppe auch nach mehrmaligem Abändern der Synthese- und Aufarbeitungsprozeduren nicht weiter erhöht werden konnten, wurden die Polymere **POx-12/13-MPDVS** im Anschluss trotzdem zur Synthese einiger Hydrogele genutzt, um ihren Einfluss auf die Hydrogeleigenschaften zu untersuchen.



**Abbildung 70:** Struktur der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit variierender Endgruppe und Länge.

Die Herstellung und Charakterisierung der Hydrogele erfolgten dabei analog zum Abschnitt 3.3 (Seite 26 ff.), wobei die Gele hierbei erneut nach dem vollständigen Ablauf der Vernetzungsreaktion für 24 Stunden in 0,01 M PBS-Puffer bei einem pH-Wert von 7 gequollen sind. Zur Vernetzung wurde das thiolhaltige Präpolymer **Psh1** ( $M_n = 21,2$  kg/mol; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%) verwendet, wobei Gele mit einer

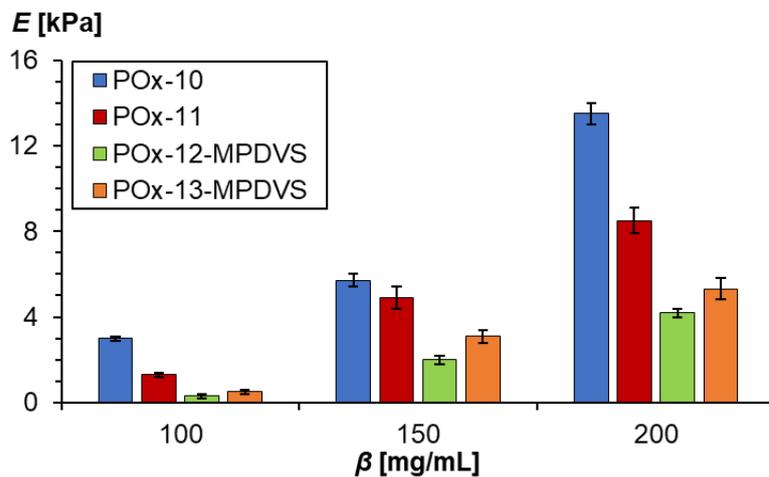
Gelkonzentration von 100, 150 und 200 mg/mL hergestellt werden sollten. Die erhaltenen Gele wurden dann bezüglich ihres E-Moduls und ihres Quellverhaltens untersucht. Die dabei erhaltenen Daten wurden in der Tabelle 17 aufgeführt.

**Tabelle 17:** Übersicht über die Daten der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern.

| Vernetzer                 | $\beta$ [mg/mL] | $E^a$ [kPa] | $Q^b$      |
|---------------------------|-----------------|-------------|------------|
| PO <sub>x</sub> -10       | 100             | 3,0 ± 0,1   | 11,0 ± 0,3 |
|                           | 150             | 5,7 ± 0,3   | 8,3 ± 0,1  |
|                           | 200             | 13,5 ± 0,5  | 6,2 ± 0,1  |
| PO <sub>x</sub> -11       | 100             | 1,3 ± 0,1   | 13,2 ± 0,1 |
|                           | 150             | 4,9 ± 0,5   | 9,9 ± 0,6  |
|                           | 200             | 8,5 ± 0,6   | 8,5 ± 0,3  |
| PO <sub>x</sub> -12-MPDVS | 100             | 0,3 ± 0,1   | 23,6 ± 0,9 |
|                           | 150             | 2,0 ± 0,1   | 8,6 ± 0,3  |
|                           | 200             | 4,2 ± 0,2   | 6,4 ± 0,2  |
| PO <sub>x</sub> -13-MPDVS | 100             | 0,5 ± 0,1   | 17,9 ± 0,4 |
|                           | 150             | 3,1 ± 0,3   | 11,1 ± 0,5 |
|                           | 200             | 5,3 ± 0,4   | 8,4 ± 0,3  |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt.

Um den Vergleich der E-Module visuell zu erleichtern, wurden diese in der Abbildung 71 gegen die Gelkonzentration aufgetragen.



**Abbildung 71:** Übersicht über die E-Module der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern.

Zunächst erfolgte der Vergleich der beiden Vernetzer mit Acrylat-Endgruppe (PO<sub>x</sub>-10/11). Bezüglich des E-Moduls wiesen die Hydrogele, welche mit dem langkettigen Vernetzer (PO<sub>x</sub>-11) hergestellt wurden, eine geringere Steifigkeit auf als die Hydrogele aus dem kurzkettigen Vernetzer. Dies war gegenläufig zu den vorher gemachten Beobachtungen beim Vergleich der dreiarmigen Vernetzer mit variierender Kettenlänge (Abschnitt 4.5.1,

Seite 99 ff.), welche gezeigt haben, dass beim Einsatz von langkettigen Vernetzern die E-Modul der erhaltenen Gele zunehmen. Dies wurde auf die vermutlich erhöhte Vernetzungseffizienz der langkettigen Vernetzer zurückgeführt und wäre als solches auch bei den bifunktionellen Vernetzern zu erwarten gewesen. Da dies jedoch nicht der Fall war, konnte an dieser Stelle vermutet werden, dass der langkettige Vernetzer (**POx-11**) eine erhöhte Zugänglichkeit der hydrolytisch labilen Esterfunktionalitäten aufwies. Diese könnten bereits bei der Herstellung der Gele zu einem signifikanten Abbau der Vernetzer geführt haben, wodurch die Hydrogele zum Zeitpunkt der Charakterisierung einen verringerten E-Modul aufwiesen. Diese Vermutung wird durch die Betrachtung der Quellwerte der Hydrogele noch weiter bestärkt, welche bei den Gelen aus dem langkettigen Vernetzer (**POx-11**) um 20% bis 37% höher ausfallen als bei denen aus dem kurzkettigen Vernetzer (**POx-10**).

Die Betrachtung der Hydrogele aus den beiden Vernetzern mit der MPDVS-Endgruppe (**POx-12/13-MPDVS**) zeigte, dass diese eine deutlich geringere Steifigkeit aufwiesen als die Gele aus den Vernetzern mit Acrylat-Endgruppe (**POx-10/11**). Dies zeigte sich vor allem bei den Gelen mit einer niedrigen Konzentration ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ). So lagen die E-Module der Hydrogele aus den Vernetzern mit MPDVS-Endgruppe bei 0,3 kPa (**POx-12-MPDVS**) und 0,5 kPa (**POx-13-MPDVS**) was gerade einmal 10% bis 17% der Steifigkeit der Gele aus **POx-10** (3 kPa) entsprach. Diese sehr geringen Werte ließen vermuten, dass die Verwendung der hydrolytisch labilen MPDVS-Endgruppe zur Bildung von Vernetzern geführt hat, welche schon während der Hydrogelherstellung einen signifikanten Abbau erfahren haben. Dies wurde erneut durch Betrachtung der Quellwerte der Gele bestärkt, welche vor allem bei den niedrig konzentrierten Gelen, im Vergleich zu einigen vorher untersuchten Systemen, erhöhte Werte aufwiesen. Der Vergleich zwischen den beiden MPDVS-funktionalisierten Vernetzern hat gezeigt, dass der Einsatz des langkettigen Vernetzers (**POx-13-MPDVS**) zur Ausbildung von steiferen Hydrogelen geführt hat, wie es zuvor auch bei der Verwendung der dreiarmligen Vernetzersysteme beobachtet wurde. Es wurde vermutet, dass der vorzeitige Abbau während der Gelierung beide Systeme in einem ähnlichen Maß betroffen hat, wodurch die erhöhte Steifigkeit der Hydrogele auf die höhere Vernetzungseffizienz des langkettigen Vernetzers (**POx-13-MPDVS**) zurückgeführt werden konnte.

Nachdem die Auswertung der Geleigenschaften auf eine erhöhte Hydrolyselabilität der bifunktionellen Vernetzer hingewiesen hat, galt es, diese im Anschluss in

Abbauexperimenten genauer zu untersuchen. Dafür wurden die Gele wie zuvor auch schon beschrieben in 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C inkubiert und die Veränderung des E-Moduls im Laufe der Zeit protokolliert. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden in der Tabelle 18 zusammengefasst.

**Tabelle 18:** Übersicht über die Abbaudaten der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern.

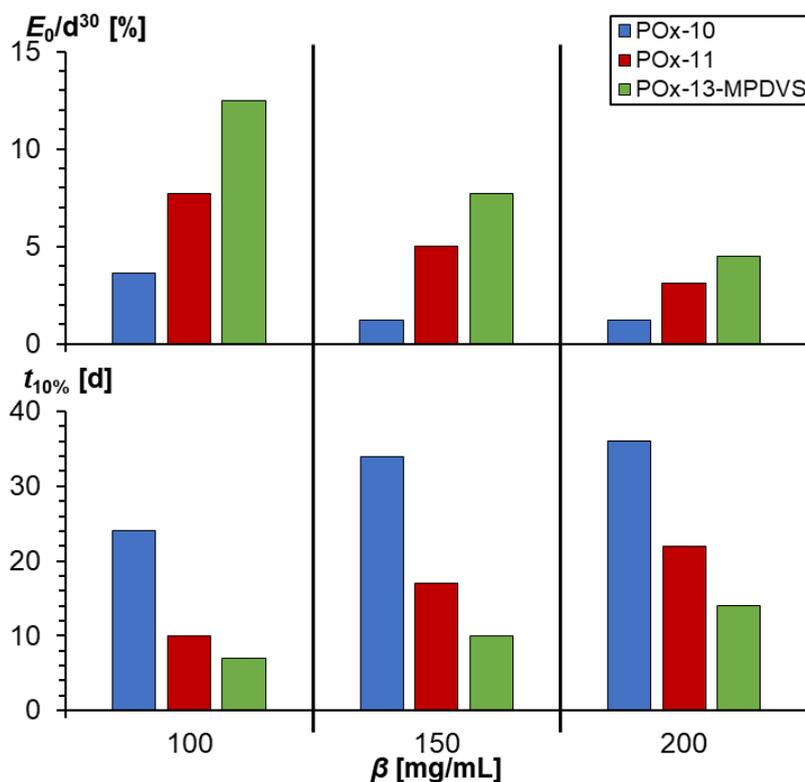
| Vernetzer    | $\beta$ [mg/mL] | $t_{50\%}^a$ [d] | $t_{10\%}^b$ [d] | $E_0/d^{30}$ c [%] |
|--------------|-----------------|------------------|------------------|--------------------|
| POx-10       | 100             | 13               | 24               | 3,6                |
|              | 150             | 13               | 34               | 1,2                |
|              | 200             | 12               | 36               | 1,2                |
| POx-11       | 100             | 3                | 10               | 7,7                |
|              | 150             | 5                | 17               | 5,0                |
|              | 200             | 7                | 22               | 3,1                |
| POx-12-MPDVS | 100             | - <sup>d</sup>   | - <sup>d</sup>   | - <sup>d</sup>     |
|              | 150             | 19               | 55               | 1,4                |
|              | 200             | - <sup>e</sup>   | - <sup>e</sup>   | - <sup>e</sup>     |
| POx-13-MPDVS | 100             | 2                | 7                | 12,5               |
|              | 150             | 3                | 10               | 7,7                |
|              | 200             | 3                | 14               | 4,5                |

a: Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  50% des  $E_0$  entsprach; b: Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  10% des  $E_0$  entsprach; c: gemittelte prozentuale Abnahme des E-Moduls im Vergleich zum  $E_0$  innerhalb der ersten 30 Tage der Messung; d: Proben waren zu weich, um reproduzierbare Messerergebnisse zu erzeugen und wurden daher verworfen; e: konnte nicht ermittelt werden, da der  $E_t$  bis zum Ende der Messung ( $t = 65$  d) noch über 80% des  $E_0$  lag.

Zur besseren Übersicht wurden die Werte für  $E_0/d^{30}$  und  $t_{10\%}$  in der Abbildung 72 für die Gele aus den Vernetzern **POx-10/11** und **POx-13-MPDVS** aufgeführt. Bei der Durchführung und Auswertung der Abbauexperimente der Hydrogele aus **POx-12-MPDVS** sind mehrere Probleme aufgetreten. Die niedrig konzentrierten Gele ( $\beta = 100$  mg/mL) waren mit einem Ausgangs-E-Modul ( $E_0$ ) von 300 Pa so weich, dass sie bereits nach 24 Stunden Inkubationszeit kaum noch auf das Rheometer überführt werden konnten. Die erhaltenen Messwerte wiesen dabei Schwankungen zwischen zwei einzelnen Messungen von bis zu 120% auf, sodass die Gele für weitere Messungen verworfen wurden. Die Gele mit höheren Konzentrationen ( $\beta = 150/200$  mg/mL) wiesen im Laufe der Abbauexperimente einen unvollständigen oder nur sehr langsamen Abbau auf.

Der Vergleich des Abbaus der Hydrogele aus den Vernetzern mit Acrylat-Endgruppe (**POx-10/11**) hat gezeigt, dass der Einsatz des langkettigen Vernetzers (**POx-11**), unabhängig von der Gelkonzentration, zu einem schnelleren hydrolytischen Abbau führte. Diese Ergebnisse decken sich mit der zuvor in Abschnitt 4.5.1 beschriebenen Vermutung, dass eine erhöhte Kettenlänge der Vernetzer zu einer besseren Zugänglichkeit der labilen

Esterfunktionalitäten führt und dadurch in einem schnelleren Abbau resultierte. Die sehr hohe Abbaurate ( $E_0/d^{30} = 7,7\%$ ) der niedrigkonzentrierten Hydrogele ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ) aus **POx-11** schienen die zuvor bei der Quantifizierung des E-Moduls aufgestellte These einer bereits bei der Gelierung partiell auftretenden Hydrolyse der Vernetzerpolymere zu bekräftigen.



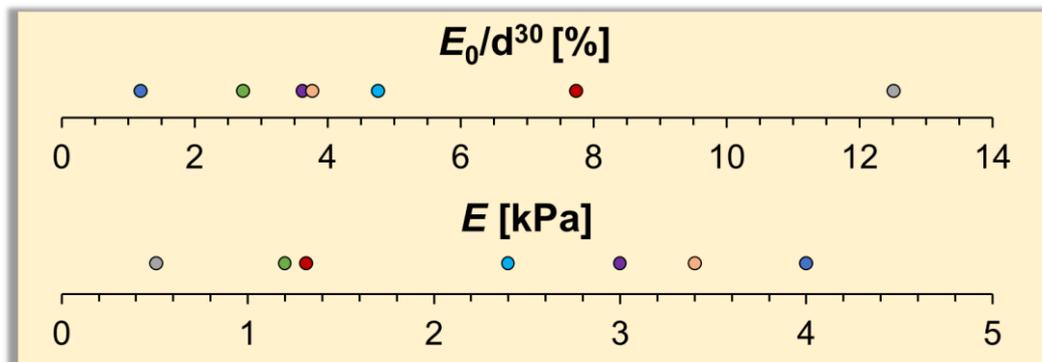
**Abbildung 72:** Übersicht über die  $t_{10\%}$  und die Abbaurate  $E_0/d^{30}$  der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern.

Die Vergleiche der Hydrogele aus dem Vernetzer **POx-13-MPDVS** zeigten, dass diese im Vergleich zu den Hydrogelen aus **POx-10/11** mit Abbauraten ( $E_0/d^{30}$ ) von bis zu 12,5% pro Tag einen noch deutlich schnelleren Abbau aufgewiesen haben. Die Zeiten bis zum beinahe vollständigen Abbau ( $t_{10\%}$ ) der Hydrogele aus **POx-13-MPDVS** waren mit Werten von 7 bis 14 Tagen deutlich schneller als jedes bis zu diesem Zeitpunkt untersuchte Hydrogelsystem. Die Kombination eines bifunktionellen Vernetzers mit einer angemessenen Kettenlänge und labiler MPDVS-Endgruppe sorgte dabei für eine gute Hydrophilie des Systems und eine erhöhte Zugänglichkeit der Esterfunktionalitäten. Ergänzend gibt es zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Arbeit noch weitere Untersuchungen an alternativen bifunktionellen Vernetzern mit zusätzlich erhöhter Kettenlänge (78 EtOx-Einheiten) oder MetOx-Anteilen von bis zu 40 mol% durchgeführt worden sind. Aufgrund der vermutlich sehr hohen Hydrolyselabilität der Systeme konnten

jedoch nur Hydrogele mit sehr geringen E-Modulen erhalten werden, welche in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben wurden.

#### 4.5.1. Vergleich der Eigenschaften mit der Literatur

Durch die Variation der Vernetzerparameter war es möglich, eine Reihe von Hydrogelen herzustellen, welche sich bezüglich ihrer Steifigkeit und ihres Abbauverhaltens unterschieden. Dabei gelang es, ein breites Spektrum an verschiedenen Steifigkeiten sowie Abbaugeschwindigkeiten zu realisieren. Als Beispiel dafür wurde in der Abbildung 73 eine Übersicht über die Eigenschaften einer Auswahl an Hydrogelen mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL dargestellt.



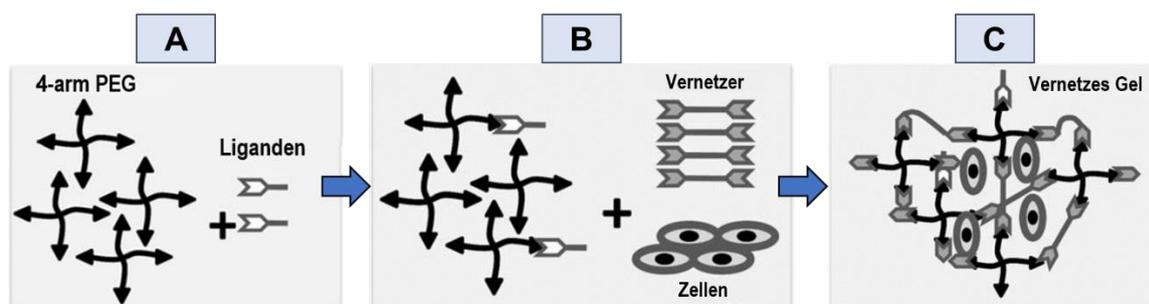
**Abbildung 73:** Übersicht über die E-Module und Abbaugeschwindigkeiten einer Auswahl von Hydrogelen mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL, welche durch den Einsatz verschiedener Oxazolinvernetzer gebildet wurden; Vernetzer welche zur Bildung der Hydrogele genutzt wurden: **blau** = POx-3, **grün** = POx-8-MPDVS, **lila** = POx-10, **orange** = POx-6-MPDVS, **türkise** = POx-DVS, **rot** = POx-11, **grau** = POx-13-MPDVS.

Die E-Module der dargestellten Hydrogele deckten einen Bereich von 0,7 bis 4 kPa ab. Die Steifigkeiten der Gele war damit mit einer Vielzahl von in der Literatur beschriebenen Systemen mit einer ähnlichen Gelkonzentration vergleichbar.<sup>[163,179,180]</sup>

Ein alternatives System, welches Hydrogele ( $\beta = 100$  mg/mL) mit einer hohen Steifigkeit von 10 bis 30 kPa erzeugen konnte, wurde von FARRUGIA *et al.* 2013 beschrieben.<sup>[179]</sup> Dabei wurden Polyoxazoline über Vinyl-Seitenketten mit niedermolekularem Dithiothreitol in einer photoinitierten Thiol-En Click-Reaktion vernetzt. Die erhaltenen Hydrogele verfügten zwar über eine hohe mechanische Stabilität, waren jedoch aufgrund der Struktur der eingesetzten Komponenten nicht abbaubar. Außerdem wäre es denkbar, dass es durch den Einsatz von niedermolekularen Verbindungen in der Photovernetzung zu einer negativen Beeinflussung von Zellen bei einer 3D-Verkapselung kommen könnte.

Bezüglich des hydrolytischen Abbaus lassen sich die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Hydrogele am besten einem von DARGAVILLE *et al.* beschriebenem System vergleichen.<sup>[181]</sup> Dieses verwendet Oxazolin-Copolymere mit Vinyl-Seitenketten, welche durch bifunktionelle Thiole mit labilen Esterfunktionalitäten im Rückgrat in einer photoinitierten Thiol-En Click-Reaktion vernetzt werden. Diese Gele ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ) wiesen in einem PBS-Puffer bei pH-Wert von 7,4 eine vollständigen Abbau nach ungefähr 60 Tagen auf, was deutlich langsamer ist als die Abbaugeschwindigkeit der in dieser Arbeit entwickelten Hydrogele.

In der Literatur werden neben den Oxazolin-basierten Systemen auch diverse PEG-basierte Hydrogele beschrieben, welche über kontrollierbare mechanische Eigenschaften und Abbaugeschwindigkeiten verfügen.<sup>[50,182]</sup> Dabei sind vor allem die Arbeiten von ZUSTIAK *et al.* zu erwähnen, welche 4-armige PEG-Acrylate mit verschiedenen PEG-Diester-Dithiol-Vernetzern umgesetzt haben (Abbildung 74).<sup>[182-184]</sup>



**Abbildung 74:** Schematische Darstellung des Hydrogelsystems von ZUSTIAK *et al.*; **A:** 4-arm PEG wird mit bioaktiven Liganden funktionalisiert; **B:** Funktionalisiertes PEG wird mit bifunktionellen abbaubaren PEG-Vernetzern in der Anwesenheit von Zellen umgesetzt; **C:** Zellen sind in einem dreidimensionalen biofunktionalisiertem Hydrogel eingeschlossen (modifiziert aus <sup>[184]</sup>).

Es war ihnen dabei möglich, durch den Einsatz von Vernetzern mit unterschiedlicher Länge und Endgruppen-Architektur eine direkte Kontrolle über die Steifigkeit und Abbaugeschwindigkeit der Gele zu erhalten, wobei E-Module von 3 bis 30 kPa und Abbauezeiten von 1 - 14 Tagen realisiert werden konnten.<sup>[182,185]</sup> Durch das Einbringen von biomimetischen Peptidsequenzen war es ihnen zusätzlich möglich die Biokompatibilität der Systeme für eine 2D- und 3D-Anwendungen signifikant zu erhöhen und in ersten Experimenten erfolgreich zu etablieren.<sup>[185]</sup> Die Systeme von ZUSTIAK *et al.* zeichnen sich daher durch ihre hohe Flexibilität und Praktikabilität aus und sind mit den in dieser Arbeit beschriebenen Systeme durchaus vergleichbar. Da die Systeme jedoch hauptsächlich auf PEG basieren, bestehen bezüglich einer *in vivo* Anwendung weiterhin Bedenken

hinsichtlich immunologischer Reaktionen, wie sie mittlerweile vermehrt in der Literatur beschrieben werden.<sup>[137,138]</sup>

Der Vergleich mit der Literatur hat somit gezeigt, dass das in dieser Arbeit entwickelte Hydrogelsystem durch den Einsatz von variablen Oxazolin-basierten Vernetzern eine außergewöhnlich hohe Flexibilität bezüglich des Abbauverhaltens aufweist, wie sie aktuell für wenige vergleichbare Systeme beschrieben werden konnten. Um die Anwendbarkeit des Systems für die biomedizinische Forschung zu bestätigen, galt es noch Untersuchungen bezüglich der Biokompatibilität der Materialien sowie der Abbauprodukte durchzuführen.

## 4.6. Gemischte Vernetzersysteme

Der Einsatz der verschiedenen Oxazolin-basierten Vernetzer hat gezeigt, dass die Steifigkeit der erhaltenen Hydrogele im Vergleich zu den vorher behandelten PEGDA-Systemen zwar deutlich niedriger ausfallen, jedoch bezüglich der Abbaugeschwindigkeit eine deutliche Verbesserung aufweisen. Um die Bandbreite an möglichen Geleigenschaften noch einmal zu erweitern, war es denkbar, Hydrogele herzustellen, welche eine Kombination aus Oxazolin-Vernetzern und **PEGDA<sub>3500</sub>** nutzen. Dabei sollte der PEGDA-Anteil zur Erhöhung der Steifigkeit der Systeme genutzt werden, wohingegen der Oxazolin-Anteil eine Kontrolle über die Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele erlauben sollte (Abbildung 75).

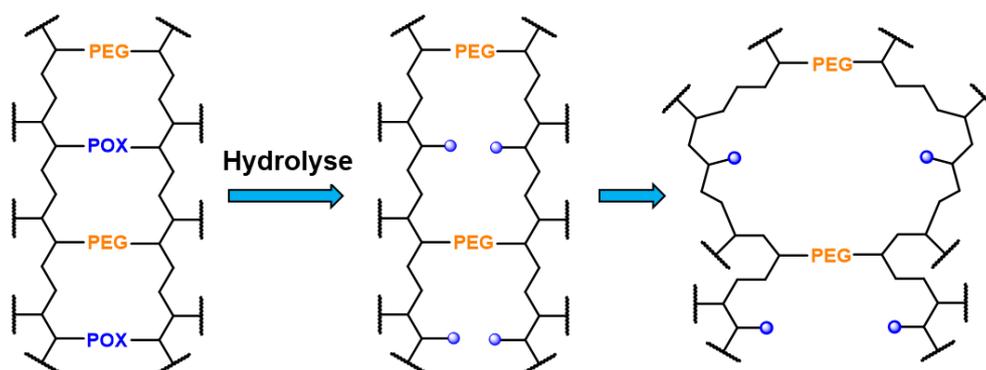


Abbildung 75: Schematische Übersicht über den selektiven Abbau von Hydrogelen mit gemischten Vernetzern.

Um das Potential einer solchen Kombination zu testen, wurde eine Reihe von Gelen mit einer Gelkonzentration von 100 mg/mL angesetzt und bezüglich ihres E-Moduls und ihres Quellgrades charakterisiert. Als thiolhaltige Präpolymer diente erneut das **P<sub>SH1</sub>** ( $M_n = 21,2$  kg/mol; AMor/BMAC = 95,9/4,1 mol%), dessen Thiolfunktionalitäten durch

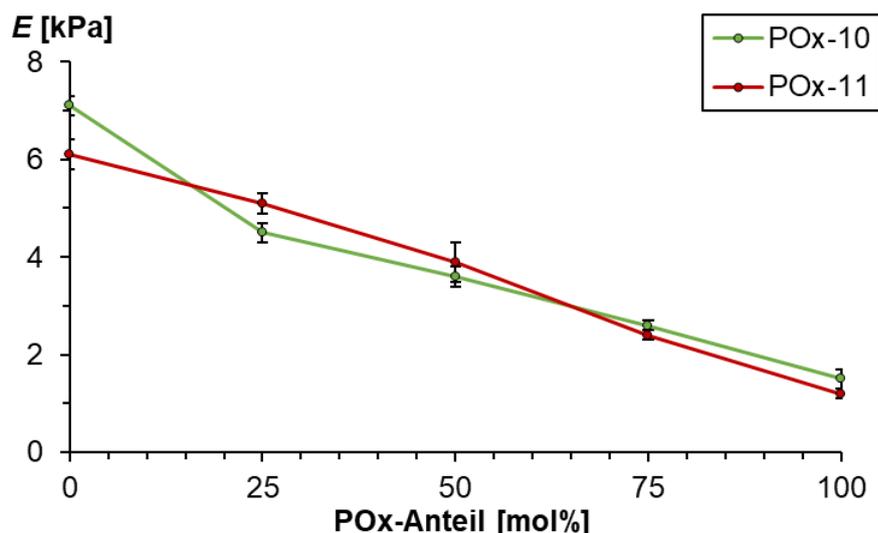
ein Vernetzer-Gemisch aus **PEGDA<sub>3500</sub>** und **POx-10/11** umgesetzt wurden. Der Stoffmengenanteil der Oxazolin-Vernetzer in den Gemischen wurde in 25% Schritten von 0 mol% bis 100 mol% variiert (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Übersicht über die Daten der Hydrogele mit variierenden POx-Anteilen.

| Vernetzer | POx-Anteil [mol%] | $E^a$ [kPa]   | $Q^b$          |
|-----------|-------------------|---------------|----------------|
| POx-10    | 0                 | $7,1 \pm 0,2$ | $7,8 \pm 0,4$  |
|           | 25                | $5,5 \pm 0,2$ | $8,4 \pm 0,1$  |
|           | 50                | $3,6 \pm 0,2$ | $8,8 \pm 0,4$  |
|           | 75                | $2,6 \pm 0,1$ | $9,2 \pm 0,1$  |
|           | 100               | $1,5 \pm 0,2$ | $9,8 \pm 0,1$  |
| POx-11    | 0                 | $6,1 \pm 0,3$ | $7,9 \pm 0,1$  |
|           | 25                | $5,1 \pm 0,2$ | $8,3 \pm 0,1$  |
|           | 50                | $3,9 \pm 0,4$ | $9,0 \pm 0,4$  |
|           | 75                | $2,4 \pm 0,1$ | $9,3 \pm 0,1$  |
|           | 100               | $1,2 \pm 0,1$ | $11,4 \pm 0,2$ |

a: ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; b: ermittelt nach Quellung in 0,01 M PBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt.

Zunächst galt es herauszufinden, wie die Variation des POx-Anteils die Steifigkeit der Systeme beeinflusst und inwiefern dies eine Vorhersage der E-Module in zukünftigen Experimenten ermöglichen könnte. Die Betrachtung der Ergebnisse der beiden Gelreihen ergab einen annäherungsweise linearen Zusammenhang zwischen der Gelsteifigkeit und dem POx-Anteil im Vernetzer (Abbildung 76). Als Beispiel dafür wurde die Gelreihe mit variierendem **POx-11**-Anteil genauer betrachtet. Die Steifigkeit des Gels ohne **POx-11** (0 mol%) betrug 6,1 kPa wohingegen das Gel, welches nur mit **POx-11** vernetzt wurde (100 mol%), eine Steifigkeit von 1,2 kPa aufgewiesen hat. Zwischen dem E-Modul der beiden Gele lag somit eine Differenz von 4,9 kPa. Die Verwendung von 25 mol% **POx-11** im Vernetzer-Gemisch führte zu Gelen mit einem E-Modul von 5,1 kPa was im Vergleich zum Gel ohne **POx-11** (0 mol%) eine Abnahme von 1 kPa war. Diese Abnahme entsprach 20% bezogen auf die Differenz der E-Module (4,9 kPa) der beiden Gele mit maximal unterschiedlicher Vernetzer-Mischung (0 mol% und 100 mol%). Dieser Trend führt sich auch für die anderen beiden Gele in der Messreihe fort. Die Gele mit einem POx-11-Anteil von 50 mol% und 75 mol% wiesen E-Module von 3,9 kPa und 2,4 kPa auf, was einer Abnahme der Steifigkeit bezogen auf die Differenz der 0 mol%- und 100 mol%-Gele, von 45% und 76% entsprach. Die Betrachtung der Messreihe mit den Hydrogelen, welche mit einem variablen POx-10-Anteil hergestellt worden sind, haben einen vergleichbar linearen Trend bezüglich der Veränderung des E-Moduls gezeigt.



**Abbildung 76:** Übersicht über die E-Module der Hydrogele in Abhängigkeit des **POx-10/11**-Anteils der Vernetzer.

An dieser Stelle konnte gezeigt werden, dass der E-Modul der Hydrogelsysteme durch den Einsatz von Gemischen aus Oxazolin-Vernetzern mit **PEGDA<sub>3500</sub>** gezielt gesteuert werden kann. Es galt jedoch noch zu klären, inwiefern sich der Einsatz der Gemische auf die Abbaugeschwindigkeit der Gele auswirkt. Um dies zu überprüfen, wurden die Gele mit variierendem **POx-11**-Anteil in Abbauxperimenten genauer untersucht. Dabei wurden die Gele aus **POx-11** gewählt, da diese in den vorhergegangenen Experimenten einen signifikant schnelleren Abbau aufgewiesen haben als die Gele aus **POx-10**. Die Gele wurden analog zu den vorhergegangenen Abbauxperimenten in 0,01 M PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bei 37 °C für 28 Tage inkubiert. Die dabei ermittelten Werte für  $t_{50\%}$  (Zeit bis zum Verlust von 50% des  $E_0$ ) und  $E_0/d^{28}$  (prozentualer Verlust im Vergleich zum  $E_0$  pro Tag innerhalb von 28 Tagen) wurden in der Tabelle 20 aufgeführt.

**Tabelle 20:** Übersicht über Abbaudaten der Hydrogele mit variierenden **POx-11**-Anteilen.

| Vernetzer | POx-Anteil [mol%] | $t_{50\%}$ <sup>a</sup> [d] | $E_0/d^{28}$ <sup>b</sup> [%] |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| POx-11    | 0                 | - <sup>c</sup>              | 1,1                           |
|           | 25                | 25                          | 1,9                           |
|           | 50                | 19                          | 2,1                           |
|           | 75                | 14                          | 2,4                           |
|           | 100               | 7                           | 4,0                           |

**a:** Zeitpunkt, ab welchem der  $E_t$  50% des  $E_0$  entsprach; **b:** gemittelte prozentuale Abnahme des E-Moduls im Vergleich zum  $E_0$  innerhalb der ersten 28 Tage der Messung; **c:**  $E_t$  lag nach Ablauf des Messzeitraum noch über 50% des  $E_0$ .

Zur grafischen Unterstützung wurden zusätzlich der Verlauf der Abbauxperimente in der Abbildung 77 dargestellt.

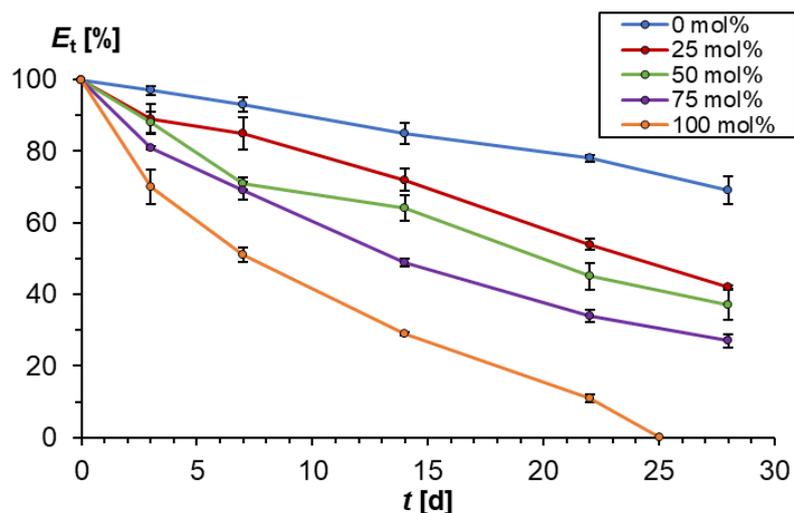


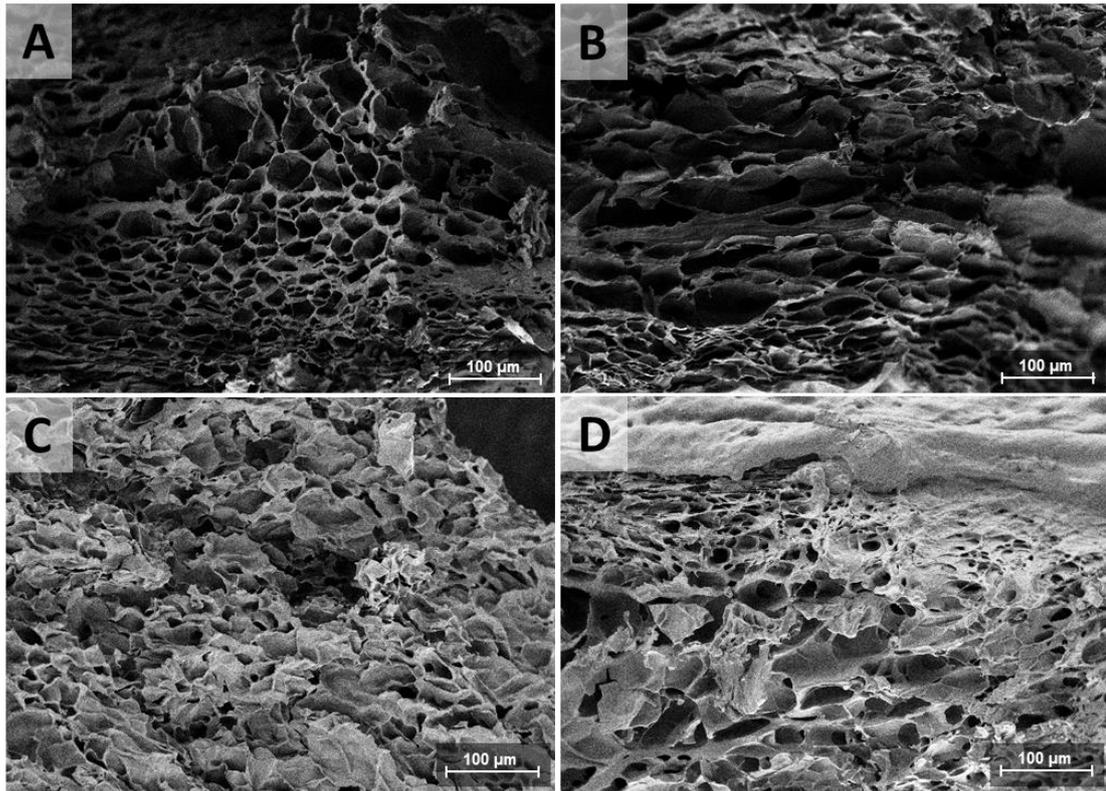
Abbildung 77: Abbaugraphen der Hydrogele mit verschiedenen **POx-11**-Anteilen der Vernetzer.

Die Ergebnisse der Abbauxperimente zeigten, dass die Abbaugeschwindigkeit maßgeblich durch den eingesetzten **POx-11**-Anteil bestimmt wird. Es konnte festgestellt werden, dass schon der Einsatz von 25 mol% **POx-11**, im Vergleich zu den reinen **PEGDA<sub>3500</sub>**-Gelen (**POx-11**, 0 mol%), zu einer deutlichen Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit ( $E_0/d^{28}$ ) von über 70% geführt hat. Diese Steigerung schien im Vergleich zu den Werten der Hydrogele mit 50 und 75 mol% von 90% und 118% relativ hoch, sollte jedoch die grundlegende Möglichkeit zur Kontrolle der Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele durch das Einbringen eines gewissen Anteils von **POx**-Vernetzern bestätigen.

Auch wenn die hier gezeigten Experimente nur exemplarisch für ein einzelnes Vernetzersystem durchgeführt wurden, so konnten sie dennoch zeigen, dass der Einsatz von verschiedenen Polymergemischen genutzt werden kann, um die Eigenschaften der späteren Hydrogele maßgeblich zu beeinflussen.

## 4.7. Gelmorphologie

Um einen Überblick über die Morphologie der porösen Struktur innerhalb der Oxazolin- vernetzten Hydrogele zu erhalten, wurden diese analog zu Abschnitt 3.3.5 (Seite 44 ff.) mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Zum Vergleich wurden dabei Aufnahmen von vier verschiedenen Hydrogelsystemen mit unterschiedlichen Vernetzern oder Gelkonzentrationen exemplarisch dargestellt (Abbildung 78).



**Abbildung 78:** REM-Bilder von Querschnitten verschiedener Hydrogele; zur Gelierung eingesetzte Vernetzer und Gelkonzentrationen: **A:** POx-5-MPDVS,  $\beta = 100$  mg/mL; **B:** POx-5-MPDVS  $\beta = 200$  mg/mL; **C:** POx-13-MPDVS,  $\beta = 150$  mg/mL; **D:** PEGDA<sub>3500</sub>,  $\beta = 100$  mg/mL.

Bei der Betrachtung der beiden Hydrogelsysteme aus dem dreiarmligen Vernetzer **POx-5-MPDVS** (55 EtOx-Einheiten) (**A**, **B**) ließen sich gleichmäßige poröse Strukturen feststellen, mit Porengrößen zwischen 15 und 40  $\mu\text{m}$ . Die Morphologie der Gele wies dabei große Ähnlichkeiten zu dem Hydrogel auf, welches mit **PEGDA<sub>3500</sub>** vernetzt worden war (**D**). Die Aufnahmen des Hydrogels, welches mit dem bifunktionellen Vernetzer **POx-13-MPDVS** (53 EtOx-Einheiten) (**C**) hergestellt wurde, zeigten eine ähnlich homogen poröse Struktur wie die anderen Gele. Die Poren in der Aufnahme **C** schienen, im Vergleich zu den anderen Gelen, teilweise kollabiert und zusammengebrochen zu sein. Dies war vermutlich auf die beim Gefriertrocknen auftretenden spannungsbedingten Kräfte zurückzuführen. Die Morphologie der drei verschiedenen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme wies somit, unabhängig von der Gelkonzentration oder Art des Vernetzers, eine gleichmäßige poröse Struktur auf, welche in guter Übereinstimmung mit verschiedenen Systemen in der Literatur steht.<sup>[186,187]</sup>

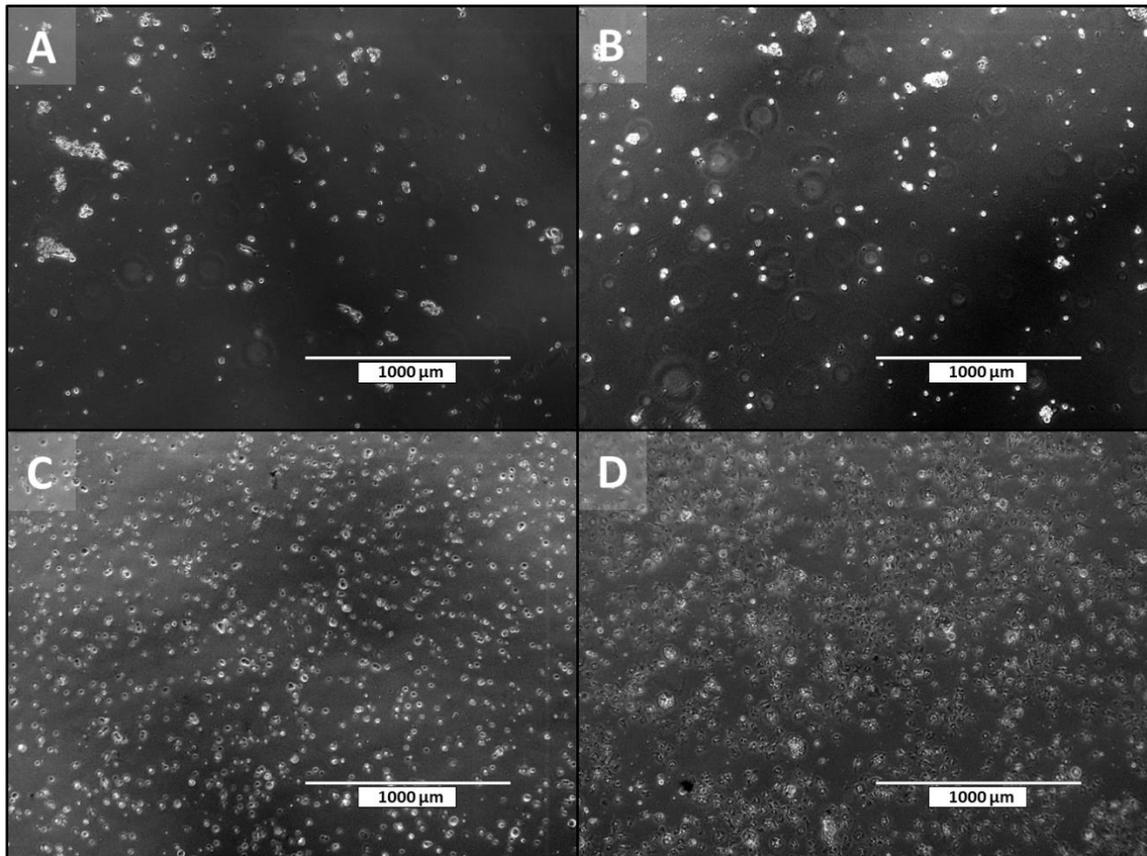
## 4.8. Einsatz in Zellexperimenten

Die Untersuchung der neuen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme in Zellexperimenten sollte die allgemeine Eignung dieser für biomedizinische Anwendungen verifizieren. Die Präparation der Gele erfolgte analog zu dem in Abschnitt 3.4 (Seite 49 ff.) beschriebenen Prozess zur Herstellung von 2D- und 3D-Hydrogelen. Zur Untersuchung des Einflusses der Geleigenschaften wurden erneut COS-7-Zellen verwendet.

### 4.8.1. Untersuchung in 2D-Experimenten

Zunächst sollte das Verhalten der Zellen gegenüber den Hydrogelen in einigen 2D-Zellexperimenten untersucht werden. Dafür wurden die Hydrogele zunächst analog zu den vorhergegangenen Zellexperimenten (Abschnitt 3.4, Seite 49) präpariert. Kurz zusammengefasst wurden jeweils 200  $\mu$ L der Hydrogel-Lösungen in die Vertiefungen von  $\mu$ -Dishes (35 mm) der Firma Ibidi überführt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Milliliter einer Zellsuspension (100.000 bis 120.000 Zellen pro mL) auf die Gele aufgetragen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit unter Kulturbedingungen (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde dem Dish ein zusätzlicher Milliliter Kultur-Medium hinzugefügt und vor der weiteren Untersuchung für weitere 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert.

Zunächst wurden eine Reihe Hydrogele betrachtet, welche durch Vernetzung des thiolhaltigen Präpolymers **P<sub>SH1</sub>** mit **PO<sub>x</sub>-5-MPDVS** (trifunktionell, 55 EtOx-Einheiten, MPDVS-Endgruppe) hergestellt worden sind. Um drei unterschiedliche Festigkeiten zu realisieren, wurden Gele mit einer Konzentration von 100, 150 und 200 mg/mL hergestellt. Zum Vergleich wurde zusätzlich ein PEGDA-vernetztes Hydrogel mit kationischer Funktionalisierung hergestellt, welches in vorhergegangenen Experimenten bereits Zelladhäsion aufgewiesen hat. Exemplarische Aufnahmen der Gele wurden in der Abbildung 79 dargestellt.

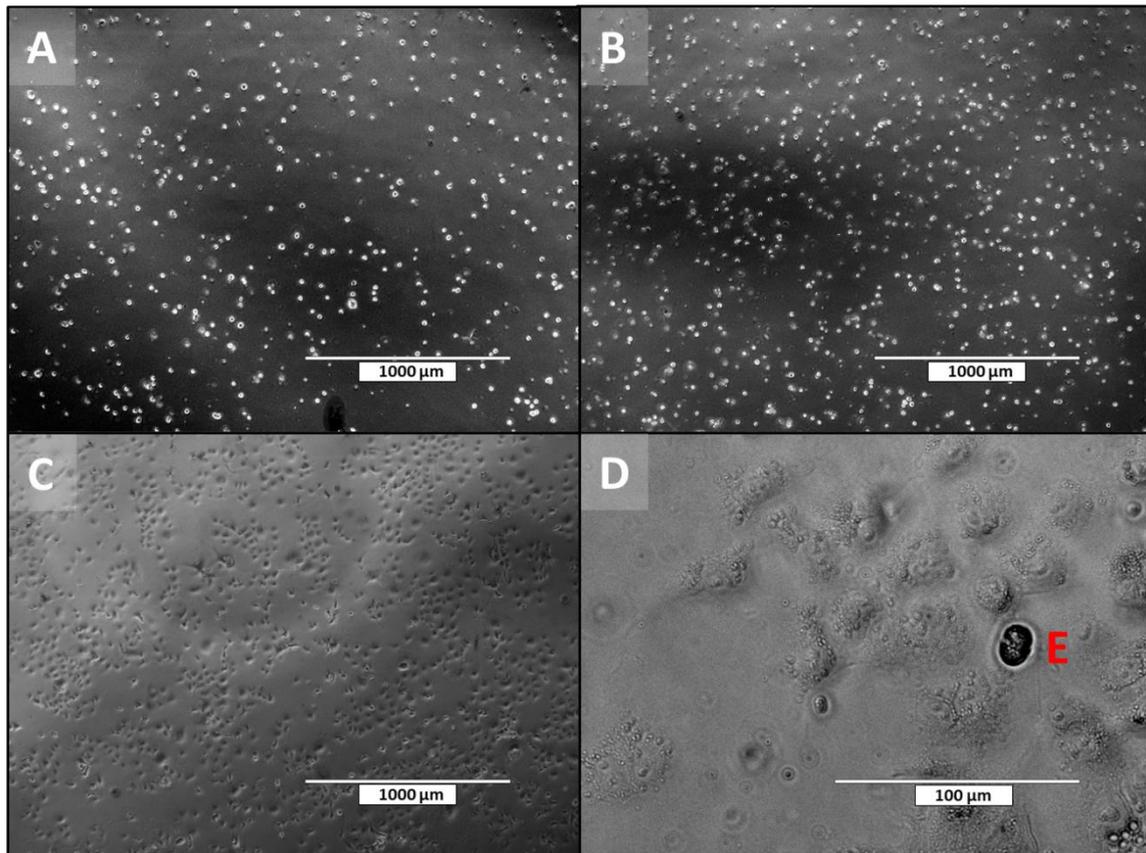


**Abbildung 79:** Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf verschiedenen Hydrogelen 24 Stunden nach Aufbringen der Zellen; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Gele: **A:** POx-5,  $E = 1,7$  kPa; **B:** POx-5,  $E = 5,2$  kPa; **C:** POx-5,  $E = 9$  kPa; **D:** PEGDA<sub>3500</sub>,  $E = 14,7$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ .

Die Auswertung der Aufnahmen der beiden Oxazolin-vernetzten Hydrogele mit geringer Gelkonzentration (**A**, **B**) zeigte, dass die Zellen keine signifikante Adhäsion an die Geloberfläche aufwiesen. Die Zellen schwammen zum Großteil im Zellmedium über den Gelen und aggregieren zum Teil miteinander. Diese Beobachtung deckte sich mit den vorhergegangenen Untersuchungen mit den PEGDA-vernetzten Hydrogelen und der Literatur, welche gezeigt haben, dass COS-7-Zellen erst ab einer gewissen Steifigkeit (13 - 15 kPa) an die Geloberflächen adhärten.<sup>[131]</sup> Die E-Module der beiden niedriger konzentrierten Gele (**A**, **B**) lagen mit Steifigkeiten von 1,7 kPa und 5,2 kPa deutlich unter diesen Werten, sodass eine Adhäsion nicht stattgefunden hat. Auf der Aufnahme des Gels mit der höchsten Konzentration ( $\beta = 200$  mg/mL) (**C**) war zu erkennen, dass sich eine signifikante Anzahl der Zellen auf der Oberfläche des Gels abgesetzt hatte. Die Morphologie der Zelle wies dabei jedoch eine sehr kleine und runde Form auf, welche auf eine sehr schwache Adhäsion der Zellen hingewiesen hat. Der Vergleich der Zellmorphologie auf Gel **C** mit den Zellen auf dem kationischen PEGDA-Gel (**D**) hat gezeigt, dass die COS-7-Zellen bei erhöhter Adhäsion eine verflachte und gestreckte Morphologie aufwiesen, was sich auch mit der Literatur deckte.<sup>[131]</sup> Die Verflachung der Zellen führte bei **D** zusätzlich zu einer Erhöhung

des Kontrasts der Aufnahme, da sich die Zellen besser in einer Ebene fokussieren ließen (erkennbar an weniger „hellen“ Stellen in den Aufnahmen). Die geringere Adhäsion der Zellen auf C war erneut auf die geringe Steifigkeit des Hydrogels zurückzuführen, dennoch war sie an dieser Stelle unerwartet, da die COS-7-Zellen in vorhergegangenen Experimenten auf PEGDA-Gelen keinerlei Adhäsion aufgewiesen haben. Eine mögliche Erklärung könnten die chemischen und strukturellen Unterschiede der Vernetzermere gewesen sein. PEG ist dafür bekannt, dass es aufgrund seiner Struktur mit einer Hydrathülle umgeben ist, wodurch es zu einer Passivierung der Polymeroberfläche kommt.<sup>[188]</sup> Durch diese Passivierung konnten die Zellen bei den weniger steifen Gelen nicht an diese adhären. Selbst bei den steiferen PEGDA-Gelen war es, ohne die Anwesenheit von kationischer Ladung an der Geloberfläche, nicht möglich eine Adhäsion der COS-7-Zellen zu erreichen. Auch wenn PEtOx ähnliche „Stealth-Eigenschaften“ wie PEG aufweisen soll, so könnte dieser Effekt weniger stark ausgeprägt sein, wodurch die Geloberfläche der Oxazolin-vernetzten Hydrogele weniger stark passiviert war.<sup>[150]</sup> Dadurch könnte es den Zellen möglich gewesen sein auf den vergleichsweise weichen Geloberflächen zumindest teilweise zu adhären, auch ohne die Anwesenheit von kationischer Ladungen.

Um zu überprüfen, ob die Adhäsion der COS-7-Zellen an die Geloberflächen durch das Einbringen von kationischer Ladung in die Gele erhöht werden kann, wurden eine weitere Reihe an Oxazolin-vernetzten Gelen hergestellt, welche eine ähnliche Steifigkeit aufgewiesen haben, wie die zuvor untersuchten ungeladenen Oxazolin-Hydrogele (Abbildung 80). Bei der Betrachtung der Aufnahmen war zu erkennen, dass sogar auf dem Hydrogel mit der geringsten Steifigkeit (A,  $E = 1,7$  kPa) zumindest eine teilweise Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden konnte. Die eingesetzte Kationkonzentration im Gel ( $c_{\text{kat}} = 45 \mu\text{mol/mL}$ ) entsprach dabei der Konzentration, welche in den vorhergegangenen Experimenten mit den PEGDA-Hydrogelen mindestens notwendig war, um eine Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche zu ermöglichen. Anhand der Morphologie der Zellen auf Gel A war zu erkennen, dass diese teilweise nur sehr schwach an der Geloberfläche adhären waren. Zwar konnten keine größeren Mengen an aggregierten Zellen im Nährmedium über den Gelen festgestellt werden, jedoch waren die Zellen auf den Gelen immer noch sehr klein und rund, was in der Aufnahme durch den geringen Kontrast der Zellen erkennbar war.



**Abbildung 80:** Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf verschiedenen Oxazolin-vernetzten Hydrogelen 24 h nach aufbringen der Zellen; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Gele: **A:** POx-5,  $E = 1,8$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 45$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **B:** POx-5,  $E = 5,3$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **C:** POx-5,  $E = 9,6$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **D:** vergrößerte Aufnahme von Gel **C**; **E:** einzelne, nicht-adhärente COS-7-Zelle.

Bei Betrachtung der Aufnahme des Hydrogels mit mittlerer Steifigkeit (**B**,  $E = 5,3$  kPa) konnte im Vergleich zum Gel **A** einer etwas höhere Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden, was an der leicht verflachten Morphologie und dem besseren Kontrast der Zellen erkennbar war. Zusätzlich konnten keine signifikanten Mengen an zellulären Aggregaten im Nährmedium über den Gelen festgestellt werden, was die Vermutung bezüglich der zusätzlich erhöhten Adhäsion bestätigte. Auf den Aufnahmen des Gels mit dem höchsten E-Modul (**C**,  $E = 9,6$  kPa) konnte eine nahezu vollständige Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche festgestellt werden. Die Morphologie der Zellen wies dabei eine deutlich verflachte und gestreckte Form auf und der Kontrast der Zellen war deutlich erhöht. Zur Bestätigung der morphologischen Veränderung der COS-7-Zellen, wurde eine zusätzliche Aufnahme mit einer erhöhten Vergrößerung aufgeführt (**D**). Auf dieser war deutlich die veränderte Morphologie der Zellen zu erkennen, was die Adhäsion der Zellen bestätigte. Zum besseren Vergleich wurde eine nur zum Teil adhärenzte Zelle (**E**) markiert, welche die morphologischen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Graden der Adhäsion verdeutlichte. Der Vergleich der Aufnahmen von Gel **C** mit den

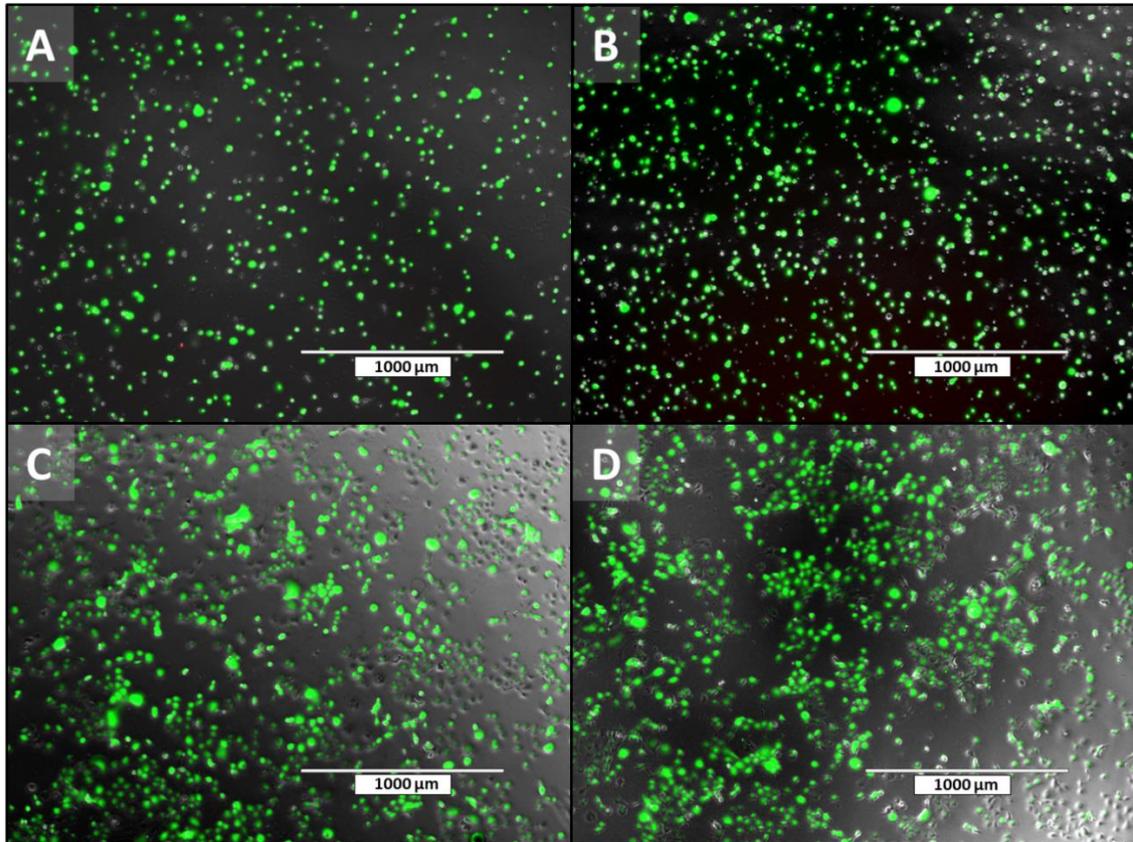
Aufnahmen eines PEGDA-Gels mit vergleichbarem E-Modul und Kationikkonzentration (Abbildung 40, Seite 58, Aufnahme **A**) hat erneut gezeigt, dass die COS-7-Zellen auf dem Oxazolin-vernetzten Hydrogel bereits eine signifikante Adhäsion aufwiesen, wohingegen die Zellen auf den PEGDA-Gelen erst ab einer deutlich höheren Gelsteifigkeit adhärirt waren. Dies schien die zuvor aufgestellte Hypothese der im Vergleich zu den Oxazolin-Systemen erhöhten Passivität der PEGDA-Gele noch einmal zu bestärken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies jedoch nicht vollständig geklärt werden und sollte daher Inhalt zukünftiger Arbeiten sein.

### **4.8.2. Validierung der Biokompatibilität**

In den vorhergegangenen Experimenten zur Untersuchung des Zellverhalten in 2D schienen die verwendeten Hydrogelsysteme zunächst keinen signifikant negativen Effekt auf die Zellen auszuüben, was auf eine gute Biokompatibilität der Systeme vermuten ließ. Um dies zu verifizieren, wurden die vorhergegangenen 2D-Experimente an einigen exemplarischen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsystemen wiederholt und die Viabilität der Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit mithilfe einer Live-Dead-Färbung untersucht. Die Durchführung erfolgte dabei analog zu den in Abschnitt 3.4.1 (Seite 53 ff.) durchgeführten Experimenten an den PEGDA-Systemen. Kurz zusammengefasst wurde das Nährmedium über den Zellen aspiriert und diese dann mit einer Calcein-AM/EthD-III-Färbelösung überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Farbelösung durch einen PBS-Puffer ersetzt und die Zellen anschließend unter dem Mikroskop bei verschiedenen Wellenlängen untersucht.

Die Betrachtung der Aufnahmen der verschiedenen 2D-Zellexperimente zeigte eine hohe Biokompatibilität der eingesetzten Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme (Abbildung 81). Auf allen vier untersuchten Gel-Systemen (**A - D**) konnte eine hohe Anzahl lebendiger (**grüner**) Zellen festgestellt werden. Vereinzelt ließen sich auch tote Zellen (**rot**) oder Fragmente dieser feststellen, jedoch handelte es sich dabei nur um eine nicht signifikante Anzahl. Da das Nährmedium vor dem Auftragen der Färbelösung aspiriert werden musste, war davon auszugehen, dass ein Großteil der nicht an das Hydrogel adhärirten Zellen, zusammen mit dem Nährmedium entfernt worden war. Dadurch war es nicht möglich, einen quantitativen Vergleich zwischen der Anzahl an lebenden und toten Zellen zu treffen. Der Vergleich mit den vorhergegangenen Aufnahmen der Gele, bei welchen das Nährmedium nicht aspiriert wurde, wies eine ähnliche hohe Zelldichte auf und zeigte nur

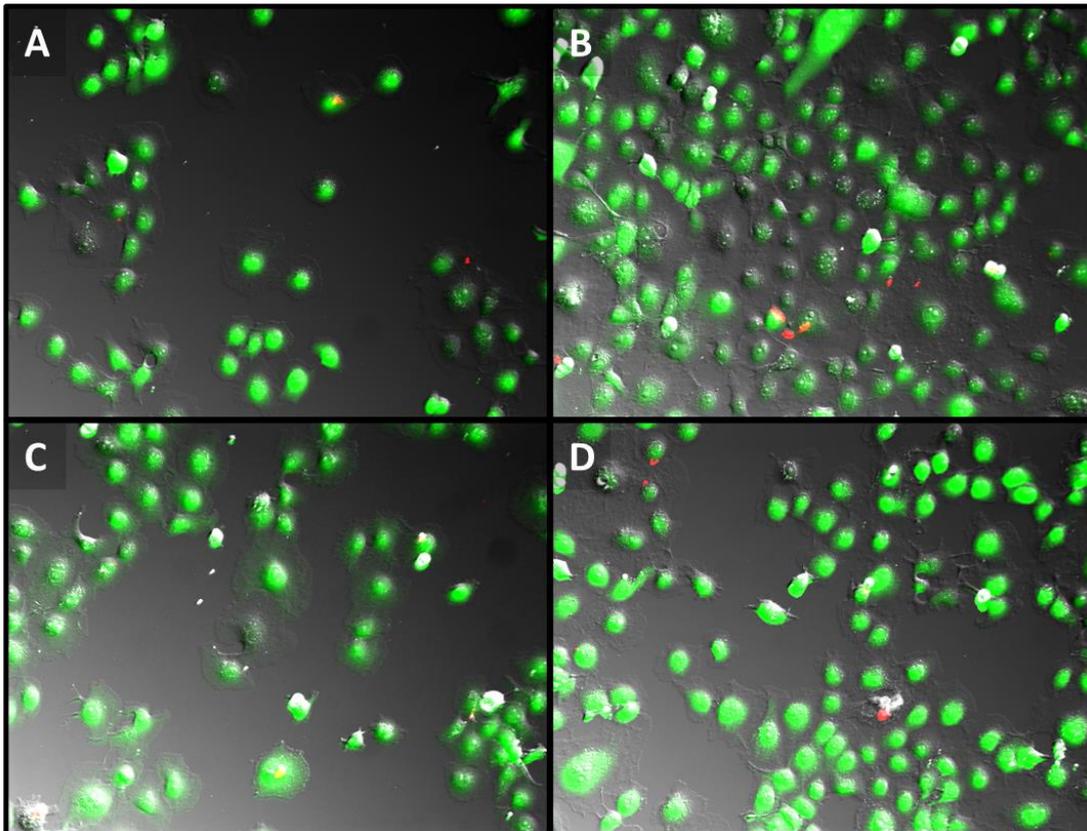
vereinzelt Aggregate von nicht adhärerten Zellen im Medium. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die grundlegende Biokompatibilität der untersuchten Systeme sehr hoch war.



**Abbildung 81:** Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf Oxazolin-vernetzten Hydrogelen nach der Anfärbung mit einem Life-Dead-Kit. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM (**grün**) und tote Zellen mit EthD-III (**rot**) angefärbt; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Hydrogele: **A:** POx-5,  $E = 9$  kPa;  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **B:** POx-5,  $E = 1,8$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 45$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **C:** POx-5,  $E = 5,3$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **D:** POx-5,  $E = 9,9$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ .

Da die verwendeten Systeme beim Einsatz in Zellexperimenten einen hydrolytischen Abbau erfahren, galt es, neben der Biokompatibilität der vernetzten Hydrogele, auch die Toxizität der Abbauprodukte zu untersuchen. Dafür wurde ein exemplarisches Hydrogelsystem aus **P<sub>SH1</sub>** und **POx-13-MPDVS** hergestellt und durch das Inkubieren in einer Natronlauge mit einem pH-Wert von 10 über drei Tage hydrolytisch abgebaut. Die entstandenen Polymerlösungen wurden im Anschluss gefriergetrocknet, wodurch ein weißes Pulver aus abgebautem Hydrogel erhalten wurde. Dieses Pulver wurde dann in Nährmedium gelöst, um ein Hydrogel-Medium zu erhalten. Nach dem Lösen musste der pH-Wert des Hydrogel-Mediums dabei aufgrund von NaOH-Rückständen auf 7,4 nachjustiert werden. Um die Biokompatibilität des Hydrogelpulvers zu untersuchen, wurden zunächst COS-7-Zellen auf einer Zellkulturplatte aus Polystyrol kultiviert, bis die Platten eine Zell-Konfluenz von mindestens 50% aufgewiesen haben. Im Anschluss wurde

das Nährmedium in den Platten aspiriert und mit einem Milliliter eines Hydrogel-Mediums ersetzt. Für die Experimente wurden insgesamt drei unterschiedliche Hydrogel-Medien mit einer Gelkonzentration von 10, 20 und 40 mg/mL hergestellt. Nach der Zugabe des Hydrogel-Mediums wurden die Zellen für weitere 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert und im Anschluss mithilfe einer Live-Dead-Färbungen auf ihre Viabilität hin untersucht (Abbildung 82).

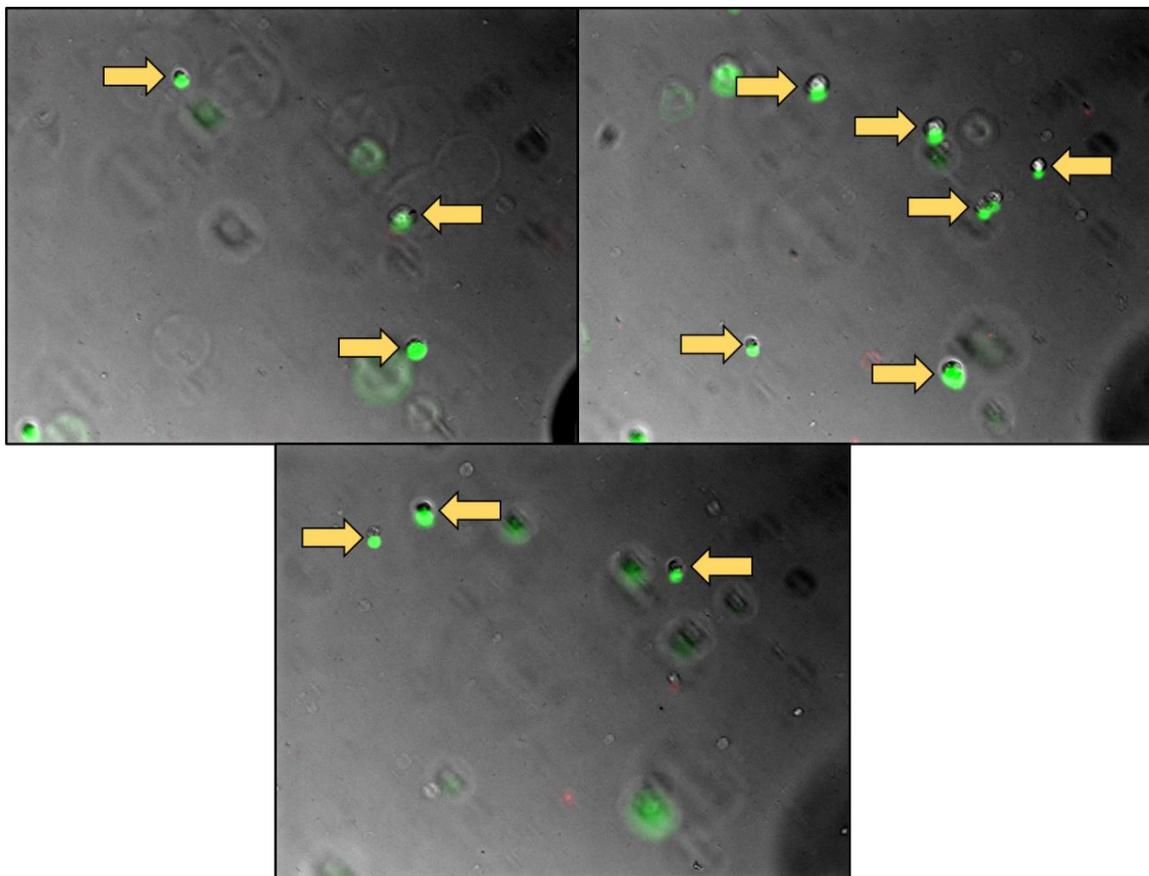


**Abbildung 82** Ausgewählte Aufnahmen der Viabilitätstests in Gegenwart der Hydrogel-Medien mit unterschiedlicher Konzentration; Konzentration der Hydrogel-Medien: **A:** 10 mg/mL; **B:** 20 mg/mL; **C:** 40 mg/mL; **D:** 0 mg/mL, reines Kultur-Medium wurde verwendet.

Die Aufnahmen der Zellen zeigten, dass die Anwesenheit der abgebauten Hydrogelrückstände zu keiner signifikanten Veränderungen der Zellzahl oder Morphologie geführt hat, wodurch ein starker toxischer Einfluss der Abbauprodukte ausgeschlossen werden konnte. Die Auswertung war an dieser Stelle jedoch rein qualitativ, da die Aufnahmen nur von einigen wenigen repräsentativen Stellen auf den Kulturplatten gemacht wurden und keine ausgiebigen Viabilitäts-Assays durchgeführt wurden. Sollten in weiterführenden Untersuchungen Zweifel an der Biokompatibilität der Systeme auftreten, wäre eine Durchführung solcher quantitativen Viabilitäts-Experimente empfehlenswert.

### 4.8.3. Untersuchung in 3D-Experimenten

Nachdem die neuen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme bereits in 2D-Experimenten genauer untersucht wurden, sollte an dieser Stelle auch die Eignung für einen Einsatz in 3D-Verkapselungs-Experimenten evaluiert werden. Dafür wurden COS-7-Zellen analog zu der Durchführung in Abschnitt 3.4 (Seite 49ff.) in einem Hydrogel aus **P<sub>SH1</sub>**, **P<sub>SH4</sub>** und **POx-6-MPDVS** ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $E = 3,7 \text{ kPa}$ ,  $c_{\text{kat}} = 45 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ) eingeschlossen und für 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert. Um den gleichmäßigen Einschluss und die Viabilität der Zellen zu überprüfen, wurden die Zellen im Anschluss mithilfe einer Live-Dead-Färbung angefärbt und mikroskopisch untersucht (Abbildung 83).



**Abbildung 83:** Zoom durch verschiedene Ebenen eines 3D-Hydrogels, welches mit **POx-6-MPDVS** vernetzt worden ist und folgende Eigenschaften besitzt:  $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ,  $E = 3,7 \text{ kPa}$ ,  $c_{\text{kat}} = 45 \text{ } \mu\text{mol/mL}$ ; Zellen wurden mit Live-Dead-Färbung **grün** (lebendig) und **rot** (tot) angefärbt; Pfeile weisen auf Zellen hin, welche sich in der jeweiligen Ebene im Fokus befinden.

Die in Abbildung 83 aufgeführten Aufnahmen zeigen die identische Position eines 3D-Hydrogels, in welcher durch die verschiedenen Ebenen fokussiert worden ist. Dabei sind stetig neue Zellen in den Fokus getreten (gelbe Pfeile), was gezeigt hat, dass die Zellen gleichmäßig in allen drei Dimensionen des Gels verteilt waren. Anhand der grün-Färbung der Zellen in den Aufnahmen konnte festgestellt werden, dass der Großteil 24 Stunden nach

Einschluss in das Hydrogel lebendig waren. Gleichzeitig konnte nur eine geringe Anzahl an toten Zellen (rot) oder deren Fragmente festgestellt werden, was dafür spricht, dass die Art der Präparation und die Hydrogele selbst keinen signifikant negativen Einfluss auf die Viabilität der Zellen ausgeübt haben. Bezüglich der Morphologie wiesen die COS-7-Zellen eine kugelartige Form auf. Der Vergleich mit der Literatur hat gezeigt, dass COS-7-Zellen bei einer 3D-Verkapselung keine strukturellen Besonderheiten ausbilden, sondern in dieser kugelförmigen Morphologie vorliegen.<sup>[125,189,190]</sup>

#### 4.8.4. Einfluss des Abbauverhaltens auf die Zellen

Nachdem die Eignung der Oxazolin-vernetzten Hydrogele für den Einsatz in 24-Stunden-Zellexperimenten bestätigt werden konnte, galt es dies auch für längere Inkubationszeiten zu überprüfen. Dafür sollten Hydrogele aus zwei verschiedenen Oxazolin-basierten Vernetzern hergestellt und über einen Versuchszeitraum von sieben Tagen untersucht werden. Neben der Betrachtung der Zellmorphologie sollte auch die Viabilität der Zellen qualitativ mithilfe einer Live-Dead-Färbung überprüft werden.

Als Vernetzer wurden dabei das **POx-13-MPDVS** (bifunktionell, 52 EtOx-Einheiten) und **POx-5-MPDVS** (trifunktionell, 55 EtOx-Einheiten) verwendet. Das **POx-13-MPDVS** wurde aufgrund seiner sehr hohen Abbaugeschwindigkeit (bei  $\beta = 150 \text{ mg/mL}$ ,  $E_0/d^{30} = 7,7\%$ ) ausgewählt, wohingegen das **POx-5-MPDVS** als eine langsamer abbauende (bei  $\beta = 150 \text{ mg/mL}$ ,  $E_0/d^{30} = 2,7\%$ ) Alternative dienen sollte. Um die Wechselwirkungen der COS-7-Zellen mit der Gelmatrix zu erhöhen, wurden verschiedene Gele hergestellt, welche zum Teil mit kationischer Ladung und dem biomimetischen RGD-Peptid funktionalisiert worden sind. Zur Herstellung der Hydrogele wurden die thiolhaltigen Präpolymere **P<sub>SH</sub>1**, **P<sub>SH</sub>4** und **P<sub>SH</sub>RGD** verwendet. Das **P<sub>SH</sub>RGD** basiert auf einem System, welches zuvor von BOLDUAN beschrieben wurde.<sup>[80]</sup> Die Synthese sowie analytische Daten des Polymers sind in Abschnitt 6.4.1 (Seite 155 ff.) aufgeführt.

Um Hydrogele zu erhalten, welche auch nach dem Ablauf der maximalen Inkubationszeit von sieben Tagen noch eine ausreichend hohe Steifigkeit aufweisen, um der mechanischen Belastung der Live-Dead-Färbung stand zu halten, wurden Gele mit einer Konzentration von 150 mg/mL hergestellt. Die Daten der verwendeten Hydrogele wurden in der Tabelle 21 zusammengefasst.

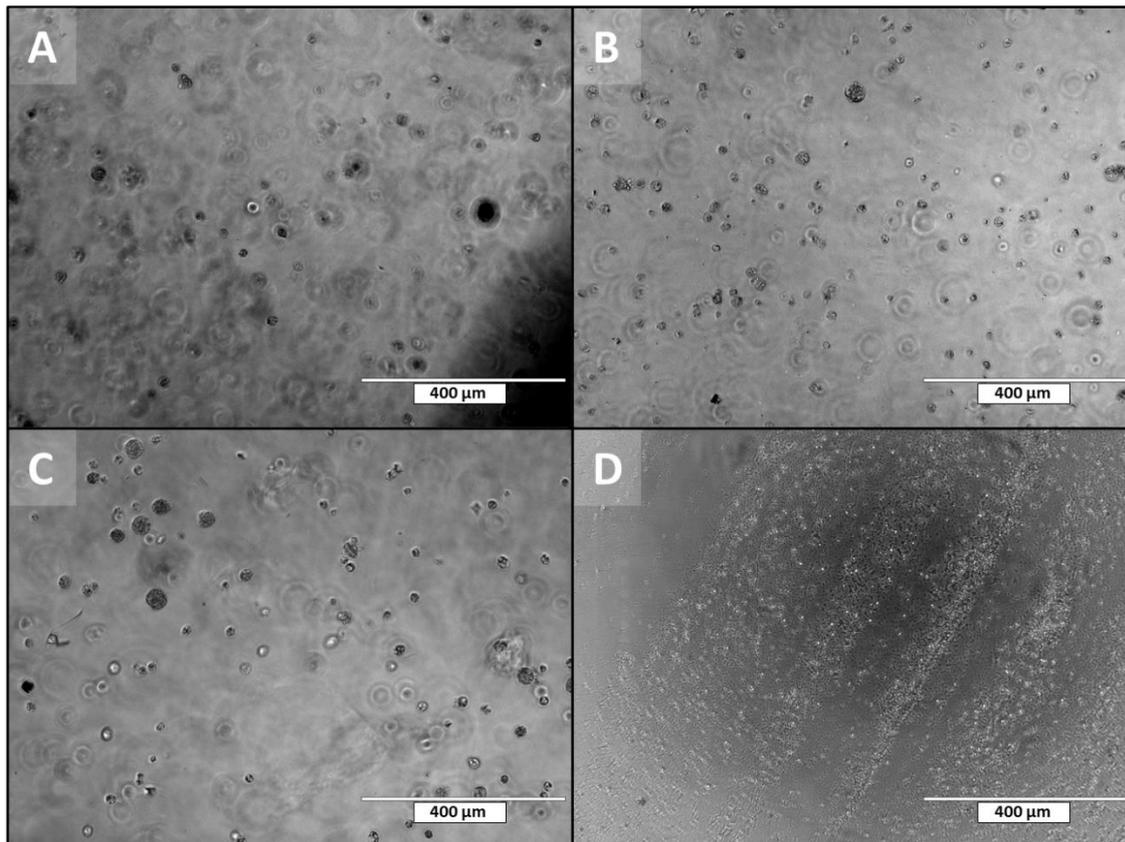
**Tabelle 21:** Übersicht über die Daten der Hydrogele für die 7-Tage-Zellexperimente.

| Vernetzer                 | $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}}^{\text{a}}$ [ $\mu\text{mol/mL}$ ] | $E^{\text{b}}$ [kPa] | $Q^{\text{c}}$    |
|---------------------------|---|----------------------|-------------------|
| PO <sub>x</sub> -5-MPDVS  | 0 0   | $5,2 \pm 0,2$        | $8,5 \pm 0,2$     |
|                           | 45 0  | $5,3 \pm 0,4$        | $8,8 \pm 0,3$     |
|                           | 45 10   | 3,9 <sup>d</sup>     | 8,1 <sup>d</sup>  |
| PO <sub>x</sub> -13-MPDVS | 0 0   | $3,1 \pm 0,3$        | $11,1 \pm 0,5$    |
|                           | 45 0  | $3,5 \pm 0,1$        | $10,6 \pm 0,3$    |
|                           | 45 10   | 2,8 <sup>d</sup>     | 11,8 <sup>d</sup> |

**a:** Kationikkonzentration ( $c_{\text{kat}}$ ) und Peptidkonzentration ( $c_{\text{pep}}$ ) der Hydrogele ermittelt aus dem Volumen der Gele und der eingesetzten Menge an funktionalisierten Polymeren; **b:** ermittelt in rheologischen Oszillationsexperimenten bei 1% Normalkraft, 1% Deformation und 1 Hz; **c:** ermittelt nach Quellung in 0,01 MPBS-Puffer mit pH = 7 für 24 h bei rt; **d:** Messung wurden aufgrund der geringen vorhandenen Menge des **P<sub>SH</sub>RGD** nur einmal exemplarisch für ein Gel durchgeführt.

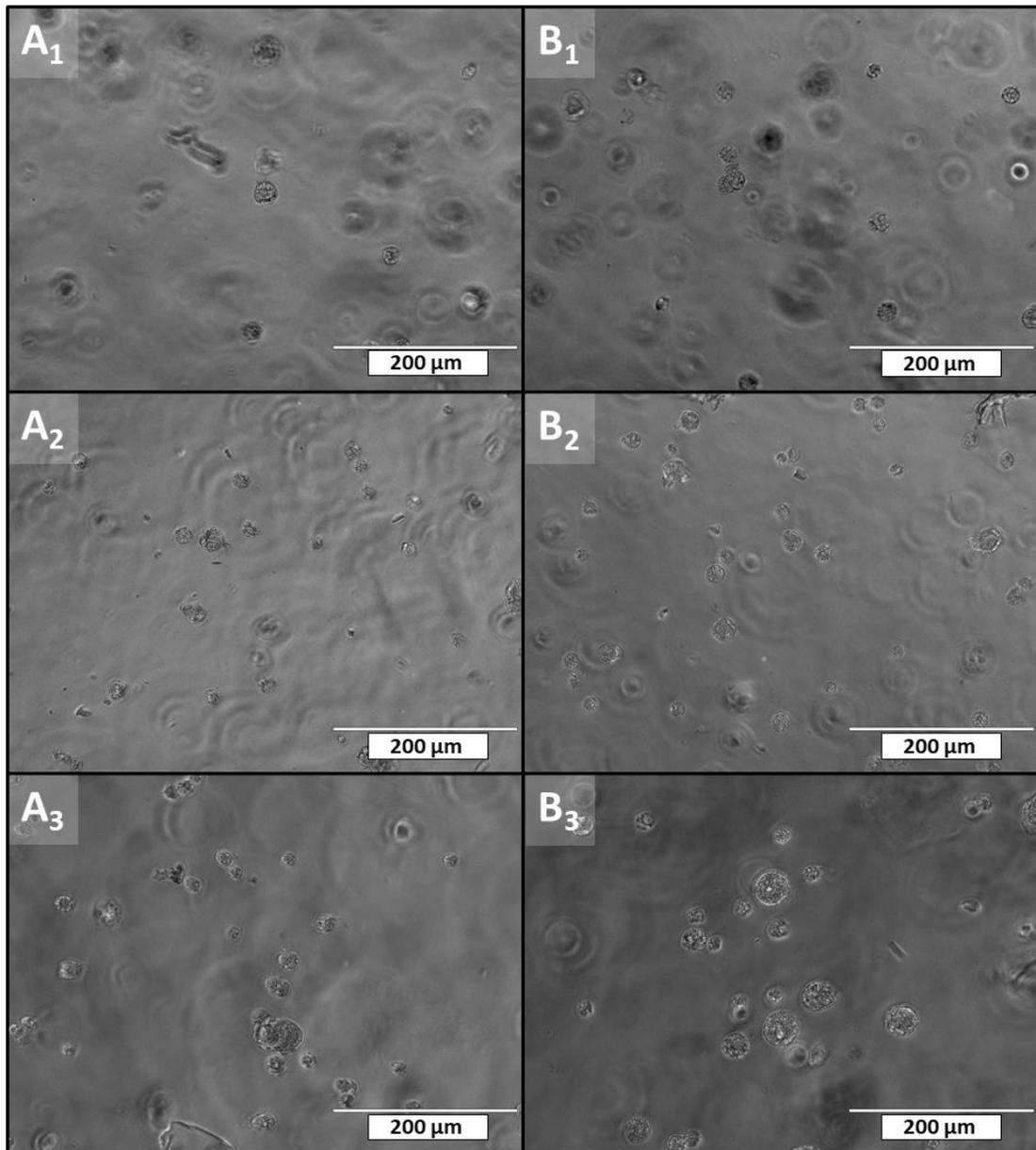
Für die Untersuchung des Einflusses der Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele in den 7-Tage-Experimenten wurden die Gele analog zu der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methodik präpariert. Da die COS-7-Zellen nach der Anwendung der Live-Dead-Färbung nur bedingt weiter inkubiert werden können, wurden für jeden Messzeitpunkt (1, 3 und 7 Tage) jeweils ein Gel hergestellt. Um einen ersten Eindruck über die erfolgreiche Präparation der Gele zu erhalten, wurden nach den ersten 24 Stunden Inkubationszeit Aufnahmen der Zellen gemacht, bevor diese mit der Live-Dead-Färbung behandelt worden sind. Im Nachfolgenden wurden exemplarisch die Aufnahmen der Hydrogele, welche mit **PO<sub>x</sub>-5-MPDVS** vernetzt wurden, dargestellt (Abbildung 84). Als negativer Vergleich wurde ein zusätzliches Hydrogel vor der Betrachtung unter dem Mikroskop für fünf Minuten mit 90%iger-Ethanol-Lösung versetzt, um die Zellen in dem Gel zu töten.

Die Betrachtung der Aufnahmen hat gezeigt, dass in allen drei **PO<sub>x</sub>-5-MPDVS** Hydrogelen (**A**, **B**, **C**) die Zellen gleichmäßig in allen drei Dimensionen der Gele verteilt waren. Es konnten keine unregelmäßigen Zelleinschlüsse oder anderweitige Unregelmäßigkeiten festgestellt werden. Die Morphologie der Zellen wies eine gleichmäßige runde Form auf und es konnten keine signifikanten Zellaggregate festgestellt werden. Auf den Aufnahmen des mit Ethanol behandelten Gels (**D**) ließen sich hingegen nur noch tote Zellen oder deren Fragmente erfassen. Zwischen den verschiedenen nicht behandelten Gelen (**A**, **B**, **C**) konnten trotz der unterschiedlichen Geleigenschaften bezüglich Konzentration an kationischen Funktionalitäten und Peptiden, keine signifikanten Unterschiede in der Zellmorphologie festgestellt werden. Dabei wäre es denkbar gewesen, dass die Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit noch zu eng von der Gelmatrix umschlossen waren und dadurch nicht genug Bewegungsfreiheit aufgewiesen haben, um mögliche besondere Strukturen auszubilden.



**Abbildung 84:** Exemplarische Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus **POX-5-MPVDS** nach 24 Stunden Inkubationszeit; Funktionalisierung der Gele: **A:**  $C_{kat|C_{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $C_{kat|C_{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $C_{kat|C_{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ ; **D:** Hydrogel wurde vor der Aufnahme für fünf Minuten mit einer 90%igen-Ethanol-Lösung behandelt.

Zur Beurteilung der Zellviabilität wurden die Gele nach einer ersten Untersuchung mit einer Live-Dead-Färbung behandelt. Um eine möglichst vollständige Färbung der Zellen zu ermöglichen, wurde die Inkubationszeit der Färbelösung von 45 Minuten auf eine Stunde erhöht. Die anschließende Untersuchung der Zellen ließ jedoch erkennen, dass die Färbung nicht erfolgreich abgelaufen ist, da es nicht möglich war lebende und tote Zellen in den Aufnahmen eindeutig zu unterscheiden. Auch bei einer erneuten Wiederholung der Experimente konnte die Färbung nicht erfolgreich durchgeführt werden, was die Vermutung aufgebracht hat, dass die verwendeten Färbereagenzien kontaminiert waren oder aus anderen Gründen nicht mehr funktionsfähig waren. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten und mangelnder Zeit, erfolgte die weitere Auswertung der Zellexperimente daher ohne Live-Dead-Färbung.



**Abbildung 85:** Exemplarische Aufnahmen von COS-7-Zellen in 3D-Hydrogelen nach 24 Stunden Inkubationszeit; Vernetzer und Funktionalisierung der Gele: **A1-3:** POx-5-MPDVS, **A1:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **A2:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **A3:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ ; **B1-3:** POx-13-MPDVS, **B1:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B2:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B3:**  $C_{\text{kat}}|C_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .

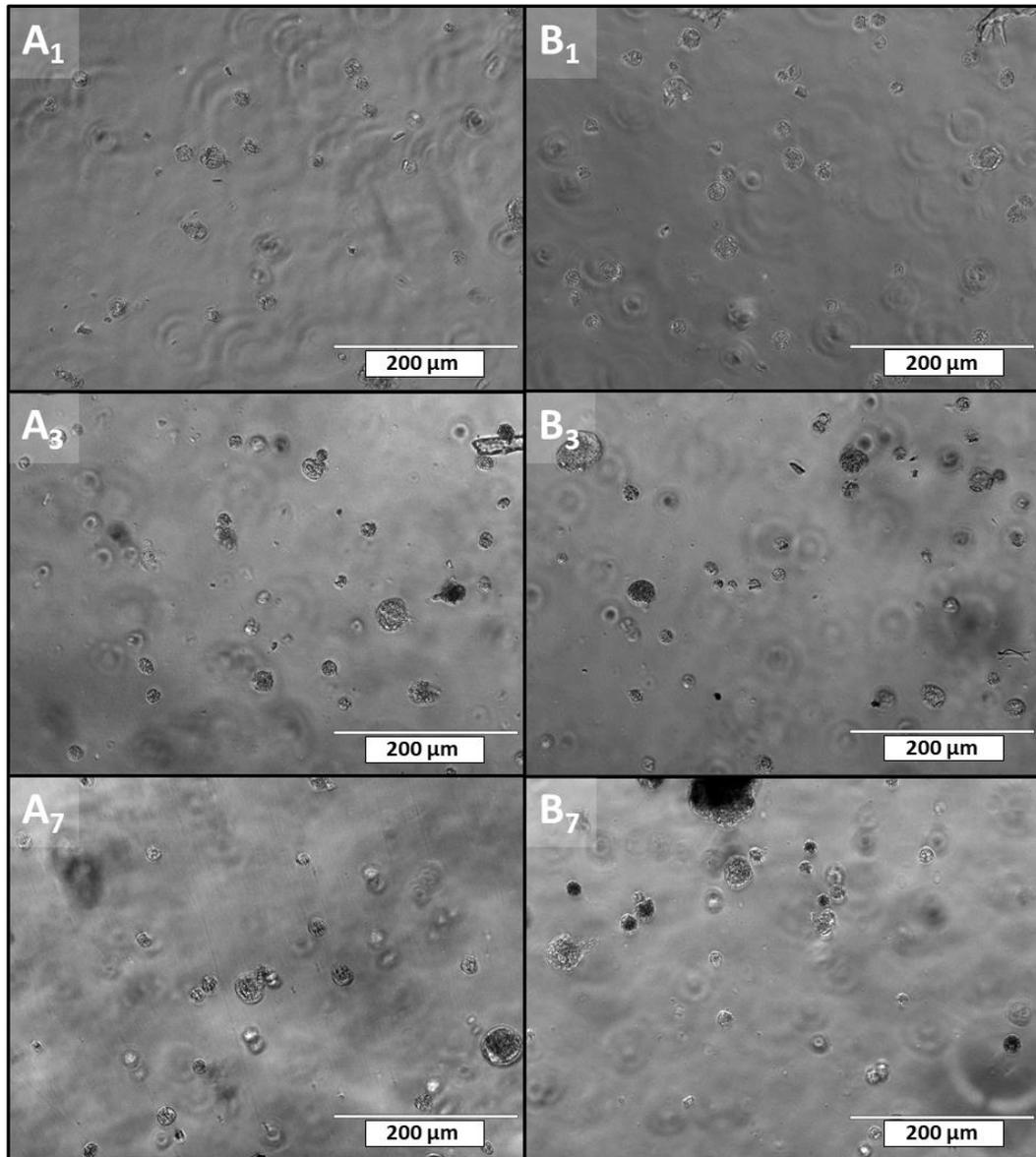
Um mögliche Unterschiede zwischen den Gelen aus den beiden verschiedenen Vernetzern **POx-5-MPDVS** und **POx-13-MPDVS** feststellen zu können, wurden in der Abbildung 85, exemplarische Aufnahmen der Gele nebeneinander aufgeführt. Die Reihe **A1-3** zeigte dabei die Hydrogele, welche mit **POx-5-MPDVS** vernetzt wurden und die Reihe **B1-3** zeigte die Hydrogele aus **POx-13-MPDVS**. Der direkte Vergleich der beiden Hydrogelreihen wies erneut keine signifikanten Unterschiede auf. Dabei war die Morphologie der betrachteten Zellen innerhalb der verschiedenen Gele vergleichbar, unabhängig der Anwesenheit von kationischer Funktionalisierung (**A2|B2**) oder zusätzlichem biomimetischen RGD-Peptid

(**A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>**). Auf den exemplarischen Aufnahmen der Gele mit kationischer Ladung und Peptiden (**A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>**) schien die Größe der Zellen zwar leicht erhöht, jedoch war dies auf die Auswahl der exemplarischen Aufnahmen zurückzuführen und nicht exklusiv für diese Art der Gelfunktionalisierung. Die geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gelreihen konnte an dieser Stelle mit der kurzen Inkubationszeit von 24 Stunden erklärt werden. Trotz der unterschiedlich hohen Abbaugeschwindigkeiten der beiden verschiedenen Vernetzerpolymere sollte der Steifigkeitsunterschied zwischen den beiden Hydrogelsystemen zu diesem Zeitpunkt noch nicht sehr hoch gewesen sein.

Im weiteren Verlauf der Experimente sollten die Hydrogele aus dem Vernetzer **POx-13-MPDVS** aufgrund der sehr hohen Abbaugeschwindigkeit dieser in den vorhergegangenen Experimenten ( $E_0/d^{30} = 7,7\%$ ) im Vergleich zu den Gelen aus **POx-5-MPDVS** ( $E_0/d^{30} = 2,7\%$ ) einen signifikant erhöhten Steifigkeitsverlust erfahren. Um die Unterschiede zwischen den beiden Gelsystemen genauer zu betrachten, wurden in der Abbildung 86 exemplarische Aufnahmen der kationisch funktionalisierten Hydrogele aus **POx-13-MPDVS** (**A<sub>1-7</sub>**) und aus **POx-5-MPDVS** (**B<sub>1-7</sub>**) nach einer Inkubationszeit von 1, 3 und 7 Tagen miteinander verglichen. Dabei ergab der Vergleich der Aufnahmen, dass selbst nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Gelreihen festgestellt werden konnte. Diese Beobachtung deckte sich auch mit den Aufnahmen der Gele mit Peptid und ohne Funktionalisierung (Abschnitt 7.9, Seite 204 ff.). Da die Zellen auch nach 7 Tagen Inkubationszeit immer noch eine Morphologie aufgewiesen haben, welche mit der Morphologie von gesunden Zellen in 3D vergleichbar war, konnte die zuvor bereits beschriebene Biokompatibilität der Systeme erneut bestätigt werden.<sup>[125]</sup>

Die genauere Untersuchung der schnell abbauenden Hydrogele aus **POx-13-MPDVS** nach 7 Tagen Inkubationszeit haben gezeigt, dass sich die COS-7-Zellen, aufgrund des zu diesem Zeitpunkt weit fortgeschrittenen Abbaus, innerhalb der Gele zum Teil bewegen konnten. Unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Abbaugeschwindigkeiten der **POx-13-MPDVS**-Hydrogele, sollten diese nach 7 Tagen Inkubation über 50% ihres ursprünglichen E-Moduls verloren haben, was gleichzeitig zu einer erhöhten Quellung und verringerten Vernetzungsdichte geführt haben sollte. Durch diese Verringerung der Steifigkeit und Vernetzungsdichte war es den Zellen dann möglich, sich auch innerhalb der Hydrogelmatrix zu bewegen. Die Betrachtung der Aufnahmen der langsam abbauenden Hydrogele aus **POx-5-MPDVS** haben gezeigt, dass die Zellen nach 7 Tagen

Inkubationszeit keinerlei Beweglichkeit innerhalb der Gele aufgewiesen haben. Aufgrund der niedrigen Hydrolysegeschwindigkeit der Gele waren sie zu diesem Zeitpunkt noch zu steif und zu eng vernetzt, sodass es den Zellen nicht möglich war, sich innerhalb dieser zu bewegen.



**Abbildung 86:** Exemplarische Aufnahmen von COS-7-Zellen in 3D-Hydrogelen nach 1-7 Tagen Inkubationszeit; Bezeichnung **A/B<sub>x</sub>** entspricht Aufnahmen zum Zeitpunkt  $x$  (mit Werten von  $x = 1/3/7$  Tagen); Vernetzer und Funktionalisierung der Gele: **A<sub>1-7</sub>**: POx-5-MPDVS,  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B<sub>1-7</sub>**: POx-13-MPDVS,  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ .

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Experimente konnte zusammenfassend gesagt werden, dass der Einsatz der neuartigen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme erfolgreich war. Die Biokompatibilität des neuen Hydrogelsystems, sowie deren Abbauprodukte konnten in verschiedenen Untersuchungen für einen Einsatz in 2D- und 3D-Experimenten verifiziert werden. Aufgrund der hohen Flexibilität des Hydrogelsystems hinsichtlich der

mechanischen Eigenschaften, der Funktionalisierungsart sowie des Abbauverhaltens kann dieses als Plattform für zukünftige Forschungen genutzt werden, um präzise biomedizinische Fragestellungen anzugehen.

#### **4.9. Zusammenfassung Oxazolinvernetzer**

Mittels CROP war es möglich, eine Reihe von verschiedenen bi- und trifunktionellen Vernetzern auf der Basis von 2-Ethyl- und 2-Methyl-Oxazolin herzustellen und mithilfe von  $^1\text{H}/\text{DOSY-NMR}$ -Spektroskopie und GPC zu charakterisieren. Dabei konnten eine Reihe von verschiedenen Vernetzern erhalten werden, welche sich bezüglich ihrer Länge, Zusammensetzung sowie ihrer Anzahl und Art der Endgruppen unterschieden. Neben der Verwendung von Acrylsäure-Endgruppen fand vor allem die neu entwickelte MPDVS-Endgruppe Anwendung, welche aufgrund ihrer Struktur für eine effektive Vernetzung und einer erhöhte Hydrolyselabilität der Systeme sorgte.

Um den Einfluss der jeweiligen Vernetzerparameter auf die mechanischen Eigenschaften und das Abbauverhalten der Hydrogele abschätzen zu können, wurden verschiedene Reihen an Hydrogelen hergestellt und deren Eigenschaften miteinander verglichen. Bei der Variation der Länge der Vernetzer hat sich gezeigt, dass die Verwendung von zunehmend länger-kettigen Vernetzern zur Bildung von Hydrogelen mit einem erhöhten E-Modul von bis zu 16,2 kPa geführt hat, was auf eine Zunahme der Vernetzungseffizienz zurückzuführen war. Bezüglich des hydrolytischen Abbaus führte der Einsatz von langkettigen Vernetzern zu einer leichten Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit von bis zu 23%. Der Einsatz von Copolymeren aus MetOx und EtOx hat gezeigt, dass durch das Einbringen von bis zu 45 mol% MetOx die Hydrophilie der Vernetzersysteme deutlich gesteigert werden konnte, ohne dabei die Steifigkeit der Hydrogele maßgeblich zu verändern. Diese erhöhte Hydrophilie hat vor allem bei der Verwendung von hohen Gelkonzentrationen ( $\beta = 200 \text{ mg/mL}$ ) zu einer Zunahme der Abbaugeschwindigkeit der Gele von bis zu 85% geführt. Um die hydrolytische Labilität der Vernetzer weiter zu erhöhen wurden der Einsatz von bifunktionellen Vernetzern untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Verwendung dieser im Vergleich zu trifunktionellen Vernetzern tendenziell zu der Ausbildung von Hydrogelen mit einem verringerten E-Modul führte. Dies war jedoch zum Teil auf die deutlich erhöhte Hydrolyselabilität der Vernetzer zurückzuführen und resultierte in Abbauraten der Hydrogele von bis zu 12,5% des

E-Moduls pro Tag. Um die Flexibilität des Systems zu verdeutlichen, wurden zusätzliche Untersuchungen bezüglich einer Kombination des Oxazolin-Vernetzers mit den zuvor beschriebenen PEGDA<sub>3500</sub>-Systemen angestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich das E-Modul (7,1 - 1,2 kPa) und die Abbaugeschwindigkeit (1,1% - 4% pro Tag) der Hydrogele durch Variation der Verhältnisse der beiden Vernetzersysteme einstellen ließ.

Durch den Einsatz der Oxazolin-vernetzten Hydrogele in 2D- und 3D-Zellexperimenten mit COS-7-Zellen konnte die Biokompatibilität der Hydrogele und deren hydrolytischer Abbauprodukte erfolgreich nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen am Adhäsionsverhalten der COS-7-Zellen haben gezeigt, dass bereits durch den Einsatz geringer Mengen an kationischer Funktionalisierung ( $c_{\text{kat}} = 45 \mu\text{mol/mL}$ ) die Adhäsion der Zellen an die Geloberfläche signifikant erhöht werden konnte. Für eine erfolgreiche Zelladhäsion waren dabei im Vergleich zu den zuvor untersuchten PEGDA-Systemen wesentlich geringere Gelsteifigkeiten von maximal 9,2 kPa notwendig. Bezüglich einer 3D-Zellanwendung war es möglich, die Eignung der Systeme in einer Reihe von Experimenten zu verifizieren. Die verwendeten Oxazolin-Hydrogele erlaubten dabei einen gleichmäßigen Einschluss der Zellen in allen drei Dimensionen der Gele, ohne zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität zu führen. Durch den Einsatz der Hydrogele in 7-Tage Experimenten konnten erste Eindrücke über das Verhalten der COS-7-Zellen in den Gelen bezüglich einer Langzeitkultivierung gewonnen werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblicke

Ziel dieser Arbeit war es, auf Grundlage des von BOLDUAN entwickelten thiolhaltigen Polymersystems Hydrogele herzustellen und deren Eigenschaften bezüglich einer biomedizinischen Anwendungen hin zu optimieren.<sup>[80]</sup> Dabei sollten zwei unterschiedliche Vernetzersysteme evaluiert werden, wobei der Fokus auf der Untersuchung des Vernetzeinflusses auf die späteren Hydrogeleigenschaften lag.

Im ersten Ergebniskapitel dieser Arbeit (Kapitel 3, Seite 17 ff.) wurde die Verwendung des Polyethylenglykol-basierten Vernetzers PEGDA<sub>3500</sub> beschrieben (Abbildung 87). Bei der Untersuchung dieses Systems stand dabei vor allem die Optimierung des Herstellungsprozesses und der Geleigenschaften im Fokus.

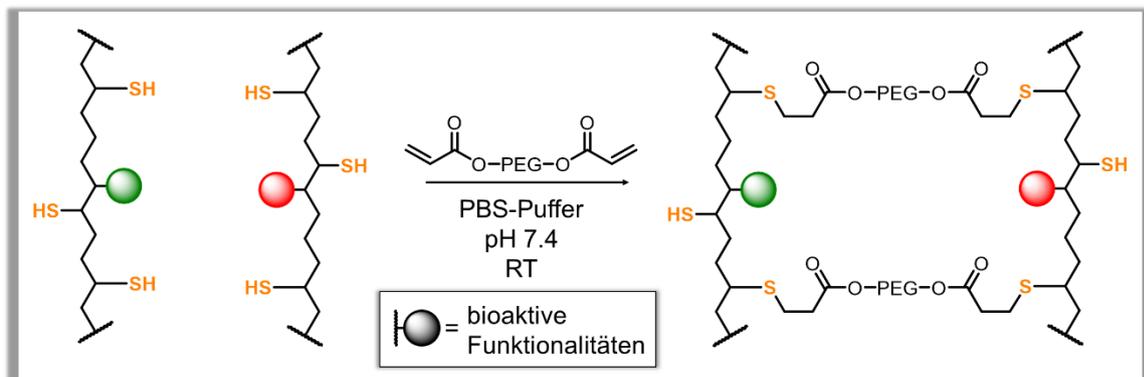
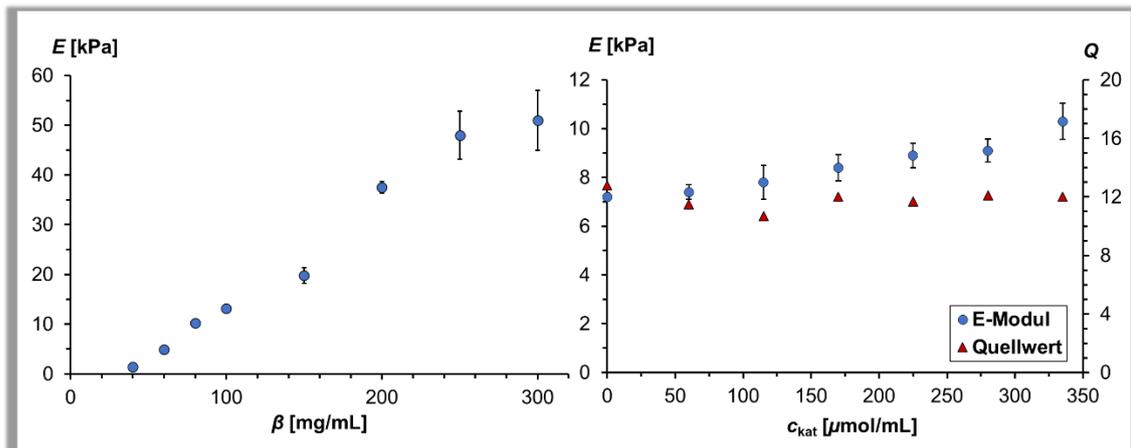


Abbildung 87: Übersicht über den Aufbau des PEGDA<sub>3500</sub>-vernetzten Hydrogelsystems.

Durch die Variation der Verhältnisse zwischen den Thiolen des Präpolymers und den Acrylat-Endgruppen des PEGDA<sub>3500</sub> in der Michael-Addition konnten die Steifigkeit und das Quellverhalten der Gele maßgeblich beeinflusst werden. Dabei wurde festgestellt, dass bei einem Thiol zu Acrylat-Verhältnis von 0,7 Hydrogele gebildet wurden, welche nicht nur über eine hohe Steifigkeit verfügten, sondern auch einen Gelanteil von bis zu 94% besaßen. Um ein besseres Verständnis über die Systeme zu erhalten, wurden der Einfluss der Gelkonzentration und der Kationikkonzentration auf die Eigenschaften der Gele genauer untersucht. Durch die Variation der Gelkonzentrationen ( $\beta = 40 - 300 \text{ mg/mL}$ ) war es dabei möglich, Hydrogele herzustellen, welche einen E-Modul zwischen 1,4 und 51 kPa aufgewiesen haben (Abbildung 88). Durch den Einsatz von höheren Gelkonzentrationen ist es dabei zur Ausbildung von dichteren Polymernetzwerken gekommen, was in einer zunehmenden Gelsteifigkeit resultiert hat. Da das E-Modul in einem näherungsweise linearen Verhältnis zur Gelkonzentration lag, wäre es möglich gewesen, die Steifigkeit der

Gele für eine gewünschte Anwendung präzise einzustellen. Durch das Einbringen variabler Mengen an kationischer Komponente in die Hydrogele, konnte eine Zunahme der Gelsteifigkeit um bis zu 30% im Vergleich zu den ungeladenen Systemen beobachtet werden (Abbildung 88). Diese Zunahme wurde auf die Ausbildung von physikalischen Vernetzungspunkten, durch Ion-Ion-Wechselwirkungen zwischen den quartären Ammoniumgruppen des TMAEA und Phosphationen des PBS-Puffers, zurückgeführt.<sup>[110]</sup>

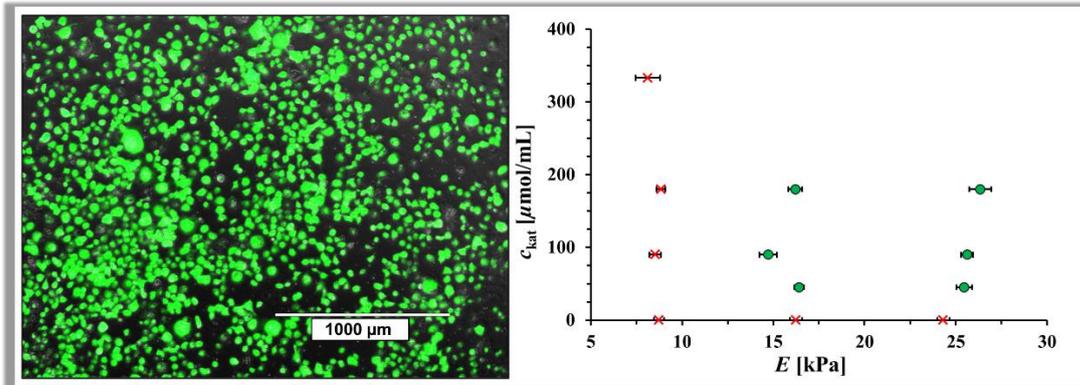


**Abbildung 88:** Übersicht über die Hydrogeleigenschaften der PEGDA<sub>3500</sub>-Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Gel- und Kationkonzentration.

Um einen Eindruck über die hydrolytische Abbaubarkeit der PEGDA-Systeme zu erhalten, wurde ein exemplarisches Hydrogelsystem für über 60 Tage unter Kulturbedingungen inkubiert. Über den gesamten Messzeitraum haben die Gele dabei einen durchschnittlichen Abbau von 0,5% des E-Moduls pro Tag erfahren, was in grober Übereinstimmung mit der Literatur liegt.<sup>[118,119]</sup>

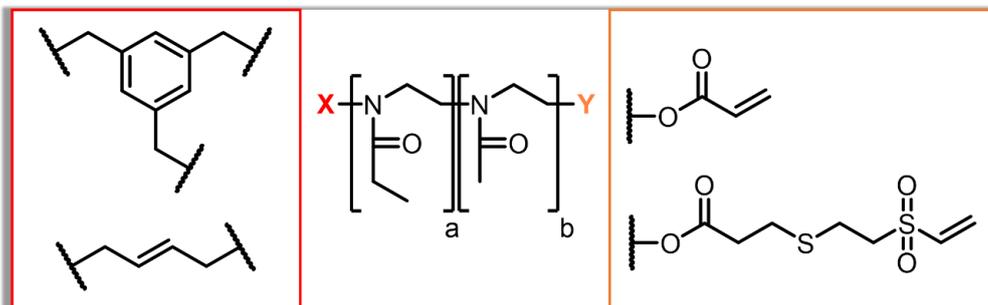
Um die Eignung der Hydrogele für einen Einsatz in verschiedenen biomedizinischen Anwendungen zu prüfen, galt es, die PEGDA-Systeme in Zellexperimenten mit COS-7-Zellen auf ihre Biokompatibilität und mögliche Zell-Gel-Wechselwirkungen zu untersuchen (Abbildung 89). Mithilfe einer Live-Dead-Färbung konnte dabei die hohe Biokompatibilität der PEGDA-Systeme für eine 2D- und 3D-Anwendungen bestätigt werden. Unter Verwendung einer Reihe von Gelen mit variierendem E-Modul und Kationkonzentration konnte zusätzlich das Adhäsionsverhalten der COS-7-Zellen gezielt untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass unterhalb einer gewissen Grenzsteifigkeit und ohne die Anwesenheit von kationischen Funktionalitäten keine signifikante Zelladhäsion an die Geloberfläche stattgefunden hat. Wiesen die Gele hingegen eine ausreichende Steifigkeit ( $E \sim 15$  kPa) auf und enthielten mindestens

45  $\mu\text{mol/mL}$  kationischer Funktionalitäten, konnte eine deutliche Adhäsion der Zellen beobachtet werden. Ähnliche Voraussetzungen bezüglich der Höhe des E-Moduls für die erfolgreiche Adhäsion von COS-7-Zellen wurde ebenfalls von XIA *et al.* beschrieben.<sup>[131]</sup>



**Abbildung 89:** Übersicht über einige Ergebnisse der Zellexperimente mit den PEGDA-Systemen.

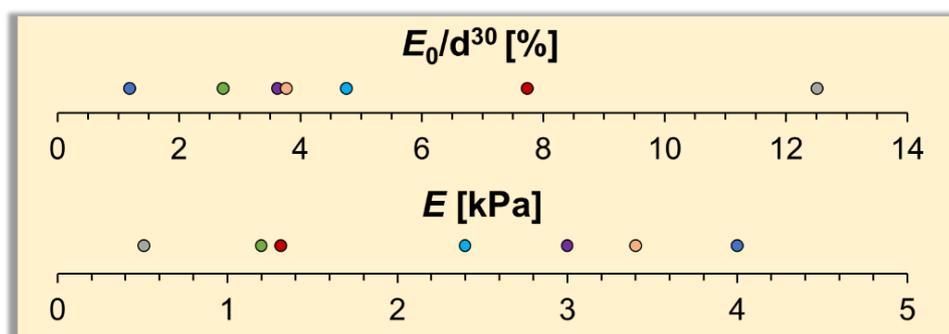
Das zweite Ergebniskapitel dieser Arbeit (Kapitel 4, Seite 65 ff.) beschäftigte sich mit der Entwicklung eines neuen Oxazolin-basierten Vernetzersystems (Abbildung 90). Durch das Einführen von hydrolytisch labilen Endgruppen war es dabei möglich, Vernetzer herzustellen, welche über eine kontrollierbare Abbaubarkeit verfügten.



**Abbildung 90:** Übersicht über die Struktur der neuen Oxazolin-basierten Vernetzersysteme.

Zunächst wurde die Funktionsfähigkeit der Systeme anhand von ersten „proof-of-concept“ Polymeren evaluiert. Dabei wurden trifunktionelle Oxazolinvernetzer mit 12 bis 32 Wiederholungseinheiten EtOx und Acrylsäure-Endgruppen hergestellt und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und GPC charakterisiert. Durch die Vernetzung von thiolhaltigen Präpolymeren mittels Michael-Addition konnten Hydrogele erhalten werden mit einem E-Modul von bis zu 4 kPa ( $\beta = 100 \text{ mg/mL}$ ). Da die Gele aus den ersten Vernetzern jedoch kaum hydrolytischen Abbau aufwiesen, galt es, die Systeme weiter zu optimieren. Eine signifikante Erhöhung der hydrolytischen Abbaugeschwindigkeit konnte dabei durch das Einführen einer Mercaptopropionsäure-Divinylsulfon-Endgruppe (MPDVS) erreicht werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde der Einfluss der verschiedenen Vernetzerparameter auf die Hydrogeleigenschaften untersucht. Dafür wurden Vernetzer mit variabler Länge, Copolymerzusammensetzung und Anzahl an Endgruppen hergestellt und zur Synthese von Hydrogelen genutzt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Erhöhung der Länge der Vernetzer aufgrund der erhöhten Vernetzungseffizienz zur Ausbildung von steiferen Hydrogelen führt, welche eine erhöhte Abbaurrate aufwiesen. Der direkte Vergleich eines langkettigen Vernetzers (POx-6-MPDVS, 81 EtOx-Einheiten) zu einem Kurzketten (POx-4-MPDVS, 32 EtOx-Einheiten) hat gezeigt, dass die mithilfe des langkettigen Vernetzers gebildeten Hydrogele ein um durchschnittlich 113% erhöhtes E-Modul aufgewiesen haben. Bezüglich der Copolymerzusammensetzung konnte durch das Substituieren von EtOx mit dem hydrophileren MetOx eine signifikante Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit festgestellt werden, ohne dabei die Steifigkeit der Gele zu verändern. Der Vergleich von zwei Hydrogelsystemen aus einem reinen EtOx-Vernetzer (POx-4-MPDVS) und einem Vernetzer mit 45 mol% MetOx-Anteil (POx-9-MPDVS) hat gezeigt, dass das Einbringen des MetOx zu einem bis zu 85% schnelleren hydrolytischen Abbau geführt hat. Durch den Einsatz von bifunktionellen Vernetzern war es möglich, die Abbaugeschwindigkeit der Gele weiter zu erhöhen, wobei Abbauraten von bis zu 12,5% des E-Moduls pro Tag erzielt werden konnten. Durch Variation der verschiedenen Vernetzerparameter war es letzten Endes möglich, Hydrogele herzustellen, welche ein breites Spektrum an möglichen Steifigkeiten und Abbaugeschwindigkeiten abdeckten (Abbildung 91).



**Abbildung 91:** Übersicht über die E-Module und Abbaugeschwindigkeiten einer Auswahl von Hydrogelen mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL, welche durch den Einsatz verschiedener Oxazolinvernetzer gebildet wurden; Vernetzer welche zur Bildung der Hydrogele genutzt wurden: **blau** = POx-3, **grün** = POx-8-MPDVS, **lila** = POx-10, **orange** = POx-6-MPDVS, **türkise** = POx-DVS, **rot** = POx-11, **grau** = POx-13-MPDVS.

Um das Spektrum der realisierbaren Geleigenschaften zu erweitern, wurden erste Untersuchungen bezüglich gemischter Oxazolin-PEGDA-Systeme durchgeführt (Abbildung 92). Durch Variation des Oxazolin-Anteils in der Vernetzerkomponente der

Hydrogele war es möglich, den E-Modul auf Werte zwischen 7,1 und 1,2 kPa einzustellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich die Abbaugeschwindigkeit der Hydrogele durch die Variation des Oxazolin-Anteils im Vernetzer auf Werte zwischen 1,1% und 4% bezüglich des Verlustes des E-Moduls pro Tag einstellen ließ.

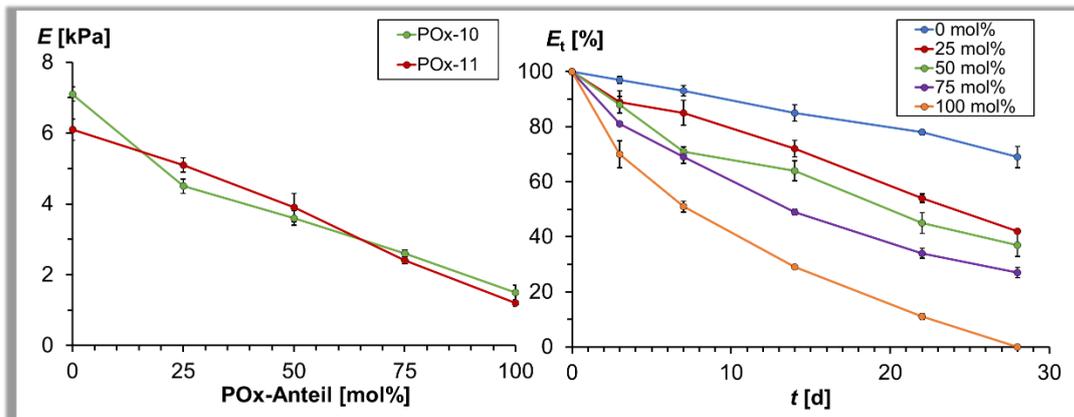


Abbildung 92: Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung der gemischten POx-PEGDA-Systeme.

Um die Eignung der neuen Oxazolin-vernetzten Hydrogelsysteme für einen Einsatz in der biomedizinischen Forschung zu überprüfen, sollte zuletzt noch die Biokompatibilität der Hydrogele und deren Abbauprodukte mithilfe von Zellexperimenten an COS-7-Zellen untersucht werden (Abbildung 93). Dabei wurde die Viabilität der Zellen durch Anwendung einer Live-Dead-Färbung qualitativ ermittelt.

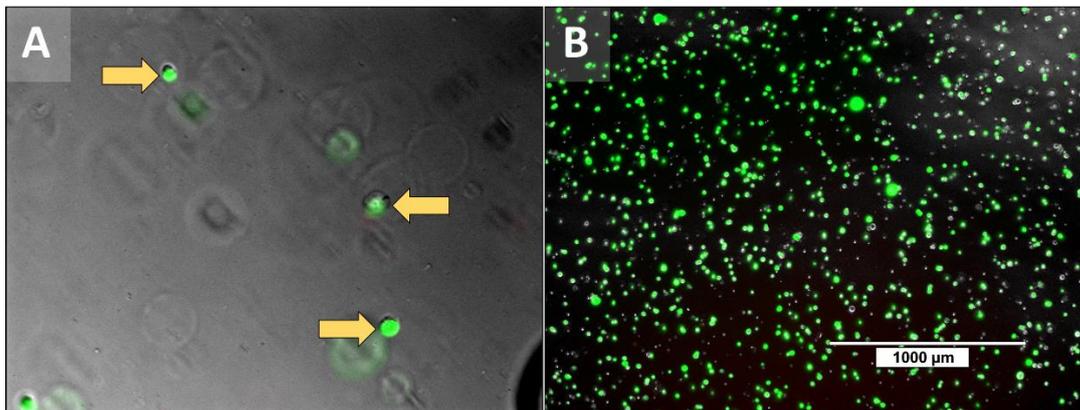


Abbildung 93: Exemplarische Auswahl einiger Aufnahmen der durchgeführten Zellexperimente mit COS-7-Zellen; A: Zellen, welche innerhalb eines 3D-Hydrogels gleichmäßig eingeschlossen wurden. Die Pfeile heben einzelne Zellen hervor, welche sich in der aktuellen Ebene im Fokus befinden; B: Aufnahme von COS-7-Zellen auf einem 2D-Hydrogel, Zellen wurden mithilfe einer Live-Dead-Färbung grün (lebendig) oder rot (tot) gefärbt.

In 2D- und 3D-Experimenten war es dadurch möglich, die hohe Biokompatibilität der Hydrogelsysteme und ihrer Abbauprodukte nachzuweisen. Bei der Untersuchung des Zellverhaltens in einigen 2D-Experimenten konnte eine Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Gele beobachtet werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die

Adhäsion der Zellen erneut in Abhängigkeit zum E-Modul und der kationischen Funktionalisierung der Gele stand. Durch den Einsatz von Hydrogelen mit einer Steifigkeit von 9,2 kPa und einer Kationikkonzentration von 45  $\mu\text{mol/mL}$  konnte eine beinahe vollständige Adhäsion der COS-7-Zellen an die Oberfläche der Gele hervorzurufen. Durch den Einsatz von Hydrogelen in 7-Tage Experimenten konnten erste Eindrücke über das Verhalten von COS-7-Zellen in den Gelen bezüglich einer Langzeitkultivierung gewonnen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, ein Hydrogelsystem zu präsentieren, welches sich durch eine hohe Flexibilität bezüglich der mechanischen Eigenschaften und des Abbauverhaltens auszeichnet. Diese Eigenschaften könnten im Rahmen zukünftiger Untersuchungen, zum Beispiel durch das Einführen alternativer Monomere in das Polymerrückgrat, noch erweitert werden. Um eine noch bessere Kontrolle über die Geleigenschaften zu erhalten, wäre es weitergehend von Interesse, die Kombination von weiteren Vernetzersystemen zu evaluieren. Dabei wäre es möglich, die Kombination verschiedener Oxazolin-basierter Vernetzersysteme kategorisch zu untersuchen und dadurch den Einsatz von PEG weiter zu verringern. Auch wenn erste Untersuchungen bezüglich des Zellverhaltens in 2D- und 3D-Experimenten bereits erfolgt sind, gilt es, die dabei erhaltenen Erkenntnisse weiter zu vertiefen. Aufgrund der guten Kontrolle über die mechanischen und chemischen Eigenschaften der Hydrogele und deren Abbauverhalten, könnten sie dabei in Zukunft für die Klärung präziser zellbiologischer Fragestellungen genutzt werden. Neben genaueren Untersuchungen zur Langzeit-Viabilität der Zellen in 3D könnten aufgrund der Abbaubarkeit der Hydrogele auch die Untersuchung der Zellmotilität in Abhängigkeit des Degradationsfortschritts von Interesse sein.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1. Allgemeines

#### 6.1.1. Hilfssoftware

Zur Erstellung der verwendeten Strukturen, wurde das Programm ChemBioDraw Ultra 20 der Firma Perkin Elmer verwendet. Die Bearbeitung von Abbildungen, erfolgte mithilfe der Software GIMP Version 2.8.14, sowie Microsoft Paint 3D. Die erhaltenen Spektren, wurden mit dem Programm ACD-Labs 12 ausgewertet. Die Verwaltung der Literatur erfolgt mithilfe des Programms Mendeley. Die Auswertung der Mikroskopieaufnahmen erfolgte mithilfe der Software Fiji (Fiji Is Just ImageJ).

#### 6.1.2. NMR-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit enthaltenen  $^1\text{H}$ /DOSY-NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, wurden mit FT-NMR-Geräten der Firma BRUKER des Typen DPX-300 (300 MHz) und DRX-500 (500 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  der jeweiligen Signale wurde in ppm (*engl: parts per million*; Teile pro Millionen) und die Kopplungskonstanten  $J$  in Hz (Hertz) angegeben. Die Multiplizitäten der Signalpeaks wurden wie folgend abgekürzt: (s) = Singulett, (d) = Duplett, (t) = Triplet, (q) = Quartett, (m) = Multipllett, (dd) = Duplett vom Duplett, (td) = Triplet vom Duplett.

#### 6.1.3. Gel-Permeations-Chromatographie

Die GPC-Messungen wurden mit einem selbstgebaute GPC bestimmt. Die Messungen wurden über zwei Säulen der Firma PSS GRAM mit DMF/(LiBr(5 g/L)) als Laufmittel bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min durchgeführt. Als Detektor wurde ein RI-Detector-Smartline-2300 der Firma Knauer verwendet. Als Referenz wurde mit einem PMAA-Standard der Firma PSS kalibriert

#### 6.1.4. RP-HPLC

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte mithilfe eines RP-HPLC-Systems der Firma Knauer. Zur Aufreinigung dienten eine Vorsäule Eurosphere II 300-10 C18A und eine Säule

Eurosphere II 100-10 C18 der Firma Knauer. Als Laufmittelgemisch wurde H<sub>2</sub>O/MeCN (+ 0,1 % TFA) verwendet mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 mL/min.

### **6.1.5. UV-Vis-Spektroskopie**

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

### **6.1.6. Rheologie**

Die rheologischen Oszillationsexperimente in dieser Arbeit wurden mit einem Gemini Advanced Rheometer der Firma Bohlin Instruments durchgeführt. Für die Messungen wurde ein Platte-Platte-System von Malvern Instruments mit 20 mm Durchmesser verwendet. In Abhängigkeit ihrer Eigenschaften, wiesen die gemessenen Gele einen Durchmesser von durchschnittlich 15 bis 20 mm und eine Dicke von 2 bis 4 mm auf. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Es wurden stets mindestens 20 Messpunkte pro Gel aufgenommen über einen Zeitraum von knapp 2 Minuten. Zur Bestimmung der jeweiligen Module wurden die Messergebnisse der einzelnen Messungen gemittelt.

### **6.1.7. Ellman's Assay**

Für ein Ellman's Assay wurde eine Polymerstammlösung aus entgastem Ellman's Puffer (0,1 M Phosphatpuffer mit pH 8) mit einer Konzentration von 1 mg/mL hergestellt. Gleichzeitig wurde eine Stammlösung des Ellman's Reagenzes 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure in entgastem Ellman's Puffer mit einer Konzentration von 4 mg/ml hergestellt. Die Messproben wurden aus jeweils 1,25 mL entgastem Ellman's Puffer, 125  $\mu$ L Polymerstammlösung und 25  $\mu$ L Ellman's Reagenz-Stammlösung angesetzt. Die Proben wurden mithilfe eines UV-Vis-Spektrometers bei einer Wellenlänge von 412 nm vermessen. Mithilfe der gemessenen Extinktion konnte unter Berücksichtigung der Verdünnung und des molaren Extinktionskoeffizienten des detektierten 2-Nitro-5-thiobenzoat-Anions von  $\epsilon_{412\text{nm}} = 14150 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  die Konzentration an freien Thiolgruppen im Polymer berechnet werden. Alle Messproben wurden in Triplets hergestellt und jede Probe des Triplets jeweils drei Mal gemessen.

### **6.1.8. Rasterelektronenmikroskopie**

Die in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen der Rasterelektronenmikroskopie wurden von Herrn Volker Brandt im Zentrum für Elektronenmikroskopie und Materialforschung (ZEMM) erstellt. Die Messungen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop H-S4500 FEG der Firma Hitachi durchgeführt. Zur Präparation der Proben wurden die Hydrogele für mindestens 24 Stunden in Wasser gequollen und anschließend gefriergetrocknet. Die getrockneten Gele wurden dann vor der Messung in flüssigem Stickstoff eingefroren und vorsichtig in der Mitte durchgebrochen. Die dadurch erhaltenen Bruchstücke wurden mit dem Querschnitt nach oben auf der Messplatte mithilfe von Kleber fixiert.

### **6.1.9. Live-Dead-Färbung**

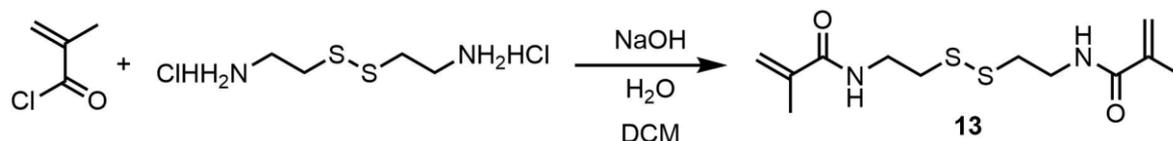
Die Durchführung der Live-Dead-Färbung erfolgte durch Anwendung des „Live/Dead Cell Staining Kit II“ der Firma PromoCell. Für die Anfärbung der Zellen wurde eine Färbelösung aus einem 0,01 M PBS-Puffer und den Reagenzien Calcein-AM ( $4 \mu\text{M}$ ) und EthD-III ( $2 \mu\text{M}$ ) verwendet. Die Herstellung dieser Färbelösung erfolgte durch das Mischen von 10 mL eines 0,01 M serumfreien PBS-Puffers mit  $5 \mu\text{L}$  einer 4 mM Calcein-AM-Stammlösung und  $20 \mu\text{L}$  einer 2 mM EthD-III-Stammlösung bei Raumtemperatur.

Vor der Auftragung der Färbelösung auf die Zellen wurde das Kultur-Medium über diesen vorsichtig aspiriert und die Gele zwei Mal mit jeweils 1 mL 0,01 M PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden die Gele mit jeweils 1,5 mL der Färbelösung überschichtet und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Untersuchung der Zellen, mithilfe von Fluoreszenz-Mikroskopie, wurde die Färbelösung aspiriert und mit 2 mL eines 0,01 M PBS-Puffers ersetzt. Die Erfassung der lebenden Zellen (grün) erfolgte durch Anregung bei einer Wellenlänge von 485 nm und die der toten Zellen bei einer Wellenlänge von 586 nm.

Die Betrachtung der Zellen und die Erstellung der gezeigten Aufnahmen erfolgten an einem EVOS FL Mikroskop mit einem 20x Objektiv und einem Standard Fluoreszenz-Filter-Set.

## 6.2. Monomersynthesen

### 6.2.1. *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin



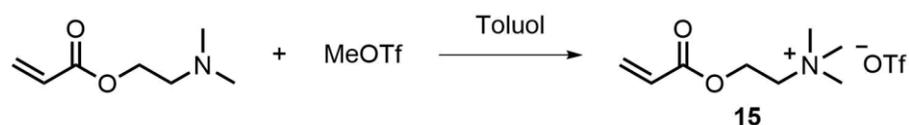
**Schema 13:** Reaktionsschema der Synthese von *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin.

Es wurde NaOH (6,89 g, 172 mmol, 2 eq.) in 100 mL H<sub>2</sub>O in einem Rundkolben vorgelegt und Cystamin Dihydrochlorid (9,69 g, 43,1 mmol, 0,5 eq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt. Dann wurde Methacryloylchlorid (9 g, 86,1 mmol, 1 eq.) in 15 mL DCM gelöst und der Reaktionslösung zugetropft. Diese wurde im Anschluss über Nacht bei RT gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgenutscht und anschließend mit 0,5 M HCl und Wasser gewaschen. Der Feststoff wurde über Nacht am Hochvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus Ethylacetat aufgereinigt. Das gewünschte Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden (12,8 g, 44,5 mmol, 52%).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (200 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  (ppm) = 1.97 (m, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.89 (t, <sup>3</sup>*J* = 6 Hz, 4H, S-CH<sub>2</sub>), 3.66 (q, <sup>3</sup>*J* = 6 Hz, 4H, NH-CH<sub>2</sub>), 5.36 (m, 2H, C=CH<sub>2</sub>), 5.75 (m, 2H, C=CH<sub>2</sub>), 6,58 (s, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (50 MHz, Chloroform-d):  $\delta$  (ppm) = 18,6; 37,7; 38,7; 120,0; 139,6; 168,7.

### 6.2.2. Trimethylaminoethylacrylat



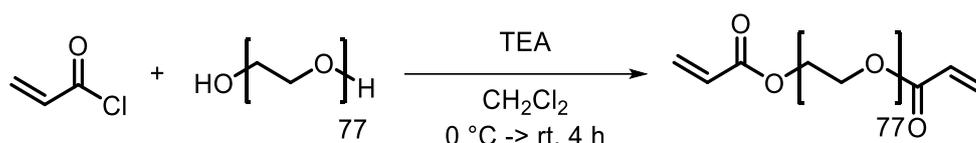
**Schema 14:** Reaktionsschema der Synthese von Trimethylaminoethylacrylat.

Frisch destilliertes Dimethylaminoethylacrylat (10,7 mL, 69,8 mmol, 1 eq.) wurde in 20 mL trockenem Toluol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Methyltrifluoromethansulfonat (8,81 mL, 80,3 mmol, 1,15 eq.) wurde in 15 mL trockenem Toluol gelöst, der Reaktionslösung zugetropft und diese dann für 12 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, mit kaltem Toluol gewaschen und bei vermindertem Druck getrocknet. Das gewünschte Produkt konnte als braunes Öl erhalten werden (21,5 g, 69,8 mmol, quant.).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3,14 (s, 9H, **CH<sub>3</sub>**), 3,71 (p, <sup>3</sup>J = 0,2 Hz, 2H, N-**CH<sub>2</sub>**), 4,55 (m, <sup>2</sup>J = 0,2 Hz, 2H, O-**CH<sub>2</sub>**), 6,04 (dd, <sup>3</sup>J = 5 Hz; <sup>2</sup>J = 10 Hz, 1H, CH=**CHH**), 6,22 (dd, <sup>3</sup>J = 10 Hz; <sup>2</sup>J = 20 Hz, 1H, CH=**CHH**), 6,40 (dd, <sup>3</sup>J = 1,5 Hz; <sup>2</sup>J = 10 Hz, 1H, CH=**CH<sub>2</sub>**).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  (ppm) = 52,9; 58,1; 127,9; 132,5; 164,9.

### 6.2.3. Poly(ethylenglykol)diacrylat (PEGDA<sub>3500</sub>)

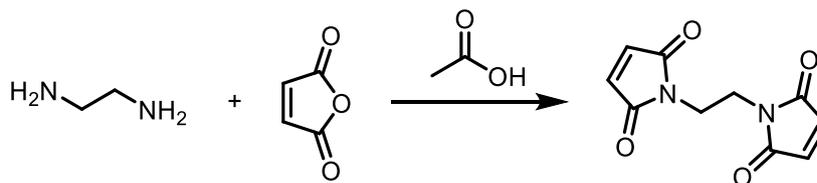


**Schema 15:** Reaktionsschema der Synthese von PEGDA<sub>3500</sub>.

Poly(ethylenglykol) [ $M_n = 3400$  g/mol] (10 g, 2,94 mmol, 1 eq.) wurden in 75 ml trockenem Dichlormethan vorgelegt. Triethylamin (1,6 mL, 11,8 mmol, 4 eq.) wurde hinzugegeben und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Acryloylchlorid (0,96 mL, 11,8 mmol, 4 eq.) wurden in 5 mL trockenem Dichlormethan aufgenommen und über 10 Minuten zur Reaktionslösung zugetropft und diese dann für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde zwei Mal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und auf circa 15 mL am Rotationsverdampfer eingengt. Das Polymer wurde in einem 20-fachem Überschuss aus kaltem Diethylether gefällt und im Hochvakuum getrocknet. Das gewünschte Produkt konnte als weißer Feststoff erhalten werden. (9,81 g, 2,8 mmol, 95,3%).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 3,47 – 3,65 (m, 4H, O-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O**), 3,78 – 3,83 (m, 4H, O=C-O-**CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>**), 4,30 (t, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 4H, O=C-O-**CH<sub>2</sub>**), 5,83 (d, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, **CH=CH<sub>2</sub>**), 6,14 (dd, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz; <sup>2</sup>J = 15 Hz, 2H, CH=**CHH**), 6,41 (d, <sup>2</sup>J = 10 Hz, 2H, CH=**CHH**).

### 6.2.4. 1,2-Bis(Maleimido)ethan

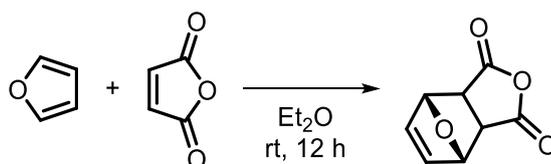


Schema 16: Reaktionsschema der Synthese von 1,2-Bis(Maleimido)ethan.

Maleinsäureanhydrid (10,8 g, 110 mmol, 2,2 eq.) wurde in Eisessig (15 mL/g Amin) vorgelegt. Ethylendiamin (3 g, 49,9 mmol, 1 eq.) wurden dem Reaktionsgemisch zugegeben und dieses dann für vier Stunden zum Reflux erhitzt. Die Essigsäure wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde zwei Mal mit jeweils gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, 1 M Salzsäure und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen in dieser Reihenfolge. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das gewünschte Produkt konnte als beigefarbener, kristalliner Feststoff erhalten werden (7,89 g, 35,8 mmol, 71,8%)

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3,73 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 6,68 (s, 4H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ).

### 6.2.5. 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion

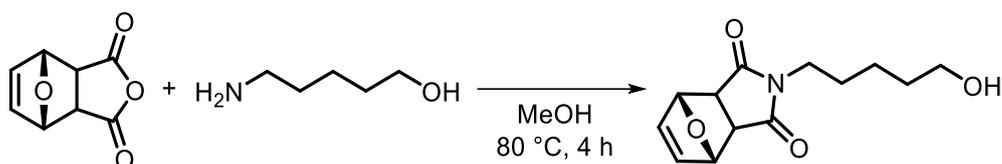


Schema 17: Reaktionsschema der Synthese von 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion.

Maleinsäureanhydrid (8 g, 81,6 mmol, 1 eq.) und Furan (5,55 g, 81,59 mmol, 1 eq.) wurden in 30 mL Diethylether gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgenutscht und mit Diethylether gewaschen und anschließend im Hochvakuum getrocknet, das gewünschte Produkt konnte als kristalliner weißer Feststoff erhalten werden (12,3 g, 74,1 mmol, 91%).<sup>[191]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ : (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3,41 (s, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 5,68 (s, 2H, O- $\text{CH}-\text{C}$ ), 6,81 (s, 2H,  $\text{CH}-\text{C}=\text{O}$ ).

### 6.2.6. (4R,7S)-2-(5-hydroxypentyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-dion

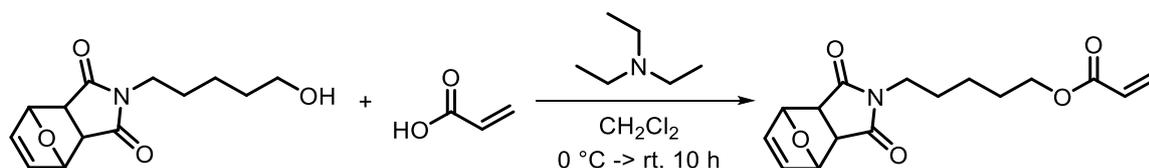


**Schema 18:** Reaktionsschema der Synthese von (4R,7S)-2-(5-hydroxypentyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-dion.

5-Aminopentanol (7,7 g, 74,6 mmol, 4 eq.) wurden in 30 mL Methanol gelöst. 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-en-3,5-dion (3,1 g, 18,7 mmol, 1 eq.) wurden der Reaktionslösung hinzugegeben und diese dann für vier Stunden bei 80 °C bis zum Sieden erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit 45 mL Dichlormethan verdünnt und anschließend je zwei Mal mit jeweils 50 mL 2 M Salzsäurelösung und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt konnte als braunes Öl erhalten werden (3,46 g, 13,8 mmol, 74%).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1,35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH), 1,6 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH/CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 2,84 (s, 2H, CH=CH), 3,5 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N) 3,62 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 5,27 (s, 2H, O-CH-C), 6,51 (s, 2H, CH-C=O).

### 6.2.7. 5-((4R,7S)-1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl)pentyl-acrylat



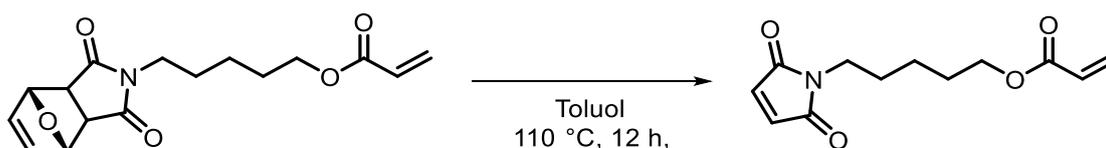
**Schema 19:** Reaktionsschema der Synthese von 5-((4R,7S)-1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl)pentyl-acrylat.

(4R,7S)-2-(5-hydroxypentyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-dion (3,1 g, 12,3 mmol, 1 eq.) wurde in 60 mL Dichlormethan aufgenommen und Triethylamin (3,78 mL, 27,1 mmol, 2,2 eq.) hinzugegeben. Acryloylchlorid (1,6 mL, 24,7 mmol, 2 eq.) wurden in 10 mL Dichlormethan aufgenommen und unter Eisbadkühlung unter Rühren der Reaktionslösung hinzutropft. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur

gerührt. Die Reaktionslösung wurde zwei Mal mit jeweils 40 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt im Hochvakuum getrocknet. Nach einer säulenchromatographischen Aufreinigung über Kieselgel mit Ethylacetat/Dichlormethan (1:1) als Laufmittelgemisch konnte das Produkt als leicht gelber, kristalliner Feststoff erhalten werden (2,61 g, 8,55 mmol, 69%).

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1,36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O), 1,6 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1,68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,83 (s, 2H, CH=CH), 3,48 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N) 4,12 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O-C=O), 5,26 (s, 2H, O-CH-C), 5,81 (d, <sup>2</sup>J = 10 Hz, 1H, HHC=CH-C=O), 6,1 (dd, <sup>3</sup>J = 10 Hz, <sup>2</sup>J = 15 Hz, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-C=O), 6,39 (d, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 1H, HHC=CH-C=O), 6,51 (s, 2H, O=C-CH-CH-C=O).

### 6.2.8. 5-Maleimido-pentyl-acrylat



Schema 20: Reaktionsschema der Synthese von 5-Maleimido-pentyl-acrylat.

5-((4R,7S)-1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-4,7-epoxyisindol-2-yl)pentyl-acrylat (2,5 g, 8,19 mmol, 1 eq.) wurden in 40 mL Toluol gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 12 Stunden bei 110 °C zum Reflux erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt mit Cyclohexan/Ethylacetat (9:1) als Laufmittelgemisch. Das gewünschte Produkt konnte als beiger kristalliner Feststoff erhalten werden (1,82 g, 7,67 mmol, 94%)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 1,37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O), 1,63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 1,7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,53 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N) 4,14 (t, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O-C=O), 5,82 (d, <sup>2</sup>J = 10 Hz, 1H, HHC=CH-C=O), 6,11 (dd, <sup>3</sup>J = 10 Hz, <sup>2</sup>J = 15 Hz, 1H, H<sub>2</sub>C=CH-C=O), 6,4 (d, <sup>2</sup>J = 7,5 Hz, 1H, HHC=CH-C=O), 6,69 (s, 1H, O=C-CH-CH-C=O).

**LR-MS (ESI):** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>, 237,1 (exakt), berechnet 238,11 [M-H]<sup>+</sup>, gefunden 238,0.

### 6.3. Festphasensynthese

Zur Synthese der Peptide wurde eine Festphasensynthese an einem 2-Chlortritylchlorid-Harz (2-CTC) nach der Fmoc-Strategie durchgeführt.<sup>[192]</sup> Um eine möglichst hohe Beladung des Harzes zu erreichen, wird dieses vor der Kopplung mit der ersten Aminosäure reaktiviert. 1 g des Harzes wurde in ein Peptidsynthesegefäß eingefüllt. Zur Konditionierung wurde das Harz für 5 min in 10 mL DMF gequollen und anschließend drei Mal mit je 10 mL DCM gewaschen. Dann wurde dem Harz eine Lösung aus 0,17 mL Thionylchlorid in 10 mL DCM zugegeben und für 1 h geschwenkt. Danach wurde das Harz zwei Mal mit je 10 mL DMF und drei Mal mit 10 mL DCM gewaschen. Fmoc-Glycin-OH (1427 mg, 4,8 mmol, 3 eq.) wurde in 10 mL DCM gelöst und zusammen mit Diisopropylethylamin (DIPEA) (1,36 mL, 8 mmol, 5 eq.) hinzugegeben. Nach 5 min Schwenken wurde zusätzliches DIPEA (0,68 mL, 4 mmol, 2,5 eq.) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 h geschwenkt. Das Lösungsmittel wurde abfiltriert und das Harz für 15 min in 1 mL MeOH geschwenkt. Das Harz wurde im Anschluss drei Mal mit je 10 mL DCM, zwei Mal mit je 10 mL DMF, zwei Mal mit je 10 mL DCM und drei Mal mit je 10 mL MeOH gewaschen. Danach wurde das Harz über Nacht im Hochvakuum getrocknet.

Zur Bestimmung der Beladung des Harzes mit Aminosäure wurden Duplikate von 5-10 mg Harz in einen Eppendorfgefäß gefüllt. Das Harz wurde für 20 min jeweils mit 1 mL einer Lösung aus 20 % (v/v) Piperidin in DMF behandelt. Danach wurde das Gemisch zentrifugiert und 100 µL des Überstands in 10 mL DMF gegeben. Die Extinktion dieser Lösung wurde bei 301 nm bestimmt. Aus der Extinktion konnte mithilfe der nachfolgenden Gleichung 22 die Beladung des Harzes berechnet werden.<sup>[192]</sup> Die Beladung des Harzes betrug 0,78 mmol/g.

$$\text{Harzbeladung} = \frac{\text{Extinktion} \cdot 101}{7,8 \cdot \text{Einwage [mg]}}$$

**Gleichung 22:** Berechnung der Harzbeladung bei der Peptidsynthese.

Der weitere Aufbau des Peptids erfolgte über die Wiederholung der nachfolgenden Schritte. Das Harz wurde fünf Mal mit je 10 mL DCM und fünf Mal mit je 10 mL DMF gewaschen. Dann wurde das Harz zwei Mal mit einer Spatlösung aus jeweils 5 mL Piperidin, 2,5 mL DMF und 2,5 mL DCM für je 30 min behandelt. Das Harz wurde danach zwei Mal mit je 10 mL DMF gewaschen. Das Harz wurde dann für 1 h mit einer Lösung

aus der zu koppelnden Aminosäure (3 eq.), HBTU (887 mg, 2,34 mmol, 3 eq.), HOBt (316 mg, 2,34 mmol, 3 eq.) und DIPEA (0,8 mL, 4,68 mmol, 6 eq.) in 9,2 mL DMF behandelt. Danach wurde das Harz fünf Mal mit je 20 mL DMF, fünf Mal mit je 20 mL DCM und zwei Mal mit je 10 mL DMF gewaschen. Wenn an dieser Stelle noch eine weitere Aminosäure gekoppelt werden musste, wurden die Schritte ab Zugabe der Spaltlösung wiederholt.

Nach Kopplung der letzten Aminosäure wurde das Harz zusätzlich drei Mal mit je 10 mL DCM gewaschen. Um das Peptid vom Harz zu spalten, wurde es zwei Mal für jeweils 30 min mit je 8 mL einer Lösung aus DCM/Eisessig/Trifluoressigsäure (7/2/1) behandelt. Danach wurde das Harz noch drei Mal mit je 15 mL DCM gewaschen. Die vereinten Spaltlösungen, sowie die Waschlösungen, wurden unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reste an Essigsäure wurden über mehrere Tage am Hochvakuum entfernt und das Rohprodukt anschließend gefriergetrocknet. Das Rohpeptid wurde als beiges Pulver (720 mg, 923  $\mu$ mol, 88 %) erhalten. Der Erfolg der Synthese wurde mittels LR-MS überprüft.

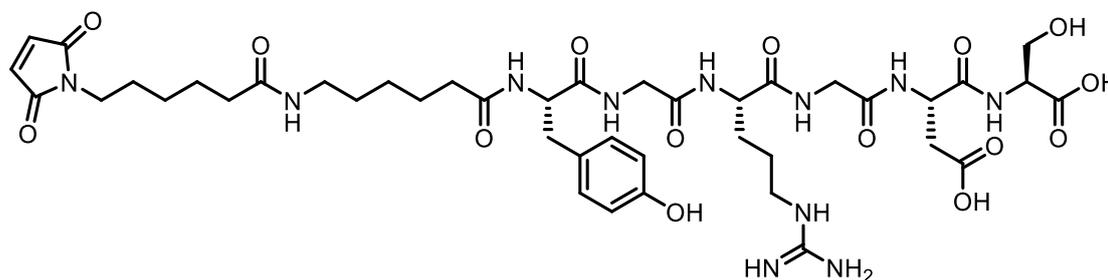


Abbildung 94: Struktur des Peptids MIC-AHX-YGRGDS

**LR-MS (ESI):**  $C_{42}H_{61}N_{11}O_{15}$ , 959,43 (exakt), berechnet 960,44  $[M-H]^+$ , gefunden 960,54.

## 6.4. Polymersynthesen

### 6.4.1. Synthese der thiolhaltigen Präpolymere

Die Synthese der thiolhaltigen Präpolymere erfolgte mittels einer freien radikalischen Polymerisation. Die Durchführung wird im Nachfolgenden exemplarisch für das Polymer **P<sub>SH1</sub>** beschrieben. Für die restlichen Polymere wurden die Verhältnisse der Monomere, sowie der verwendeten Lösungsmittel entsprechend angepasst.

Es wurden 5,42 g 4-Acryloylmorpholin (38,4 mmol, 24 eq.) und 461 mg *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin (1,6 mmol, 1 eq.) in THF ([M] = 2M) gelöst und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, welches im Anschluss mit einem Septum verschlossen wurde. Die Lösung wurde für 20 Minuten mit Argon durchströmt. Es wurden 123 mg 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V70) (0,4 mmol, 0,25 eq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei 42 °C erhitzt. Als Produkt wurden feste Organogele erhalten, welche in kleine Stücke geschnitten wurden und für zwei Tage gegen Wasser gequollen wurden. Das Wasser wurde dabei drei Mal täglich gewechselt.

Die gequollenen Hydrogelstücke wurden sorgfältig gefiltert und in einen Rundkolben gegeben. Zur Spaltung der Disulfidbindungen wurde DTT (5 Äquivalente in Bezug auf die verwendete Menge BMAC) in 2 ml Wasser gelöst und den Hydrogelstücken zugesetzt. Nachdem der pH-Wert mit NaOH (2 M) auf 8-10 eingestellt worden war, wurde die Lösung unter Argon-Strom gerührt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach vollständigem Auflösen wurde der pH-Wert mit HCl (5 M) auf 2-4 eingestellt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Filtration (Glasfaserfilter) entfernt. Zur Reinigung wurde das Polymer in einem 20-fachen Überschuss an entgastem und angesäuertem (pH 3) Isopropanol ausgefällt, in Dioxan gelöst und erneut in eiskaltem Diethylether ausgefällt. Nach der Ausfällung wurde das resultierende Polymer im Vakuum getrocknet und mittels <sup>1</sup>H-NMR, SEC und Ellman's-Assay analysiert.

### 6.4.2. Peptidfunktionalisierung

Zur Funktionalisierung mit RGD-Peptid, wurde ein extra thiolhaltiges Präpolymer hergestellt mit einer Zusammensetzung von AMOr/BMAC 93,5/6,5 mol% (**P<sub>SH</sub>Pep**). Nach vollständiger Charakterisierung des Polymers wurden die Thiolfunktionalitäten des Polymers partiell mit dem Peptid MIC-AHX-YGRGDS umgesetzt. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wurden Ellman's Assays des Polymers vor und nach der Funktionalisierung durchgeführt. Die Differenz der Thiolgehalte entsprach dabei dem Grad der Funktionalisierung.

Für die Funktionalisierung von **P<sub>SH</sub>Pep** wurden 0,5 g des Polymers (Thiolkonzentration = 876 mmol/g) in 3,3 mL Wasser gelöst und mit 100 µL Triethylamin versetzt. Die Lösung wurde mithilfe eines Argonstroms für 20 Minuten entgast. 168 mg (169 µmol) des Peptids MIC-AHX-YGRGDS (M = 998,59 g/mol) wurden der Lösung

hinzugegeben und diese dann über Nacht bei RT gerührt. Nach Ablauf der Reaktion wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wurde dann in DCM aufgenommen und zwei Mal in eiskaltem Ether gefällt. Das gewünschte Polymer **P<sub>SH</sub>RGD** konnte als leicht beiger Feststoff erhalten werden. Der Erfolg der Reaktion wurde zusätzlich zum Ellman's Assay mithilfe von <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie kontrolliert, indem die Signale der AMOr- und BMAC-Wiederholungseinheiten ins Verhältnis zu den aromatischen Signalen des Tyrosins (Y) im Peptid gesetzt wurden.

### 6.4.3. Oxazolinpolymere

Die Synthese der Oxazolinpolymere erfolgte mittels einer CROP unter inerten Bedingungen. Die für die Synthese verwendeten Oxazolinmonomere wurden vor der Verwendung in der Polymerisation getrocknet. Dafür wurde das jeweilige Monomer mit Kalziumhydrid versetzt und unter inerten Bedingungen destilliert. Das getrocknete Polymere wurde unter Argonatmosphäre und über Molsieb gelagert.

Für die Polymerisation wurden die Monomere und der Initiator in einem ausgeheizten Schlenkrohr unter Argonatmosphäre vorgelegt. Acetonitril wurde zugegeben, sodass eine 2 M-Lösung (bezogen auf die Monomere) entstanden ist. Die Reaktionslösung wurde bei 120 °C unter Rühren erhitzt. Die Reaktionszeit betrug dabei eine Stunde pro 40 Oxazolin-Wiederholungseinheiten im gewünschten Polymer (mindestens 30 Minuten). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktionslösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurden, bezogen auf die Menge an Initiator, 15 Äquivalente (10 bei DBB als Initiator) des Terminierungsreagenz und Triethylamin unter Argon-Gegenstrom hinzugegeben. Für eine möglichst vollständige Terminierung wurde die Reaktion im Anschluss für mindestens vier Stunden bei 60 °C gerührt.

Für die Aufarbeitung der Polymere wurde die Reaktionslösung zunächst am Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte des Ursprungsvolumens eingengt und anschließend in einem 20-fachen Überschuss an kaltem Ether gefällt. Die dadurch erhaltenen Rohpolymere wurden im Hochvakuum getrocknet. Bei einer Terminierung mit Acrylsäure wurden die Rohpolymere insgesamt drei weitere Male in Dichlormethan aufgenommen und in kaltem Ether gefällt. Bei einer Terminierung mit 3-Mercaptopropionsäure wurde das Rohpolymer zunächst in Dichlormethan gelöst und jeweils zwei Mal mit einer 1 M Natriumthiosulfat Lösung und brine gewaschen. Die

organische Phase wurde im Anschluss über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und in einem 20-fachem Überschuss kaltem Ether gefällt. Vor der Charakterisierung wurden die aufreinigten Polymere erneut über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

Für die Funktionalisierung der Mercaptopropionsäure-terminierten Polymere wurden diese in Dichlormethan (50 mg/mL) gelöst und 18 Äquivalente (12 bei DBB als Initiator) Triethylamin und Funktionalisierungsreagenz (DVS/MaPenA) hinzugegeben. Die Reaktion wurde für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösungen wurden danach auf ein Fünftel des ursprünglichen Volumens am Rotationsverdampfer eingengt, in einem 20-fachem Überschuss kaltem Ether gefällt und wurde über Nacht im Hochvakuum getrocknet. Das erhaltene Polymer wurde im Anschluss für weitere drei Mal in Dichlormethan aufgenommen und in kaltem Ether gefällt. Vor der Charakterisierung wurden die fertig funktionalisierten Polymere noch einmal über Nacht am Hochvakuum getrocknet.

## 6.5. Hydrogelpräparation

Für die Präparation der Hydrogele wurden, unter Berücksichtigung der gewünschten Gelkonzentration, Stammlösungen der zu verwendenden Polymere (thiolhaltige Präpolymere und Vernetzer) in 0,01 M PBS-Puffer hergestellt. Dabei wurde der pH-Wert der Lösungen nach dem vollständigen Lösen der Polymere überprüft und bei Bedarf mit NaOH- beziehungsweise HCl-Lösung auf 7,4 nachjustiert. In Abhängigkeit der gewünschten Gelparameter wurden dann verschiedenen Stammlösungen der thiolhaltigen Präpolymere gemischt und bei Bedarf mit 0,01 M PBS-Puffer verdünnt. Im Anschluss wurde ein Aliquot einer Vernetzer-Stammlösung den präparierten Lösungen zugegeben, ausgiebig durchmischt und in zylindrische Vertiefungen überführt. Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Gel-Lösungen abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Alle untersuchten Gele wurden dabei stets in Triplikaten hergestellt und untersucht. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Gele vorsichtig aus den zylindrischen Vertiefungen gelöst und vor der Charakterisierung für mindestens 24 Stunden in 0,01 M PBS-Puffer gequollen. Bei der Herstellung von vermeidlich

hydrolytisch labilen Hydrogelen wurden der pH-Wert des PBS-Puffers vor dem Quellen mit 1 M HCl-Lösung auf 7 eingestellt, um die Hydrolysegeschwindigkeit zu senken.

### **6.5.1. Präparation für die Zelleexperimente**

Die Präparation der Hydrogele für die Zelleexperimente erfolgte zunächst analog zu der regulären Herstellung durch das Ansetzen von Stammlösungen der thiolhaltigen Präpolymere und der Vernetzer.

Für eine Anwendung in 2-D Zelleexperimenten wurden die Hydrogele, wie zuvor beschrieben, durch das Mischen verschiedener Stammlösungen hergestellt. Nach der Zugabe des Aliquot der Vernetzer-Stammlösung wurden die Hydrogel-Lösung gründlich durchmischt und jeweils 200  $\mu\text{L}$  in die Vertiefung eines  $\mu$ -Dish (Firma Ibidi) überführt. Um ein gleichmäßiges Ausfüllen der Vertiefung zu erreichen, wurde mehrfach vorsichtig gegen den Rand des  $\mu$ -Dish gestoßen, bis eine gleichmäßige Verteilung des Gels erkennbar war. Die Präparation der Gele erfolgte in der Regel mindestens zwei Stunden vor der Auftragung der Zellen. Zur Auftragung der Zellen wurde eine COS-7-Zellsuspension (100 k bis 120 k Zellen/mL) aus einem Kultur-Medium verwendet. Es wurden jeweils 1 mL der Suspension vorsichtig auf die Oberfläche der Gele aufgetragen und diese für 15 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde jedem Dish ein zusätzlicher Milliliter Kultur-Medium hinzugegeben und die Gele für 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert.

Für die Herstellung der 3D-Hydrogele wurden die Stammlösungen der thiolhaltigen Präpolymere zusammen mit einer hoch konzentrierten Zellsuspension (400k bis 450k Zellen/mL), unter Berücksichtigung der späteren Geleigenschaften und Konzentrationen, vorsichtig vorsichtig gemischt. Diese Präpolymer-Zell-Suspensionen wurden dann mit Aliquoten der Vernetzer-Stammlösungen gemischt und jeweils 200  $\mu\text{L}$  in die Vertiefung eines  $\mu$ -Dishs überführt. Die Gele wurden dann für mindestens 30 Minuten unter Kulturbedingungen inkubiert, um eine möglichst fortgeschrittene Vernetzung der Gele zu gewährleisten. Im Anschluss wurden die Proben mit 2 mL Kultur-Medium vorsichtig überschichtet und für die gewünschte Dauer weiter inkubiert.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

Folgenden Abkürzungen wurden im Laufe der Arbeit verwendet:

Äq. = Äquivalente

AMor = Acryloylmorpholin

BMAC = *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin

BME = 1,2-Bis(Maleimido)ethan

Calcein-AM = Calcein-Acetoxymethylester

CROP = *engl.: cationic ring opening polymerization* (kationische Ringöffnungspolymerisation)

d = *engl.: days* (Tage)

DBB = 1,4-Dibrom-2-buten

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DMF = Dimethylformamid

DTT = Dithiothreitol

DVS = Divinylsulfon

eq. = Äquivalente

EthD-III = Ethidium Homodimer III

EtOx = 2-Ethyl-2-oxazolin

EZM = Extrazelluläre Matrix

GPC = Gel-Permeations-Chromatographie

h = *engl.: hours* (Stunden)

Live-Dead-... = lebend-tot-...

MetOx = 2-Methyl-2-oxazolin

min. = Minuten

PBS = *engl.: phosphate buffered saline*

PEG = Polyethylenglykol

PEGDA = Polyethylenglykoldiacrylat

PEtOx = Poly(2-ethyl-2-oxazolin)

PMetOx = Poly(2-methyl-2-oxazolin)

PMMA = Polymethylmethacrylat

POx = Polyoxazoline

POx-MI = Polyoxazolin-Präpolymere mit terminaler Maleimidfunktionalität

POx-SH = Polyoxazolin-Präpolymere mit terminaler Thiolfunktionalität

REM = Rasterelektronenmikroskopie

rt = Raumtemperatur

TBMB = 1,3,5-Tris-(brommethyl)-benzol

TMAEA = Trimethylaminoethylacrylat

V-70 = 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Darstellung des Vorgangs bei der Geweberegeneration. <sup>[10]</sup> .....   | 2  |
| <b>Abbildung 2:</b> Übersicht über einige Hydrogele als Plattformen für eine biomedizinische Anwendung; <b>A:</b> Mikrogele in einer Suspension, welche verschiedene immobilisierte, farbcodierte Moleküle enthält; <b>B:</b> Ein Mikrogel, welches weitere kleine, farbcodierte Mikrogele enthält; <b>C:</b> Fluoreszenz-markierte Zellen in einem Mikrogel eingeschlossen; <b>D:</b> Fibroblast-Zellen eingeschlossen in einem semi-synthetischen PEG-Fibrinogen Mikrogel; Maßstabsleisten entsprechen 500 $\mu\text{m}$ (modifiziert aus <sup>[31]</sup> ). ..... | 4  |
| <b>Abbildung 3:</b> Klassifizierung von Hydrogelen bezüglich ihrer Eigenschaften (modifiziert aus <sup>[34]</sup> ). .....   | 5  |
| <b>Abbildung 4:</b> Schematischer Vergleich zwischen den verschiedenen Abbaumechanismen von Hydrogelen, bezogen auf den Ort des Abbaus; <b>A)</b> Abbau des Netzwerks entlang der Polymerrückgrate; <b>B)</b> Abbau des Netzwerks nur an einzelnen labilen Positionen (orange). .....  | 8  |
| <b>Abbildung 5</b> Struktur des bifunktionellen Monomers BAC. ....   | 9  |
| <b>Abbildung 6:</b> Reduktive Spaltung von Disulfidbrücken zwischen zwei Polymerketten...9   |    |
| <b>Abbildung 7:</b> Funktionalisierung von thiolhaltigen Polymeren. ....   | 10 |
| <b>Abbildung 8:</b> Übersicht über die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. <sup>[61]</sup> .....   | 10 |
| <b>Abbildung 9</b> Übersicht über den Aufbau und die Funktionen eines Integrins. (Modifiziert aus <sup>[70]</sup> ) .....  | 12 |
| <b>Abbildung 10</b> Darstellung der Mechanismen der Integrin-vermittelten Zelladhäsion. <sup>[69]</sup> 12   |    |
| <b>Abbildung 11</b> Darstellung einer Integrin vermittelten Zelladhäsion an eine Oberfläche. <sup>[66]</sup> .....   | 13 |
| <b>Abbildung 12:</b> Überblick über das verwendete Hydrogelsystem und den allgemeinen Ablauf der Gelpräparation. ....  | 15 |
| <b>Abbildung 13:</b> Beispielhafte Darstellung für den hydrolytischen Abbau eines Oxazolinvernetzers in einem Hydrogel; <b>POx</b> = Poly(oxazolin)-Vernetzer.....   | 16 |
| <b>Abbildung 14:</b> Übersicht über die Struktur der Monomere, welche zur Herstellung der thiolhaltigen Präpolymere verwendet wurden. ....   | 17 |
| <b>Abbildung 15:</b> Übersicht über ein mögliches Vorgehen bei der Nutzung von disulfidhaltigen Vernetzern.....  | 18 |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Abbildung 16:</b> Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Hydrogelsystems. Thiolhaltige biofunktionalisierte Präpolymere werden mittels Michael-Addition von PEGDA vernetzt. ....  | 19 |
| <b>Abbildung 17:</b> Strukturformel des Vernetzers PEGDA <sub>3500</sub> .....  | 20 |
| <b>Abbildung 18:</b> Beispielhaftes <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines thiolhaltigen Präpolymers mit kationischer Ladung in D <sub>2</sub> O.....  | 22 |
| <b>Abbildung 19:</b> Schematische Darstellung der Hydrogelpräparation. ....   | 26 |
| <b>Abbildung 20</b> Übersicht über das Verhalten einer sinusförmigen Amplitude einer angelegten Schubspannung sowie deren Scherantwort in einem rheologischen Oszillationsexperiment (modifiziert aus <sup>[99]</sup> ). .... | 27 |
| <b>Abbildung 21:</b> Schematische Darstellung des KELVIN-Modells. ....  | 28 |
| <b>Abbildung 22:</b> Beispielhafte Messdaten eines rheologischen Oszillationsexperiments für ein PEGDA-vernetztes Hydrogel mit einer Konzentration von $\beta = 100$ mg/mL. ....  | 30 |
| <b>Abbildung 23:</b> Übersicht über das E-Modul der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA <sub>3500</sub> .....  | 34 |
| <b>Abbildung 24:</b> Übersicht über die Quellwerte ( $Q$ ) der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA <sub>3500</sub> .....   | 35 |
| <b>Abbildung 25:</b> Übersicht über den Gelanteil der Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Äquivalente an PEGDA <sub>3500</sub> .....  | 36 |
| <b>Abbildung 26:</b> Übersicht über das E-Modul der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration. ....   | 37 |
| <b>Abbildung 27:</b> Übersicht über die Quellwerte der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration. ....  | 39 |
| <b>Abbildung 28:</b> Übersicht über den Gelanteil der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration. ....   | 40 |
| <b>Abbildung 29:</b> Übersicht über die Gelierungszeit ( $t_{\text{Gel}}$ ) der Gele in Abhängigkeit der Gelkonzentration. ....   | 40 |
| <b>Abbildung 30:</b> Darstellung eines temporären Vernetzungspunktes durch Ion-Ion-Wechselwirkung. ....   | 42 |
| <b>Abbildung 31:</b> Übersicht über das E-Modul und die Quellwerte der Gele in Abhängigkeit ihrer Kationikkonzentration. ....   | 43 |
| <b>Abbildung 32:</b> Übersicht über den Vorgang zur Präparation der Hydrogele für die Rasterelektronenmikroskopie. ....   | 44 |

- Abbildung 33:** REM-Bilder von Querschnitten verschiedener PEGDA-vernetzer Hydrogele; Eigenschaften der einzelnen Hydrogele wie folgend: **A:**  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $\beta = 150$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 225$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **D:**  $\beta = 200$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 335$   $\mu\text{mol/mL}$ . .....45
- Abbildung 34:** Vergleich von REM-Bildern zwei verschiedener Hydrogelsysteme; **links:** PEGDA-vernetztes Hydrogelsystem mit Eigenschaften:  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 225$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **rechts:** pseudo-interpenetrierendes zwei-Phasen Hydrogelsystem von XIAO *et al.*; **roter Bereich:** geringe Konzentration an zwitterionischem Monomer; **blauer Bereich:** erhöhte Konzentration an zwitterionischem Monomer. (Teilausschnitt aus [117]) .....46
- Abbildung 35** REM-Bild eines PEGDA-vernetzten Hydrogels, welches kristalline Strukturen aufweist; Eigenschaften des Hydrogels:  $\beta = 200$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 335$   $\mu\text{mol/mL}$ . .....47
- Abbildung 36:** Abbaudiagramm eines PEGDA-vernetzten Hydrogels mit einer Konzentration von  $\beta = 100$  mg/mL und  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ . Das E-Modul der Gele zum Zeitpunkt  $t$  ( $E_t$ ) wurde gegen den Ausgangs E-Modul bei  $t = 0$  ( $E_0$ ) normalisiert aufgetragen. Abbau erfolgte in 0,01 M PBS-Puffer bei 37 °C. ....48
- Abbildung 37:** Übersicht über die Präparation der Hydrogele für die Zelleexperimente. .50
- Abbildung 38:** Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen in Kontakt mit einigen PEGDA-Hydrogele nach 24 h Inkubation unter Kulturbedingungen; **A<sub>1-3</sub>:** Zoom durch verschiedene Ebene eines 3D Hydrogels mit den Eigenschaften:  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ; Die Pfeile heben einzelne Zellen, welche sich in den jeweiligen Ebenen im Fokus befinden, hervor; **B:** Adhäririerte Zellen auf einem 2D PEGDA-Hydrogel; **C:** Nicht adhäririerte Zellen über einem 2D PEGDA-Hydrogel; **D:** Adhäririerte Zellen auf einer behandelten Zellkulturplatte aus Polystyrol. ....51
- Abbildung 39:** Exemplarische Bilder der Zellen nach der Anfärbung mit einem Life-Dead-Kit. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit EthD-III (rot) angefärbt; **A:** 2D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **B:** 2D-PEGDA-Gel,  $\beta = 200$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **C:** 3D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ ; **D:** 3D-PEGDA-Gel,  $\beta = 100$  mg/mL,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ . ....55
- Abbildung 40:** Exemplarische Bilder der COS7 Zellen auf verschiedenen Hydrogelen 24 h nach aufbringen der Zellen; Eigenschaften der Gele: **(A)**  $E = 8,5$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 90$   $\mu\text{mol/mL}$ , **(B)**  $E = 16,4$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 45$   $\mu\text{mol/mL}$ , **(C)**  $E = 8,7$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ , **(D)**  $E = 16,2$  kPa,  $c_{\text{kat}} = 0$   $\mu\text{mol/mL}$ . ....58

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abbildung 41:</b> Übersicht über die Ergebnisse der Zelladhäsionsexperimente in Abhängigkeit der Hydrogeleigenschaften.....   | <b>60</b> |
| <b>Abbildung 42:</b> Übersicht über den allgemeinen Aufbau des Hydrogelsystems; <b>blau</b> = Poly(oxazolin)-Rückgrat; <b>rot</b> = hydrolytisch labile Funktionalitäten. ....   | <b>65</b> |
| <b>Abbildung 43:</b> Übersicht über verschiedene Reaktionen zur Entschützung reaktiver Funktionalitäten in Poly(2-oxazolin)-Seitenketten (modifiziert aus <sup>[148]</sup> ). ....   | <b>67</b> |
| <b>Abbildung 44:</b> Strukturformeln der beiden Monomere 2-Methyl-2-oxazolin und 2-Ethyl-2-oxazolin. ....  | <b>68</b> |
| <b>Abbildung 45:</b> Mechanismus der kationischen Ringöffnungspolymerisation von 2-Oxazolin; Nuk = Nukleophil. <sup>[148]</sup> .....  | <b>70</b> |
| <b>Abbildung 46:</b> Übersicht über eine Auswahl verschiedener Terminierungsreaktionen bei einer CROP. <sup>[148]</sup> .....  | <b>71</b> |
| <b>Abbildung 47:</b> Beispiele für multifunktionelle Initiatoren. ....   | <b>71</b> |
| <b>Abbildung 48:</b> Schematische Übersicht über die Synthese der Oxazolin-basierten Vernetzer. ....   | <b>72</b> |
| <b>Abbildung 49:</b> Vergleich der Hydrolyseprodukte von verschieden aufgebauten Vernetzersystemen; <b>A)</b> Hydrolyse erfolgt an den Endgruppen des Vernetzers; <b>B)</b> Hydrolyse erfolgt am Initiator der Vernetzer; <b>C)</b> Hydrolyse erfolgt entlang des Polymerrückgrats der Vernetzer. .... | <b>73</b> |
| <b>Abbildung 50:</b> Exemplarisches <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum eine Acrylat-funktionalisierten trifunktionellen Polyoxazolins in CDCl <sub>3</sub> . ....   | <b>75</b> |
| <b>Abbildung 51:</b> Schematische Darstellung des Einflusses der Vernetzerlänge auf die Vernetzungseffizienz; <b>rot</b> = langer Vernetzerarm; <b>blau</b> = mittellanger Vernetzerarm; <b>grün</b> = kurzer Vernetzerarm. ....   | <b>80</b> |
| <b>Abbildung 52:</b> Abbaugraphen der Hydrogele aus den Oxazolinvernetzern <b>POx-1</b> , <b>POx-2</b> und <b>POx-3</b> . ....   | <b>81</b> |
| <b>Abbildung 53:</b> Schematische Darstellung des Ansatzes zur Verbesserung der Zugänglichkeit des hydrolytisch labilen Esters; <b>blau</b> = hydrolytisch labiler Ester, <b>rot</b> = Abstandshalter, <b>orange</b> = Michael-Akzeptor. ....  | <b>84</b> |
| <b>Abbildung 54:</b> Vergleich der Reaktivitäten verschiedener Michael-Akzeptor-Funktionalitäten. (Modifiziert aus <sup>[173]</sup> ) .....  | <b>84</b> |
| <b>Abbildung 55:</b> Beispielhaftes <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum eines trifunktionellen POx-SH aus PEtOx in CDCl <sub>3</sub> . ....  | <b>86</b> |
| <b>Abbildung 56:</b> Struktur der beiden bifunktionellen Michael-Akzeptor-Moleküle. ....   | <b>86</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Abbildung 57:</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des <b>POx-DVS</b> in $\text{CDCl}_3$ . .....  | 87  |
| <b>Abbildung 58:</b> Struktur des alternativen Funktionalisierungsreagenz 5-Maleimido-pentyl-acrylat ( <b>MaPenA</b> ). .....  | 89  |
| <b>Abbildung 59:</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des <b>POx-MaPenA</b> in $\text{CDCl}_3$ . .....   | 91  |
| <b>Abbildung 60:</b> Bearbeitetes DOSY-NMR-Spektrum des <b>POx-MaPenA</b> . .....  | 93  |
| <b>Abbildung 61:</b> Übersicht über die Struktur der neuen Vernetzerpolymere <b>POx-DVS</b> und <b>POx-MaPenA</b> . .....  | 94  |
| <b>Abbildung 62:</b> Abbaugraphen der Hydrogele aus den Oxazolinvernetzern <b>POx-DVS</b> und <b>POx-MaPenA</b> . .....  | 96  |
| <b>Abbildung 63:</b> Struktur der beiden etablierten Endgruppen ( <b>rot</b> ) für die Oxazolinvernetzersynthese. ....   | 98  |
| <b>Abbildung 64:</b> Struktur der untersuchten Oxazolinvernetzer mit variierenden EtOx-Wiederholungseinheiten. ....  | 99  |
| <b>Abbildung 65:</b> Übersicht über die E-Module der Hydrogele aus den Vernetzern mit unterschiedlichen Vernetzerlängen. ....  | 101 |
| <b>Abbildung 66:</b> Übersicht über die $t_{10\%}$ und die Abbaurate $E_0/d^{30}$ der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierenden Vernetzerlängen. ....  | 104 |
| <b>Abbildung 67:</b> Struktur der Oxazolinvernetzer mit variierender Copolymerzusammensetzung. ....  | 106 |
| <b>Abbildung 68:</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von <b>POx-9-MPDVS</b> in $\text{CDCl}_3$ . ....   | 107 |
| <b>Abbildung 69:</b> $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von <b>POx-10</b> in $\text{CDCl}_3$ . .....   | 111 |
| <b>Abbildung 70:</b> Struktur der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit variierender Endgruppe und Länge. ....   | 112 |
| <b>Abbildung 71:</b> Übersicht über die E-Module der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern. ....  | 113 |
| <b>Abbildung 72:</b> Übersicht über die $t_{10\%}$ und die Abbaurate $E_0/d^{30}$ der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern. ....   | 116 |
| <b>Abbildung 73:</b> Übersicht über die E-Module und Abbaugeschwindigkeiten eine Auswahl von Hydrogelen mit einer Konzentration von $\beta = 100$ mg/mL, welche durch den Einsatz verschiedener Oxazolinvernetzer gebildet wurden; Vernetzer welche zur Bildung der Hydrogele genutzt wurden: <b>blau</b> = <b>POx-3</b> , <b>grün</b> = <b>POx-8-MPDVS</b> , <b>lila</b> = <b>POx-10</b> , <b>orange</b> = <b>POx-6-MPDVS</b> , <b>türkise</b> = <b>POx-DVS</b> , <b>rot</b> = <b>POx-11</b> , <b>grau</b> = <b>POx-13-MPDVS</b> . .... | 117 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abbildung 74:</b> Schematische Darstellung des Hydrogelsystems von ZUSTIAK <i>et al.</i> ; <b>A:</b> 4-arm PEG wird mit bioaktiven Liganden funktionalisiert; <b>B:</b> Funktionalisiertes PEG wird mit bifunktionellen abbaubaren PEG-Vernetzern in der Anwesenheit von Zellen umgesetzt; <b>C:</b> Zellen sind in einem dreidimensionalen biofunktionalisiertem Hydrogel eingeschlossen (modifiziert aus <sup>[184]</sup> ). .....   | <b>118</b> |
| <b>Abbildung 75:</b> Schematische Übersicht über den selektiven Abbau von Hydrogelen mit gemischten Vernetzern.....   | <b>119</b> |
| <b>Abbildung 76:</b> Übersicht über die E-Module der Hydrogele in Abhängigkeit des <b>POx-10/11</b> -Anteils der Vernetzer.....   | <b>121</b> |
| <b>Abbildung 77:</b> Abbaugraphen der Hydrogele mit verschiedenen <b>POx-11</b> -Anteilen der Vernetzer.....  | <b>122</b> |
| <b>Abbildung 78:</b> REM-Bilder von Querschnitten verschiedener Hydrogele; zur Gelierung eingesetzte Vernetzer und Gelkonzentrationen: <b>A:</b> POx-5-MPDVS, $\beta = 100$ mg/mL; <b>B:</b> POx-5-MPDVS $\beta = 200$ mg/mL; <b>C:</b> POx-13-MPDVS, $\beta = 150$ mg/mL; <b>D:</b> PEGDA <sub>3500</sub> , $\beta = 100$ mg/mL. ....  | <b>123</b> |
| <b>Abbildung 79:</b> Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf verschiedenen Hydrogelen 24 Stunden nach Aufbringen der Zellen; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Gele: <b>A:</b> POx-5, $E = 1,7$ kPa; <b>B:</b> POx-5, $E = 5,2$ kPa; <b>C:</b> POx-5, $E = 9$ kPa; <b>D:</b> PEGDA <sub>3500</sub> , $E = 14,7$ kPa, $c_{\text{kat}} = 90$ $\mu\text{mol/mL}$ .....   | <b>125</b> |
| <b>Abbildung 80:</b> Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf verschiedenen Oxazolin- vernetzten Hydrogelen 24 h nach aufbringen der Zellen; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Gele: <b>A:</b> POx-5, $E = 1,8$ kPa, $c_{\text{kat}} = 45$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B:</b> POx-5, $E = 5,3$ kPa, $c_{\text{kat}} = 90$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>C:</b> POx-5, $E = 9,6$ kPa, $c_{\text{kat}} = 90$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>D:</b> vergrößerte Aufnahme von Gel <b>C</b> ; <b>E:</b> einzelne, nicht-adhärenente COS-7-Zelle.....   | <b>127</b> |
| <b>Abbildung 81:</b> Exemplarische Bilder von COS-7-Zellen auf Oxazolin- vernetzten Hydrogelen nach der Anfärbung mit einem Life-Dead-Kit. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM ( <b>grün</b> ) und tote Zellen mit EthD-III ( <b>rot</b> ) angefärbt; verwendeter Vernetzer und Eigenschaften der Hydrogele: <b>A:</b> POx-5, $E = 9$ kPa; $c_{\text{kat}} = 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B:</b> POx-5, $E = 1,8$ kPa, $c_{\text{kat}} = 45$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>C:</b> POx-5, $E = 5,3$ kPa, $c_{\text{kat}} = 90$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>D:</b> POx-5, $E = 9,9$ kPa, $c_{\text{kat}} = 90$ $\mu\text{mol/mL}$ . .... | <b>129</b> |
| <b>Abbildung 82</b> Ausgewählte Aufnahmen der Viabilitätstests in Gegenwart der Hydrogel- Medien mit unterschiedlicher Konzentration; Konzentration der Hydrogel-Medien: <b>A:</b> 10 mg/mL; <b>B:</b> 20 mg/mL; <b>C:</b> 40 mg/mL; <b>D:</b> 0 mg/mL, reines Kultur-Medium wurde verwendet.....   | <b>130</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Abbildung 83:</b> Zoom durch verschiedene Ebenen eines 3D-Hydrogels, welches mit <b>POx-6-MPDVS</b> vernetzt worden ist und folgende Eigenschaften besitzt: $\beta = 100$ mg/mL, $E = 3,7$ kPa, $c_{\text{kat}} = 45$ $\mu\text{mol/mL}$ ; Zellen wurden mit Live-Dead-Färbung <b>grün</b> (lebendig) und <b>rot</b> (tot) angefärbt; Pfeile weisen auf Zellen hin, welche sich in der jeweiligen Ebene im Fokus befinden.....  | <b>131</b> |
| <b>Abbildung 84:</b> Exemplarische Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus <b>POX-5-MPVDS</b> nach 24 Stunden Inkubationszeit; Funktionalisierung der Gele: <b>A:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 0 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>C:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 10$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>D:</b> Hydrogel wurde vor der Aufnahme für fünf Minuten mit einer 90%iger-Ethanol-Lösung behandelt. ....  | <b>134</b> |
| <b>Abbildung 85:</b> Exemplarische Aufnahmen von COS-7-Zellen in 3D-Hydrogelen nach 24 Stunden Inkubationszeit; Vernetzer und Funktionalisierung der Gele: <b>A1-3:</b> POx-5-MPDVS, <b>A1:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 0 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>A2:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>A3:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 10$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B1-3:</b> POx-13-MPDVS, <b>B1:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 0 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B2:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B3:</b> $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 10$ $\mu\text{mol/mL}$ . .... | <b>135</b> |
| <b>Abbildung 86:</b> Exemplarische Aufnahmen von COS-7-Zellen in 3D-Hydrogelen nach 1-7 Tagen Inkubationszeit; Bezeichnung <b>A/B<sub>x</sub></b> entspricht Aufnahmen zum Zeitpunkt x (mit Werten von x = 1/3/7 Tagen); Vernetzer und Funktionalisierung der Gele: <b>A1-7:</b> POx-5-MPDVS, $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 0$ $\mu\text{mol/mL}$ ; <b>B1-7:</b> POx-13-MPDVS, $c_{\text{kat}} c_{\text{pep}} = 45 0$ $\mu\text{mol/mL}$ . ...   | <b>137</b> |
| <b>Abbildung 87:</b> Übersicht über den Aufbau des PEGDA <sub>3500</sub> -vernetzten Hydrogelsystems. ....   | <b>140</b> |
| <b>Abbildung 88:</b> Übersicht über die Hydrogeleigenschaften der PEGDA <sub>3500</sub> -Gele in Abhängigkeit der eingesetzten Gel- und Kationikkonzentration. ....  | <b>141</b> |
| <b>Abbildung 89:</b> Übersicht über einige Ergebnisse der Zellexperimente mit den PEGDA-Systemen. ....   | <b>142</b> |
| <b>Abbildung 90:</b> Übersicht über die Struktur der neuen Oxazolin-basierten Vernetzersysteme. ....   | <b>142</b> |
| <b>Abbildung 91:</b> Übersicht über die E-Module und Abbaugeschwindigkeiten eine Auswahl von Hydrogelen mit einer Konzentration von $\beta = 100$ mg/mL, welche durch den Einsatz verschiedener Oxazolinvernetzer gebildet wurden; Vernetzer welche zur Bildung der Hydrogele genutzt wurden: <b>blau</b> = POx-3, <b>grün</b> = POx-8-MPDVS, <b>lila</b> = POx-10, <b>orange</b> = POx-6-MPDVS, <b>türkise</b> = POx-DVS, <b>rot</b> = POx-11, <b>grau</b> = POx-13-MPDVS. ....   | <b>143</b> |
| <b>Abbildung 92:</b> Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchung der gemischten POx-PEGDA-Systeme. ....   | <b>144</b> |

**Abbildung 93:** Exemplarische Auswahl einiger Aufnahmen der durchgeführten Zellexperimente mit COS-7-Zellen; **A:** Zellen, welche innerhalb eines 3D-Hydrogels gleichmäßig eingeschlossen wurden. Die Pfeile heben einzelne Zellen hervor, welche sich in der aktuellen Ebene im Fokus befinden; **B:** Aufnahme von COS-7-Zellen auf einem 2D-Hydrogel, Zellen wurden mithilfe einer Live-Dead-Färbung **grün** (lebendig) oder **rot** (tot) gefärbt. ....144

**Abbildung 94:** Struktur des Peptids MIC-AHX-YGRGDS .....155

### 7.3. Schemataverzeichnis

**Schema 1:** Syntheschema der thiolhaltigen Präpolymere.....20

**Schema 2:** Reaktionsschema der reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken mit DTT. ....21

**Schema 3:** Umsetzung von DTNB<sup>2-</sup> mit einer Thiofunktionalität unter Freisetzung eines 2-Nitro-5-thiobenzoat-Anions.<sup>[95]</sup> .....23

**Schema 4:** Beispielhaftes Schema für die partielle Funktionalisierung eines Präpolymers mit einem RGD-Peptid. ....25

**Schema 5:** Reaktionsschema der Esterspaltung durch Esterasen im Inneren von lebendigen Zellen.<sup>[127]</sup> .....53

**Schema 6:** Syntheschema der „proof-of-concept“ Vernetzerpolymere. ....74

**Schema 7:** Syntheschema des ersten Schrittes der optimierten Oxazolinvernetzersynthese. ....85

**Schema 8:** Reaktionsschema der Funktionalisierung von POx-SH mit DVS.....87

**Schema 9:** Reaktionsschema zur Synthese von 5-Maleimido-pentyl-acrylat (MaPenA). 90

**Schema 10:** Reaktionsschema der Funktionalisierung des **POx-SH** mit MaPenA, um das **POx-MaPenA** zu erhalten. ....90

**Schema 11:** Syntheschema der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit Acrylat-Endgruppe. ....110

**Schema 12:** Syntheschema der bifunktionellen Oxazolinvernetzer mit MPDVS-Endgruppe. ....110

**Schema 13:** Reaktionsschema der Synthese von *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamin. ....149

**Schema 14:** Reaktionsschema der Synthese von Trimethylaminoethylacrylat. ....149

**Schema 15:** Reaktionsschema der Synthese von PEGDA<sub>3500</sub>. ....150

**Schema 16:** Reaktionsschema der Synthese von 1,2-Bis(Maleimido)ethan. ....151

|  |            |
|--|------------|
| <b>Schema 17:</b> Reaktionsschema der Synthese von 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]dec-8-en-3,5-dion. ....                          | <b>151</b> |
| <b>Schema 18:</b> Reaktionsschema der Synthese von (4R,7S)-2-(5-hydroxypentyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-dion. ....    | <b>152</b> |
| <b>Schema 19:</b> Reaktionsschema der Synthese von 5-((4R,7S)-1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl)pentyl-acrylat. .... | <b>152</b> |
| <b>Schema 20:</b> Reaktionsschema der Synthese von 5-Maleimido-pentyl-acrylat. ....  | <b>153</b> |

## 7.4. Tabellenverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die analytischen Daten der Copolymere <b>P<sub>SH1</sub></b> bis <b>P<sub>SH5</sub></b> . ....                  | <b>24</b>  |
| <b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele mit verschiedenen Äquivalenten an PEGDA-Vernetzer. ....                                 | <b>33</b>  |
| <b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele mit unterschiedlicher Gelkonzentration. ....  | <b>37</b>  |
| <b>Tabelle 4:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele mit unterschiedlicher Kationikkonzentration. ....                                       | <b>41</b>  |
| <b>Tabelle 5:</b> Übersicht über die Daten der zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens eingesetzten Hydrogele. ....                             | <b>57</b>  |
| <b>Tabelle 6:</b> Übersicht über die ermittelten Daten der „proof-of-concept“ Polymere. ....   | <b>76</b>  |
| <b>Tabelle 7:</b> Übersicht über die Daten der ersten Oxazolin-vernetzten Hydrogele. ....  | <b>78</b>  |
| <b>Tabelle 8:</b> Übersicht über die Daten der beiden funktionalisierten Oxazolinvernetzer <b>POx-DVS</b> und <b>POx-MI</b> . ....               | <b>88</b>  |
| <b>Tabelle 9:</b> Übersicht über die Eigenschaften der Hydrogele aus den Vernetzern <b>POx-DVS</b> und <b>POx-MaPenA</b> . ....                  | <b>95</b>  |
| <b>Tabelle 10:</b> Übersicht über die Daten der Oxazolinvernetzer mit variierenden Kettenlängen. ....  | <b>99</b>  |
| <b>Tabelle 11:</b> Übersicht über die Eigenschaften der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierenden Kettenlängen. ....                         | <b>100</b> |
| <b>Tabelle 12:</b> Übersicht über die Daten der Abbauxperimente der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Vernetzerlänge. ....           | <b>103</b> |
| <b>Tabelle 13:</b> Übersicht über die Daten der Oxazolinvernetzer mit variierender Copolymerzusammensetzung. ....                                | <b>107</b> |
| <b>Tabelle 14:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung. ....                     | <b>108</b> |
| <b>Tabelle 15:</b> Übersicht über die Daten der Abbauxperimente der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung. .... | <b>109</b> |
| <b>Tabelle 16:</b> Übersicht über die Daten der bifunktionellen Oxazolinvernetzer. ....  | <b>111</b> |

|   |            |
|---|------------|
| <b>Tabelle 17:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern. ....      | <b>113</b> |
| <b>Tabelle 18:</b> Übersicht über die Abbaudaten der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzern. .... | <b>115</b> |
| <b>Tabelle 19:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele mit variierenden POx-Anteilen. ..             | <b>120</b> |
| <b>Tabelle 20:</b> Übersicht über Abbaudaten der Hydrogele mit variierenden POx-11-Anteilen. ....       | <b>121</b> |
| <b>Tabelle 21:</b> Übersicht über die Daten der Hydrogele für die 7-Tage-Zelleexperimente. .            | <b>133</b> |

## 7.5. Gleichungsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>Gleichung 1:</b> Normierung der Integralflächen der Monomersignale auf die Anzahl an zugeordneten Wasserstoffatomen. ....       | <b>22</b>  |
| <b>Gleichung 2:</b> Berechnung der Monomeranteile aus den normierten <sup>1</sup> H-NMR-Signalen. <b>23</b>                        | <b>23</b>  |
| <b>Gleichung 3:</b> Berechnung des Thiolgehalts der Polymere aus den Ergebnissen des Ellman's Assays. ....                         | <b>24</b>  |
| <b>Gleichung 4:</b> Sinusförmige Schubspannung, welche auf das Gel appliziert wird. ....   | <b>27</b>  |
| <b>Gleichung 5:</b> Die durch die Gele übertragene Scherantwort. ....  | <b>27</b>  |
| <b>Gleichung 6:</b> Beschreibung der Gesamtschubspannung im KELVIN-Modell. ....  | <b>28</b>  |
| <b>Gleichung 7:</b> Beschreibung des HOOK'schen Teils der Schubspannung. ....  | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 8:</b> Beschreibung des NEWTON'schen Teils der Schubspannung. ....  | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 9:</b> Ausführliche Beschreibung des Gesamtschubs unter Berücksichtigung der beiden parallel geschalteten Teile. .... | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 10:</b> Beschreibung des komplexen Schubmoduls. ....  | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 11:</b> Beschreibung des Speichermoduls. ....   | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 12:</b> Beschreibung des Verlustmoduls. ....  | <b>29</b>  |
| <b>Gleichung 13:</b> Beschreibung des Verlustfaktors. ....   | <b>30</b>  |
| <b>Gleichung 14:</b> Beschreibung des E-Moduls unter Verwendung der Poisson-Zahl. ....   | <b>31</b>  |
| <b>Gleichung 15:</b> Vereinfachte Beschreibung des E-Moduls. ....  | <b>31</b>  |
| <b>Gleichung 16:</b> Beschreibung des Quellwertes. ....  | <b>31</b>  |
| <b>Gleichung 17:</b> Beschreibung des Gelanteils. ....   | <b>31</b>  |
| <b>Gleichung 18:</b> Berechnung des Molekulargewichts der Oxazolinvernetzer. ....  | <b>76</b>  |
| <b>Gleichung 19:</b> Berechnung des Funktionalisierungsgrads der Oxazolinvernetzer. ....   | <b>76</b>  |
| <b>Gleichung 20:</b> Beschreibung der Signalintensität eines NMR-Signals in Anwesenheit eines externen Gradientenimpulses. ....    | <b>92</b>  |
| <b>Gleichung 21:</b> Stokes-Einstein-Gleichung. ....   | <b>92</b>  |
| <b>Gleichung 22:</b> Berechnung der Harzbeladung bei der Peptidsynthese. ....  | <b>154</b> |



## 7.6. Literaturverzeichnis

- [1] M. D. Lechner, K. Gehrke, E. H. Nordmeier, *Makromolekulare Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [2] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487–492.
- [3] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23.
- [4] P. X. Ma, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 184–198.
- [5] W. H. De Jong, P. J. A. Borm, *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 133–149.
- [6] T. M. Allen, P. R. Cullis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 36–48.
- [7] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1869–1879.
- [8] R. Cruz-Acuña, A. J. García, *Matrix Biol.* **2017**, *57–58*, 324–333.
- [9] S. D. Blostein, H. S. Richardson, *IEEE Trans. Aerosp. Electron. Syst.* **1994**, *30*, 197–212.
- [10] G. R. D. Evans, “Tissue engineering,” DOI 10.1016/S0094-1298(03)00066-X can be found under [https://de.wikipedia.org/wiki/Tissue\\_Engineering](https://de.wikipedia.org/wiki/Tissue_Engineering), **2003**.
- [11] Y. Ikada, *J. R. Soc. Interface* **2006**, *3*, 589–601.
- [12] Y. Cao, J. P. Vacanti, K. T. Paige, J. Upton, C. A. Vacanti, *Plast. Reconstr. Surg.* **1997**, *100*, 297–304.
- [13] S. Wakitani, T. Kimura, A. Hirooka, T. Ochi, M. Yoneda, N. Yasui, H. Owaki, K. Ono, *J. Bone Jt. Surg. - Ser. B* **1989**, *71*, 74–80.
- [14] M. Gajendiran, J. Choi, S. J. Kim, K. Kim, H. Shin, H. J. Koo, K. Kim, *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, *51*, 12–26.
- [15] D. Brahatheeswaran, Y. Yasuhiko, M. Toru, K. D. Sakthi, *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, *2011*, 19.
- [16] J. Radhakrishnan, U. M. Krishnan, S. Sethuraman, *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 449–461.
- [17] A. Sivashanmugam, R. Arun Kumar, M. Vishnu Priya, S. V. Nair, R. Jayakumar, *Eur. Polym. J.* **2015**, *72*, 543–565.
- [18] S. C. Cox, J. A. Thornby, G. J. Gibbons, M. A. Williams, K. K. Mallick, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *47*, 237–247.
- [19] I. Denry, L. T. Kuhn, *Dent. Mater.* **2016**, *32*, 43–53.
- [20] E. Entekhabi, M. Haghbin Nazarpak, F. Moztarzadeh, A. Sadeghi, *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *69*, 380–387.
- [21] H. Wang, Z. Liu, D. Li, X. Guo, F. K. Kasper, C. Duan, J. Zhou, A. G. Mikos, C. Wang, *J. Cell. Mol. Med.* **2012**, *16*, 1310–1320.

- [22] A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 3–12.
- [23] M. S. Chapekar, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *53*, 617–620.
- [24] D. Lü, C. Luo, C. Zhang, Z. Li, M. Long, *Biomaterials* **2014**, *35*, 3945–3955.
- [25] M. B. Rahmany, M. Van Dyke, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5431–5437.
- [26] M. Stadtfeld, K. Hochedlinger, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 2239–2263.
- [27] D. A. Robinton, G. Q. Daley, *Nature* **2012**, *481*, 295–305.
- [28] I. Levental, P. C. Georges, P. A. Janmey, *Soft Matter* **2007**, *3*, 299–306.
- [29] J. Thiel, G. Maurer, J. M. Prausnitz, *Chemie Ing. Tech.* **1995**, *67*, 1567–1583.
- [30] J. A. Yang, J. Yeom, B. W. Hwang, A. S. Hoffman, S. K. Hahn, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 1973–1986.
- [31] D. Seliktar, *Science (80-. )*. **2012**, *336*, 1124–1128.
- [32] N. A. Peppas, A. S. Hoffman, *Biomater. Sci.* **2020**, 153–166.
- [33] O. Wichterle, D. Lím, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [34] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H. M. Akil, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 414–433.
- [35] C. S. Hughes, L. M. Postovit, G. A. Lajoie, *Proteomics* **2010**, *10*, 1886–1890.
- [36] O. Z. Fisher, A. Khademhosseini, R. Langer, N. A. Peppas, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 419–428.
- [37] N. H. Romano, D. Sengupta, C. Chung, S. C. Heilshorn, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2011**, *1810*, 339–349.
- [38] I. Levental, P. C. Georges, P. A. Janmey, *Soft Matter* **2007**, *3*, 299–306.
- [39] M. Kar, Y. R. Vernon Shih, D. O. Velez, P. Cabrales, S. Varghese, *Biomaterials* **2016**, *77*, 186–197.
- [40] J. J. Rice, M. M. Martino, L. De Laporte, F. Tortelli, P. S. Briquez, J. A. Hubbell, *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 57–71.
- [41] Y. Jiang, J. Chen, C. Deng, E. J. Suuronen, Z. Zhong, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4969–4985.
- [42] A. Sosnik, M. V. Sefton, *Biomaterials* **2005**, *26*, 7425–7435.
- [43] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chemie* **2010**, *122*, 1584–1617.
- [44] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chemie* **2004**, *116*, 3168–3178.
- [45] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 7108–7133.
- [46] S. Dobner, D. Bezuidenhout, P. Govender, P. Zilla, N. Davies, *J. Card. Fail.* **2009**, *15*, 629–636.

- 
- [47] P. D. Rios, X. Zhang, X. Luo, L. D. Shea, *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 2485–2495.
- [48] S. G. Marapureddy, P. Thareja, in *Biointerface Eng. Prospect. Med. Diagnostics Drug Deliv.*, Springer, Singapore, **2020**, pp. 75–99.
- [49] G. Pasut, F. M. Veronese, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 933–961.
- [50] P. M. Kharkar, K. L. Kiick, A. M. Kloxin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7335–7372.
- [51] M. P. Lutolf, J. L. Lauer-Fields, H. G. Schmoekel, A. T. Metters, F. E. Weber, G. B. Fields, J. A. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5413–5418.
- [52] Y. S. Jo, J. Gantz, J. A. Hubbell, M. P. Lutolf, *Soft Matter* **2009**, *5*, 440–446.
- [53] S. Mondal, S. Das, A. K. Nandi, *Soft Matter* **2020**, *16*, 1404–1454.
- [54] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 237–280.
- [55] J. N. Hansen, *Anal. Biochem.* **1976**, *76*, 37–44.
- [56] N. Hisano, N. Morikawa, H. Iwata, Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 115–123.
- [57] R. E. Hansen, H. Østergaard, P. Nørgaard, J. R. Winther, *Anal. Biochem.* **2007**, *363*, 77–82.
- [58] S. Matsumura, A. R. Hlil, C. Lepiller, J. Gaudet, D. Guay, Z. Shi, S. Holdcroft, A. S. Hay, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 7207–7224.
- [59] B. Gyarmati, B. Vajna, Á. Némethy, K. László, A. Szilágyi, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 633–640.
- [60] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, N. K. Karamanos, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 4–27.
- [61] S. Hamacher, S. Matern, E. Roeb, *Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **2004**, *129*, 1976–1980.
- [62] C. Frantz, K. M. Stewart, V. M. Weaver, *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4195–4200.
- [63] J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, L. Robert, *FEBS Lett.* **1990**, *268*, 386–393.
- [64] R. P. Mecham, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2012**, *57*, 10.1.1-10.1.16.
- [65] D. A. C. Walma, K. M. Yamada, *Development* **2020**, *147*, 1–17.
- [66] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [67] I. Laitinen, J. Notni, K. Pohle, M. Rudelius, E. Farrell, S. G. Nekolla, G. Henriksen, S. Neubauer, H. Kessler, H. J. Wester, M. Schwaiger, *EJNMMI Res.* **2013**, *3*, 1–9.
- [68] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. G. Kapp, H. Kessler, *Angew. Chemie* **2016**, *128*, 7162–7183.
-

- [69] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. G. Kapp, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7048–7067.
- [70] D. Docheva, C. Popov, W. Mutschler, M. Schieker, *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, *11*, 21–38.
- [71] R. Fraioli, K. Dashnyam, J. H. Kim, R. A. Perez, H. W. Kim, J. Gil, M. P. Ginebra, J. M. Manero, C. Mas-Moruno, *Acta Biomater.* **2016**, *43*, 269–281.
- [72] F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fassler, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1572–1575.
- [73] R. S. Ross, T. K. Borg, *Circ. Res.* **2001**, *88*, 1112–1119.
- [74] J. L. Alonso, W. H. Goldmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *421*, 245–248.
- [75] P. Roca-Cusachs, N. C. Gauthier, A. Del Rio, M. P. Sheetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 16245–16250.
- [76] L. Dolat, J. L. Hunyara, J. R. Bowen, E. P. Karasmanis, M. Elgawly, V. E. Galkin, E. T. Spiliotis, *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 225–235.
- [77] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [78] M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H. J. Wester, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969–980.
- [79] J. Vagner, H. Qu, V. J. Hruby, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292–296.
- [80] P. Bolduan, *Dissertation* **2018**, Technische Universität Dortmund.
- [81] E. Ranucci, G. Spagnoli, L. Sartore, P. Ferruti, P. Caliceti, O. Schiavon, F. M. Veronese, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 3469–3479.
- [82] Y. S. Jo, A. J. Van Der Vlies, J. Gantz, S. Antonijevic, D. Demurtas, D. Velluto, J. A. Hubbell, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1140–1150.
- [83] H. A. Aliyar, P. D. Hamilton, N. Ravi, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 204–211.
- [84] D. Pallarola, A. Bochen, H. Boehm, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, J. P. Spatz, H. Kessler, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 943–956.
- [85] F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1572–1575.
- [86] S. Zheng, Y. Guan, H. Yu, G. Huang, C. Zheng, *New J. Chem.* **2019**, *43*, 9989–10002.
- [87] H. Lu, L. Guo, N. Kawazoe, *J. Biomater. Sci.* **2012**, *20*, 577–589.
- [88] E. Yavin, Z. Yavin, *J. Cell Biol.* **1974**, *62*, 540–546.
- [89] PerkinElmer, “Plate Treatments, Coatings and Applications,” can be found under

- <https://www.perkinelmer.com/de/lab-products-and-services/application-support-knowledgebase/microplates/plate-treatments.html>, **2021**.
- [90] M. Sallouh, M. Jarocki, O. Sallouh, P. Degen, A. Faissner, R. Weberskirch, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600178.
- [91] M. Zhang, X. H. Li, Y. D. Gong, N. M. Zhao, X. F. Zhang, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2641–2648.
- [92] E. M. Moore, G. Ying, J. L. West, *Adv. Biosyst.* **2017**, *1*, 1600021.
- [93] H. W. Chien, W. B. Tsai, S. Jiang, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5706–5712.
- [94] S. D. Dimitrov, N. C. Dimitrova, J. D. Walker, G. D. Veith, O. G. Mekenyan, in *QSAR Comb. Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, **2003**, pp. 58–68.
- [95] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443–450.
- [96] G. Odian, *Principles of Polymerization*, Wiley-Interscience, **2004**.
- [97] C. Yan, D. J. Pochan, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3528–3540.
- [98] G. M. Kavanagh, S. B. Ross-Murphy, *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 533–562.
- [99] V. A. Hackley, “Rheologisches Oszillationsexperiment,” can be found under <https://ciks.cbt.nist.gov/~garboocz/SP946/node11.htm>, **2017**.
- [100] A. I. I. Alexander Y. Malkin, *Rheology: Concepts, Methods, and Applications*, ChemTec Publishing, **2017**.
- [101] W. C. Haneberg, *The Rock Physics Handbook*, Cambridge University Press, **1999**.
- [102] S. Q. Liu, Q. Tian, J. L. Hedrick, J. H. Po Hui, P. L. Rachel Ee, Y. Y. Yang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 7298–7307.
- [103] T. Fekete, J. Borsa, E. Takács, L. Wojnárovits, *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*, 46.
- [104] M. T. S. Alcântara, A. J. C. Brant, D. R. Giannini, J. O. C. P. Pessoa, A. B. Andrade, H. G. Riella, A. B. Lugão, *Radiat. Phys. Chem.* **2012**, *81*, 1465–1470.
- [105] Y. Sun, Y. Huang, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2768–2775.
- [106] A. Zahoranová, Z. Kroneková, M. Zahoran, D. Chorvát, I. Janigová, J. Kronek, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2016**, *54*, 1548–1559.
- [107] Z. Xu, K. M. Bratlie, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4*, 2276–2291.
- [108] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345–1360.
- [109] C. F. Guimarães, L. Gasperini, A. P. Marques, R. L. Reis, *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 351–370.
- [110] G. Nie, L. Wu, Y. Du, H. Wang, Y. Xu, Z. Ding, Z. Liu, *Chem. Eng. J.* **2019**, *360*, 1128–1136.

- [111] H. Qiao, L. Mei, G. Chen, H. Liu, C. Peng, F. Ke, R. Hou, X. Wan, H. Cai, *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *483*, 114–122.
- [112] A. S. Woods, S. C. Moyer, S. N. Jackson, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3423–3427.
- [113] W. F. Lee, C. H. Hsu, *Polymer (Guildf)*. **1998**, *39*, 5393–5403.
- [114] S. K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D. L. Kaplan, E. Chiellini, C. van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7147–7194.
- [115] H. Günzler, *Analytiker Taschenbuch*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **2000**.
- [116] S. Xiao, Y. Yang, M. Zhong, H. Chen, Y. Zhang, J. Yang, J. Zheng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 20843–20851.
- [117] S. Xiao, M. Zhang, X. He, L. Huang, Y. Zhang, B. Ren, M. Zhong, Y. Chang, J. Yang, J. Zheng, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 21642–21653.
- [118] M. B. Browning, S. N. Cereceres, P. T. Luong, E. M. Cosgriff-Hernandez, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2014**, *102*, 4244–4251.
- [119] Z. Stillman, B. M. Jarai, N. Raman, P. Patel, C. A. Fromen, *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 568–580.
- [120] ibidi GmbH, “ $\mu$ -Dish, supporting material,” can be found under [https://ibidi.com/img/cms/products/labware/open\\_standard/D\\_811XX\\_Dish\\_35mmhigh/IN\\_811XX\\_Dish35mm\\_high.pdf](https://ibidi.com/img/cms/products/labware/open_standard/D_811XX_Dish_35mmhigh/IN_811XX_Dish35mm_high.pdf), **2021**.
- [121] Y. Gluzman, *Cell* **1981**, *23*, 175–182.
- [122] W. Wei, J. Li, X. Qi, Y. Zhong, G. Zuo, X. Pan, T. Su, J. Zhang, W. Dong, *Carbohydr. Polym.* **2017**, *177*, 275–283.
- [123] C. Chang, N. Peng, M. He, Y. Teramoto, Y. Nishio, L. Zhang, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 7–13.
- [124] H. Liu, J. Liu, C. Qi, Y. Fang, L. Zhang, R. Zhuo, X. Jiang, *Acta Biomater.* **2016**, *35*, 228–237.
- [125] X. Cheng, J. Liu, L. Wang, R. Wang, Z. Liu, R. Zhuo, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 101334–101346.
- [126] Y. Li, D. Maciel, J. Rodrigues, X. Shi, H. Tomás, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8564–8608.
- [127] J. E. Scott, *Conn’s Biological Stains. A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine*, BIOS Scientific Publisher, Oxford, UK, **2003**.
- [128] K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V. Schaffer, K. E. Healy, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4426–4438.
- [129] S. Tietze, A. Hofmann, S. Wolk, C. Reeps, *Gefasschirurgie* **2020**, *25*, 244–248.
- [130] K. Weissenbruch, M. Hippler, M. Bastmeyer, *BioSpektrum* **2021**, *27*, 385–389.
- [131] Y. Xia, H. Wu, D. Tang, S. Gao, B. Chen, Z. Zeng, S. Wang, M. Cao, D. Li, *Macromol. Res.* **2019**, *27*, 679–685.

- 
- [132] S. Gurunathan, J. H. Kim, *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 1927–1945.
- [133] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308.
- [134] B. Romberg, J. M. Metselaar, L. Baranyi, C. J. Snel, R. Büniger, W. E. Hennink, J. Szebeni, G. Storm, *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 186–189.
- [135] S. M. Moghimi, J. Szebeni, *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 463–478.
- [136] M. D. McSweeney, L. Shen, A. C. DeWalle, J. B. Joiner, E. C. Ciociola, D. Raghuvanshi, M. S. Macauley, S. K. Lai, *J. Control. Release* **2021**, *329*, 774–781.
- [137] J. K. Armstrong, G. Hempel, S. Kolling, L. S. Chan, T. Fisher, H. J. Meiselman, G. Garratty, *Cancer* **2007**, *110*, 103–111.
- [138] Q. Yang, S. K. Lai, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2015**, *7*, 655–677.
- [139] C. Dingels, M. Schömer, H. Frey, *Chemie Unserer Zeit* **2011**, *45*, 338–349.
- [140] A. A. Fisher, *Contact Dermatitis* **1978**, *4*, 135–138.
- [141] R. Hoogenboom, *Angew. Chemie* **2009**, *121*, 8122–8138.
- [142] T. Lorson, M. M. Lübtow, E. Wegener, M. S. Haider, S. Borova, D. Nahm, R. Jordan, M. Sokolski-Papkov, A. V. Kabanov, R. Luxenhofer, *Biomaterials* **2018**, *178*, 204–280.
- [143] S. Kobayashi, H. Uyama, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 192–209.
- [144] S. Kobayashi, *Prog. Polym. Sci.* **1990**, *15*, 751–823.
- [145] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, F. M. Veronese, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 976–986.
- [146] A. Mero, G. Pasut, L. D. Via, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, F. M. Veronese, *J. Control. Release* **2008**, *125*, 87–95.
- [147] M. C. Woodle, C. M. Engbers, S. Zalipsky, *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 493–496.
- [148] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1613–1631.
- [149] N. Adams, U. S. Schubert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1504–1520.
- [150] M. Bauer, C. Lautenschlaeger, K. Kempe, L. Tauhardt, U. S. Schubert, D. Fischer, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 986–998.
- [151] G. Cai, M. H. Litt, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1989**, *27*, 3603–3618.
- [152] H. Xu, M. Hu, X. Yu, Y. Li, Y. Fu, X. Zhou, D. Zhang, J. Li, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *91*, 66–74.
- [153] N. E. Göppert, M. Kleinsteuber, C. Weber, U. S. Schubert, *Macromolecules* **2020**, *53*, 10837–10846.

- [154] N. E. Göppert, M. Dirauf, C. Weber, U. S. Schubert, *Polym. Chem.* **2021**, *12*, 5426–5437.
- [155] P. Šrámková, A. Zahoranová, Z. Kroneková, A. Šišková, J. Kronek, *J. Polym. Res.* **2017**, *24*, 82.
- [156] M. Hartlieb, K. Kempe, U. S. Schubert, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 526–538.
- [157] T. R. Dargaville, J. R. Park, R. Hoogenboom, *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, 1800070.
- [158] Y. Chujo, K. Sada, K. Matsumoto, T. Saegusa, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1234–1237.
- [159] Y. Chujo, K. Sada, T. Saegusa, *Macromolecules* **1993**, *26*, 6315–6319.
- [160] Y. Chujo, K. Sada, R. Nomura, A. Naka, T. Saegusa, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5611–5614.
- [161] Y. Chujo, K. Sada, A. Naka, R. Nomura, T. Saegusa, *Macromolecules* **1993**, *26*, 883–887.
- [162] M. Hartlieb, S. Schubert, K. Kempe, N. Windhab, U. S. Schubert, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2015**, *53*, 10–14.
- [163] T. Lorson, S. Jaksch, M. M. Lübtow, T. Jüngst, J. Groll, T. Lühmann, R. Luxenhofer, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2161–2171.
- [164] K. P. Luef, C. Petit, B. Ottersböck, G. Oreski, F. Ehrenfeld, B. Grassl, S. Reynaud, F. Wiesbrock, *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 701–712.
- [165] Y. You, K. Kobayashi, B. Colak, P. Luo, E. Cozens, L. Fields, K. Suzuki, J. Gautrot, *Biomaterials* **2021**, *269*, 120356.
- [166] M. Szwarc, *Nature* **1956**, *178*, 1168–1169.
- [167] L. Severa, L. Adriaenssens, J. Vávra, D. Šaman, I. Císařová, P. Fiedler, F. Teplý, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3537–3552.
- [168] J. C. Rueda, M. Asmad, V. Ruiz, H. Komber, S. Zschoche, B. Voit, *Des. Monomers Polym.* **2015**, *18*, 761–769.
- [169] C. Krumm, S. Konieczny, G. J. Dropalla, M. Milbradt, J. C. Tiller, *Macromolecules* **2013**, *46*, 3234–3245.
- [170] B. D. Ulery, L. S. Nair, C. T. Laurencin, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2011**, *49*, 832–864.
- [171] P. A. J. M. De Jongh, A. Mortiboy, G. S. Sulley, M. R. Bennett, A. Anastasaki, P. Wilson, D. M. Haddleton, K. Kempe, *ACS Macro Lett.* **2016**, *5*, 321–325.
- [172] T. R. Dargaville, K. Lava, B. Verbraeken, R. Hoogenboom, *Macromolecules* **2016**, *49*, 4774–4783.
- [173] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 724–744.

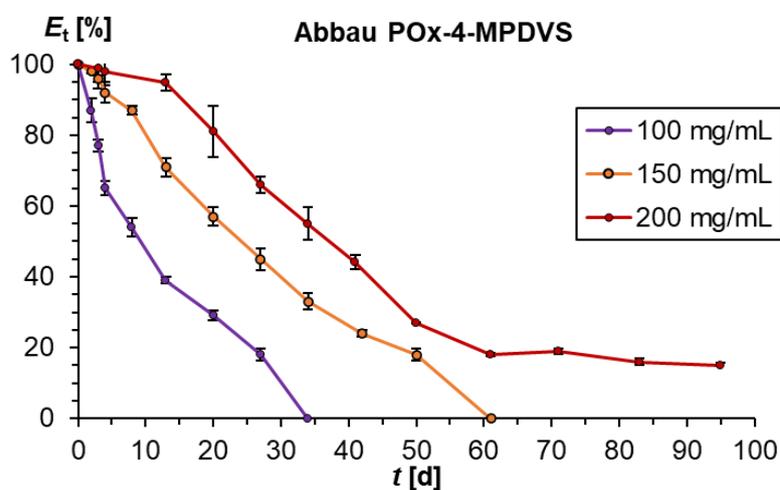
- 
- [174] P. A. J. M. De Jongh, M. R. Bennett, G. S. Sulley, P. Wilson, T. P. Davis, D. M. Haddleton, K. Kempe, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 6703–6707.
- [175] K. F. Morris, C. S. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3139–3141.
- [176] J. S. Gounarides, A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1999**, *725*, 79–90.
- [177] A. T. Metters, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Polymer (Guildf)*. **2000**, *41*, 3993–4004.
- [178] A. T. Metters, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8069–8076.
- [179] B. L. Farrugia, K. Kempe, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, T. R. Dargaville, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 2724–2732.
- [180] D. Hahn, J. M. Sonntag, S. Lück, M. F. Maitz, U. Freudenberg, R. Jordan, C. Werner, *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2101327.
- [181] T. R. Dargaville, R. Forster, B. L. Farrugia, K. Kempe, L. Voorhaar, U. S. Schubert, R. Hoogenboom, *Macromol. Rapid Commun.* **2012**, *33*, 1695–1700.
- [182] S. M. Kroger, L. Hill, E. Jain, A. Stock, P. J. Bracher, F. He, S. P. Zustiak, *Macromol. Biosci.* **2020**, *20*, 2000085.
- [183] E. Jain, L. Hill, E. Canning, S. A. Sell, S. P. Zustiak, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 2679–2691.
- [184] S. P. Zustiak, S. Pubill, A. Ribeiro, J. B. Leach, *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 1255–1264.
- [185] S. P. Zustiak, J. B. Leach, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1348–1357.
- [186] A. Zahoranová, Z. Kroneková, M. Zahoran, D. Chorvát, I. Janigová, J. Kronek, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2016**, *54*, 1548–1559.
- [187] M. M. Lübtow, M. Mrlik, L. Hahn, A. Altmann, M. Beudert, T. Lühmann, R. Luxenhofer, *J. Funct. Biomater.* **2019**, *10*, 36–52.
- [188] I. Ozer, A. Tomak, H. M. Zareie, Y. Baran, V. Bulmus, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 2699–2710.
- [189] T. Frisk, S. Rydholm, T. Liebmann, H. Andersson Svahn, G. Stemme, H. Brismar, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 4705–4712.
- [190] Y. J. Cheng, G. F. Luo, J. Y. Zhu, X. D. Xu, X. Zeng, D. B. Cheng, Y. M. Li, Y. Wu, X. Z. Zhang, R. X. Zhuo, F. He, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 9078–9087.
- [191] M. C. Costas-Lago, P. Besada, F. Rodríguez-Enríquez, D. Viña, S. Vilar, E. Uriarte, F. Borges, C. Terán, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 1–11.
- [192] M. Amblard, J. A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.



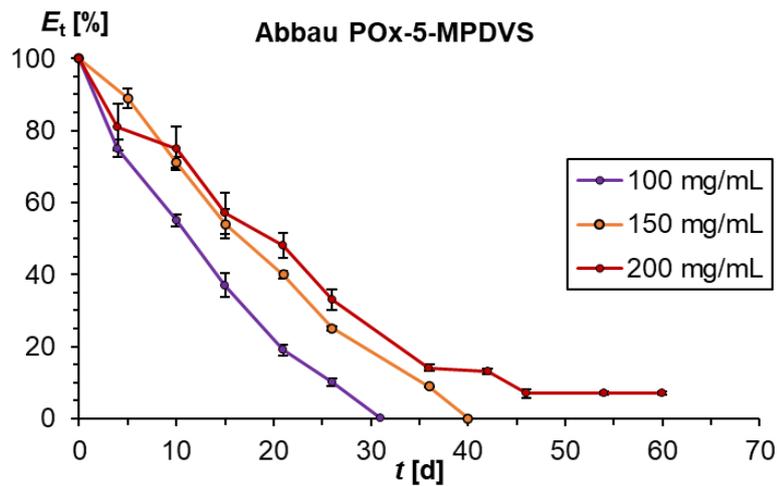
## 7.7. Ergänzende Daten

**Ergänzende Daten 1:** Zugehörige Daten zu Abbildung 52.

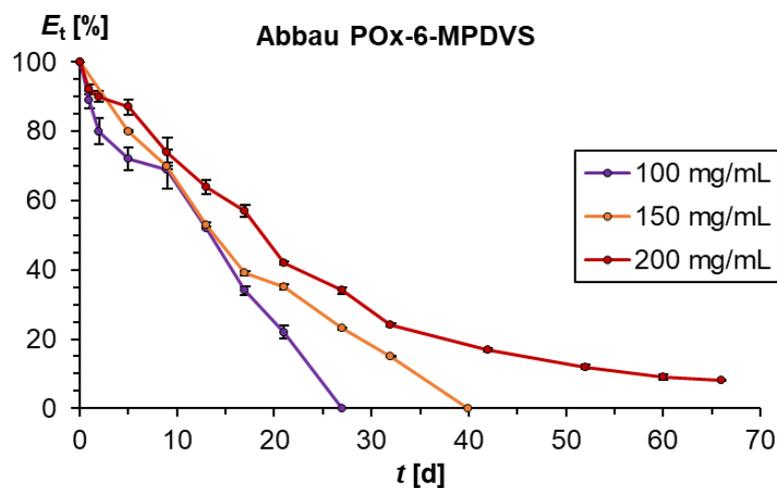
| $t$ [d] | POx-1          | POx-2          | POx-3          |
|---------|----------------|----------------|----------------|
| 0       | 100            | 100            | 100            |
| 1       | $97,2 \pm 1,5$ | $84,2 \pm 5,6$ | $96,7 \pm 1,7$ |
| 4       | $95,3 \pm 1,9$ | $92,8 \pm 0,7$ | $82,4 \pm 4,2$ |
| 6       | $92,5 \pm 3,2$ | $90,6 \pm 1,5$ | $85,2 \pm 2,9$ |
| 11      | $90,5 \pm 1,1$ | $90,7 \pm 0,8$ | $86,5 \pm 2,3$ |
| 18      | $89,6 \pm 1,5$ | $91,3 \pm 1,3$ | $78,6 \pm 1,6$ |
| 26      | $91,5 \pm 3,5$ | $90,1 \pm 1,5$ | $69 \pm 1,2$   |
| 32      | $87,6 \pm 2,1$ | $89,6 \pm 1,1$ | $60,9 \pm 1,6$ |



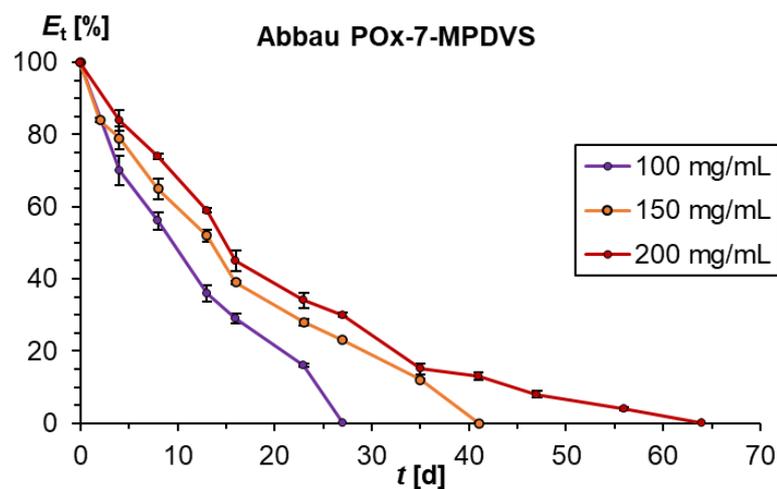
**Ergänzende Daten 2:** Abbaugraphen der Hydrogele, welche mit POx-4-MPDVS hergestellt wurden.



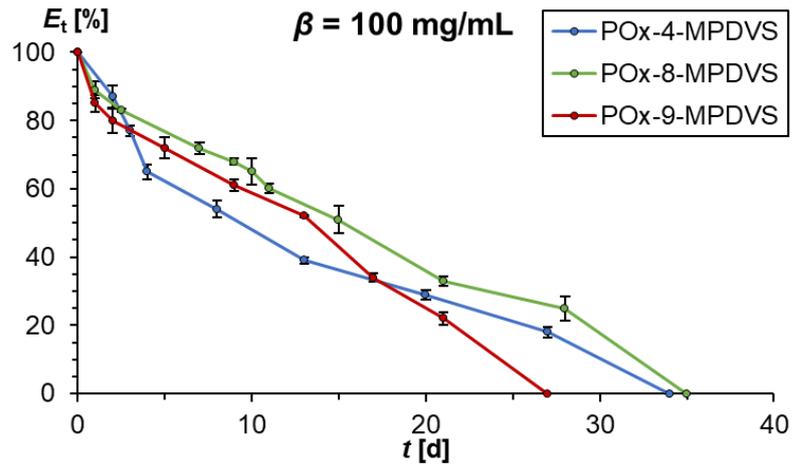
**Ergänzende Daten 3:** Abbaugraphen der Hydrogele, welche mit POx-5-MPDVS hergestellt wurden.



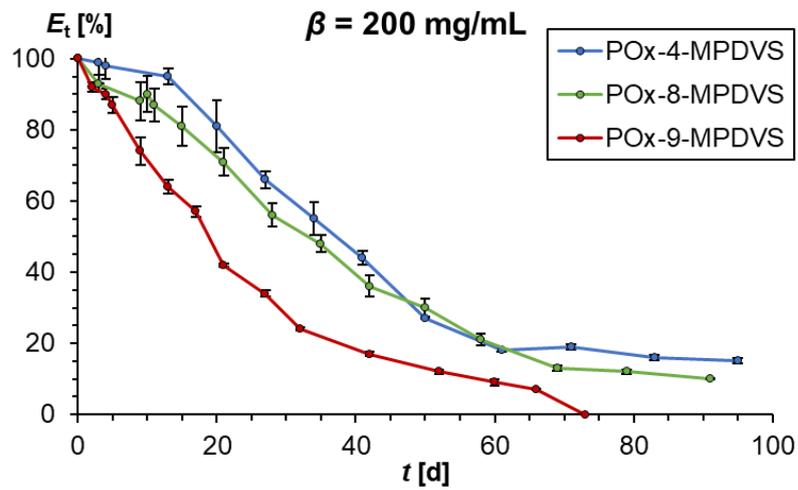
**Ergänzende Daten 4:** Abbaugraphen der Hydrogele, welche mit POx-6-MPDVS hergestellt wurden.



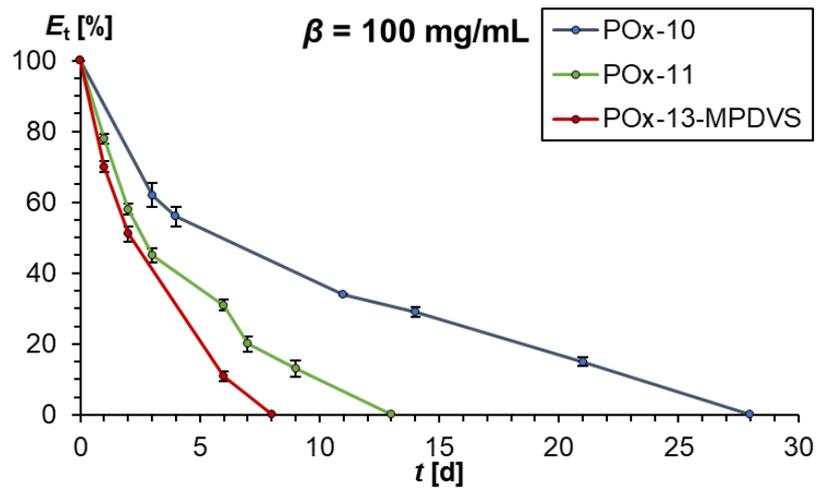
**Ergänzende Daten 5:** Abbaugraphen der Hydrogele, welche mit POx-7-MPDVS hergestellt wurden.



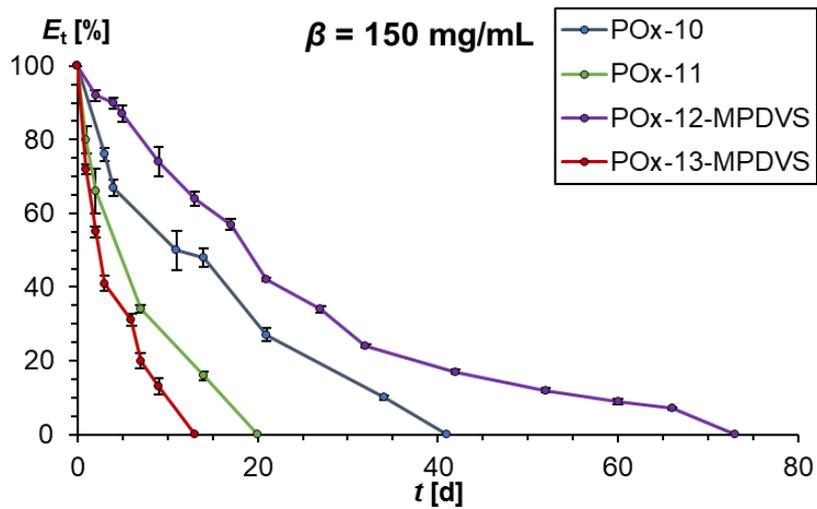
**Ergänzende Daten 6:** Abbaugraphen der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung.



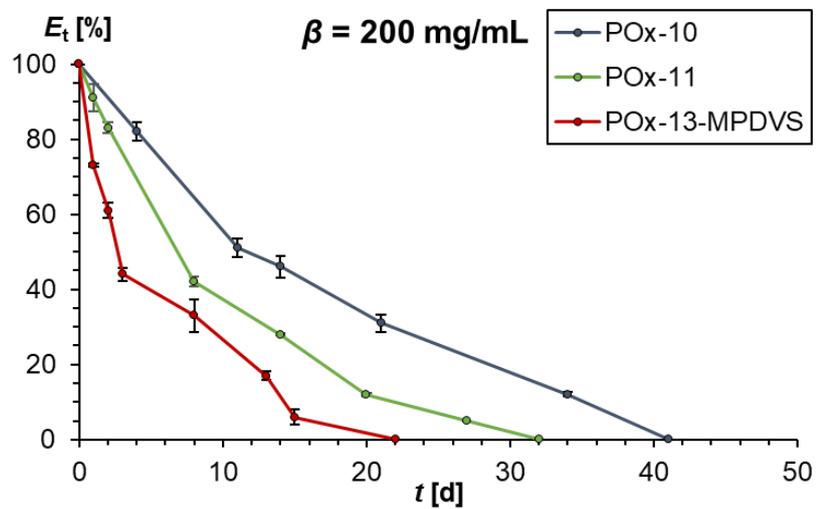
**Ergänzende Daten 7:** Abbaugraphen der Hydrogele aus den Vernetzern mit variierender Copolymerzusammensetzung.



**Ergänzende Daten 8:** Abbaugraphen der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzer.

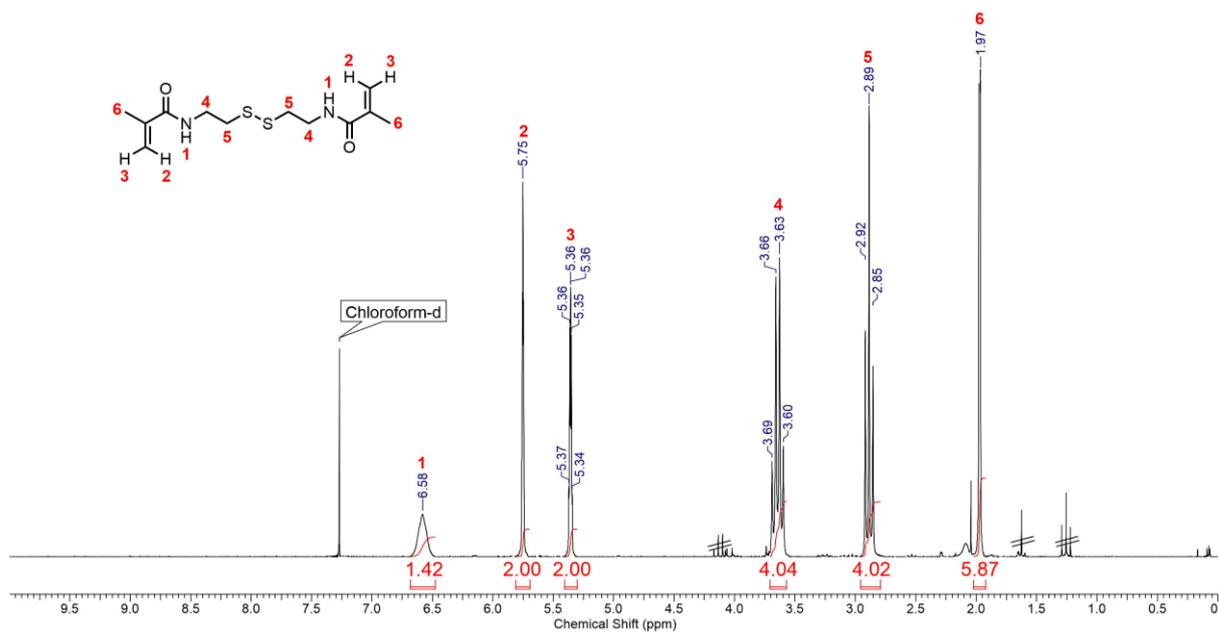
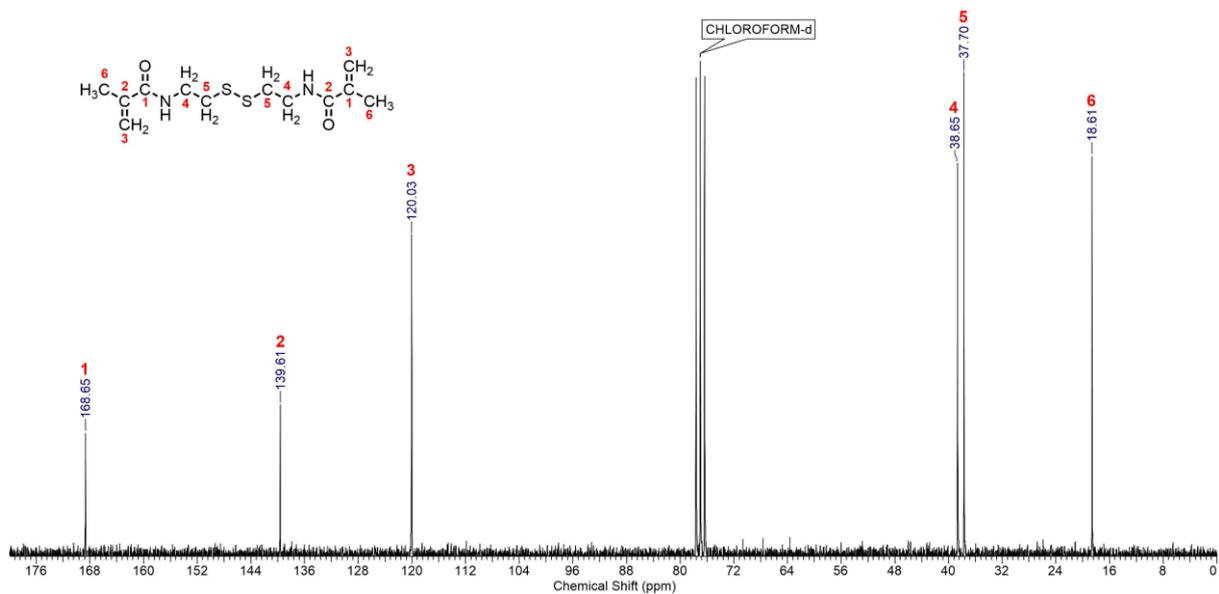


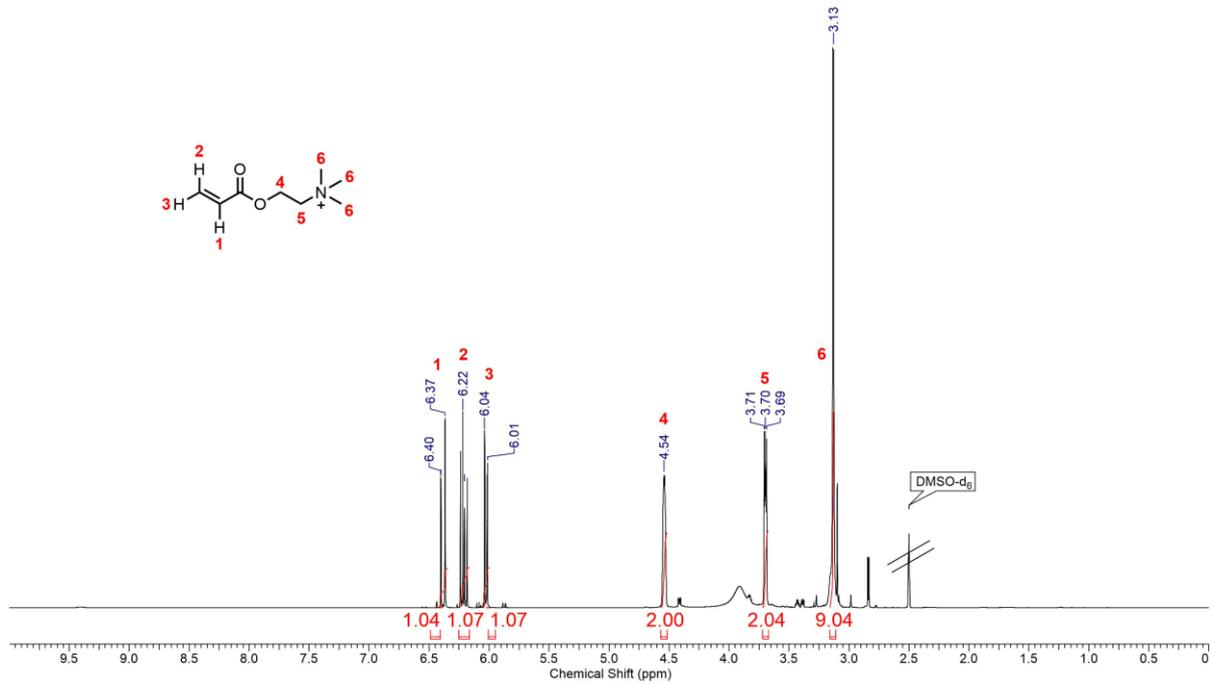
Ergänzende Daten 9: Abbaugraphen der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzer.



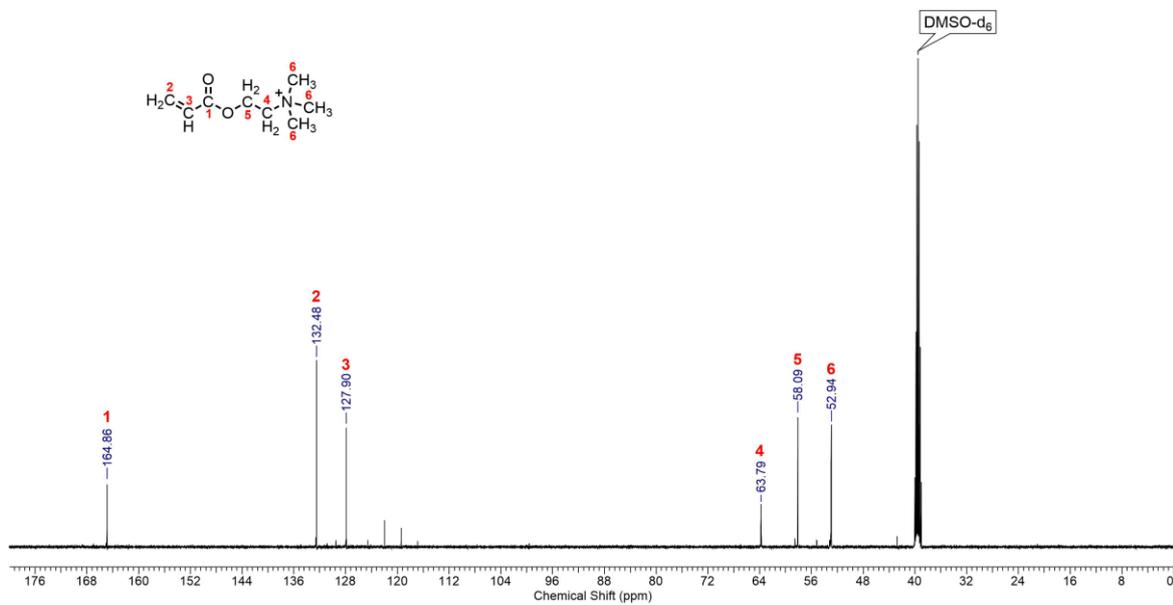
Ergänzende Daten 10: Abbaugraphen der Hydrogele aus den bifunktionellen Vernetzer.

## 7.8. NMR-Spektren

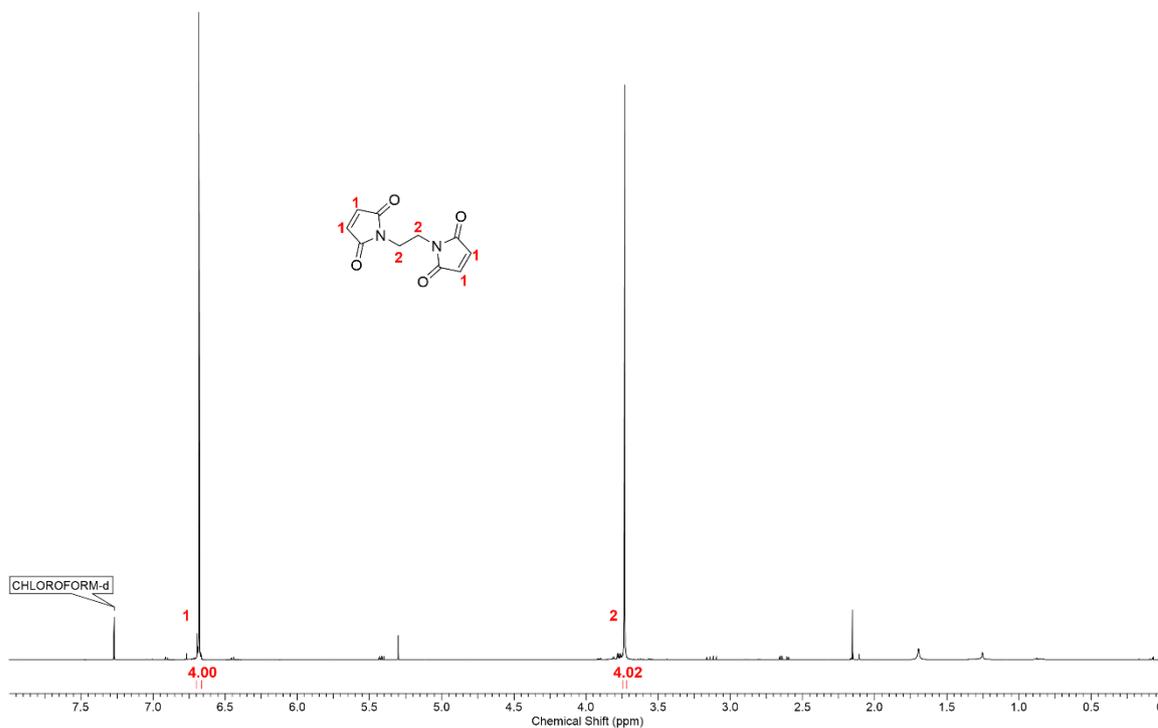
NMR 1  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $N,N'$ -Bis(methacryloyl)cystamin in Chloroform-d.NMR 2  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $N,N'$ -Bis(methacryloyl)cystamin in Chloroform-d.



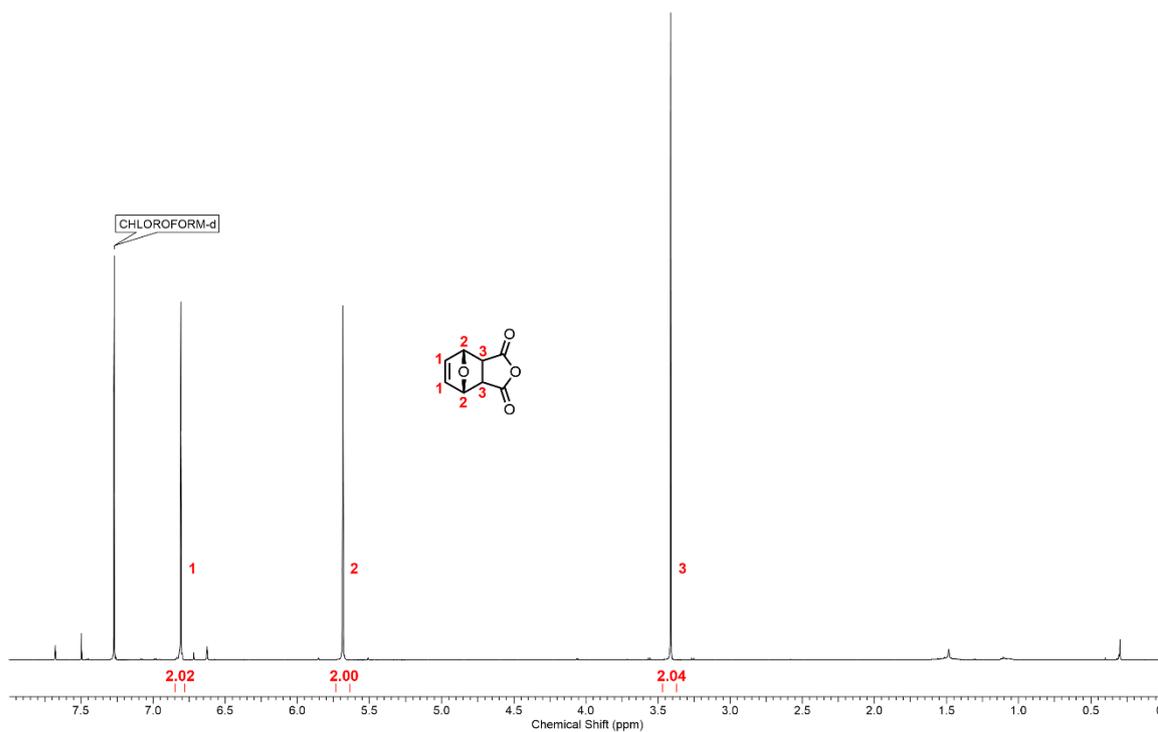
NMR 3 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Trimethylaminoethylacrylat in DMSO-d<sub>6</sub>.



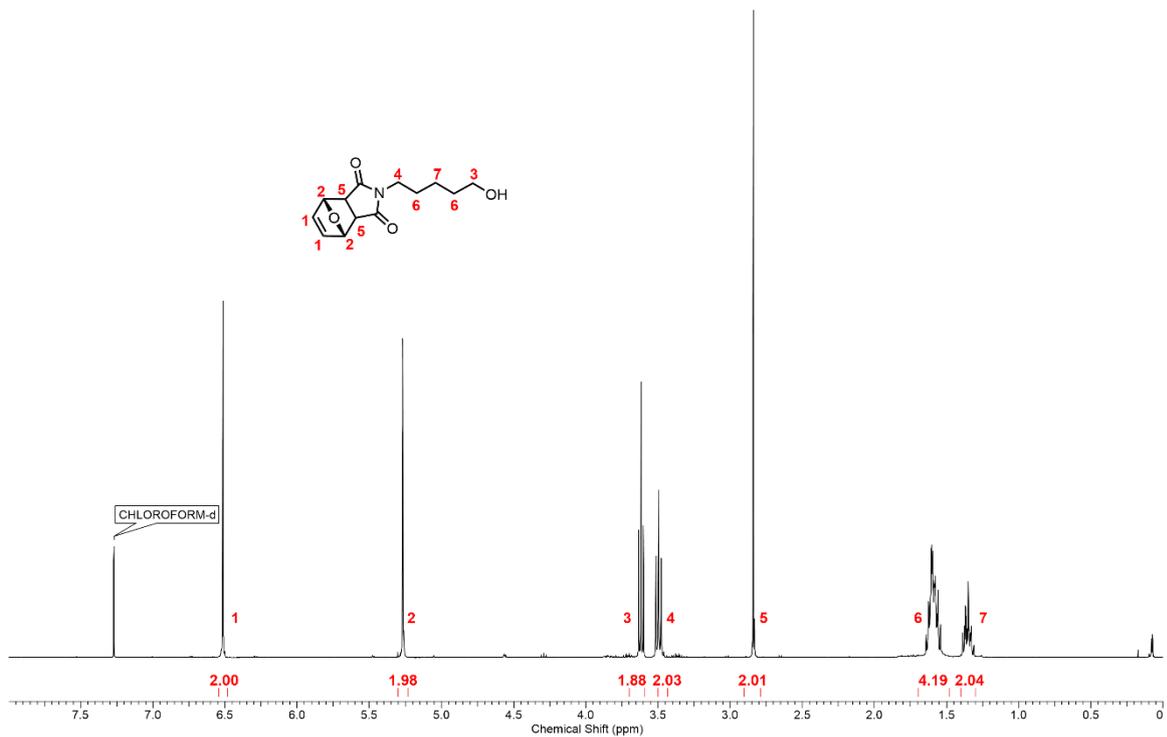
NMR 4 <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Trimethylaminoethylacrylat in DMSO-d<sub>6</sub>.



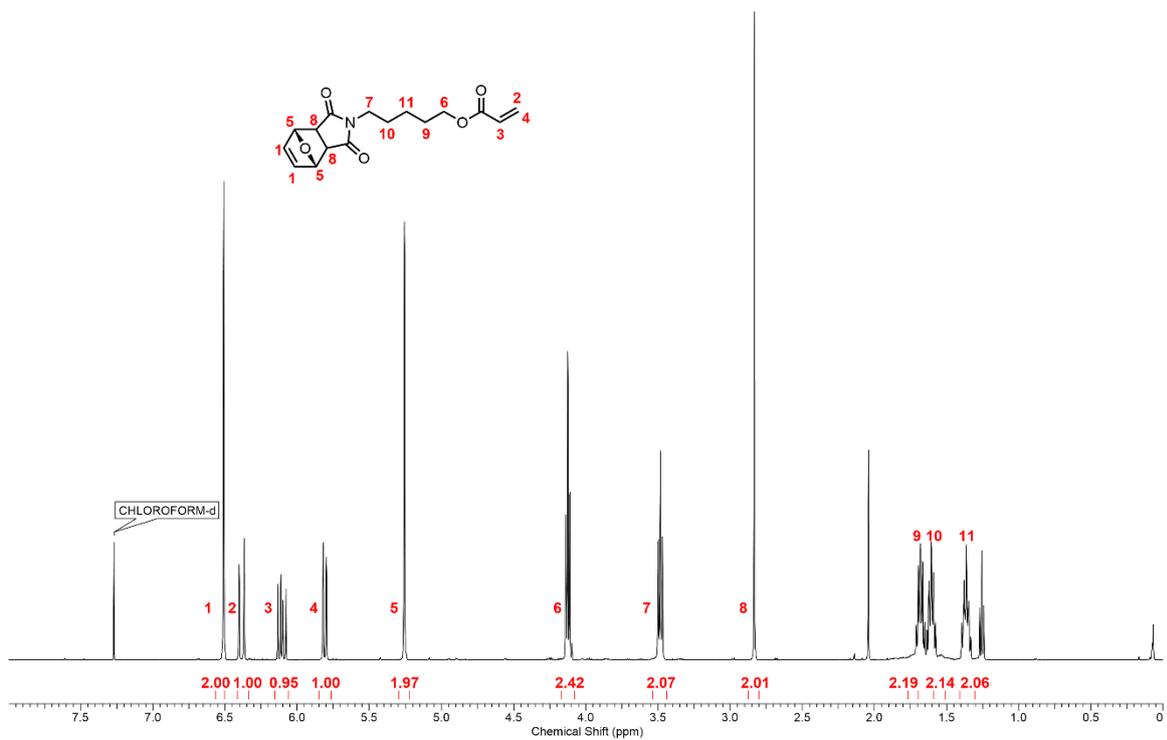
NMR 5: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 1,2-Bis(maleimido)ethan in CDCl<sub>3</sub>.



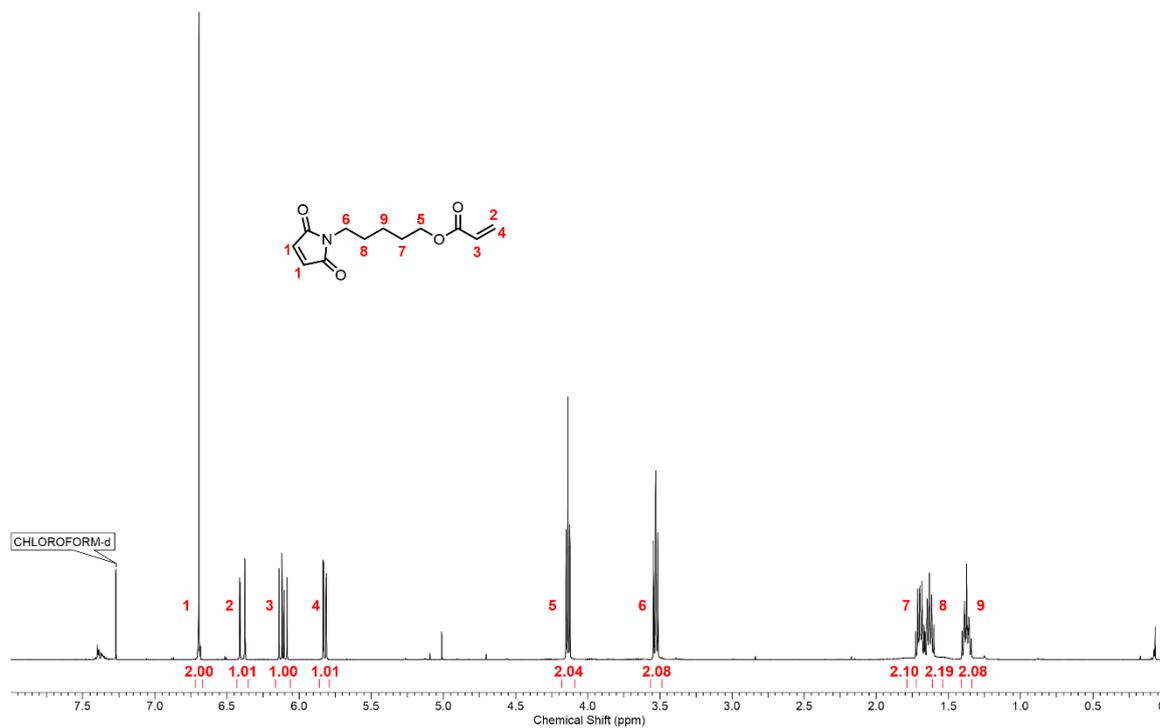
NMR 6: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 4,10-dioxatricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-8-en-3,5-dion in CDCl<sub>3</sub>.



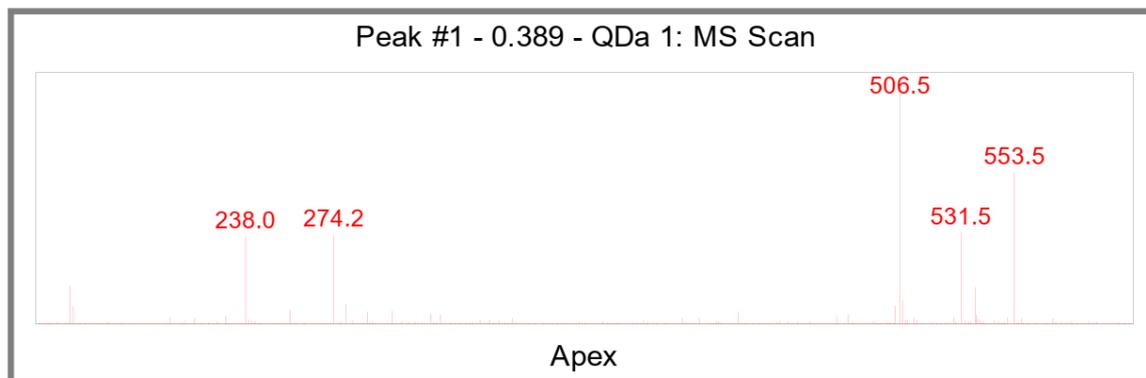
**NMR 7:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von (4R,7S)-2-(5-hydroxypentyl)-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-4,7-epoxyisoindol-1,3(2H)-dion in CDCl<sub>3</sub>.



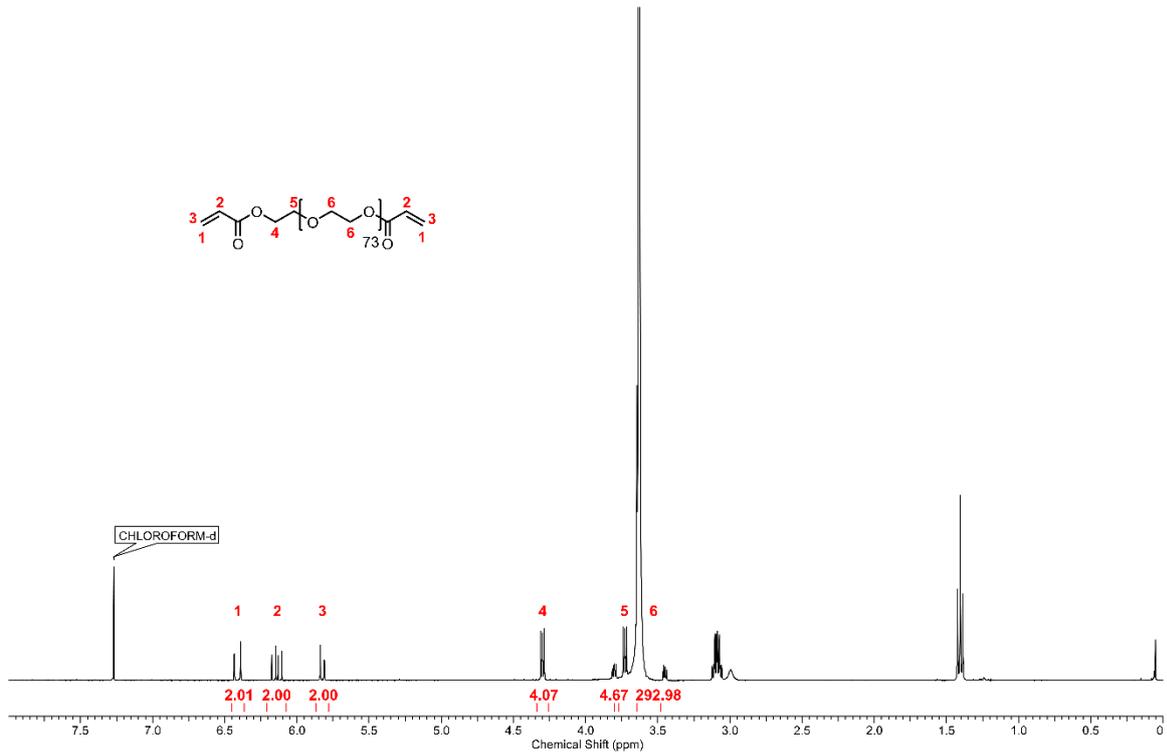
**NMR 8:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 5-((4R,7S)-1,3-dioxo-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-2H-4,7-epoxyisoindol-2-yl)pentyl acrylat. in CDCl<sub>3</sub>.



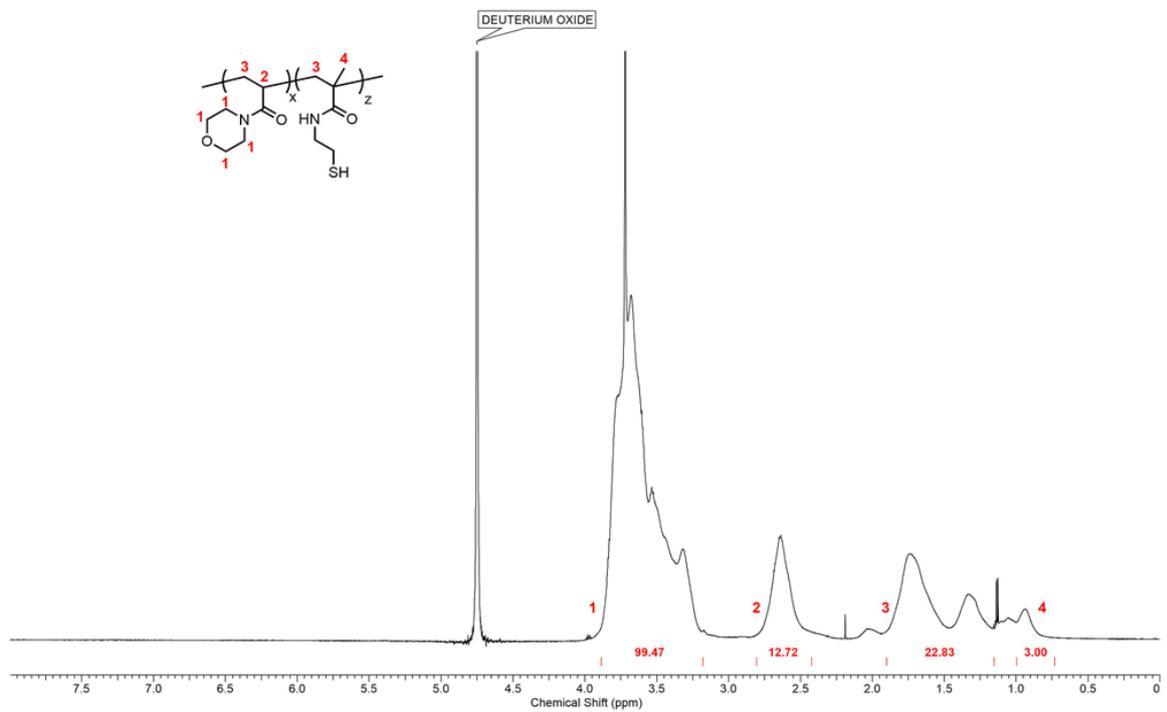
**NMR 9:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 5-Maleimido-pentyl-acrylat in CDCl<sub>3</sub>.



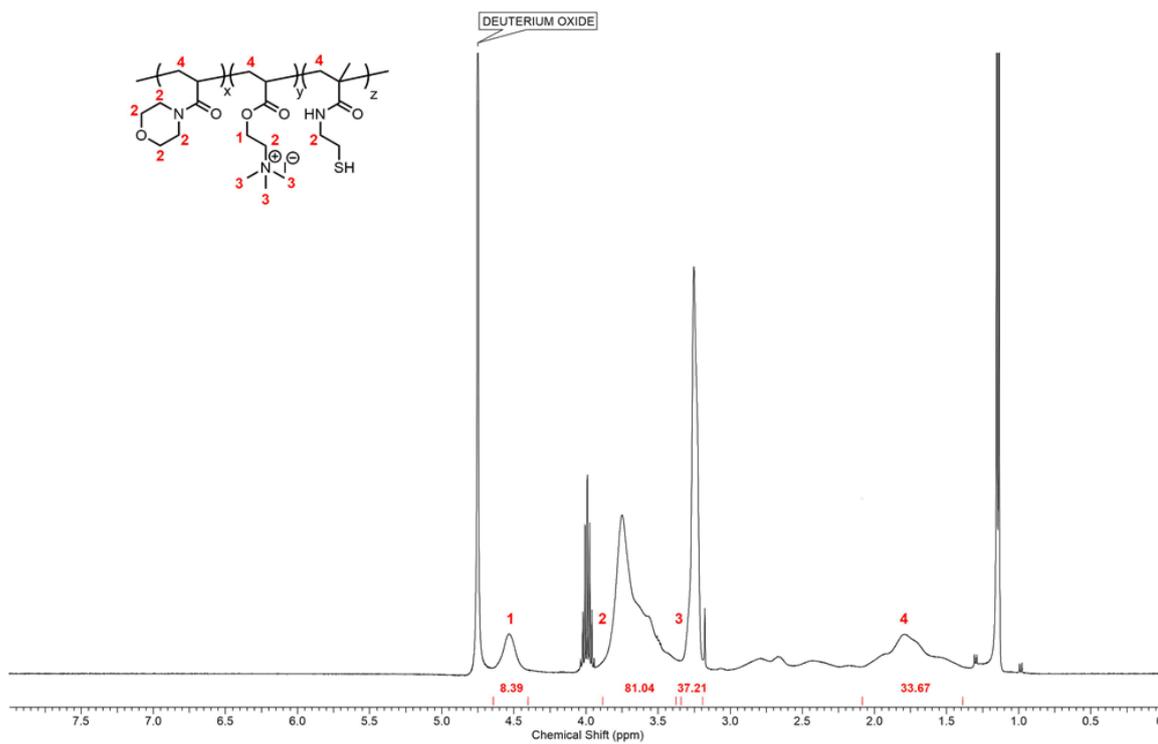
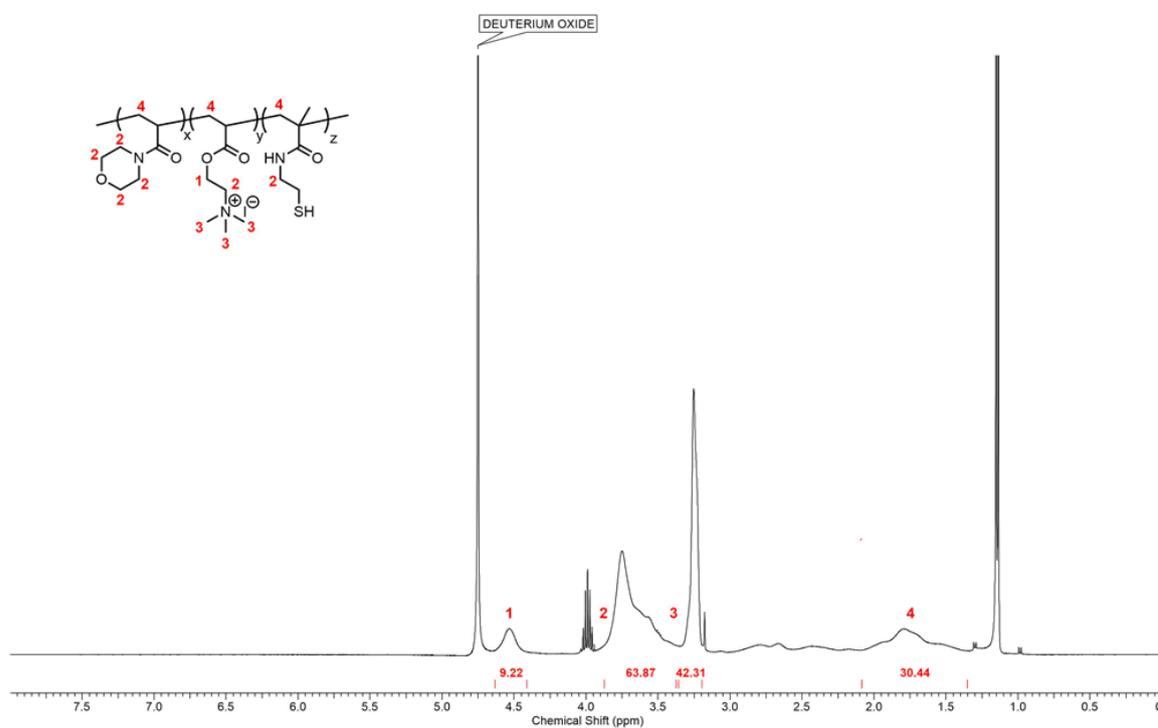
**Massenspektrum 1:** Massenspektrum einer LR-MS (ESI) von 5-Maleimido-pentyl-acrylat.

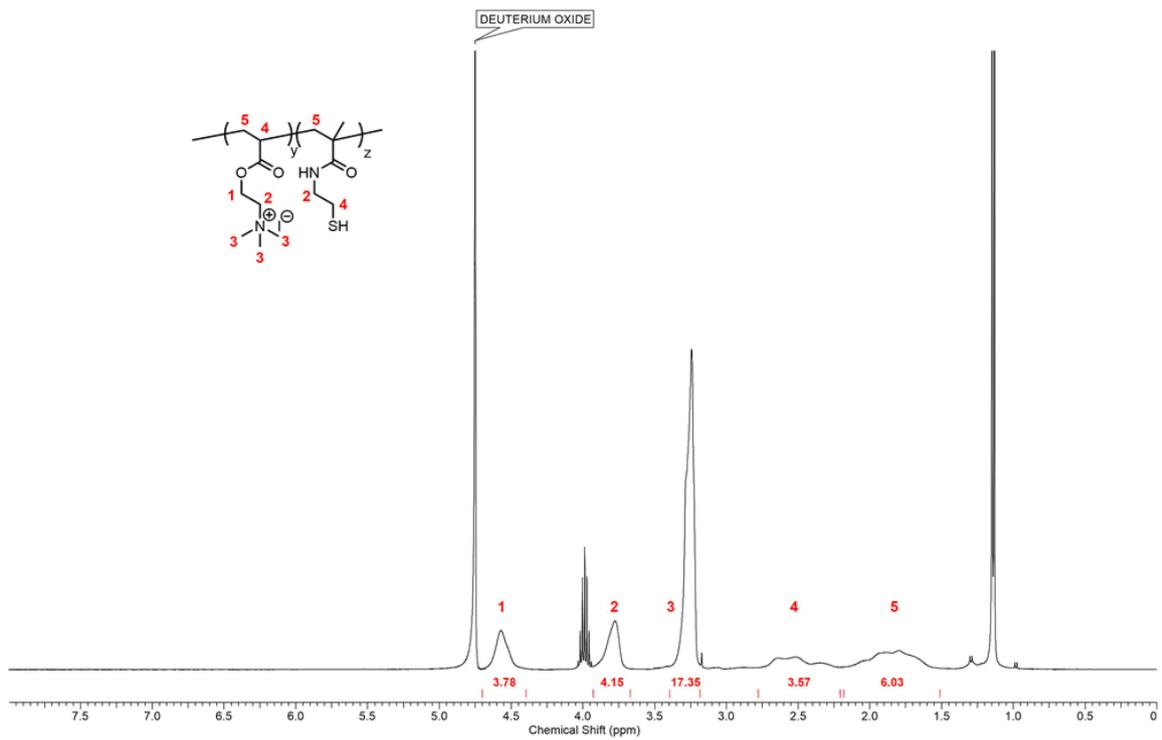


NMR 10: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von PEGDA<sub>3500</sub> in CDCl<sub>3</sub>.

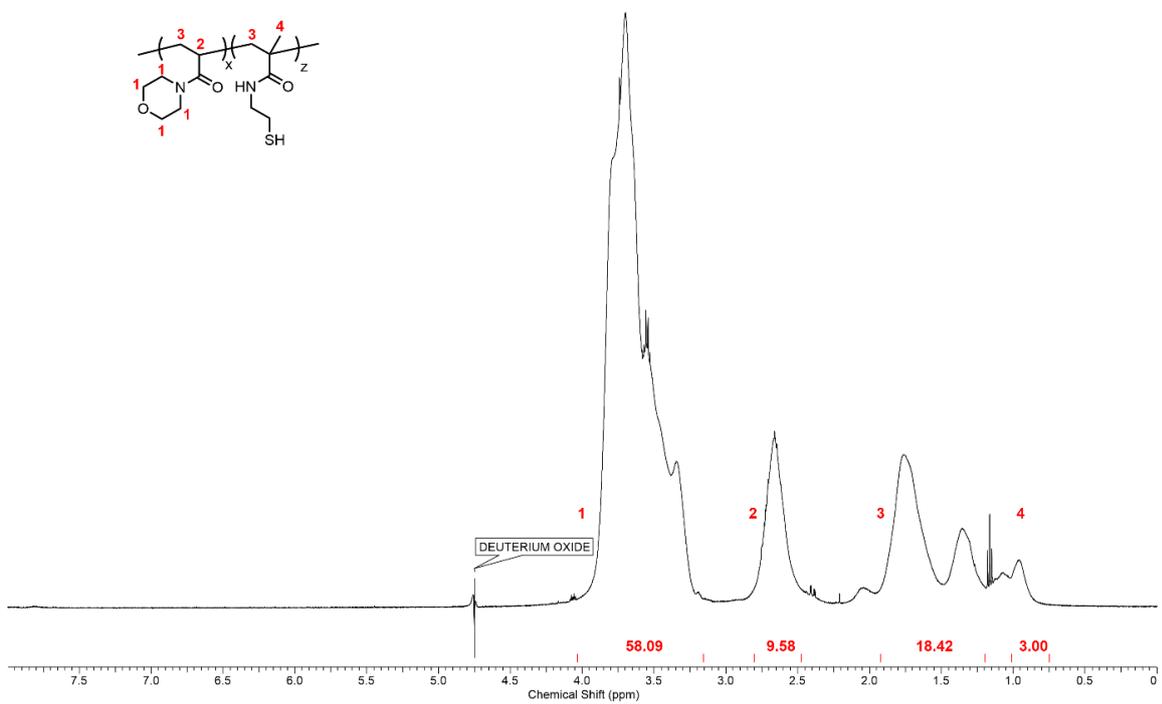


NMR 11 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von PSH1 in D<sub>2</sub>O.

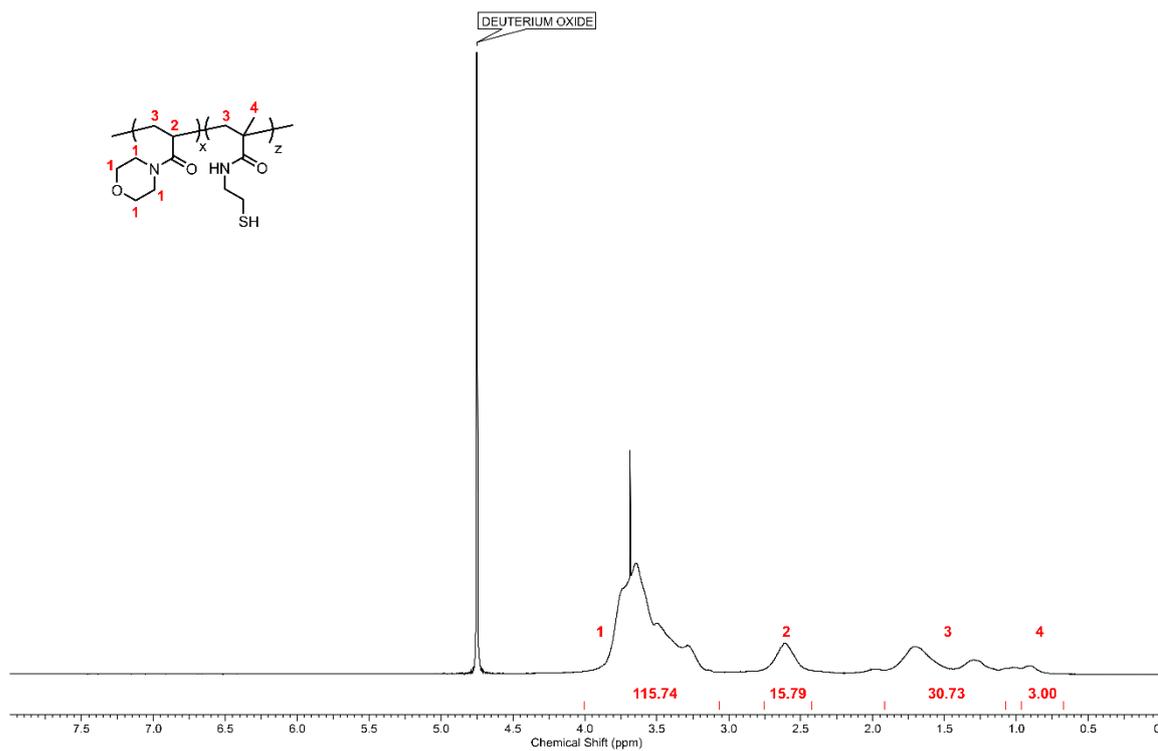
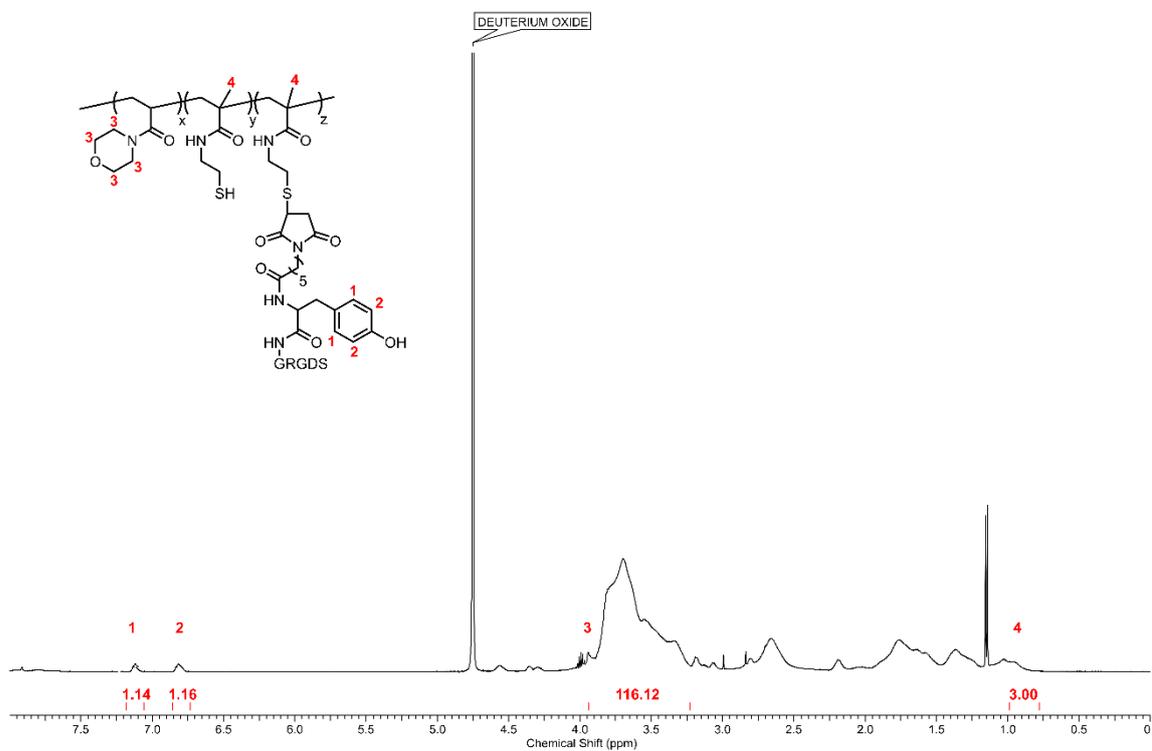
NMR 12  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PSH<sub>2</sub> in D<sub>2</sub>O.NMR 13  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PSH<sub>3</sub> in D<sub>2</sub>O.

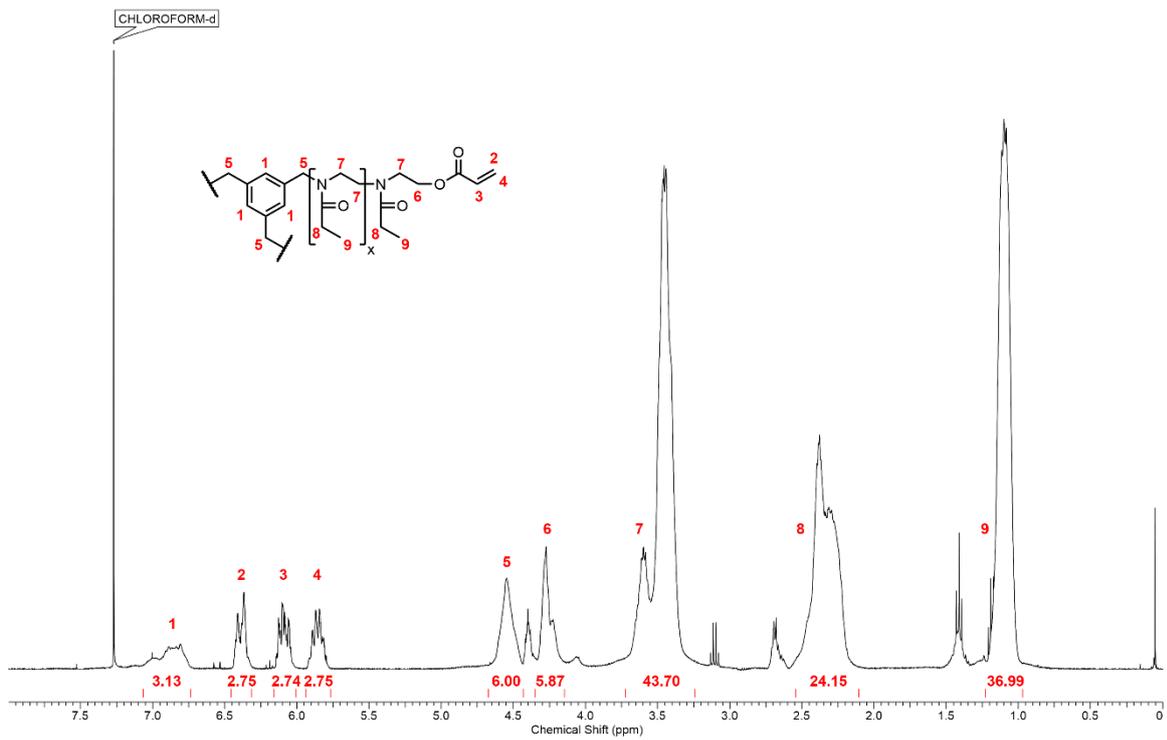


NMR 14  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von P<sub>SH4</sub> in D<sub>2</sub>O.

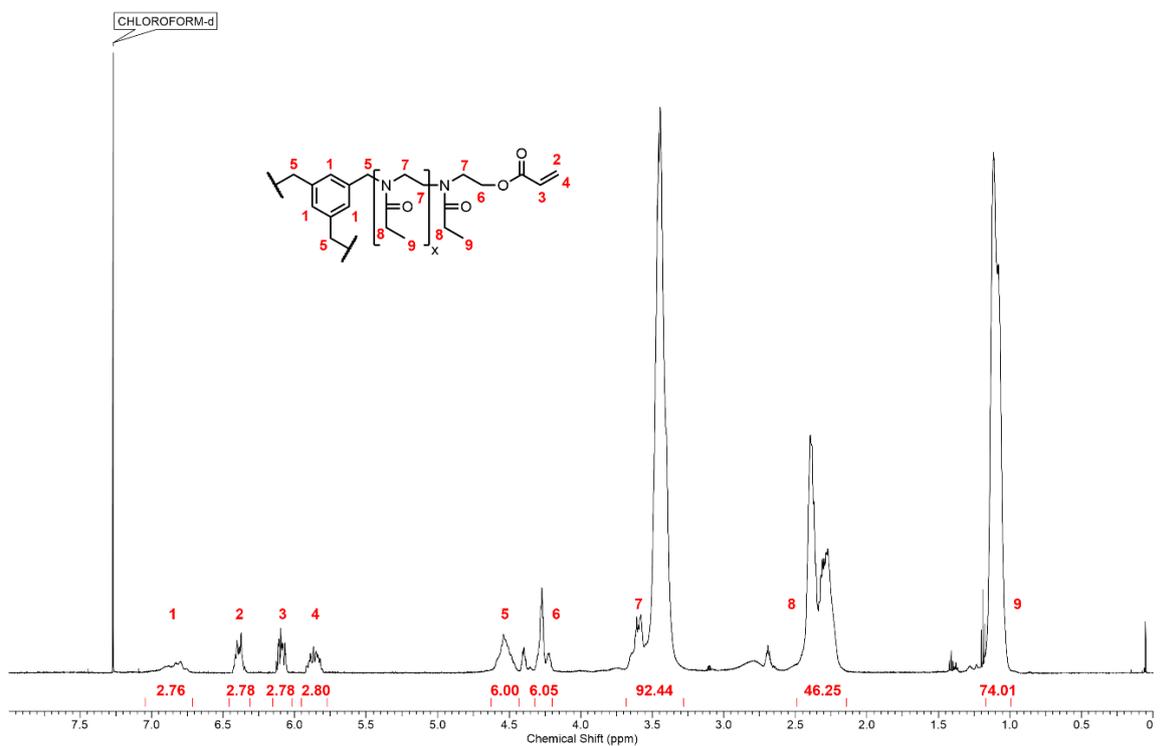


NMR 15  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von P<sub>SH5</sub> in D<sub>2</sub>O.

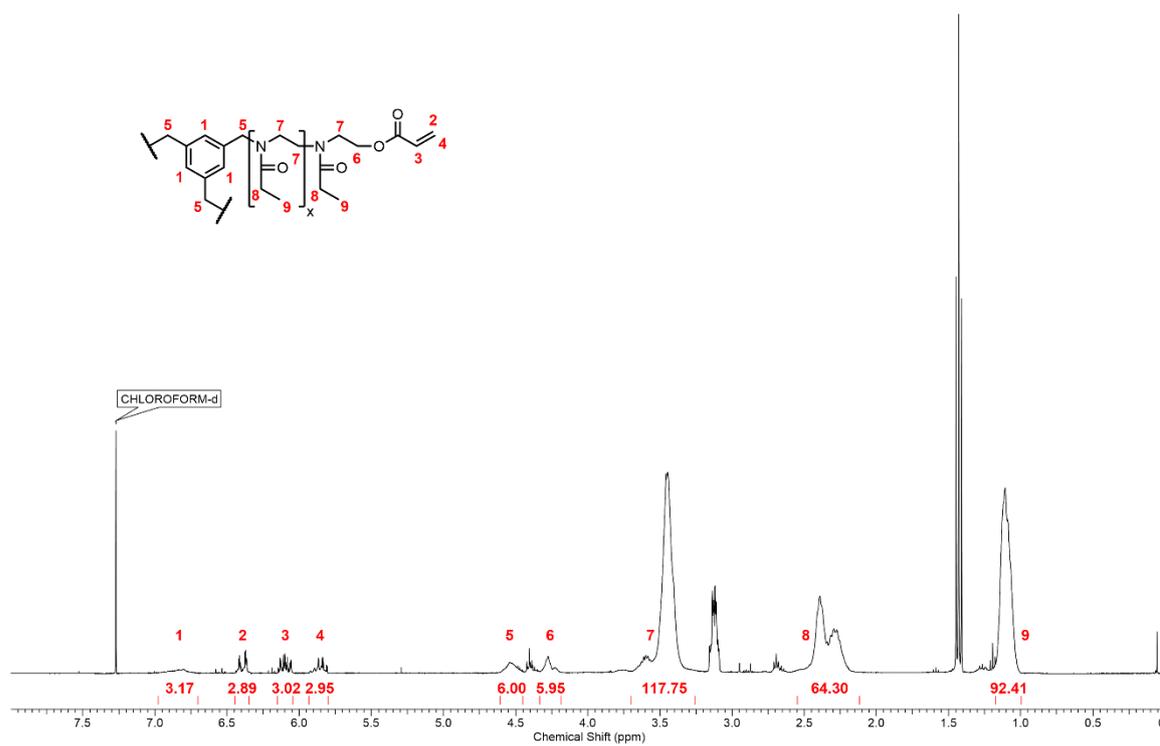
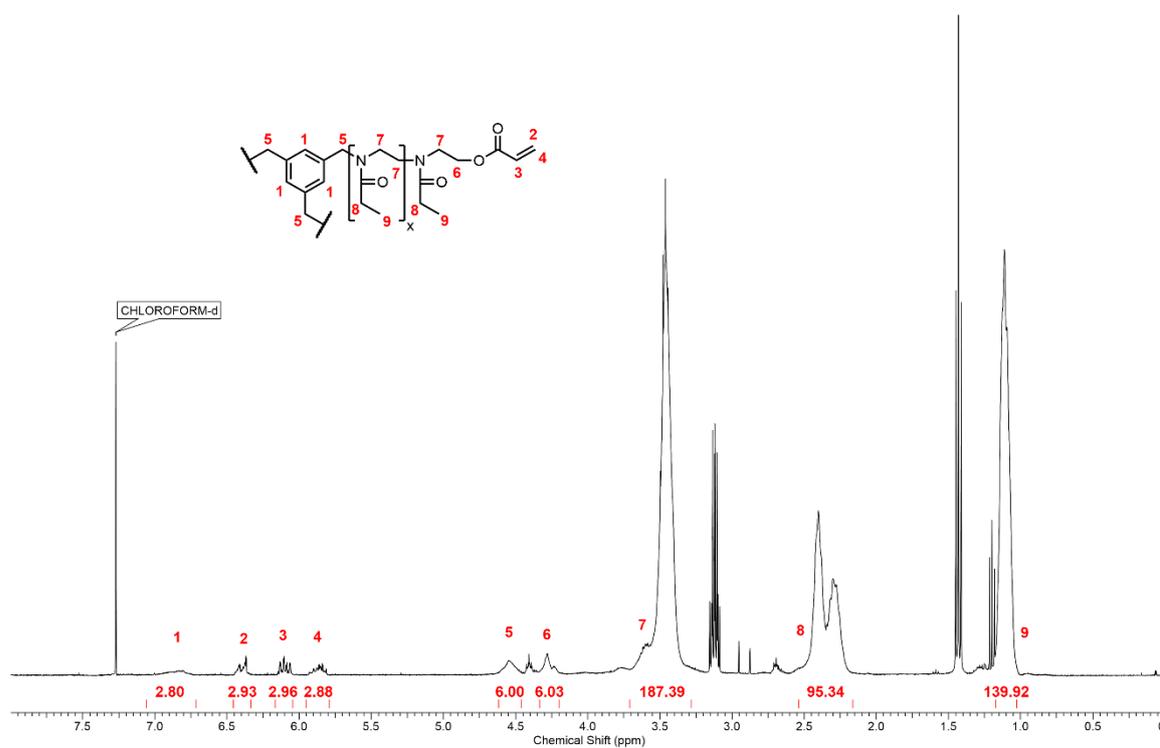
NMR 16: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von P<sub>SH</sub>Pep in D<sub>2</sub>O.NMR 17: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von P<sub>SH</sub>RGD in D<sub>2</sub>O.

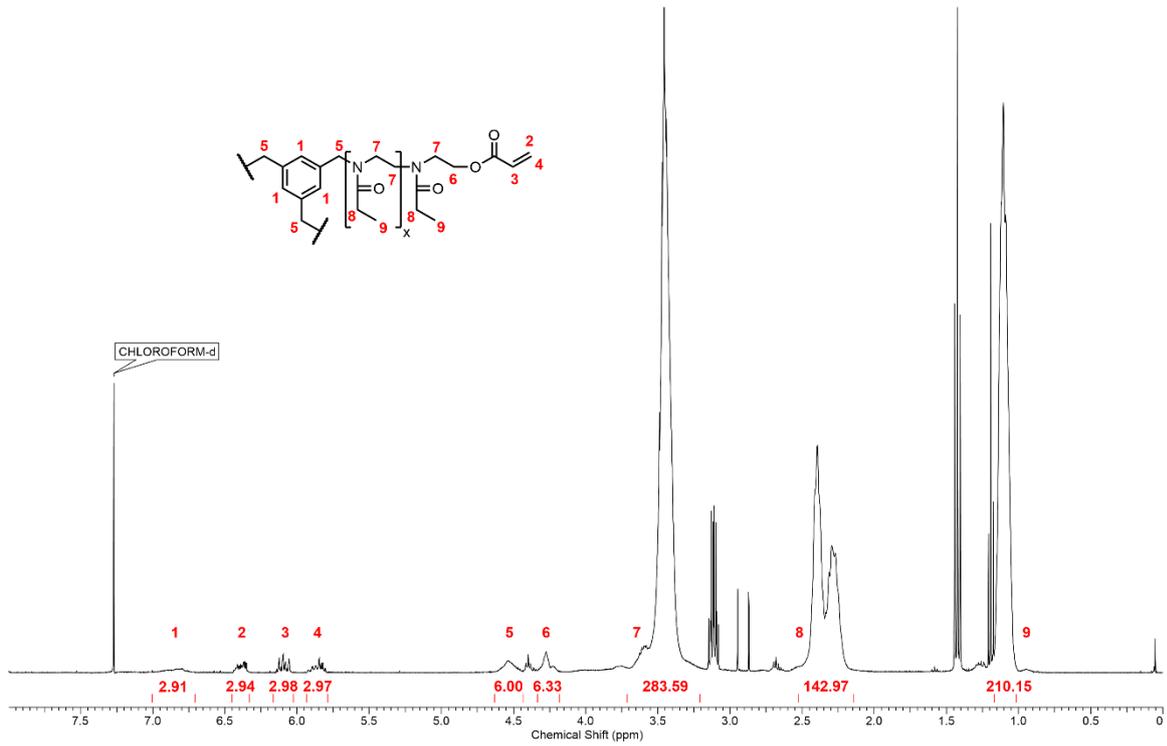


NMR 18: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-1 in CDCl<sub>3</sub>.

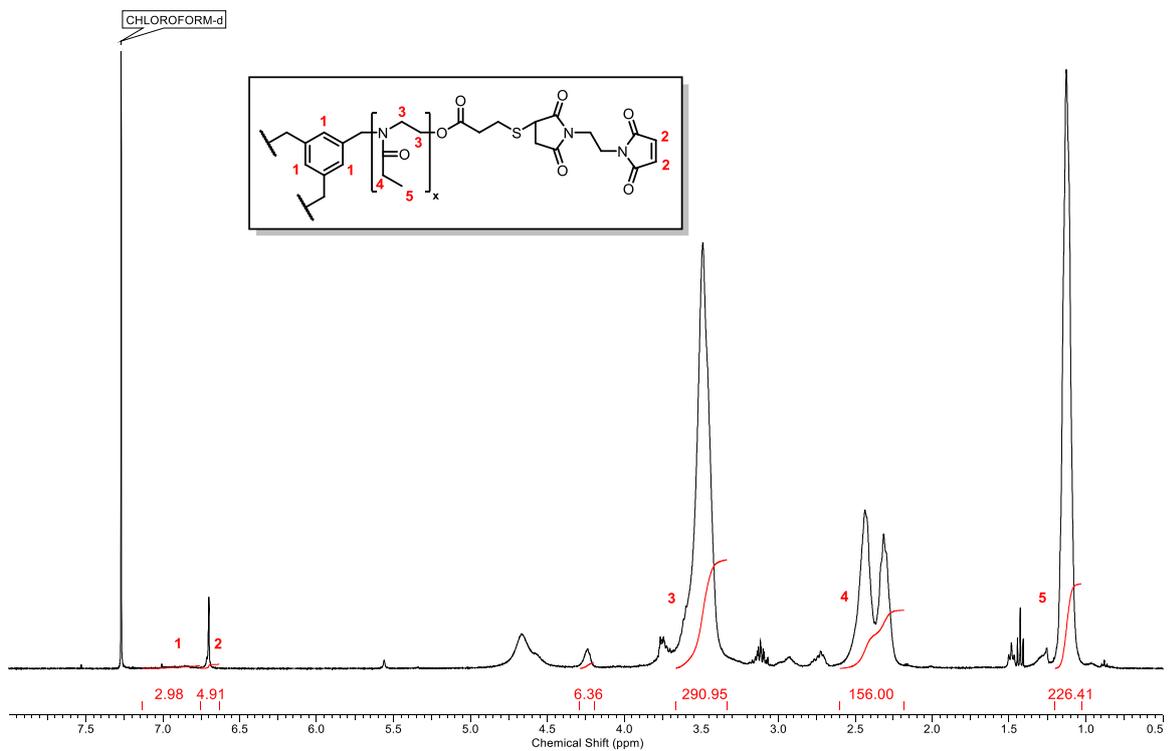


NMR 19: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-2 in CDCl<sub>3</sub>.

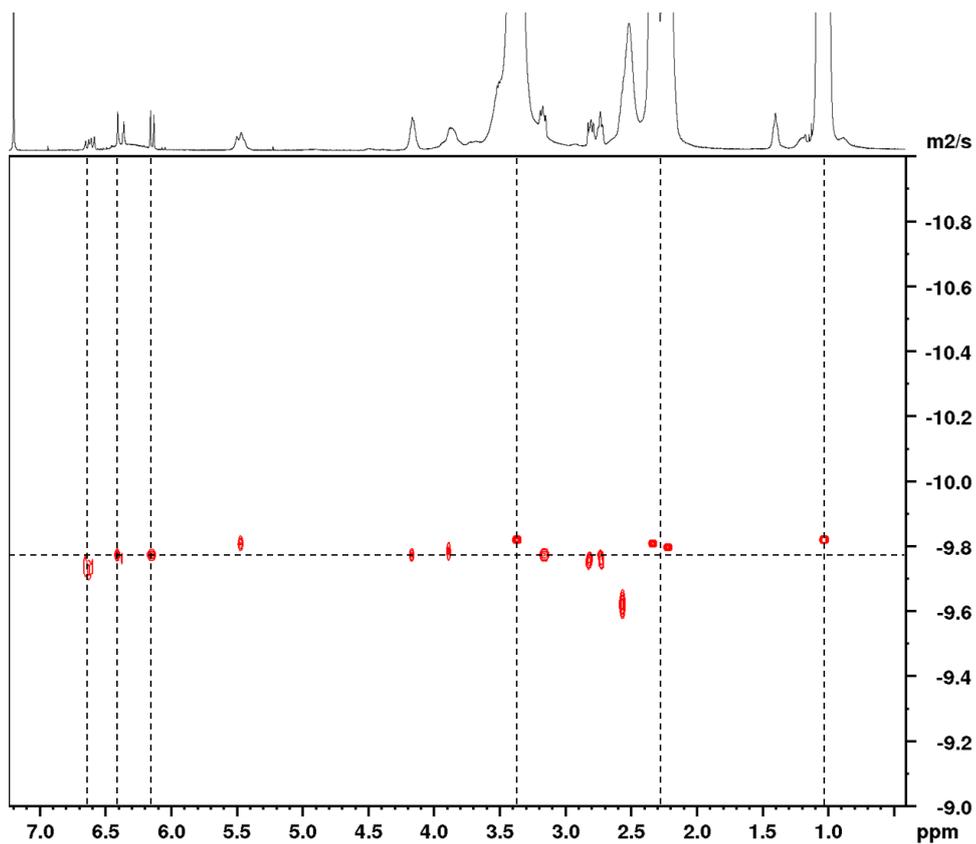
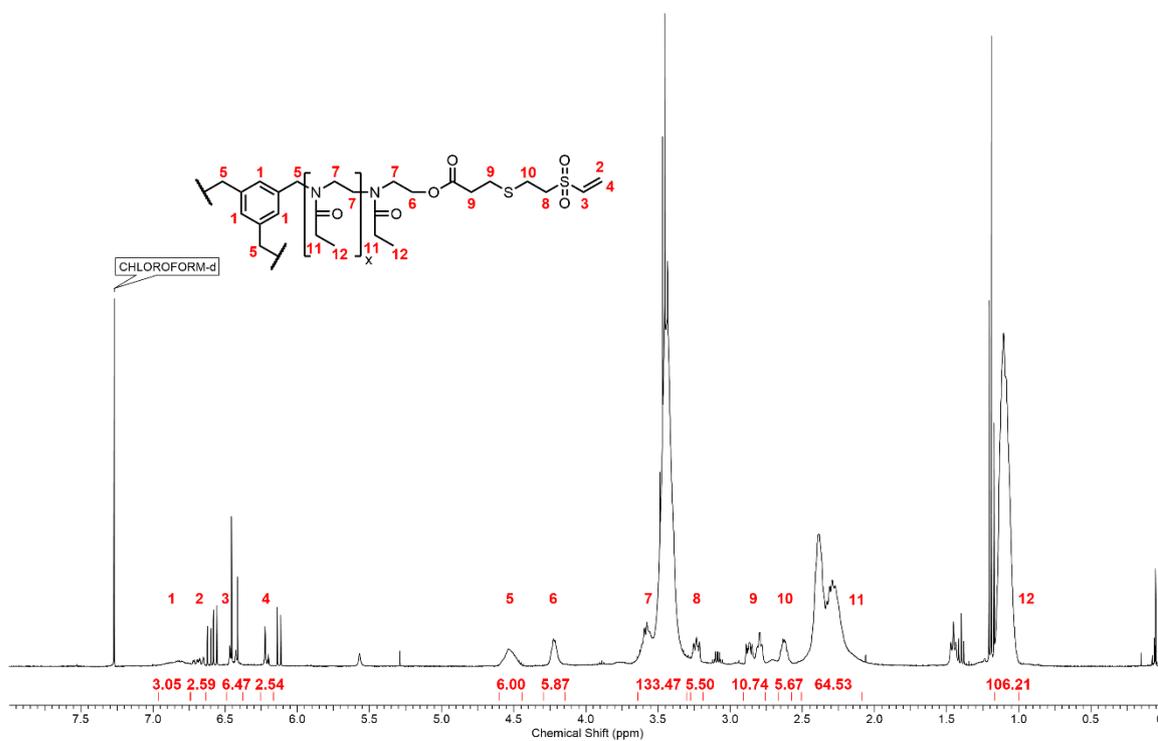
NMR 20:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von POx-3 in  $\text{CDCl}_3$ .NMR 21:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von POx-14 in  $\text{CDCl}_3$ .

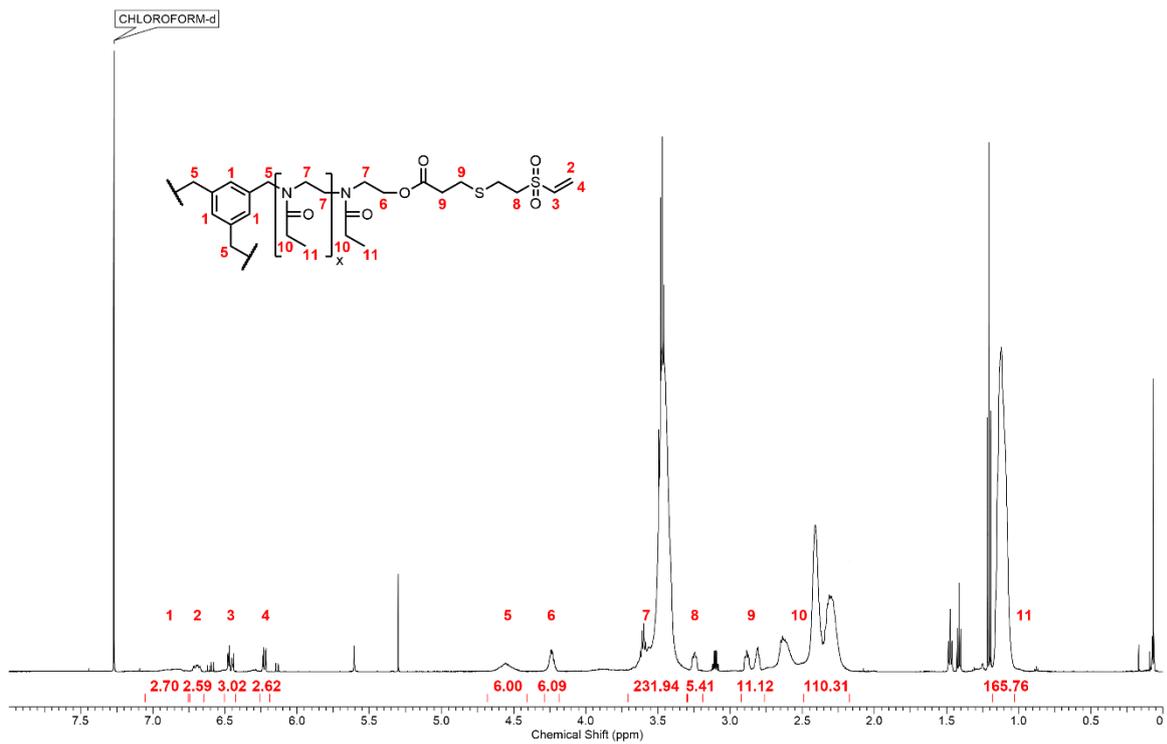


NMR 22: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von PO<sub>x</sub>-15 in CDCl<sub>3</sub>.

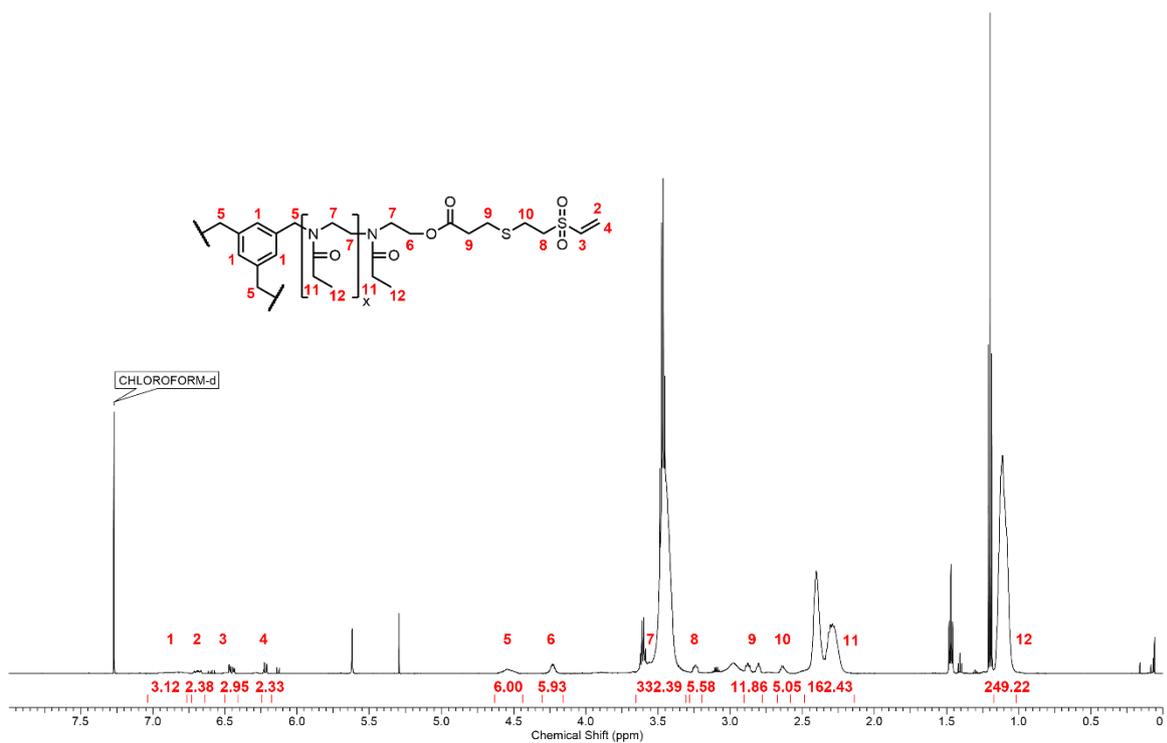


NMR 23: Exemplarisches <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines PO<sub>x</sub>-MI in CDCl<sub>3</sub>.

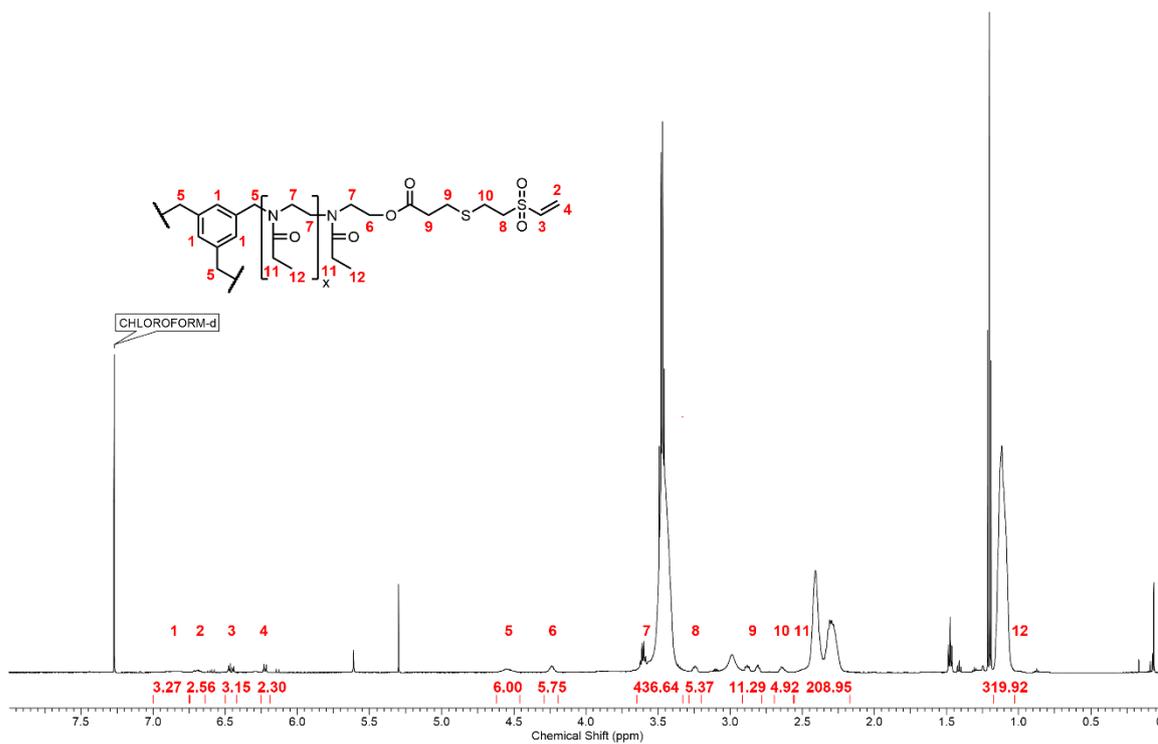
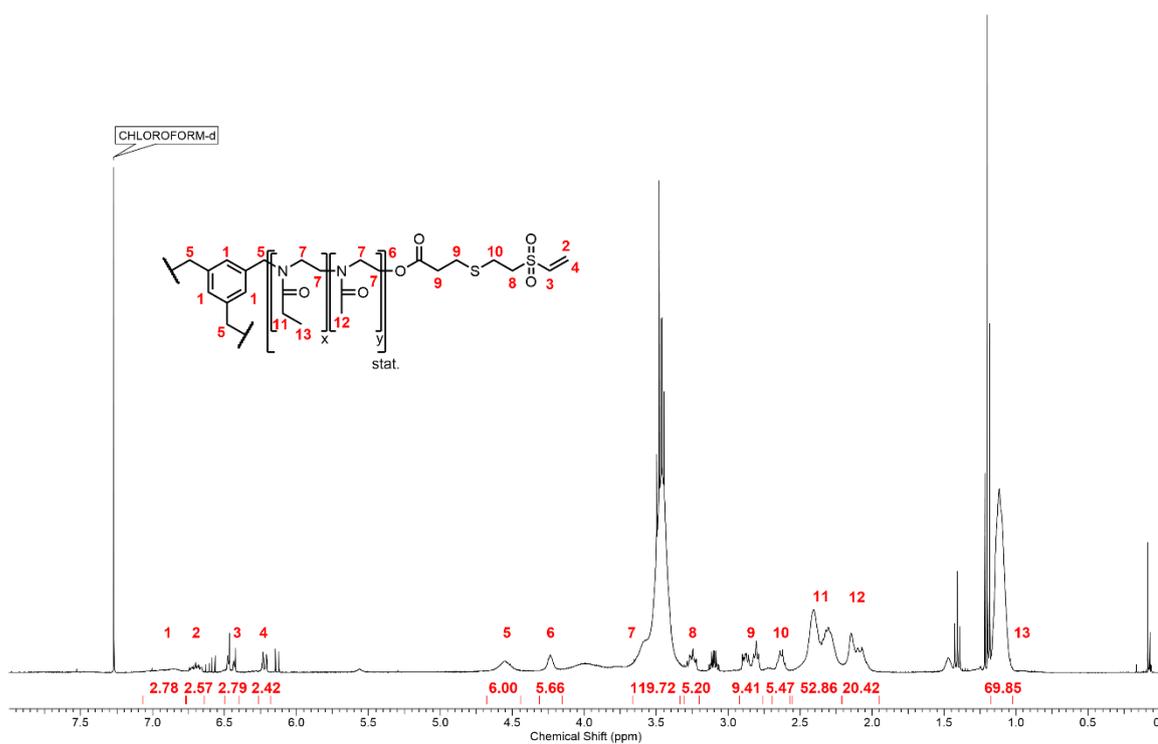
NMR 24: Bearbeitetes DOSY-NMR des **POx-DVS**.NMR 25:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von **POx-4-MPDVS** in  $\text{CDCl}_3$ .

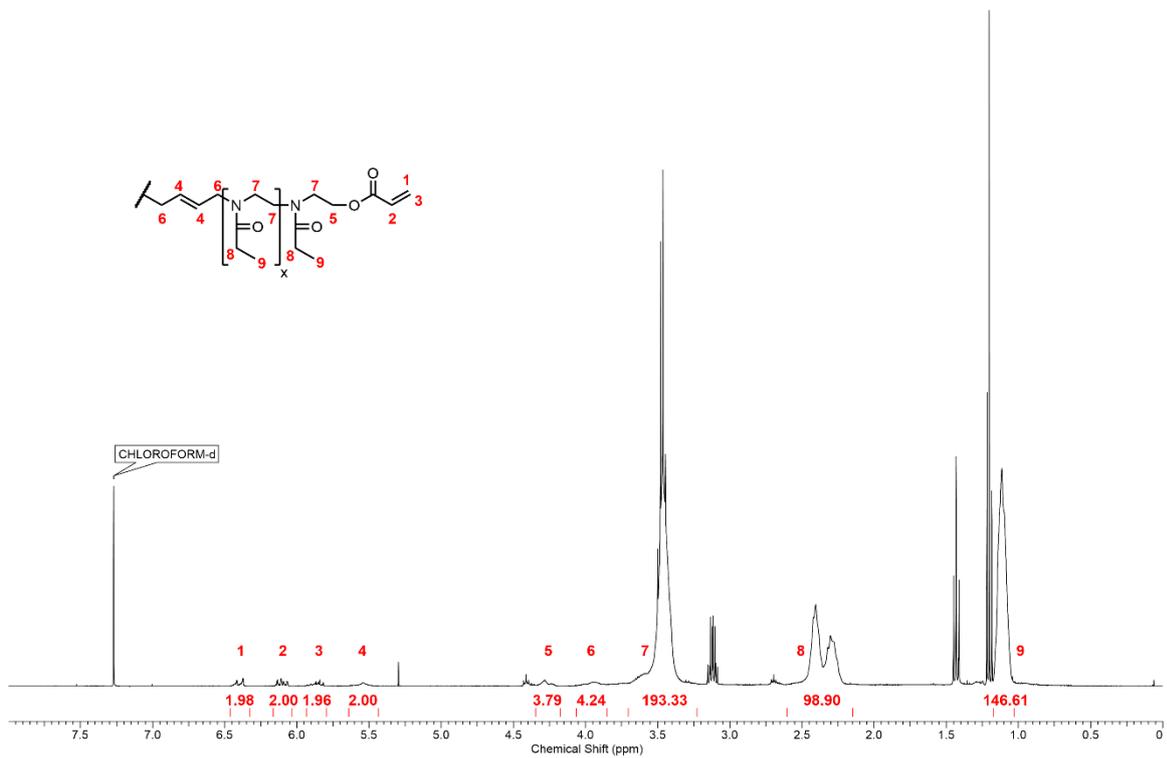


NMR 26: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-5-MPDVS in CDCl<sub>3</sub>.

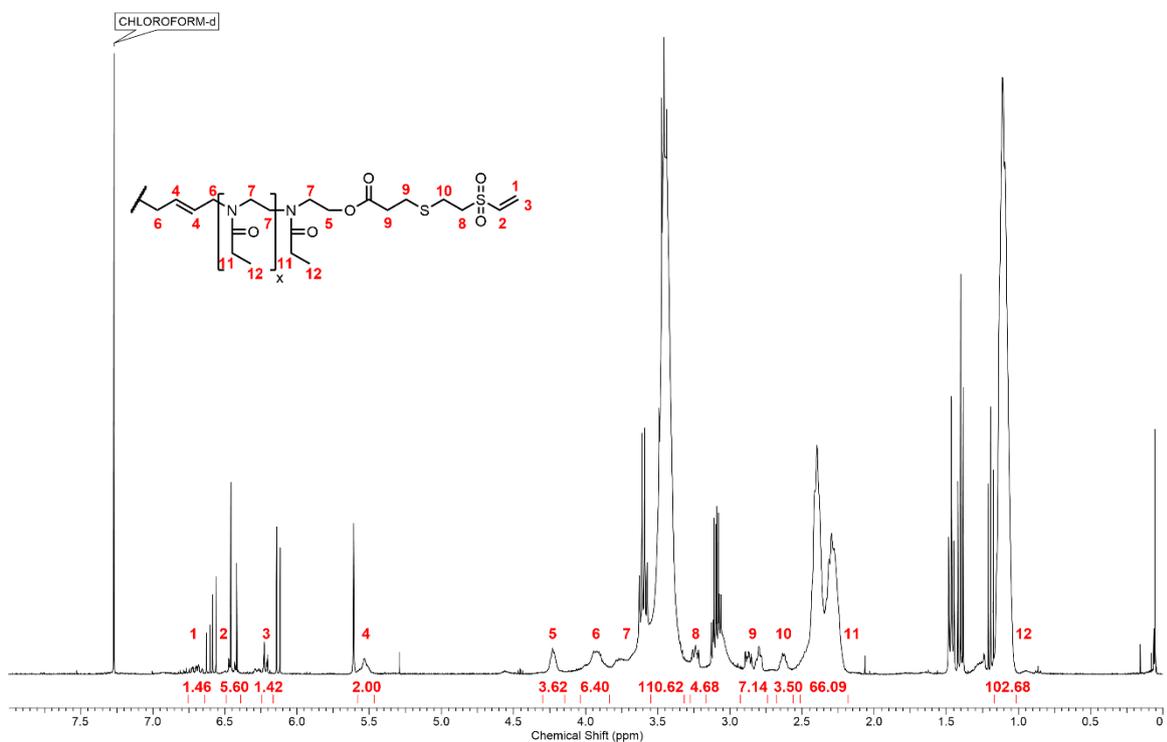


NMR 27: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-6-MPDVS in CDCl<sub>3</sub>.

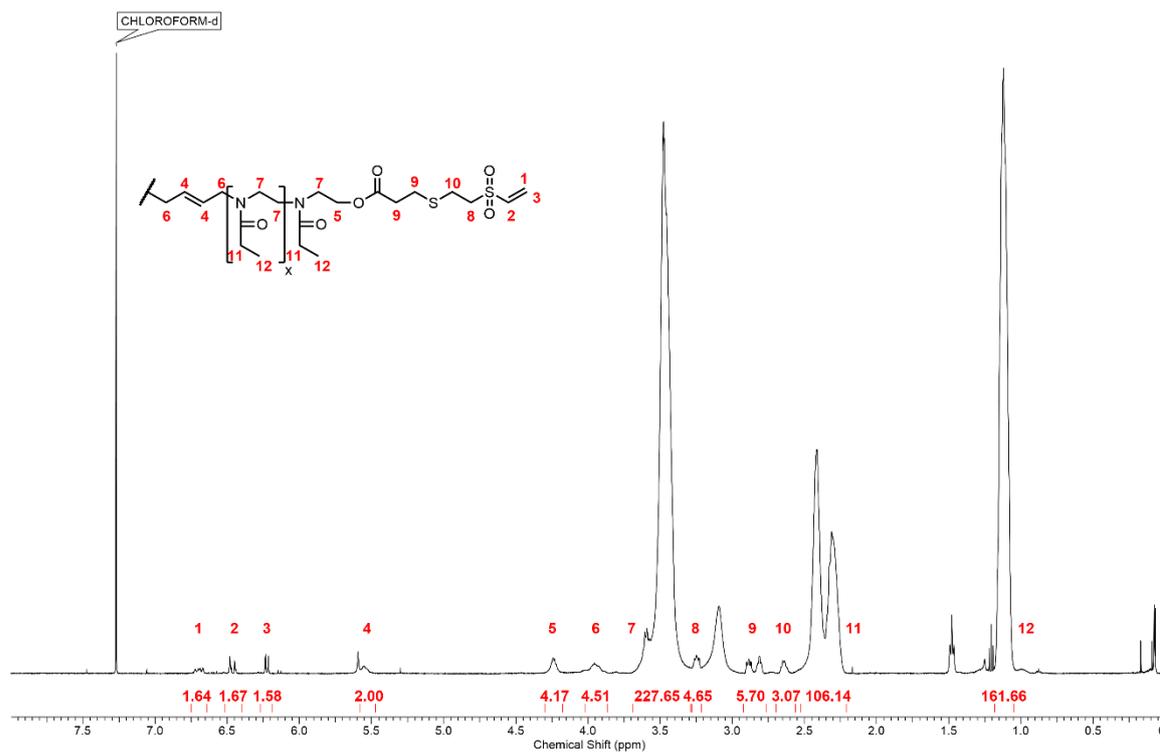
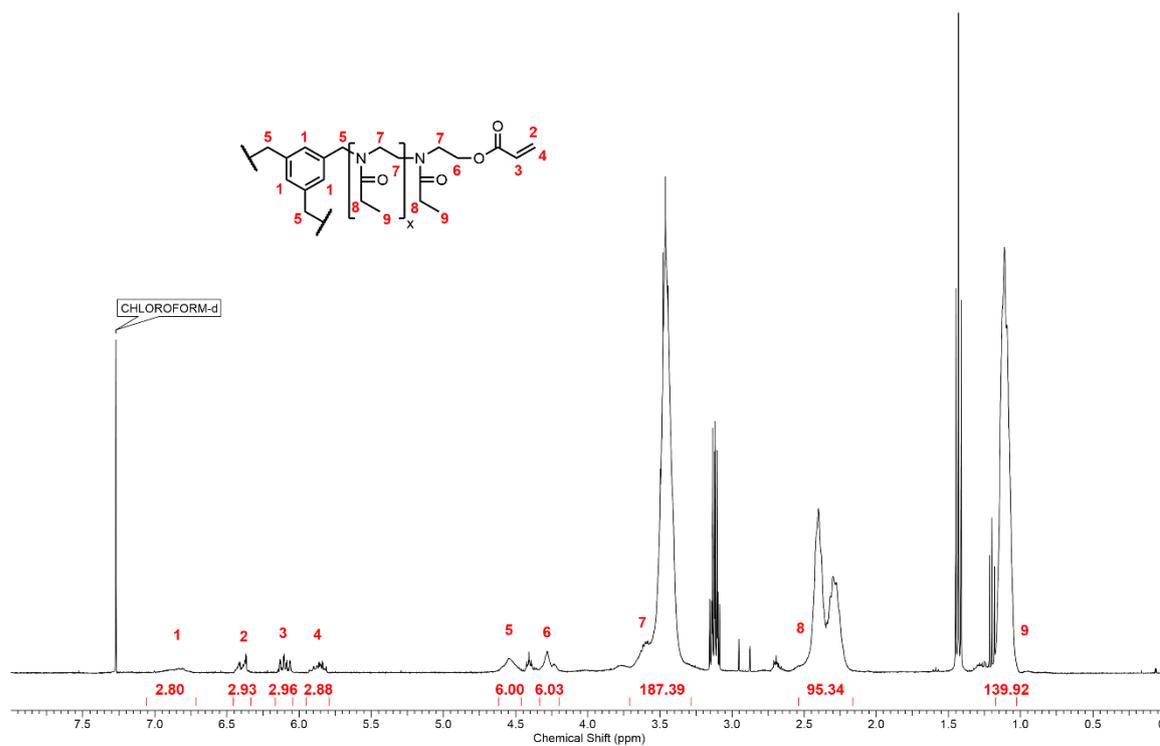
NMR 28: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-7-MPDVS in CDCl<sub>3</sub>.NMR 29: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-8-MPDVS in CDCl<sub>3</sub>.

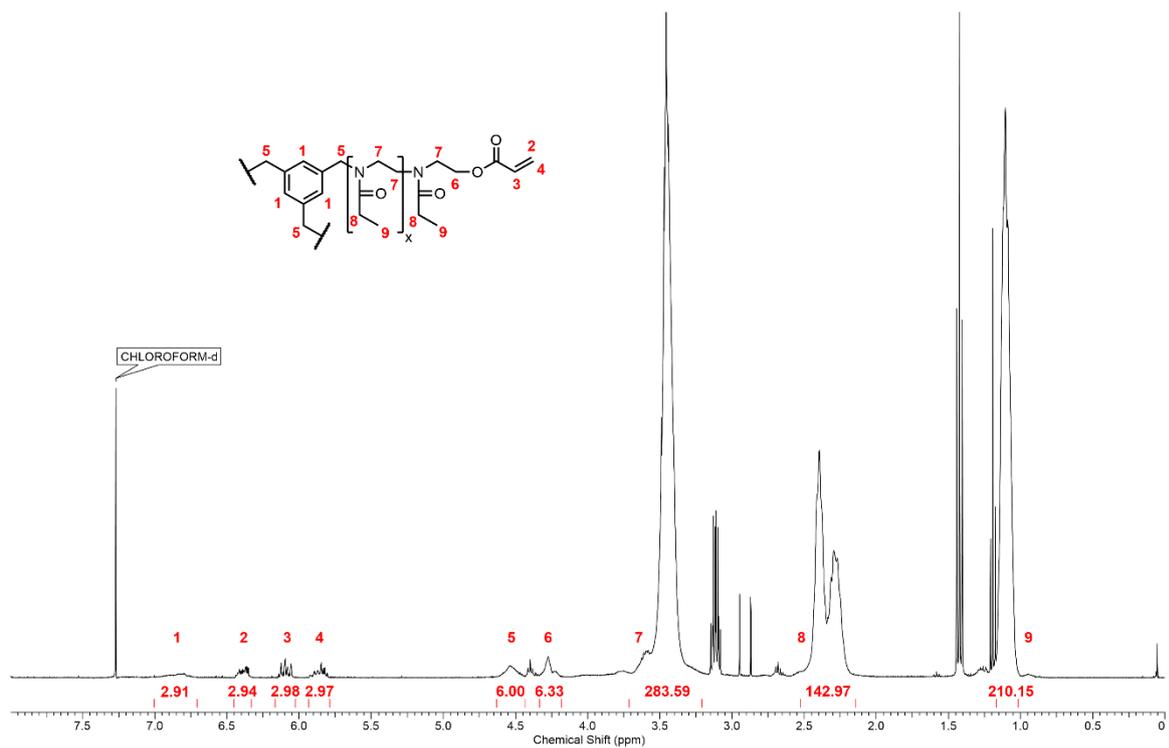


NMR 30: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-11 in CDCl<sub>3</sub>.

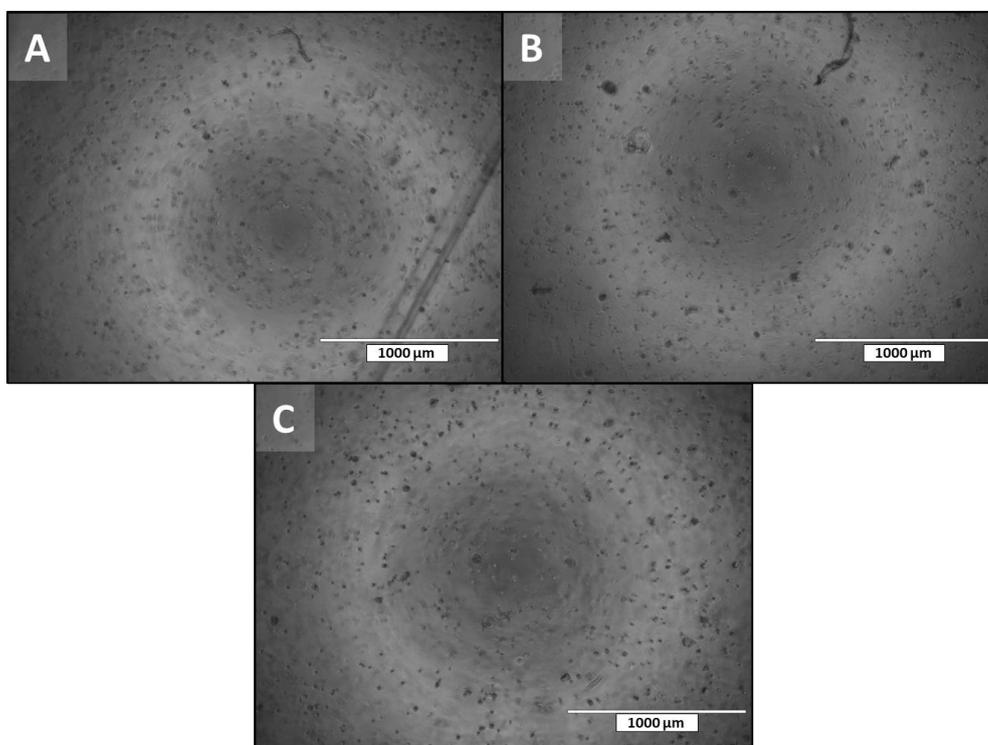


NMR 31: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von POx-12-MPDVS in CDCl<sub>3</sub>.

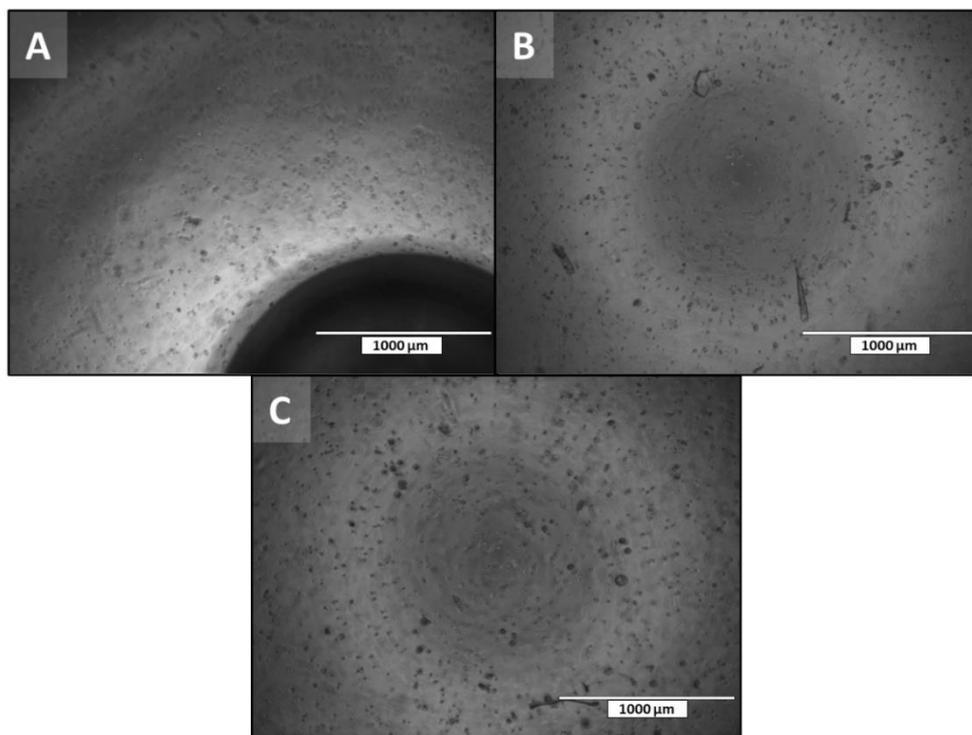
NMR 32:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von POx-13-MPDVS in  $\text{CDCl}_3$ .NMR 33:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von POx-14 in  $\text{CDCl}_3$ .

NMR 34:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von POx-15 in  $\text{CDCl}_3$ .

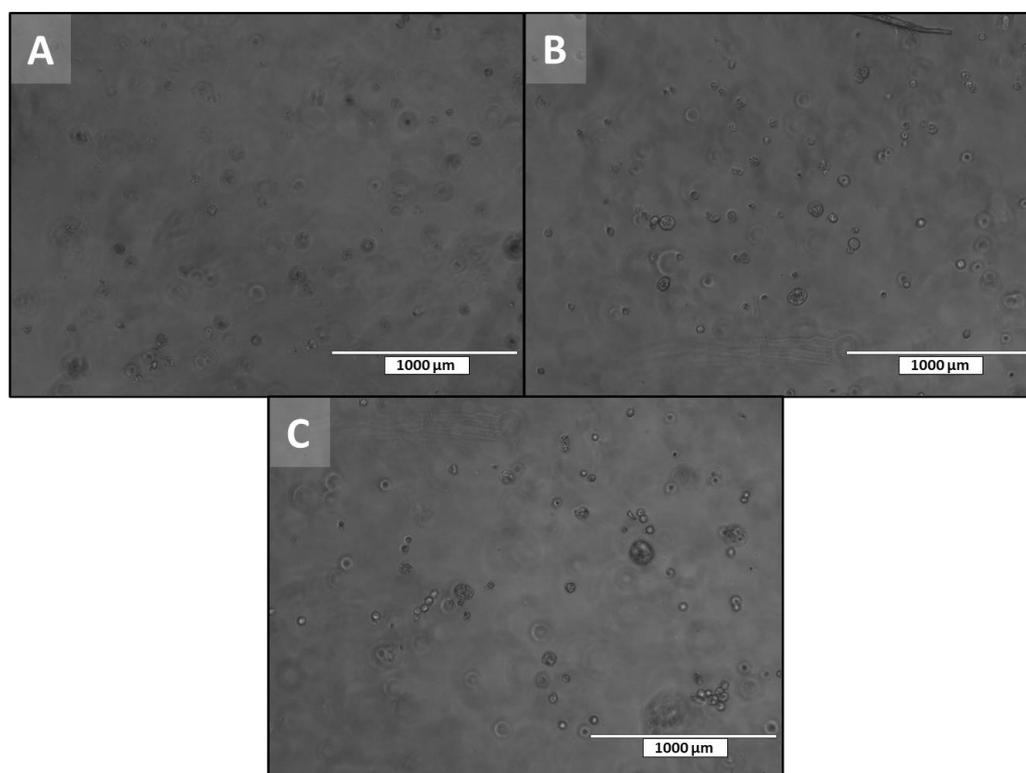
## 7.9. Mikroskopieaufnahmen



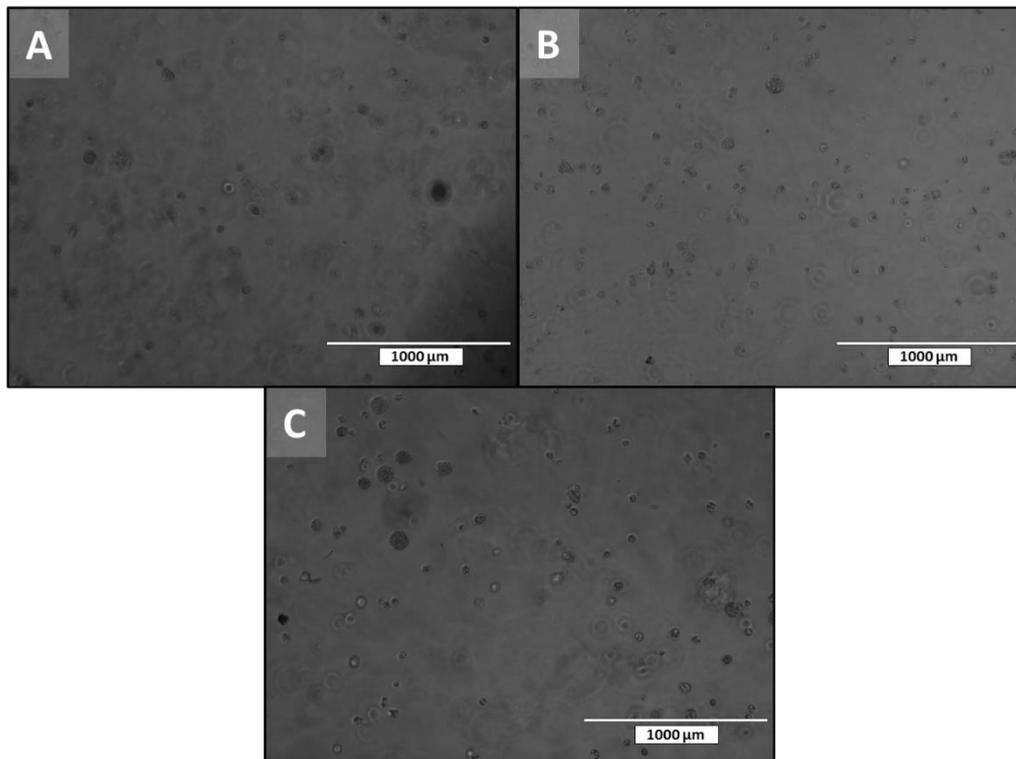
**Zellbild 1:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



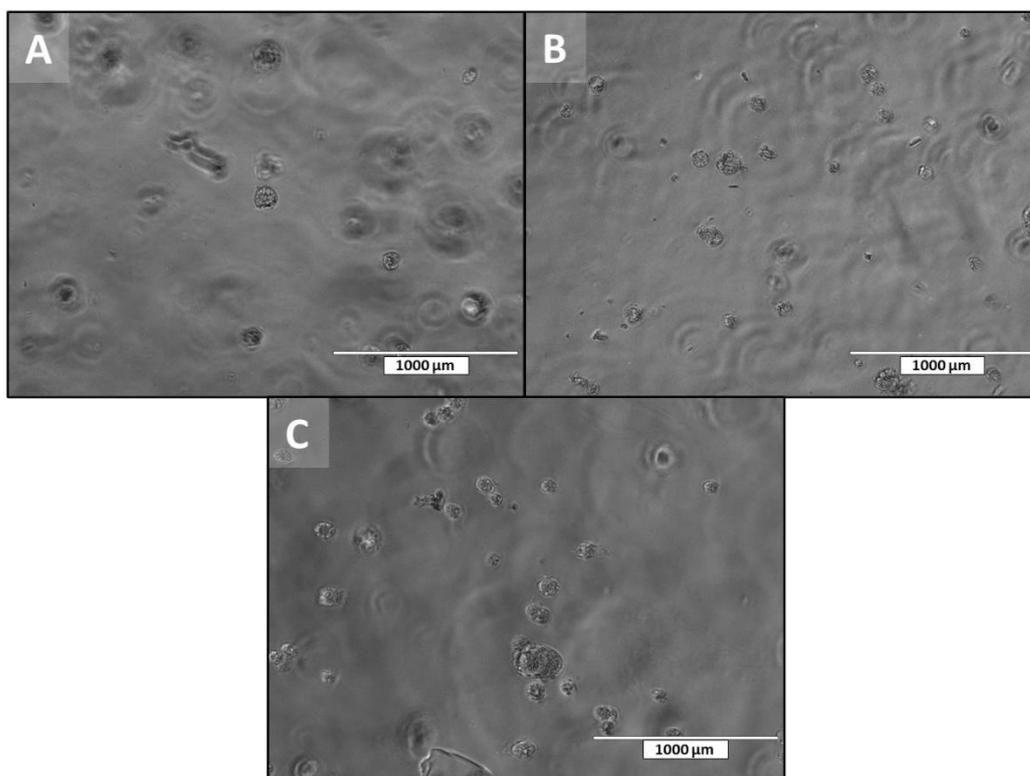
**Zellbild 2:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



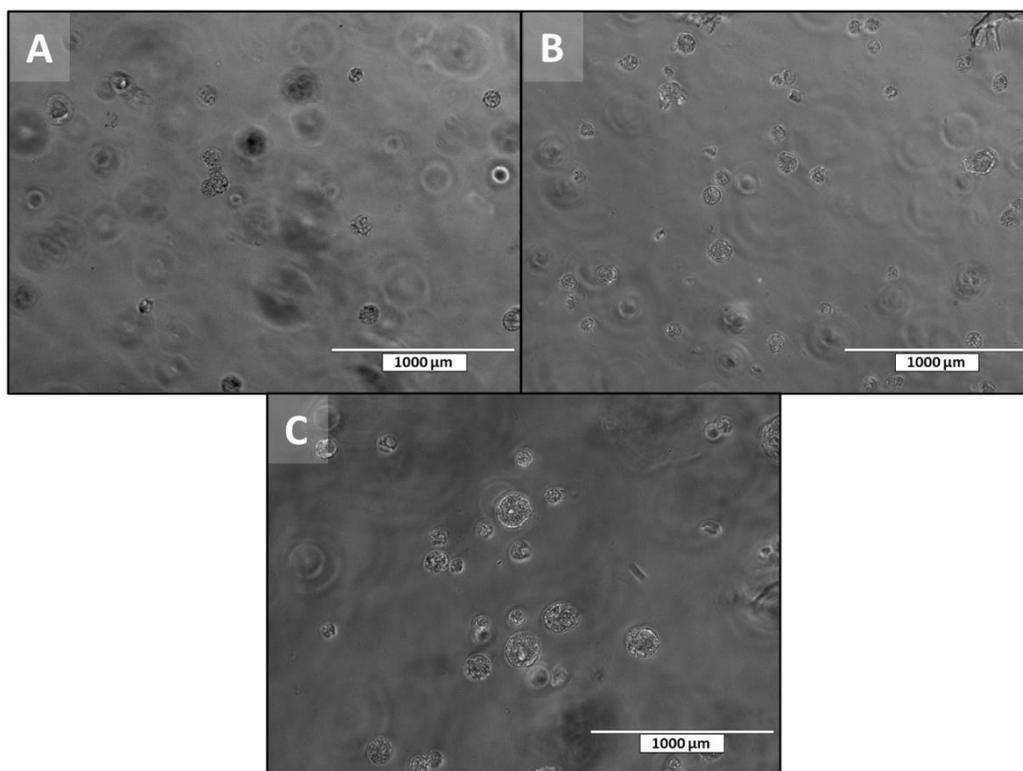
**Zellbild 3:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



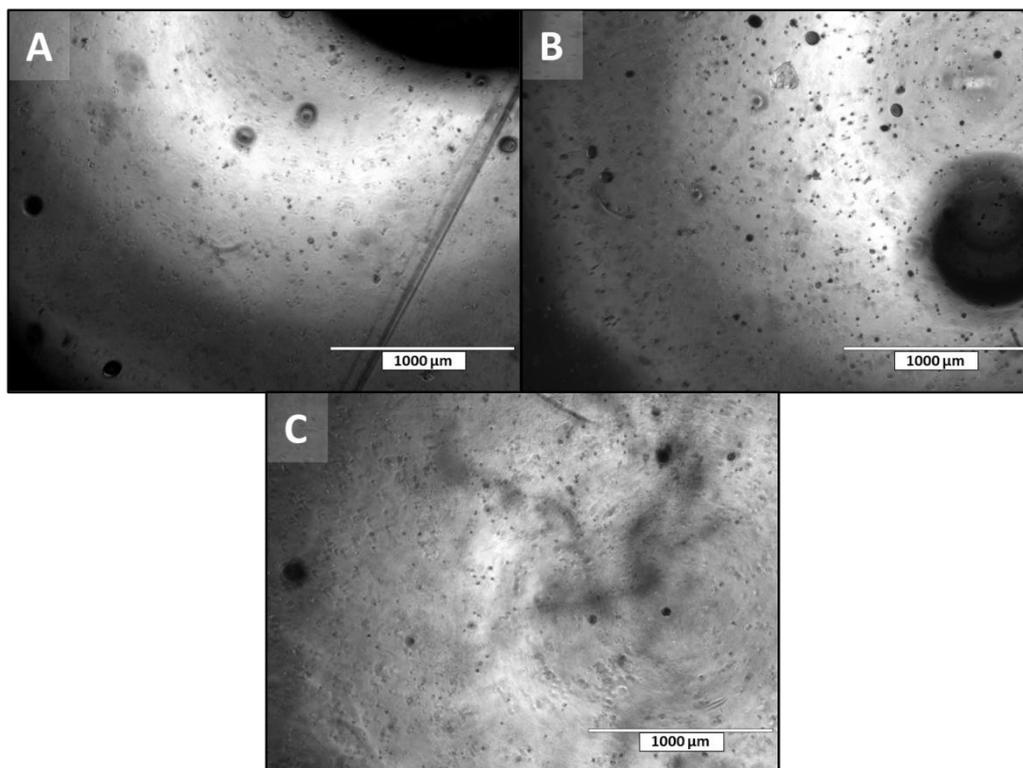
**Zellbild 4:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



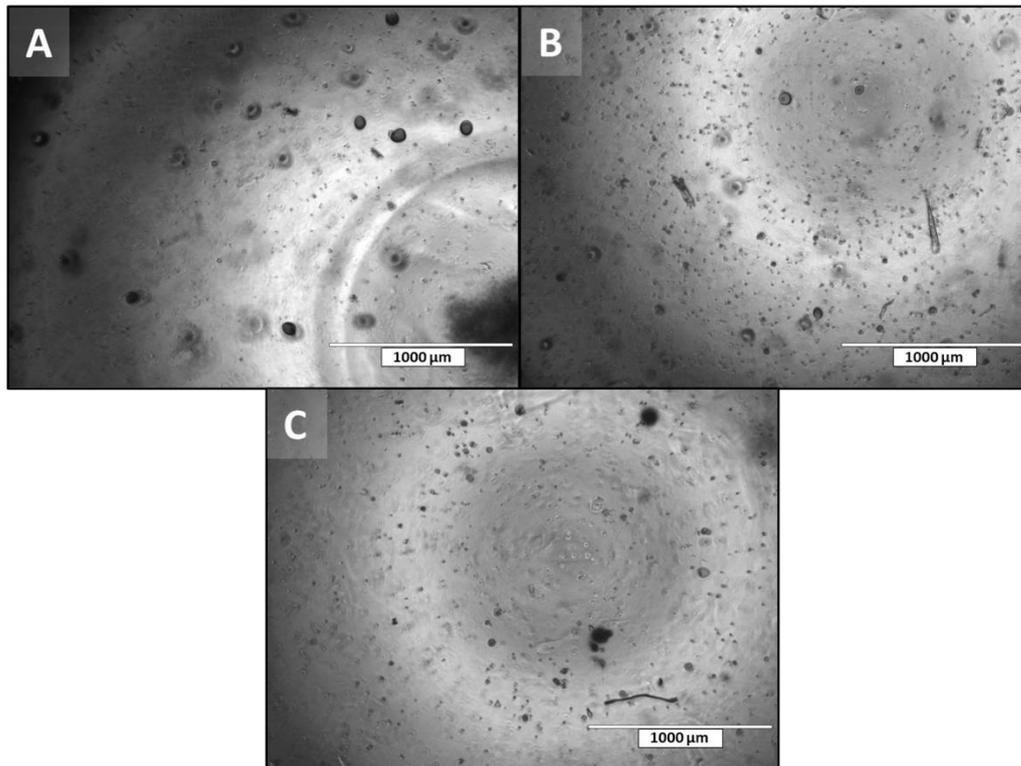
**Zellbild 5:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



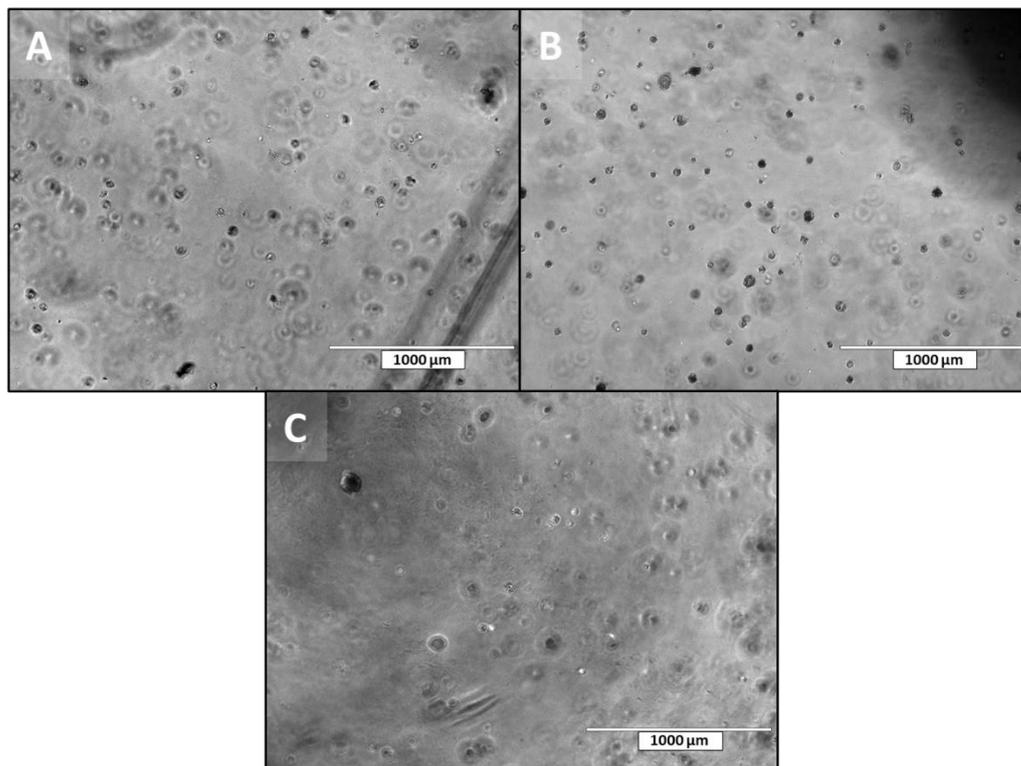
**Zellbild 6:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 1 Tag Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



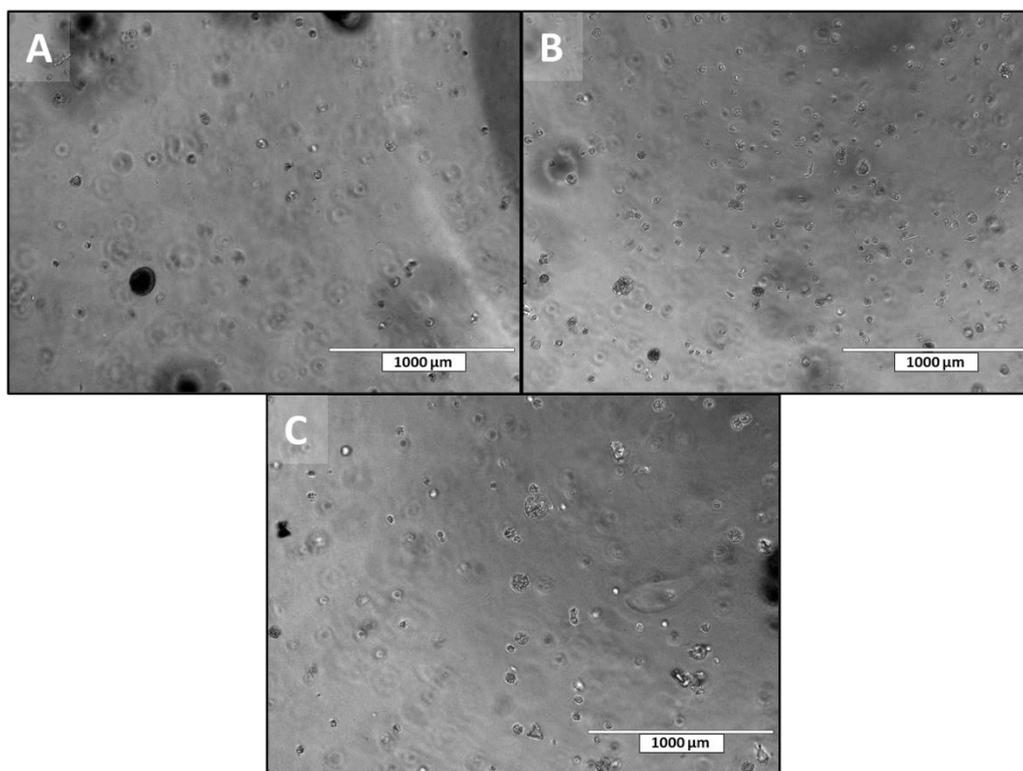
**Zellbild 7:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|C_{\text{peg}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



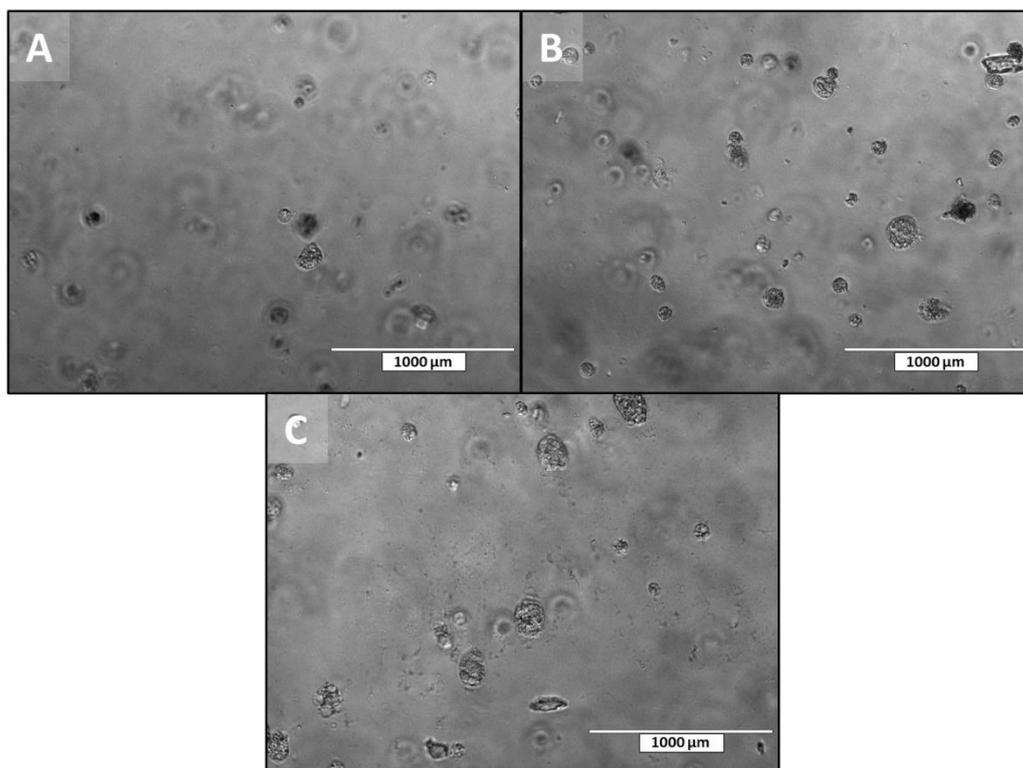
**Zellbild 8:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



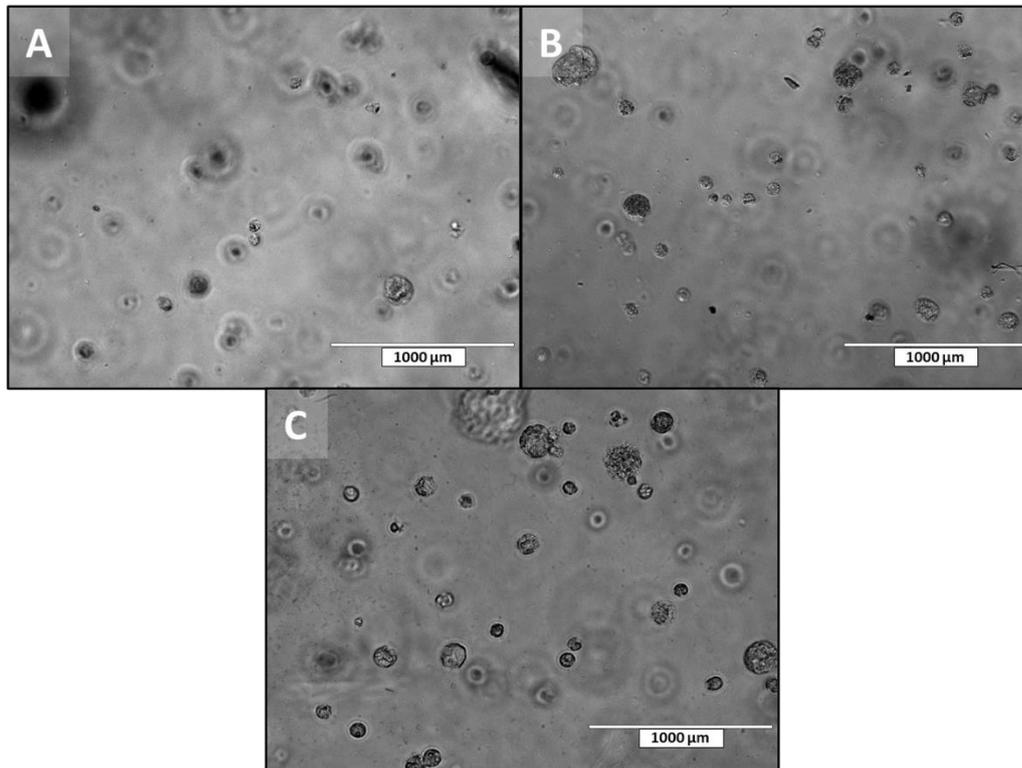
**Zellbild 9:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|_{C_{\text{pep}}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



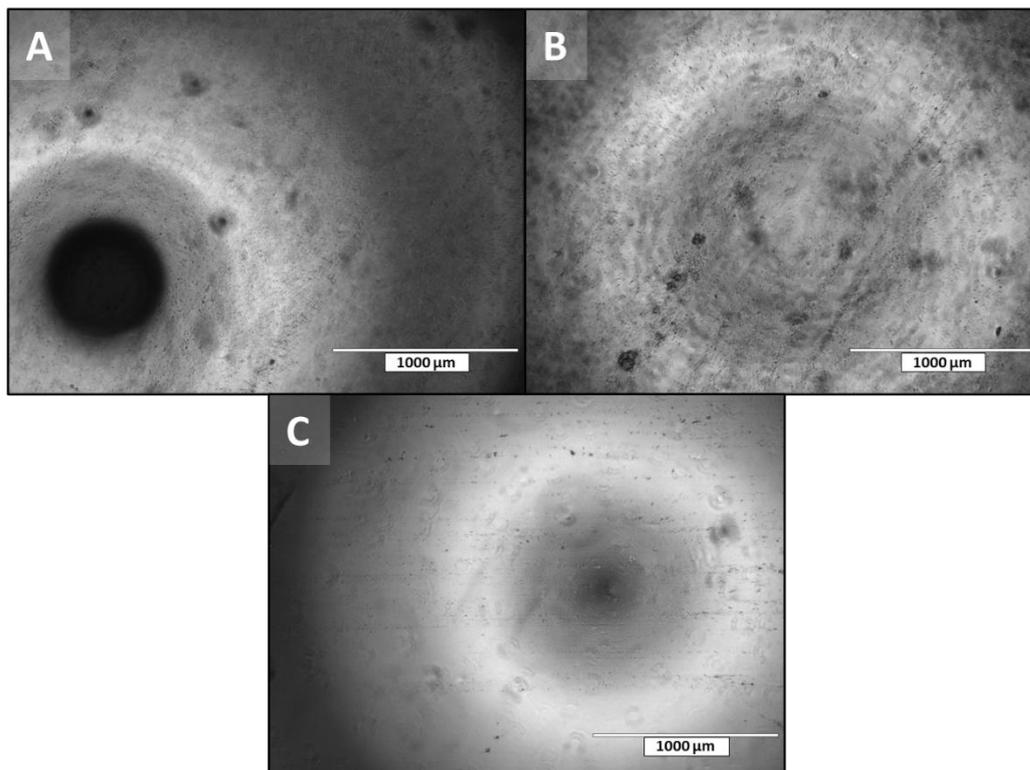
**Zellbild 10:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



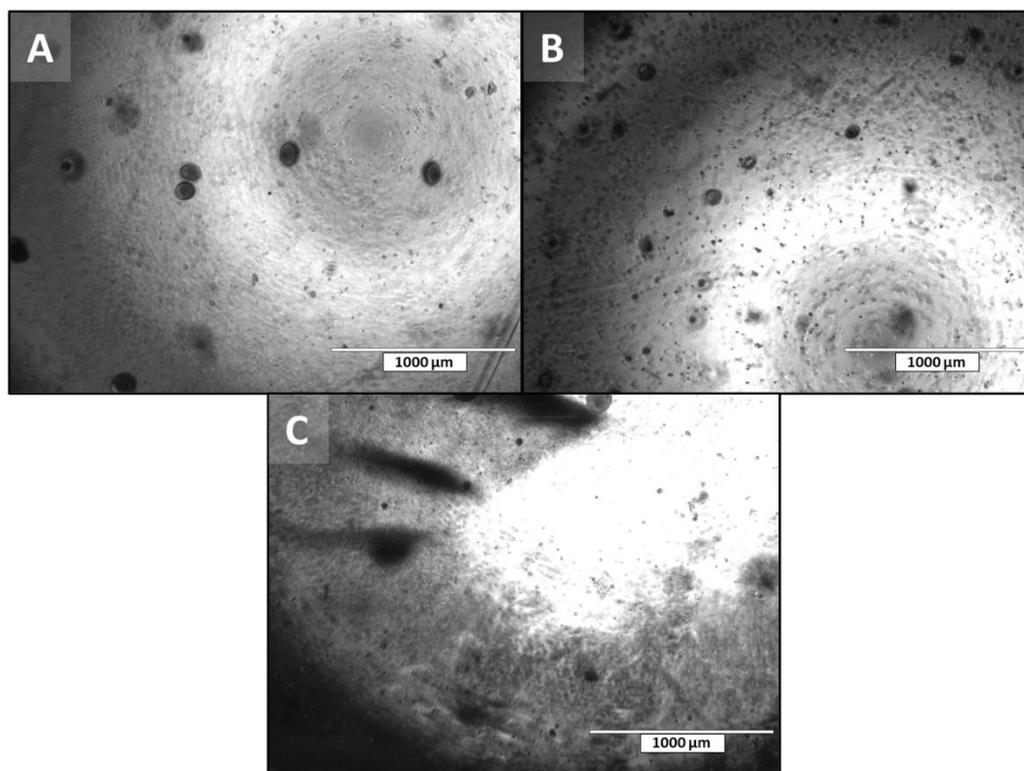
**Zellbild 11:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



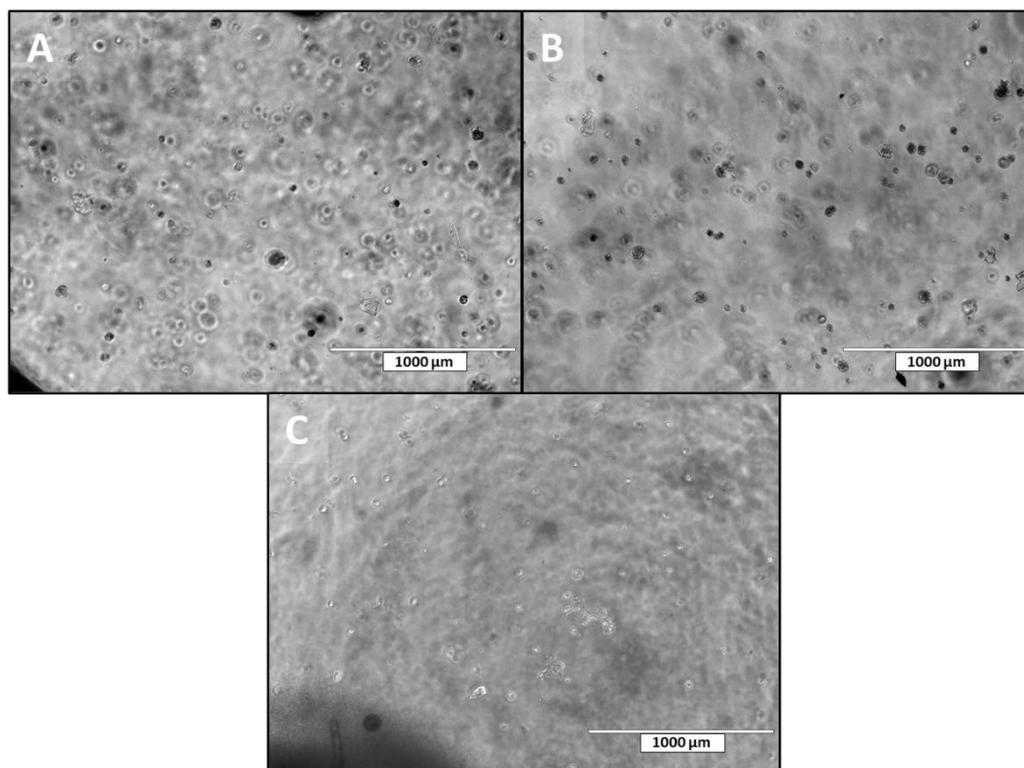
**Zellbild 12:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 3 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



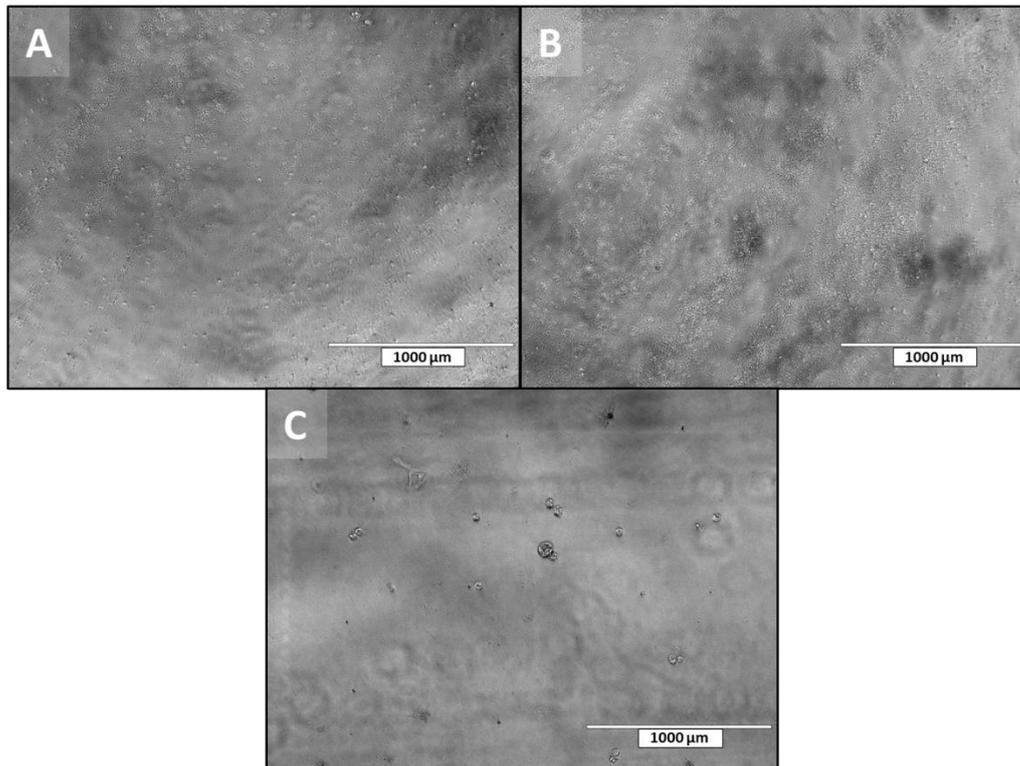
**Zellbild 13:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



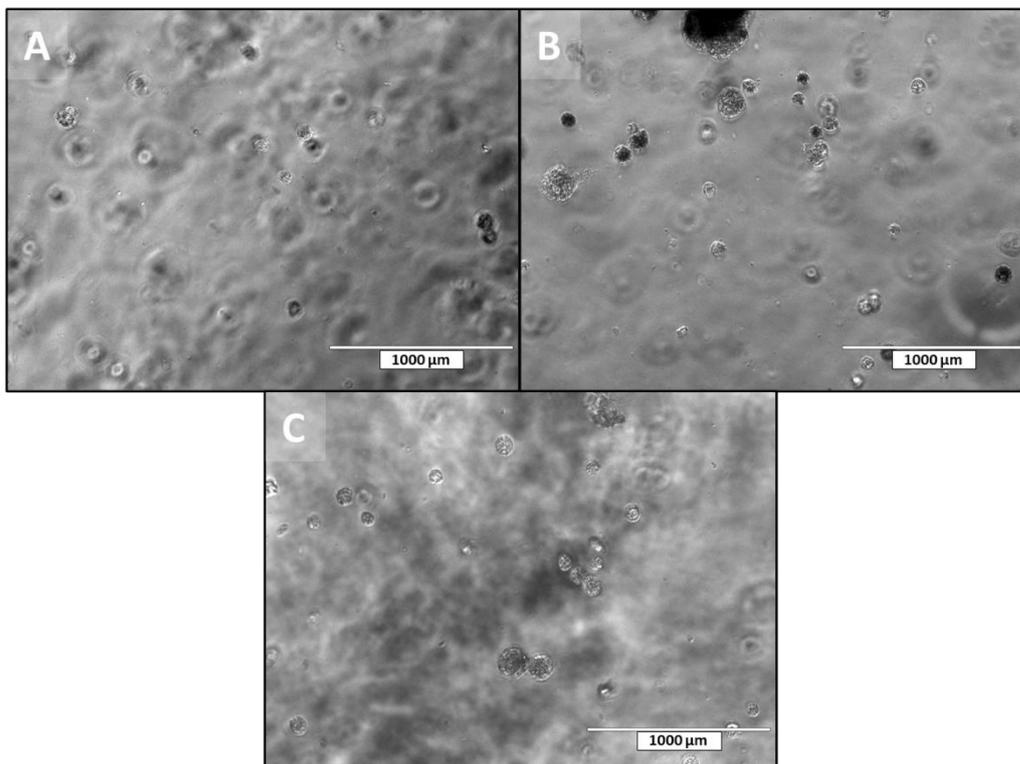
**Zellbild 14:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



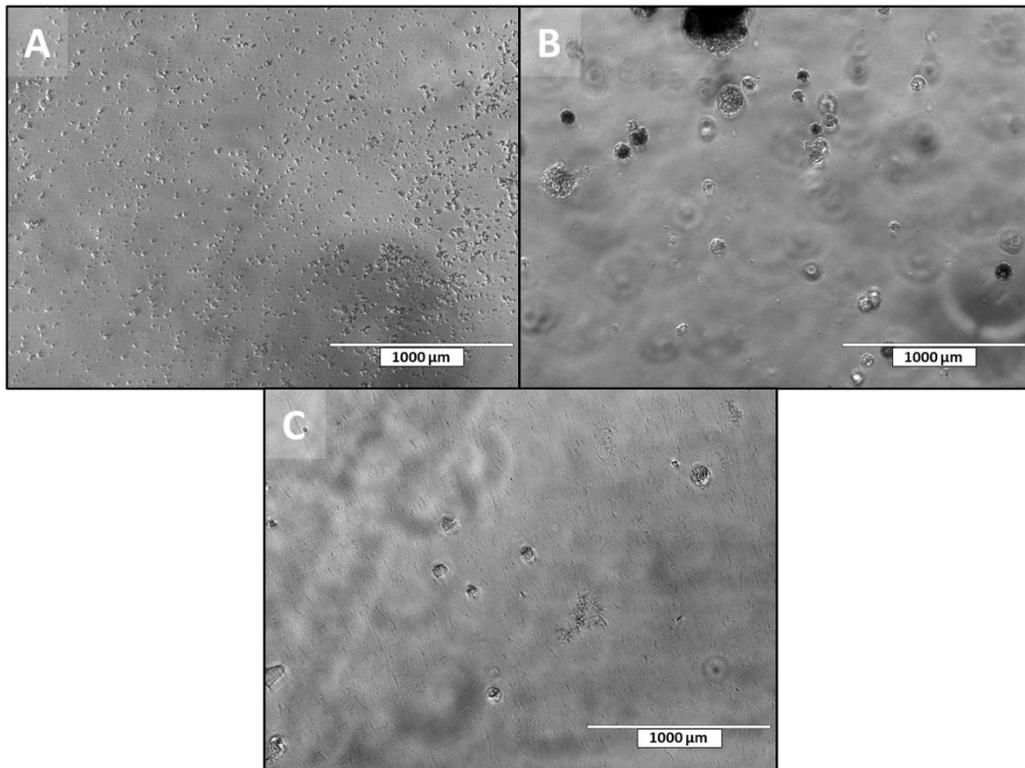
**Zellbild 15:** : Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



**Zellbild 16:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



**Zellbild 17:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-5-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .



**Zellbild 18:** Aufnahmen von 3D-Hydrogelen aus POx-13-MPDVS nach 7 Tagen Inkubationszeit; **A:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 0|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **B:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|0 \mu\text{mol/mL}$ ; **C:**  $c_{\text{kat}}|c_{\text{pep}} = 45|10 \mu\text{mol/mL}$ .

## 7.10. Eidesstattlicher 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)