

**Synthese und Charakterisierung von  
funktionalisierten Hydrogel Matrices und deren  
Anwendung in der Kultivierung von neuronalen Stammzellen**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und chemische Biologie

Arbeitsgruppe Polymere Hybridsysteme

vorgelegt von

**Nils Stamm**

aus Bottrop

Dortmund, 2023



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2018 bis Oktober 2022 unter der Leitung von Herrn *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* an der Fakultät für Chemie und chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Glotzbach, K., Stamm, N., Weberskirch, R., Faissner, A., *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 475.

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

Stamm, N., Glotzbach, K., Faissner, A., Weberskirch, R., *Gels* **2022**, *8*, 827.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Weberskirch

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tiller

Eingereicht am: 06.02.2023



## Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei *Prof. Dr. Ralf Weberskirch* bedanken. Vielen Dank für das interessante Forschungsthema, dein großes Interesse gegenüber meinen Ideen, die zahlreichen Fachgespräche und die mir gewährte Freiheit, sowie das entgegengebrachte Vertrauen.

Ein großer Dank gilt *Kristin Glotzbach*, welche in den letzten vier Jahren mit mir zusammen auf diesem Thema gearbeitet hat. Vielen Dank für die sehr gute Zusammenarbeit, die vielen fachlichen Gespräche und die Arbeit, die du in dieses Projekt gesteckt hast. Ohne dich wäre ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen! Zusätzlich möchte ich *Prof. Dr. Andreas Faissner* für die zahlreichen Fachgespräche und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme vor Ort in Bochum danken.

Weiterhin danke ich herzlich *Prof. Dr. Jörg Tiller* für die Übernahme des Korreferats. Zusätzlicher Dank gilt ebenfalls seiner gesamten Arbeitsgruppe. Insbesondere danke ich *Volker Brandt* für die REM-Aufnahmen und die fachliche Beratung zu diesen, sowie *Sascha Wilhelms* für die fachlichen und privaten Diskussionen, Bereitstellung von Geräten und diversen Chemikalien.

Ich danke der NMR-Abteilung von *Prof. Dr. Wolf Hiller* für die unzähligen NMR-Messungen und dem Zentrum für Massenspektrometrie von *Dr. Sebastian Zühlke* für das Aufnehmen zahlreicher Massenspektren. Weiterhin gilt mein Dank *Jens Warmers* vom Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie für die fachliche Beratung und die Bereitstellung der MALDI. Ohne diese Methoden wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt allen Studenten, die ich in den letzten vier Jahren in Praktika und Abschlussarbeiten betreuen durfte. Vielen Dank für das gezeigte Interesse und euren Beitrag zu dieser Arbeit. Besonders möchte ich dabei *Timo Forstbach*, *Cedric Arndt*, *Sebastian Brandenburg* und *Dagmar Schürmann* danken.

Ich danke ebenfalls allen Mitarbeitern der Fakultät Chemie und Chemische Biologie, insbesondere *Andrea Bokelmann*, *Dr. Alexandra Behler* und *Dr. Lyuba Iovkova*. Ein besonderer Dank gilt *Andreas Hammer*, *Katja Weber* und *Silvia Lessing*, die mir jederzeit bei organisatorischen Fragen und sonstigen Anliegen zur Seite standen.

Ein sehr großes Dankeschön gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre, den fachlichen Austausch, die sonstigen Gespräche in den Pausen und nach Feierabend und die insgesamt schöne Zeit. Besonders möchte ich *Dr. Max Jopen, Dr. Sarah Zinken, Dr. Florian Pätzold* und *Dr. David Pelzer* für die zahlreichen Brettspielabende und Treffen außerhalb der Uni danken. Ich bedanke mich bei *Marvin Dieter, Dr. Yannik Olszowy, David Mroß, Gonca Sevingen, Cemile Sirik, Timo Forstbach, Wibke Langenkamp* und *Dieu Cao* für die vielen interessanten Gespräche abseits der Uni und sonstigen Arbeitskreisaktivitäten. Ein großer Dank gilt *Janick Wesselmann, Lara Stahl, Wiebke Schnettger* und erneut *Dr. Max Jopen* und *Dr. Florian Pätzold*, mit denen ich mir über die letzten vier Jahre ein Büro teilen durfte. Vielen Dank für die schöne Zeit! Weiterhin danke ich den ehemaligen Mitgliedern, insbesondere *Dr. Hanne Braun-Streb, Dr. Christian Gramse* und *Dr. Patrick Bolduan*, für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und das Mentoring über die gesamte Zeit. Vielen Dank, dass ihr alle die Promotion und die Coronajahre für mich um einiges erleichtert habt!

*Dominic Weiher* möchte ich im Besonderen für das Korrekturlesen der Arbeit auf sprachliche und sonstige Fehler danken. Vielen Dank, dass du dich hier durchgequält hast, obwohl dieses Thema fernab von deinem Fachwissen liegt.

*Last, but not least* möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die ständige Unterstützung während meines gesamten Studiums danken. Nur durch euch konnte ich die Promotion bewältigen. Vielen Dank, dass ihr mir auch in stressigen Situationen und in der schwierigen Coronazeit zur Seite standet! Auf euch ist Verlass!

**Kurzfassung**

Durch die immer älter werdende Bevölkerung steigt mit hohem Alter auch die Anzahl an Krankheiten, welche mit einem Verlust von Zellen verbunden sind. Die Verwendung von Stammzellen stellt eine Möglichkeit zur Regeneration der verlorenen Zellen dar. Die begrenzte Verfügbarkeit von Stammzellen mit fortschreitendem Alter macht eine Kultivierung dieser Stammzellen *in vitro* notwendig. Zur Kultivierung von Stammzellen eignen sich Hydrogele, welche mit ihren mechanischen Eigenschaften dem natürlichen Gewebe ähneln. Wegen ihrer vielfältigen Eigenschaften finden Hydrogele Anwendung in vielen Bereichen der Medizin, aber auch im alltäglichen Leben.

In dieser Arbeit wurden Hydrogele durch die Verwendung von vollsynthetischen Präpolymeren auf Basis von 4-Acryloylmorpholin und *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamid durch die Vernetzung über eine Michael-Addition mit Poly(ethylenglykol)diacrylat hergestellt und das Verhalten von neuronalen Stammzellen während der Kultivierung mit diesen Hydrogelen untersucht. So war es zunächst möglich definierte Präpolymere mit kationischen Funktionalitäten oder verschiedenen Peptidsequenzen herzustellen. Aus diesen Präpolymeren wurden anschließend Hydrogele hergestellt. Die Untersuchung von neuronalen Stammzellen und Tumorzellen auf kationischen Hydrogelen zeigte eine Erhöhung der Adhäsion der Zellen in Abhängigkeit der kationischen Ladung. Zusätzlich war es für neurale Stammzellen möglich, die Kombination von kationischen Gruppen mit dem Wachstumsfaktor FGF zu untersuchen und einen synergistischen Effekt zwischen diesen Komponenten nachzuweisen, wodurch die Adhäsion und Überlebensfähigkeit der Stammzellen enorm gesteigert wurde. Neben dem bereits beschriebenen Polymersystem wurde ebenfalls ein weiteres Polymersystem auf Basis von Thiolactonen entwickelt. Dieses Polymersystem ermöglichte eine vielfältigere Funktionalisierung der Polymere durch die Dualität des geöffneten Thiolactons. So konnte der Thiolactonring durch Verwendung verschiedener Amine geöffnet und die freigewordenen Thiole zur partiellen Funktionalisierung über eine Michael-Addition eingesetzt werden. Dadurch war es möglich unter milden Bedingungen und wenig Aufwand vielfältige Präpolymere mit verschiedenen Funktionalitäten herzustellen. Die Biokompatibilität dieses neuen Polymersystems wurde in Zellexperimenten mit neuronalen Stammzellen nachgewiesen.

## **Abstract**

Due to the aging population, the number of diseases associated with a loss of cells increases with advanced age. The use of stem cells represents a possibility for the regeneration of lost cells. The limited availability of stem cells with advancing age makes it necessary to cultivate these stem cells *in vitro*. Hydrogels, which resemble natural tissue with their mechanical properties, are suitable for the cultivation of stem cells. Because of their diverse properties, hydrogels are used in many areas of medicine, but also in everyday life.

In this work, hydrogels were prepared by using fully synthetic prepolymers based on 4-Acryloylmorpholine and *N,N'*-Bis(methacryloyl)cystamide by crosslinking via a Michael-addition with Poly(ethylene glycol) diacrylate and the behavior of neural stem cells during cell cultivation with these hydrogels was investigated. Defined prepolymers with cationic charges or different peptide sequences could be prepared and used for hydrogels. An investigation of neural stem cells and tumor cells on cationic hydrogels showed an increase in adhesion of the cells depending on the cationic charge. In addition, for neural stem cells it was possible to investigate the combination of cationic groups with the growth factor FGF and a synergistic effect of these two components, resulting in an enormous increase in cell adhesion and survival, could be demonstrated. In addition to the polymer system already described, another polymer system based on thiolactones was also developed. This polymer system allowed a more diverse functionalization of the polymers due to the duality of the opened thiolactone. Thus, the thiolactone ring could be opened by using different amines and the released thiols could be used for partial functionalization via Michael-additions. This made it possible to prepare diverse prepolymers with different functionalities under mild conditions and with little effort. The biocompatibility of this new polymer system was demonstrated in cell experiments with neural stem cells.

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung .....	1
1.1	Stammzellen .....	1
1.1.1	Pluripotente Stammzellen .....	2
1.1.2	Induziert pluripotente Stammzellen .....	3
1.1.3	Multipotente Stammzellen .....	4
1.1.4	Extrazelluläre Matrix und Stammzellnische .....	5
1.2	Stammzelltherapien .....	7
1.3	Polymere in der Medizin .....	9
1.3.1	Hydrogele .....	9
1.3.1.1	Historie der Hydrogele.....	10
1.3.1.2	Klassifizierung von Hydrogelen .....	11
1.3.1.3	Chemische Hydrogele.....	12
1.3.1.4	Physikalische Hydrogele.....	15
1.3.2	Kultivierung von neuronalen Stammzellen auf synthetischen Hydrogelen 16	
2	Zielsetzung .....	21
3	<i>In situ</i> vernetzte Hydrogele mit spaltbarer Vernetzungsstelle .....	23
3.1	Herstellung der Präpolymere über <i>in situ</i> vernetzte Gele.....	23
3.1.1	Synthese der Monomere & Vernetzer.....	23
3.1.2	Synthese der Präpolymere.....	28
3.1.2.1	Charakterisierung mittels <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie .....	30
3.1.2.2	Charakterisierung mittels Ellman`s Assay.....	33
3.2	Herstellung der Hydrogele .....	36
3.2.1	Untersuchung der Hydrogele mittels Rheologie .....	37
3.2.2	Bestimmung der Quellwerte der Hydrogele .....	39
3.2.3	Untersuchung der Hydrogele mittels Rasterelektronenmikroskopie ...	40
3.3	Kultivierung von NSCs auf Hydrogelen .....	42

3.3.1	Die alternative Zelllinie U251-MG.....	43
3.3.2	Einfluss der Steifigkeit auf die Kultivierung von NSCs.....	47
3.3.3	Einfluss von Proteinen und Wachstumsfaktoren auf die Kultivierung von NSCs .....	49
3.3.4	Einfluss verschiedener kationischer Monomere auf die Kultivierung von NSCs .....	57
3.3.5	Untersuchung der Zelltoxizität verschiedener Vernetzer.....	62
3.3.6	Kultivierung von NSCs auf dialysierten Hydrogelen .....	68
3.4	Kultivierung von Zellen in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen.....	71
3.4.1	Charakterisierung der Hydrogele .....	71
3.4.2	Untersuchung von U251-MG Zellen in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen .....	78
3.4.3	Kultivierung der U251-MG Zellen auf dialysierten Hydrogelen.....	82
3.4.4	Untersuchung von NSCs in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen .....	86
3.5	Ausblick auf erste 3D Zellexperimente.....	99
3.6	Fazit.....	101
4	Hydrogelsystem basierend auf Thiolactonen.....	104
4.1	Alternativen zur Konjugation von Peptiden.....	104
4.2	<i>N</i> -Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton als Monomer für thiolhaltige Präpolymere .....	107
4.3	Synthese der TLA-Präpolymere.....	109
4.3.1	RAFT-Polymerisation.....	109
4.3.2	Synthese von <i>N</i> -Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton .....	111
4.3.3	Synthese und Charakterisierung der TLA-Präpolymere .....	112
4.4	Herstellung und Charakterisierung der TLA-Hydrogele.....	123
4.5	Kultivierung von NSCs auf TLA-Hydrogelen .....	126
4.6	Fazit.....	129

5	Konjugation von Proteinen .....	130
5.1	Proteinkonjugation über NTA-Liganden.....	133
5.2	Proteinkonjugation über ein 2-Pyridincarboxaldehyd Motiv .....	135
5.3	Nicht selektive Proteinkonjugation über Aktivester .....	143
5.4	Fazit .....	147
6	Zusammenfassung & Ausblick .....	148
7	Experimenteller Teil.....	156
7.1	Allgemeines .....	156
7.1.1	NMR-Spektroskopie .....	156
7.1.2	UV/Vis-Spektroskopie .....	156
7.1.3	Ellman`s Assay .....	156
7.1.4	Rheologie .....	156
7.1.5	Analytische HPLC & niedrigaufgelöste Massenspektrometrie .....	161
7.1.6	Hochauflösende Massenspektrometrie.....	161
7.1.7	Gelpermeationschromatographie .....	161
7.1.8	Zetapotential.....	161
7.1.9	Rasterelektronenmikroskopie.....	162
7.2	Niedermolekulare Synthesen.....	162
7.2.1	Synthese von <i>N,N</i> -Bis(methacryloylcystamid) (BMAC) .....	162
7.2.2	Synthese von Trimethylaminoethylacrylat (TMAEA).....	163
7.2.3	Synthese von PEGDA-3500.....	163
7.2.4	Synthese von Boc-Aminopropanol .....	164
7.2.5	Synthese von Boc-Aminoproylacrylat (Boc-APropAc).....	164
7.2.6	Synthese von Boc-Aminopentanol.....	165
7.2.7	Synthese von Boc-Aminopentylacrylat (Boc-APentAc) .....	165
7.2.8	Synthese von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat.....	166
7.2.9	Synthese von einseitig Boc geschütztem 2,2`-(Ethylen dioxy)bis(ethylamin).....	166

7.2.10	Synthese von <i>N</i> -Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton (TLA).....	167
7.2.11	Synthese des NTA-Monomers .....	167
7.2.12	Synthese von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin .....	168
7.2.13	Synthese von (6-formylpyridin-2-yl)methyl methansulfonat .....	168
7.2.14	Synthese von Boc-Piperazin .....	169
7.2.15	Synthese des 2PCA-Acrylats .....	169
7.2.16	Synthese von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat.....	170
7.2.17	Synthese von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat .....	170
7.2.18	Synthese von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure.....	171
7.2.19	Synthese des 2PCA-NHS-Aktivesters .....	171
7.2.20	Synthese von Hexansäureacrylamid .....	172
7.3	Synthese von Polymeren und polymeranaloge Reaktionen .....	172
7.3.1	Synthese der BMAC-haltigen Präpolymere.....	172
7.3.2	Funktionalisierung der BMAC-Präpolymere mit Peptiden.....	174
7.3.3	Synthese von Poly-2-Oxazolinen.....	174
7.3.4	Synthese der TLA-Polymere.....	175
7.3.5	Ringöffnung der TLA-Polymere.....	176
7.3.6	Funktionalisierung der geöffneten TLA-Polymere.....	176
7.3.7	Polymeranaloge Synthese des NHS-Polymers .....	177
7.3.8	Polymeranaloge Synthese des NTA-Polymers .....	177
7.3.9	Herstellung des NTA-Eisenkomplexes .....	178
7.3.10	Synthese des PAMor-co-HSAA-Polymers (P11) .....	178
7.3.11	Synthese der Aktivester Polymere zur Proteinkonjugation .....	178
7.3.12	Konjugation von Proteinen an Aktivester-Polymere .....	179
7.4	Herstellung der Hydrogele und Durchführung der Zelleexperimente .....	179
7.4.1	U251-MG Zelllinie.....	179
7.4.2	Präparation der primären Neurosphären von Mäusen.....	180

7.4.3	Herstellung der Hydrogele für rheologische Untersuchungen.....	181
7.4.4	Herstellung der Hydrogele für Zelleexperimente .....	181
7.4.5	Herstellung von Hydrogelen für 3D Zelleexperimenten .....	182
7.4.6	Färbung mit einem live/dead Assay .....	182
7.4.7	Immunohistochemie der U251-MG Zellen.....	183
7.4.8	Immunohistochemie der NSCs .....	183
8	Literaturverzeichnis.....	185
9	Anhang .....	194
9.1	Abkürzungen .....	194
9.2	Symbole.....	196
9.3	Abbildungsverzeichnis .....	197
9.4	Tabellenverzeichnis .....	219
9.5	Spektren und weitere Abbildungen .....	220



## 1 Einleitung

Aufgrund der Alterung der Bevölkerung treten bei vielen Menschen im fortschreitenden Alter vermehrt Krankheiten wie Krebs<sup>[1]</sup>, zerebrovaskuläre Erkrankungen<sup>[2]</sup> (z.B. Schlaganfall) oder neurodegenerative Krankheiten (z.B. Alzheimer oder Parkinson)<sup>[3,4]</sup> auf. Im Jahr 2017 gehörten in den USA sowohl Krebs (21 %), zerebrovaskuläre Krankheiten (5 %) als auch Alzheimer (4 %) zu den zehn verbreitetsten Todesursachen.<sup>[1]</sup> Während Krebs unkontrolliertes Zellwachstum hervorruft<sup>[5]</sup>, steht bei neurodegenerativen Krankheiten vor allem der Verlust von neuronalen Zellen im Vordergrund.<sup>[6]</sup> Eine Möglichkeit solche neurodegenerativen Krankheiten zu heilen und dem Verlust von Zellen entgegenzuwirken, ist eine Therapie mit Stammzellen zur Regeneration des Gewebes. Dabei werden zunächst patienteneigene Stammzellen entnommen, *in vitro* kultiviert und anschließend, teilweise unter Verwendung eines Gerüsts (engl. *scaffold*), reimplantiert, um die Funktion verschiedenster verlorener Zelltypen wiederherzustellen.<sup>[7]</sup>

### 1.1 Stammzellen

Zellen mit der Möglichkeit der Selbsterneuerung durch Zellteilung und der Fähigkeit durch Differenzierung reife Zellen zu generieren werden als Stammzellen bezeichnet.<sup>[8]</sup> Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser Zellen ist die Möglichkeit der asymmetrischen Zellteilung, wodurch zwei verschiedene Tochterzellen gebildet werden. Dabei verbleibt eine dieser Zellen als Stammzelle, während die zweite Tochterzelle differenziert als Vorläuferzelle vorliegt. Weiterhin ist eine Stammzelle in der Lage, eine symmetrische Zellteilung durchzuführen, wodurch entweder zwei Stammzellen oder aber zwei Vorläuferzellen entstehen. Dadurch ist es möglich die Selbsterneuerung der Stammzellen aufrecht zu erhalten. Bei den Stammzellen wird zwischen embryonalen oder adulten Stammzellen unterschieden. Auf Grund des natürlichen Alterungsprozesses von Zellen sterben diese mit fortlaufendem Alter ab und sind nicht mehr teilungsfähig. Adulte Stammzellen sorgen hierbei für einen stetigen Ersatz dieser Zellen und sind in nahezu jedem Organ zu finden. Embryonale Stammzellen hingegen können aus wenige Tage alten Blastozysten gewonnen werden und unterscheiden sich von den adulten Stammzellen in ihrer Potenz, der Fähigkeit in andere Zelltypen zu differenzieren. Zellen werden in der Biologie anhand ihrer Potenz klassifiziert und es wird zwischen den Begriffen Totipotenz, Pluripotenz, Multipotenz, Oligopotenz und Unipotenz unterschieden.<sup>[9]</sup> Totipotente

Stammzellen sind in der Lage aus einer einzelnen Zelle einen vollständigen Organismus zu bilden. Ein Beispiel für eine solche Zelle ist die Zygote, eine befruchtete Eizelle.<sup>[10]</sup> Oligopotente Stammzellen hingegen können nur zu einer geringen Anzahl verschiedener Zelltypen differenzieren. Als Beispiel hierfür sind Lymphozyten zu nennen, welche zu B- und T-Zellen differenzieren können, nicht aber in andere Blutzelltypen, wie z.B. Erythrozyten. Dagegen sind unipotente Zellen lediglich in der Lage eine einzige Zelllinie auszubilden.

### 1.1.1 Pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen ähneln den totipotenten Stammzellen sehr und sind in der Lage zu jedem der mehr als 220 Zelltypen eines Menschen zu differenzieren, können aber keinen vollständigen Organismus ausbilden.<sup>[11]</sup> Auf Grund der zusätzlichen Fähigkeit zur Selbstregeneration sind pluripotente Stammzellen Gegenstand aktueller Forschung und könnten zukünftig in der regenerativen Medizin eine Behandlung bisher unheilbarer Erkrankungen oder Verletzungen, wie z.B. Verletzungen des Rückenmarks, Schlaganfälle oder neurodegenerative Störungen, ermöglichen.<sup>[12]</sup> Des Weiteren werden pluripotente Stammzellen zur Untersuchung der Entwicklung von Organismen verwendet, wodurch neue Therapien getestet werden können.

Ein Beispiel für pluripotente Stammzellen sind embryonale Stammzellen (engl. *embryonic stem cells*, ESCs). ESCs werden direkt aus Embryonen gewonnen, welche meist aus künstlich befruchteten Eizellen gezüchtet werden. Dabei werden die Embryonen zunächst bis zum Blastozysten Stadium *in vitro* kultiviert und anschließend aus der Zellmasse die Stammzellen isoliert.<sup>[13]</sup> Um diese Stammzellen für Forschungs- oder therapeutische Zwecke zu verwenden, ist eine ausreichende Menge an Zellen notwendig. Dazu müssen diese in einer geeigneten Umgebung kultiviert werden. Anfangs wurden diese auf Beschichtungen mit bestrahlten Maus-embryonalen Fibroblasten kultiviert. Während die Beschichtung eine geeignete Umgebung zur Selbsterneuerung der Stammzellen bietet, steigt gleichzeitig das Risiko eines Transfers von mausartigen Pathogenen.<sup>[13]</sup> Heutzutage werden hauptsächlich Kultursysteme aus natürlichen Materialien, wie z.B. Matrigel® oder Laminin-beschichteten Oberflächen, verwendet.<sup>[14]</sup> Vollsynthetische Matrices stellen eine Alternative für die pathogenfreie Kultivierung dar. Da bei der Isolation von ESCs der Embryo und somit potenzielles menschliches Leben zerstört wird, steht die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen (engl. *human embryonic stem*

*cells*, hESCs) für Forschungszwecke in einem ethischen Konflikt und es wird häufig auf Maus-embryonale Stammzellen (engl. *mouse embryonic stem cells*, mESCs) zurückgegriffen. Diese eignen sich auf Grund ihrer ähnlichen Eigenschaften zu menschlichen Stammzellen als Modellsystem zur Untersuchung der Entwicklung embryonaler Stammzellen.<sup>[15]</sup>

### **1.1.2 Induziert pluripotente Stammzellen**

Eine Möglichkeit, um pluripotente Stammzellen ohne ethische Konflikte zu verwenden, sind induziert pluripotente Stammzellen (engl. *induced pluripotent stem cells*, iPSCs). Bei diesen handelt es sich um somatische Zellen, bei denen die Zellkerne durch Zugabe von Transkriptionsfaktoren in einen undifferenzierten, embryoähnlichen Status umprogrammiert werden. Erstmals wurden im Jahre 2006 von YAMANAKA und TAKAHASHI iPSCs aus adulten Fibroblasten einer Maus hergestellt.<sup>[16]</sup> Im Folgejahr konnten unabhängig voneinander YU *et al.* und TAKAHASHI *et al.* diese Technik auf humane somatische Zellen übertragen und so humane iPSCs (engl. *human induced pluripotent stem cells*, hiPSCs) generieren.<sup>[17,18]</sup>

Eine potenzielle Mutagenese bei Verwendung integrierender, viraler Vektoren zur Neuprogrammierung der Zellen stellt ein großes Problem für klinische Anwendungen dar. Daher wurden zur Neuprogrammierung der Zellen hin zu iPSCs eine Vielzahl nicht-integrierender Methoden entwickelt. Durch diese Neuerung fanden iPSCs in den letzten 15 Jahren in vielen verschiedenen Bereichen der Medizin Anwendung, wie z.B. der Arzneimittelforschung oder der Zelltherapie. Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet ist die Modellierung von Krankheiten und das Screening potenzieller Arzneimittel, da durch iPSCs Zugang zu verschiedensten Phänotypen von Zellen besteht.<sup>[19]</sup> Weiterhin können Patienten-spezifische iPSCs generiert werden und so detaillierte Untersuchungen einer Krankheit durchgeführt werden. Zusätzlich sind iPSCs vielversprechend für eine Anwendung in der regenerativen Medizin. So wurde im Jahre 2014 eine klinische Studie gestartet, welche iPSCs zur Behandlung von Makuladegeneration untersucht. Bei ersten Patienten wurde dabei eine Verbesserung der Sehkraft festgestellt.<sup>[20]</sup>

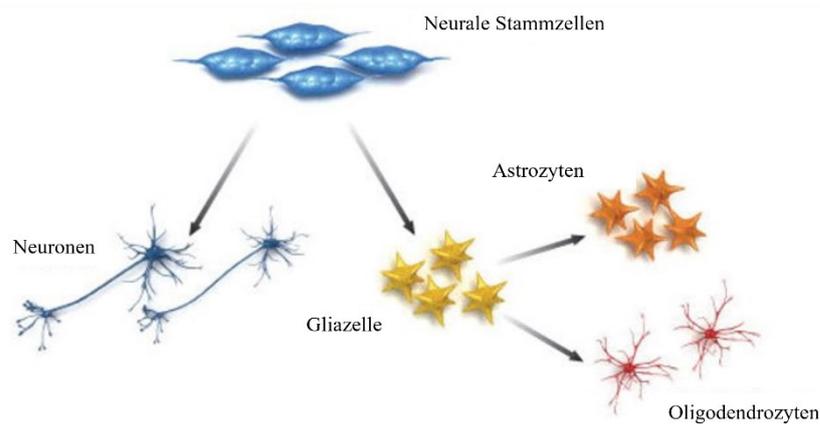
Pluripotente Stammzellen stellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Behandlung von bisher unheilbaren Krankheiten und Verletzungen dar. Durch die Art der Gewinnung von hESCs sind diese für Forschungszwecke allerdings nicht ohne Weiteres zugänglich, weshalb tierische embryonale Stammzellen oder iPSCs

hervorragende Alternativen bieten, auf Grund ihrer Verfügbarkeit, einfachen Gewinnung und Fähigkeit verschiedenste Zelltypen auszubilden.

### 1.1.3 Multipotente Stammzellen

Wegen der ethischen Bedenken bei embryonalen Stammzellen stellen neben den iPSCs auch adulte Stammzellen, welche zu den multipotenten Stammzellen gehören, eine Alternative dar. Adulte Stammzellen treten nach Abschluss der vollständigen Entwicklung eines Embryos und dessen Geburt auf und sind Bestandteil der meisten Gewebearten. Wie auch embryonale Stammzellen besitzen sie ein hohes Potential zur Selbstregeneration und sind hauptverantwortlich für die Reparatur beschädigter Gewebe und den Ersatz toter Zellen.<sup>[21]</sup> Ursprünglich wurden hierbei vor allem Vertreter des Knochenmarksstromas, wie z.B. hämatopoetische Stammzellen (engl. *hematopoietic stem cells*, HSCs) oder mesenchymale Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSCs), genutzt.<sup>[22]</sup> Die am besten charakterisierten Stammzellen sind HSCs, welche zur Behandlung von Leukämie eingesetzt werden.<sup>[23]</sup> Heutzutage werden adulte Stammzellen auch aus anderen Gewebearten, wie z.B. menschlichem Fettgewebe, gewonnen. Diese sind um ein Vielfaches einfacher als andere adulte Stammzellen zu gewinnen (z.B. aus Resten einer Fettabsaugung) und in großen Mengen verfügbar.<sup>[24]</sup>

Weitere multipotente Stammzellen sind die in dieser Arbeit verwendeten neuronalen Stammzellen (engl. *neural stem cells*, NSCs). Diese besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und sind in der Lage, durch Neurogenese und Gliogenese zu Neuronen und Gliazellen zu differenzieren. Letztere können weiterhin zu Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren (siehe Abb. 1). Adulte NSCs liegen hauptsächlich in der subventrikulären Zone des Vorderhirns und im Hippocampus vor.<sup>[25]</sup> Wegen der geringen Verfügbarkeit und den ethischen Bedenken von adulten NSCs, werden in der Forschung hauptsächlich tierische NSCs verwendet. Dabei werden vor allem embryonale neurale Stammzellen der Maus verwendet, da diese in größeren Mengen, im Vergleich zu adulten NSCs, aus den Gehirnen von Mausembryonen gewonnen werden können. Weiterhin weisen diese ein ähnliches Verhalten wie humane adulte neurale Stammzellen auf. Eine Steuerung der Differenzierung von NSCs könnte die Regeneration verschiedenster neurodegenerativer Krankheiten ermöglichen und ist ein wichtiger Gegenstand aktueller Forschung.



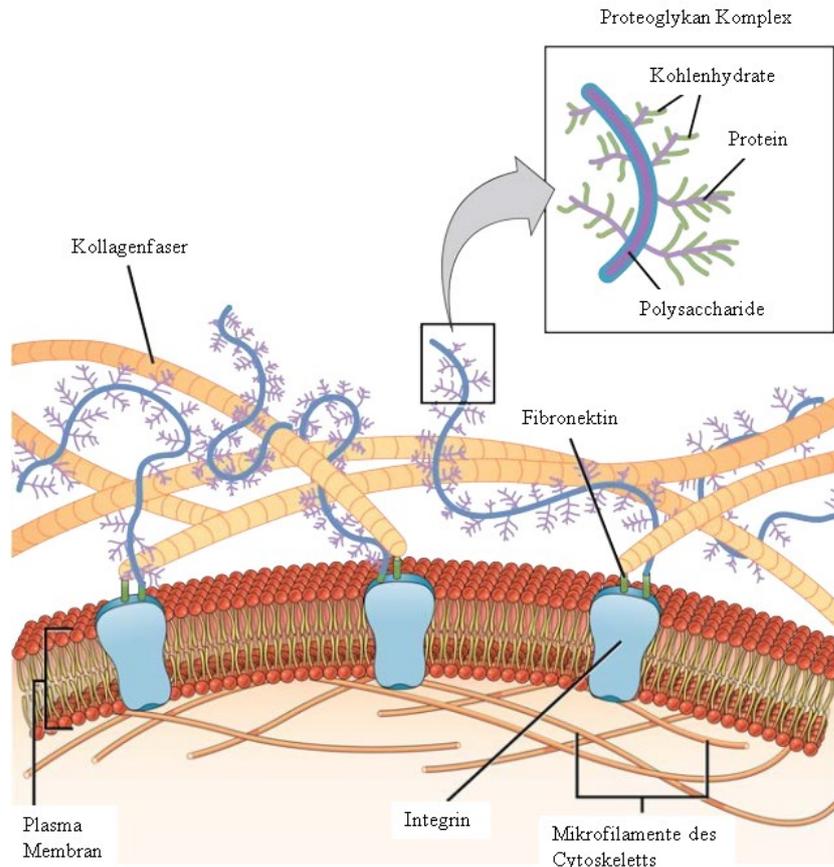
**Abb. 1:** Differenzierung von neuronalen Stammzellen in verschiedene Zelltypen.<sup>[26]</sup>

Es wurde angenommen, dass adulte Stammzellen lediglich im Rahmen ihres Gewebes differenzieren können und dementsprechend auf Zelllinien eines Gewebetyps beschränkt sind. Verschiedene Studien hingegen zeigten, dass auch Stammzellen aus unterschiedlichem Gewebe in der Lage sind zur Regeneration von z.B. Muskeln<sup>[27]</sup> oder Blut<sup>[28]</sup> beizutragen und dadurch universeller eingesetzt werden können. Hierbei spielt vor allem die Umgebung der Zellen, insbesondere die Stammzellnische und die extrazelluläre Matrix, eine entscheidende Rolle.

#### 1.1.4 Extrazelluläre Matrix und Stammzellnische

Verschiedene Zellen sind nicht direkt miteinander verbunden, sondern durch einen Extrazellulärraum (auch Interzellulärraum genannt) getrennt.<sup>[29]</sup> Hauptbestandteile dieses Raums sind Gewebsflüssigkeiten und die sogenannte extrazelluläre Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM). Diese wiederum besteht aus diversen Komponenten, welche sich in Fasern und Grundsubstanz unterteilen lassen.<sup>[30]</sup> Die einzelnen Komponenten werden durch Zellen exprimiert und bilden so ein komplexes und dynamisches Gerüst. Die Zusammensetzung und der Anteil an verschiedenen Proteinen im Gewebe ist dabei abhängig davon, welches Organ oder welche Gewebeart ausgebildet wird.<sup>[31]</sup> Beispielsweise besteht die ECM eines Schweinedarms zu über 90 % aus Kollagen, wovon der Hauptteil Kollagen Typ I ist und nur ein geringer Anteil des Typs III, IV, V und VI vorhanden ist. Die Schweineblase hingegen besteht ebenfalls über 90 % aus Kollagen, wobei hier Kollagen Typ III den Hauptteil bildet.<sup>[31]</sup> Weitere Bestandteile der ECM neben Kollagenen sind Elastin, Polysaccharide (vor allem Glykosaminoglykane und Proteoglykane) und Adhäsionsproteine, wie z.B. Fibronectin (siehe Abb. 2). Je nach Gewebstyp können noch weitere Bestandteile in der ECM auftreten. So sind in

Knochen z.B. zusätzlich noch anorganische Bestandteile, wie z.B. Hydroxylapatit, zu finden.<sup>[32]</sup>



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix, ihrer Bestandteile und dessen Wechselwirkung mit der Zellmembran.<sup>[33]</sup>

Während der faserige Anteil hauptsächlich der Stabilität und Elastizität des gebildeten Gewebes dient, hat die Grundsubstanz eine entscheidende Rolle für das Verhalten der Zellen innerhalb des Gewebes. Durch Wechselwirkung von Transmembranproteinrezeptoren, den sogenannten Integrinen, mit der ECM werden viele Prozesse, wie z.B. Adhäsion, Migration, Proliferation oder Differenzierung von Stammzellen, aber auch der Informationsaustausch zwischen verschiedenen Zellen, gesteuert.<sup>[34]</sup>

Ein spezieller Bereich der ECM ist die sogenannte Stammzellnische, welcher bereits 1978 von SCHOFIELD eine wichtige Rolle zugesprochen wurde<sup>[35]</sup>. Während die ECM verschiedene Zelltypen enthalten kann und jeglichen Raum zwischen Zellen beschreibt, wird die Mikroumgebung von Stammzellen als Stammzellnische bezeichnet. Diese Nische ist essenziell wichtig für die Funktion der Stammzelle und

reglementiert das Wachstum und die Selbstregeneration dieser.<sup>[36]</sup> Der Aufbau der Nische ist abhängig von der Art der Stammzelle (NSCs, HSCs, etc.). Sie enthält sogenannte Stromalzellen (oder Nischenzellen), welche mit den Stammzellen interagieren und für einen gewissen Schutz dieser sorgen.<sup>[37]</sup> Innerhalb der Nische werden extrinsische Faktoren, wie z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren, gebildet, welche das Verhalten der Stammzelle durch Signale an die Rezeptoren steuern.<sup>[38]</sup>

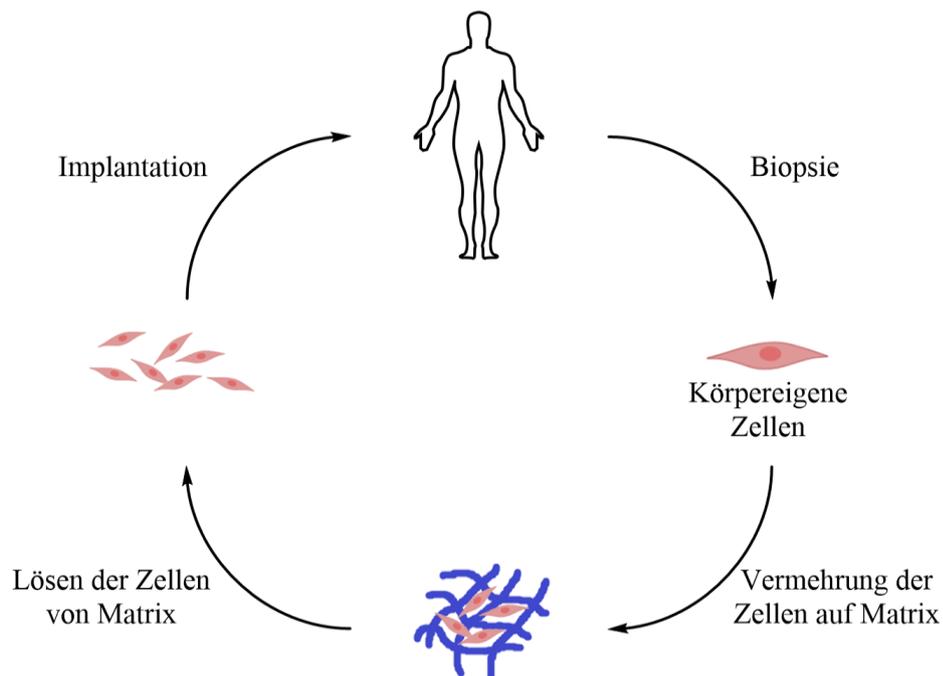
## 1.2 Stammzelltherapien

Die Transplantation von lebenden Zellen zur Regeneration von krankhaftem Gewebe wird als Zelltherapie bezeichnet. Diese Therapien stellen einen modernen Ansatz zur Behandlung einer Vielzahl an Krankheiten, welche mit einem Verlust von Zellen verbunden sind. Zu den wichtigsten potenziellen Anwendungsgebieten gehören die Behandlung von Krebs<sup>[39]</sup>, degenerative Krankheiten<sup>[40]</sup> oder kardiovaskuläre Erkrankungen, z.B. Herzinfarkt.<sup>[41]</sup> Werden bei der Zelltherapie Stammzellen verwendet, so wird diese auch als Stammzelltherapie bezeichnet. Grundsätzlich wird zwischen der allogenen und der autogenen Transplantation (auch autologe Transplantation genannt) unterschieden. Während bei der autogenen Transplantation patienteneigene Zellen verwendet werden, nutzt die allogene Transplantation Spenderzellen einer anderen Person.

Der Begriff der Zelltherapien wurde 1931 erstmals von PAUL NIEHANS geprägt.<sup>[42]</sup> NIEHANS verwendete Zellen von Schafsfüten bei einer missglückten Schilddrüsenoperation, was zum Überleben der Patientin führte. Etwas später wurden diese Zellen als Wundermittel gegen Altersbeschwerden verwendet. Obwohl kein direkter Nutzen der Zelltransplantation nachgewiesen werden konnte und sogar heftige adverse Effekte, sowie Todesfälle, im Zusammenhang mit dieser Zelltherapie auftraten, gewannen Zelltherapien über die Jahre immer mehr an Bedeutung. Bis zum heutigen Tage wird in der Praxis ausschließlich die Transplantation von Blutstammzellen (auch als hämatopoetische Stammzellen bezeichnet) verwendet, während eine Vielzahl weiterer Zelllinien zur Transplantation in klinischen Studien untersucht werden. Die erste erfolgreiche Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen wurde im Jahre 1957 von THOMAS *et al.* beschrieben.<sup>[43]</sup> Nur ein Jahr später konnte mit Hilfe einer allogenen Transplantation die Symptome einer an Leukämie erkrankten Patientin für sechs Monate unterdrückt werden, bevor die Symptome erneut auftraten. Die Forschung von THOMAS *et al.* stellt einen wichtigen

Meilenstein der Zelltherapieforschung dar und resultierte 1990 im Nobelpreis für Medizin. Weitere wichtige Meilensteine im Bereich der Zelltherapien war die unabhängige Isolierung von embryonalen Stammzellen aus Mausembryonen und deren *in vitro* Kultivierung im Jahre 1981 von EVANS und KAUFMAN, sowie MARTIN *et al.*<sup>[44,45]</sup> Ein weiterer wichtiger Meilenstein war die bereits in Kapitel 1.1.2 beschriebene Möglichkeit der Generierung von induziert pluripotente Stammzellen.

Eine wichtige Voraussetzung für Stammzelltherapien ist die Verfügbarkeit der Stammzellen. Während hämatopoetische Stammzellen in größerer Menge im Knochenmark oder der Nabelschnur vorkommen und so isoliert, sowie transplantiert werden können, sind viele andere Stammzellen, wie z.B. neurale Stammzellen, nur in geringen Mengen zugänglich. Solche Stammzellen werden für gewöhnlich *in vitro* kultiviert, um eine ausreichende Verfügbarkeit zu gewährleisten. Der Ablauf des Kultivierungsprozesses ist in Abb. 3 dargestellt.



**Abb. 3:** Kultivierungsprozess von Stammzellen zur Verwendung in Zelltherapien.

Zunächst werden Stammzellen mittels Biopsie aus dem Patienten oder einem Spender entnommen. Diese können unter geeigneten Bedingungen kultiviert und vermehrt werden. Anschließend können diese Zellen von der Matrix gelöst werden, um dann im Rahmen der Zelltherapie zur Behandlung verschiedener Krankheiten reimplantiert zu werden. Während die Verwendung von beschichteten Zellkulturschalen zur Kultivierung von Zellen etabliert ist, bekommen synthetische

polymere Gerüste eine immer größere Bedeutung in der Forschung. Diese sind in der Lage die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix nachzustellen und bilden so eine geeignete Umgebung zur Kultivierung der Stammzellen (siehe Kapitel 1.3.1).

### 1.3 Polymere in der Medizin

In der heutigen Zeit sind Polymere aus dem alltäglichen Leben und in vielen Berufen nicht mehr wegzudenken. Polymere finden nicht nur als Verpackungsmaterialien, sondern auch als Baustoffe in Form von Rein- oder Hybridstoffen Anwendung. Zusätzlich werden Polymere auch als Fasern in Kleidungsstücken und in vielen Bereichen der Medizin verwendet.<sup>[46-49]</sup> Viele Einwegartikel in der Medizin, wie z.B. Spritzen oder Katheter, basieren auf Polymeren, aber auch für Behandlungen von Krankheiten werden diese verwendet. So zeigen viele Wirkstoffe verbesserte Eigenschaften, wenn diese auf polymeren Trägersystemen verabreicht werden. Ein bekanntes Beispiel stellt das Zytostatikum Doxorubicin dar, welches durch die Verwendung von polymeren Trägern eine deutlich längere Verweilzeit im Körper aufweist.<sup>[50]</sup> Auch können Teile des menschlichen Körpers oder gar ganze Organe aus synthetischen Polymeren hergestellt und transplantiert werden. Prominente Beispiele sind Gefäßstützen (engl. *stents*) oder künstliche Arterien.<sup>[51,52]</sup> Abhängig des Einsatzgebietes müssen Polymere verschiedenste Anforderungen erfüllen. So müssen Baustoffe und Fasern in Kleidungsstücken vor allem widerstandsfähig sein, während Polymere in der Medizin hingegen kompatibel mit der biologischen Umgebung sein müssen. Diese Biokompatibilität ist essenziell für den Bereich der Geweberegeneration (engl. *tissue engineering*), welcher sich mit künstlichem Gewebe und dessen Anwendung zur Behandlung verschiedenster Krankheiten beschäftigt. Weiterhin werden im Bereich der Stammzelltherapien sogenannte Hydrogele zur Kultivierung von Stammzellen eingesetzt.

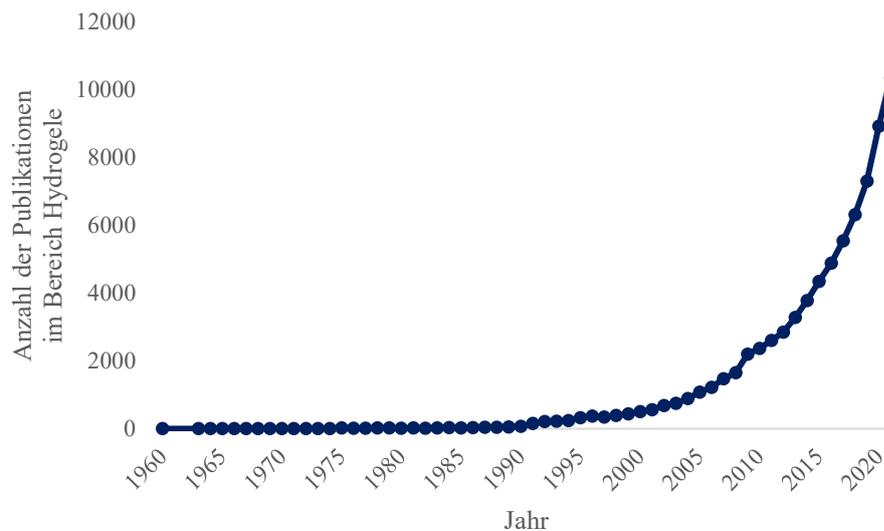
#### 1.3.1 Hydrogele

Als Gele werden solche Materialien bezeichnet, welche aus einem dreidimensionalen Netzwerk bestehen, dessen Poren mit einer flüssigen oder gasförmigen Komponente gefüllt sind.<sup>[53]</sup> Ein Material, welches mit einem Gas gefüllt ist, wird als Xerogel bezeichnet. Ein mit Luft gefülltes Gel ist eine spezielle Art von Xerogel und wird auch als Aerogel bezeichnet.<sup>[54]</sup> Ist der Füllstoff eine Flüssigkeit, so wird das Material als Lyogel bezeichnet.<sup>[55]</sup> Lyogele werden zusätzlich in die Unterkategorien

Hydrogel und Organogel eingeteilt.<sup>[55]</sup> Während der Füllstoff von Hydrogelen Wasser ist, können Organogele verschiedene organische Lösungsmittel beinhalten. Das Wasser der Hydrogele ist innerhalb des Netzwerkes gebunden, wodurch dieses aufquillt, aber nicht gelöst wird. Das Netzwerk ist so in der Lage ein Vielfaches des Eigengewichts an Füllstoff aufzunehmen.

### 1.3.1.1 Historie der Hydrogele

Das Konzept der Hydrogele wurde erstmals von WICHTERLE und LIM im Jahre 1960 beschrieben.<sup>[56]</sup> Sie entwickelten ein vollsynthetisches Hydrogelsystem aus Poly(hydroxyethylmethacrylat-*co*-ethylendimethacrylat) für biologische Anwendungen. Obwohl der Nutzen von Hydrogelen in medizinischen Anwendungen bereits früh erkannt wurde, stieg die Zahl der Veröffentlichungen im Bereich der Hydrogele erst 30 Jahre später auf über 100 pro Jahr an und anschließend exponentiell bis zum heutigen Tag (siehe Abb. 4).



**Abb. 4:** Anzahl der Publikationen im Bereich der Hydrogele ab 1960. Ermittelt über „Web of Science“ mit dem Suchbegriff „Hydrogel“. Stand 28.09.2022.

Bereits vor den 90er Jahren wurden wichtige Meilensteine im Bereich der Hydrogele erreicht. So stellte YANNAS *et al.* im Jahre 1980 mehrere Grundsätze zur erfolgreichen Gestaltung von künstlicher Haut für Transplantationen auf.<sup>[57]</sup> Nur ein Jahr später gelang es selbiger Arbeitsgruppe ein solches Transplantat zur Behandlung von Brandwunden an einem Patienten einzusetzen und so die Heilung der Brandwunden zu fördern.<sup>[58]</sup> Im Jahre 1993 wurde das heute wohl meistbekannte Hydrogel basierend auf Poly(ethylenglykol-*co*- $\alpha$ -hydroxysäurediacrylat) von SAWHNEY und HUBBELL *et al.* veröffentlicht, welches in der Lage war in Gegenwart

von natürlichem Gewebe ein interpenetrierendes Netzwerk mit diesem auszubilden.<sup>[59]</sup> Diese Arbeit war maßgebend für den Bereich der Hydrogele und viele Hydrogelsysteme basieren noch heute auf Poly(ethylenglykol) (PEG) oder bilden Kompositmaterialien mit PEG aus.<sup>[60,61]</sup> Fünf Jahre später im Jahr 1998 wurde von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) die erste künstliche Haut unter dem Namen Apligraf<sup>®</sup> als Transplantationsprodukt zugelassen.<sup>[62]</sup> Dieses war ein Kollagengel mit Fibroblasten, welches zur Behandlung von chronischen Wunden eingesetzt wurde. In den folgenden 20 Jahren wurden immer fortgeschrittenere Hydrogele entwickelt. Dazu gehören intelligente Systeme, die auf Umgebungsreize wie Änderungen in der Temperatur oder dem pH-Wert reagieren, oder auch komplexe Copolymersysteme, welche verschiedene Funktionalitäten und bioaktive Peptide tragen.<sup>[63–65]</sup>

### **1.3.1.2 Klassifizierung von Hydrogelen**

Auf Grund der Vielzahl verschiedener Polymersysteme, die für Hydrogele verwendet werden können, werden Hydrogele in verschiedene Kategorien eingeteilt. So können die Polymersysteme für Hydrogele natürlichen Ursprungs, semisynthetisch oder vollsynthetisch sein.<sup>[66]</sup> Natürliche Polymere bieten den Vorteil, dass sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen, da sie häufig bereits Bestandteil der natürlichen ECM sind und können meist durch z.B. Enzyme abgebaut werden.<sup>[67]</sup> Beispiele für natürliche Polymere im Bereich der Hydrogele sind Kollagen<sup>[68]</sup>, Alginate<sup>[69]</sup>, Hyaluronsäure<sup>[70]</sup> oder Matrigel<sup>®</sup>.<sup>[71]</sup> Ein bedeutender Nachteil dieser Polymere ist, dass sie eine hohe Variation in ihrer chemischen Zusammensetzung aufweisen können und daher die Eigenschaften der Gele teilweise stark voneinander abweichen. Häufig werden diese auch aus tierischen Quellen gewonnen, welches negative Auswirkungen auf die Zellen durch tierische Pathogene haben könnte.<sup>[72]</sup> Die Gewinnung eines natürlichen Polymers hat ebenfalls Auswirkungen auf deren Kosten. Durch ihren natürlichen Ursprung weisen die Gele häufig einen sehr schnellen Abbau auf und sind dadurch sehr stark in ihren mechanischen Eigenschaften eingeschränkt.<sup>[72]</sup> Eine Lösung dieses Problems ist der semi-synthetische Ansatz, bei welchem natürliche Polymere mit funktionellen Gruppen modifiziert werden. Dadurch können kovalente Vernetzungen ausgebildet werden, welche nicht oder nur langsam abbauen. Vollsynthetische Polymere stellen eine Alternative gegenüber den natürlichen Polymeren dar. Die gesamte Struktur dieser

Polymere kann durch die Wahl der Monomereinheiten an die Anwendung angepasst werden. Grundsätzlich können hierfür alle Monomere verwendet werden, allerdings sollte das Polymer eine gewisse Hydrophilie aufweisen, sodass dieses Wasser aufnehmen kann, um als Hydrogel Verwendung zu finden. Dadurch können die Materialeigenschaften von Hydrogelen auf die entsprechende Anwendungsmaßgeschneidert werden.<sup>[73]</sup> Durch die Verwendung von kontrollierten Polymerisationsmethoden können definierte und reproduzierbare Polymerstrukturen mit einer geringen Molmassenverteilung synthetisiert werden. Synthetische Polymere sind oftmals nicht biokompatibel, können aber durch das Einbringen von funktionellen Gruppen modifiziert werden. Dadurch können bioaktive Motive, wie z.B. Peptide oder Wachstumsfaktoren, in das Gel eingebracht werden, um dieses biokompatibel zu machen.<sup>[73]</sup> Zusätzlich kann das Abbauverhalten der Polymere über das Einbringen labiler Gruppen, wie z.B. Ester, genau eingestellt werden. Ein weiterer Vorteil von vollsynthetischen Gelen ist die Verwendung von kostengünstigen Monomeren, welche meist in großen Mengen hergestellt werden und daher sehr kostengünstig in der Beschaffung sind. Beispiele für bekannte vollsynthetische Polymere im Bereich der Hydrogele sind Poly(ethylenglykol) oder Poly(acrylamid).

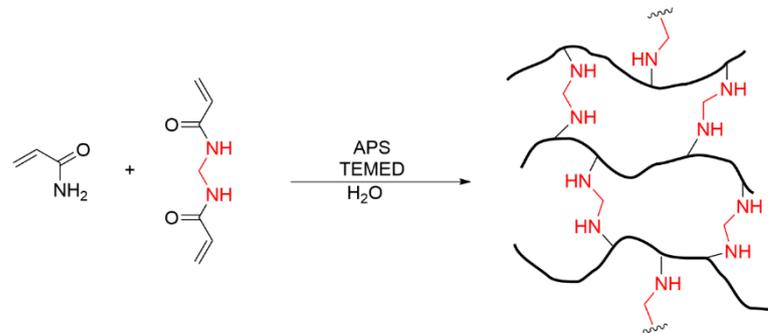
Zusätzlich zu ihrer Herkunft können Hydrogele anhand ihrer Vernetzungsart eingeteilt werden. Dabei wird zwischen physikalischen und chemischen Hydrogelen unterschieden.

### 1.3.1.3 Chemische Hydrogele

Als chemische Hydrogele werden solche bezeichnet, die als Vernetzungsstellen eine kovalente Bindung nutzen. Diese kovalente Bindung kann während der Polymerisation (auch *in situ* Vernetzung genannt) ausgebildet werden, oder aber durch eine nachträgliche Vernetzung unter Verwendung von Präpolymeren.<sup>[74]</sup>

Eine Herstellung von chemischen Hydrogelen über die *in situ* Vernetzung stellt die simpelste Methode dar. Dabei findet die Vernetzung direkt während der Polymerisation der Monomere durch Zugabe eines Vernetzers statt. Vernetzer sind Moleküle, die zwei oder mehr Funktionalitäten, wie z.B. ein bifunktionelles Acrylat, tragen, über welche eine Vernetzung stattfinden kann. Mehrere Vernetzer werden in das Rückgrat jeder Polymerkette eingebaut und bilden so ein Netzwerk zwischen den Polymerketten aus. Die Herstellung von SDS-Page Gelen folgt dieser Methode und

ist in Abb. 5 exemplarisch dargestellt.<sup>[75]</sup> Acrylamid dient hierbei als hydrophiles Monomer, während *N,N*'-Methylenbisacrylamid den Vernetzer darstellt. Dieses Gel wird über freie radikalische Polymerisation unter Verwendung von Ammoniumpersulfat (APS) als Initiator und *N,N,N,N*'-Tetramethyldiamin (TEMED) als Katalysator in Wasser hergestellt.



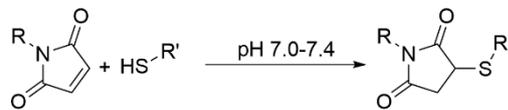
**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Vernetzung von chemischen Hydrogelen anhand des SDS-Page Gels auf Basis von Acrylamid und *N,N*'-Methylenbisacrylamid.

Trotz der einfachen Herstellung der Gele durch diese Methode, besitzt sie einige entscheidende Nachteile. Durch die *in situ* Vernetzung werden direkt unlösliche polymere Netzwerke ausgebildet. Viele der gängigen Analysemethoden für Polymere basieren jedoch auf deren Löslichkeit. So können die *in situ* vernetzten Polymere z.B. nicht mehr mittels Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) oder Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert werden. Dadurch kann die gleichbleibende Zusammensetzung der Gele nicht gewährleistet werden, da diese nicht ausreichend charakterisiert werden können. Auch können die so gebildeten Gele meist nicht mehr ohne Weiteres nachträglich mit bioaktiven Motiven funktionalisiert werden, sodass diese bereits während der Polymerisation als Monomere in das Polymer eingebaut werden müssen. Dies kann unter Umständen zum Verlust oder der Verringerung der biologischen Aktivität führen, wenn Nebenreaktionen mit freien Radikalen stattfinden.<sup>[76]</sup> Durch die Zytotoxizität von Vernetzern und Monomeren mit einer molaren Masse  $< 1000$  g/mol ist diese Methode nicht für Verkapselung von Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung geeignet.<sup>[77,78]</sup> Hierfür muss das Hydrogel in Gegenwart der Zellen hergestellt werden. Eine Methode, die viele dieser Probleme bewältigt, ist die nachträgliche Vernetzung von Polymeren.

Bei der nachträglichen Vernetzung wird ein Polymernetzwerk mit Hilfe von Präpolymeren und Vernetzern aufgebaut. Das Präpolymer trägt bestimmte

funktionelle Gruppen, welche mit den Funktionalitäten des Vernetzers reagieren. Dabei können zwei Polymere mit komplementären Funktionalitäten, wie z.B. ein Polymer mit Alkin-Gruppen und ein weiteres Polymer mit Azid-Gruppen im Rahmen einer Click-Reaktion, für eine Vernetzung verwendet werden. Grundsätzlich kann hierfür jede chemische Reaktion, bei welcher eine kovalente Bindung ausgebildet wird, genutzt werden. Zur Herstellung von Gelen mit dreidimensional verkapselten Zellen hingegen können lediglich bioorthogonale Reaktionen verwendet werden, welche hohe Selektivitäten, hohe Umsätze, keine toxischen Nebenprodukte oder Kupplungsreagenzien und eine Reaktion bei Raumtemperatur aufweisen. Dies ist notwendig, um die lebenden Zellen nicht zu beschädigen. Die am häufigsten verwendeten bioorthogonalen Reaktionen sind Michael-Additionen ( $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen mit Thiolen oder Aminen)<sup>[79]</sup>, Diels-Alder Reaktionen (z.B. Furane mit Maleimiden)<sup>[80]</sup>, Ausbildung von Disulfidbindungen<sup>[81]</sup>, Kondensationsreaktionen (z.B. Amine mit Aldehyden)<sup>[82]</sup>, Click-Reaktionen (z.B. Alkine mit Aziden)<sup>[83]</sup> oder Staudinger-Ligationen (Azide mit Triphenylphosphin Estern)<sup>[84]</sup> (siehe Abb. 6).

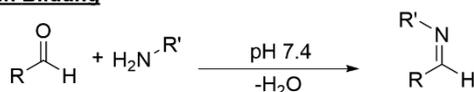
**Michael-Addition**



**Disulfidbrücke**



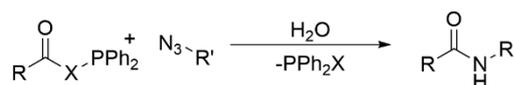
**Imin Bildung**



**Click-Reaktion**



**Staudinger Ligation**



**Abb. 6:** Beispiele für bioorthogonale Reaktionen.

Der größte Vorteil dieser Methode basiert auf der Verwendung von löslichen Präpolymeren, welche mit den gängigen Analysemethoden charakterisiert werden können. Es können zunächst Präpolymere mit gleichbleibenden Eigenschaften hergestellt werden, welche anschließend zu Hydrogelen vernetzt werden. Bei der

Herstellung von löslichen Präpolymeren können neben der freien radikalischen Polymerisation auch kontrollierte Polymerisationstechniken eingesetzt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Präpolymere polymeranalog zu funktionalisieren. So können zunächst Polymere hergestellt werden und diese anschließend mit bioaktiven Motiven, wie z.B. Peptide oder Wachstumsfaktoren, versehen werden. Dadurch wird gewährleistet, dass die Aktivität dieser Motive bestehen bleibt und keine Nebenreaktionen während der Polymerisation auftreten. Allerdings benötigt diese nachträgliche Funktionalisierung meist Mehrstufenreaktionen und erhöht dadurch den synthetischen Aufwand. Ein Beispiel für ein Polymer mit nachträglicher Vernetzung ist z.B. Hyaluronsäure, bei welcher einige Carbonsäuregruppen mit Thiolen funktionalisiert und anschließend mit einem PEG-Diacrylat (PEGDA) vernetzt wurden.<sup>[85]</sup>

#### **1.3.1.4 Physikalische Hydrogele**

Die Vernetzung von physikalischen Hydrogelen basiert auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen oder hydrophobe Interaktionen.<sup>[73]</sup> Diese Wechselwirkungen werden meist über externe Trigger ausgelöst. Dafür können Änderungen an der Temperatur, dem pH-Wert oder der Konzentration genutzt werden, was diese Art der Vernetzung reversibel macht. Eine reversible Vernetzung ermöglicht außerdem eine vollständige Charakterisierung der Polymere, da der Präkursor des Gels unter bestimmten Bedingungen löslich ist. Da bei dieser Methode zunächst lösliche Polymere für das Gel verwendet werden, eignen sich physikalische Hydrogele besonders zur dreidimensionalen Verkapselung von Zellen. Das wohl bekannteste Beispiel eines physikalischen Hydrogels als Standardmatrix zur Kultivierung von Zellen ist Matrigel<sup>®</sup>. Matrigel<sup>®</sup> ist der Handelsname für eine basalmembranartige Matrix, welche aus dem Sekret der Engelbreth-Holm-Swarm Tumorzellen von Mäusen gewonnen wird.<sup>[86]</sup> Die Matrix ähnelt in ihrer Zusammensetzung teilweise der extrazellulären Matrix der Basalmembran von tierischen Zellen und besteht unter anderem aus Laminin, Kollagen-IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykanen.<sup>[87]</sup> Zusätzlich können sich noch einige Wachstumsfaktoren innerhalb dieser Matrix befinden. Die genaue Zusammensetzung von Matrigel<sup>®</sup> ist sehr variabel und unterscheidet sich je nach Charge, weshalb sich dieses nicht für klinische Studien eignet.<sup>[88]</sup> Während es bei niedrigen Temperaturen (4 °C) als Flüssigkeit vorliegt,

bildet es unter Inkubationsbedingungen bei 37 °C ein stabiles Gel.<sup>[89]</sup> Ein weiterer bekannter Vertreter von physikalischen Hydrogelen ist Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm).<sup>[90]</sup> PNIPAAm ist ein thermoresponsives Polymer und liegt bei Überschreiten der sogenannten unteren kritischen Lösungstemperatur (engl. *lower critical solution temperature*, LCST) oder Unterschreiten der oberen kritischen Lösungstemperatur (engl. *upper critical solution temperature*, UCST) als Gel vor.<sup>[91]</sup> Weitere vollsynthetische Polymere, die sich für ein physikalisches Hydrogel eignen, besitzen häufig sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche.<sup>[92]</sup> Solche Polymere werden als amphiphile bezeichnet. Die hydrophoben Bereiche von amphiphilen Polymeren lagern sich in Wasser auf Grund des hydrophoben Effekts zusammen. Dadurch entstehen sowohl Verknäuelung als auch hydrophobe Wechselwirkungen in den Bereichen der Zusammenlagerungen.

### **1.3.2 Kultivierung von neuronalen Stammzellen auf synthetischen Hydrogelen**

Auf Grund ihrer mechanischen Eigenschaften, welche der natürlichen ECM ähneln, kann mit Hilfe von Hydrogelen eine künstliche Matrix zur Kultivierung von Stammzellen geschaffen werden. Heutzutage werden viele unterschiedliche Hydrogelsysteme und deren Auswirkungen auf die Kultivierung verschiedenster Zelllinien untersucht. Neben natürlichen Materialien, wie z.B. Kollagen<sup>[93]</sup>, Hyaluronsäure<sup>[94]</sup> oder Alginaten<sup>[95]</sup>, finden vor allem synthetische Polymere einen großen Anklang bei Forschern. Während die natürliche ECM aus einer Vielzahl diverser Komponenten, wie z.B. Fasern, Kohlenhydraten und Adhäsionsproteinen, besteht, sind künstliche Matrices aus natürlichen oder synthetischen Quellen deutlich simpler aufgebaut.<sup>[96]</sup> Künstliche Matrices bestehen häufig aus nur einem oder wenigen Polymeren, welche die Grundstruktur bilden und zusätzlich mit verschiedenen bioaktiven Substanzen, wie z.B. Peptide oder kationische Gruppen, modifiziert werden. Im Gegensatz zu Hydrogelen aus natürlichen Quellen, bieten vollsynthetische Hydrogele den Vorteil, dass diese sehr leicht modifiziert werden können. Weiterhin sind diese in der Lage durch Variation der Zusammensetzung und ihrer mechanischen Eigenschaften an verschiedene Zelllinien angepasst zu werden. Auf Grund dieser Vorteile wurden bis zum heutigen Tage eine Vielzahl verschiedener synthetischer Hydrogelsysteme zur Kultivierung von Zellen entwickelt. Der Hauptfokus dieser Arbeiten liegt dabei auf dem Einfluss

verschiedener Peptidsequenzen und der mechanischen Eigenschaften der Hydrogele auf die Kultivierung unterschiedlicher Zelllinien.

Die nachfolgende Darstellung der Literatur zeigt einen kurzen Überblick über die wichtigsten vollsynthetischen Hydrogelsysteme zur Kultivierung von neuronalen (Stamm-)Zellen und stellt nicht die Gesamtheit der Hydrogelsysteme dar. Diese Übersicht berücksichtigt keine Hydrogele, welche aus natürlichen Materialien, wie z.B. Kollagen<sup>[93]</sup>, Hyaluronsäure<sup>[94]</sup>, Gellan<sup>[97]</sup>, Alginaten<sup>[95]</sup> oder Chitosan<sup>[98]</sup>, hergestellt werden.

Eines der wichtigsten Polymere im Bereich der Hydrogele zur Kultivierung von Stammzellen ist PEG. Dieses weist eine hohe Hydrophilie und Biokompatibilität auf und wird bereits in vielen medizinischen Anwendungen, z.B. als Wirkstoffträger, verwendet.<sup>[99,100]</sup> MAHONEY und ANSETH entwickelten im Jahre 2006 ein abbaubares PEG Hydrogelsystem durch die Einführung von Polylactiden.<sup>[101]</sup> Innerhalb dieses Hydrogels konnten neurale Vorläuferzellen dreidimensional eingeschlossen werden. Im Verlauf der Experimente nahm durch den hydrolytischen Abbau der Lactid-Einheiten die Steifigkeit des Hydrogels ab und die Maschenweite des Netzwerkes nahm zu. Verglichen mit ihrer Kontrolle wiesen die Hydrogele eine deutlich verbesserte Viabilität der Zellen auch nach 16 Tagen Kultivierung auf. Weiterhin waren die eingeschlossenen Zellen trotz des limitierten Platzes in der Lage zu proliferieren. Durch die Zugabe verschiedener bioaktiver Motive, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Poly-L-lysin oder RGD-Peptidsequenzen, können verschiedene Eigenschaften von neuronalen Zellen während der Kultivierung auf PEG-Hydrogelen weiter beeinflusst werden. FREUDENBERG *et al.* nutzten PEG-Sternpolymere, welche mit Sulfo-NHS aktiviertem Heparin modifiziert wurden, um sowohl RGD-Peptide über kovalente Bindungen als auch den Wachstumsfaktor FGF2 über nicht-kovalente Interaktionen mit dem Heparin zu binden.<sup>[102]</sup> So konnte die Arbeitsgruppe ein hochfunktionales und modifizierbares Hydrogelsystem zur Kultivierung von neuronalen Stammzellen der Maus herstellen. Im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Biomodifikationen zeigten die funktionalisierten Hydrogele eine deutlich gesteigerte Überlebensfähigkeit der Zellen. Solche Hydrogele, welche lediglich die RGD-Peptidsequenz enthielten, zeigten nur eine leichte Verbesserung, während Hydrogele mit der Kombination von RGD und dem Wachstumsfaktor FGF2 eine enorme Verbesserung der Überlebensfähigkeit der Zellen aufwies. Weiterhin führte die

Verwendung von RGD zu einer erhöhten Differenzierung in Neuronen im Vergleich zur Kontrolle ohne Biofunktionalitäten. Die Verwendung des Wachstumsfaktors FGF2 hingegen führte zu einer verstärkten Proliferation der NSC während der Kultivierung. Die NSC behielten dabei bevorzugt ihren undifferenzierten Status. SAHA *et al.* entwickelten 2006 ein interpenetrierendes Polymernetzwerk aus Polyacrylamiden und PEG, welches mit RGD modifiziert wurde. Bei der Kultivierung von NSCs der Ratte fanden diese eine minimal notwendige laterale RGD-Konzentration von  $5.3 \text{ pmol/cm}^2$ , welche notwendig war, um die Adhäsion und Differenzierung der Zellen auf den Hydrogelen zu verbessern. Eine weitere Studie von SAHA *et al.* aus dem Jahre 2008 zeigte die Bedeutung der mechanischen Eigenschaften dieser interpenetrierenden Netzwerke auf die Kultivierung von NSCs der Ratte.<sup>[103]</sup> Diese hatten einen enormen Einfluss auf die Differenzierung der Stammzellen in Abhängigkeit der Steifigkeit. Während NSCs auf Hydrogelen mit einer relativ hohen Steifigkeit von 1 bis 10 kPa hauptsächlich in Astrozyten und Oligodendrozyten differenzierten, zeigten Hydrogele mit einer geringen Steifigkeit von 0.5 kPa einen höheren Anteil an Neuronen.

Neben dem vielfach verwendeten PEG fanden ebenfalls Polymere auf Basis von Acrylaten und Acrylamiden Anwendung zur Herstellung von Hydrogelen. Im Vergleich zu PEG konnte hierbei auf eine große Zahl unterschiedlicher Monomere zurückgegriffen werden, wodurch die Polymerstruktur an eine Zelllinie angepasst werden konnte. Eines der bekanntesten Hydrogele auf einer Acrylamid Basis ist Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid), welches von WOERLY 1997 unter dem Namen Neurogel<sup>TM</sup> patentiert wurde und die RGD-Peptidsequenz enthält.<sup>[104,105]</sup> Auch ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren zeigte diese Matrix vielversprechende Ergebnisse bei der Reparatur von Rückenmarksverletzungen. KUBINOVÁ *et al.* entwickelten ein Copolymersystem basierend auf Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und 2-Aminoethylmethacrylat (AEMA).<sup>[106]</sup> Diese waren durch Aktivierung der primären Amine von AEMA mit  $\gamma$ -Butyrolacton in der Lage durch Ausbildung einer Disulfidbrücke Peptidsequenzen in das Polymer einzubauen. Hierbei wurde auf die Peptidsequenz IKVAV aus Laminin zurückgegriffen, wodurch die Zahl adhärierter Zellen verbessert werden konnte. Zusätzlich konnte die Proliferation, Differenzierung und die Ausbreitung von menschlichen NSCs verbessert werden.

Neben den vielfältigen Modifikationen mit Peptidsequenzen, wurden häufig auch Amine zur Verbesserung der Adhäsion von Stammzellen verwendet. Diese liegen bei einem physiologischen pH-Wert als protonierte Ammoniumionen vor und tragen eine kationische Ladung, welche mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipid-Doppelschichten der Zellmembran wechselwirken kann.<sup>[107]</sup> Dieser Ansatz geht auf die von YAVIN und YAVIN im Jahre 1974 publizierten Arbeiten zur Verwendung von Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Zellkulturschalen für die Kultivierung von NSCs der Ratte zurück.<sup>[108]</sup> Die Oberflächenbeschichtung mit PLL führte zu einer sehr schnellen Adhäsion von 75 % der NSCs nach nur 15 Minuten ohne die Differenzierung dieser in großem Maße zu beeinflussen. Ein Vergleich mit anderen Aminosäuren, welche Carboxylate oder Thiole enthielten, zeigte, dass die Wirkung von PLL auf die primären Amine zurückzuführen waren. Beschichtungen mit PLL spielen bis zum heutigen Tage eine enorm wichtige Rolle bei der Kultivierung von NSCs. Heutzutage wird PLL nicht nur als Beschichtung von Oberflächen, sondern auch als Bestandteil von Hydrogelmatices eingesetzt. HYNES *et al.* entwickelten beispielsweise 2007 aus PLL-PEG Macromeren ein Hydrogel zur Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen in 3D, welches die Überlebensfähigkeit der Zellen bis zu 17 Tage steigerte und die Differenzierung hin zu adulten neuronalen Zelltypen steuerte.<sup>[109]</sup> In 2009 zeigten Hynes *et al.*, dass eine PLL-Konzentration von 0.1 - 3.0  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ohne weitere Modifikation ausreichend war, um die Überlebensfähigkeit der Zellen zu verbessern.<sup>[110]</sup> Die besten Ergebnisse erzielten dabei Hydrogele mit einer Steifigkeit von 3800 - 5300 Pa und einer Konzentration kationischer Gruppen von 0.32 - 0.6  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ . CAI *et al.* konnten in ihrer im Jahre 2012 veröffentlichten Arbeit eine Abhängigkeit der Überlebensfähigkeit und Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen von der Menge an PLL innerhalb des PLL-PEG-Hydrogels nachweisen.<sup>[111]</sup> Hierbei nahm die Überlebensfähigkeit der Zellen nach 7 div von 87 % ohne PLL auf 92 - 95 % bei 2 - 5 Gew.-% zu. Im Vergleich zum neutralen Gel (31 %) war der Anteil differenzierter Zellen in den PLL-Hydrogelen mit 85 - 100 % deutlich höher. Hierbei wurden Astrozyten und Neuronen in gleichem Maße ausgebildet, während Oligodendrozyten kaum nachzuweisen waren. Im selben Jahr zeigten CAI *et al.* zusätzlich einen Vergleich zwischen PLL und dem kationischen Monomer (2-(Methacryloyloxy)ethyl)trimethylammoniumchlorid (MTAC), welches durch das quartäre Ammoniumion eine dauerhafte, kationische Ladung trug.<sup>[112]</sup> Mit Hilfe

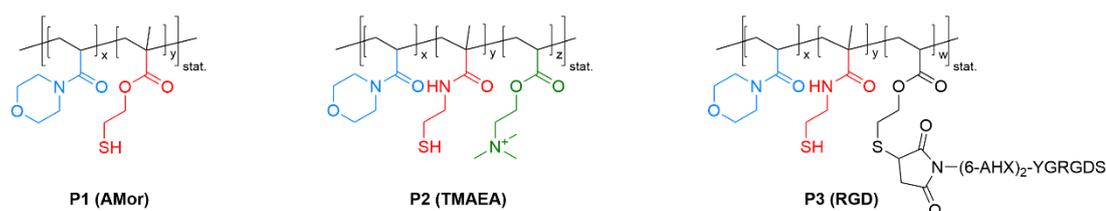
dieses Monomers konnte ein positiv geladenes PEG-MTAC Hydrogel hergestellt werden, welches erneut für die Kultivierung von neuronalen Vorläuferzellen eingesetzt wurde. Auch dieses kationische Gel führte zu einer Verbesserung der Überlebensfähigkeit und Differenzierung der Vorläuferzellen im Vergleich zur neutralen Kontrolle. Dennoch zeigte in dieser Arbeit PLL eine etwas bessere Wirkung im Vergleich zu MTAC.

Während Peptidsequenzen, kationische Gruppen und mechanische Eigenschaften einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten von Stammzellen während der Kultivierung aufwiesen, wurden diese nur selten auch in Kombination untersucht. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppen WEBERSKIRCH und FAISSNER wurde die Kombination von primären Aminen (hier 2-Aminoethylmethacrylat, AEMA) mit der RGD-Peptidsequenz in einem Polyacrylamid-Hydrogel untersucht. Diese Untersuchungen zeigten 2017 einen synergistischen Effekt zwischen der kationischen Ladung von AEMA und der RGD-Sequenz, wenn diese in einem Hydrogel kombiniert wurden.<sup>[113]</sup> Während das kationische Hydrogel allein einen ca. 11-fachen Anstieg an adhärierten Zellen gegenüber dem reinen RGD-Hydrogel aufwies, zeigte die Kombination mit RGD einen 22-fachen Anstieg an adhärierten Zellen. Dieser Effekt trat auf, obwohl eine deutlich geringere Konzentration als die von SAHA *et al.* prognostizierten  $5.3 \text{ pmol/cm}^2$  verwendet wurden. Diese Doktorarbeit schließt an die vorangegangenen Studien über den Einfluss von kationischen Gruppen und die Kombination von kationischen Ladungen und Peptiden auf die Kultivierung von neuronalen Stammzellen an.

## 2 Zielsetzung

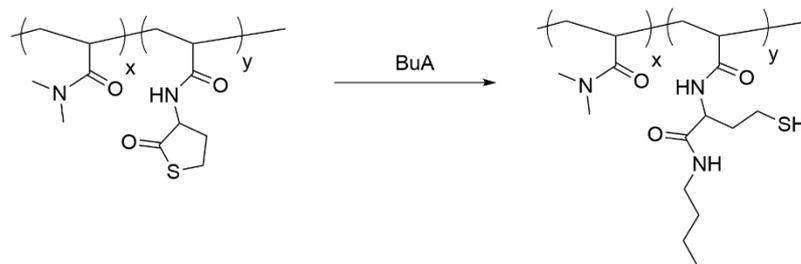
Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von modifizierten, vollsynthetischen Hydrogelen und die Untersuchung der Auswirkungen auf neurale Stammzellen während der Kultivierung. Der Fokus sollte dabei auf die Herstellung und Charakterisierung der definierten Hydrogele mit Hilfe von vollständig charakterisierten Präpolymeren gelegt werden. Als Grundlage dienten dabei Polymersysteme, welche bereits zuvor von BOLDUAN und PÄTZOLD innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt wurden.<sup>[114,115]</sup> In dieser Arbeit sollten drei verschiedene Hauptteile behandelt werden.

Zunächst sollte das Hydrogelsystem aus *N,N'*-Bis(methacryloylcystamid) (BMAC) und 4-Acryloylmorpholin (AMor) von BOLDUAN und PÄTZOLD (siehe Abb. 7) hergestellt und in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Zellmorphologie und Molekulare Neurobiologie der Ruhr-Universität-Bochum zur Kultivierung von neuronalen Stammzellen (NSCs) eingesetzt werden. Die Hydrogele sollten aus thiolhaltigen Präpolymeren und Vernetzern mit Michael-Akzeptoren über eine Michael-Addition hergestellt werden. Dabei stand die Verwendung von definierten Präpolymeren zur Herstellung der Hydrogele im Vordergrund, sodass verschiedene Einflüsse auf die Kultivierung in Abhängigkeit von definierten Konzentrationen untersucht werden konnten. Anfänglich sollten geeignete Bedingungen zur Kultivierung der Stammzellen auf den Hydrogeloberflächen (2D) gefunden werden. Anschließend sollte der Einfluss verschiedener Parameter, wie z.B. mechanische Eigenschaften, kationische Ladungen, Peptide oder Proteine, auf das Verhalten der Zellen während der Kultivierung untersucht werden. Um die natürliche Umgebung von Zellen besser nachzustellen, sollte zusätzlich zu den 2D-Experimenten das Verhalten der Zellen während der Kultivierung in 3D-Zellexperimenten untersucht werden.



**Abb. 7:** Präpolymerstrukturen des BMAC-Hydrogelsystems.

Im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit sollte ein neues Polymersystem zur Herstellung von Hydrogelen basierend auf Thiolactonen entwickelt werden (siehe Abb. 8). Im Fokus sollte dabei die Modifizierbarkeit des Systems mit Peptiden stehen, sodass eine höhere Konzentration als bei dem BMAC-Hydrogelsystem ermöglicht werden konnte. Dabei sollte die Copolymerisation eines Thiolacton-Monomers in verschiedenen Stoffmengenanteilen mit hydrophilen Monomeren untersucht werden. Zusätzlich sollte die Ringöffnung des Thiolactons zur Freisetzung der Thiole mit verschiedenen primären Aminen und die partielle Funktionalisierung der Thiole untersucht werden. Zuletzt sollte die Herstellung von Hydrogelen mit dem neuen Polymersystem, die Eigenschaften der Hydrogele und deren Eignung zur Kultivierung von NSCs untersucht werden.



**Abb. 8:** Mögliche Thiolacton-Polymerstrukturen und Ringöffnung zur Freisetzung der Thiole. Ringöffnung hier gezeigt mit *n*-Butylamin (BuA).

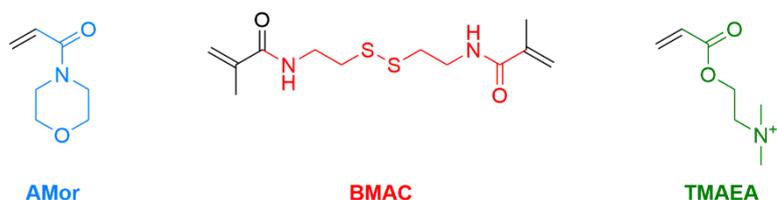
Der dritte Ergebnisteil beschäftigt sich mit der Konjugation von Proteinen an lösliche chemisch-reaktive Präpolymere. Wie zuvor bereits beschrieben, sollte der konzentrationsabhängige Einfluss verschiedener Motive im Fokus dieser Arbeit stehen. Dazu sollten Proteine über definierte Methoden, wie z.B. das selektive 2PCA-Motiv oder einen NTA-Liganden, an Polymere gebunden werden. Diese Konjugation sollte mit nicht selektiven Konjugationsmethoden, wie z.B. Aktivester, verglichen und der Einfluss auf die Kultivierung von NSCs untersucht werden.

### 3 In situ vernetzte Hydrogele mit spaltbarer Vernetzungsstelle

#### 3.1 Herstellung der Präpolymere über in situ vernetzte Gele

Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Polymersystem zur Herstellung der Hydrogele basiert auf den Arbeiten von BOLDUAN und PÄTZOLD.<sup>[114,115]</sup> Während BOLDUAN in seiner Dissertation das Polymersystem basierend auf Acrylaten und die anschließende Herstellung der Hydrogele entwickelte, befasste sich PÄTZOLD in erster Linie mit der Abbaubarkeit des Hydrogelsystems. Sowohl das Polymersystem von BOLDUAN als auch die abbaubaren Hydrogele von PÄTZOLD stellen die Grundlage der Hydrogele in dieser Arbeit und deren Anwendung in 2D und 3D Zellexperimenten dar.

Alle zur Herstellung der finalen Hydrogele benötigten Präpolymere bestehen aus dem hydrophilen Monomer 4-Acryloylmorpholin (**AMor**) und dem disulfidhaltigen bifunktionellen Monomer *N,N'*-Bis(methacryloylcystamid) (**BMAC**), welches durch Reduktion in ein Thiol überführt und in einer Michael-Addition eingesetzt werden kann. Zusätzlich wurde zum Teil das Monomer Trimethylaminoethylacrylat (**TMAEA**) verwendet, welches durch ein quartäres Ammoniumion eine dauerhafte kationische Ladung trägt (siehe Abb. 9).



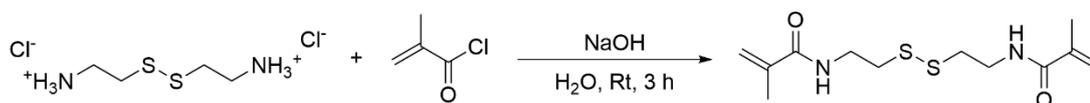
**Abb. 9:** Zur Präpolymerherstellung verwendete Monomere **AMor**, **BMAC** und **TMAEA**. Die für das Polymer relevanten Seitenketten sind entsprechend farblich markiert.

##### 3.1.1 Synthese der Monomere & Vernetzer

Das Monomer **AMor** besitzt nicht nur einen hydrophilen Charakter, sondern ist auch in vielen organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Dichlormethan oder Tetrahydrofuran, löslich.<sup>[116,117]</sup> Dies erweitert die Bandbreite an möglichen Reaktionen, um polymeranalogue Funktionalisierungen, wie z.B. mit bioaktiven Motiven, durchzuführen. Weiterhin konnten JO *et al.* zeigen, dass Polymere basierend auf **AMor** ähnliche Eigenschaften wie PEG in ihrem Aggregationsverhalten und der Hydrolysestabilität aufwiesen, weshalb solche Polymere eine gute Alternative zu den bereits etablierten PEG-Polymeren darstellen.<sup>[117]</sup> PEG ist eines der wenigen Polymere, welche eine Zulassung der FDA erhalten haben und bereits in vielen

Bereichen der Medizin Anwendung finden.<sup>[118]</sup> Bei **AMor** handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Monomer, welches ohne weitere Reinigung für die Synthese der Präpolymere verwendet wurde.

Die Verwendung von **BMAC** als bifunktionelles Monomer erfüllt drei Zwecke. Einerseits besitzt dieses eine reversibel spaltbare Disulfidbrücke, welche durch Reduktion einen Zugang zu Thiolen bietet. Andererseits ermöglicht ein bifunktionelles Monomer mit einer spaltbaren Gruppe die Herstellung eines *in situ* vernetzten Gels, welches nach Spaltung in lösliche Polymerketten überführt werden kann. Die Herstellung eines solchen Gels bringt den Vorteil, dass dieses Gel über simple Dialyse gegen Wasser gereinigt werden kann, wodurch die für die späteren Zelleexperimente toxischen Lösungsmittel und Reste an Monomeren entfernt werden können. Außerdem bietet die Methacrylat-Variante (**BMAC**) des bifunktionellen Monomers gegenüber der Acrylat Variante *N,N'*-Bis(acryloylcystamid) (BAC) den Vorteil, dass die zusätzliche Methylgruppe nach der Polymerisation im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum ein eigenständiges, isoliertes Signal besitzt. Dieses Signal kann nach der Spaltung verwendet werden, um die Menge an **BMAC** mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Ein großer Nachteil von **BMAC** ist die Anfälligkeit des Thiols gegenüber Oxidationen durch Luftsauerstoff im Hinblick auf die Reaktionsführung.<sup>[119]</sup> Weiterhin werden Thiole in der FRP als Kettenübertragungs-Reagenzien eingesetzt, wodurch eine direkte Verwendung eines thiolhaltigen Monomers nicht möglich war.<sup>[120]</sup> **BMAC** ist kommerziell erhältlich, wurde aber aus Kostengründen ausgehend von Cystamin Dihydrochlorid mit Methacryloylchlorid in einer Schotten-Baumann-Reaktion synthetisiert (siehe Abb. 10).



**Abb. 10:** Synthese von **BMAC** mittels einer Schotten-Baumann-Reaktion ausgehend von Cystamin Dihydrochlorid und Methacryloylchlorid.

Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 66 % mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und HR-MS nachgewiesen werden (siehe Abb. 11). Zusätzlich zu den zwei Signalen der CH<sub>2</sub>-Einheiten des Cystamin Dihydrochlorids bei 2.89 (5) und 3.65 ppm (4) waren die vier Protonen der beiden Doppelbindungen des Produkts zu erkennen. Diese spalten als diastereotope Protonen durch ihre unterschiedliche chemische Umgebung jeweils als ein Dublett auf und liegen bei 5.36 (3) und 5.75 (2) ppm.

Diese sind charakteristisch für Methacrylat-Monomere.<sup>[121]</sup> Für das Wasserstoffaddukt des Moleküls wurde ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 289.0966 berechnet. Gefunden wurde eine Masse von 289.1042. Zusätzlich konnte das Natriumaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 311.0854 (ber. 311.0858) nachgewiesen werden (siehe Abb. A 4).

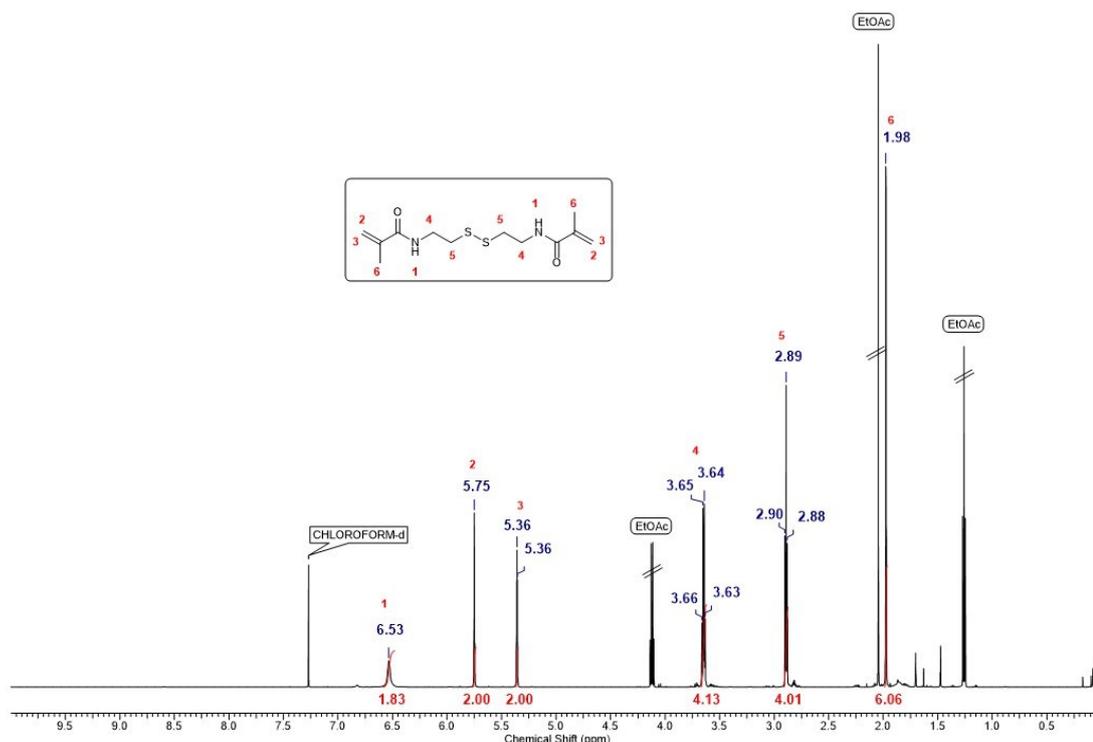
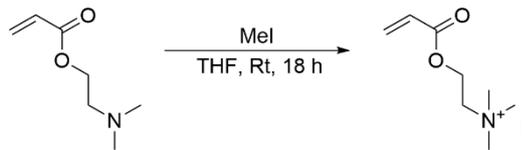


Abb. 11:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von **BMAC** in  $\text{CDCl}_3$ .

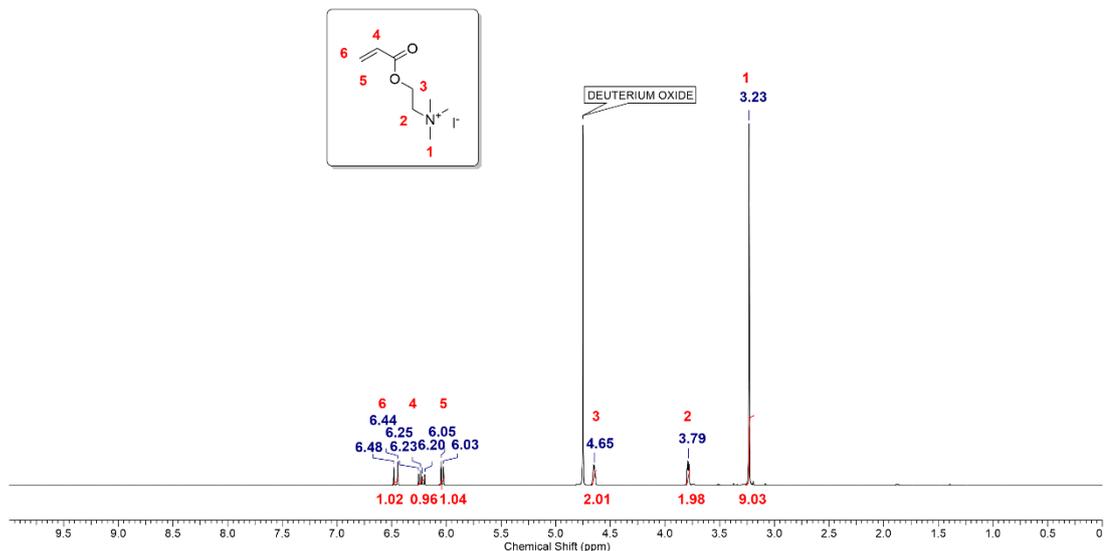
Das Monomer **TMAEA**, welches teilweise zusätzlich in das Präpolymer eingebaut wurde, trägt eine dauerhaft kationische Ladung. Dadurch ist dieses in der Lage mit der Zellmembran, welche aus Phospholipid-Doppelschichten mit unter anderem einer negativ geladenen Kopfgruppe besteht, zu interagieren.<sup>[122]</sup> Bei Verwendung einer dauerhaft kationischen Ladung kann im Gegensatz zu primären Aminen eine konstante Konzentration gewährleistet werden, wohingegen diese bei primären Aminen abhängig vom pH-Wert ist. Durch nicht-spezifische, elektrostatische Wechselwirkungen soll zunächst der erste Kontakt zwischen Zellen und der Oberfläche des Hydrogels hergestellt und die Adhäsion der Zellen auf dem Hydrogel gefördert werden.<sup>[113]</sup> Dadurch kann in einem zweiten Schritt die eigentliche Adhäsion der Zellen durch spezifische Interaktionen verschiedener Rezeptoren, wie z.B. Integrine mit der bekannten RGD-Sequenz, stattfinden. Die Adhäsion spielt dabei eine wichtige Rolle für das Überleben der Zellen.<sup>[123]</sup> Solche Konzepte finden bereits vielfältig in der Biologie Anwendung. So werden bei der Zellkultivierung

häufig Beschichtungen mit Poly-L-Lysin<sup>[124]</sup> oder Poly-L-Ornithin<sup>[125]</sup> verwendet, um die Adhäsion und das Überleben von Zellen zu verbessern. Die Überlebensfähigkeit von vielen Zellen hängt direkt mit der Adhäsion der Zellen an Oberflächen, wie z.B. der ECM, zusammen.<sup>[126]</sup> **TMAEA** wurde ausgehend von *N,N*-Dimethylaminoethylacrylat (DMAEA) über eine Methylierungsreaktion mit Methyljodid hergestellt (Abb. 12).



**Abb. 12:** Synthese von **TMAEA** ausgehend von *N,N*-Dimethylaminoethylacrylat durch eine Methylierung mit Methyljodid.

Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 95 % mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und HR-MS nachgewiesen werden. Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum zeigte bei 3.23 ppm (**1**) die durch Methylierung zusätzlich eingeführte Methylgruppe (siehe Abb. 13). Mittels HR-MS konnte das Molekölion weniger des Iodid-Gegenions mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 158.1173 (ber. 158.1176) nachgewiesen werden (siehe Abb. A 8).



**Abb. 13:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von **TMAEA** in D<sub>2</sub>O.

Zur Herstellung der Hydrogele wurde Polyethylenglykoldiacrylat ( $M_w = 3500$  g/mol, PEGDA-3500) als Vernetzer verwendet. Bei den synthetischen Hydrogelen gehört PEG, bzw. PEGDA, auf Grund seiner guten Eigenschaften zu den am häufigsten verwendeten Polymeren. Zu diesen Eigenschaften zählen unter anderem die hohe Biokompatibilität, eine hohe Löslichkeit in Wasser und der Tarnkappeneffekt (engl.

*stealth effect*), welcher für eine geringe nicht-spezifische Proteinadsorption sorgt.<sup>[127]</sup> Dieser Tarnkappeneffekt wird durch die hohe Hydrophilie von PEG ermöglicht, wodurch sich eine Wasserschicht um PEG Moleküle bildet, welche die Proteinadsorption verhindert. Es werden sowohl reine PEG-Hydrogele als auch Kombinationen mit anderen natürlichen und synthetischen Materialien verwendet.<sup>[128–130]</sup> Für den Vernetzer wurde eine molare Masse größer 1000 g/mol gewählt, da Moleküle mit einer kleineren molaren Masse von Zellen aufgenommen werden können und dadurch eine toxische Wirkung aufzeigen.<sup>[131,132]</sup> Der Vernetzer wurde ausgehend von PEG-3400 mit Acryloylchlorid in einer Schotten-Baumann-Reaktion hergestellt (siehe Abb. 14). PEG-3400 hat eine molare Masse von 3400 g/mol im Mittel. Dies entspricht 77 Wiederholungseinheiten.



**Abb. 14:** Herstellung des Vernetzers PEGDA-3500 über eine Schotten-Baumann-Reaktion.

Die Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 78 % durchgeführt werden und der Erfolg der Reaktion mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestätigt werden (siehe Abb. 15). Bei einer chemischen Verschiebung von 5.5 bis 6.5 ppm (**1,2,3**) waren die durch die Reaktion eingeführten Acrylat Protonen zu erkennen. Ein Vergleich des Integrals der Protonen der PEG-Wiederholungseinheiten (**4,5**, insgesamt 313) mit dem theoretischen Integral von 308 (77 Einheiten mit je 4 Protonen) zeigte eine Funktionalisierungsrate von 98 %. Die Funktionalisierung lag über mehrere Ansätze hinweg im Mittel bei über 90 % und stimmt mit Literaturangaben überein.<sup>[133]</sup>

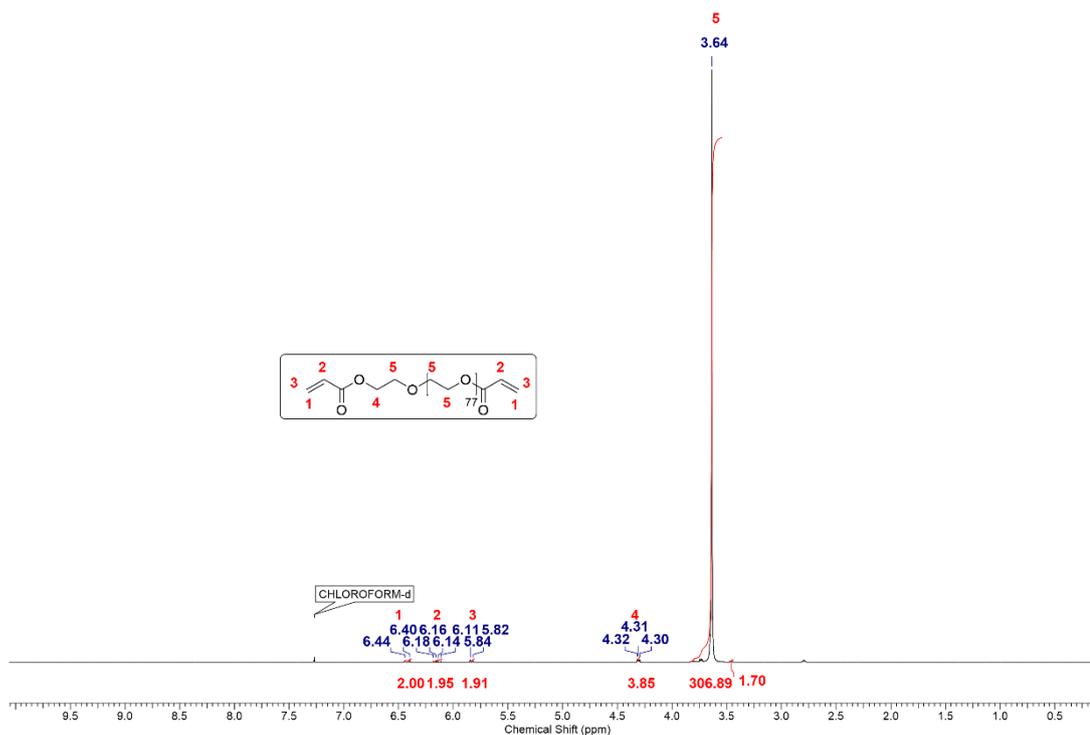


Abb. 15: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl<sub>3</sub>.

### 3.1.2 Synthese der Präpolymere

Die Synthese der Polymere ist schematisch in Abb. 16 dargestellt. Zunächst wurden die Monomere in einem verschließbaren Gefäß im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und für 20 Minuten mit einem Argonstrom entgast, um Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen. Anschließend fand die Polymerisation ohne Rühren für 3 h bei 42 °C statt, wodurch sich *in situ* zunächst ein Organogel gebildet hat. Dieses Gel wurde nach der Polymerisation in kleine Stücke geschnitten, wodurch die Oberfläche des Gels erhöht, und eine bessere Diffusion ermöglicht wurde. Durch Dialyse der Gelstücke gegen Wasser wurden über 2 Tage sowohl organische Lösungsmittel als auch Reste der Monomere, welche nicht in das Netzwerk eingebaut wurden, aus dem Gel entfernt. Durch Austausch des organischen Lösungsmittels gegen Wasser bildete sich ebenfalls aus dem vorherigen Organogel das primäre Hydrogel, welches mit Hilfe einer reduktiven Spaltung der Disulfidbrücken, durch z.B. Dithiothreitol (DTT, auch Clelands Reagenz genannt), in das lösliche Präpolymer überführt wurde. Dieses Präpolymer konnte anschließend mittels gängiger Analysemethoden, wie z.B. NMR oder GPC, analysiert werden.

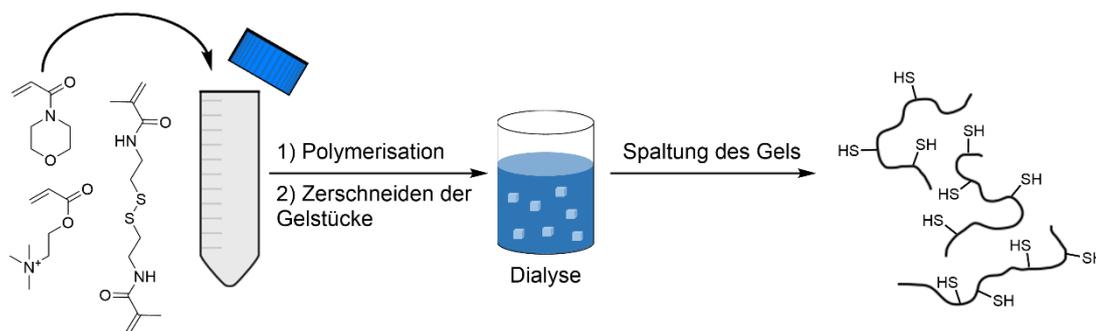


Abb. 16: Schematische Darstellung der Präpolymersynthese.

Insgesamt wurden drei verschiedene Präpolymere hergestellt. Diese sind in Abb. 17 dargestellt. Da die spätere Vernetzung der Präpolymere abhängig von der Menge an Thiolen und somit der Menge an **BMAC** im Präpolymer ist, wurde diese bei allen Polymeren mit einer Menge von 4 mol% konstant gehalten. Für das **PAMor-co-BMAC**-Polymer entspricht dies einer Thiol-Konzentration von 0.53 mmol/g Polymer. Bei Präpolymer **P1** handelte es sich um das Grundsystem, welches keine Funktionen mit einem Einfluss auf die spätere Zellkultivierung trug. Das Präpolymer **P2** hingegen enthielt zusätzlich das kationische Monomer **TMAEA**, welches die Adhäsion und Überlebensfähigkeit der Zellen auf dem finalen Hydrogel verbessern sollte. Präpolymer **P3** trug zusätzlich eine Funktionalisierung mit dem bekannten Tripeptid RGD aus Fibronectin.<sup>[134]</sup> Dieses Polymer wurde ausgehend von **P1** mit einem erhöhten **BMAC**-Anteil von 8 mol% synthetisiert. Es wurde ein Teil der vorhandenen Thiole mit dem Maleimid funktionalisierten Peptid MIC-6AHX-YGRGDS in einer polymeranalogen Michael-Addition zu dem Peptid-Polymer **P3** umgesetzt. Das finale Präpolymer **P3** sollte nach Funktionalisierung ebenfalls 4 mol% (0.53 mmol/g Thiol-Konzentration) an **BMAC** besitzen. Das verwendete Peptid wurde zuvor nach der von MERRIFIELD entwickelten Festphasensynthese hergestellt.<sup>[135]</sup> Neben der bekannten RGD-Sequenz wurden zusätzlich die flankierenden Aminosäuren Glycin (G) und Serin (S) verwendet. Diese Aminosäuren spielen eine essenzielle Rolle für die biologische Aktivität der Sequenz, da sie die Bindungsaffinität des Peptids erhöhen.<sup>[136]</sup> Zur Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurde Tyrosin (Y) wegen des spezifischen Signals im aromatischen Bereich verwendet. Zusätzlich wurde 6-Aminohexansäure (6-AHX) als Abstandhalter (engl. *spacer*) verwendet, um die Flexibilität der Seitenkette zu ermöglichen. Das Maleimid (als Maleimidocapronsäure (MIC)) wurde ebenfalls mit einem C<sub>6</sub>-*spacer* eingebaut, um die Flexibilität des Peptids zu erhöhen.

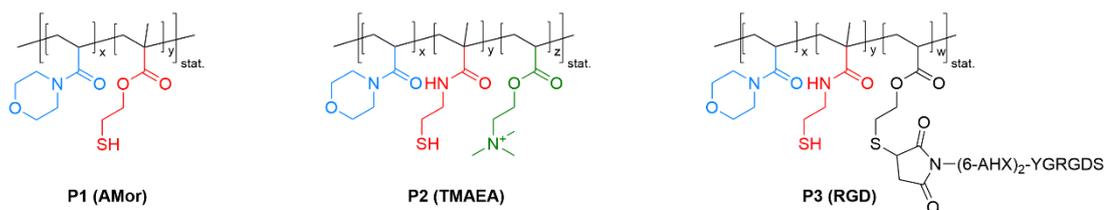


Abb. 17: Übersicht der verschiedenen Präpolymerstrukturen.

### 3.1.2.1 Charakterisierung mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie

Die Zusammensetzung der Präpolymere konnte mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bestimmt werden. Die Präpolymere wiesen in ihren Spektren charakteristische Signale für die jeweiligen Seitenketten der Monomere auf. Dem **AMor** Monomer wurde das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3.8 - 3.27 ppm (**1**) in D<sub>2</sub>O zugeordnet, hervorgerufen durch die 8 Protonen des Morpholinrings. Dem **BMAC**-Monomer wurde das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 1.0 - 0.8 ppm (**5**) in D<sub>2</sub>O zugeordnet, hervorgerufen durch die Methylgruppe der ursprünglichen Doppelbindung. Dem **TMAEA** Monomer wurde das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3.23 - 3.08 ppm (**2**) in D<sub>2</sub>O zugeordnet, hervorgerufen durch die 9 Protonen der drei Methylgruppen des Ammoniumions. Letzteres war durch die ionische Struktur nicht in organischen Lösungsmitteln löslich, weshalb für ein NMR lediglich D<sub>2</sub>O oder (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO in Frage kam. Für das RGD-Peptid wurde das Signal der 5 Protonen des Tyrosins bei einer chemischen Verschiebung von 7.13 und 6.81 ppm verwendet.

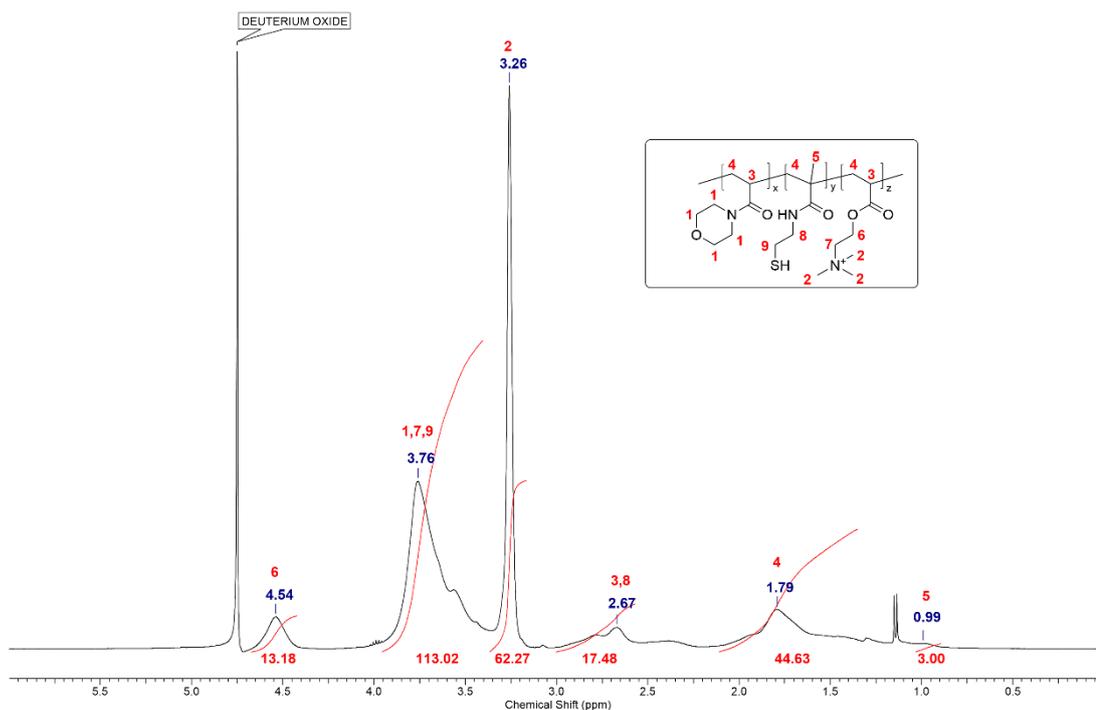


Abb. 18: Beispielhaftes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum für ein PAMor-co-BMAC-co-TMAEA Copolymer in  $\text{D}_2\text{O}$ .

In dem  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum in Abb. 18 waren deutliche Reste von Isopropanol bei einer chemischen Verschiebung von 1.14 ppm zu erkennen. Diese waren auch nach mehrstündigem Trocknen und Lyophilisieren vorhanden und wurden für die weitere Verwendung der Präpolymere in Kauf genommen. Aus dem Verhältnis der spezifischen Signale für die jeweiligen Seitenketten zu der Summe der Signale aller Komponenten, unter Berücksichtigung der Anzahl Protonen der jeweiligen Signale, konnte eine Zusammensetzung der Polymere bestimmt werden. Der Anteil der einzelnen Bestandteile wurde mit nachfolgender Gleichung 1 berechnet:

$$x_i[\%] = \frac{\frac{S_i}{P_i}}{\sum \frac{S_i}{P_i}} \cdot 100 \quad (1)$$

$x_i$ : Anteil des Monomers  $i$  in Prozent,  $S_i$ : Signal des Monomers  $i$ ,  $P_i$ : Anzahl Protonen des Monomers  $i$ .

Nachfolgend ist eine Beispielrechnung für den AMor-Anteil eines PAMor-co-BMAC-co-TMAEA Polymers aus Abb. 18 gezeigt:

$$x_{\text{AMor}}[\%] = \frac{\frac{113.02}{8}}{14.13 + 0.5 + 6.92} \cdot 100 = \frac{14.13}{21.55} = 65.6 \%$$

Bei der Berechnung des BMAC-Anteils musste beachtet werden, dass dieses durch die Bifunktionalität zwei Methylgruppen besitzt und dementsprechend nach der Spaltung doppelt so viele Gruppen im Polymer vorhanden waren.

$$x_{\text{BMAC}}[\%] = \frac{\frac{3}{6}}{21.55} \cdot 100 = \frac{0.5}{21.55} = 2.3 \%$$

$$x_{\text{TMAEA}}[\%] = \frac{\frac{62.27}{9}}{21.55} \cdot 100 = \frac{6.92}{21.55} = 32.1 \%$$

Demnach ergab sich eine Zusammensetzung von **65.6:2.3:32.1 AMor:BMAC:TMAEA** für das Beispiel aus Abb. 18. In Abb. 19 ist beispielhaft ein <sup>1</sup>H-NMR Spektrum eines Präpolymers, welches die Peptidsequenz MIC-6AHX-YGRGDS enthält, dargestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Präpolymere ist in Tabelle 1 am Ende von Abschnitt 3.1.2.2 dargestellt.

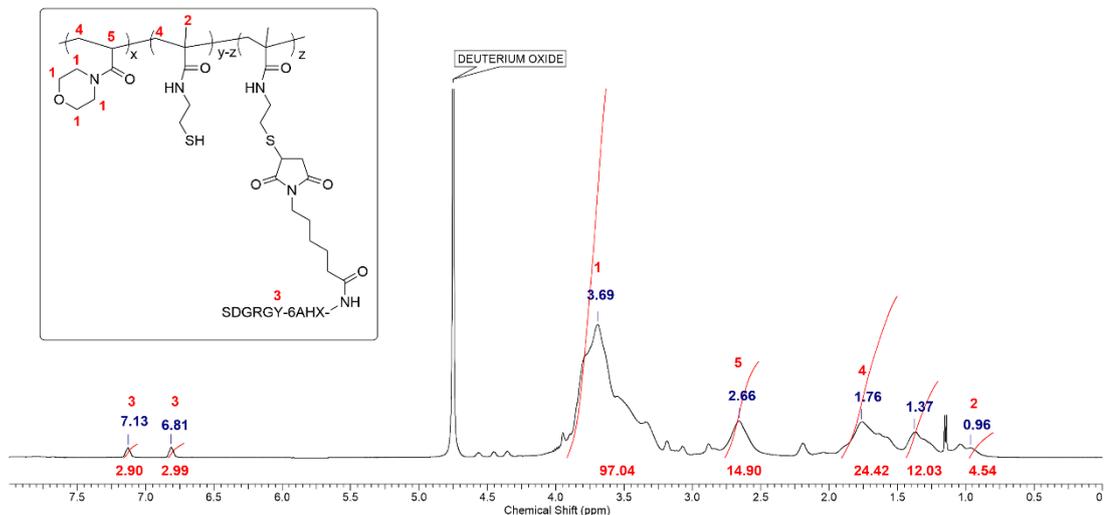


Abb. 19: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum eines **PAMor-co-BMAC-co-MIC-6AHX-YGRGDS** Copolymers in D<sub>2</sub>O.

Wie bereits zuvor erwähnt, wurden hierbei für das Peptid die Signale der aromatischen Protonen des Tyrosins bei einer chemischen Verschiebung von 7.13 und 6.81 ppm (**3**) zur Berechnung der Zusammensetzung verwendet. Da sich bei der Reaktion des Polymers mit dem Peptid die Zusammensetzung des Polymers, also die Menge an **AMor** und **BMAC** im Polymer, nicht ändert, wurde zur Bestimmung der Peptidfunktionalisierung auf das Signal der **AMor** Gruppen vor der Funktionalisierung referenziert. Das Integral betrug hierbei vor Funktionalisierung 97.04. Wurde nun Gleichung 1 auf diese Integrale angewendet, konnte eine Peptidfunktionalisierung von 8.1 mol% berechnet werden. Hierbei musste beachtet werden, dass ein Präpolymer mit einer theoretischen **BMAC**-Menge von 8 mol% verwendet wurde und unter Berücksichtigung der Bifunktionalität dementsprechend 16 mol% Thiole im Präpolymer vorhanden waren. Dadurch konnte die Peptidfunktionalisierung von über 8 mol% erklärt werden. Für das in Abb. 19

gezeigte Präpolymer ergab dies eine Zusammensetzung von 88.3:3.6:8.1 (AMor:BMAC:Peptid).

### 3.1.2.2 Charakterisierung mittels Ellman`s Assay

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Menge an Thiolen, neben der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, ist der sogenannte Ellman`s Assay, welcher 1958 von GEORGE L. ELLMAN publiziert wurde.<sup>[137,138]</sup> Dabei handelt es sich um eine Austausch-Reaktion zwischen einem thiolhaltigen Molekül und einem 5,5`-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure Molekül (DTNB) (siehe Abb. 20).

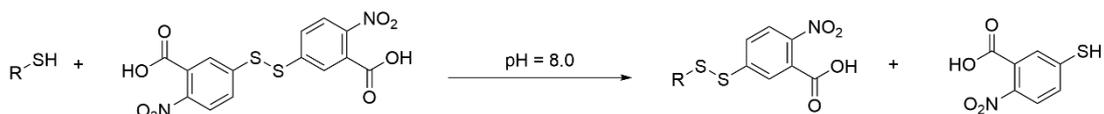


Abb. 20: Reaktionsschema des Ellman`s Assays.

Hierbei reagiert das Molekül, dessen Konzentration an Thiolen bestimmt werden soll, mit dem DTNB unter Ausbildung einer neuen Disulfidbindung und Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoessäure, welche in basischen Lösungen zu dem gelben Farbstoff 2-Nitro-5-thiobenzoat ( $\text{TNB}^{2-}$ ) deprotoniert wird. Dieser Farbstoff wird in äquivalenten Mengen zu den vorhandenen Thiolen gebildet und kann über UV/Vis-Spektroskopie quantifiziert werden. Das  $\text{TNB}^{2-}$ -Ion besitzt ein Absorptionsmaximum bei 412 nm und über das Lambert-Beer`sche-Gesetz (Gleichung 2) konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von  $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für verdünnte Lösungen die Konzentration an Thiolen bestimmt werden.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

$E$ : Extinktion,  $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $c$ : Konzentration,  $d$ : Schichtdicke der Küvette.

Durch Umstellen von Gleichung 2 konnte die Konzentration innerhalb der Messlösung über folgende Gleichung berechnet werden:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad (3)$$

Wurde diese Konzentration nun auf die eingewogene Menge an Polymer bezogen, konnte eine Stoffmenge des Thiols pro Gramm Polymer bestimmt werden:

$$b_{\text{Thiol}}[\text{mmol/g}] = \frac{c_{\text{Probelösung}} \cdot V_{\text{Probelösung}}}{V_{\text{Polymerlösung}} \cdot \beta_{\text{Polymerlösung}}} \quad (4)$$

$b_{\text{Thiol}}$ : Stoffmenge des Thiols auf einem Gramm Polymer,  $c_{\text{Probelösung}}$ : ermittelte Konzentration des Ellman's Assays,  $V_{\text{Probelösung}}$ : Volumen der Probelösung,  $V_{\text{Polymerlösung}}$ : Volumen der verwendeten Polymerstammlösung,  $\beta_{\text{Einwaage}}$ : Massenkonzentration der verwendeten Polymerstammlösung.

Nachfolgend ist die Berechnung der Stoffmenge des Thiols pro Gramm Polymer am Beispiel des in Abb. 18 gezeigten Copolymers dargestellt. Das Volumen der Probelösung betrug 1.4 mL und die Konzentration dieser wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Hierbei wurden 0.125 mL der Polymerstammlösung mit einer Konzentration von 1 g/L verwendet:

$$b_{\text{Thiol}}[\text{mmol/g}] = \frac{0.0329 \mu\text{mol/mL} \cdot 1.4 \text{ mL}}{0.125 \text{ mL} \cdot 1 \text{ mg/mL}} = 0.369 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg}} = 0.369 \frac{\text{mmol}}{\text{g}}$$

Im Gegensatz zur  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, bei welcher lediglich die molare Verteilung der Monomere innerhalb des Polymers in mol% bestimmt werden kann, konnte über den Ellman's Assay eine absolute Stoffmenge an Thiolen pro Gramm Polymer bestimmt werden. Ebenfalls konnte durch Vergleich der theoretischen und gemessenen Konzentration an Thiolen der Einbau von **BMAC** in das Polymer ermittelt werden. Aus der Stoffmenge pro Gramm Polymer konnte mit Hilfe der Masse des thiolhaltigen Monomers (144.21 g/mol) eine Massenkonzentration berechnet werden. Für das obige Beispiel betrug diese 53.18 mg/g. Die theoretische Massenkonzentration konnte aus der verwendeten Masse an **BMAC** und der Gesamtmasse des Polymers berechnet werden und betrug für das obige Beispiel mit 4 mol% **BMAC** 58.43 mg/g. Durch Teilen der praktischen Massenkonzentration durch die theoretische Massenkonzentration konnte ein **BMAC**-Anteil von 3.6 % (theor. 4.0 %) aus dem Ellman's Assay berechnet werden.

Die in Tabelle 1 dargestellten Zusammensetzungen der verschiedenen Präpolymere zeigen jeweils Beispiele eines einzelnen Präpolymeransatzes. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze dieser Polymere hergestellt und die Zusammensetzung dieser Ansätze unterschied sich leicht voneinander. Eine Menge an **BMAC** im Präpolymer zwischen 3.0 und 4.5 mol% nach der Charakterisierung mit dem Ellman's Assay wurde dabei in der Regel als ausreichend betrachtet und

solche Polymere wurden für die weitere Herstellung von Hydrogelen verwendet. Bei dem Vergleich der **BMAC**-Menge durch NMR und Ellman's Assay wurde deutlich, dass sich diese häufig recht stark voneinander unterschieden. Dies konnte dadurch erklärt werden, dass das Signal der Methylgruppe des **BMAC** bei der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie im Vergleich zu den beiden anderen verwendeten Monomeren sehr klein war. Dadurch wirkten sich bereits kleine Änderungen beim Setzen der Integrale oder durch Überlagerungen weiterer Signale, wie z.B. Lösungsmittel, stark auf die ermittelte Zusammensetzung aus. Bei dem Ellman's Assay hingegen konnten alle Thiole quantitativ bestimmt werden. Ein Problem hierbei könnte hingegen eine Aggregatbildung in Wasser sein, sodass nicht alle Thiole für die stattfindende Reaktion zugänglich wären. Diesem Phänomen wurde durch eine ausreichende Reaktionszeit für die zu Grunde liegende Reaktion entgegengewirkt, da diese Aggregate keine starren Gebilde waren und sich über die Zeit veränderten. Während für niedermolekulare Verbindungen häufig geringe Reaktionszeiten (<5 min) ausreichend waren, wurde für den Assay mit Polymeren eine Reaktionszeit von 20 - 30 min gewählt. Sichtbar wäre eine unvollständige Reaktion während der Messung durch einen kontinuierlichen Anstieg der Extinktion. Dieses Phänomen war bei keiner Messung aufgetreten, weshalb von einer vollständigen Reaktion ausgegangen wurde.

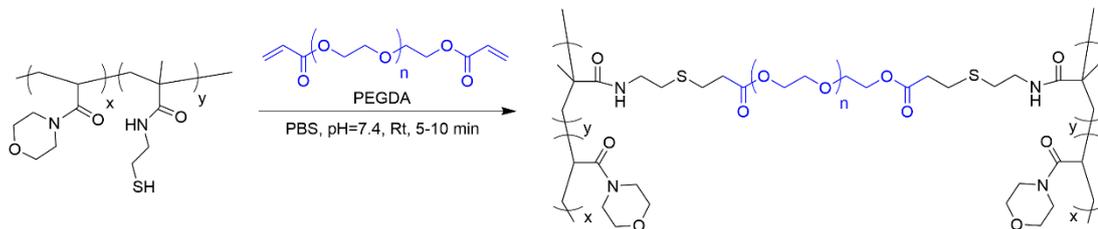
**Tabelle 1:** Übersicht über die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Präpolymere.

Polymer	Struktur	Komposition (theor.)	Komposition (NMR)	$b_{\text{BMAC}}^{\text{a)}$ [mmol/g] ([mol%])	$M_n^{\text{b)}$ [g/mol]	$\mathcal{D}^{\text{b)}$
<b>P1</b>	AMor- BMAC	96:4	95.6:4.4	0.42 (3.1)	25000	1.54
<b>P2</b>	AMor- BMAC- TMAEA	56:4:35	65.6:2.3:32.1	0.37 (3.6)	- <sup>c)</sup>	- <sup>c)</sup>
<b>P3</b>	AMor- BMAC- RGD	88:4:8	88.3:3.6:8.1	0.28 (2.7)	33200	2.7

a) Bestimmt durch Ellman's Assay mittels UV/Vis-Spektroskopie, mol% Angabe berechnet aus Vergleich von theoretischen und praktischen Gew.-% (mg BMAC pro g Polymer), b) Proben wurden in DMF + 5 g/L LiBr gelöst und auf einen PMMA-Standard referenziert, c) das Polymer ist nicht im GPC Laufmittel löslich.

### 3.2 Herstellung der Hydrogele

Bei den in diesem Kapitel verwendeten Hydrogelen handelte es sich um Gele, welche über eine nachträgliche Vernetzung von Präpolymeren mit Vernetzern über eine Michael-Addition hergestellt wurden. Bei der Michael-Addition handelt es sich um eine Namensreaktion, welche von ARTHUR MICHAEL 1887 das erste Mal vorgestellt wurde.<sup>[139]</sup> Dabei reagieren  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen, welche auch als Michael-Akzeptoren bezeichnet werden, mit einem Nucleophil (Michael-Donator). Als Michael-Akzeptoren werden z.B. Aldehyde, Ester, Ketone und Carbonsäureamide verwendet, während als Donatoren hauptsächlich Carbanionen, Amine oder Thiole in Frage kommen. Dadurch können sowohl C-C-Bindungen als auch Heteroatombindungen wie C-N- oder C-S-Bindungen entstehen. In dieser Arbeit wurde die Reaktion zwischen Acrylaten und Thiolen ausgenutzt, welche auch als bioorthogonale Reaktion beschrieben wird. Diese Reaktion findet unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert statt. Weiterhin handelt es sich um eine atomökonomische Reaktion, da keinerlei Nebenprodukte bei dieser Reaktion entstehen. Die Michael-Addition ist anhand der Vernetzungsreaktion eines Präpolymers mit PEGDA in Abb. 21 dargestellt.



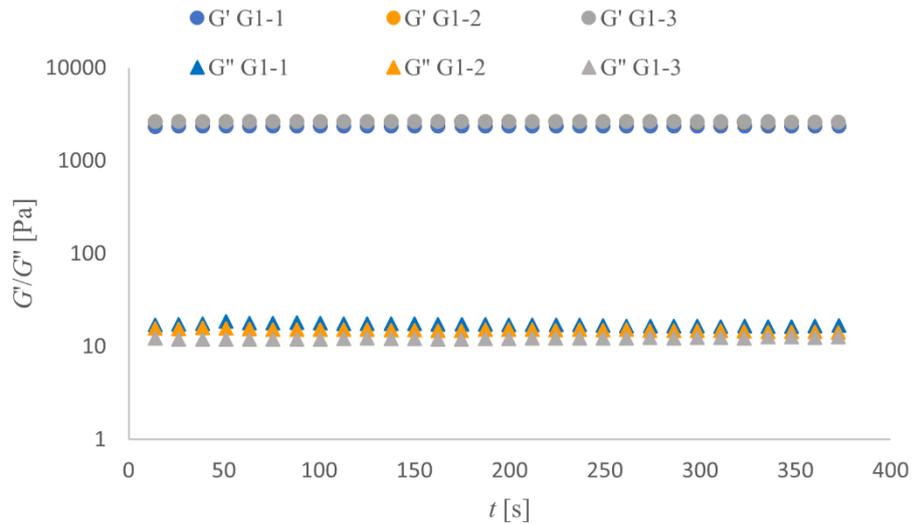
**Abb. 21:** Michael-Addition am Beispiel der Vernetzungsreaktion eines Präpolymers mit PEGDA.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich drei verschiedene Arten von Hydrogelen untersucht. Bei dem ersten Hydrogel **G1** handelte es sich um ein Gel ohne weitere Funktionen, welches aus dem Präpolymer **P1** hergestellt wurde. Dieses diente als Negativkontrolle und besaß keinen spezifischen Einfluss auf die spätere Kultivierung der Zellen. Das zweite Hydrogel **G2** beinhaltete eine dauerhafte kationische Gruppe (**TMAEA**) und war so in der Lage mit der negativen geladenen Kopfgruppe der Zellmembran zu interagieren, um eine initiale Adhäsion zu fördern. Das Hydrogel **G3** beinhaltete im Vergleich zu **G1** zusätzlich das Tripeptid RGD, welches bereits ausgiebig in der Literatur untersucht wurde und durch Interaktion mit Integrinen in der Lage ist, sowohl die Adhäsion als auch die Zellviabilität zu verbessern.<sup>[134]</sup> Alle weiteren Hydrogele leiteten sich von diesen drei Grundgelen ab und stellten

Variationen dieser dar. Die Hydrogele wurden durch Mischen zweier Stammlösungen, einer Präpolymer- und einer Vernetzer-Stammlösung, hergestellt. Dazu wurden die Stammlösungen des Präpolymers (200 mg/mL) und des Vernetzers (175 mg/mL) in PBS-Puffer (0.01 M, pH = 7.4) hergestellt. Diese Stammlösungen wurden in bestimmten Verhältnissen, ggf. unter Zugabe von weiterem PBS-Puffer, gemischt, sodass eine finale Massenkonzentration von 18 Gew.-% entstand. Zur Herstellung von Hydrogelen für Zellexperimente wurden die Stammlösungen in sterilem PBS-Puffer angesetzt. Die entstandenen Lösungen wurden anschließend entweder für analytische Zwecke in eine runde Form mit einem Durchmesser von 15 mm oder für Zellexperimente in eine SDS-Page-Kammer mit einem Plattenabstand von 1 mm gegossen. Zur vollständigen Gelierung wurden die Proben für ca. 1 - 2 h bei Rt inkubiert, bevor diese für 24 h in einem Medium (PBS-Puffer oder H<sub>2</sub>O) zur vollständigen Quellung gelagert und anschließend für Experimente verwendet wurden. Die hergestellten Hydrogele wurden mittels verschiedener Analysemethoden untersucht.

### **3.2.1 Untersuchung der Hydrogele mittels Rheologie**

Die wichtigste verwendete Methode zur Charakterisierung der Materialeigenschaften von Gelen in dieser Arbeit ist die Rheologie. Hierbei wird das Hydrogel mittels eines Platte-Platte-Rheometers untersucht und das Speicher- und Verlustmodul bestimmt. Wie aus Gleichung 15 (siehe Kapitel 7.1.4) deutlich wird, liegt ein Gel vor, wenn der Verlustfaktor  $\tan(\delta)$  kleiner 1 ist. Hierbei muss also das Speichermodul  $G'$  größer als das Verlustmodul  $G''$  sein. Um die Stabilität der Hydrogele zu untersuchen, wurden zeitabhängige Oszillationsversuche durchgeführt. Dabei wurde eine Frequenz von 1 Hz und eine Deformation von 1 % verwendet, um die Probe bei der Messung nicht zu zerstören. Nachfolgend ist in Abb. 22 beispielhaft eine zeitabhängige Messung eines unfunktionalisierten Gels **G1** mit 18 Gew.-%, vollständig gequollen in PBS-Puffer, dargestellt.



**Abb. 22:** Beispielhafte zeitabhängige Oszillationsmessung des unfunktionalisierten Gels **G1**, vollständig gequollen in PBS-Puffer, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 %. Das Experiment wurde in dreifach Bestimmung durchgeführt (gekennzeichnet durch die Farben Blau, Gelb und Grau). Dargestellt sind die Messdaten für das Speichermodul  $G'$  (Kreis) und Verlustmodul  $G''$  (Dreieck).

Die zeitabhängige Messung zeigte, dass alle drei Gele über die Messdauer eine konstante Steifigkeit von ca.  $2550 \pm 130$  Pa aufwiesen und nur geringe Abweichungen zwischen den drei Gelen auftraten. Außerdem wurde deutlich, dass zu jedem Zeitpunkt  $G'$  deutlich größer als  $G''$  war und somit per Definition ein Gel vorlag. Außerdem war  $G''$  mit ca.  $15 \pm 2$  Pa deutlich kleiner als das Speichermodul. Dies ist eine Eigenschaft eines nahezu ideal-elastischen Materials. Auch für die weiteren Gele sah der zeitliche Verlauf ähnlich konstant aus und lediglich die Höhe des Speicher- und Verlustmoduls änderten sich, sodass im weiteren Verlauf der Arbeit lediglich die mittleren Zahlenwerte der Speicher- und Verlustmodule aufgezeigt werden. Zur besseren Übersicht sind die Verlust- und Speichermodule, sowie Quellwerte für **G1 - 4** in

**Tabelle 2** am Ende von Kapitel 3.2.2 dargestellt. Es sind die Daten über drei Messungen und der daraus resultierende Fehler dargestellt. Während alle Gele mit einer 18 Gew.-% Lösung hergestellt wurden, wurden RGD-haltige Hydrogele lediglich mit einer geringeren Massenkonzentration von 10 Gew.-% hergestellt. Dies ist auf die benötigte Menge an Materialien zurückzuführen, da Peptide sehr kostspielig in Herstellung und Beschaffung sind. Während sich die Speichermodule von **G1** ( $2550 \pm 130$  Pa) und **G2** ( $2940 \pm 480$  Pa) nur in geringem Maße unterschieden, kann der große Unterschied des Speichermoduls zu **G3** ( $570 \pm 50$  Pa) und **G4** ( $690 \pm 110$  Pa) durch die geringere Massenkonzentration bei der Herstellung

erklärt werden. Bei der Verwendung von Polymeren zur Herstellung von Gelen kann es auf Grund der langen Ketten zu Verknäuelungen kommen, welche zusätzliche Netzpunkte ausbilden. Je mehr Netzpunkte vorhanden sind, desto steifer wird in der Regel das Hydrogel, da die freie Bewegung der Ketten eingeschränkt ist. Wird nun eine höhere Massenkonzentration verwendet, befindet sich mehr Material auf demselben Volumen, wodurch eine stärkere Verknäuelung hervorgerufen wird und die Steifigkeit des Gels steigt. Weiterhin war zu erkennen, dass das Verlustmodul bei allen Gelen mit  $< 30$  Pa sehr klein war und es sich bei allen Hydrogelen um ein nahezu ideal-elastisches Material handelte.

### 3.2.2 Bestimmung der Quellwerte der Hydrogele

Der Quellwert ( $Q_m$ ) eines Hydrogels gibt an, wie viel Wasser das Material im Vergleich zum Trockengewicht aufnehmen kann. Während Hydrogele im Schnitt häufig etwa das 10- bis 20-fache an ihrem Eigengewicht an Wasser aufnehmen können, sind superabsorbierende Polymere (SAPs) in der Lage das bis zu 2000-fache ihres Eigengewichts an Wasser zu absorbieren.<sup>[140]</sup> Das wohl bekannteste Beispiel für solch einen Superabsorber sind Babywindeln auf Basis von Polyacrylsäure mit einer maximalen Absorption von 1000 g reinem Wasser pro g Polymer. Dabei ist die Menge abhängig von der aufgenommenen Flüssigkeit. Bei ionischen Flüssigkeiten, im Gegensatz zu reinem Wasser, kann z.B. nur etwa das 200-fache an Flüssigkeit aufgenommen werden.<sup>[141]</sup> Der Quellwert konnte über den Vergleich des Trockengewichts mit einem vollständig gequollenen Gel über die nachfolgende Formel bestimmt werden:

$$Q_m = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (5)$$

$Q_m$ : Quellwert,  $m_s$ : Masse gequollenes Gel,  $m_d$ : Masse trockenes Gel.

Die Quellwerte für die Gele **G1 - 4** sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Übersicht über die Materialeigenschaften der Gele **G1-4**.

Gel	Polymerstruktur	Lösung [Gew.-%]	$Q_m^{a)}$	$G'$ [Pa] <sup>b)</sup>	$G''$ [Pa] <sup>b)</sup>
G1	AMor-BMAC	18	10.3 ± 0.1	2550 ± 130	15 ± 2
G2	AMor-BMAC- TMAEA	18	11.1 ± 0.3	2940 ± 480	26 ± 4
G3	AMor-BMAC- RGD	10	14.7 ± 0.1	570 ± 50	3 ± 1
G4 <sup>c)</sup>	AMor-BMAC- TMAEA-RGD	10	14.1 ± 0.1	690 ± 110	4 ± 1

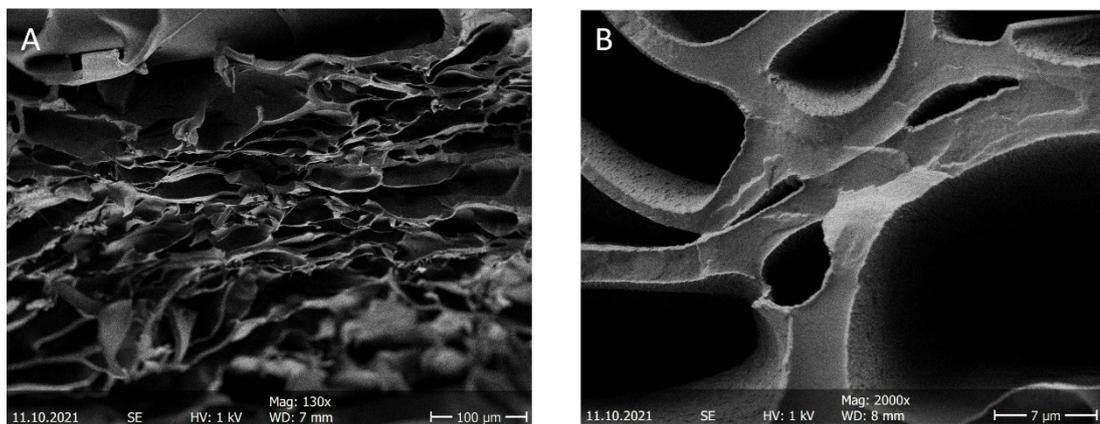
a) Quellwertbestimmung in Triplikaten über Trocknung von vollständig gequollenen Gelen in PBS-Puffer,  
 b) bestimmt über rheologische Untersuchungen mit einer Frequenz von 1 Hz und 1 % Deformation in Triplikaten,  
 c) Herstellung durch Mischung von P2 und P3.

Die Quellwerte in Tabelle 2 zeigten, dass diese im typischen Bereich für Hydrogele lagen. Die erhöhten Quellwerte für **G3** und **G4** konnten durch die geringere Vernetzungsdichte und den damit einhergehenden geringeren Speichermodul erklärt werden. Weichere und nur leicht vernetzte Gele sind in der Lage größere Mengen an Wasser aufzunehmen. Die geringere Vernetzungsdichte beruhte auf der Verwendung einer 10 Gew.-%-Lösung, wodurch weniger Verschlaufungen als bei einer 18 Gew.-%-Lösung auftraten. Die rheologischen Untersuchungen und Quellwerte zeigten deutlich, dass sich die Gele **G1** und **G2** trotz ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung nur bedingt in ihren mechanischen Eigenschaften unterscheiden. Dadurch sollte sich der Einfluss auf spätere Zelleexperimente durch die mechanischen Eigenschaften kaum unterscheiden. Somit sollten sichtbare Effekte während der Zelleexperimente auf die zusätzliche funktionelle Gruppe zurückgeführt werden können.

### 3.2.3 Untersuchung der Hydrogele mittels Rasterelektronenmikroskopie

Damit Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung überleben können, ist ein ausreichender Transport von Nährstoffen und Sauerstoff unerlässlich. Ein Nährmedium für NSCs beinhaltet unter anderem verschiedene Proteine und Wachstumsfaktoren, welche mittels Diffusion zu den Zellen innerhalb des Hydrogels gelangen müssen. Dafür ist es notwendig, dass die Diffusion ausreichend schnell stattfindet und die Größe der Poren, durch welche das Medium diffundieren kann, einen Transport von Proteinen ermöglicht. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) ist ein Signalprotein und wichtiger Bestandteil der Regulation von Zellwachstum und

Differenzierung bei der Kultivierung von NSCs. Dieser wird für gewöhnlich in geringen Konzentrationen von wenigen ng bis  $\mu\text{g}$  pro mL (in dieser Arbeit wurden 20 ng/mL verwendet) eingesetzt und liegt dabei in Aggregaten mit einem hydrodynamischen Radius von ca. 80 - 100 nm vor.<sup>[142]</sup> Wichtige Proteine für die Kultivierung der Zellen sind Laminin (400 - 900 kDa) und Tenascin-C (180 - 300 kDa). In gängigen Puffermedien nimmt Laminin eine sehr kompakte Form ein und besitzt, trotz der hohen molaren Masse, einen hydrodynamischen Radius von nur ca. 20 - 30 nm.<sup>[143]</sup> Die Porengröße der Hydrogele wurde mit Hilfe von **Rasterelektronenmikroskopie (REM)** untersucht. Dazu wurden zunächst vollständig gequollene Gele hergestellt, welche anschließend mittels Lyophilisierung getrocknet wurden. Aus dem trockenen Gel, welches zur Probenpräparation erneut eingefroren wurde, wurde ein Stück rausgebrochen, um den Querschnitt des Hydrogels zu untersuchen. Die Querschnitte des kationischen 18 Gew.-% Gels **G2** sind in Abb. 23 dargestellt.

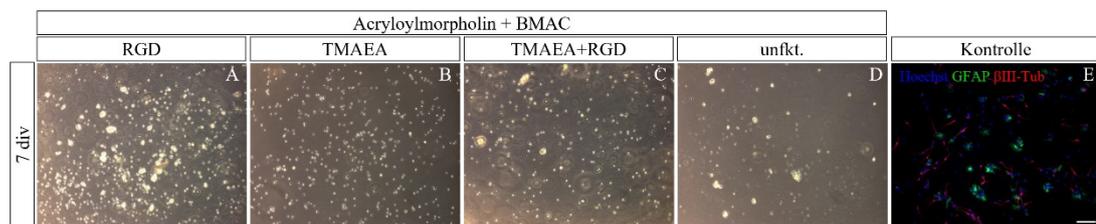


**Abb. 23:** REM-Aufnahmen eines getrocknete kationischen 18 Gew.-% Hydrogels bei einer 130-fachen (A) und 2000-fachen (B) Vergrößerung. Bild A zeigt eine Übersicht der Poren bei einem Maßstab von 100  $\mu\text{m}$  und Bild B eine Nahaufnahme der Poren bei einem Maßstab von 7  $\mu\text{m}$ .

Die REM-Aufnahmen zeigten deutlich, dass eine poröse Struktur des Hydrogels vorlag. Dabei lagen unterschiedliche Porengrößen vor, welche in allen Fällen größer als 2 - 3  $\mu\text{m}$  und dadurch für einen Transport von Proteinen geeignet waren. Es ist zu beachten, dass die Aufnahmen mit einem getrockneten Hydrogel durchgeführt wurden und das Netzwerk in einem vollständig gequollenen Zustand größere Poren aufweisen kann.

### 3.3 Kultivierung von NSCs auf Hydrogelen

Im nächsten Schritt wurde die Kultivierung von Maus embryonalen NSCs auf den Hydrogelen untersucht. Dazu wurden zunächst aus den hergestellten Hydrogelen in der SDS-Page Kammer mit Hilfe eines sterilen Kork Stanzers runde Probenkörper mit einem Durchmesser von 13 mm ausgestanzt. Hierbei wurden die bereits beschriebenen Gele **G1** - **G3**, sowie zusätzlich ein Gel **G4**, welches kationische Gruppen und das RGD-Peptid beinhaltet, verwendet. Dieses wurde durch Mischen von **P2** und **P3** in einem 50:50 Massenverhältnis hergestellt. Ein Hydrogel, welches kationische Gruppen mit RGD kombiniert, basiert auf der Idee von SALLOUH und JAROCKI *et al.*, welche einen synergistischen Effekt bei der Verwendung eines RGD Peptids in Kombination mit dem primären Amin Aminoethylmethacrylat (AEMA) beschrieben.<sup>[113]</sup> Primäre Amine liegen bei einem pH-Wert von 7.4 zu ca. 50 % als protonierte Spezies vor und weisen daher kationische Ladungen auf.<sup>[144]</sup> Wie bereits in Kapitel 3.2 erwähnt, sind kationische Ladungen in der Lage mit der negativen Zellmembran zu interagieren und eine initiale Adhäsion der Zellen zu fördern. Dies kann in einem zweiten Schritt den Kontakt der NSCs mit dem RGD-Peptid auf der Oberfläche des Hydrogels fördern. Dadurch kann eine starke Adhäsion der Zellen durch Wechselwirkung der Integrine mit dem RGD auftreten. Auf jedem Hydrogel wurden 40.000 Zellen ausgesät und diese für insgesamt 7 Tage (7 div, engl. *days in vitro*, Tage in Kultur) kultiviert. Dabei wurde die Morphologie der Zellen auf den Proben nach 7 div zunächst in Phasenkontrastaufnahmen betrachtet (siehe Abb. 24). Großaufnahmen aller Zellbilder sind im Anhang zu finden (Abb. A 61 und folgende).



**Abb. 24:** Phasenkontrastaufnahmen von NSCs kultiviert auf **G1** - **G4** (A-D) nach 7 div, sowie Fluoreszenzfärbung von NSCs kultiviert auf Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin als Kontrolle (E). (A) zeigt die NSCs auf einem RGD-funktionalisierten Hydrogel (**G3**), (B) auf einem kationischen Hydrogel (**G2**), (C) auf einem kombinierten Hydrogel mit kationischen Gruppen und dem RGD-Peptid (**G4**) und (D) auf einem unfunktionalisierendem Hydrogel als negativ Kontrolle (**G1**). Die Fluoreszenzfärbung der Kontrolle wurde mit Hoechst (Zellkern), GFAP (Astrozyten) und  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) durchgeführt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu$ m.

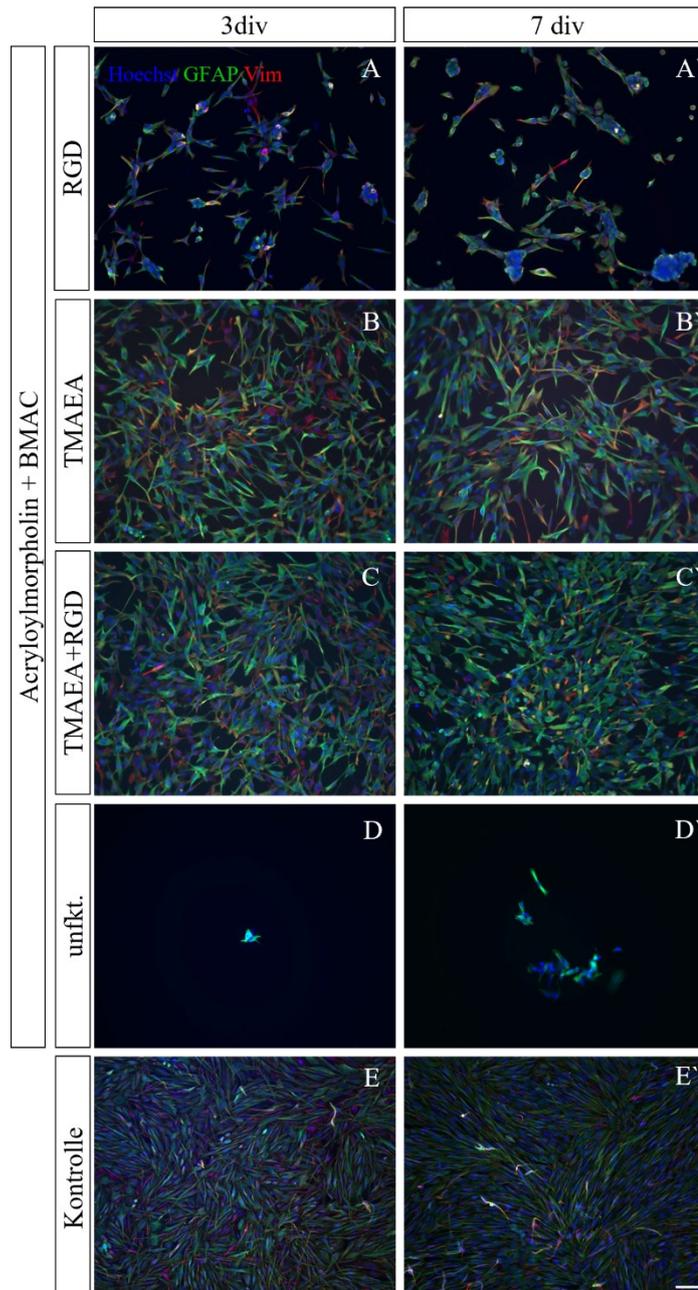
In den Phasenkontrastaufnahmen A-D war deutlich zu erkennen, dass die Zellen gleichmäßig über das gesamte Gel verteilt waren und eine runde Morphologie im Gegensatz zu der gestreckten Form der Kontrolle aufwiesen. Weiterhin waren einige

Zellaggregate, vor allem bei den Gelen, welche RGD beinhalteten, zu finden. Während die Bildung von Zellaggregaten im Zusammenhang mit einer runden Morphologie dafür spricht, dass eine Zell-Zell-Interaktion gegenüber einer Wechselwirkung mit dem Hydrogel bevorzugt wurde, deutete die runde Morphologie zusätzlich auf eine geringe Adhäsion und Differenzierung der Stammzellen hin. Stammzellen sind bekannt als eine in der Kultivierung sehr anspruchsvolle Zelllinie und reagieren stark auf äußere Einflüsse.<sup>[145]</sup> So können bereits Probleme bei der Gewinnung der Zellen aus den Embryos auftreten, wenn z.B. Tiere gestresst oder gar krank sind. Die Fluoreszenzaufnahmen der NSCs auf Polyornithin als Kontrolle mit  $\beta$ III-Tubulin als Marker für Neuronen und GFAP als Marker für Astrozyten zeigten allerdings viele differenzierte Zellen, sodass hier ein Problem bei der Gewinnung der NSCs ausgeschlossen werden konnte. Eine ausgiebige Differenzierung findet nur statt, wenn die Zellen auch adhären, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass hier keine signifikante Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen stattgefunden hat. Ein weiterer Hinweis auf eine schlechte Adhäsion war die Morphologie der Zellen. In 2D-Experimenten nehmen Zellen häufig eine gestreckte Morphologie an, um die Kontaktfläche mit der Oberfläche des Materials zu erhöhen. Aus diesem Grund wurden die Hydrogele lediglich in Phasenkontrastaufnahmen betrachtet und keine Untersuchung mit verschiedenen Markern durchgeführt. Dennoch zeigten die Experimente, dass die Präparation der Hydrogele und Zellen zu einer gleichmäßigen Verteilung der Zellen auf dem Hydrogel führte, aber noch keine optimalen Bedingungen für die Kultivierung der NSCs vorlagen. In den nachfolgenden Experimenten galt es nun die Probleme des Hydrogelsystems systematisch zu lokalisieren und Bedingungen zu finden, welche zur erfolgreichen Kultivierung von NSCs eingesetzt werden können.

### **3.3.1 Die alternative Zelllinie U251-MG**

Um zu überprüfen, ob das Hydrogel allgemein für die Kultivierung von Zellen ungeeignet war, oder ob die Probleme nur bei den NSCs auftraten, wurde eine zweite Zelllinie verwendet. Dafür wurde die Zelllinie U251-MG gewählt. Diese Zelllinie stammt aus dem menschlichen Glioblastom, welcher der am häufigsten auftretende bösartige Hirntumor bei erwachsenen Menschen ist. U251-MG Zellen sind dementsprechend sehr robust und wurden bereits ausgiebig in der Literatur untersucht.<sup>[146-148]</sup> Für dieses Experiment wurden erneut die Gele **G1 - G4**

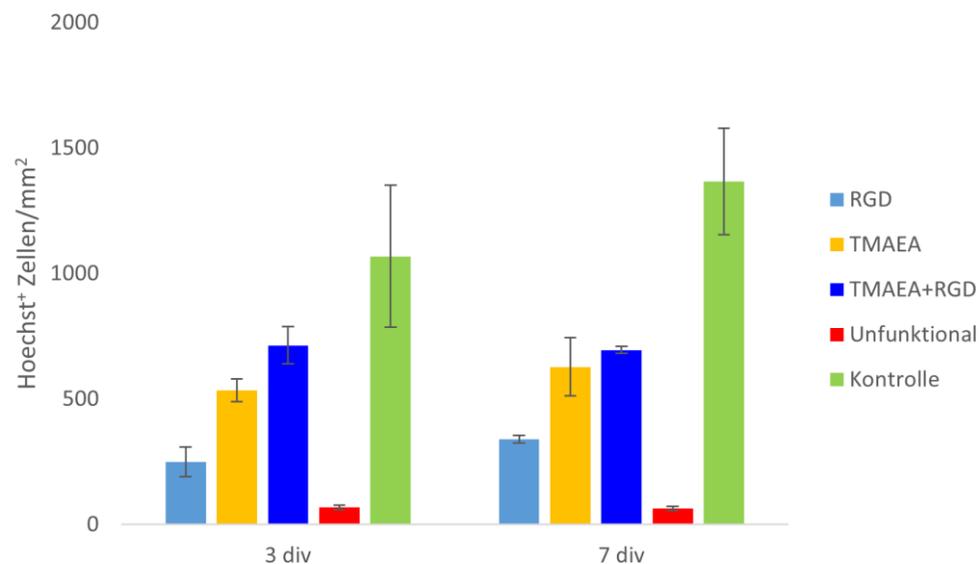
verwendet. Hierbei wurden die Zellen nach 3 und 7 div betrachtet und eine Fluoreszenzfärbung mit Hoechst (Zellkern), GFAP (Astrozyten) und Vimentin (Intermediärfilamente) durchgeführt. Die Fluoreszenzbilder sind in Abb. 25 dargestellt. Zunächst war deutlich der Unterschied zu den Experimenten mit NSCs (vgl. Abb. 24) zu erkennen. Während bei den NSCs lediglich eine runde Zellmorphologie auftrat, war bei den Tumorzellen eine gestreckte Morphologie zu erkennen. Dies ist typisch für diese Zelllinie in 2D-Experimenten, da durch die Ausbreitung der Zelle ein größerer Kontakt zu dem Substrat hergestellt werden kann.<sup>[149]</sup> Bereits die Verwendung von geringen Mengen des RGD-Peptids (A/A', 0.26  $\mu\text{mol/mg}$  Gel) führte zu einer deutlichen Erhöhung der adhären Zellen im Vergleich zur unfunktionalisierten negativ Kontrolle (D/D'). Bei der Verwendung von kationischen Gruppen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (B/B') und der Kombination von kationischen Gruppen mit dem RGD-Peptid (C/C', 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel, kationische Gruppe; 0.13  $\mu\text{mol/mg}$  Gel, RGD) war bereits ähnlich der Positivkontrolle die komplette Oberfläche mit Zellen bedeckt.



**Abb. 25:** Fluoreszenzfärbung von U251-MG Zellen auf einem Hydrogel mit einem RGD-Peptid (**G3**, A/A'), einem kationischen Gel (**G2**, B/B'), einem kombinierten Gel mit kationischen Gruppen und RGD-Peptid (**G4**, C/C') und einem Gel ohne weitere Funktion (**G1**, D/D'). Als Kontrolle wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale verwendet (E/E'). Als Zeitpunkte der Evaluation wurden 3 div (A-E) und 7 div (A'-E') gewählt. Die Fluoreszenzfärbung wurde mit Hoechst (Nukleus), GFAP (Astrozyten) und Vimentin (Intermediärfilamente) durchgeführt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Bei genauerer Betrachtung der statistischen Auswertung von **G2** und **G4** (siehe Abb. 26) wurde deutlich, dass allein durch die Verwendung des RGD-Peptids die Anzahl an Zellen/ $\text{mm}^2$  nach 3 div von ca.  $68 \pm 9$  (D, unfunkt.) auf  $249 \pm 60$  (A, RGD) gesteigert werden konnte. Die Verwendung eines rein kationischen Hydrogels hingegen sorgte für einen 7.6-fachen Anstieg der Anzahl adhärierter Zellen auf  $535 \pm 45$  Zellen/ $\text{mm}^2$  nach 3 div im Vergleich zu dem unfunktionalisierten Gel (D). Durch die Kombination von RGD mit der kationischen Gruppe konnte die Anzahl

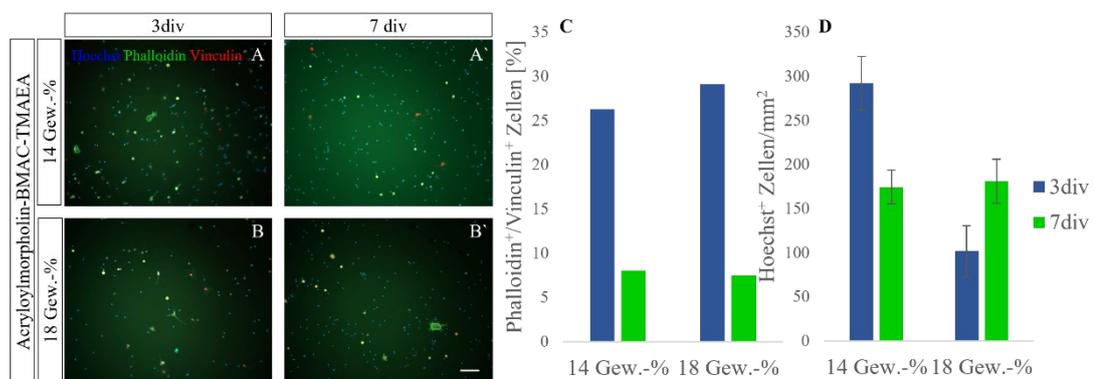
der Zellen auf  $714 \pm 74$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div gesteigert werden. Nach 7 div stieg die Anzahl der adhärenierten Zellen nicht mehr merklich an. Lediglich die Anzahl der Zellen auf der Positivkontrolle waren deutlich gestiegen ( $1069 \pm 284$  nach 3 div,  $1366 \pm 213$  nach 7 div). Dies deutete darauf hin, dass die initiale Adhäsion durch die Verwendung von kationischen Gruppen und eines RGD-Peptids, wie bereits prognostiziert, verbessert werden konnte. Die Anzahl der Zellen während der Kultivierung veränderte sich allerdings nicht merklich, weshalb ein Einfluss auf die Proliferation und weitere Adhäsion der Zellen während der Dauer der Experimente ausgeschlossen werden konnten. Die Adhäsion der Zellen findet für gewöhnlich innerhalb der ersten Stunden nach aussäen der Zellen statt. Das Experiment mit U251-MG Zellen zeigte, dass das Hydrogelsystem grundsätzlich zur Kultivierung von Zellen verwendet werden konnte, während bei der Kultivierung der NSCs Probleme auftraten. Da die NSCs deutlich anfälliger für Änderungen in den Kulturbedingungen sind, bestand die Möglichkeit, dass eine bestimmte Komponente des Hydrogels (z.B. die dauerhafte kationische Ladung) oder ein anderer Parameter der Kultivierungsbedingungen einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität und Adhäsion der NSCs ausübte.



**Abb. 26:** Statistische Auswertung der Hoechst-positiven Zellen auf den verschiedenen Hydrogelen G1-G4 nach 3 und 7 div.

### 3.3.2 Einfluss der Steifigkeit auf die Kultivierung von NSCs

Zellen werden nicht nur durch extrinsische Faktoren wie z.B. Wachstumsfaktoren, sondern auch durch mechanische Eigenschaften der extrazellulären Matrix beeinflusst. Die mechanischen Eigenschaften von verschiedenen Gewebetypen des menschlichen Körpers variieren sehr stark. So besitzt das Gehirn eine geringe Steifigkeit von ca. 0.5 - 1 kPa, während die Leber eine moderate Steifigkeit von 3 kPa aufweist. Gewebe mit einer sehr hohen Steifigkeit von 15 MPa sind z.B. Knochen.<sup>[103,150]</sup> Da NSCs hauptsächlich im Gehirn und im zentralen Nervensystem (engl. *central nervous system*, CNS) vorkommen, bevorzugen diese eine geringere Steifigkeit der Matrix im Bereich von 0.5 - 1 kPa, wie sie auch von SAHA *et al.* beschrieben wurde.<sup>[103]</sup> Bei den Zellexperimenten entstand durch das Ausstanzen der Hydrogele, den Transfer in Zellkulturschalen und das mehrmalige Waschen der Probenkörper eine hohe Belastung, wodurch die Gele anfällig für Beschädigungen bei der Präparation waren. Ein Hydrogel mit einer höheren Steifigkeit vereinfachte die Handhabung während der Experimente, weshalb 18 Gew.-% Gele mit einer Steifigkeit von ca. 3 kPa als Standardbedingung festgelegt wurden. Für die Untersuchung des Einflusses der Steifigkeit auf die Kultivierung der NSCs wurden kationische Hydrogele ausgewählt, da diese bei den U251-MG Zellen bereits eine gute Adhäsion zeigten. Über die Änderung der Konzentration der Präpolymer-Lösung vor der Gelierung konnten Hydrogele mit verschiedenen Steifigkeiten hergestellt werden. Hierbei wurden 14 Gew.-% und 18 Gew.-% Gele miteinander verglichen. Die 14 Gew.-% Gele wiesen dabei eine Steifigkeit von ca. 2 kPa auf. Die Fluoreszenzaufnahmen und die statistische Auswertung sind in Abb. 27 dargestellt.

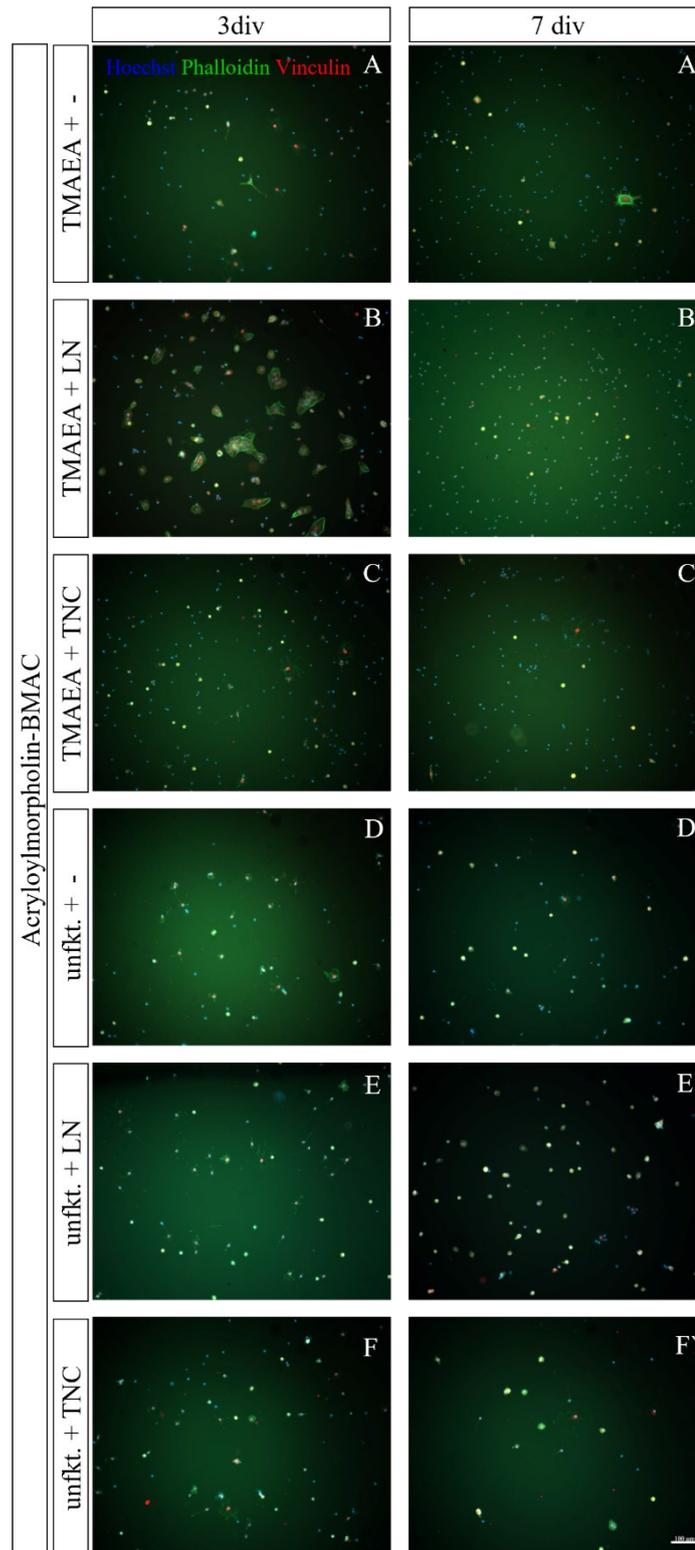


**Abb. 27:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen Hydrogelen mit unterschiedlichen Steifigkeiten. Die Bilder A und A' zeigen ein Hydrogel mit 2 kPa Steifigkeit nach 3 und 7 div und die Bilder B und B' zeigen ein Hydrogel mit 3 kPa Steifigkeit nach 3 und 7 div. Die Färbung wurde mit Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Phalloidin und Vinculin positiven Zellen ist in C und die statistische Auswertung der Hoechst positiven Zellen in D dargestellt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu$ m.

Die Abbildung zeigte erneut eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der gesamten Oberfläche der Hydrogele. Qualitativ waren in den Aufnahmen zwischen den beiden Bedingungen keine großen Unterschiede zu erkennen. Auch die statistische Auswertung der Zellen zeigte nur minimale Unterschiede zwischen den Konditionen (siehe Abb. 27, Graphen rechts). Die prozentualen Anteile der Zellen, welche fokale Adhäsion ausbildeten, waren bei beiden Steifigkeiten in etwa gleich groß sowohl nach 3 als auch nach 7 div. Mit ca. 25 - 30 % fielen diese allerdings sehr gering aus. Lediglich bei der Gesamtzahl an Zellen auf den Hydrogelen war ein Unterschied zu erkennen. Hierbei waren auf dem 14 Gew.-% Gel nach 3 div  $292 \pm 30$  Zellen/mm<sup>2</sup>, während auf dem 18 Gew.-% Gel lediglich  $102 \pm 29$  Zellen/mm<sup>2</sup> vorhanden waren. Nach 7 Tagen hingegen war die Anzahl der Zellen unter beiden Bedingungen nahezu identisch, sodass auf beiden Hydrogelen ca. 180 Zellen vorhanden waren. Hierbei nahm also die Zahl der Zellen auf dem weicheren Gel ab, während sie auf dem härteren Gel leicht zunahm. Bei einer Betrachtung der NSCs nach 7 Tagen schien die Steifigkeit keinen großen Einfluss auf die Adhäsion der Zellen zu haben. Allerdings konnte qualitativ durch Betrachtung der Morphologie der Zellen auch bei diesen Experimenten nur eine geringe Zahl differenzierter Zellen gefunden werden. Dies spricht weiterhin für Probleme bei der Kultivierung der NSCs, welche nicht durch die Änderung der Steifigkeit der Gele allein behoben werden konnten.

### 3.3.3 Einfluss von Proteinen und Wachstumsfaktoren auf die Kultivierung von NSCs

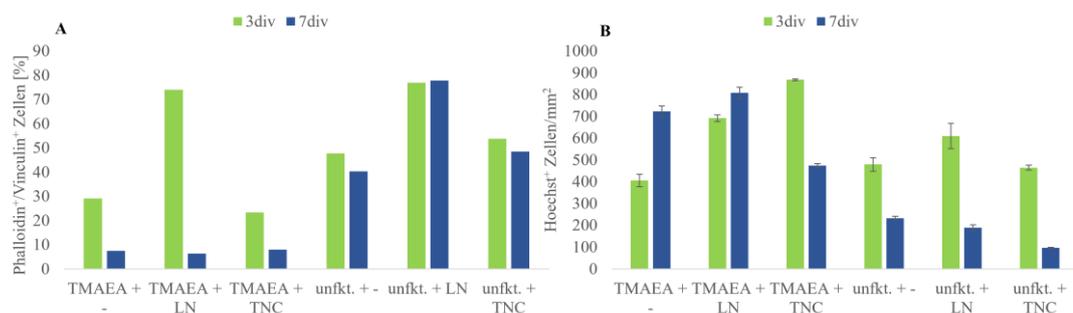
Proteine und Wachstumsfaktoren sind natürliche Bestandteile der extrazellulären Matrix und regulieren das Schicksal von Zellen über verschiedene Signalkaskaden. Eines der wichtigsten Bestandteile der ECM ist Laminin, ein Glykoprotein, welches einen wesentlichen Teil in fast allen Gewebearten bildet und eine wichtige Rolle für die biologische Aktivität von Zellen, wie z.B. Überlebensfähigkeit, Adhäsion, Migration oder Differenzierung der Zellen, spielt.<sup>[151]</sup> Laminin ist ein Heterotrimer bestehend aus  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ -Untereinheiten, welches über die Fähigkeit der Selbstassemblierung verfügt, an andere Matrixmoleküle binden und über Integrine und andere Rezeptoren mit den umliegenden Zellen interagieren kann. Ein weiteres wichtiges Glykoprotein der ECM ist Tenascin-C (TNC). Während es in geringen Mengen in allen Geweben aufzufinden ist, ist TNC hauptsächlich an Orten mit einer hohen Zellaktivität, wie z.B. Stammzellnischen, Sehnen und im CNS zu finden.<sup>[152]</sup> Weiterhin spielt TNC eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung von Geweben im Falle von Wundheilung oder Krebs. Tenascin-C ist ein Hexamer bestehend aus vier ausgeprägten Domänen und besitzt verschiedene molekulare Formen, welche durch Proteinmodifikation und alternatives Spleißen entstehen.<sup>[153]</sup> Dadurch ist TNC in der Lage mit einer Vielzahl an Komponenten in der ECM zu interagieren und so einen Einfluss auf verschiedene Prozesse wie z.B. Migration, fokale Adhäsion, Überlebensfähigkeit und Differenzierung von Zellen auszuüben. Zur Untersuchung des Einflusses von Proteinen auf die Kultivierung der NSCs wurde zur initialen Zellsuspension, welche anschließend auf die Hydrogele gegeben wurde, entweder Laminin oder TNC als Lösung hinzugegeben, sodass eine finale Konzentration von 5  $\mu\text{g/mL}$  entstand. Der Effekt der Proteine auf das Verhalten der NSCs wurde auf unfunktionalisierten und kationischen Hydrogelen untersucht und ist in Abb. 28 dargestellt.



**Abb. 28:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen (TMAEA, A-C) und unfunktionalisierten Gelen (unfkt., D-F) nach 3 (A-F) und 7 (A'-F') Tagen. Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (LN) (B/E) und Tenascin-C (TNC) (C/F) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Als Referenz wurden Hydrogele ohne Proteinzugabe verwendet (-) (A/D). Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

Auf den ersten Blick war qualitativ kein großer Unterschied zwischen den einzelnen Konditionen zu erkennen. Lediglich die Gele in Kombination mit Laminin zeigten Unterschiede. Das kationische Gel (B) zeigte ein Aggregationsverhalten, bzw. eine Netzwerkbildung der Zellen untereinander, nach 3 div. Die Änderung in der Zellmorphologie sprach für eine verbesserte Differenzierung der Zellen unter diesen Bedingungen. Genaue Aussagen über die Differenzierung konnten an dieser Stelle nicht getroffen werden und müssten mit Differenzierungsmarkern untersucht werden. Voraussetzung für die Differenzierung der Zellen ist eine ausreichende Überlebensfähigkeit und Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche. Bei den unfunktionalisierten Hydrogelen hingegen trat diese Interaktion der Zellen untereinander nicht auf. Dennoch schien hier die Adhäsion im Vergleich zu den Konditionen mit TNC oder ohne Proteine verbessert zu sein. Um eine quantitative Aussage zu treffen, wurden die verwendeten Zellmarker statistisch ausgewertet. Die statistische Auswertung ist in Abb. 29 dargestellt. Die verwendeten Zellmarker Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) stellten dabei die Anzahl der adhären Zellen dar, während Hoechst-positive Zellen die Gesamtzahl der Zellen darstellten. Die Auswertung der adhären Zellen (A) zeigte deutlich, dass lediglich bei den Hydrogelen mit Laminin und in gewissem Maße bei dem unfunktionalisierten TNC-Gel eine verbesserte Adhäsion der Zellen stattfand. Die prozentuale Anzahl adhären Zellen lagen bei dem kationischen Laminin-Gel bei 74 % und bei dem unfunktionalisierten Laminin-Gel bei 77 %. Das unfunktionalisierte TNC-Gel hingegen wies einen Anteil von adhären Zellen von 54 % auf. Dennoch zeigte die statistische Auswertung deutlich, dass die Adhäsion bei fast allen Konditionen nach 7 div deutlich zurückging. Speziell bei den kationischen Hydrogelen lag diese nach 7 div bereits unter 10 %. Die Auswertung der Hoechst positiven Zellen zeigte, dass bei den kationischen Hydrogelen eine höhere Zahl an Zellen/mm<sup>2</sup> vorlag. Die Verwendung von Proteinen führte nach 3 div zu einer leichten Erhöhung von  $102 \pm 29$  Zellen/mm<sup>2</sup> (ohne Proteine) hin zu ca.  $173 \pm 16$  Zellen/mm<sup>2</sup> für die Laminin-Gele und  $217 \pm 4$  Zellen/mm<sup>2</sup> für die TNC-Gele. Bei den kationischen TNC-Gelen sank die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div auf  $119 \pm 9$ , während die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> bei dem kationischen Laminin-Gel nochmal leicht auf  $202 \pm 26$  anstieg. Bei den unfunktionalisierten Hydrogelen war ebenfalls eine leichte Erhöhung der Gesamtzahl an Zellen auf den Laminin-Gelen im Vergleich zu den unfunktionalisierten Gelen ohne Proteinzugabe

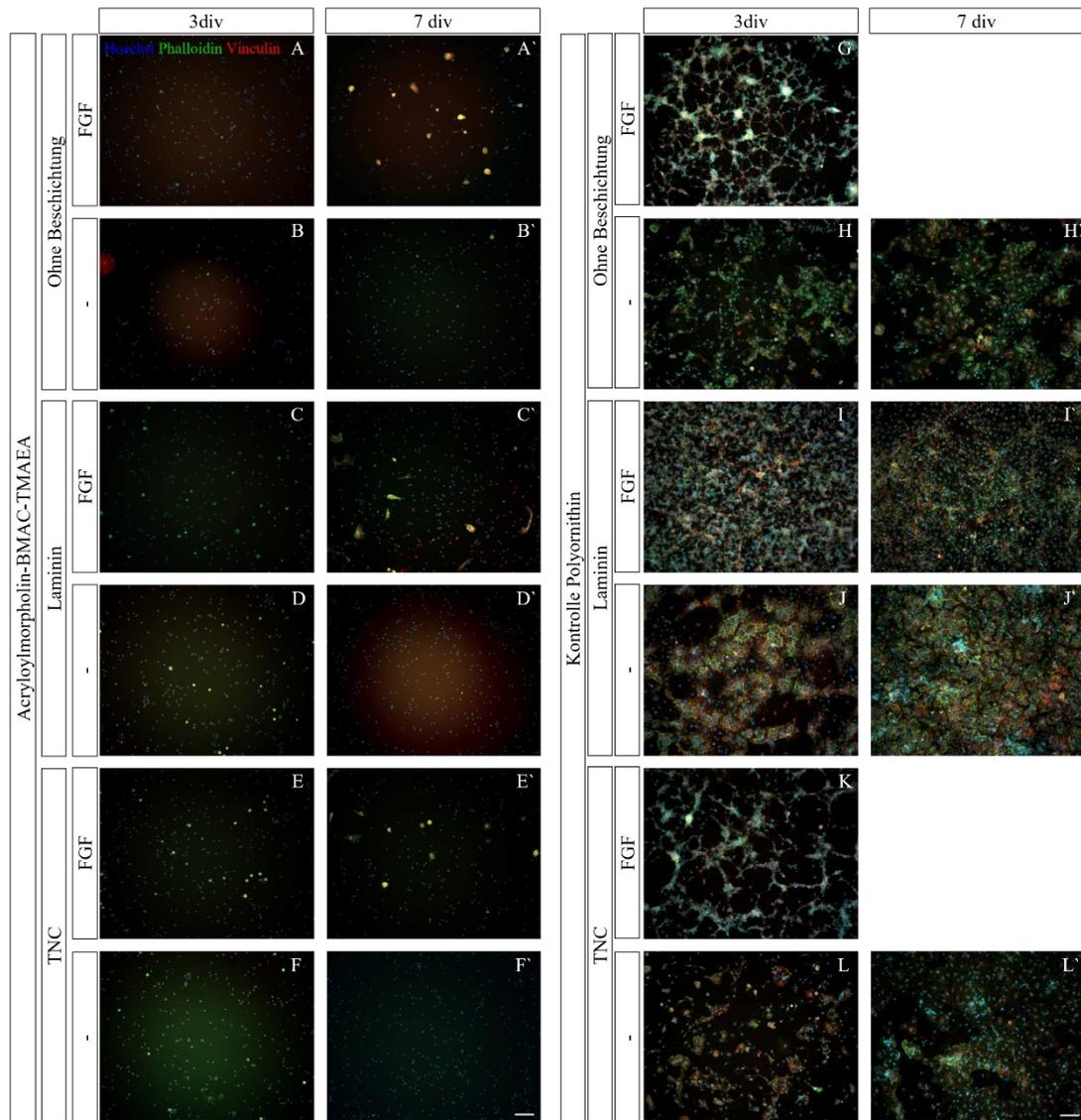
( $153 \pm 58$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div mit Laminin,  $120 \pm 31$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div ohne Proteine) zu erkennen, während sich das TNC-Gel nicht sehr stark von dem Gel ohne Proteinzugabe unterschied ( $116 \pm 11$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div mit TNC). Hier sank allerdings bei allen Konditionen die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div deutlich ( $58 \pm 8$  Zellen/mm<sup>2</sup> ohne Proteine,  $47 \pm 14$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit Laminin,  $24 \pm 3$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit TNC). Die Betrachtung der Morphologie der Zellen (siehe Abb. 28, verglichen mit der Kontrolle in Abb. 24) zeigte deutlich, dass die Bedingungen für die NSCs immer noch nicht optimal waren und die Differenzierung der Zellen nur in geringem Maße stattfand. Dies wäre durch die Ausprägung eines Netzwerks zwischen den Zellen auf Grund der Differenzierung in Neuronen deutlich zu sehen. Dennoch zeigten diese Experimente, dass die Adhäsion und Viabilität von Zellen durch Zugabe von Proteinen verbessert werden konnte und dieser Effekt deutlich stärker auf den kationischen Gelen ausgeprägt war. Die unfunktionalisierten Hydrogele als Negativkontrolle zeigten über die Dauer der Experimente eine Abnahme der adhärten Zellen. Laminin ist dafür bekannt hauptsächlich die Adhäsion und Viabilität der NSCs zu verbessern, während TNC einen großen Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum der Neurite der NSCs nimmt. Diese unterschiedlichen Effekte auf die Kultivierung konnten durch dieses Experiment bestätigt werden.



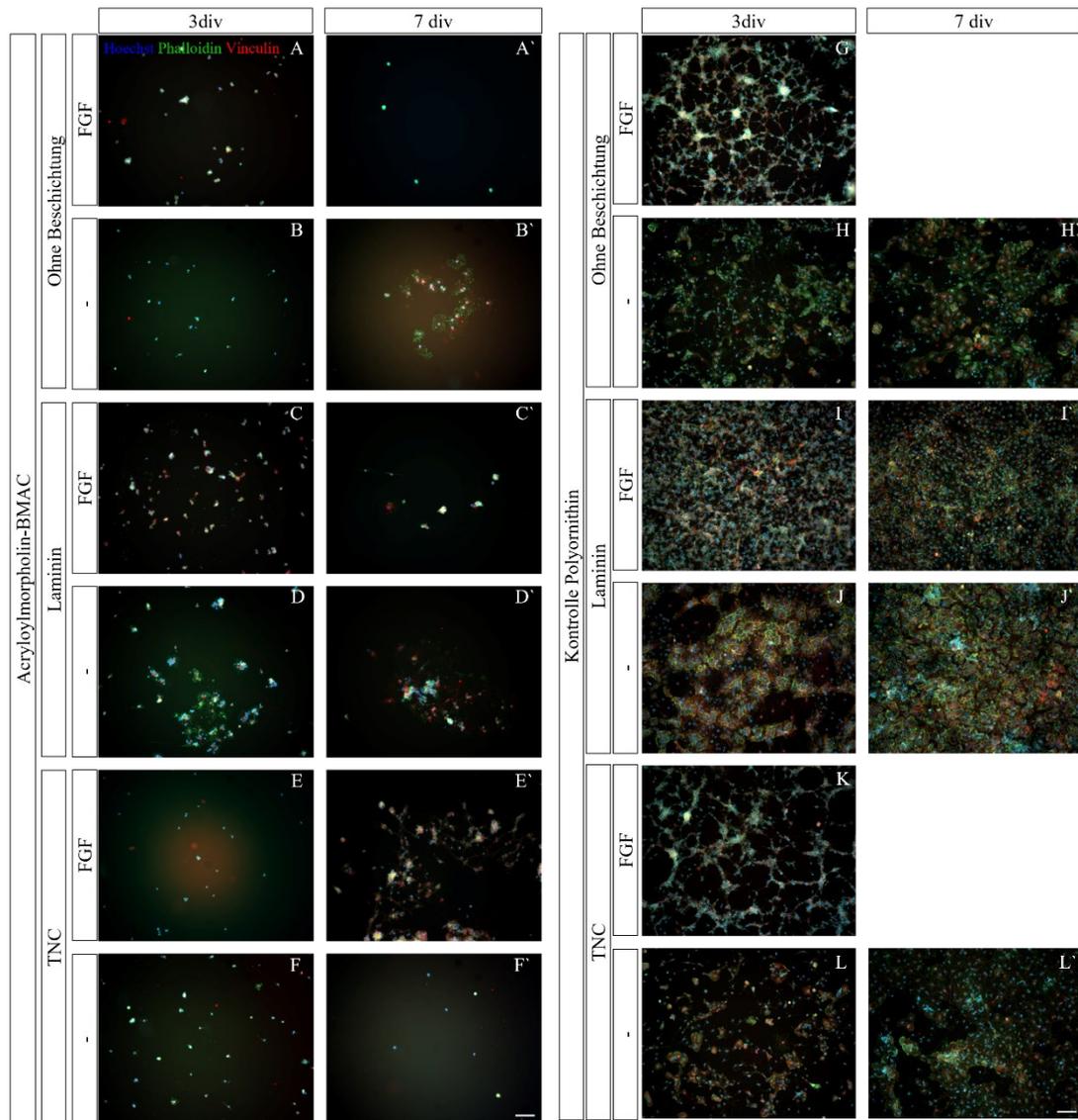
**Abb. 29:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzmarker Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen in Kombination mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und ohne Proteine (-) nach 3 und 7 div.

Zusätzlich zu den Proteinen der ECM kann die Zugabe eines Wachstumsfaktors (WFs) zu einer Erhöhung der Überlebensfähigkeit der NSCs führen. Auch WFs sind Proteine und können unter anderem die Proliferation, aber auch die Differenzierung der Zellen fördern, wodurch die Kultivierung der Zellen auf Hydrogelen verbessert werden könnte. Diese WFs können an Rezeptoren in der Zellmembran binden und dadurch intrazelluläre Prozesse in Gang setzen oder fördern. In dieser Arbeit wurde

ein Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) verwendet und in Kombination mit den beiden ECM-Proteinen Laminin und TNC untersucht. Proteine und WFs steuern unter anderem die Embryonalentwicklung sowie die Differenzierung, Erhaltung und Regeneration von Gewebe und haben dadurch einen großen Einfluss auf das Schicksal von Zellen. Der Wachstumsfaktor wurde, wie auch die Proteine, als lösliche Komponente in einer finalen Konzentration von 20 ng/mL mit Heparin als Cofaktor hinzugegeben. Als Referenz wurden hier erneut Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin genutzt. Die Fluoreszenzaufnahmen der kationischen Hydrogele sind in Abb. 30 dargestellt, während die unfunktionalisierten Gele in Abb. 31 dargestellt sind. Aus den Aufnahmen der Kontrollexperimente mit FGF war deutlich zu erkennen, dass die WFs einen enormen Einfluss auf das Überleben und die Differenzierung der NSCs hatten. Bei der Verwendung von FGF waren die Zellkulturschalen bereits nach 3 div vollständig mit Zellen bedeckt und bildeten ein Netzwerk untereinander aus. Dieses war bei den Experimenten ohne FGF nicht so stark ausgeprägt. Hierbei stach vor allem die Kombination von Laminin mit FGF heraus, bei welcher nahezu keine freie Stelle auf der Zellkulturschale zu erkennen war. Nach 7 div war bei allen Bedingungen ohne FGF ein Anstieg der Zellzahl/mm<sup>2</sup> und der Interaktionen untereinander zu erkennen. Die Experimente auf kationischen Hydrogelen ohne FGF hingegen zeigten keinerlei bis wenig Zell-Zell-Interaktionen und viele Zellen wiesen eine eher runde Morphologie auf. Bei den Experimenten mit FGF waren nach 7 Tagen kleinere Zellaggregate zu sehen, welche für eine Verbesserung der Zellviabilität auf den kationischen Hydrogelen sprachen. Verglichen mit den kationischen Gelen waren auf den unfunktionalisierten Hydrogelen eine deutlich verbreiterte Morphologie der Zellen zu sehen. Diese traten nicht ausschließlich im Zusammenhang mit FGF auf und konnten daher nicht auf die WFs zurückgeführt werden. Die Zellmorphologie sprach dafür, dass die Zellen in diesen Experimenten besser auf den unfunktionalisierten Gelen adhärten und differenzierten. Speziell in Kombination mit dem Protein TNC wiesen die Zellen nach 7 div ein ausgeprägtes Netzwerk zwischen den Zellen als Hinweis auf eine signifikante Differenzierung auf. Bei der Verwendung von Laminin mit FGF trat diese Ausbildung nur in geringem Maße auf.



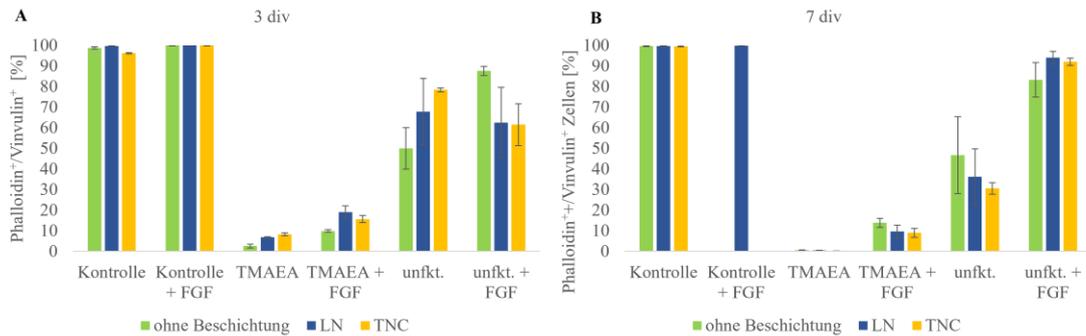
**Abb. 30:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen Hydrogelen (A-F) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (G-L) nach 3 (A-L) und 7 div (A'-L'). Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (LN) (C/D/I/J) und Tenascin-C (TNC) (E/F/K/L) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Weiterhin wurde eine Kombination aus Proteinen und den Wachstumsfaktoren FGF (A/C/F/G/I/K) (20 ng/mL) untersucht. Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.



**Abb. 31:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A-F) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (G-L) nach 3 (A-L) und 7 div (A'-L'). Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (C/D/I/J) und Tenascin-C (TNC) (E/F/K/L) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Weiterhin wurde eine Kombination aus Proteinen und den Wachstumsfaktoren FGF (A/C/F/G/I/K) (20 ng/mL) untersucht. Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

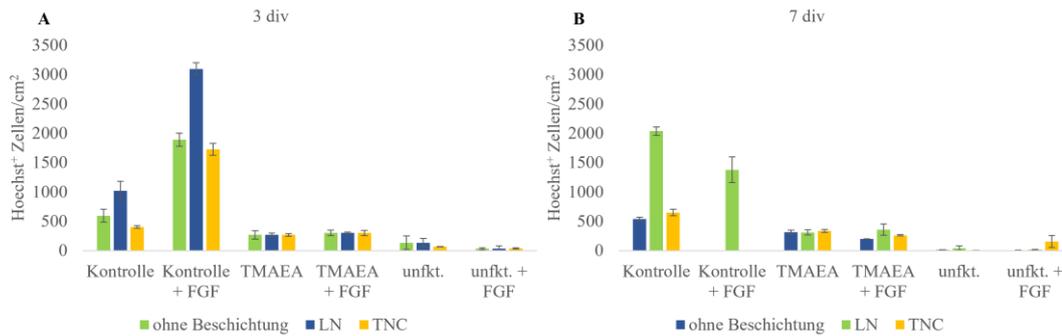
Die statistischen Auswertungen der Fluoreszenzaufnahmen sind in Abb. 32 und Abb. 33 dargestellt. Die Adhäsion auf den Kontrollexperimenten lag in allen Fällen bei nahezu 100 % für beide Zeitpunkte, wohingegen die Adhäsion aller kationischen Hydrogele nach 3 div bei unter 20 %, die Adhäsion der unfunktionalisierten Hydrogele ohne FGF zwischen 30 und 50 % und mit FGF zwischen 80 und 95 % lagen. Nach 7 div lag die Adhäsion der kationischen Gele ohne FGF bereits unter 10 %, während die Adhäsion mit FGF bei ca. 10 % lag. Bei den unfunktionalisierten Gelen sank die Adhäsion nach 7 div auf 30 - 45 %, wobei ein umgekehrter Trend zu den Gelen nach 3 div deutlich wurde. Während die adhärten Zellen ohne Zugabe

von Proteinen in etwa gleichblieben, nahm die Zahl der adhärirten Zellen der beiden Gele mit den Proteinen stärker ab. Lediglich bei den unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit FGF war eine Steigerung der adhärirten Zellen auf bis zu 95 % sichtbar. Insgesamt nahm die Adhäsion bei den unfunktionalisierten Gelen unter Verwendung von FGF mit fortlaufender Zeit zu, während bei den Gelen ohne FGF die Adhäsion abnahm.



**Abb. 32:** Statistische Auswertung der Phalloidin- und Vinculin-Marker der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und in Kombination mit den Wachstumsfaktoren FGF nach 3 und 7 div.

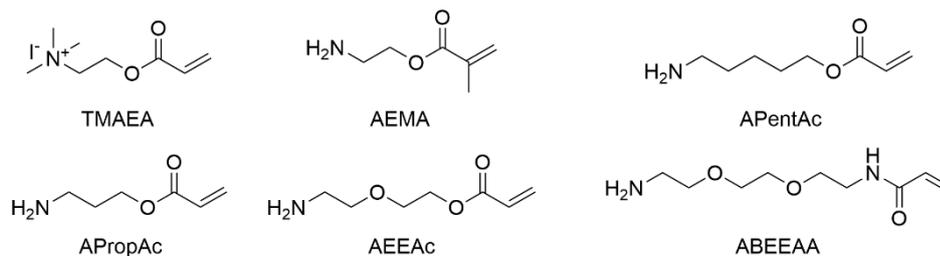
Eine Betrachtung der absoluten Zahlen an Zellen auf den Hydrogelen zeigte, dass deutlich mehr Zellen auf den Kontrollexperimenten vorhanden waren ( $596 \pm 112$  Zellen/ $\text{mm}^2$  für die Kontrolle ohne weitere Beschichtung,  $3096 \pm 103$  Zellen/ $\text{mm}^2$  für die Kontrolle mit Laminin und FGF). Weiterhin sorgte die kationische Gruppe im Vergleich zu den unfunktionalisierten Gelen für eine erhöhte Zahl an Zellen durch die Interaktion der kationischen Gruppe mit der negativ geladenen Membran der Zellen ( $303 \pm 48$  Zellen/ $\text{mm}^2$  für kationische Gele mit FGF nach 3 div,  $32 \pm 14$  Zellen/ $\text{mm}^2$  für unfunktionalisierte Gele mit FGF nach 3 div). Auf den unfunktionalisierten Gelen hingegen waren die wenigsten Zellen vorhanden. Allerdings zeigten hier die meisten dieser Zellen Adhäsion auf dem Hydrogel. Auch die Verwendung von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Proteinen zeigte nur einen geringen positiven Effekt auf die Kultivierung der NSCs auf den Hydrogelen. Obwohl die Zugabe eines WFs die Proliferation der Zellen stark erhöhte und damit die Viabilität der NSCs deutlich verbesserte, reichte dies selbst in Kombination mit den Proteinen Laminin oder TNC nicht aus, um NSCs auf den Hydrogelen zu kultivieren. In einem nächsten Schritt wurden deshalb die einzelnen Komponenten des Hydrogelsystems untersucht.



**Abb. 33:** Statistische Auswertung des Hoechst-Markers der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und in Kombination mit den Wachstumsfaktoren FGF nach 3 und 7 div.

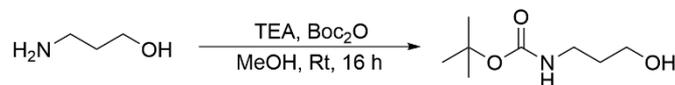
### 3.3.4 Einfluss verschiedener kationischer Monomere auf die Kultivierung von NSCs

Da es sich bei zwei der drei Komponenten des Präpolymers (**AMor** und **BMAC**) um Monomere handelt, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit Zellen Anwendung fanden, wurde der Fokus zunächst auf das kationische Monomer **TMAEA** gelegt.<sup>[154,155]</sup> Auch kationische Monomere wurden bereits häufig zur Kultivierung von Zellen eingesetzt. Zu den bekanntesten zählen Beschichtungen mit Poly-L-Lysin oder Polyornithin. Beide Polymere besitzen in den Seitenketten primäre Amine, welche bei einem physiologischen pH-Wert von 7.4 zu einem Teil protoniert vorliegen und dadurch eine kationische Ladung tragen. Weiterhin wurde von SALLOUH und JAROCKI *et al.* ein Polymer, welches das kationische Monomer Aminoethylmethacrylat (AEMA) beinhaltet, zur Kultivierung von NSCs eingesetzt.<sup>[113]</sup> Durch die partielle Protonierung bei pH = 7.4 liegen variable Ladungen vor, welche über alle primären Amine verteilt liegen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten kationischen Gruppe **TMAEA** hingegen handelt es sich um ein quartäres Ammoniumion, weshalb hierbei die Ladung statisch und dauerhaft vorliegt. Diese dauerhafte elektrostatische Interaktion mit der Zellmembran über die Dauer der Experimente von 7 div könnte zu einer ungewünschten negativen Beeinflussung der Zellen während der Kultivierung geführt haben. Um dies zu überprüfen, wurden fünf Monomere mit primären Aminen als Alternative zu **TMAEA** untersucht. Bei den Aminen handelt es sich um AEMA, Aminopropylacrylat (APropAc), Aminopentylacrylat (APentAc), Aminoethoxyethylacrylat (AEEAc) und Amino-bis-ethoxyethylacrylamid (ABEEAA), welche in Abb. 34 dargestellt sind. Gleichzeitig sollte dabei der Effekt eines längeren Spacers zwischen Polymerrückgrat und Amin untersucht werden.



**Abb. 34:** Monomerstrukturen der primären Amine als Alternative zu **TMAEA**.

Während AEMA kommerziell erhältlich ist, mussten die anderen aminhaltigen Monomere über eine zweistufige Synthese hergestellt werden. In allen Fällen wurde dabei das Amin (bzw. eines der Amine im Falle von ABEEAA) zunächst mit einer Boc-Schutzgruppe (siehe Abb. 35) geschützt, bevor diese dann wie bei der Synthese von PEGDA-3500 (vgl. Kapitel 3.1.1, S. 23ff) mit Acryloylchlorid in einer Schotten-Baumann-Reaktion zu den entsprechenden Monomeren umgesetzt wurden. Alle Amine wurden mit denselben Bedingungen geschützt oder als bereits geschütztes Amin verwendet. Bei der Herstellung von ABEEAA konnte selbst bei Verwendung von 0.33 Äquivalenten an  $\text{Boc}_2\text{O}$  nur die beidseitig geschützte Variante isoliert werden, weshalb dieses in der weiteren Untersuchung nicht betrachtet wurde (siehe Abb. A 22).



**Abb. 35:** Schützung der Amine mit einer Boc-Schutzgruppe am Beispiel von 3-Aminopropanol.

Alle erhaltenen Produkte wurden mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Massenspektrometrie untersucht und im Nachfolgenden für die Herstellung von Polymeren verwendet. Die entsprechenden  $^1\text{H-NMR}$  Spektren und Massenspektren der Boc-geschützten Amine und der über die Schotten-Baumann-Reaktion hergestellten Monomere sind im Anhang zu finden. Die Polymere wurden analog zu den anderen Präpolymeren hergestellt und die Daten der Polymere sind in Tabelle 3 dargestellt. Aus den Monomeren konnten lediglich die Polymere, welche die Monomere AEMA, APropAc und AEEAc enthielten, hergestellt werden, weshalb nur diese Polymere nachfolgend aufgeführt wurden. Bei den anderen Monomeren konnten keine Polymere isoliert werden, weshalb diese nicht weiterverfolgt wurden. Bei den synthetisierten Monomeren war ein deutlich geringerer Einbau von **BMAC** im Vergleich zu **P1 - P4** zu erkennen. Hierbei schien ein Problem bei der Copolymerisation dieser Boc-geschützten Monomere mit dem **BMAC** und **AMor** aufzutreten, welches nicht weiter untersucht wurde. Die aminhaltigen Monomere

hingegen konnten problemlos in größeren Mengen (hier bis zu 30 mol%) in das Polymer eingebaut werden.

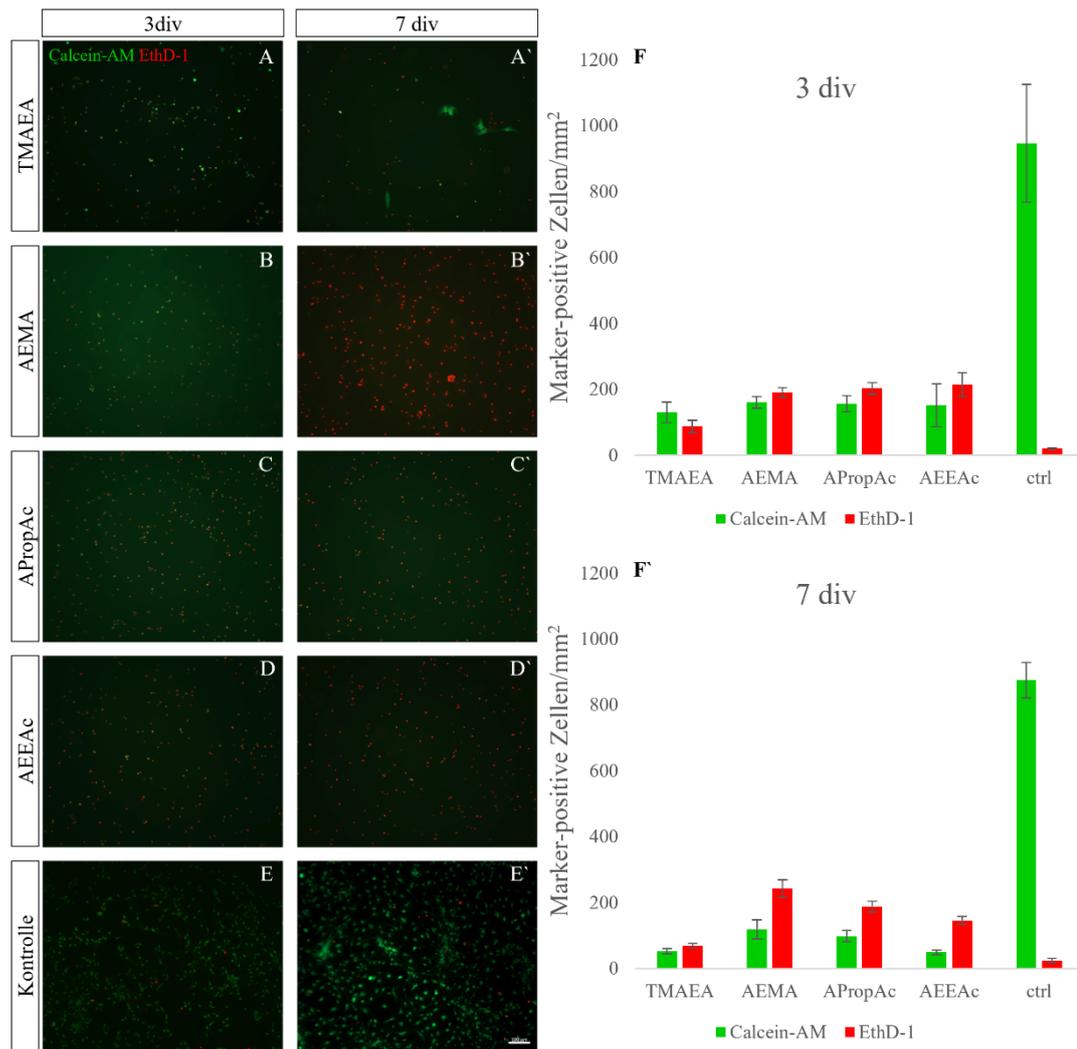
**Tabelle 3:** Daten der aminhaltigen Polymere.

Polymer	Struktur	Komposition (theor.)	Komposition (NMR)	$b_{\text{BMAC}}^{\text{a}}$ [mmol/g] ([mol%])
<b>P4</b>	AMor-BMAC-AEMA	66:4:30	70.4:3.6:26	0.46 (3.6)
<b>P5</b>	AMor-BMAC-APropAc	66:4:30	70.1:1.9:27.9	0.20 (1.4)
<b>P6</b>	AMor-BMAC-AEEAc	66:4:30	66:2.2:31.8	0.11 (0.8)

a) Bestimmt durch Ellman's Assay mittels UV/Vis-Spektroskopie; b) mol% Angabe berechnet durch Vergleich von theoretischem und praktischem Gew.-% (mg BMAC pro g Polymer).

Trotz der geringen Thiolkonzentrationen wurden die Polymere zur Herstellung von Hydrogelen verwendet. Dazu wurden erneut 18 Gew.-% Hydrogele hergestellt und diese anschließend rheologisch untersucht. Das Hydrogel mit **P4** als Polymer wies dabei eine sehr hohe Steifigkeit von ca. 18 kPa auf, während die anderen beiden Hydrogele mit ca. 2.3 kPa deutlich weicher waren. Dies lag hauptsächlich an der geringeren Vernetzung, verursacht durch die geringe Thiolkonzentration in **P5** und **P6**. Die Zellexperimente der aus den Polymeren **P4 - P6** hergestellten Hydrogele wurden mit den Ergebnissen des Hydrogels **G2**, welches **TMAEA** als kationische Gruppe verwendet, verglichen. Hierbei wurde bei allen Hydrogelen dieselbe Konzentration der kationischen Gruppe von 0.53  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel verwendet. Dazu wurden die kationischen Polymere bei der Herstellung mit einem unfunktionalisierten Polymer **P1** gemischt und anschließend vernetzt. Da die NSCs bisher nur runde Morphologien aufwiesen, welche auf eine schlechte Adhäsion und dadurch fehlende Differenzierung zurückzuführen war, wurden die Gele nun anhand eines Zellviabilitäts-Assays untersucht. Die Viabilität der Zellen steht in direktem Zusammenhang mit der Adhäsion der Zellen auf Oberflächen. Ohne Adhäsion können Zellen nicht lange überleben und sterben, wodurch auch keine Differenzierung der NSCs stattfindet. Hierzu wurde ein Zellviabilitäts-Assay mit Calcein-AM als Marker für lebende Zellen (grüne Farbe) und Ethidium Homodimer-1 (EthD-1, rote Farbe) als Marker für tote Zellen verwendet und die Zellen nach 3 und 7 div betrachtet (siehe Abb. 36). Die Abbildung zeigt deutlich, dass viele tote Zellen bereits nach 3, aber auch 7 div, vorhanden und keine großen Unterschiede zwischen den Konditionen mit verschiedenen kationischen Gruppen

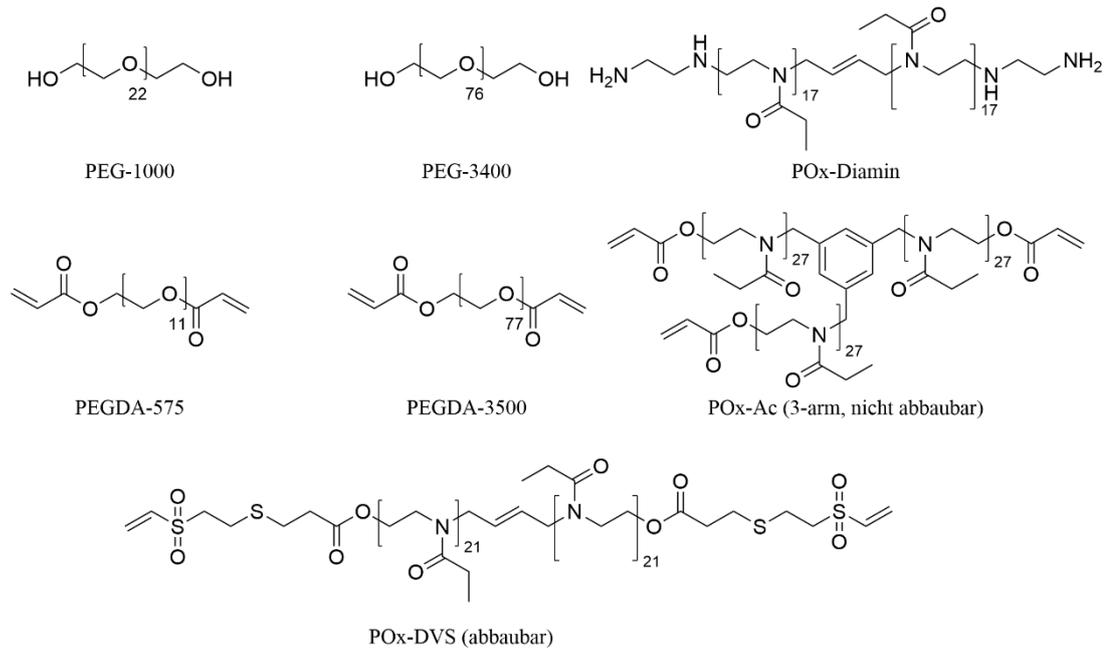
ersichtlich waren. Die statistische Auswertung zeigte, dass bei allen Bedingungen nach 3 div das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ca. 50 % betrug. Lediglich das Hydrogel **G2** mit **TMAEA** als kationische Gruppe besaß eine leicht erhöhte Zahl lebender Zellen ( $130 \pm 89$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $88 \pm 52$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, ca. 60 % Zellviabilität), während bei den anderen Gelen die toten Zellen/mm<sup>2</sup> etwas stärker vertreten waren (AEMA:  $160 \pm 49$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $190 \pm 38$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, APropAc:  $156 \pm 70$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $203 \pm 50$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, AEEAc:  $156 \pm 183$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vs.  $215 \pm 101$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>). Nach 7 div war bei allen Bedingungen die Zahl der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> stark gesunken, sodass die Anzahl der toten Zellen/mm<sup>2</sup> stark überwiegte. Hierbei zeigte erneut **TMAEA** die beste Verteilung mit 43 % Zellviabilität (**TMAEA**:  $52 \pm 23$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> und  $69 \pm 18$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, AEMA:  $119 \pm 82$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> und  $243 \pm 75$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, APropAc:  $98 \pm 49$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> und  $188 \pm 47$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>, AEEAc:  $49 \pm 19$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> und  $146 \pm 35$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>). Auffällig war die deutlich geringere Anzahl an Gesamtzellen bei **G2** im Vergleich zu den anderen kationischen Hydrogelen. Verglichen mit der Kontrolle auf Polyornithin-beschichteten Zellkulturschalen war die Gesamtzahl der Zellen auf allen Hydrogelen deutlich geringer ( $966 \pm 47$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div,  $900 \pm 36$  Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div). Auch war die Viabilität der Zellen auf der Kontrolle mit 98 % deutlich besser. Eine Änderung der kationischen Monomere führte nicht zu einer Verbesserung der Viabilität und Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen. Selbst AEMA, welches bereits für die Kultivierung der NSCs eingesetzt wurde, zeigte keine verbesserte Zellviabilität, weshalb das Problem bei der Kultivierung nicht durch die kationische Gruppe hervorgerufen wurde. Als nächstes wurde der Einfluss des Vernetzers auf die Kultivierung der NSCs untersucht.



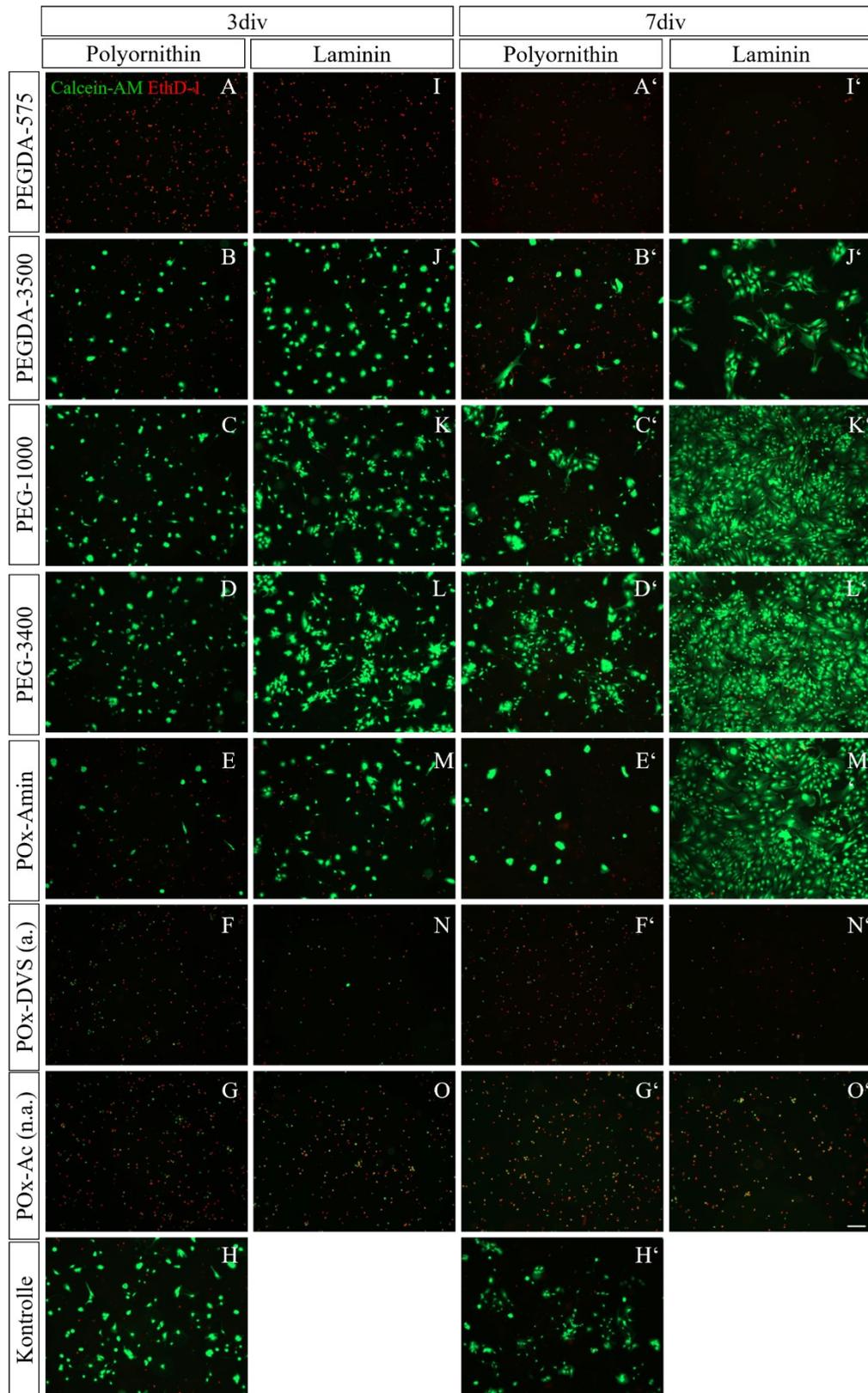
**Abb. 36:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Gruppen (A-D) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (E) nach 3 (A-E) und 7 div (A'-E'). Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden die Marker Calcein-AM (lebende Zellen) und Ethidium Homodimer-1 (tote Zellen) verwendet. Statistische Auszählung der Marker-positiven Zellen nach 3 und 7 div (F/F'). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.5 Untersuchung der Zelltoxizität verschiedener Vernetzer

Standardmäßig wurde PEGDA-3500 zur Vernetzung der Präpolymere verwendet. Bei der Vernetzung der Präpolymere mittels Michael-Addition findet eine vollständige Vernetzung statt, wenn jedes Thiol am Polymer auf einen Michael-Akzeptor des Vernetzers trifft. Dies ist praktisch nicht möglich, da bei fortschreitender Vernetzung aus der eingesetzten Flüssigkeit ein Gel wird und dadurch die freie Diffusion eingeschränkt wird. Zusätzlich ist es notwendig, dass der bifunktionelle Vernetzer zwei Thiole für eine Michael-Addition findet. Diese Reaktion kann intermolekular oder intramolekular stattfinden. Bei der intramolekularen Reaktion findet keine weitere Vernetzung des Gels statt. Da PEGDA-3500 als eine lineare Kette vorliegt und ein Molekulargewicht von 3500 g/mol im Durchschnitt besitzt, ist die räumliche Entfernung der Thiole am Präpolymer entscheidend. So kann es vorkommen, dass ein Vernetzer einseitig mit einem Thiol reagiert, aber in ausreichender Nähe keine weiteren Thiole vorhanden sind, um eine weitere Michael-Addition durchzuführen. Da hierdurch keine vollständige Vernetzung stattfinden kann, liegen im Hydrogel immer freie Thiole und Endgruppen des Vernetzers vor, welche potenziell toxisch auf die Zellen wirken können. Auch besteht die Möglichkeit, dass ein Vernetzer gar keine Reaktion mit einem Thiol eingeht, sodass dieses innerhalb des Gels als freie Komponente vorliegt und ebenfalls mit den Zellen interagieren kann. Es wurde die Annahme getroffen, dass sich ein im Medium gelöster Vernetzer toxisch auf Zellen auswirken könnte. Das toxische Verhalten ist dabei abhängig von der Konzentration, der Endgruppe und des Molekulargewichts des Vernetzers. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass Zellen unterschiedlich auf Endgruppen wie z.B. Acrylate, Divinylsulfone und Maleimide reagieren, wohingegen Alkohole, Amine und Thiole keine negativen Auswirkungen auf Zellen haben, da sie in der Natur häufig vorkommen.<sup>[156]</sup> Um die Konzentration an freien Vernetzern möglichst gering zu halten, wurden lediglich 0.4 Äquivalente des Vernetzers bezogen auf die Thiole am Polymer verwendet, sodass maximal eine Vernetzung von 80 % auftreten kann. Untersuchungen von PÄTZOLD haben gezeigt, dass dadurch die mechanischen Eigenschaften der Gele nicht beeinträchtigt werden.<sup>[115]</sup> Im nachfolgenden Experiment wurden insgesamt sieben verschiedene, polymere Vernetzer mit unterschiedlichen Monomereinheiten, Endgruppen und Längen untersucht. Diese sind in Abb. 37 dargestellt.



**Abb. 37:** Strukturen der polymeren Vernetzer mit unterschiedlichen Monomereinheiten, Endgruppen und Längen. Zur Untersuchung der Endgruppen wurden Alkohol-, Amin-, Acrylat- und Divinylsulfon-Endgruppen verwendet. Es wurden die zwei verschiedenen Monomere PEG und 2-Ethylloxazolin, sowie unterschiedliche molare Massen von 575 bis 8000 g/mol untersucht. PEG-1000, PEG-3400 und PEGDA-575 wurden als kommerziell erhältliche Chemikalien verwendet, während alle anderen Vernetzer zunächst hergestellt wurden. Die Oxazolin Vernetzer wurden freundlicherweise von FLORIAN PÄTZOLD zur Verfügung gestellt. Ein ausgestanztes Gel mit einem Durchmesser von 13 mm besaß nach der Herstellung ein Volumen von 113  $\mu\text{L}$ . Dies entsprach einer Menge an PEGDA-3500 von 10 - 12 mg, je nach Konzentration der Thiole des Präpolymers. Um die Experimente identisch zu halten, wurden hierbei je 10 mg pro Vernetzer eingesetzt. Die Zellen wurden auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen kultiviert und für ca. 1 h fand zunächst die Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche statt. Anschließend wurden die Vernetzer, welche in Medium gelöst wurden, hinzugegeben. Zusätzlich wurden die Vernetzer in Kombination mit dem Protein Laminin kultiviert, um einen möglichen Vernetzer für die Zellexperimente zu identifizieren. Nach 3 und 7 div wurde die Zellviabilität, wie auch bereits zuvor beschrieben, mit Calcein-AM und EthD-1 untersucht (siehe Abb. 38).

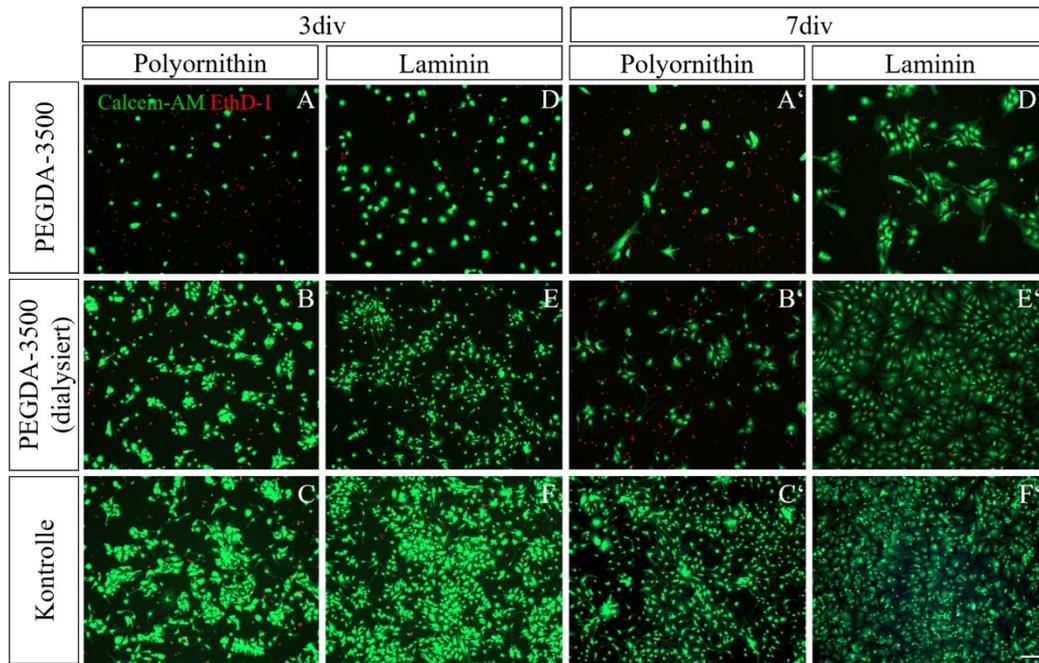


**Abb. 38:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit den Vernetzern PEGDA-575 (A), PEGDA-3500 (B), PEG-1000 (C), PEG-3400 (D), POx-Amin (E), POx-DVS (F, abbaubar (a.)) und POx-Ac (G, nicht abbaubar (n.a.)) und zusätzlich in Kombination mit Laminin (I-O) nach 3 (A-O) und 7 div (A'-O'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (H/H'). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

Als Positiv-Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet, während als Negativ-Kontrolle PEGDA-575 verwendet wurde. Dieses liegt mit einem Molekulargewicht von 575 g/mol unterhalb der Ausschlussgrenze für Zellen und kann daher von diesen aufgenommen werden. Zusätzlich besitzt PEGDA-575 Acrylatgruppen, welche toxisch auf Zellen wirken. Wie in Abb. 38 (A/I) zu erkennen, lagen hier bereits nach 3 div ausschließlich tote Zellen vor. Auch durch die Zugabe von Laminin konnte die Zellviabilität nicht verbessert werden. Eine Erhöhung des Molekulargewichts auf 3500 g/mol (PEGDA-3500, B/J) hingegen zeigte eine deutliche Verbesserung der Zellviabilität nach 3 div ( $36 \pm 9$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Allerdings überwog hier immer noch die Anzahl der toten Zellen/mm<sup>2</sup> ( $105 \pm 16$  tote Zellen/mm<sup>2</sup>). Eine Zugabe von Laminin konnte die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $123 \pm 23$  erhöhen, während die Anzahl der toten Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $44 \pm 14$  abnahm. Eine längere Kultivierung von 7 div (B/J) statt 3 div hatte eine leichte Erhöhung der Gesamtzahl der Zellen/mm<sup>2</sup> zu Folge (ca. 140 Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div und ca. 170 Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div). Während die Zahl der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> bei der Kultivierung ohne Laminin abnahmen ( $26 \pm 8$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>), nahm die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> bei der Kultivierung mit Laminin zu ( $164 \pm 28$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Der Einsatz einer Alkoholendgruppe im Vergleich zu der Acrylatendgruppe zeigte bei PEG-3400 (D/L) nochmal eine deutliche Verbesserung der Zellviabilität. Mit  $134 \pm 23$  lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div ohne Laminin und  $265 \pm 46$  lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> mit Laminin waren erstmals vergleichbare Zahlen mit der Kontrolle (H,  $122 \pm 52$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>) aufgetreten. Auch die kürzere Variante in Form von PEG-1000 (C/K) zeigte eine gute Zellviabilität mit  $113 \pm 24$  lebenden Zellen/mm<sup>2</sup>. Ein enormer Anstieg der Zellzahl auf über 760 lebende Zellen/mm<sup>2</sup> in Kombination mit Laminin (K/L) war nach 7 div für beide PEG Vernetzer zu sehen. Die Polyoxazolin Vernetzer (E-G und M-O) hingegen zeigten nach 3 div keine gute Zellviabilität unabhängig der Endgruppe (POx-Amin:  $30 \pm 11$ , POx-DVS:  $14 \pm 4$ , POx-Ac:  $14 \pm 12$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Die Zugabe von Laminin und auch eine längere Kultivierungszeit sorgte bei POx-Amin für eine Erhöhung der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $82 \pm 23$  nach 3 div, bzw.  $530 \pm 67$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div. Bei den Vernetzern POx-DVS und POx-Ac hingegen war keine Änderung der Zellviabilität mit Zugabe von Laminin oder einer Erhöhung der Kultivierungszeit aufgetreten. Diese Experimente zeigten, dass die Struktur der Vernetzer, die Endgruppe und auch das

Molekulargewicht des Vernetzers einen enormen Einfluss auf die Viabilität von Zellen ausübten. Acrylat- und Divinylsulfonendgruppen wirkten in diesen Experimenten deutlich toxischer auf die Zellen als Hydroxy- oder Aminendgruppen. Dies konnte durch den Vergleich von PEG-3400 und PEGDA-3500 bestätigt werden. Die Verwendung von Vernetzern mit einem Molekulargewicht kleiner als 1000 g/mol wirkte ebenfalls toxisch auf die Zellen. Die Ausschlussgrenze von 1000 g/mol konnte durch diese Experimente bestätigt werden, da die Zellen bei Verwendung von PEG-1000 eine gute Zellviabilität im Vergleich zu den Zellen mit PEGDA-575 aufwiesen. Dennoch war die Zellviabilität der Zellen mit PEG-3400 leicht erhöht im Vergleich zu PEG-1000. Auch scheint die Struktur des Vernetzers eine bedeutende Rolle zu spielen. Bei diesen Experimenten schnitten alle Polyoxazolin-Vernetzer deutlich schlechter als PEG-Vernetzer ab. Lediglich der POX-Amin Vernetzer zeigte bei der Zugabe von Laminin eine erhöhte Viabilität. Hier scheint die Endgruppe eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei POx-DVS hingegen ist zu beachten, dass hier ein abbaubarer Vernetzer vorliegt, welcher an der Esterposition basisch gespalten werden kann. Unter Kulturbedingungen bei einem pH von 7.4 läuft diese Spaltung ab und es werden kleinere Fragmente gebildet, welche unterhalb der Ausschlussgrenze liegen und dadurch in die Zellen eindringen können. Im Falle eines Hydrogels würde dieser Rest nicht frei in Lösung schwimmen, sondern am Polymer gebunden sein. Das freiwerdende Fragment des Vernetzers wäre mit einer Molmasse größer 7000 g/mol ausreichend groß, um nicht von Zellen aufgenommen zu werden. Auch bei den Acrylaten sind Estergruppen vorhanden, welche gespalten werden können. Studien mit PEGDA zeigten allerdings, dass dieses unter physiologischen Bedingungen über den Zeitraum der Experimente keinen relevanten Abbau aufweist.<sup>[157]</sup> Ebenfalls sollte die Tatsache beachtet werden, dass sowohl PEGDA-3500 als auch die POx-Vernetzer, über einen oder mehrere Schritte synthetisiert wurden. Während die kommerziell erhältlichen Vernetzer mittels industrieller Methoden gereinigt wurden, können die synthetisierten Vernetzer geringe Rückstände von Edukten oder Lösungsmitteln aufweisen. Auch ist die Dispersität der kommerziellen Chemikalien mit 1.01 - 1.03 sehr gering und kann für die synthetisierten Vernetzer nur bedingt nachgestellt werden (POx-Diamin:  $D = 1.16$ ). Das <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PEGDA-3500 z.B. zeigte geringe Rückstände von Lösungsmitteln von wenigen ppm auch nach mehrtägigem Trocknen. Diese könnten sich negativ auf die Kultivierung der

anfälligen NSCs auswirken. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde PEGDA-3500 vor der Kultivierung für mehrere Tage gegen Wasser dialysiert, sodass alle Bestandteile, welche nicht an dem Vernetzer gebunden waren, entfernt werden konnten. Der Vergleich der Experimente ist in Abb. 39 dargestellt. Im Vergleich zu dem nicht dialysierten PEGDA-3500 (A und D) zeigte die dialysierte Variante (B und E) eine enorme Verbesserung der Viabilität auf  $250 \pm 74$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div ohne Laminin und auf  $465 \pm 128$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> mit Laminin. Ohne die Dialyse waren lediglich  $36 \pm 9$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>, bzw.  $105 \pm 16$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> in Kombination mit Laminin, zu finden. Auch wurde deutlich, dass die Zellen untereinander Netzwerke ausbildeten und ein Großteil der Zellen überlebte. Allerdings nahm die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> bei der Kultivierung ohne Laminin nach 7 div wie auch zuvor leicht ab ( $108 \pm 12$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Durch das Entfernen von minimalen Rückständen an Lösungsmitteln, Edukten oder anderen Verunreinigungen konnte die Viabilität deutlich gesteigert werden und gezeigt werden, wie wichtig sehr saubere Materialien bei der Kultivierung der NSCs sind. Da die genannten Verunreinigungen bei der Herstellung der Hydrogele nicht entfernt wurden, sind diese der voraussichtliche Grund für die schlechte Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen durch die geringe Zellviabilität. Um dies zu überprüfen, wurde das Konzept der Dialyse nachfolgend auf die Kultivierung der Zellen mit Hydrogelen übertragen.

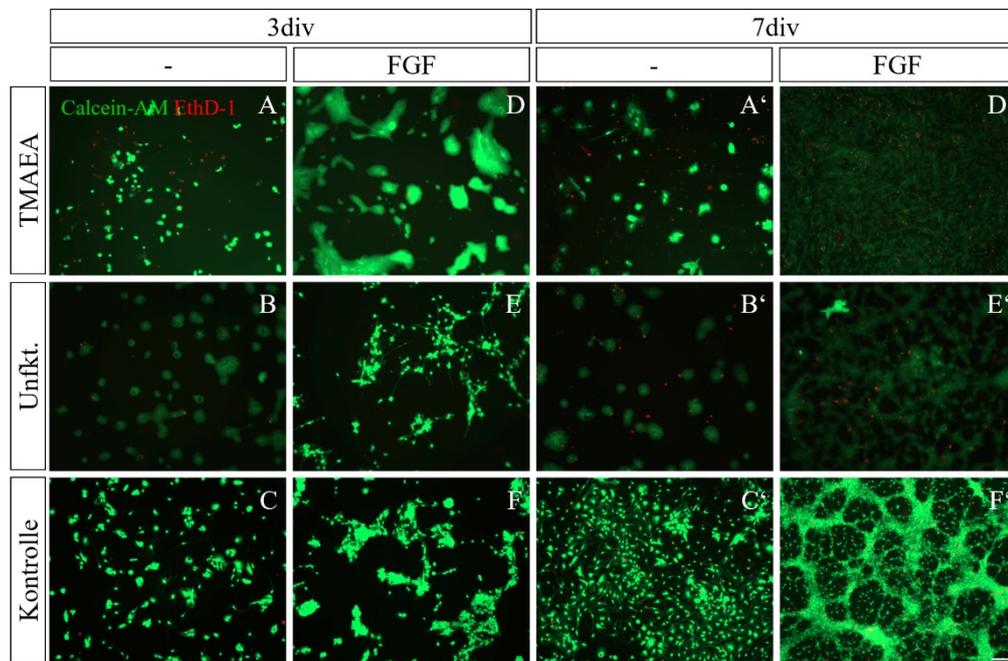


**Abb. 39:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert mit dialysiertem (B/E) und nicht dialysiertem PEGDA-3500 (A/D) zusätzlich in Kombination mit Laminin (D-F) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (C/F). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.6 Kultivierung von NSCs auf dialysierten Hydrogelen

Hydrogele können ebenso wie die Vernetzer vor der Kultivierung von NSCs dialysiert werden. Die fertigen Hydrogele wurden vor dem Ausstanzen für mehrere Tage in Milli-Q® Wasser dialysiert und das Wasser täglich gewechselt. Durch diesen Prozess konnten Verunreinigungen, wie z.B. Spuren von Edukten oder Lösungsmitteln in den eingesetzten Polymeren und Vernetzern, und nicht in das Netzwerk eingebaute Komponenten aus dem Hydrogel entfernt werden. Anschließend wurden, wie auch zuvor, NSCs auf diesen Hydrogelen kultiviert. Zusätzlich wurde erneut der Einfluss von WFs untersucht. Die Fluoreszenzaufnahmen des Zellviabilitäts-Assays sind in Abb. 40 dargestellt. Auf diesen Hydrogelen waren bereits nach 3 Tagen deutlich mehr lebende Zellen als in den vorherigen Experimenten zu sehen. Die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF führte dazu, dass nur noch eine geringe Zahl toter Zellen/mm<sup>2</sup> auf den Hydrogelen vorhanden war. Während die Zellviabilität bei den Hydrogelen ohne WFs nach 3 div (A/B) bei 77 % für die kationischen Hydrogele und bei 84 % für die unfunktionalisierten Hydrogele lag, stieg die Viabilität mit Zugabe des Wachstumsfaktors (D/E) auf 92 %, bzw. 93 %. Nach 7 div war die Viabilität ohne WFs (A'/B') leicht niedriger im Vergleich zu der Viabilität nach 3 div. Die Viabilität der kationischen Hydrogele lag bei 72 %, wohingegen die Zellen auf den

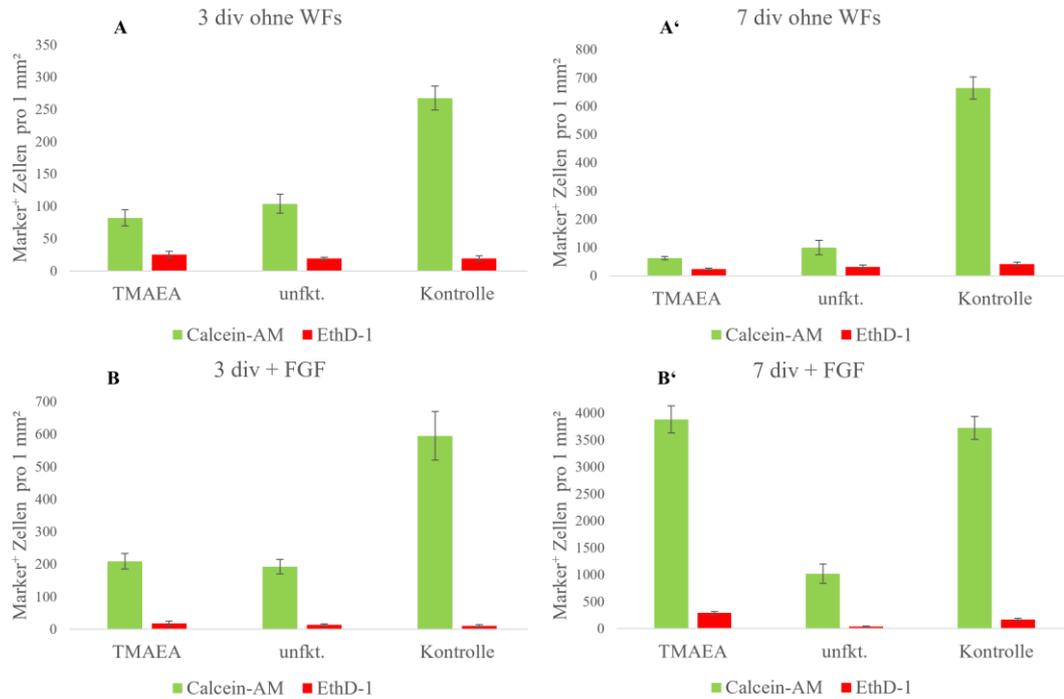
unfunktionalisierten Hydrogelen eine Viabilität von 76 % aufwiesen. Bei den Hydrogelen mit Wachstumsfaktor (D/E) hingegen stieg die Viabilität im Vergleich zu 3 div leicht auf 93 %, bzw. 96 % an. Bei der Kontrolle lag die Viabilität zwischen 93 % (3 div ohne WFs) und 98 % (3 div mit WFs), bzw. 94 % (7 div ohne WFs) und 96 % (7 div mit WFs).



**Abb. 40:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf dialysierten kationischen (A) und unfunktionalisierten (B) Hydrogelen in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF (D/E) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (C/F). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

Die statistische Auswertung der Zellkultivierung ist in Abb. 41 dargestellt. Deutlich zu erkennen war, dass nach 3 div ohne WF (A) die Zahl der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> auf den kationischen ( $82 \pm 12$ ) und unfunktionalisierten Hydrogelen ( $104 \pm 7$ ) trotz der prognostizierten Wechselwirkung der kationischen Gruppe mit der negativen Kopfgruppe der Zellmembran nahezu identisch war. Auch war die Anzahl der toten Zellen/mm<sup>2</sup> auf den kationischen Gelen leicht erhöht im Vergleich zu den unfunktionalisierten Hydrogelen ( $25 \pm 5$  vs.  $19 \pm 2$ ). Eine Zugabe der WFs erhöhte die Gesamtzahl der Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $209 \pm 24$  für das kationische Gel und  $193 \pm 22$  für das unfunktionalisierte Hydrogel. Bei der Kontrolle hingegen war die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> mit  $268 \pm 18$  nach 3 div ohne WFs und  $595 \pm 75$  mit WFs deutlich höher im Vergleich zu den verschiedenen Hydrogelen. Nach 7 div stieg die Zahl der Zellen/mm<sup>2</sup> auf der Kontrolle ohne WFs auf  $664 \pm 39$  an, wohingegen auf den Hydrogelen eine leichte Abnahme der Zellzahl auftrat ( $62 \pm 6$  auf den kationischen

Gelen und  $100 \pm 25$  auf den unfunktionalisierten Gelen). Bei der Zugabe der WFs und 7 div stieg die Zahl der Zellen, vermutlich auf Grund der erhöhten Proliferation der Zellen, auch auf den Hydrogelen deutlich an. Hier waren auf dem unfunktionalisierten Gel  $1020 \pm 186$  und auf dem kationischen Gel  $3886 \pm 252$  Zellen/mm<sup>2</sup> zu finden. Die Kontrolle hingegen zeigte  $3726 \pm 212$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>. Während die Zahl der lebenden Zellen durch die Zugabe von FGF auf beiden Hydrogelen und der Kontrolle stieg, lag bei dem kationischen Gel eine enorme Steigerung der Gesamtzahl der Zellen vor, welche sogar die Anzahl der Zellen auf der Kontrolle überstieg. Dieser enorme Anstieg könnte auf eine Wechselwirkung zwischen dem Cofaktor Heparin und der kationischen Ladung zurückgeführt werden. Da FGF2 und Heparin als lösliche Komponente während der Kultivierung hinzugegeben wurden, war eine Ablagerung dieser auf der Oberfläche der Hydrogele durch die Interaktion der kationischen Gruppe mit den negativ geladenen Gruppen der löslichen Komponenten möglich. Während FGFs sowohl basische als auch saure Eigenschaften aufweisen, besitzt der Cofaktor Heparin eine Vielzahl negativ geladener Gruppen (z.B. Carbonsäuren oder Sulfate).<sup>[158]</sup> Dadurch konnte Heparin an der Oberfläche der Hydrogele angelagert werden und mit der Heparin-Bindungsdomäne von FGF2 interagieren. Solch eine Interaktion von Heparin und FGF2 nutzte bereits FREUDENBERG *et al.* um hoch funktionalisierte Hydrogele zur Kultivierung von NSCs zu entwickeln und die Überlebensfähigkeit zu verbessern.<sup>[102]</sup> Durch diese Interaktion befanden sich sowohl Zellen als auch die WFs an der Oberfläche der Hydrogele, sodass hier eine Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen unterstützt und die Proliferation der Zellen deutlich stärker angeregt wurde als auf den unfunktionalisierten Hydrogelen. Dadurch wurde gleichzeitig auch die Viabilität der Zellen erhöht. Durch die Verbesserung der Zellkulturbedingungen mittels Dialyse konnte in dieser Arbeit erstmals eine große Zahl lebender NSCs erfolgreich auf den Hydrogelen kultiviert werden. Als nächstes sollte der Einfluss der kationischen Gruppe auf die Kultivierung von Zellen untersucht werden. Hierbei wurden sowohl die U251-MG Zellen als auch die NSCs untersucht.



**Abb. 41:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten, kationischen und unfunktionalisierten Gelen (A/A'), sowie in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF (B/B').

### 3.4 Kultivierung von Zellen in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen

Sowohl bei den U251-MG Zellen als auch bei den NSCs zeigte die Verwendung von kationischen Gruppen einen enormen Anstieg der Anzahl adhärierter Zellen auf den Hydrogelen (vgl. Kapitel 3.3.1 und 3.3.6). Nun galt es zu untersuchen, welchen Einfluss die Konzentration dieser kationischen Gruppe auf die Kultivierung der Zellen besitzt und ob eine Grenzkonzentration vorliegt, welche notwendig ist, um eine verbesserte Adhäsion hervorzurufen. Dieser Einfluss wurde anhand der U251-MG Zellen und den NSCs untersucht und miteinander verglichen.

#### 3.4.1 Charakterisierung der Hydrogele

Es wurden insgesamt sechs Hydrogele mit unterschiedlichen Konzentrationen der kationischen Gruppe **TMAEA** untersucht. Als Negativkontrolle diente ein unfunktionalisiertes Hydrogel. Alle Hydrogele wurden wie zuvor bereits beschrieben in 18 Gew.-% Lösungen hergestellt. Die verschiedenen Konzentrationen von **TMAEA** wurden durch Mischen des kationischen Polymers **P2** mit dem unfunktionalisierten Polymer **P1** in bestimmten Verhältnissen eingestellt. Die Hydrogele wurden in PBS-Puffer hergestellt und vollständig gequollen, da die späteren Zelleexperimente in Zellmedium, bestehend aus einer phosphatgepufferten

Lösung mit weiteren Nährstoffen, durchgeführt wurden. Eine Quellung in PBS-Puffer spiegelte somit das Verhalten der Hydrogele während der Zellexperimente wider. Es wurde das Quell- und rheologische Verhalten, sowie das Zeta-Potential dieser Hydrogele untersucht. Die gesammelten Daten sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4:** Daten der in PBS-Puffer gequollenen Hydrogele.

<b>Gel</b>	<b>Zusammensetzung</b>	$b_{\text{TMAEA}}$ [ $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ] <sup>b)</sup>	$Q_m$ <sup>c)</sup>	$G'$ <sup>d)</sup> [Pa]	<b>Zeta-Potential</b> <sup>e)</sup> [mV]
<b>G1</b>	AMor-BMAC	-	$10.3 \pm 0.1$	$2550 \pm 130$	$-3.9 \pm 1.6$
<b>G2</b>	AMor-BMAC-TMAEA	0.91	$11.1 \pm 0.3$	$2940 \pm 480$	$42.1 \pm 3.7$
<b>G5<sup>a)</sup></b>	AMor-BMAC-TMAEA	0.46	$10.0 \pm 0.2$	$3050 \pm 220$	$35.1 \pm 2.8$
<b>G6<sup>a)</sup></b>	AMor-BMAC-TMAEA	0.23	$10.0 \pm 0.1$	$3200 \pm 280$	$31.5 \pm 1.9$
<b>G7<sup>a)</sup></b>	AMor-BMAC-TMAEA	0.11	$10.2 \pm 0.2$	$2870 \pm 350$	$24.9 \pm 3.3$
<b>G8<sup>a)</sup></b>	AMor-BMAC-TMAEA	0.06	$9.6 \pm 0.2$	$3720 \pm 140$	$20.0 \pm 1.2$

a) Geringere kationische Konzentrationen wurden durch Mischen von P2 mit P1 erreicht, b) Konzentration der funktionellen Gruppe pro mg Gel, c) Gemessen in Triplikaten in PBS-Puffer als Quellmedium; Trockengewicht nach Gefriertrocknung der vollständig gequollenen Gele ermittelt, d) Gemessen in Triplikaten bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 %, e) gemessen in einer 1 mM KCl-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL der löslichen Polymere bei einem pH-Wert von 7 - 8 und 25 °C; Mittelwerte über zehn Messungen bestimmt; für verschiedene Konzentrationen wurde **P2** mit **P1** gemischt um eine finale Konzentration von 1 mg/mL zu erhalten.

Auffällig für die kationischen Hydrogele war, dass trotz einer erhöhten Konzentration an kationischen Gruppen und damit einhergehend eine Erhöhung der Gesamthydrophilie des Polymers sich bei **G2** der Quellwert, im Vergleich zu den geringeren Konzentrationen der kationischen Gruppe, nicht merklich änderte. Bei der höchsten Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel lag ein Quellwert von  $11.1 \pm 0.3$  vor. Das Gel mit der geringsten Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel hingegen besaß einen Quellwert von  $9.6 \pm 0.2$ . Damit lag der Unterschied der beiden Quellwerte bei 1.5 und alle weiteren Gele besaßen eine noch geringere Abweichung. In der Literatur

ist eine hohe Bindungsaffinität der Ammonium-Ionen gegenüber Phosphat-Ionen beschrieben.<sup>[159]</sup> Diese Affinität wird z.B. auch zur Entfernung von Phosphat-Ionen aus Lösungen verwendet.<sup>[160]</sup> Da bei diesen Hydrogelen sowohl bei der Präparation, als auch bei der Quellung Phosphat-Ionen im Überschuss vorlagen, konnten alle vorhandenen Ammonium-Ionen mit den Phosphat-Ionen interagieren. Dadurch konnten alle Ladungen auch bei einer Erhöhung der Konzentration kationischer Gruppen im Hydrogel durch Phosphat-Ionen abgeschirmt werden, sodass die Quellung unabhängig von der erhöhten Hydrophilie und Abstoßung der Ladungen war. Bei der Wechselwirkung von Phosphaten mit Ammonium-Ionen handelt es sich um reversible physikalische Wechselwirkungen, welche im Gleichgewicht mit freien Ionen stehen. Auch bei der Zellmembran liegen negativ geladene Phosphate als Kopfgruppen vor, wodurch diese ebenfalls mit den Kationen der Hydrogele interagieren können. Dementsprechend wurde durch die gleichbleibende Quellung ein Einfluss durch das Quellverhalten der Hydrogele auf die spätere Kultivierung der Zellen ausgeschlossen. Auch der Unterschied der Steifigkeit der kationischen Gele war gering und lag für die meisten Gele zwischen 2550 Pa für das unfunktionalisierte Gel und 3200 Pa für das Gel mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ . Lediglich das Hydrogel mit der geringsten kationischen Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  besaß mit 3720 Pa eine deutlich höhere Steifigkeit als die restlichen Hydrogele. Unter Einbeziehung der Fehler zwischen 5 - 10 % waren die Steifigkeiten der Hydrogele sehr ähnlich und frühere Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.3.2) zeigten bereits, dass bei den NSCs eine Änderung der Steifigkeit keinen großen Einfluss auf die Kultivierung der Zellen hatte. Daher konnte ein Einfluss auf die spätere Kultivierung der Zellen durch unterschiedliche Steifigkeiten ausgeschlossen werden, sodass ein Effekt während der Kultivierung auf die unterschiedliche Konzentration kationischer Gruppen zurückgeführt werden konnte. Die Ladung der Hydrogele wurde mit einer Zeta-Potential Analyse untersucht. Dazu wurden die löslichen Polymere in einer 1 mM KCl-Lösung bei einem pH-Wert von 7 - 8 und bei 25 °C untersucht. Die verschiedenen Konzentrationen wurden erneut durch Mischen von **P2** mit **P1** eingestellt. Die Untersuchung zeigte, dass das Zeta-Potential ausgehend von der höchsten Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  mit einem Zeta-Potential von  $42.1 \pm 3.7$  mV auf  $20.0 \pm 1.2$  mV für die geringste kationische Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  stetig abnahm. Dadurch konnte gezeigt werden, dass wie gewünscht eine geringere kationische Ladung bei Verringerung des Anteils an kationischem

Polymer vorlag. Das unfunktionalisierte Polymer zeigte ein leicht negatives Zeta-Potential von  $-3.9 \pm 1.6$  mV hervorgerufen durch die deprotoniert vorliegenden Thiole. Bei der Herstellung der Hydrogele werden diese Thiole zur Vernetzung verwendet, sodass in einem Hydrogel ein Zeta-Potential nahe 0 mV vorliegen sollte.

Aus Kostengründen wurden die Dialysen der Hydrogele in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser statt PBS-Puffer durchgeführt. Daher wurden zusätzlich die Eigenschaften von in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser gequollenen Hydrogelen untersucht. Die Hydrogele wurden erneut wie bereits zuvor beschrieben hergestellt. Auch hier wurden die Komponenten zunächst in PBS-Puffer gelöst, da ein basischer pH-Wert die Reaktionsgeschwindigkeit der Michael-Addition erhöht. Anschließend wurden die fertigen Gele über Nacht in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser gequollen. Eine Übersicht der Daten ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Daten der in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser gequollenen Hydrogele.

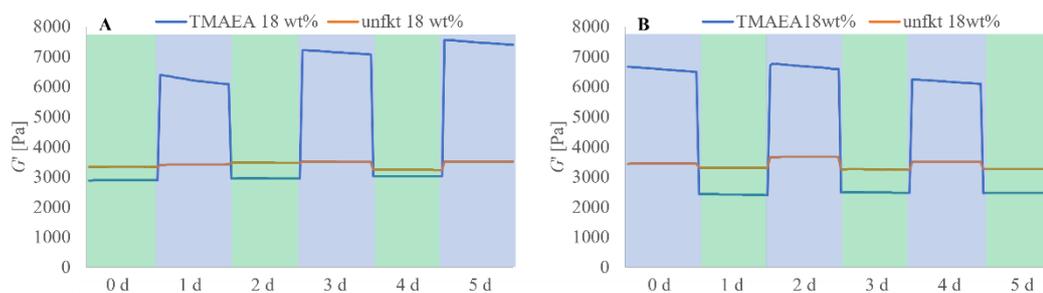
Gel	Zusammensetzung	$b_{\text{TMAEA}}$ [ $\mu\text{mol/mg}$ ] <sup>b)</sup>	$Q_m$ <sup>c)</sup>	$G^d$ [Pa]	Zeta-Potential <sup>e)</sup> [mV]
G1	AMor-BMAC	-	$13.3 \pm 0.2$	$2600 \pm 70$	$-3.9 \pm 1.6$
G2	AMor-BMAC-TMAEA	0.91	$16.9 \pm 0.2$	$5100 \pm 1000$	$42.1 \pm 3.7$
G5 <sup>a)</sup>	AMor-BMAC-TMAEA	0.46	$12.4 \pm 0.3$	$4700 \pm 1000$	$35.1 \pm 2.8$
G6 <sup>a)</sup>	AMor-BMAC-TMAEA	0.23	$9.5 \pm 0.1$	$3500 \pm 430$	$31.5 \pm 1.9$
G7 <sup>a)</sup>	AMor-BMAC-TMAEA	0.11	$9.0 \pm 0.4$	$3500 \pm 840$	$24.9 \pm 3.3$
G8 <sup>a)</sup>	AMor-BMAC-TMAEA	0.06	$8.6 \pm 0.1$	$3600 \pm 460$	$20.0 \pm 1.2$

a) Geringere kationische Konzentrationen wurden durch Mischen von P2 mit P1 erreicht, b) Konzentration der funktionellen Gruppe pro mg Gel, c) Gemessen in Triplikaten in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser als Quellmedium; Trockengewicht nach Gefriertrocknung der vollständig gequollenen Gele ermittelt, d) Gemessen in Triplikaten bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 %, e) gemessen in einer 1 mM KCl-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL der löslichen Polymere bei einem pH-Wert von 7-8 und 25 °C; Mittelwerte über zehn Messungen bestimmt; für verschiedene Konzentrationen wurde P2 mit P1 gemischt um eine finale Konzentration von 1 mg/mL zu erhalten.

Bei der Quellung in Wasser trat ein Anstieg des Quellwerts in Abhängigkeit der Konzentration an kationischen Gruppen auf. Das Hydrogel mit der höchsten Konzentration an kationischen Gruppen von  $0.91 \mu\text{mol}/\text{mg}$  besaß den höchsten Quellwert von  $16.9 \pm 0.2$ , während das Hydrogel mit der geringsten Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}$  den geringsten Quellwert von  $8.6 \pm 0.1$  aufwies. Hierbei schien das Fehlen der Phosphat-Ionen im Quellmedium einen großen Effekt auf die Quellung auszuüben. Bei diesen Hydrogelen lagen Phosphat-Ionen lediglich bei der Herstellung der Hydrogele vor, sodass der Überschuss an Phosphat-Ionen nicht so groß war wie bei den vorherigen Experimenten. Durch die bereits beschriebene hohe Affinität von Phosphat-Ionen gegenüber Ammonium-Ionen verbleiben die Phosphat-Ionen bei einer Quellung in Wasser innerhalb des Gels und diffundieren nur in geringen Mengen aus dem Hydrogel. Dadurch war die Salzkonzentration im Hydrogel im Vergleich zu dem umgebenden Medium höher und ein osmotischer Druck trat auf, wodurch eine stärkere Quellung erklärt werden könnte. Dieser Effekt war höher je mehr Ladungen im Hydrogel vorhanden waren, da bei jedem Gel dieselbe Menge PBS Puffer zur Herstellung verwendet wurde. Durch die Interaktion von Phosphat-Ionen mit den Ammonium-Ionen des Hydrogels konnte zusätzlich der Anstieg der Steifigkeit im Vergleich zu den in PBS-Puffer gequollenen Hydrogelen erklärt werden. Phosphat-Ionen können bis zu dreifach negativ geladen sein, wodurch diese in der Lage sind mit mehreren Ammonium-Gruppen zu interagieren. Durch diese Interaktion treten physikalische Netzpunkte auf, welche zu einer erhöhten Vernetzung und dadurch erhöhten Steifigkeit führen. Bei der höchsten Konzentration an kationischen Gruppen konnten somit auch mehr physikalische Netzpunkte auftreten, sodass dieses die höchste Steifigkeit von  $5100 \text{ Pa}$  aufwies. Bei den in PBS-Puffer gequollenen Hydrogelen hingegen waren Phosphat-Ionen im Überschuss vorhanden, sodass hier die Bildung von physikalischen Netzpunkten statistisch unwahrscheinlicher war und kein Effekt auf die Steifigkeit sichtbar wurde. Auch ist eine höhere Steifigkeit durch eine stark erhöhte Quellung denkbar, wenn dadurch die Polymerketten maximal gestreckt vorliegen, sodass die Flexibilität dieser stark eingeschränkt ist. Der Einfluss der Phosphat-Ionen auf die Eigenschaften der Hydrogele konnte ebenfalls durch die Herstellung eines Hydrogels mit NaOH anstelle von PBS-Puffer bestätigt werden. Wurde dieses Gel in PBS-Puffer gequollen, wurde ein Quellwert von  $11.5 \pm 0.3$  erreicht, wohingegen eine Quellung in Wasser einen Quellwert von  $69 \pm 4.5$  zeigte. Der Effekt auf die Steifigkeit der

Gele schien einer Grenzkonzentration zu unterliegen. Eine erhöhte Steifigkeit trat erst bei einer Konzentration größer  $0.46 \mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel auf.

Nachfolgend wurde das Verhalten der unfunktionalisierten und kationischen Hydrogele mit einer Konzentration von  $0.91 \mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel bei einem Wechsel des Mediums untersucht. Dazu wurden die Hydrogele für jeweils 24 h entweder in PBS-Puffer oder Milli-Q® Wasser gequollen, anschließend das rheologische Verhalten untersucht und dann erneut im jeweils anderen Medium für 24 h gequollen. Die zwei Messreihen wurden über fünf Tage in Triplikaten durchgeführt. Die erste Messreihe begann dabei mit einem in PBS-Puffer gequollenen Gel (A) und die zweite Messreihe mit einem in Milli-Q® Wasser gequollenen Gel (B). In Abb. 42 sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmungen abgebildet. Die gesammelten Daten sind in Tabelle 6 dargestellt.



**Abb. 42:** Rheologisches Verhalten von kationischen (blaue Kurve) und unfunktionalisierten Hydrogelen (orange Kurve) bei Wechsel des Mediums zwischen Wasser (blauer Hintergrund) und PBS-Puffer (grüner Hintergrund) über sechs Zyklen (5 Tage).

Die Untersuchung bei Wechsel des Mediums zeigte einen reversiblen Verlauf der Steifigkeit für das kationische Hydrogel über sechs Zyklen und einen Zeitraum von fünf Tagen. Das kationische Hydrogel nahm dabei eine Steifigkeit von ca. 3000 Pa in PBS-Puffer und von ca. 6700 Pa in Wasser an. Das unfunktionalisierte Hydrogel hingegen zeigte eine konstante Steifigkeit von ca. 3400 Pa. Auffällig war, dass bei einer ersten Quellung des kationischen Hydrogels in PBS-Puffer die Steifigkeit beim Wechsel zu Wasser bei jeder Wiederholung leicht anstieg. Bei einer ersten Quellung in Wasser hingegen nahm die Steifigkeit nach Wechsel des Mediums bei jeder Wiederholung leicht ab. Dies könnte allerdings durch den Gerätefehler und die Präparation der Proben vor jeder Messung zu erklären gewesen sein. Nach fünf Tagen wurden die Quellwerte der Hydrogele bestimmt. Diese lagen für das unfunktionalisierte Hydrogel mit 9.4 in PBS-Puffer und 10.1 in Wasser leicht unterhalb der Quellwerte, welche nach 1 d bestimmt wurden (10.3 und 13.3, vgl.

Tabelle 4 und Tabelle 5). Dennoch konnte hier davon ausgegangen werden, dass ein Wechsel des Mediums keinen Einfluss auf die Eigenschaften des unfunktionalisierten Hydrogels besaß. Der Quellwert des kationischen Gels war nach fünf Tagen für PBS-Puffer leicht höher als nach 1 d (12.8 nach 5 d, 11.1 nach 1 d, vgl. Tabelle 4). In Wasser hingegen stieg der Quellwert nach 5 d auf 31.6, wohingegen der Quellwert nach 1 d bei lediglich 16.9 lag (vgl. Tabelle 5). Da der Quellwert in PBS-Puffer, welcher auch im Medium während der Zellexperimente vorhanden war, nach dem Wechsel des Mediums identisch blieb, wurde dieses Phänomen nicht weiter untersucht. Mit Hilfe dieses Experiments konnte nachgewiesen werden, dass Änderungen der Eigenschaften in verschiedenen Medien durch das quartäre Ammoniumion von **TMAEA** verursacht wurde und nicht auftraten, wenn **TMAEA** nicht vorhanden war. Somit konnten die Materialeigenschaften des kationischen Hydrogelsystem über einen externen Trigger (Medium) variiert werden. Dies könnte für andere Anwendungen neben den Zellexperimenten, wie z.B. in der Wirkstofffreisetzung, eine interessante Eigenschaft darstellen, da eine stärkere Quellung mit einer Expansion des Hydrogels und damit der Poren einhergeht.

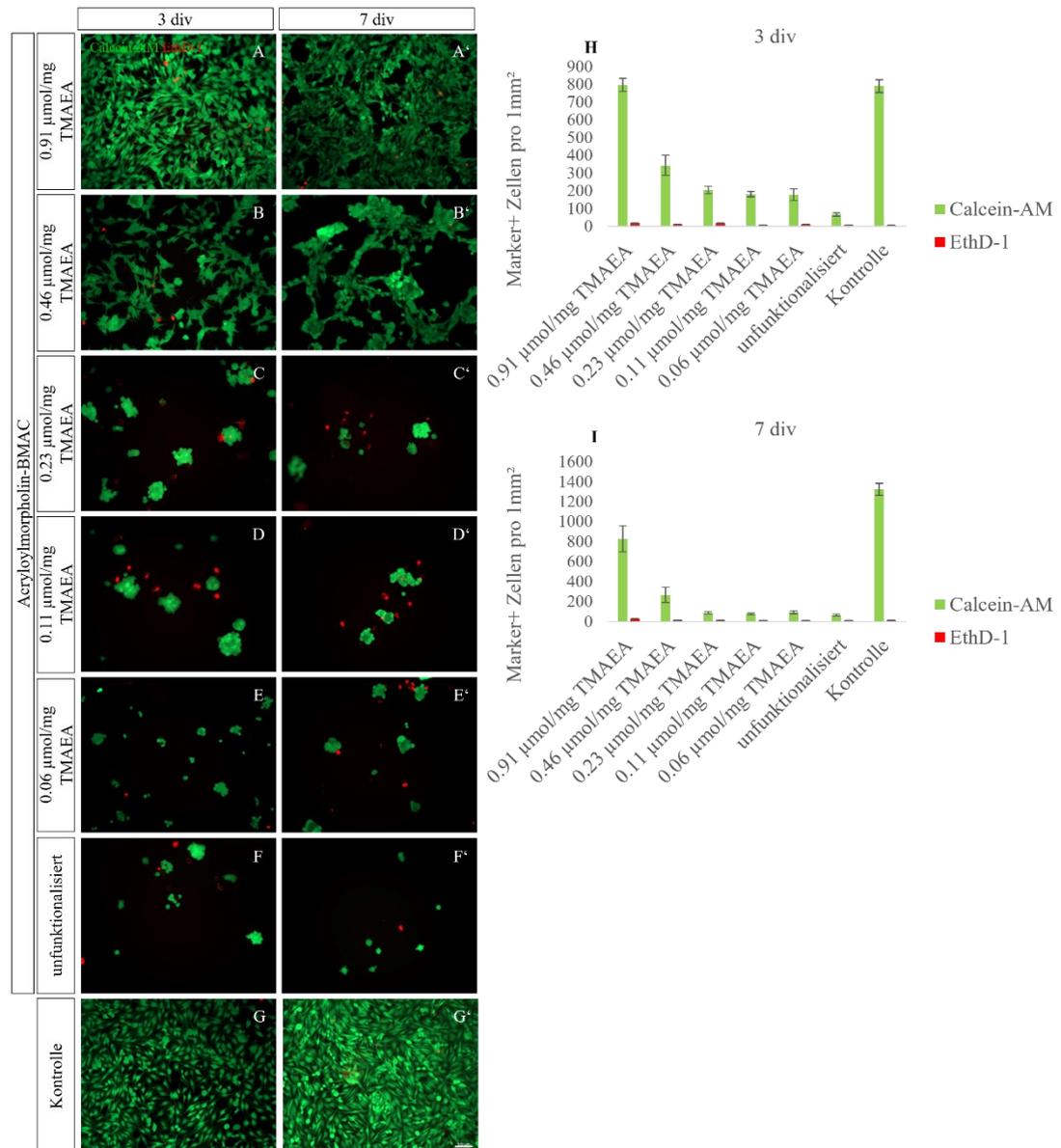
**Tabelle 6:** Rheologische Daten des kationischen und unfunktionalisierten Hydrogels bei einem Wechsel des Mediums über 5 Tage.

	<u>TMAEA</u>		<u>Unfunktionalisiert</u>	
	$G'^a$ [Pa]		$G'$ [Pa]	
	PBS-Puffer <sup>b)</sup>	Wasser <sup>c)</sup>	PBS-Puffer <sup>b)</sup>	Wasser <sup>c)</sup>
<b>0 d</b>	2900 ± 180	6600 ± 350	3300 ± 80	3500 ± 180
<b>1 d</b>	6200 ± 600	2400 ± 260	3400 ± 110	3300 ± 230
<b>2 d</b>	3000 ± 80	6700 ± 400	3500 ± 110	3700 ± 100
<b>3 d</b>	7100 ± 360	2500 ± 90	3500 ± 210	3300 ± 170
<b>4 d</b>	3000 ± 90	6200 ± 230	3200 ± 260	3500 ± 40
<b>5 d</b>	7500 ± 430	2500 ± 150	3500 ± 40	3300 ± 40
$Q_{5d}^d$	31.6 ± 0.5	12.8 ± 0.1	10.1 ± 0.3	9.4 ± 0.1

a) bestimmt in Triplikaten mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 % nach 24 h Quellen im entsprechenden Medium, b) Messreihe beginnend in PBS-Puffer, c) Messreihe beginnend in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser, d) gemessen in Triplikaten im jeweiligen Quellmedium nach 5 d; Trockengewicht nach Gefriertrocknung der vollständig gequollenen Gele ermittelt.

### **3.4.2 Untersuchung von U251-MG Zellen in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen**

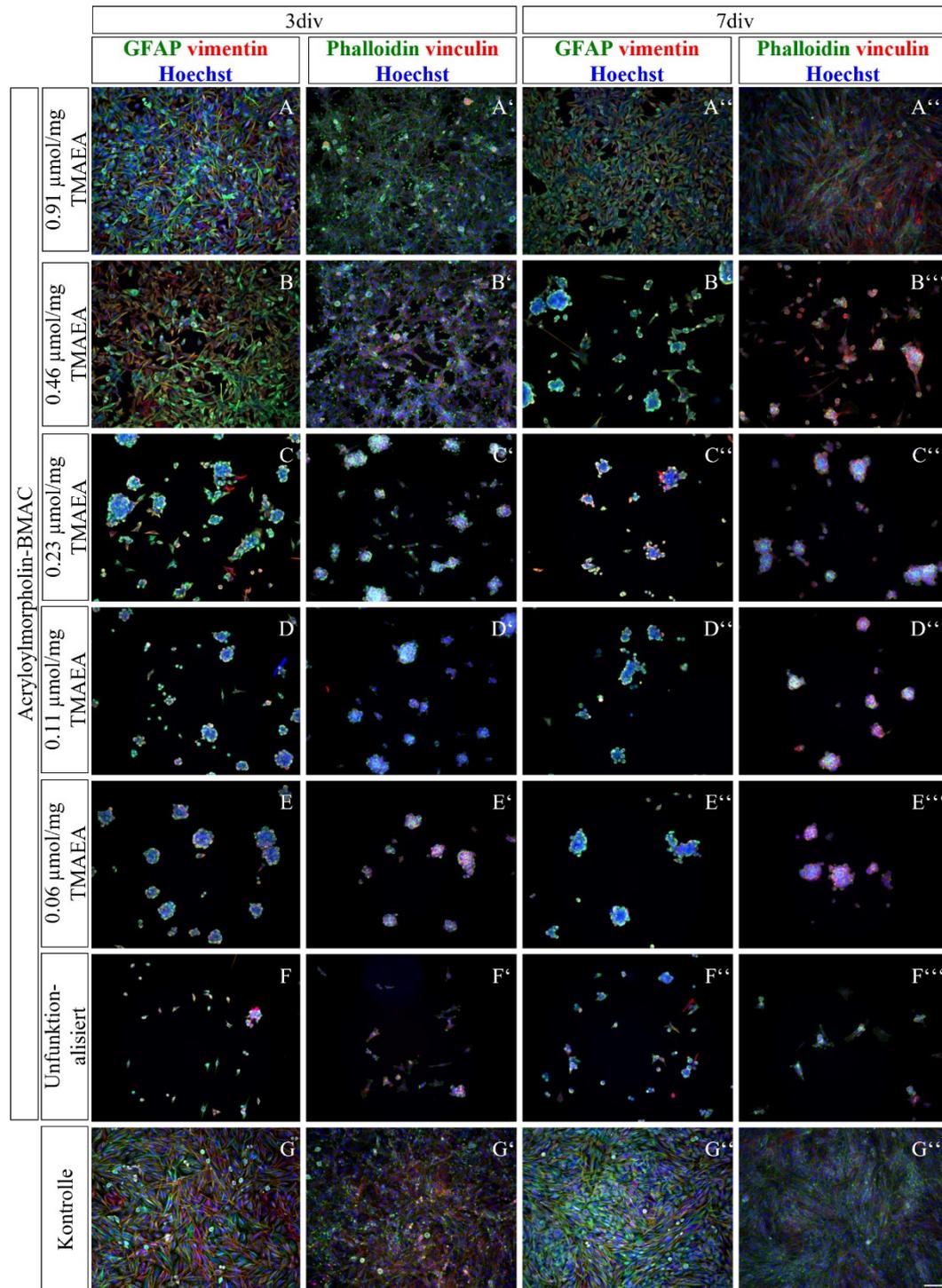
Da nun ausgeschlossen werden konnte, dass die Eigenschaften der Hydrogele sich bei einer Änderung der Konzentration an kationischen Gruppen und durch Dialyse verändern, wurden U251-MG Zellen auf diesen Hydrogelen kultiviert. Dabei sollte der Einfluss der Konzentration kationischer Gruppen untersucht werden. Da die U251-MG Zellen aus einer sehr robusten Tumorzelllinie stammen, wurden zunächst die Zellen auf nicht dialysierten Hydrogelen kultiviert und anschließend mit dialysierten Hydrogelen verglichen. Dazu wurden erneut 40000 Zellen auf jedem Hydrogel ausgesät und diese für insgesamt 7 div kultiviert. Nach 3 und 7 div wurden die Hydrogele anhand eines Zellviabilitätsassays und den Tumormarkern GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) evaluiert. Die Fluoreszenzaufnahmen sowie die statistische Auswertung des Zellviabilitätsassays sind in Abb. 43 dargestellt.



**Abb. 43:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. Die statistische Auswertung des Zellviabilitätsassays wurde über drei Versuche nach 3 (H) und 7 div (I) durchgeführt.

Anhand der Fluoreszenzaufnahmen war ein eindeutiger Trend in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen sichtbar. Während Hydrogele mit einer geringen Konzentration der kationischen Gruppe (0.06 µmol/mg Gel bis 0.23 µmol/mg Gel, C-E) nur eine geringe Anzahl adhärierter Zellen zeigten, war bei den höheren Konzentrationen (0.46 µmol/mg Gel und 0.91 µmol/mg Gel, A, B) eine hohe Zahl adhärierter Zellen zu finden. Die höchste Konzentration mit 0.91 µmol/mg Gel zeigte dabei nach 3 div (A) ähnliche Ergebnisse wie die Kontrolle auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (G) ( $800 \pm 36$  vs.  $790 \pm 35$  Zellen/mm<sup>2</sup> auf der

Kontrolle). Nach 7 div hingegen nahm die Zahl adhärierter Zellen auf dem Hydrogel nur noch leicht zu (A',  $828 \pm 131$  Zellen/mm<sup>2</sup>), wohingegen die Anzahl adhärierter Zellen auf der Kontrolle stärker anstieg (G',  $1325 \pm 59$  Zellen/mm<sup>2</sup>). Auch auf den Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46 µmol/mg Gel (B) konnte nach 3 div eine erhöhte Adhäsion von  $343 \pm 60$  Zellen/mm<sup>2</sup> festgestellt werden. Diese nahm nach 7 div (B') allerdings leicht auf  $266 \pm 76$  Zellen/mm<sup>2</sup> ab. Die drei niedrigen Konzentrationen (0.06, 0.11 und 0.23 µmol/mg Gel, C-E) zeigten im Vergleich zu dem unfunktionalisierten Hydrogel (F) eine leicht verbesserte Adhäsion von ca. 180 Zellen/mm<sup>2</sup> im Gegensatz zu 68 Zellen/mm<sup>2</sup> auf dem unfunktionalisierten Hydrogel. Die Zahl der adhärerten Zellen schwankte bei den drei Hydrogelen zwischen 179 und 205 Zellen/mm<sup>2</sup> und nahm für alle drei Hydrogele nach 7 div um ca. die Hälfte ab (C'-E'). Es schien eine untere Grenzkonzentration für den positiven Einfluss der kationischen Gruppe auf die Adhäsion von 0.46 µmol/mg Gel vorzuliegen. Unterhalb dieser Konzentration hatte die kationische Funktionalisierung nur einen sehr geringen Einfluss auf die Adhäsion und oberhalb dieser Konzentration wurde die Adhäsion mit steigender Konzentration deutlich verbessert. Bei der höchsten verwendeten Konzentration konnte auch nach 7 div ein Anstieg der Anzahl adhärierter Zellen festgestellt werden, während die Anzahl adhärierter Zellen auf allen anderen Hydrogelen nach 7 div abnahm. Gleichzeitig wurde durch die höhere kationische Konzentration aber auch die Anzahl der toten Zellen/mm<sup>2</sup> erhöht. Hierbei lagen nach 7 div bei der höchsten Konzentration  $29 \pm 3$  tote Zellen/mm<sup>2</sup> vor, wohingegen auf der Kontrolle lediglich  $11 \pm 3$  tote Zellen/mm<sup>2</sup> vorlagen. Die Anzahl toter Zellen/mm<sup>2</sup> nahm bei Verringerung der kationischen Konzentration ebenfalls ab, was durch die unspezifische Interaktion der kationischen Gruppe mit der Zellmembran der Zellen erklärt werden konnte. Auch tote Zellen besitzen weiterhin eine negativ geladene Zellmembran, welche ebenfalls durch die ionische Wechselwirkung auf dem Hydrogel haften bleibt. Eine Untersuchung der Zellen mittels verschiedener Tumormarker gab Aufschluss über die Morphologie der Zellen auf den Hydrogelen. Die Fluoreszenzaufnahmen dieser Untersuchungen sind in Abb. 44 dargestellt.



**Abb. 44:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

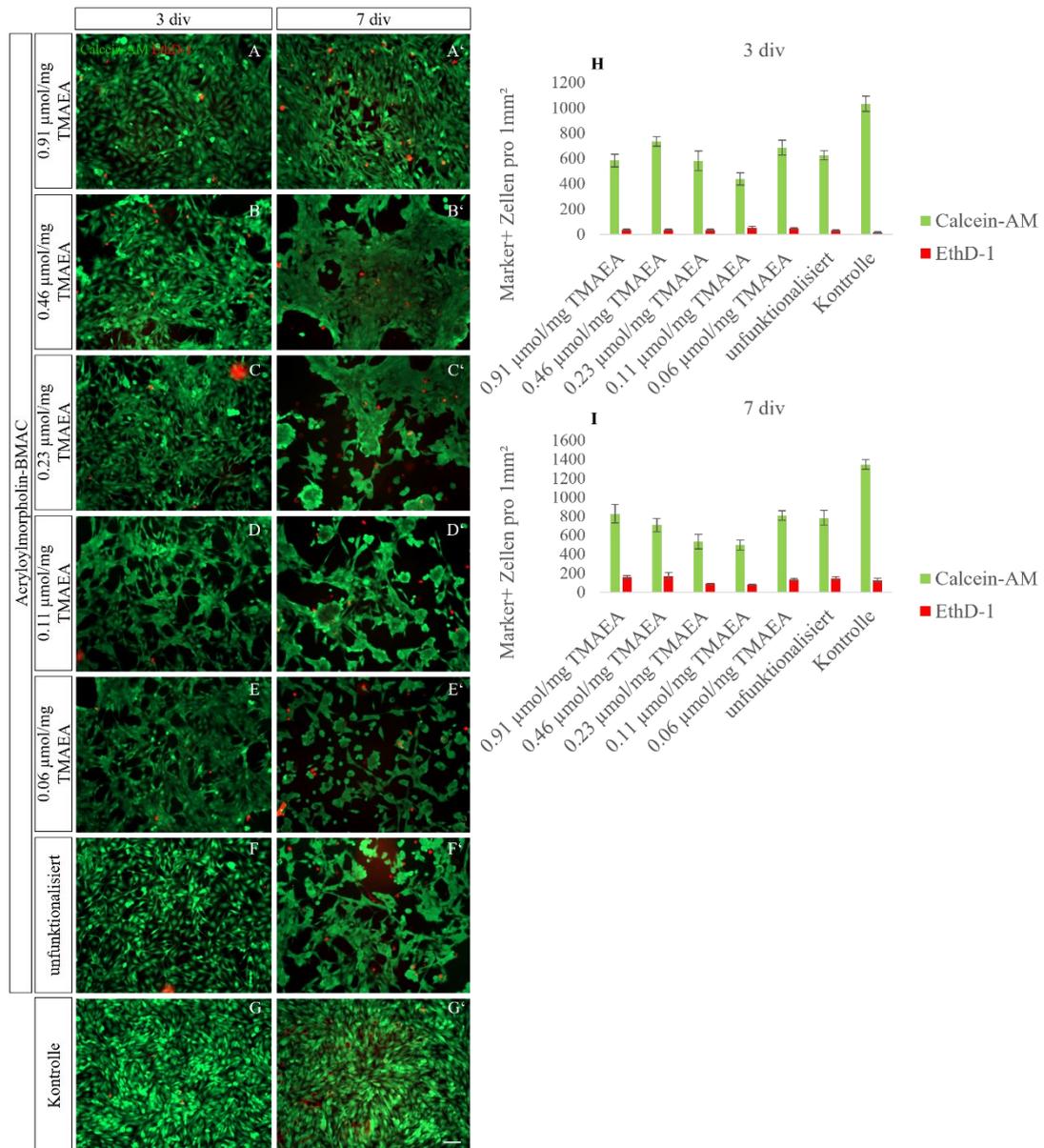
Die Untersuchung der U251-MG Zellen mit Tumormarkern zeigte für die geringen Konzentrationen (0.06, 0.14 und 0.28  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel, C-E) häufig eine runde Morphologie mit starker Zellaggregationen, während bei höheren Konzentrationen (0.46 und 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$ , A/B) eine gestreckte Morphologie vorlag. Weiterhin konnte

bei den höheren Konzentrationen ein ausgedehntes Netzwerk der Zellen, wie auch bei der Kontrolle, festgestellt werden und die Fläche des Hydrogels war vollständig mit Zellen besetzt. Die Untersuchung mit Vinculin, einem Marker für fokale Adhäsion, zeigte deutlich, dass die Zellen auf der Oberfläche des Hydrogels adhärten. Diese Adhäsion schien bei dem Hydrogel mit einer Konzentration an kationischen Gruppen von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel nach 7 div zurückzugehen (B'' und B'''). Aber auch bei niedrigeren Konzentrationen adhärten die einzelnen Zellen und Zellaggregate auf den Hydrogelen. Für die nicht dialysierten Hydrogele konnte eine untere Grenzkonzentration von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel für die Verbesserung der Adhäsion festgestellt werden. Mit der höchsten verwendeten Konzentration konnten hierbei eine ähnlich gute Adhäsion wie auf der Kontrolle bestätigt werden. Eine Verringerung der Konzentration kationischer Gruppen führte ebenfalls zu einer Verschlechterung der Anzahl adhärter Zellen. Dennoch war auffällig, dass die Anzahl adhärter Zellen für fast alle Bedingungen nach 7 div abnahm. Dies könnte durch den negativen Einfluss der zuvor bereits bestätigten Verunreinigungen in den Hydrogelen erklärt werden.

### **3.4.3 Kultivierung der U251-MG Zellen auf dialysierten Hydrogelen**

Obwohl Tumorzelllinien sehr robust sind, könnten diese Verunreinigungen zu einem früheren Zelltod führen, weshalb in einem nächsten Schritt der Einfluss von dialysierten Gelen auf die Kultivierung der U251-MG Zellen untersucht wurde. Dazu wurden die Hydrogele vor Verwendung für insgesamt 5 - 7 Tage gegen Wasser dialysiert, wobei das Wasser täglich gewechselt wurde. Die Zellkultivierung wurde, wie zuvor bereits beschrieben (vgl. Kapitel 3.4.2), durchgeführt und mit den Tumormarkern und einem Zellviabilitätsassay untersucht. Die Fluoreszenzaufnahmen und die statistische Auswertung des Viabilitätsassays sind in Abb. 45 dargestellt. Im Vergleich zu den Fluoreszenzaufnahmen der undialysierten Hydrogele zeigten diese Aufnahmen eine enorme Verbesserung der Adhäsion für alle Bedingungen. Selbst das unfunctionalisierte Hydrogel zeigte nach der Dialyse ein ausgedehntes Netzwerk an Zellen, welches vergleichbar mit der Kontrolle war, und die gesamte Oberfläche bedeckte. Nach 3 div konnte hier kein eindeutiger Trend für eine verbesserte Adhäsion auf Grund der Konzentration der kationischen Gruppe festgestellt werden. Die höchste Anzahl adhärter Zellen lag bei einer Konzentration von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel vor (B,  $734 \pm 38$  lebende Zellen/ $\text{mm}^2$ ),

wohingegen die geringste Zahl adhärierter Zellen bei 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel auftrat (D,  $438 \pm 49$  lebende Zellen/ $\text{mm}^2$ ). Insgesamt betrachtet war die Anzahl der adhärerten Zellen nach 3 div sehr ähnlich für alle Bedingungen. Auffällig war hier, dass die Anzahl adhärierter toter Zellen für alle Bedingungen deutlich höher war als bei den nicht dialysierten Hydrogelen (H/I, zwischen  $16 \pm 5$  für die Kontrolle bis  $52 \pm 12$  bei 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel).



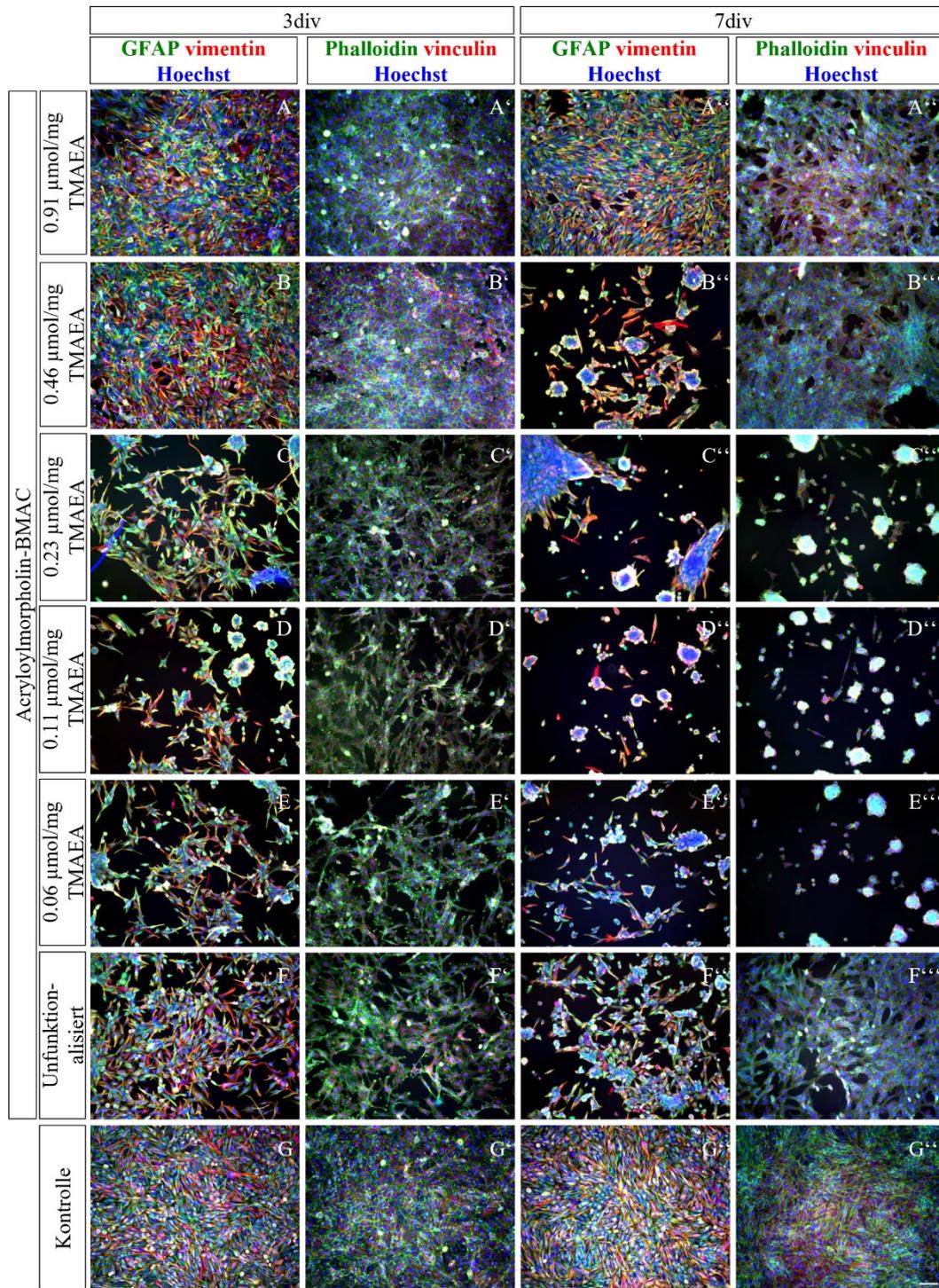
**Abb. 45:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ . Die statistische Auswertung des Zellviabilitätsassays wurde über drei Versuche nach 3 (H) und 7 div (I) durchgeführt.

Im Vergleich zu den nicht dialysierten Hydrogelen stieg die Zahl adhärierter Zellen bei allen Bedingungen außer 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel nach 7 div leicht an, während dies

zuvor lediglich bei der höchsten Konzentration auftrat. Der größte Anstieg war auch hier wieder bei der Kontrolle zu sehen ( $1032 \pm 59$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div, G,  $1346 \pm 50$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div, G'). Bei den Hydrogelen lag der größte Anstieg bei der höchsten kationischen Konzentration von  $0.91 \mu\text{mol/mg}$  Gel vor ( $584 \pm 49$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div, A,  $826 \pm 98$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div, A'). Auch das unfunktionalisierte Hydrogel ( $625 \pm 36$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div, F,  $784 \pm 78$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div, F') und das Hydrogel mit der geringsten kationischen Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel ( $684 \pm 59$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 3 div, E,  $809 \pm 51$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div, E') zeigten einen signifikanten Anstieg. Nach 7 div war hier erneut eine Tendenz in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen zu erkennen. Allerdings fielen hierbei das unfunktionalisierte Hydrogel und das Hydrogel mit der geringsten kationischen Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel aus der Reihe und zeigten mehr adhärierte Zellen als die höheren Konzentrationen bis  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel. Eine untere Grenzkonzentration konnte bei den dialysierten Hydrogelen in Kombination mit den U251-MG Zellen nicht gefunden werden.

Die Untersuchung der Zellen mit Tumormarkern (siehe Abb. 46) zeigte für alle Bedingungen eine gestreckte Morphologie der Zellen und deutlich weniger Zellaggregate verglichen mit den Zellen auf undialysierten Hydrogelen (vgl. Abb. 44). Besonders nach 3 div war die Oberfläche aller Gele mit einem Netzwerk aus Zellen übersät (A-F und A'-F'). Nach 7 div aggregierten bei den Konzentrationen von  $0.06$  bis  $0.23 \mu\text{mol/mg}$  Gel viele Zellen (E''-G'' und E'''-G'''). Während hier viele lebende Zellen vorlagen, zeigte die Morphologie, dass die Kultur der U251-MG Zellen unter diesen Bedingungen nicht optimal war. Optimale Bedingungen lagen wie auch bei den nicht dialysierten Gelen ab einer Konzentration von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel vor, wobei das unfunktionalisierte Hydrogel ähnlich gute Ergebnisse lieferte. Eine Auswertung des Markers Vinculin zeigte erneut eine gute Adhäsion der Zellen auf allen Hydrogelen. Die Untersuchung der U251-MG Zellen im Zusammenhang mit der Konzentration kationischer Gruppen zeigte erneut wie wichtig saubere Materialien in Zusammenhang mit der Kultivierung der Zellen waren. Optimale Kulturbedingungen lagen bei kationischen Hydrogelen ab einer Konzentration von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel vor, wobei kein oberes Limit für die Konzentration kationischer Gruppen gefunden werden konnte. Eine

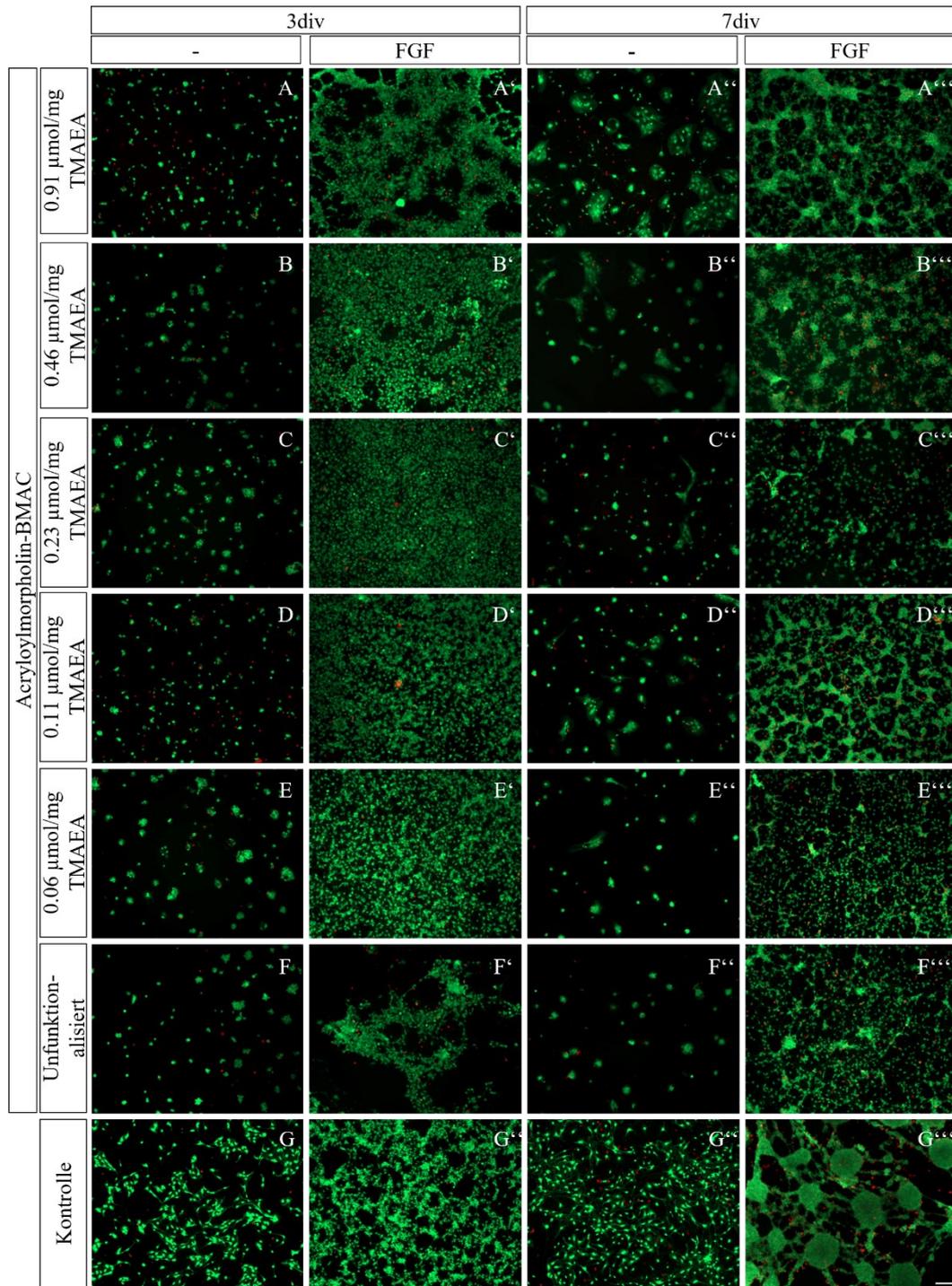
Erhöhung der Konzentration kationischer Gruppen zeigte in diesen Experimenten eine Verbesserung der Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen.



**Abb. 46:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

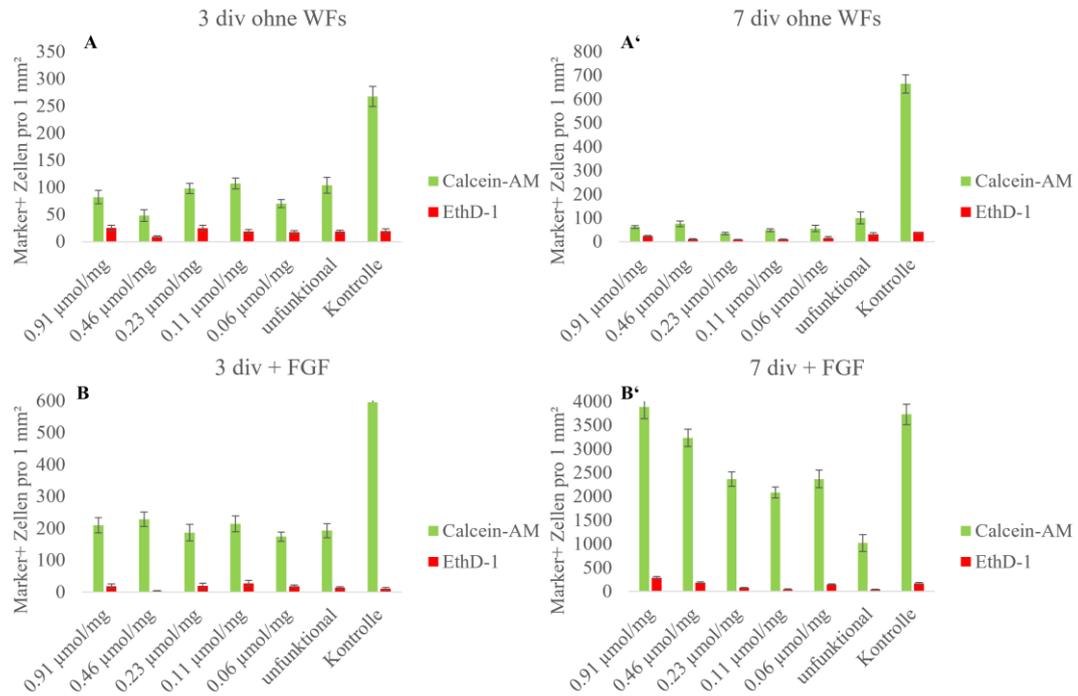
#### **3.4.4 Untersuchung von NSCs in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen**

Nachdem mit Hilfe der robusten U251-MG Zelllinie eine Abhängigkeit der Adhäsion von der Konzentration kationischer Funktionalitäten nachgewiesen werden konnte, wurde diese Abhängigkeit nun auch für NSCs untersucht. Es wurden erneut 40.000 Zellen auf den Hydrogelen ausgesät und diese für insgesamt 7 div kultiviert. Zusätzlich wurden die NSCs in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF untersucht. Dieser wurde in einer Konzentration von 20 ng/mL mit Heparin als Cofaktor als lösliche Komponente hinzugegeben. Nach 3 und 7 div wurden die Hydrogele anhand eines Zellviabilitätsassays und den Differenzierungsmarkern GFAP (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen), O4 (Oligodendrozyten), Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) evaluiert. Die Fluoreszenzaufnahmen des Viabilitätsassays sind in Abb. 47 dargestellt. Sowohl bei der Verwendung von FGF als auch ohne WFs waren nach 3 und 7 div deutlich mehr lebende als tote Zellen auf allen Hydrogelen zu finden. Dennoch war ein deutlicher Unterschied zwischen den Bedingungen ohne WFs (A-F) und mit FGF (A'-F') zu erkennen. Die Verwendung von FGF führte zu einer starken Erhöhung der Anzahl adhärierter Zellen auf den Hydrogelen unter allen Bedingungen, sodass bei allen kationischen Hydrogelen die Oberfläche ähnlich der Kontrolle vollständig mit Zellen bedeckt war (A'-E'). Lediglich das unfunktionalisierte Gel (F') zeigte einen leichten Unterschied. Hier war ein kleinerer Bereich mit Zellen bedeckt, wobei in diesem Bereich die Zahl adhärierter Zellen im Vergleich zu dem Hydrogel ohne WFs (F) deutlich erhöht war. Auch die Morphologie der NSCs unterschied sich bei der Verwendung von FGF. Die NSCs bildeten, vor allem nach 7 div, große untereinander vernetzte Aggregate aus, während ohne FGF einzelne Zellen untereinander Netzwerke ausbildeten. Eine genauere Betrachtung der Morphologie anhand der Differenzierungsmarker erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt. Grundsätzlich waren die NSCs gleichmäßig auf den Hydrogelen verteilt.



**Abb. 47:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Die statistische Auswertung der Viabilitätsassays ist in Abb. 48 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle ( $268 \pm 18$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>) waren nach 3 div (A) ohne WFs auf den Hydrogelen deutlich weniger lebende Zellen/mm<sup>2</sup> zu finden (zwischen  $48 \pm 11$  für  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel und  $107 \pm 10$  für  $0.11 \mu\text{mol/mg}$  Gel). Eine Abhängigkeit der Adhäsion von der Konzentration kationischer Gruppen trat hierbei nicht auf. Auch nach 7 div konnte keine Abhängigkeit festgestellt werden. Bei den Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.91$ ,  $0.23$ ,  $0.11$  und  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel sank die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div leicht ab, während die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> für die Konzentration  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel von  $48 \pm 11$  auf  $76 \pm 12$  leicht zunahm. Bei dem unfunktionalisierten Hydrogel lagen nach 3 und 7 div nahezu gleich viele Zellen/mm<sup>2</sup> vor ( $104 \pm 15$  nach 3 div und  $100 \pm 25$  nach 7 div). Bei der Kontrolle hingegen stieg die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> von 3 div ( $268 \pm 18$ ) auf 7 div ( $664 \pm 39$ ) deutlich an. Bei den Hydrogelen in Kombination mit FGF trat hingegen ein deutlicher Unterschied zwischen den Bedingungen auf. Zunächst einmal waren nach 3 div mehr lebende Zellen/mm<sup>2</sup> bei allen Bedingungen vorhanden (zwischen  $173$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> für  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel und  $228$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> für  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel). Auch hier war die Zahl lebender Zellen unabhängig von der Konzentration kationischer Funktionalitäten. Eine deutliche Änderung war nach 7 div zu sehen. Hier war nicht nur eine klare Tendenz in Abhängigkeit der Konzentration kationischer Gruppen zu erkennen, sondern auch eine enorme Steigerung der Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup>. Die kleinste Steigerung war dabei bei dem unfunktionalisierten Gel zu sehen. Hier stieg die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> von  $193 \pm 22$  nach 3 div auf  $1020 \pm 177$  nach 7 div. Die größte Steigerung war bei der höchsten Konzentration von  $0.91 \mu\text{mol/mg}$  Gel von  $209 \pm 24$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> auf  $3886 \pm 252$  zu finden. Dabei war die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> erstmals leicht höher als bei der Kontrolle ( $3726 \pm 212$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Eine untere Grenzkonzentration lag bei  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel vor. Niedrigere Konzentrationen ( $0.23$ ,  $0.11$  und  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel) zeigten sehr ähnliche Zahlen lebender Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div ( $2368 \pm 152$ ,  $2085 \pm 114$  und  $2367 \pm 186$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>). Ab einer Konzentration von  $0.46 \mu\text{mol/mg}$  Gel hingegen stieg die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> stärker an (hier  $3232 \pm 183$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>).

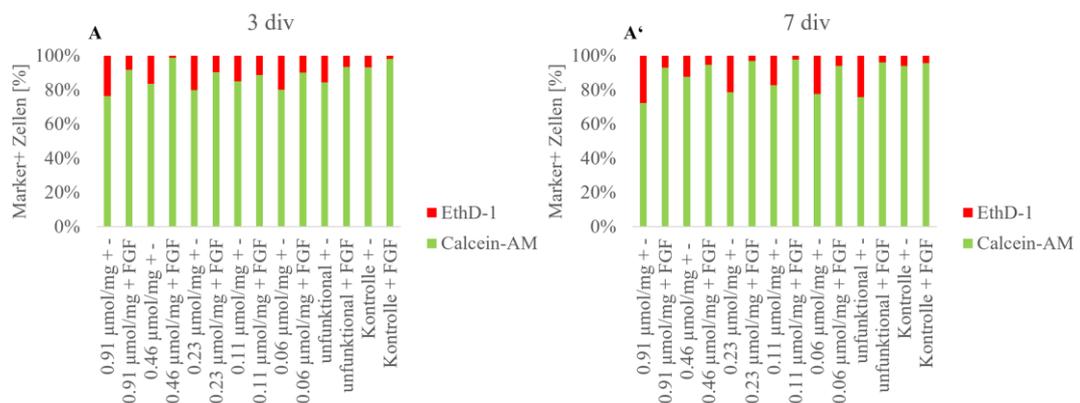


**Abb. 48:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF nach 3 (B) und 7 div (B') verwendet. Die statistische Auswertung wurde über Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Verwendung einer kationischen Gruppe allein schien bei diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Adhäsion lebender Zellen zu haben. Unabhängig der Konzentration lagen sowohl nach 3 als auch 7 div eine ähnliche Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> auf allen Hydrogelen vor, während auf der Kontrolle deutlich mehr Zellen vorhanden waren. Da die Hydrogele selbst keinen Einfluss auf das Verhalten der Zellen hatten, nahm die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> mit fortlaufender Dauer ab. Im Vergleich zu den Hydrogelen nimmt FGF einen direkten Einfluss auf das Verhalten der NSCs. Eine Verbesserung der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> durch die Verwendung von FGF kann über den Einfluss von FGF auf die Proliferation der NSCs erklärt werden. Durch die verbesserte Proliferation lagen insgesamt mehr Zellen vor, welche auf den Gelen adhären konnten. Dennoch ging aus den Experimenten bei der Verwendung von FGF eine Abhängigkeit der Anzahl lebender Zellen von der Konzentration kationischer Gruppen hervor, welche ohne FGF nicht auftrat. Eine mögliche Erklärung ist die Interaktion der kationischen Gruppe mit dem Cofaktor Heparin, wodurch dieses an die Oberfläche der Hydrogele angelagert werden konnte. Heparin ist in einem zweiten Schritt in der Lage mit FGF2 zu interagieren und dieses ebenfalls an die Oberfläche anzulagern. Dadurch lag FGF in direkter Nähe zu den Zellen vor und der Einfluss von FGF auf die Zellen konnte

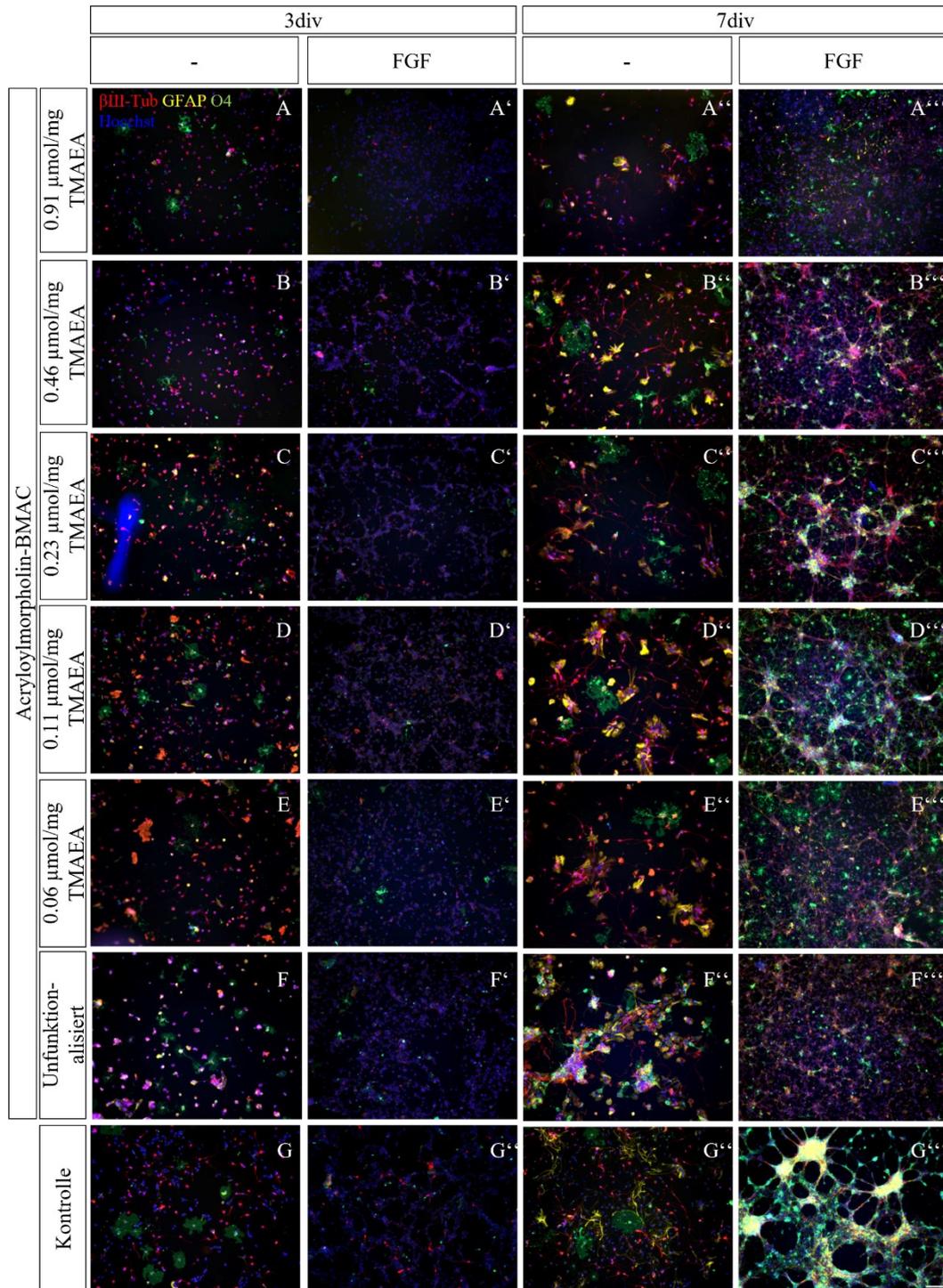
nochmal deutlich erhöht werden. Hierbei schien ein synergistischer Effekt zwischen der kationischen Gruppe und FGF bei fortschreitender Dauer der Experimente aufzutreten. Je höher die Konzentration an kationischen Gruppen war, desto mehr FGF konnte auf dem Hydrogel anlagern, um die Proliferation der NSCs zu verbessern.

Die Überlebensfähigkeit der NSCs auf den Hydrogelen, dargestellt durch das Verhältnis lebender zu toten Zellen, ist in Abb. 49 dargestellt. In allen Fällen lag die Überlebensfähigkeit über 72 %, meist sogar über 80 %. Die niedrigste Überlebensfähigkeit trat nach 7 div bei der höchsten kationischen Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel auf. Für die meisten Hydrogele ohne WFs nahm die Überlebensfähigkeit mit fortlaufender Dauer ab. Die Verwendung von FGF führte in allen Fällen zu einem Anstieg der Überlebensfähigkeit auf über 90 % nach 3 div. Nach 7 div nahm die Überlebensfähigkeit bei Verwendung von FGF bei allen Bedingungen noch einmal auf über 93 % zu, wobei bei einer Konzentration von 0.23 und 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit 97 %, bzw. 98 % die höchsten Überlebensfähigkeiten vorlagen. Bei der Verwendung von FGF trat nicht nur eine erhöhte Anzahl lebender Zellen/ $\text{mm}^2$  auf, sondern auch die Anzahl toter Zellen/ $\text{mm}^2$  war unter allen Bedingungen deutlich erhöht. Während nach 3 div die Zahl toter Zellen/ $\text{mm}^2$  grundsätzlich bei allen Bedingungen geringer war als ohne WFs, lagen nach 7 div deutlich mehr tote Zellen/ $\text{mm}^2$  vor. So zeigte die Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel statt zuvor  $24 \pm 3$  tote Zellen pro  $\text{mm}^2$   $292 \pm 25$  tote Zellen/ $\text{mm}^2$ . Dennoch hatte FGF einen positiven Einfluss auf die Überlebensfähigkeit.



**Abb. 49:** Überlebensfähigkeit von NSCs auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF verwendet. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit EthD-1 (rot) markiert.

Eine qualitative Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen (siehe Abb. 50) mit den Markern  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) zeigte, dass die NSCs unter allen Bedingungen differenzierten. Die differenzierten Zellen zeigten die typische Morphologie für den jeweiligen Zelltyp (siehe Abb. 1). Die Neuronen zeigten eine typische Ausbildung von Dendriten, während Oligodendrozyten einige wenige verzweigte Fortsätze ausbildeten.

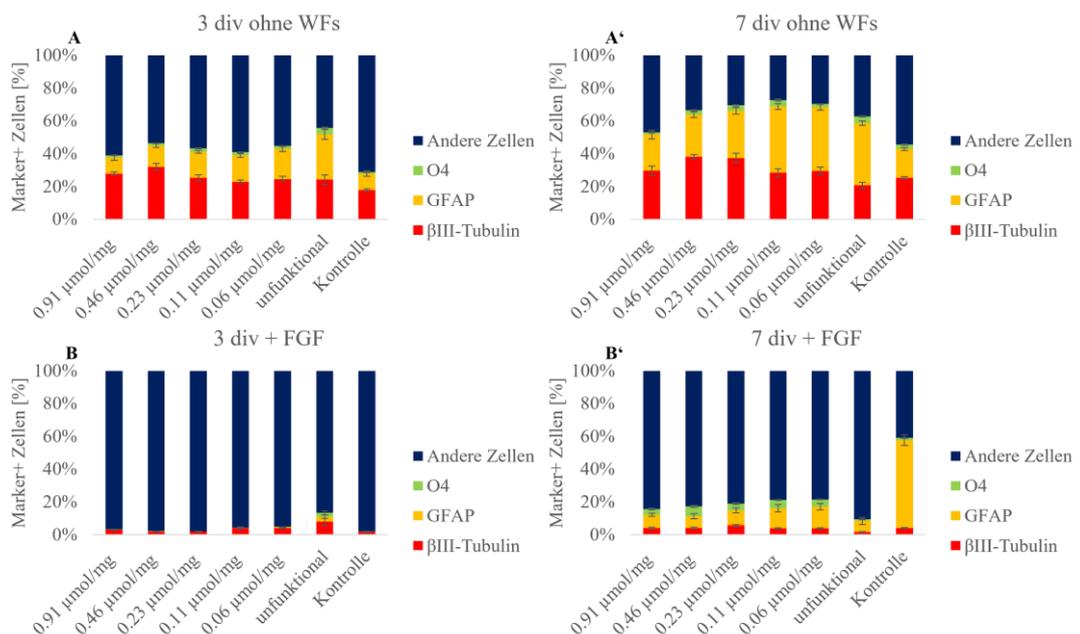


**Abb. 50:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Zusätzlich wurden die Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-G', A'''-G'''). Als Differenzierungsmarker wurden GFAP (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ .

Ein großer Unterschied lag zwischen den Hydrogelen mit FGF und ohne WFs vor. Nach 3 div waren auf den Hydrogelen mit FGF bei allen Bedingungen inklusive der Kontrolle nahezu ausschließlich Zellkerne (blaue Farbe durch Hoechst Färbung, A'-G') zu sehen. Dies deutete darauf hin, dass hier nur wenige Zellen differenzierten. Nach 7 div hingegen zeigten auch die Hydrogele in Kombination mit FGF eine Vielzahl differenzierter Zellen, wobei diese mit Zunahme der kationischen Konzentration abnahm. Auf den Hydrogelen ohne WFs befanden sich nach 3 und 7 div prozentual gesehen deutlich mehr differenzierte Zellen als auf den Hydrogelen mit FGF. Eine statistische Auswertung der Marker positiven Zellen (siehe Abb. 51) ergab für die Hydrogele in Kombination mit FGF nach 3 div lediglich eine Differenzierung aller Zellen zwischen 2.0 % (0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel) und 13.3 % (unfunktionalisiertes Hydrogel). Im Vergleich dazu war die Differenzierung bei den Hydrogelen ohne WFs nach 3 div mit 39.0 % (0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel) bis 55.7 % (unfunktionalisiertes Hydrogel) deutlich höher. Auffällig war für beide Konditionen, dass auf den unfunktionalisierten Hydrogelen deutlich mehr Zellen differenzierten als auf den kationischen Hydrogelen. Die höchste Differenzierung zeigte bei den kationischen Hydrogelen mit FGF nach 3 div das Hydrogel mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (4.8 % differenzierte Zellen), wohingegen ohne WFs das Hydrogel mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (46.4 %) die höchste Differenzierung zeigte. Der Unterschied zwischen den kationischen Gelen war hier allerdings jeweils sehr gering (2.1 - 4.8% mit FGF und 39.0 - 46.4 % ohne WFs) und es konnte keine Abhängigkeit der Differenzierung von der Konzentration kationischer Gruppen festgestellt werden. Ein großer Unterschied lag allerdings bei der Differenzierung in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten vor. Die folgenden Prozentzahlen stellen den Anteil der jeweiligen Zelltypen von der Gesamtzahl differenzierter Zellen dar. Sowohl bei der Verwendung von FGF als auch ohne WFs, waren auf den unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 div die wenigsten Neuronen zu finden (59.9 % mit FGF, 43.5 % ohne WFs) und dafür deutlich mehr Astrozyten (22.6 % mit FGF, 49.6 % ohne WFs) und Oligodendrozyten (17.4 % mit FGF, 6.9 % ohne FGF) im Vergleich zu den kationischen Hydrogelen. Auffällig war, dass bei den unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit FGF weniger Astrozyten und mehr Oligodendrozyten und Neuronen gebildet wurden. Bei den kationischen Hydrogelen hingegen lag bei den Hydrogelen ohne WFs nach 3 div eine Abhängigkeit von der

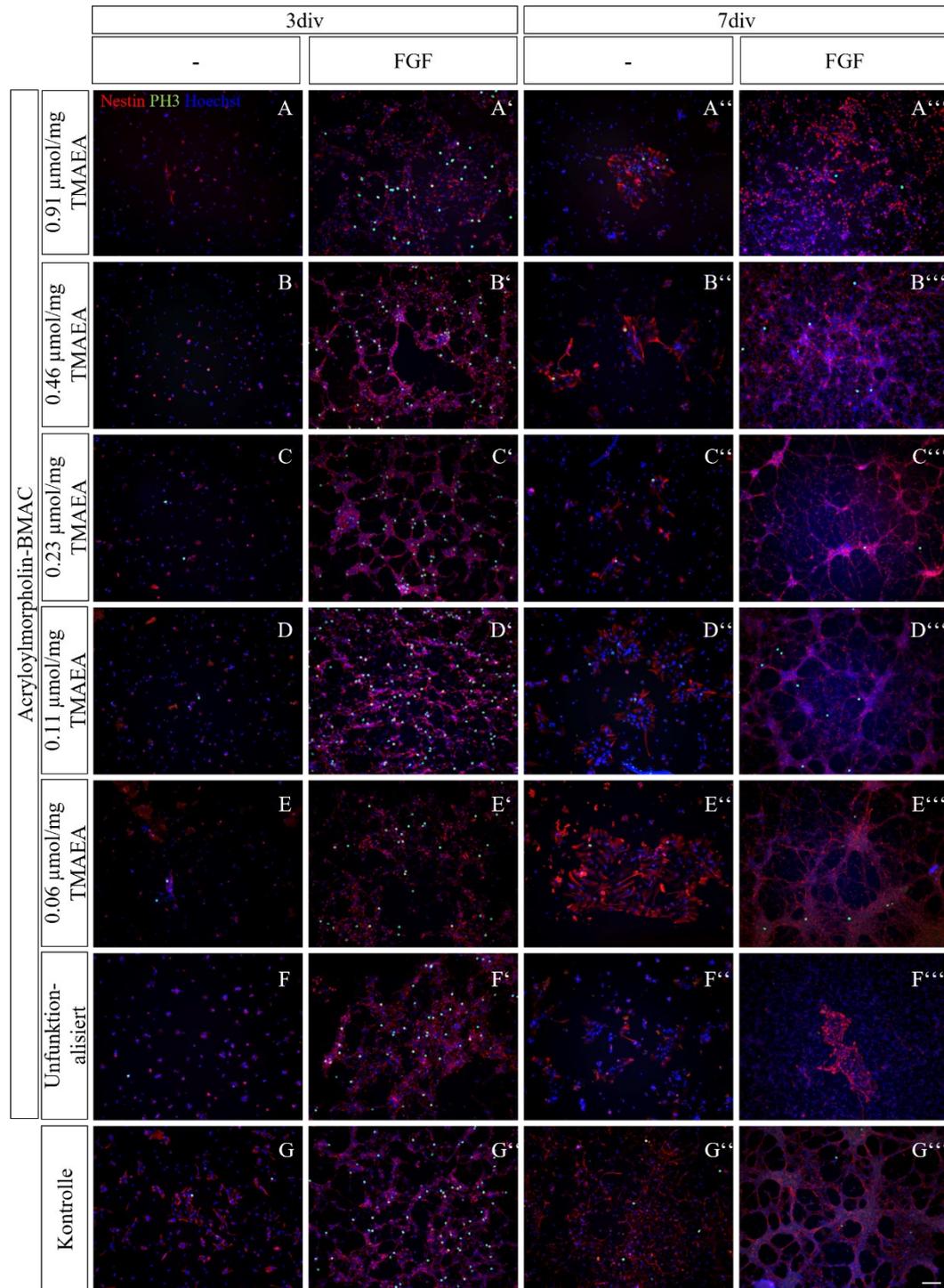
Konzentration kationischer Gruppen vor. So stieg die Differenzierungsrate in Neuronen mit steigender Konzentration an (71.4 % für 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel, 54.8 % für 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel). Gleichzeitig sank die Differenzierungsrate in Astrozyten mit steigender Konzentration (25.0 % für 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel, 49.6 % für 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel). Bei den Oligodendrozyten lag keine Abhängigkeit vor und hier war die Differenzierungsrate zwischen 3.3 % (0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel) und 5.0 % (0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel). Die Verwendung von FGF in Kombination mit kationischen Hydrogelen zeigte keine bestimmten Tendenzen in Abhängigkeit der kationischen Funktionalität. Dennoch lagen hier im Vergleich zu den Hydrogelen ohne WFs deutlich mehr Neuronen vor (84.4 % für 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel bis 92.6 % für 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel). Dementsprechend sank auch die Differenzierungsrate in Astrozyten (zwischen 5.5 % für 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel und 14.7 % für 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel) und Oligodendrozyten (zwischen 0.8 % für 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel und 2.0 % für 0.23 und 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel). Auf der Kontrolle lagen ebenfalls nach 3 div hauptsächlich Neuronen (84.8 % mit FGF, 61.8 % ohne FGF) vor. In Kombination mit FGF war die Differenzierungsrate in Astrozyten deutlich vermindert (6.6 % mit FGF, 35.0 % ohne FGF), wohingegen die Differenzierungsrate in Oligodendrozyten erhöht war (8.9 % mit FGF, 3.2 % ohne FGF). Nach 7 div änderten sich diese Verhältnisse deutlich. So lagen auf allen Gelen in Kombination mit FGF deutlich mehr Astrozyten als Neuronen und Oligodendrozyten vor. Aber auch der Anteil an Oligodendrozyten nahm für fast alle Bedingungen zu im Vergleich zu 3 div. Bei den kationischen Hydrogelen konnte erneut eine Abhängigkeit des Zelltyps von der Konzentration kationischer Gruppen festgestellt werden. Trotz der insgesamt geringeren Differenzierungsrate in Neuronen, lagen bei der höchsten Konzentration an kationischen Gruppen die meisten Neuronen vor (25.6 % mit FGF, 55.7 % ohne WFs). Die geringste Differenzierungsrate in Neuronen zeigte erneut das unfunktionalisierte Hydrogel (17.3 % mit FGF, 32.9 % ohne WFs). Gegensätzlich sank die Differenzierungsrate in Astrozyten. Hier zeigte das unfunktionalisierte Hydrogel die höchste Differenzierungsrate (72.3 % mit FGF, 60.6 % ohne WFs), wohingegen die geringste Rate bei 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel vorlag (51.6 % mit FGF, 41.9 % ohne WFs). Eine Ausnahme war das Hydrogel mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel. Hier war die Differenzierung in Neuronen ohne WFs leicht erhöht im Vergleich zu den anderen Konzentrationen (57.2 %). Zeitgleich war die Differenzierungsrate in Astrozyten geringer (38.8 %). Bei den Hydrogelen in Kombination mit FGF lag nach

7 div ebenfalls eine hohe Differenzierungsrate in Oligodendrozyten vor. Hier wies das Hydrogel mit 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel die höchste Differenzierungsrate mit 34.0 % auf (4.0 % ohne WFs). Die geringste Differenzierungsrate in Oligodendrozyten zeigte das unfunktionalisierte Hydrogel mit 10.4 % (6.5 % ohne WFs). Ohne die Verwendung von FGF zeigte das unfunktionalisierte Hydrogel allerdings die höchste Differenzierung in Astrozyten. Bei der Kontrolle war auffällig, dass zunächst nach 3 div und in Kombination mit FGF hauptsächlich Neuronen (84.8 %) vorlagen, während nach 7 div hauptsächlich Astrozyten vorlagen (90.8 %). Zu beachten war, dass hier die Neuronen nicht verloren gingen, sondern im Vergleich zu 3 div nach 7 div deutlich mehr Zellen differenziert vorlagen und hauptsächlich Astrozyten im Verlauf der Kultivierung gebildet wurden. Die Differenzierung fand nach 3 div nur in geringem Maße statt, da durch FGF die Proliferation der Zellen verbessert wurde. Während in den ersten drei Tagen der Kultivierung hauptsächlich Neuronen gebildet wurden, differenzierten im weiteren Verlauf die NSCs verstärkt zu Astrozyten. Dennoch konnte eine klare Abhängigkeit des Zelltyps von der Konzentration kationischer Gruppen nachgewiesen werden. Dieser Abhängigkeit tritt sowohl mit als auch ohne WFs auf. Je höher die Konzentration kationischer Gruppen war, desto mehr Neuronen wurden gebildet. Gleichzeitig führte die Verwendung von FGF zu einer Erhöhung der Differenzierung in Oligodendrozyten für alle Bedingungen.



**Abb. 51:** Statistische Auswertung der Marker positiven NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlicher kationischer Konzentration. Als Kontrolle wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Als Differenzierungsmarker wurden GFAP (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) und O4 (Oligodendrozyten) verwendet. Nicht differenzierte Zellen, welche nicht durch die Marker angefärbt wurden, werden als andere Zellen beschrieben. Die statistische Auswertung fand über drei Versuche statt.

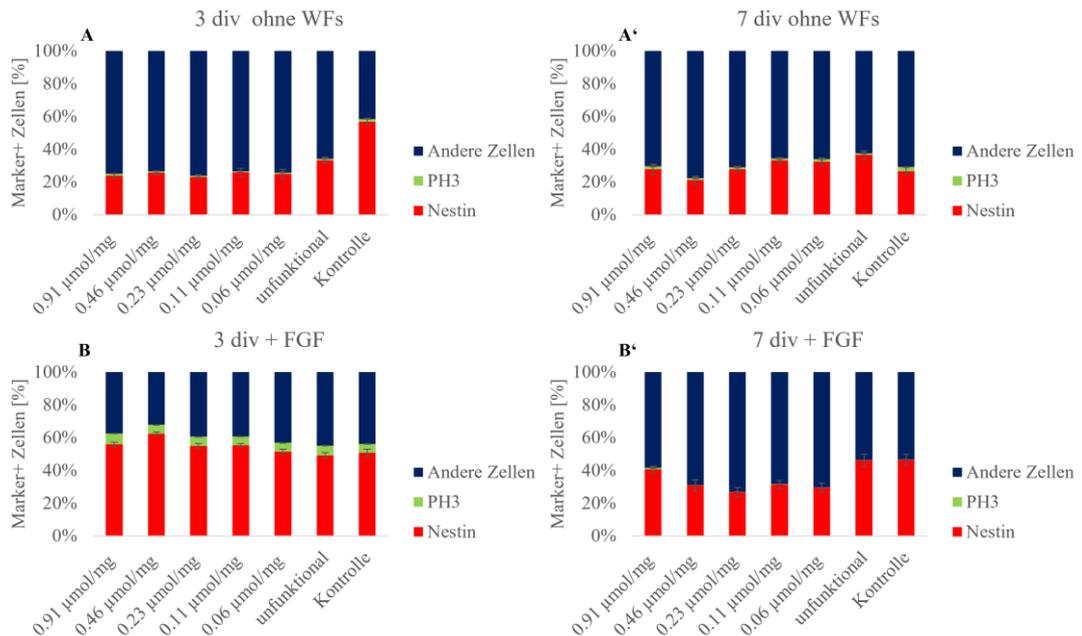
Die Hydrogele mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen wurden zusätzlich mit den Fluoreszenzmarkern Nestin und PH3 untersucht. Nestin ist in der Lage Vorläuferzellen, also solche Zellen, die in der Lage sind zu differenzieren, anzufärben. PH3 hingegen färbt teilungsaktive Zellen an. Die Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 52 zeigten für alle Konzentrationen bei einer Kultivierung ohne WFs nur eine sehr geringe Zahl teilungsaktiver Zellen (A-F, A''-F''), wohingegen die Zahl teilungsaktiver Zellen bei den Hydrogelen mit FGF nach 3 div deutlich höher ausfiel (A'-F'). Nach 7 div ging die Zahl teilungsaktiver Zellen allerdings stark zurück (A'''-F'''). Dennoch zeigten auch die Hydrogele ohne WFs nach 3 und 7 div einige Vorläuferzellen, welche in der Lage waren zu differenzieren. Die Zahl der Vorläuferzellen auf Hydrogelen in Kombination mit FGF waren allerdings bei beiden Zeitpunkten deutlich höher als auf den Hydrogelen ohne WFs (A'-F'). Die Kontrolle zeigte im Vergleich mit den Hydrogelen nach 3 und 7 div mehr Vorläuferzellen, sowohl mit als auch ohne FGF (G-G'''). Auch auf der Kontrolle war die Zahl teilungsaktiver Zellen nach 3 und 7 div sehr gering. Die qualitative Betrachtung dieser Färbung zeigte bereits, dass die Zugabe von FGF zu einer starken Erhöhung der Proliferation der Zellen führte, wohingegen ohne FGF nur sehr wenig teilungsaktive Zellen vorlagen.



**Abb. 52:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Zusätzlich wurden die Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-G', A'''-G'''). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.

Die Fluoreszenzfärbung mit den Markern Nestin und PH3 wurde zusätzlich statistisch ausgewertet. Die Auswertung ist in Abb. 53 dargestellt. Auffällig war der enorme Unterschied in der Anzahl an Nestin und PH3 positiven Zellen bei den Hydrogelen in Kombination mit FGF und ohne WFs. Nach 3 div lagen ohne WFs

etwa 20 - 30 % der gesamten Zellen als Vorläuferzellen vor (A) und nur ca. 1 % der Zellen waren teilungsaktiv. Die meisten Vorläuferzellen zeigte die Kontrolle mit 57 %. Während die Anzahl der Vorläuferzellen für alle Hydrogele bei der Zugabe von FGF auf 50 - 60 % anstieg, sank die Anzahl für die Kontrolle auf 51 % (B). Auch stieg die Anzahl teilungsaktiver Zellen durch die Zugabe von FGF um das ca. 5-fache auf 5 - 6 % für die Hydrogele und die Kontrolle an. Nach 7 div stieg für die Hydrogele ohne WFs die Anzahl der Vorläuferzellen auf 27 - 36 % leicht an (A'), wohingegen die Anzahl der Vorläuferzellen bei den Hydrogelen mit FGF auf 26 - 40 % sank (B'). Auffällig war, dass die Zahl teilungsaktiver Zellen nach 7 div in Kombination mit FGF auf 0.1 - 0.9 deutlich abnahm. Bei den Hydrogelen ohne WFs nahm die Zahl teilungsaktiver Zellen auf 1.0 - 1.9 leicht zu. Diese Färbung zeigte, dass durch die Zugabe von FGF die Proliferation der NSCs auf den Hydrogelen hauptsächlich nach 3 div stark gesteigert werden konnte und nach 7 div verstärkt die Differenzierung der Zellen eintrat. Eine Abhängigkeit von der Konzentration kationischer Gruppen für Vorläufer- und teilungsaktive Zellen wurde nicht gefunden. Alle Hydrogele zeigten in einem gewissen Bereich dieselbe Zahl Marker positiver Zellen.

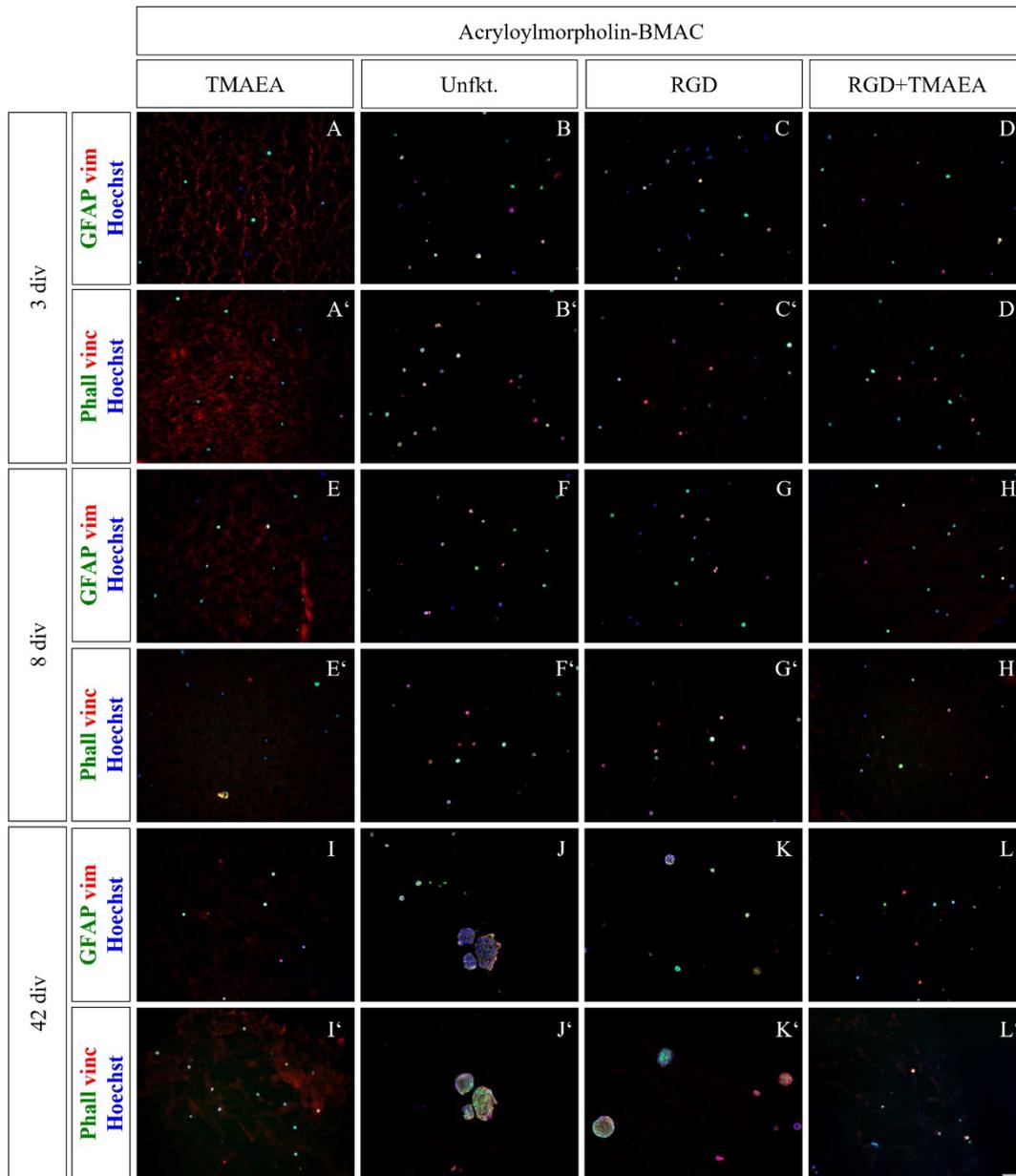


**Abb. 53:** Statistische Auswertung der Marker positiven NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlicher kationischer Konzentration und unfunktionalisierten Hydrogelen. Als Kontrolle wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Als Differenzierungsmarker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Nicht differenzierte Zellen, welche nicht durch die Marker angefärbt wurden, werden als andere Zellen beschrieben. Die statistische Auswertung fand über drei Versuche statt.

### 3.5 Ausblick auf erste 3D Zelleexperimente

Zusätzlich zur 2D-Kultivierung der NSCs und U251-MG Zellen wurde eine Methode zur Herstellung von 3D-Zell-Hydrogel-Präparaten untersucht. Dabei wurden die Hydrogele nicht wie zuvor in SDS-Page-Kammern hergestellt, sondern Parafilm verwendet. Mit Hilfe eines 100  $\mu$ L Spitzenkastens wurden in das Parafilm Vertiefungen gedrückt, sodass in diesen Vertiefungen tropfenförmige Hydrogele hergestellt werden konnten. Dazu wurden insgesamt 80  $\mu$ L der Gellösung in die Vertiefungen gegeben. Zur Verkapselung der Zellen wurden diese als Zellsuspension in Medium während der Herstellung der Hydrogele zur Gellösung gegeben, bevor der Vernetzer hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden nach 3, 8 und 42 div untersucht. Dazu wurden Kryoschnitte der einzelnen Proben angefertigt, sodass jeweils eine Ebene des 3D-Hydrogels untersucht werden konnte. Die Kryoschnitte konnten dann wie auch bei den 2D-Zelleexperimenten mit verschiedenen Markern angefärbt werden. In einer ersten Untersuchung wurden U251-MG Zellen untersucht und mit GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) angefärbt. In Abb. 54 sind die Fluoreszenzaufnahmen der Kryoschnitte dargestellt. Deutlich zu erkennen war dabei die gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb des Gels unter allen Bedingungen. Im Vergleich zu der gestreckten Morphologie in den 2D-Zelleexperimenten der U251-MG Zellen (vergleiche Abb. 25) zeigten die Zellen in den 3D-Zelleexperimenten eine deutlich runde Morphologie. Dies ist ein verbreitetes Verhalten von Zellen, welche unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert werden.<sup>[161]</sup> In 2D-Zelleexperimenten liegen die Zellen auf der Oberfläche des Substrates. Zur Vergrößerung des Kontakts mit der Oberfläche nehmen die Zellen eine gestreckte Morphologie an. In einer 3D-Umgebung hingegen ist die Zelle von dem Substrat vollständig umgeben, weshalb diese mit ihrer runden Morphologie bereits einen ausreichend hohen Kontakt zu dem Substrat besitzt und keine gestreckte Morphologie angenommen werden muss. Die Zellen nach 3 div (A-D) unterschieden sich kaum von den Zellen nach 42 div (I-L). Lediglich bei dem unfunktionalisierten Hydrogel (B/F/J) und in geringem Maße bei dem RGD-Hydrogel (C/G/K) trat nach 42 div eine Aggregation der Zellen auf. Dies zeigte, dass die Zellen in der Lage waren innerhalb des Hydrogels zu migrieren. Weiterhin war dies ein Hinweis darauf, dass die Zellen auch nach 42 div noch lebten. Diese Aggregation der Zellen tritt allerdings nicht bei den kationischen Hydrogelen auf.

Grund hierfür könnte die elektrostatische Wechselwirkung der negativ geladenen Zellmembran mit der kationischen Ladung gewesen sein. Die Zellen schienen hier nicht in der Lage gewesen zu sein diese Wechselwirkung der Ladungen aufzuheben, sodass Zellen migrieren könnten. Da diese 3D-Zelleexperimente lediglich eine erste Untersuchung zur Präparation von verkapselten Zellen in Hydrogelen darstellten, wurde dieses Verhalten nicht weiter untersucht.



**Abb. 54:** Fluoreszenzaufnahmen von Kryoschnitten mit U251-MG Zellen kultiviert in 3D-Hydrogelen mit der kationischen Gruppe **TMAEA** (A/E/I), auf unfunktionalisierten Hydrogelen (B/F/J), mit dem Peptid RGD (C/G/K) und mit einem kombinierten Gel aus **TMAEA** und RGD nach 3 (A-D, A'-D'), 8 div (E-H, E'-H') und 42 div (I-L, I'-L'). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (vim, Zytoskelett), Vinculin (vinc, fokale Adhäsion), Phalloidin (Phall, Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Die Experimente zeigten, dass sich diese Art der Präparation zur Verkapselung von Zellen eignete. Bei den U251-MG Zellen wurden die jeweilige Polymer- und Vernetzlerlösungen lediglich in sterilem PBS-Puffer hergestellt und dennoch überlebten die Zellen 42 div innerhalb des Hydrogels. Wie die vorherigen 2D-Zellexperimente bereits zeigten, müssen für die Verwendung von NSCs zur Verkapselung die jeweiligen Komponenten zuvor, z.B. durch Dialyse, von allen Verunreinigungen gereinigt werden. Auch zeigte die Herstellung der Kryoschnitte teilweise einige Probleme. So wurde z.B. bei den **TMAEA**-Hydrogelen die Oberfläche durch den Schnitt sehr rau, wodurch sich der Farbstoff dort besser ablagern konnte und zu einer intensiven Färbung bei der Mikroskopie führte. Teilweise stach dadurch das Hydrogel selbst in der Mikroskopie deutlich hervor, was die Auswertung erschwerte.

### 3.6 Fazit

Basierend auf den Hydrogelsystemen von BOLDUAN und PÄTZOLD konnten erfolgreich funktionalisierte Hydrogele hergestellt werden, welche zur Kultivierung von NSCs und U251-MG Zellen eingesetzt werden konnten. Diese Gele waren hauptsächlich aus **AMor** und **BMAC** aufgebaut, besaßen aber teilweise auch weitere Motive wie z.B. **TMAEA** oder das Peptid RGD. Anhand der U251-MG Zellen konnte zunächst die Kompatibilität des Hydrogelsystems mit Zellen untersucht werden. Dabei wurden Hydrogele mit einer Steifigkeit von 2500 - 3500 Pa und einer Quellung von ca. 10 verwendet. Es konnte der Einfluss unterschiedlicher Bedingungen auf die Kultivierung der Zellen untersucht werden. Hierbei stach vor allem das kationische Hydrogel mit einer stark erhöhten Anzahl adhärerter Zellen hervor, welches durch Kombination mit dem Peptid RGD nochmals deutlich gesteigert werden konnte (vgl. Abb. 25). Weiterhin konnte der Einfluss der kationischen Funktionalitäten in Abhängigkeit der Konzentration untersucht werden. Hierbei war die Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> bei den nicht dialysierten Gelen abhängig von der Konzentration der kationischen Funktionalitäten. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Mindestkonzentration an kationischen Gruppen von 0.46 µmol/mg notwendig war, um eine Steigerung der Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> zu ermöglichen. Unterhalb dieser Konzentration war die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> für alle Konzentrationen nahezu identisch. Bei der Verwendung von dialysierten Hydrogelen war dieser Trend ebenfalls aufzufinden. Hier trat der Effekt allerdings

erst nach 7 div auf, wohingegen er ohne Dialyse bereits nach 3 div deutlich zu erkennen war. Eine Dialyse der Hydrogele führte zusätzlich zu einer Steigerung der Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> auf den Hydrogelen mit einer geringen Konzentration kationischer Gruppen.

Bei der Kultivierung von NSCs konnten viele verschiedene Parameter wie z.B. die Zugabe von Proteinen (Laminin, TNC) oder Wachstumsfaktoren, bzw. der Einfluss von Vernetzern, Monomeren oder von Steifigkeiten der Hydrogele auf die Kultivierung untersucht werden. Mit Hilfe der Dialyse war es in dieser Arbeit erstmals möglich NSCs mit einer ausreichenden Überlebensfähigkeit auf den Hydrogelen zu kultivieren. Hier zeigte vor allem die Zugabe von Wachstumsfaktoren in Kombination mit kationischen Hydrogelen einen enormen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der NSCs. Ohne Wachstumsfaktoren überlebten nur wenige hundert Zellen auf den Hydrogelen und die Zugabe von Wachstumsfaktoren führte zu einer bis zu 40-fachen Erhöhung der Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup>. Solch ein Effekt von FGF2 auf die Kultivierung von NSC wurde 2009 ebenfalls von FREUDENBERG *et al.* beschrieben und konnte für das **BMAC**-Hydrogelsystem bestätigt werden.<sup>[102]</sup> Während FREUDENBERG *et al.* mit Hilfe eines kovalent gebundenen Heparins FGF2 auf dem Hydrogel immobilisieren konnte, wurde in dieser Arbeit zunächst in einem ersten Schritt über elektrostatische Wechselwirkungen Heparin auf dem Hydrogel abgelagert, welches in einem zweiten Schritt mit dem FGF2 interagiert. In beiden Fällen führte die Wechselwirkung von FGF2 mit den NSC zu einer enormen Steigerung der Überlebensfähigkeit und Proliferation, wobei die Differenzierung zunächst gehindert wurde. Im Gegensatz zu den Experimenten von FREUDENBERG *et al.* zeigte das **BMAC**-Hydrogelsystem nach 7 div allerdings eine ausgeprägte Differenzierung. Weiterhin konnte der Einfluss der Konzentration kationischer Gruppen auch in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF auf die Kultivierung der NSCs untersucht werden. Während nach 3 div nahezu dieselbe Anzahl an Zellen/mm<sup>2</sup> bei allen Konzentrationen vorhanden war, nahm, wie auch zuvor bei den U251-MG Zellen, die Anzahl adhärierter Zellen/mm<sup>2</sup> bei der höchsten Konzentration kationischer Gruppen nach 7 div am stärksten zu. Hierbei konnten erstmals mehr Zellen als auf der Kontrolle nachgewiesen werden. Auch hier konnte eine Grenzkonzentration von 0.46 µmol/mg Gel nachgewiesen werden, ab welcher die Adhäsion der NSCs stärker anstieg. Die verwendeten Konzentrationen befinden sich

im Bereich der von HYNES *et al.* beschriebenen Konzentrationen von PLL von 0.1 - 3.0  $\mu\text{mol/mg}$ , welche bereits ausreichend waren um die Adhäsion von NSC auf Hydrogelen zu verbessern.<sup>[110]</sup> Auch in dieser Arbeit waren bei der Kultivierung von NSC auf dialysierten Hydrogelen jegliche verwendete Konzentration kationischer Gruppen ausreichend, um die Adhäsion der Zellen auf den Hydrogelen zu verbessern.

Die Untersuchung des Zellverhaltens mit verschiedenen Markern zeigte einen starken Einfluss der Konzentration kationischer Gruppen auf die Differenzierung der Zellen. Während auf unfunktionalisierten Hydrogelen hauptsächlich Astrozyten vorlagen, zeigten kationische Hydrogele eine erhöhte Zahl an Neuronen. Hier stieg die Zahl der Neuronen mit steigender Konzentration. Im Gegensatz zu den Experimenten von CAI *et al.* aus dem Jahre 2012 zeigte das **BMAC**-Hydrogelsystem eine eindeutige Abhängigkeit der Differenzierung von der Konzentration kationischer Gruppen.<sup>[111]</sup> Die Arbeitsgruppe von CAI *et al.* zeigten bei der Verwendung von PLL statt **TMAEA** eine ausgeglichene Verteilung von Astrozyten und Neuronen unter allen Bedingungen. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren führte, wie bereits erwartet, nach 3 div zunächst zu einer Verringerung der Differenzierung (gemessen an der Zahl differenzierter Zellen), da hier die Zellen zunächst verstärkt proliferierten. Erst nach 7 div waren auch auf den Hydrogelen in Kombination mit FGF eine Vielzahl differenzierter Zellen aufzufinden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Wachstumsfaktoren bei der Kultivierung von NSCs eine essenzielle Rolle spielten und durch die Kombination mit kationischen Hydrogelen das Verhalten der NSCs während der Kultivierung stark beeinflusst werden konnte. Eine Erhöhung der Konzentration kationischer Gruppen hatte dabei stets einen positiven Einfluss sowohl auf die Anzahl der lebenden Zellen als auch auf die Ausbildung von Neuronen.

Erste Untersuchungen zur Verwendung des Hydrogelsystems zur Verkapselung von Zellen in 3D zeigten eine gute Kompatibilität bei der Herstellung der Hydrogele in Gegenwart von Zellen. Weiterhin zeigten U251-MG Zellen auch nach 42 div eine gute Überlebensfähigkeit und durch die Verwendung von Kryoschnitten konnten die Zellen mit verschiedenen Markern untersucht werden.

#### 4 Hydrogelsystem basierend auf Thiolactonen

Das in Kapitel 3 beschriebene Hydrogelsystem basierend auf **BMAC** konnte zwar erfolgreich für die Kultivierung verschiedener Zellen eingesetzt werden, barg aber einen entscheidenden Nachteil bei der Funktionalisierung mit Peptiden durch die Limitierung des Einbaus von **BMAC** auf Grund der geringen Hydrophilie. Wurde der Anteil an **BMAC** zu groß, war das zunächst hergestellte Organogel so hydrophob, dass die Disulfidbrücke nicht mehr durch DTT gespalten werden konnte. Deutlich wurde dies auf Grund einer Trübung des Hydrogels in Wasser. Während das Gel nach der Herstellung in THF zunächst durchsichtig war, trat eine Trübung ein, wenn das Gel in Wasser dialysiert wurde. Die Trübung war ein Indiz dafür, dass eine Quellung des Gels in Wasser nicht eintrat. Ohne Spaltung des Gels konnten keine Präpolymere erhalten werden. Die in Kapitel 3.1.2 beschriebene Menge **BMAC** zur Herstellung der Peptid Polymere war gleichzeitig die maximale Menge an **BMAC**, welche in das Polymer eingebaut werden konnte. Daraus resultieren mehrere Probleme. Einerseits war durch die limitierte Konzentration an Thiolen die Funktionalisierung mit Peptiden ebenfalls auf diese Konzentration begrenzt. Andererseits war die Anzahl möglicher Vernetzungspunkte limitiert, wodurch ebenfalls die Reichweite der möglichen Steifigkeiten des fertigen Hydrogels nur einen geringen Bereich umfasste. Dadurch konnten nur Hydrogele mit einer Steifigkeit von unter 30.000 Pa betrachtet werden. Die Steifigkeit, im Gegensatz zu der Konzentration der Peptide, konnte ebenfalls über die Verwendung verschieden konzentrierter Lösungen bei der Herstellung der Hydrogele eingestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit dem **BMAC**-System Steifigkeiten zwischen 500 und 20.000 Pa hergestellt werden. Die Limitierung des Einbaus von Peptiden hingegen stellt ein großes Problem dar, da eine Untersuchung der Kultivierung der Zellen in Abhängigkeit der Konzentration nur für einen kleinen Konzentrationsbereich durchgeführt werden könnte. Aus diesem Grund war das zweite Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines neuen Hydrogelsystems, welches einen erhöhten Einbau von Peptiden in das Präpolymer ermöglicht.

##### 4.1 Alternativen zur Konjugation von Peptiden

Grundsätzlich kann zwischen zwei Methoden für den Einbau von Peptiden in das Präpolymer unterschieden werden. Dabei können Peptide als Monomere während der Polymerisation oder nachträglich über polymeranalogue Reaktionen mit funktionellen

Gruppen des Polymers eingebaut werden. Nachfolgend werden die Vor- und Nachteile der Verwendung von Monomeren und polymeranalogen Reaktionen näher beleuchtet.

Die einfachste Methode zur Konjugation von Peptiden stellt die Verwendung von Monomeren während der Polymerisation dar. Hierbei können Peptidmonomere in gewünschter Konzentration eingesetzt werden, um peptidhaltige Polymere herzustellen. Die Herstellung der Präpolymere über die in Kapitel 3 beschriebene Methode in Kombination mit **BMAC** stellte sich allerdings als problematisch dar. Da die Peptidmonomere häufig ein Molekulargewicht von über 1000 g/mol aufweisen und dadurch sterisch sehr anspruchsvoll sind, war die Copolymerisation dieser Monomere oft langsamer im Vergleich zu den anderen Monomeren. Da bei der verwendeten Methode während der Polymerisation ein Organogel entstand, in welchem die Monomere zu den aktiven Kettenenden diffundieren mussten, war der Einbau der sterisch anspruchsvollen Peptidmonomere in einem ersten Test deutlich gehemmt und der Einbau fand nur zu geringen Teilen statt. Grundsätzlich stellt dieser Ansatz eine Möglichkeit zum Einbau von Peptiden in das Polymer dar, wenn ein Polymersystem verwendet wird, welches während der Polymerisation kein Gel ausbildet. Zusätzlich muss für jede zu untersuchende Peptidsequenz ein neues Polymer hergestellt werden. Je nach verwendetem Peptidmonomer müssen unterschiedliche Bedingungen für die Copolymerisation verwendet werden, sodass die Herstellung der peptidhaltigen Polymere sehr aufwändig wäre. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit der Fokus auf polymeranaloge Reaktionen gesetzt.

In den letzten Jahren haben sich mehrere effiziente Kupplungsmethoden zur Herstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten etabliert. Click-Reaktionen zwischen Aziden und Alkinen<sup>[162]</sup>, aktivierte Carbonsäuren wie z.B. *N*-Hydroxysuccinimid-Ester (NHS-Ester) mit Amin<sup>[163]</sup> und Michael-Additionen zwischen Thiolen und Michael-Akzeptoren<sup>[164]</sup> zählen zu den meist verwendeten Methoden. Azide und Alkine sind häufig sehr hydrophobe Motive, weshalb sie sich nicht gut zur Herstellung von Hydrogelen eignen. Der Einbau von Aktivestern, bzw. Säuren, welche polymeranalog in Aktivester umgewandelt werden können, hingegen stellen eine gute Alternative dar, um eine höhere Konzentration an Peptiden im Polymer zu erreichen. Das vorhandene Amin des N-Terminus des Peptids, welches zur Kupplung an das Polymer verwendet werden könnte, ist ein weiterer Vorteil, da hierdurch keine

aufwändige Modifikation der Peptide notwendig wäre. Weiterhin könnten z.B. auch Lysin-Seitenketten für die Reaktion mit Aktivestern verwendet werden. Durch die Verwendung des Amins der Seitenkette wäre hier allerdings die Anwendung auf Peptidsequenzen beschränkt, welche für ihre biologische Aktivität kein Lysin in ihrer Sequenz benötigen. Da bei dem Prozess der Präpolymer Herstellung aus Kapitel 3 die Spaltung der Disulfidbrücke mit DTT in Wasser stattfindet, stellte sich die Verwendung von Aktivestern als Monomere als problematisch dar. Viele Aktivester sind labil gegenüber Hydrolyse und reagieren mit Wasser zu einer Carbonsäure und einem Alkohol. Die Verwendung von NHS als Aktivester stellte sich auf Grund der hohen Hydrolysestabilität als das geeignetste Aktivester-Monomer heraus. Während mit diesem Aktivester Reaktionen in Wasser möglich sind, stellt weiterhin das verwendete DTT zur Spaltung der Disulfidbrücke ein Problem dar. Durch die vorhandenen Hydroxy- und Thiol-Gruppen von DTT ist dieses in der Lage mit dem Aktivester zu reagieren. Dadurch ist die Verwendung eines Aktivester-Monomers zur Herstellung der Polymere des **BMAC**-Systems nicht optimal. Dennoch kann der Aktivester mit einer polymeranalogen Reaktion nach der Spaltung mit DTT hergestellt werden. Ein großer Nachteil hierbei ist die Verwendung von verschiedenen Kupplungsreagenzien, welche nach erfolgter Reaktion entfernt werden müssen. Ein weiteres Problem stellt das freie Thiol nach Spaltung des initialen Organogels dar. Durch Luftsauerstoff kann dieses erneut zu einem Disulfid oxidiert werden. Selbst unter inerten Bedingungen fand diese Reaktion in kleinen Teilen statt, wodurch erneut ein Gel ausgebildet wurde. Grundsätzlich ist diese Reaktion reversibel, wenn eine geringe Menge DTT nach erfolgter Reaktion hinzugegeben wurde. Wie zuvor bereits beschrieben, kann DTT mit Aktivestern reagieren und an das Polymer binden. Je mehr polymeranaloge Reaktionen in Gegenwart der Thiole durchgeführt werden, desto häufiger kommt es zu einer Oxidation der Thiole. Eine Verwendung anderer Spaltungsreagenzien könnte dieses Problem beheben. Auf Grund der genannten Probleme wurden weitere Alternativen zur Konjugation von Peptiden betrachtet.

Die Verwendung von Thiolen zur Konjugation von Peptiden hatte sich in der Vergangenheit bereits bewährt, weshalb eine Möglichkeit zur Erhöhung der Konzentration an Thiolen im Präpolymer gesucht wurde.<sup>[164–167]</sup> Da **BMAC** auf Grund der geringen Hydrophilie lediglich bis zu 8 mol% eingebaut werden konnte,

mussten alternative hydrophilere thiolhaltige Monomere eingesetzt werden. Die Verwendung der Acrylvariante von **BMAC** (Bisacryloylcystamid, BAC) stellt eine Methode dar, um die Hydrophilie des disulfidhaltigen Monomers zu erhöhen. Es wurden Polymere mit BAC anstelle von **BMAC** untersucht und es konnte nachgewiesen werden, dass sich BAC im Vergleich zu **BMAC** deutlich schlechter über die in Kapitel 3 beschriebene Methode in das Präpolymer einbauen lässt. Das Monomer BAC eignete sich demnach nicht als Alternative zu dem verwendeten **BMAC**. Weiterhin wären Monomere ausgehend von z.B. Cystin, durch die vorhandenen Säuren eine weitere Alternative zur Herstellung hydrophiler disulfidhaltiger Monomere. Die direkte Verwendung von thiolhaltigen Monomeren, welche deutlich hydrophiler als die disulfidhaltigen Monomere sind, stören hingegen die Polymerisation. Thiole werden im Rahmen von radikalischen Polymerisationen häufig als Kettenübertragungsreagenzien eingesetzt.<sup>[120]</sup> Durch die Verwendung von Schutzgruppen können thiolhaltige Monomere dennoch in einer Polymerisation eingesetzt werden. Eine interessante Schutzgruppe stellt dabei das Thiolacton dar, welches durch eine Ringöffnung mit einem primären oder sekundären Amin das Thiol freisetzen kann. Dies bringt nicht nur den Vorteil, dass ein thiolhaltiges Monomer in der Polymerisation eingesetzt werden kann, sondern das Polymer nachträglich auch über die Verwendung verschiedener Amine funktionalisiert werden könnte. Die Verwendung eines Thiolactons zur Herstellung von Hydrogelen wurde nachfolgend näher untersucht.

#### 4.2 *N*-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton als Monomer für thiolhaltige Präpolymere

Thiolactone sind schwefelhaltige heterozyklische Verbindungen, welche als interne Thioester der entsprechenden Mercaptosäuren bezeichnet werden können. Sie ähneln in ihrem Aufbau stark den Lactonen, welche innere Ester der entsprechenden Hydroxysäuren sind. Diese Molekülklasse wurde das erste Mal gegen Ende des 19. Jahrhunderts durch Erhitzen der Mercaptosäure unter Abspaltung von Wasser dargestellt (siehe Abb. 56).<sup>[168]</sup> Häufig finden hierbei auch Katalysatoren Anwendung. Während zunächst nur Fünf- bzw. Sechsringe der Thiolactone zugänglich waren, konnten bald auch kleinere Ringgrößen nachgewiesen werden. Diese treten allerdings im Falle der  $\alpha$ -Thiolactone lediglich als instabile Zwischenprodukte auf oder sind im Falle der  $\beta$ -Thiolactone nur unter spezifischen

Bedingungen stabil.<sup>[169,170]</sup> Beispiele von Thiolactonen verschiedener Ringgrößen sind in Abb. 55 dargestellt.

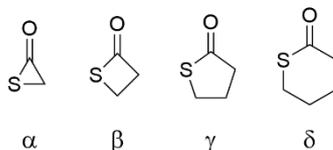


Abb. 55: Beispiele einiger Thiolactone mit unterschiedlichen Ringgrößen.

Thiolactone sind auf Grund ihrer Thioesterstruktur deutlich anfälliger gegenüber Nucleophilen als ihre Lacton-Gegenstücke.<sup>[168]</sup> So kann die Ringstruktur unter geeigneten Bedingungen durch einen nucleophilen Angriff von Aminen, Alkoholen oder Wasser geöffnet werden und die entsprechende lineare Mercaptoverbindung freigesetzt werden.<sup>[171,172]</sup> Funktionalisierte Thiolactone können ausgehend von Mercaptosäuren hergestellt werden. Eines der wichtigsten funktionalisierten Thiolactone ist das Homocystein-Thiolacton, welches, wie in Abb. 56 gezeigt, aus Homocystein, einer natürlich vorkommenden, nicht proteinogene Aminosäure, hergestellt werden kann. Durch das zusätzliche Amin ist dieses Thiolacton ebenso anfällig gegenüber elektrophilen wie nucleophilen Angriffen und erweitert damit das mögliche Anwendungsgebiet enorm. Bei einem neutralen pH-Wert ist Homocystein-Thiolacton stabil, wohingegen bei basischem pH-Wert sehr schnell eine Hydrolyse des Thioesters durch die Amine weiterer Homocystein-Thiolacton Moleküle eintritt.<sup>[173]</sup>

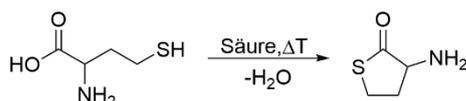


Abb. 56: Herstellung eines Thiolactons am Beispiel von Homocystein-Thiolacton.<sup>[174]</sup>

Durch die vielfältigen Eigenschaften finden Thiolactone in vielen Bereichen Anwendung. In der Biologie spielt Homocystein-Thiolacton eine wichtige Rolle im Methionin Kreislauf. Hierbei entsteht dieses in natürlichen Prozessen aus Homocystein und wird während des Kreislaufes normalerweise in Methionin umgewandelt. Fehler in diesem Kreislauf führen zu einem erhöhten Level an Homocystein-Thiolacton, welches im Blut nachgewiesen werden kann. Ein erhöhtes Homocystein-Thiolacton Level wird in Verbindung mit vielen Krankheiten wie z.B. kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfällen oder neurologischen Abnormalitäten gebracht.<sup>[175]</sup> Im Bereich der ringöffnenden Polymerisationen können  $\beta$ -Thiolacton und  $\epsilon$ -Thiocaprolacton als Monomere eingesetzt werden, um Polythioester mit einem

hohen Molekulargewicht herzustellen.<sup>[176]</sup> DU PREZ *et al.* nutzten Homocystein-Thiolacton für Eintopf-Multischritt Funktionalisierungen von Polymeren auf Grund der dualen Reaktivität und der Freisetzung eines Thiols durch Ringöffnung. Dazu wurde ein Styrol-Thiolacton Monomer synthetisiert und in einer Copolymerisation mit Styrol oder MMA eingesetzt. Anschließend wurde der Ring des Thiolactons durch einen nucleophilen Angriff eines Amins (z.B. Propylamin oder Aminoethanol) geöffnet und in einem zweiten Schritt das entstandene Thiol in einer Michael-Addition umgesetzt. Dadurch war es ihnen möglich hoch funktionalisierte Polymere herzustellen.<sup>[177]</sup> Weiterhin können Thiolactone als Präkursor für Thiole dienen, welche über eine Aminolyse freigesetzt werden können. Bei der Verwendung von Thiolacton-Monomeren können so Polymere mit einer Vielzahl an Thiolen hergestellt werden, welche dann zur weiteren Funktionalisierung oder Vernetzung im Falle der Hydrogele verwendet werden können.<sup>[178]</sup> Ein großer Vorteil der Thiolactone ist die Atomökonomie bei der Freisetzung der Thiole. Unter Verwendung von stöchiometrischen Mengen des Amins entstehen keine Nebenprodukte, sodass z.B. eine Vernetzung von Hydrogelen über Thiole bei gleichzeitiger Ringöffnung in Gegenwart von Zellen durchgeführt werden könnte. Dies ermöglicht die Untersuchung von Zellen in 3D Zellexperimenten. Außerdem wird die Problematik der Thiol-Oxidation umgangen, da diese bis zur Verwendung geschützt als Thiolactone vorliegen. Durch diesen Aspekt kann die Lagerzeit solcher Thiolacton Polymere im Vergleich zu den thiolhaltigen Polymeren deutlich erhöht werden.

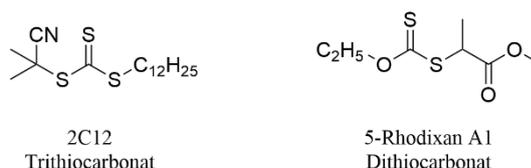
### 4.3 Synthese der TLA-Präpolymere

Nachfolgend sollte die Verwendung eines Thiolactonacrylats (TLA) als Monomer zur Herstellung von Präpolymeren untersucht werden. Diese Präpolymere sollten mit einer höheren Konzentration an Peptiden im Vergleich zu den **BMAC**-Polymeren funktionalisiert werden. Zur Herstellung der Thiolacton Copolymere wurde statt der in Kapitel 3 verwendeten FRP die kontrollierte RAFT-Polymerisation verwendet.

#### 4.3.1 RAFT-Polymerisation

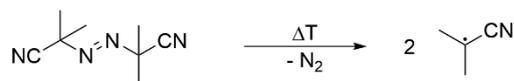
Bei der RAFT-Polymerisation handelt es sich um eine kontrollierte Polymerisationsmethode, welche 1998 von MOAD, RIZZARDO und THANG erstmals beschrieben wurde.<sup>[179]</sup> In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich die RAFT-Polymerisation, neben den anderen kontrollierten Polymerisationen, zu einem der

wichtigsten Werkzeuge in der Polymerchemie um definierte Polymere herzustellen. Eine große Auswahl an Monomeren und eine Toleranz gegenüber vielen funktionellen Gruppen zeichnet die RAFT-Polymerisation aus.<sup>[180]</sup> Die Dispersität der erhaltenen Polymere liegt typischerweise im Bereich von 1.05 - 1.30.<sup>[181]</sup> Die Kontrolle bei der RAFT-Polymerisation wird über ein sogenanntes RAFT-Reagenz erreicht. Typischerweise handelt es sich dabei um Dithio- oder Trithiocarbonate. In Abb. 57 sind beispielhaft die jeweiligen RAFT-Reagenzien dargestellt.



**Abb. 57:** Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten Trithiocarbonat-RAFT-Reagenzes (2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat, 2C12) und eines Dithiocarbonat-RAFT-Reagenzes (5-Rhodixan A1).

Die Initiierung dieser Polymerisationsart findet wie auch bei der FRP über den Zerfall eines Initiatormoleküls wie z.B. Azobis(isobutyronitril) (AIBN) unter Bildung zweier Radikale und Freisetzung von Stickstoff statt (siehe Abb. 58).



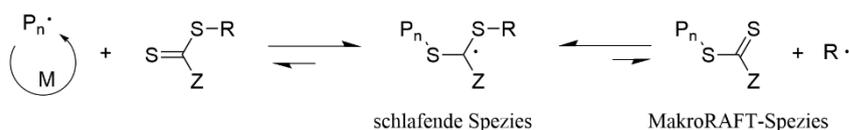
**Abb. 58:** Zerfall des Initiators am Beispiel AIBN durch Thermolyse und Ausbildung zweier Radikale.

Die freien Radikale können nun mit Monomeren reagieren und Polymerradikale  $P_n\cdot$  bilden. Im Gegensatz zur FRP stehen diese durch das RAFT-Reagenz in einem ständigen Gleichgewicht mit der sogenannten schlafenden Spezies. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt stark auf der Seite der schlafenden Spezies, weshalb zu jedem Zeitpunkt der Polymerisation die Konzentration an freien Radikalen sehr gering ist (siehe Abb. 59).

Bildung des Polymerradikals



Vorgleichgewicht



**Abb. 59:** Mechanismus der Polymerradikal Bildung und des Vorgleichgewichts.

Durch das Vorgleichgewicht kann ein neues Radikal  $R\cdot$  als Initiator entstehen, wobei zusätzlich die MakroRAFT-Spezies ausgebildet wird. Das neugebildete Radikal ist häufig das Gleiche wie das aus dem Initiator gebildete Radikal. Dieses Radikal kann erneut mit Monomeren zu einem zweiten Polymerradikal  $P_m\cdot$  reagieren. Dieser Schritt wird auch als Reinitiation bezeichnet und ist in Abb. 60 dargestellt.

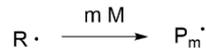


Abb. 60: Reinitiation der RAFT-Polymerisation durch das neugebildete Radikal  $R\cdot$ .

Das neugebildete Polymerradikal liegt nun erneut in einem Gleichgewicht mit der MakroRAFT-Spezies, wodurch das kontrollierte und gleichmäßige Wachstum der Polymerketten gewährleistet wird (siehe Abb. 61).

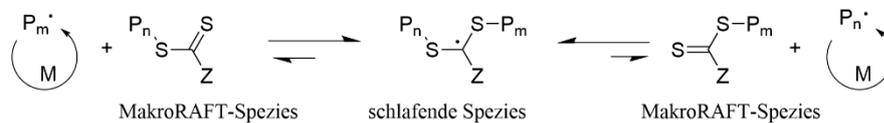


Abb. 61: Hauptgleichgewicht der RAFT-Polymerisation durch Reaktion eines Polymerradikals mit der MakroRAFT-Spezies.

Die Termination der Polymerisation erfolgt wie bei der FRP über Rekombination oder Disproportionierung. Ein großer Vorteil der RAFT-Polymerisation, neben den bereits genannten Vorteilen, ist die Endgruppe, welche durch die Verwendung des RAFT-Reagenzes entsteht. Dadurch ist es einerseits über das Design des RAFT-Reagenzes möglich verschiedenste funktionelle Gruppen an den Enden der Polymere einzubringen. Andererseits können die verwendeten Dithio- und Trithiocarbonat Gruppen über Aminolyse in Thiole umgewandelt werden, welche für weitere Funktionalisierungsschritte verwendet werden können.

### 4.3.2 Synthese von *N*-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton

Bevor die TLA-Präpolymere hergestellt werden konnten, musste zunächst ein geeignetes Monomer synthetisiert werden. Dieses wurde ausgehend von DL-Homocystein- $\gamma$ -Thiolacton Hydrochlorid in einer Schotten-Baumann-Reaktion mit Acryloylchlorid hergestellt (siehe Abb. 62).

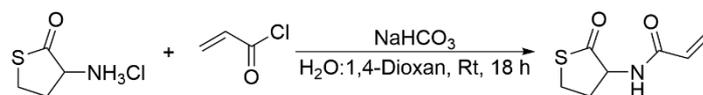
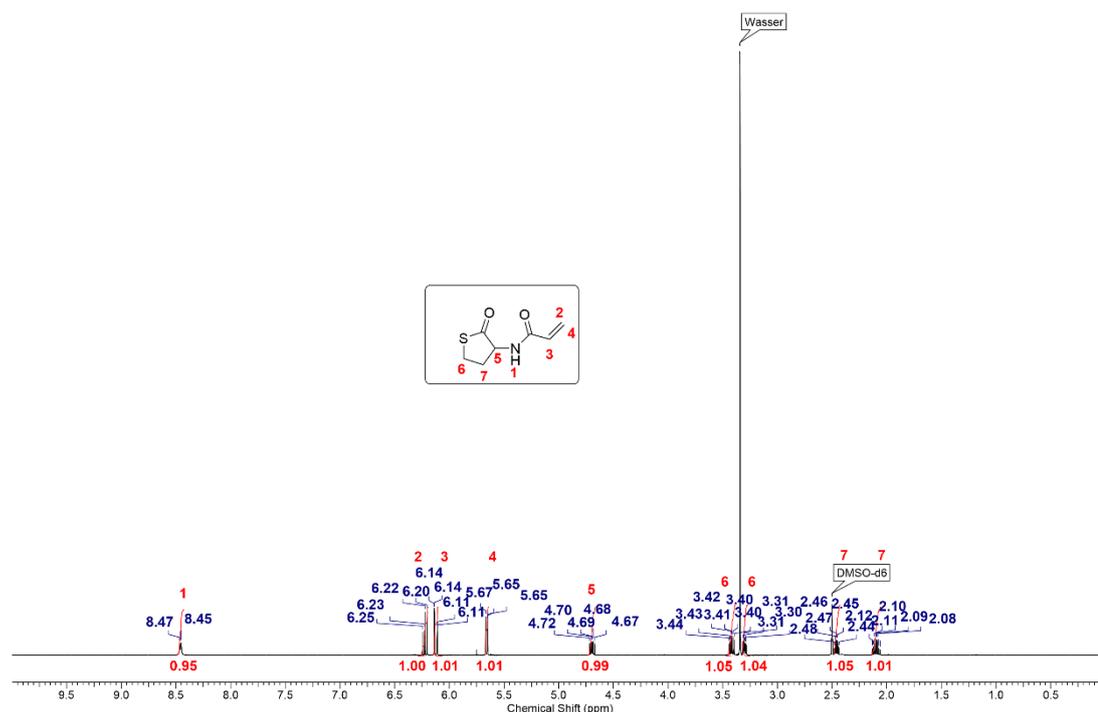


Abb. 62: Synthese des *N*-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolactons (TLA) über eine Schotten-Baumann-Reaktion.

Das TLA-Monomer konnte im Multigramm-Maßstab mit bis zu 5 g bei einer Ausbeute von bis zu 81 % erhalten werden. Die erfolgreiche Reaktion wurde mittels

$^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und HR-MS nachgewiesen. Mit HR-MS konnte das Wasserstoff- und Natriumaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 172.0426, bzw. 194.0246 (ber. 172.0432, bzw. 194.0252) nachgewiesen werden (siehe Abb. A 25). Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum in Abb. 63 zeigte die typischen Signale der Acrylat Doppelbindung bei einer chemischen Verschiebung von 5.65 - 6.20 ppm (**2,3,4**). Zusätzlich lag bei einer chemischen Verschiebung von 8.45 ppm (**1**) nur noch ein Integral von 0.95 statt den ursprünglichen zwei des Homocystein- $\gamma$ -Thiolactons vor.

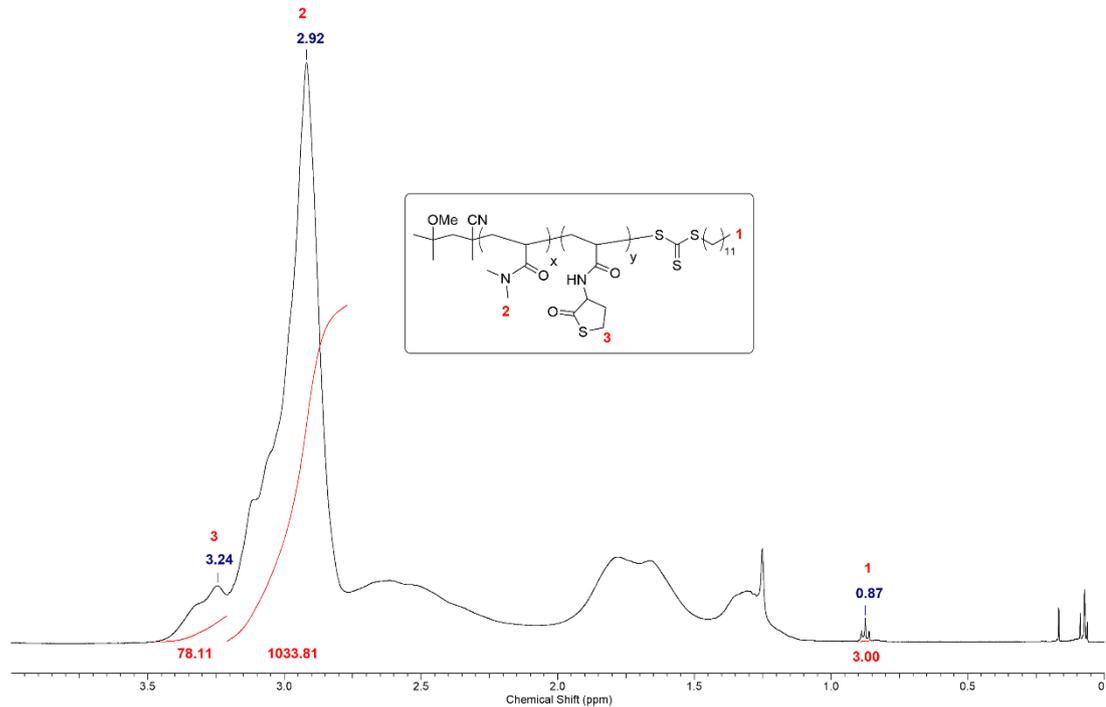


**Abb. 63:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von *N*-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton in DMSO- $d_6$ .

### 4.3.3 Synthese und Charakterisierung der TLA-Präpolymere

Bei der Verwendung des TLA-Monomers führte die Polymerisation im Gegensatz zu **BMAC** zu keiner Vernetzung. Daher wurde das TLA-Monomer in einer kontrollierten RAFT-Polymerisation mit *N,N*-Dimethylacrylamid (DMA) umgesetzt. Hierbei wurde im Gegensatz zu dem **BMAC**-Hydrogelsystem DMA statt **AMor** verwendet, da im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum die Signale von **AMor** und TLA stark überlagern. Durch die Verwendung von DMA wurde eine Bestimmung der Zusammensetzung mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermöglicht. Als RAFT-Reagenz wurde 2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat (2C12) verwendet und die Polymerisation bei 50 °C in 1,4-Dioxan durchgeführt. Das Polymer **P7** sollte mit einer theoretischen molaren Masse von 30000 g/mol bei einer Zusammensetzung von

5:1 (DMA:TLA) synthetisiert werden. Hierbei wurde ein Polymer mit einer höheren finalen Thiolkonzentration im Vergleich zu dem **BMAC**-Hydrogelsystem gewählt, um eine höhere Peptid Funktionalisierung zu ermöglichen. Während bei der Verwendung von **BMAC** je zwei Thiole entstehen, ist bei den TLA-Polymeren die Thiolkonzentration gleich der eingesetzten Menge TLA. Zusätzlich zu den 20 mol% TLA-Polymeren, wurden Polymere mit 10 (**P8**) und 30 mol% TLA (**P9**) hergestellt. In Abb. 64 ist ein Ausschnitt des  $^1\text{H-NMR}$  Spektrums von **P7** dargestellt.



**Abb. 64:** Ausschnitt des  $^1\text{H-NMR}$  Spektrums eines PDMA-*co*-TLA Copolymers mit 20 mol% TLA in  $\text{CDCl}_3$ .

Der Ausschnitt des  $^1\text{H-NMR}$  Spektrums zeigte bei 0.87 ppm das charakteristische Signal für die Methylgruppe der Dodecylkette des RAFT-Reagenzes, welche als Referenz für die Seitenketten verwendet wurde. Da diese Gruppe nur einmal im gesamten Polymer vorkam, konnten die Wiederholungseinheiten der beiden verwendeten Monomere bestimmt werden. DMA zeigte ein spezifisches Signal für die sechs Protonen der zwei Methylgruppen der Seitenkette bei einer chemischen Verschiebung von 2.92 ppm (**2**). Daraus ergaben sich 172 DMA-Einheiten. Die Methylen-Gruppe neben dem Stickstoffatom des Thiolactons besaß ein spezifisches Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3.24 ppm (**3**). Daraus wurden 39 TLA-Einheiten berechnet und ein Gesamtmolekulargewicht von 23800 g/mol für das Polymer über  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Eine Untersuchung mittels GPC ergab ein Molekulargewicht von 30500 g/mol mit einer Dispersität von 1.17.

Das TLA-Monomer ließ sich problemlos mit DMA copolymerisieren und auch die Dispersität von 1.17 befand sich in dem für RAFT-Polymerisationen typischen Bereich. Die durch NMR berechnete molare Masse wich mit ca. 7000 g/mol recht stark von der über GPC bestimmten molaren Masse ab. Grund hierfür könnte die geringe Signalintensität der Endgruppe des Polymers sein. Da diese nur einmal im Polymer vorkam und dementsprechend die Signalintensität sehr klein war, führten bereits kleine Änderung des Integrals zu einem großen Einfluss auf die Anzahl der Wiederholungseinheiten der Monomere. Zusätzlich ist die Auswertung per NMR nur akkurat, wenn die Endgruppe zu 100 % am Polymer vorhanden ist. Bei der RAFT-Polymerisation besteht die Möglichkeit, dass die Endgruppe auf Grund von Terminationsreaktionen und anderen Nebenreaktionen verloren geht. Mit Hilfe der aus GPC bestimmten molaren Masse und der aus  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmten Anzahl von TLA-Wiederholungseinheiten, konnte über folgende Gleichung die maximal mögliche Stoffmenge des Thiols für ein Gramm Polymer bestimmt werden.

$$n_{\text{Thiol}} [\text{mmol}] = \frac{m}{M \cdot x_{\text{TLA}}} = \frac{1 \text{ g}}{23758 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \cdot 39} = 0.00164 \text{ mol} = 1.64 \text{ mmol} \quad (6)$$

$n_{\text{Thiol}}$ : Stoffmenge der maximal möglichen Thiole, berechnet für 1 g Polymer,  $m$ : Masse des Polymers,  $M$ : Molekulargewicht des Polymers aus NMR oder GPC,  $x_{\text{TLA}}$ : Anzahl TLA-Wiederholungseinheiten pro Polymer.

Die Berechnung unter Verwendung der molaren Masse aus der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ergab eine maximal mögliche Konzentration der Thiole für **P7** von 1.64 mmol/g Polymer. Unter Verwendung der molaren Masse von 30500 g/mol, welche mit Hilfe der GPC bestimmt wurde, wurde eine Konzentration von 1.28 mmol/g Polymer bestimmt. Die theoretisch maximale Konzentration der Thiole betrug 1.76 mmol/g Polymer. Für das **BMAC**-Hydrogelsystem lag die Konzentration eines 4 mol% Polymers bei ca. 0.5 mmol/g Polymer. Somit konnte erfolgreich ein wasserlösliches TLA-Präpolymer mit einer erhöhten Menge an Thiolen hergestellt und charakterisiert werden. Um die tatsächliche Menge der Thiole mit Hilfe des Ellman's Assays zu bestimmen, musste das Thiolacton mit einem Amin geöffnet und das Thiol freigesetzt werden. In Abb. 65 ist solch eine Ringöffnung anhand von *n*-Butylamin gezeigt.

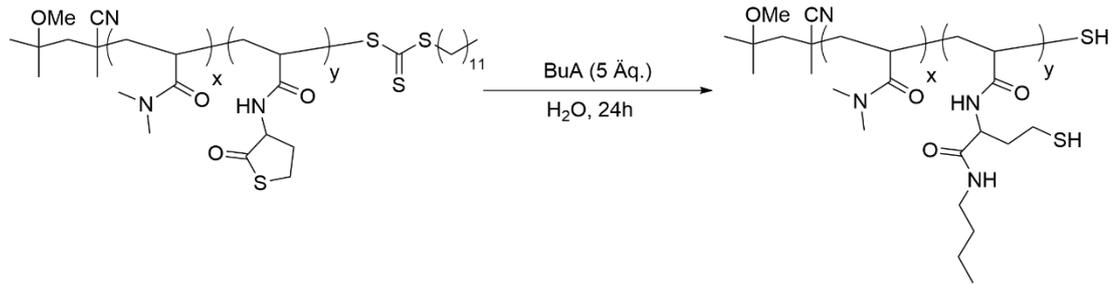
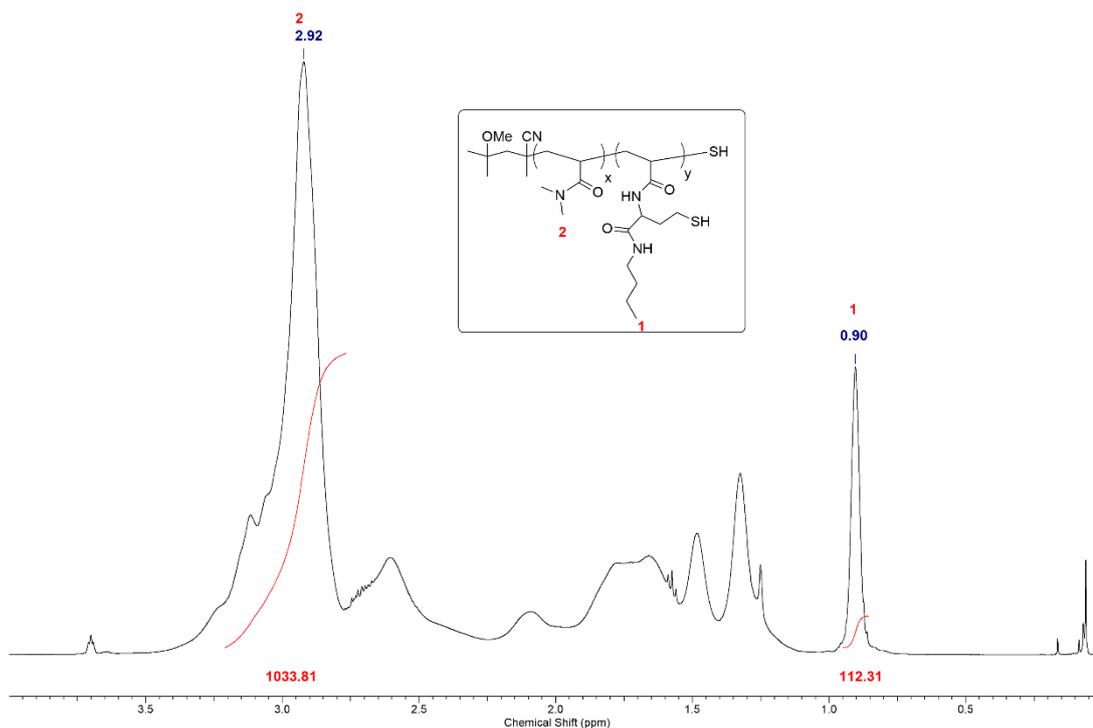


Abb. 65: Öffnung des Thiolacton-Rings durch *n*-Butylamin.

Die Ringöffnung des Thiolactons wurde mit einem Überschuss von 5 Äquivalenten *n*-Butylamin in Wasser für 24 h durchgeführt. Neben der Ringöffnung fand gleichzeitig auch die Aminolyse der RAFT-Endgruppe statt, wodurch ein weiteres Thiol gebildet wurde. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln statt Wasser zur Öffnung des Thiolacton-Rings war ebenfalls möglich und wurde im Rahmen dieses Projektes untersucht. Hierbei sollten allerdings chlorierte Lösungsmittel (DCM, CHCl<sub>3</sub>) vermieden werden, da diese über eine Substitutionsreaktion unter basischen Bedingungen zu einer irreversiblen Vernetzung der Polymere führen können.<sup>[178]</sup> Die Verwendung von Wasser hat den Vorteil, dass die Reaktionslösung nach erfolgter Reaktion ohne weitere Aufarbeitung vollständig in eine Dialysekassette überführt werden konnte. Nach der Dialyse wurde das Polymer mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie (Abb. 66) untersucht. Hierbei war deutlich die CH<sub>3</sub>-Gruppe des *n*-Butylamins bei einer chemischen Verschiebung von 0.90 ppm (**1**) zu erkennen. Gleichzeitig änderte sich die Aufspaltung dieses Signals. Während zuvor an dieser Position das Triplett der RAFT-Endgruppe zu sehen war, trat an dieser Stelle nach erfolgter Aminolyse lediglich ein verbreitertes Singulett auf, welches ein Indiz für eine erfolgte Bindung an das Polymer darstellte. Weiterhin nahm die Signalintensität des TLA bei einer chemischen Verschiebung von 3.24 ppm deutlich ab. Da sich die Anzahl der PDMA-Einheiten während der Ringöffnung nicht änderte, konnte das Signal der Butylamin-Kette bei einer chemischen Verschiebung von 0.90 ppm (**1**) auf dieses Integral referenziert werden und die Anzahl der Wiederholungseinheiten der Ringöffnung bestimmt werden. Es wurden 37 geöffnete TLA-Einheiten bestimmt, wohingegen ursprünglich 39 Einheiten des TLA vorhanden waren.



**Abb. 66:** Ausschnitt eines <sup>1</sup>H-NMR Spektrums eines mit *n*-Butylamin geöffneten 20 mol% TLA-Polymers in CDCl<sub>3</sub>.

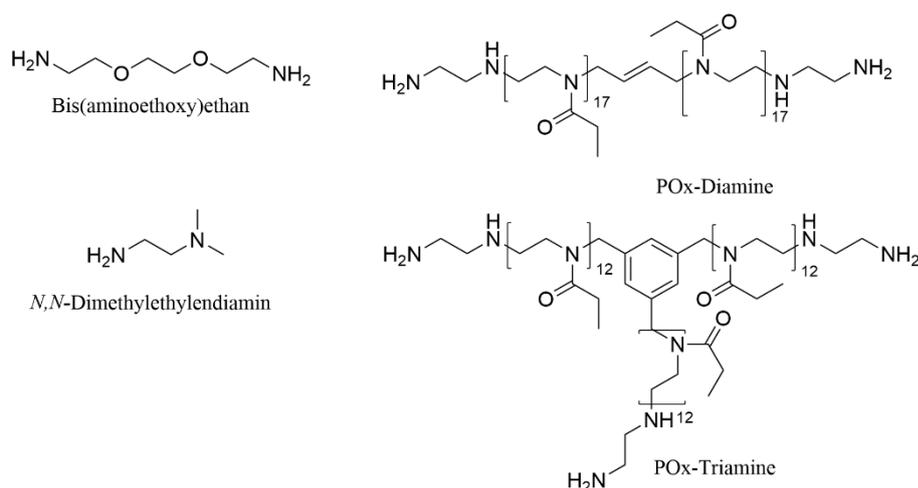
Mit Hilfe des Ellman's Assays wurde die Konzentration an Thiolen bestimmt. Für das 20 mol% TLA-Polymer wurde eine Konzentration von 1.45 mmol/g Polymer bestimmt (siehe Tabelle 7). Diese lag zwischen den berechneten maximalen Thiolkonzentrationen, welche über <sup>1</sup>H-NMR Spektrum (siehe Abb. 64) und GPC berechnet wurden. Dies zeigte, dass die Ringöffnung des Thiolactons quantitativ ablief. Demnach eignete sich die vorherige Abschätzung der finalen Konzentration an Thiolen über <sup>1</sup>H-NMR und GPC. In Tabelle 7 ist eine Übersicht über alle Präpolymere mit 10 - 30 mol% TLA dargestellt. Die Untersuchungen von **P8** und **P9** mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie und Ellman's Assay ergaben, dass auch bei diesen beiden Präpolymeren das TLA-Monomer in der gewünschten Konzentration eingebaut und geöffnet wurde. Mit 0.73 mmol/g Polymer und 2.1 mmol/g Polymer verlief der Einbau des TLA-Monomers auch bei Änderung des TLA-Anteils gleichmäßig. Bei **P9** war hingegen die molare Masse des Polymers mit 18900 g/mol deutlich geringer als die ursprünglich angesetzten 30000 g/mol. Dieses Polymer wurde allerdings nur einmal im Rahmen eines studentischen Praktikums getestet und Bedarf weiterer Untersuchung. Dennoch können Präpolymere mit einem hohen TLA-Anteil hergestellt werden.

**Tabelle 7:** Übersicht der analytischen Daten der TLA Präpolymere mit verschiedenen Mengen an TLA.

	Struktur	Monomer Verteilung (theor.)	Monomer Verteilung (NMR)	$M_n^a)$ [g/mol] (NMR)	$M_n^b)$ [g/mol] (GPC)	$b_{\text{Thiol}}^c)$ [mmol/g]	$\bar{D}^b)$
<b>P7</b>	PDMA- TLA	211:53	172:39	24100	30500	1.45	1.17
<b>P8</b>	PDMA- TLA	255:26	257:22	29600	29100	0.73	1.30
<b>P9</b>	PDMA- TLA	174:75	111:44	18900	- <sup>d)</sup>	2.1	- <sup>d)</sup>

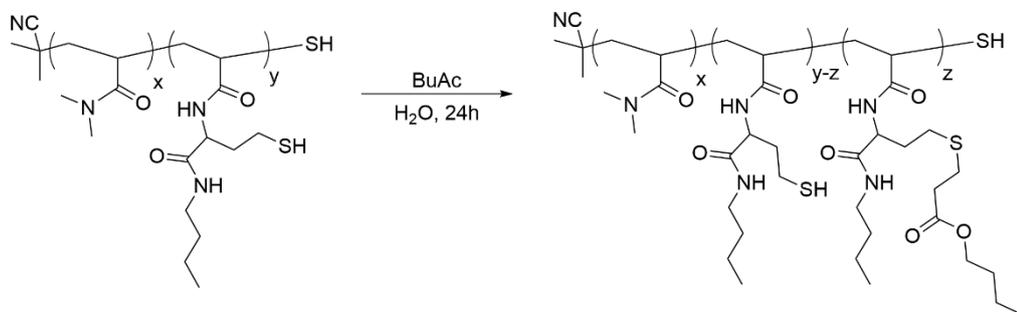
a) bestimmt über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie mit der RAFT-Endgruppe als Referenz, b) bestimmte mittels GPC in DMF + 5 g/L LiBr und PMMA als Standard, c) bestimmt mittels Ellman's Assay d) nicht bestimmt.

Neben *n*-Butylamin als Amin zur Ringöffnung wurden auch *N,N*-Dimethylethylendiamin (DMEDA), Peptide mit einem Amin am N-Terminus und verschiedene Diamine oder Triamine zur direkten Vernetzung verwendet (siehe Abb. 67 für die Strukturen der verwendeten Amine). Während die Ringöffnung mit DMEDA ebenfalls quantitativ ablief (berechnete maximale Konzentration: 1.48 mmol/g Polymer; mit Ellman's Assay bestimmte Konzentration: 1.50 mmol/g Polymer), konnte die Ringöffnung mit verschiedenen Peptiden nicht erfolgreich durchgeführt werden. Nach 24 h konnte mittels Ellman's Assay nahezu kein Thiol nachgewiesen werden. Die Verwendung von einem Äquivalent verschiedener Diamine oder Triamine zur direkten Vernetzung bei der Ringöffnung führten zu keiner Gelbildung nach mehreren Tagen. Die Zugabe einer Spatelspitze des Ellman's Reagenzes DTNB zeigte eine instantane tiefe Gelbfärbung und war ein Indikator für die erfolgte Ringöffnung und dadurch Freisetzung der Thiole. Dennoch fand keine Vernetzung durch die bi- oder trifunktionellen Amine statt. Diese Untersuchungen zeigten, dass grundsätzlich eine Ringöffnung mit hochmolekularen Aminen möglich ist, aber das freie Amin am N-Terminus der Peptide nicht ausreicht, um die Ringöffnung durchzuführen. Eine Möglichkeit die Ringöffnung auch mit Peptiden durchzuführen wäre die Verwendung von z.B. Lysin oder einer Funktionalisierung des N-Terminus mit besser zugänglichen Aminen. Allerdings wäre eine solche Ringöffnung durch Lysin nicht optimal, da hierbei keine Peptide verwendet werden können, welche ein Lysin für ihre biologische Aktivität benötigen.



**Abb. 67:** Strukturen der für die Ringöffnung verwendeten Amine.

Nach Untersuchung der Ringöffnung, sollte nun die Nutzung der freigewordenen Thiole untersucht werden. Dazu wurde zunächst die partielle Funktionalisierung eines 20 mol% Thiolacton Präpolymers mit Butylacrylat oder Hydroxyethylacrylat untersucht. Die Hälfte aller Thiole (0.73 mmol/g von 1.45 mmol/g) sollten dabei funktionalisiert werden, sodass die andere Hälfte zur Vernetzung der Präpolymere verwendet werden konnte. Das Reaktionsschema der Funktionalisierung mit Butylacrylat ist in Abb. 68 dargestellt.



**Abb. 68:** Funktionalisierung der Thiole des Polymers mit Butylacrylat.

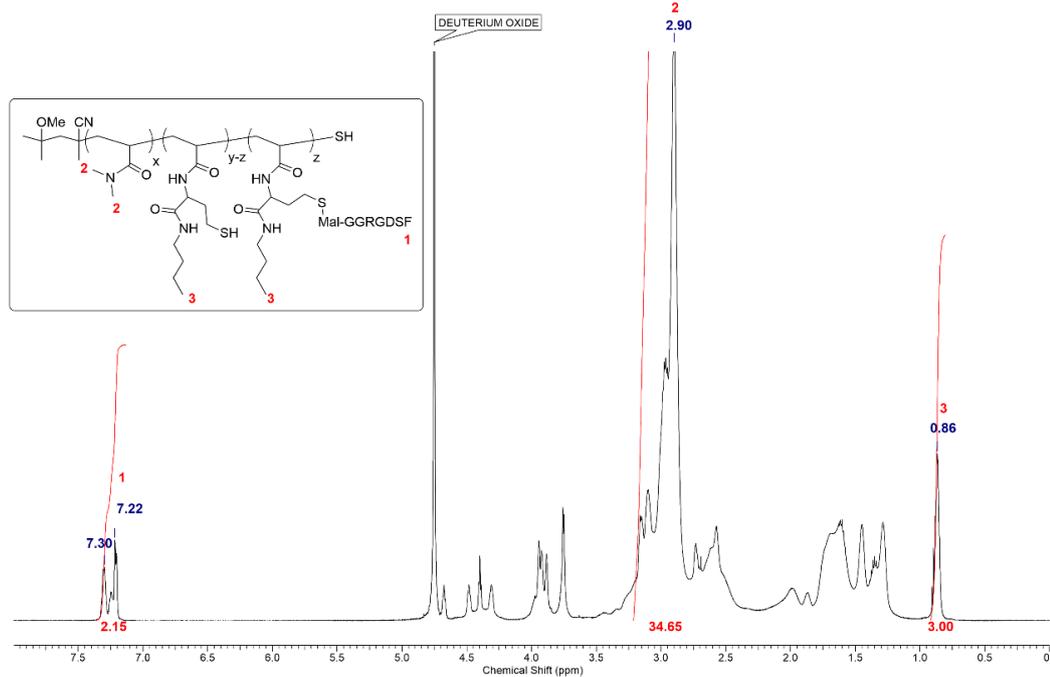
Nach 24 h wurde das Polymer erneut dialysiert und anschließend mit Hilfe des Ellman's Assays die Konzentration der Thiole bestimmt. Diese Untersuchung ergab eine Restkonzentration der Thiole für die Butylacrylat Funktionalisierung von 0.33 mmol/g Polymer und für die Hydroxyethylacrylat Funktionalisierung von 0.73 mmol/g Polymer. Bei beiden Funktionalisierungen waren nach erfolgter Reaktion eine ausreichende Konzentration an Thiolen zur Herstellung von Hydrogelen vorhanden. Dennoch war die Konzentration bei der Butylacrylat Funktionalisierung deutlich geringer als theoretisch gewünscht. Ein möglicher Grund hierbei könnte die verwendete Pipette gewesen sein. An der äußeren Hülle der

Pipettenspitzen befinden sich durch das Eintauchen in die Chemikalie kleine Tröpfchen. In diesem Fall wurde die Spitze vor der Zugabe zur Reaktionslösung nicht von überschüssigen Tröpfchen gesäubert, sodass diese bei der kleinen Ansatzgröße (Zugabe von 52  $\mu\text{L}$ ) zu einer großen Ungenauigkeit führen konnten. Bei der Funktionalisierung von Hydroxyethylacrylat wurde darauf geachtet, dass diese Tropfen vor der Zugabe entfernt wurden, sodass hier eine präzisere Einstellung der Thiol Konzentration möglich war. Zusätzlich konnte die Anzahl der funktionalisierten Einheiten mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie analysiert werden. Diese ergab für die Funktionalisierung mit HEMA 17 von 37 funktionalisierte Einheiten und für Butylacrylat 15 von 37 funktionalisierte Einheiten. Beide Funktionalisierungen lagen dabei sehr nah an den gewünschten 18-19 Einheiten, wobei die Ergebnisse der Butylacrylat Funktionalisierung aus NMR und UV/Vis-Spektroskopie sehr unterschiedlich ausfielen. Da diese Untersuchungen lediglich einen Vortest für die Funktionalisierung mit Peptiden darstellte und nachgewiesen werden konnte, dass eine partielle Funktionalisierung möglich war, wurde die Funktionalisierung mit Butylacrylat nicht wiederholt. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Peptiden ist der feste Aggregatzustand, sodass die zugegebenen Mengen präziser eingewogen werden können.

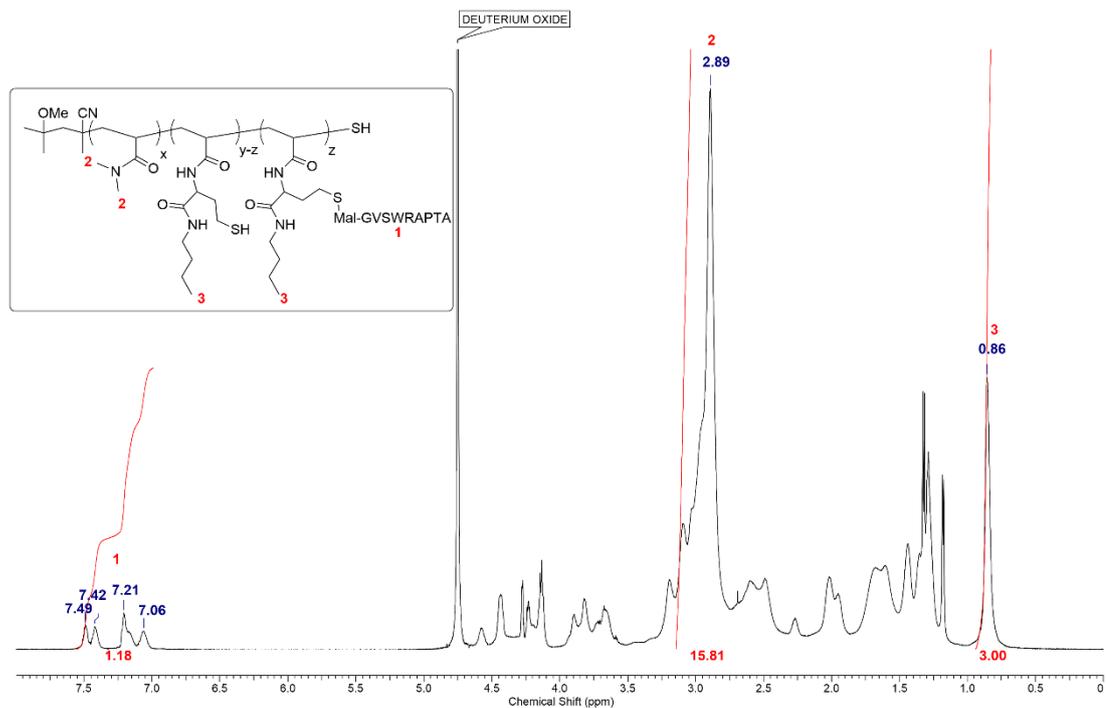
Für die Funktionalisierung mit Peptiden wurde ein Präpolymer mit einer Thiolkonzentration von 1.39 mmol/g Polymer verwendet. Es wurden drei verschiedene Peptidsequenzen mit Maleimid-Endgruppen verwendet: Mal-GGRGDSF (845.82 g/mol), Mal-GVSWRAPTA (1095.17 g/mol) und Mal-GVFDNFVLK (1189.32 g/mol). Während die RGD-Sequenz aus Fibronectin in der Lage ist die Adhäsion und Überlebensfähigkeit von Zellen zu erhöhen, sind VSWRAPTA und VFDNFVLK aus dem Protein TNC unter anderem in der Lage die Differenzierung und Bildung von Neuriten von NSCs zu verbessern. Die Funktionalisierung wurde analog zu der zuvor beschriebenen Funktionalisierung durchgeführt, wobei 0.86 mmol/g Polymer der Thiole verwendet werden sollten, sodass 0.53 mmol/g Polymer an Thiolen zur Herstellung der Hydrogele verwendet werden konnten. Lediglich die Reaktionszeit wurde auf 3 Tage erhöht, da es sich bei den Peptiden um sterisch anspruchsvolle Reagenzien handelte und eine vollständige Funktionalisierung gewährleistet werden sollte. Weiterhin wurde der pH-Wert nach Zugabe der Peptide kontrolliert und auf 6.5 - 7.4 eingestellt, sodass die Michael-

Addition hinreichend schnell ablief, die übrigen Thiole aber nicht oxidierten und zu einer Vernetzung der Polymere führten. Bei der Funktionalisierung mit Mal-GVFDNFVLK trat direkt zu Beginn die Problematik der Löslichkeit der Peptidsequenz auf. Diese war weder unter sauren noch basischen Bedingungen in Wasser löslich. Auch die Zugabe von DMSO, bzw. eine Durchführung der Reaktion in reinem DMSO, führte zu keiner vollständigen Löslichkeit des Peptids. Da die Polymere auch in organischen Lösungsmitteln löslich waren, wäre diese Vorgehensweise zur Funktionalisierung möglich. Allerdings wären die entstandenen Polymere bei dieser Sequenz voraussichtlich sehr hydrophob und würden sich nicht zur Herstellung von Hydrogelen eignen, sodass im Folgenden nur die Funktionalisierung mit den anderen beiden Peptidsequenzen untersucht wurde. Nach erfolgter Reaktion wurden die Polymere erneut dialysiert und anschließend die Funktionalisierung mittels Ellman's Assay und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Für das RGD-Peptid ergab die Untersuchung mittels Ellman's Assay eine Thiolkonzentration von 0.53 mmol/g Polymer. Die Konzentration der Thiole der Funktionalisierung mit VSWRAPTA lag bei 0.52 mmol/g Polymer. Somit lag eine Peptidkonzentration von 0.97, bzw. 0.98 mmol/g Polymer und eine quantitative Funktionalisierung in beiden Fällen vor. Auch die Untersuchung mit  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigte eine erfolgreiche Funktionalisierung mit den Peptiden (siehe Abb. 69 und Abb. 70). Deutlich sichtbar waren für beide Funktionalisierungen verbreiterte Signale im aromatischen Bereich, welche für eine erfolgreiche Verknüpfung der Peptide mit dem Polymer sprachen. Bei dem RGD-Peptid lagen die fünf Protonen der aromatischen Aminosäure Phenylalanin (F) bei einer chemischen Verschiebung von 7.22 - 7.30 ppm (Abb. 69, **1**). Bei dem VSWRAPTA-Peptid lagen bei einer chemischen Verschiebung von 7.06 - 7.49 ppm (Abb. 70, **1**) die vier Protonen der aromatischen Aminosäure Tryptophan (W). Aus dem Verhältnis des Signals bei einer chemischen Verschiebung von 0.86 ppm, welches zu der  $\text{CH}_3$ -Gruppe des Butylamins zur Öffnung des Thiolactons gehörte, und den aromatischen Signalen bezogen auf die Anzahl der Protonen konnte der Anteil der Peptidfunktionalisierung bezogen auf alle vorhandenen Thiole bestimmt werden. Die Funktionalisierungsrate für RGD lag bei 30 %, während diese für VSWRAPTA bei 20 % lag. Theoretisch sollte für beide Peptide die Funktionalisierungsrate bei 62 % der vorhandenen Thiole liegen. Die Untersuchung mittels Ellman's Assay ergab die gewünschte Funktionalisierungsrate von 62 %. Bei der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie war

zu beachten, dass die Verwendung von D<sub>2</sub>O als deuteriertes Lösungsmittel zu einem starken Lösungsmittelsignal im NMR führte, wodurch die Molekülsignale sehr klein wurden. Dadurch entstanden bereits große Fehler bei sehr kleinen Änderungen von z.B. Integralen. Dennoch konnte die <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie als Nachweis der erfolgreichen Kupplung der Peptide an das Polymer dienen, wohingegen die genaue Konzentration über den Ellman`s Assay bestimmt werden konnte.

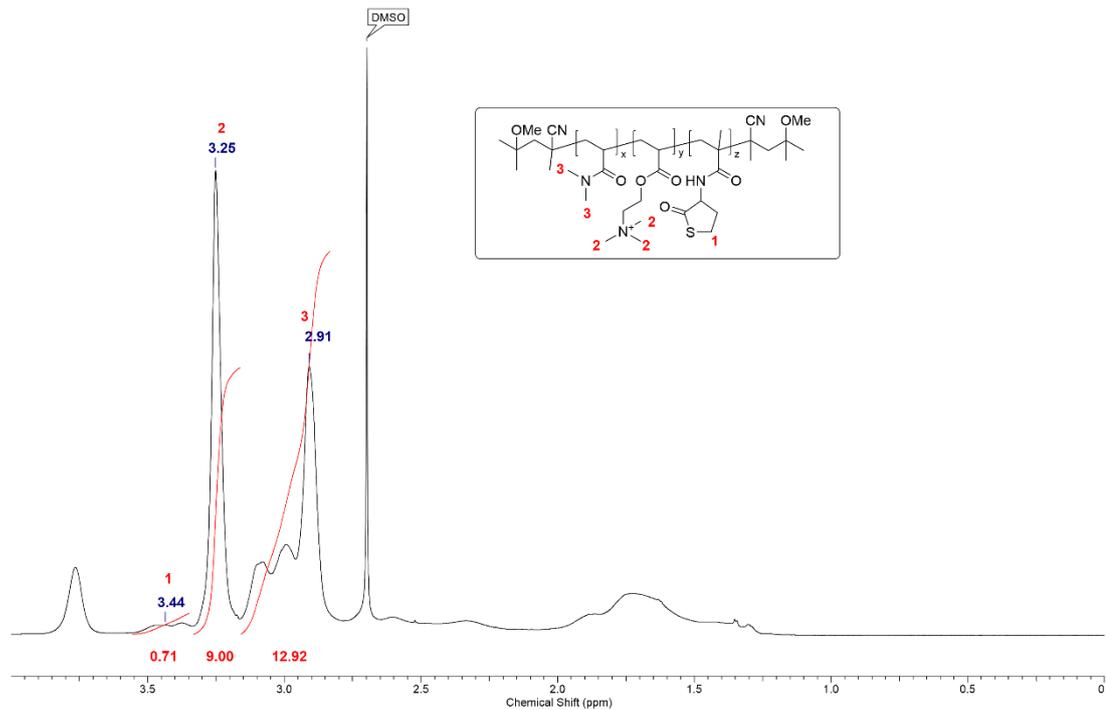


**Abb. 69:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum des Mal-GGRGDSF funktionalisierten 20 mol% TLA-Präpolymers in D<sub>2</sub>O.



**Abb. 70:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum des Mal-GVSWRAPTA funktionalisierten 20 mol% TLA-Präpolymers in D<sub>2</sub>O.

Neben den bereits beschriebenen Präpolymeren wurde ebenfalls die Copolymerisation von Thiolactonen mit **TMAEA** untersucht. Durch die ionische Struktur des **TMAEA** Monomers konnte allerdings keine kontrollierte Polymerisation verwendet werden, da das Gegenion Iod zu Übertragungsreaktionen während der Polymerisation führen kann oder mit dem RAFT-Reagenz zu Nebenreaktionen führt. Bei der Synthese des Polymers mittels RAFT-Polymerisation zeigte das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum, dass keine RAFT-Endgruppen vorhanden waren. Daher wurde für die Synthese des Polymers (**P10**) die FRP verwendet. Als Monomere wurden DMA, **TMAEA** und TLA in einem Verhältnis von 60:30:10 mol% eingesetzt. Die Polymerisation wurde für 48 h bei 50 °C mit dem Initiator V70 in DMSO durchgeführt. Abbildung Abb. 71 zeigt das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von **P10**. Deutlich zu sehen waren das Signal für die neun Methylprotonen von **TMAEA** bei einer chemischen Verschiebung von 3.26 ppm (**2**) und das Signal für die sechs Methylgruppen von DMA bei einer chemischen Verschiebung 2.91 ppm (**3**). Das Signal des Thiolactons für die  $\text{CH}_2$ -Gruppe benachbart zum Schwefel war bei einer chemischen Verschiebung von 3.44 ppm (**1**) hingegen nur sehr schwach. Unter Berücksichtigung der Protonen jedes Signals konnte eine Zusammensetzung von 61.4:28.5:10.1 bestimmt werden, welche sehr gut mit der theoretischen Zusammensetzung übereinstimmte. Auf Grund der ionischen Struktur von **TMAEA** konnte auch hier keine molare Masse über GPC bestimmt werden, da das Polymer nicht in dem Laufmittel DMF löslich war.



**Abb. 71:** Ausschnitt eines  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums von PDMA-co-TMAEA-co-TLA in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Durch die Verwendung von TLA als Comonomer anstelle von **BMAC** war es möglich Präpolymere herzustellen, welche einerseits ein geschütztes Thiol besaßen, welches durch die Verwendung von Aminen freigesetzt werden konnte. Andererseits konnte eine deutlich höhere Menge an Thiolacton im Vergleich zu **BMAC** unter Beibehaltung der Wasserlöslichkeit in das Polymer eingebaut werden. Die erhöhte freigesetzte Menge an Thiolen konnte erfolgreich genutzt werden, um eine höhere Konzentration an Peptiden im Polymer zu ermöglichen. Hierbei können noch höhere Konzentrationen durch eine weitere Erhöhung des Thiolacton-Anteils ermöglicht werden. Auch war es mit dem neuen Thiolacton-System möglich geladene Polymere herzustellen, sodass sich dieses als eine gute Alternative zu dem bereits vorhandenen **BMAC**-System erwies. In einem letzten Schritt galt es die Herstellung der Gele und deren mechanische Eigenschaften zu untersuchen.

#### 4.4 Herstellung und Charakterisierung der TLA-Hydrogele

Die Vernetzung der Präpolymere wurde erneut mit PEGDA-3500 durchgeführt. Wie auch bei dem **BMAC**-Hydrogelsystem wurde die Vernetzung in PBS-Puffer unter Verwendung von 0.4 Äquivalenten PEGDA-3500 durchgeführt. Das Thiolacton-Hydrogelsystem wurde in erster Linie zur Erhöhung der Thiolkonzentration entworfen, sodass nachfolgend hauptsächlich Hydrogele aus dem 20 mol% TLA-Präpolymer hergestellt wurden. Die Thiolactone dieser Präpolymere wurden mit

*n*-Butylamin geöffnet. Zusätzlich zu den 18 Gew.-% Hydrogelen wurden bei der Funktionalisierung auch 10 Gew.-% Hydrogele untersucht. Dabei wurde die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften durch die Funktionalisierung mit verschiedenen Acrylaten und Peptiden betrachtet. Zusätzlich wurde das kationische Präpolymer zur Herstellung eines Gels verwendet. Für einen ersten Test in Zellexperimenten wurde ein 10 mol% TLA-Hydrogel verwendet, welches mit DMEDA geöffnet wurde. Eine Übersicht aller untersuchten Hydrogele ist in Tabelle 8 gegeben. Bei **G9 - G15** wurden jeweils PDMA-TLA (20 mol%) Präpolymere, bei **G16** ein PDMA-TLA (10 mol%) Präpolymer und bei **G17** ein PDMA-**TMAEA**-TLA (10 mol%) Präpolymer verwendet.

**Tabelle 8:** Übersicht der untersuchten TLA-Hydrogele und deren rheologischen Eigenschaften.

Gel	Ringöffnung	Funktionalisierung	Gew.-% <sup>e)</sup>	G' [Pa] <sup>f)</sup>	Q <sup>g)</sup>
<b>G9</b>	<i>n</i> -Butylamin	BuAc <sup>a)</sup>	18	1520 ± 140	13.1 ± 0.2
<b>G10</b>	<i>n</i> -Butylamin	HEA <sup>b)</sup>	10	1290 ± 136	20.6 ± 0.4
<b>G11</b>	<i>n</i> -Butylamin	HEA <sup>b)</sup>	18	3950 ± 240	13.3 ± 0.1
<b>G12</b>	<i>n</i> -Butylamin	RGD <sup>c)</sup>	10	1200 ± 60	15.5 ± 0.5
<b>G13</b>	<i>n</i> -Butylamin	RGD <sup>c)</sup>	18	3890 ± 380	10.8 ± 0.1
<b>G14</b>	<i>n</i> -Butylamin	VSWRAPTA <sup>d)</sup>	10	700 ± 110	13.8 ± 2.9
<b>G15</b>	<i>n</i> -Butylamin	VSWRAPTA <sup>d)</sup>	18	2990 ± 240	9.1 ± 0.2
<b>G16</b>	DMEDA	-	18	5960	13.5
<b>G17</b>	<i>n</i> -Butylamin	-	18	5890 ± 690	40.4 ± 1.3 <sup>h)</sup>

a) BuAc: Butylacrylat, b) HEA: Hydroxyethylacrylat, c) RGD: Mal-GGRGDSF, d) VSWRAPTA: Mal-GVSWRAPTA, e) Massenanteil der verwendeten Lösung zur Herstellung des Hydrogels, f) bestimmt in Triplikaten mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 % nach 24 h Quellen in PBS-Puffer, g) gemessen in Triplikaten, Trockengewicht nach Gefriertrocknung der vollständig gequollenen Gele ermittelt, h) Quellung in reinem Wasser.

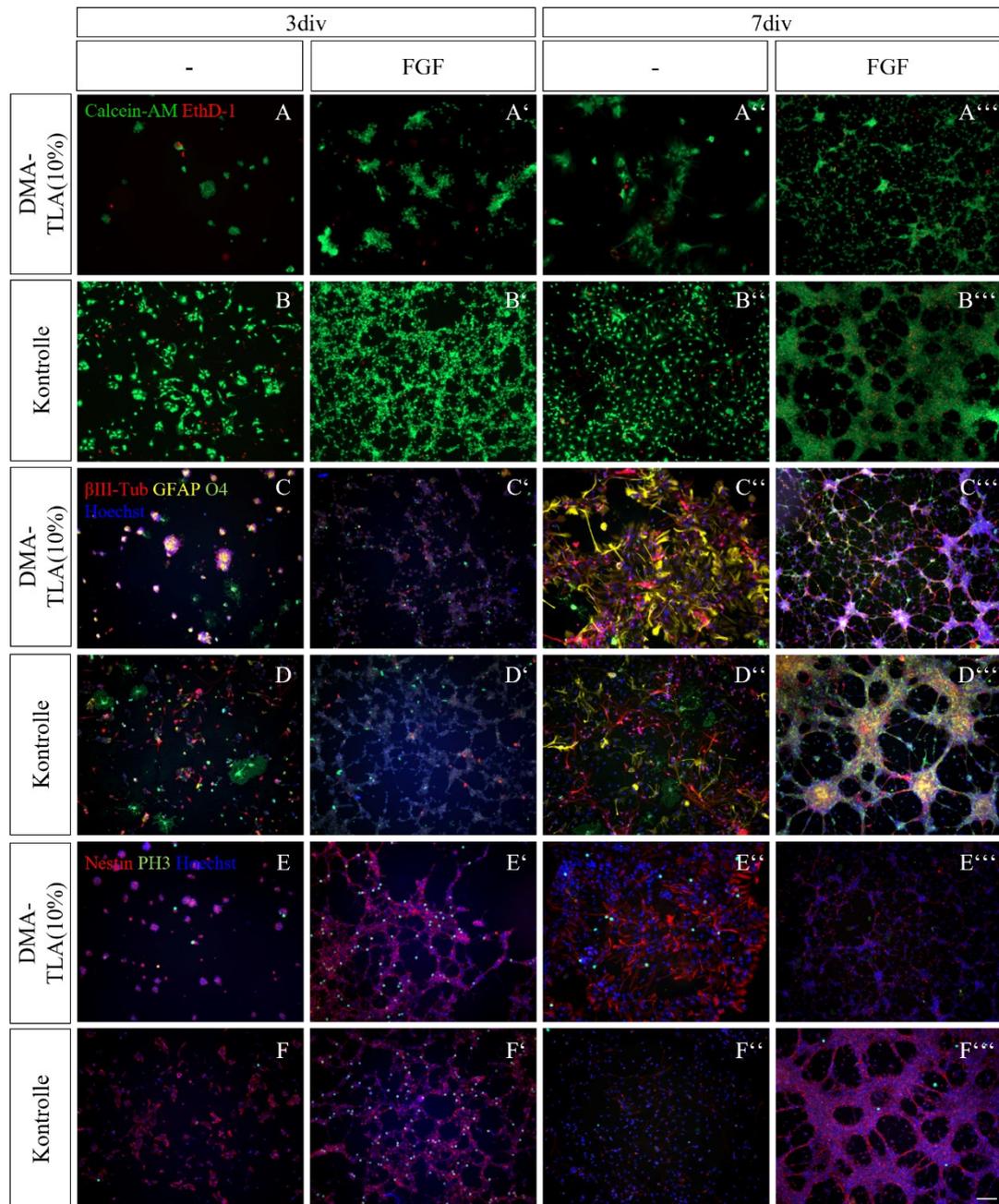
Da die Hydrogele teilweise aus verschiedenen Polymeren mit unterschiedlichen Thiolkonzentrationen hergestellt wurden, ließen sich diese nur bedingt miteinander vergleichen. Lediglich die Hydrogele mit Peptid-Funktionalisierung wurden aus demselben Präpolymer hergestellt. Ein Vergleich zwischen Hydrogelen aus 10 Gew.-%-Lösungen mit denen aus einer 18 Gew.-%-Lösung ergaben für alle Hydrogele eine geringere Steifigkeit bei höherer Quellung. Bei einer Erhöhung des Massenanteils der Polymerlösungen zur Herstellung von Hydrogelen entsteht ein höherer Grad an Verknäuelungen, welche physikalische Vernetzungspunkte bilden und zu einer Erhöhung der Steifigkeit führen. Die Quellung nimmt dabei ab, da durch die höhere Vernetzung die freie Beweglichkeit der Polymerketten stärker eingeschränkt ist. Die deutlich höhere Steifigkeit von **G11** im Vergleich zu **G9** ist

durch die erhöhte Vernetzung auf Grund der Erhöhung der Thiolkonzentration des verwendeten Präpolymers zu erklären. Bei dem Vergleich der beiden peptidhaltigen Hydrogele wiesen die RGD-Hydrogele (**G12 + G13**) jeweils eine leicht erhöhte Steifigkeit bei gleichzeitig geringfügig höherer Quellung im Vergleich zu dem VSWRAPTA-Hydrogel auf (**G14 + G15**). Die Sequenz GGRGDSF besitzt mit Arginin (R), Asparaginsäure (D) und Serin (S) drei sehr hydrophile Aminosäuren, während die weiteren Aminosäuren eher neutraler Natur sind. Die Sequenz VSWRAPTA hingegen besitzt zusätzlich einige sehr hydrophobe Aminosäuren mit Valin (V), Tryptophan (W) und Prolin (P). Die hydrophilere Sequenz des RGD-Hydrogels könnte die geringfügig höhere Quellung erklären. Die deutlich erhöhte Quellung bei **G17** wurde durch die Quellung in Wasser auf Grund der starken Hydrophilie des kationischen Monomers **TMAEA** hervorgerufen. Wie bereits zuvor bei den **BMAC**-Hydrogelen deutlich wurde, sorgt **TMAEA** bei einer Quellung in Wasser für einen enormen Anstieg der Quellung, wodurch die Polymerketten maximal gestreckt werden. Dadurch wird die freie Beweglichkeit der Polymerketten eingeschränkt, sodass eine erhöhte Steifigkeit des Hydrogels auftritt. Das Hydrogel **G16** wies mit 13.5 eine Quellung ähnlich den **BMAC**-Hydrogelen auf. Hierbei wurde das tertiäre Amin DMEDA zur Ringöffnung verwendet, welches keinen großen Einfluss auf die Quellung hatte. Es sollte berücksichtigt werden, dass dieses Gel nur ein einziges Mal im Rahmen eines Praktikums vermessen wurde und die Messwerte daher zunächst verifiziert werden sollten. Dieses Amin kann partiell als protonierte Spezies vorliegen, sodass ein ähnliches Verhalten wie bei **TMAEA** auftreten sollte, wodurch der Quellwert bei einer Quellung in Wasser deutlich höher sein sollte. Mit Steifigkeiten von ca. 3000 - 4000 Pa und einer Quellung von 10 - 15 wiesen die TLA-Hydrogele trotz der Funktionalisierung mit unterschiedlichen Molekülen ähnliche Eigenschaften wie die **BMAC**-Hydrogele auf. Auch kationische TLA-Hydrogele mit **TMAEA** als kationische Komponente verhielten sich ähnlich zu den **BMAC**-Hydrogelen, sodass sich das TLA-Hydrogelsystem auf Grund der mechanischen Eigenschaften als Alternative zu dem bereits bestehenden Hydrogelsystem eignet. Zuletzt sollte die Eignung des neuen Hydrogelsystems zur Kultivierung von NSCs untersucht werden.

#### 4.5 Kultivierung von NSCs auf TLA-Hydrogelen

Zur Untersuchung der TLA-Hydrogele für die Kultivierung der NSCs wurde **G16** verwendet und die Überlebensfähigkeit mit einer Polyornithin beschichteten Zellkulturschale verglichen. Zusätzlich wurde rein optisch die Differenzierung der Zellen auf **G16** betrachtet, um eine Aussage über die Eignung der TLA-Hydrogele zu treffen. Weiterhin wurde die Kultivierung in Kombination mit FGF betrachtet, da dieses zuvor einen enormen Einfluss auf die Kultivierung zeigte (siehe Kapitel 3.4). Wie auch zuvor wurden für die Zellexperimente 40000 Zellen pro Hydrogel eingesetzt und die Zellen nach 3 und 7 div mit den folgenden Fluoreszenzmarkern gefärbt: Calcein-AM (lebende Zellen), EthD-1 (tote Zellen),  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten), Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus). Die Fluoreszenzaufnahmen sind in Abb. 72 dargestellt. Für das TLA-Hydrogel zeigten die Experimente ohne WFs nach 3 div (A) nur eine geringe Zahl lebender Zellen ( $44 \pm 11$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup>), wohingegen mit FGF  $897 \pm 109$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vorlagen (A'). Die Hydrogele wiesen dabei eine Viabilität von 80 % ohne WFs und 96 % mit FGF auf. Auf der Kontrolle hingegen waren nach 3 div  $348 \pm 33$  Zellen/mm<sup>2</sup> ohne WFs und  $3107 \pm 317$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit FGF vorhanden (B/B'). Im Vergleich zu den Hydrogelen war hier die Zahl der vorhandenen Zellen deutlich größer. Die Viabilität unterschied sich mit 86 % ohne WFs und 99 % mit FGF nur leicht von den Hydrogelen. Nach 7 div stieg die Zahl der lebenden Zellen bei allen Konditionen an (A''/A'''/B''/B'''). Die Hydrogele zeigten  $119 \pm 32$  lebende Zellen/mm<sup>2</sup> ohne WFs und  $1761 \pm 96$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit FGF, wohingegen die Kontrolle  $545 \pm 27$  Zellen/mm<sup>2</sup> ohne WFs und  $5307 \pm 189$  Zellen/mm<sup>2</sup> mit FGF zeigte. Die Viabilität betrug für das Hydrogel 88 % ohne WFs, bzw. 79 % mit FGF und für die Kontrolle 93 % ohne WFs, bzw. 87 % mit FGF. Insgesamt war die Zahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> und auch die Viabilität bei der Kontrolle größer, allerdings war die Überlebensfähigkeit der TLA-Hydrogele mit über 80 % zufriedenstellend. Besonders in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF waren die TLA-Hydrogele zur Kultivierung der NSCs geeignet und zeigten ein ähnliches Verhalten der Zellen wie auf den **BMAC**-Hydrogelen. Hier war die Gesamtzahl lebender Zellen auf den neuen Hydrogelen größer als auf den unfunktionalisierten **BMAC**-Hydrogelen. Das verwendete TLA-Hydrogel trug neben dem tertiären Amin durch die Ringöffnung mit DMEDA

keinerlei Funktionen, welche die Kultivierung in besonderem Maße beeinflussen konnten.



**Abb. 72:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA- (A/C/E) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (B/D, F-B''', D''-F'''). Zusätzlich wurden die NSCs in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-F', A'''-F'''). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) für die Überlebensfähigkeit verwendet. Zur Untersuchung der Differenzierung wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten), Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) als Marker verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu$ m.

Die Betrachtung der Differenzierung (C-F) zeigte für die Hydrogele vor allem in Kombination mit FGF ein stark ausgeprägtes Netzwerk an Zellen (C'/C'''). Während nach 3 div bei beiden Bedingungen (C/C') kaum differenzierte Zellen auf den

Hydrogelen vorhanden waren, zeigte das Hydrogel nach 7 div ohne WFs (C'') eine starke Ausbildung von Astrozyten (stark ausgeprägte Gelbfärbung durch GFAP). In Kombination mit FGF waren nach 7 div (C'') hingegen hauptsächlich Oligodendrozyten und Neuronen zu sehen (rote und grüne Färbung). Die Kontrolle zeigte nach 3 div ohne WFs (D) hauptsächlich Neuronen und Oligodendrozyten, wohingegen mit FGF kaum differenzierte Zellen vorlagen (D'). Nach 7 div stieg auch auf der Kontrolle die Zahl der Astrozyten, wobei im Vergleich zu dem Hydrogel deutlich weniger Astrozyten und mehr Neuronen zu sehen waren (D''/D'''). Die Untersuchung mit Markern für Vorläuferzellen (Nestin) und teilungsaktive Zellen (PH3) zeigten für die Hydrogele nach 3 div in Kombination mit FGF (E') und nach 7 div ohne WFs (E'') viele Vorläuferzellen. Diese waren bei der Kontrolle in Kombination mit FGF für beide Zeitpunkte ebenfalls stark ausgeprägt (E-E''). Teilungsaktive Zellen lagen hauptsächlich nach 3 div bei den Experimenten mit FGF vor.

#### 4.6 Fazit

Durch die Verwendung von Thiolactonen konnte erfolgreich ein robustes Hydrogelsystem etabliert werden. Präpolymere unterschiedlicher Zusammensetzungen konnten durch die Copolymerisation eines Thiolacton Monomers mit DMA und der anschließenden Ringöffnung des Thiolactons hergestellt werden. Neben Präpolymeren mit einer höheren Thiolkonzentration im Vergleich zu den **BMAC**-Präpolymeren konnten auch kationische Präpolymere synthetisiert werden. Die Ringöffnung des Thiolactons konnte erfolgreich mit verschiedenen Aminen, wie z.B. *n*-Butylamin, DMEDA und Amin-funktionalisierten Oxazolinen, durchgeführt werden. Eine Vernetzung mit Diaminen oder die Ringöffnung mit den terminalen Aminen von Peptiden funktionierte hingegen nicht. Die erhaltenen freien Thiole konnten zur Funktionalisierung mit einfachen Acrylaten und Maleimid-funktionalisierten Peptiden in definierten Mengen eingesetzt und die verbliebenen Thiole zur Herstellung der Hydrogele genutzt werden. Die hergestellten Hydrogele wiesen dabei Steifigkeiten zwischen 2000 - 6000 Pa und Quellwerte zwischen 9 und 40 auf. Die erhaltenen Steifigkeiten und Quellwerte befanden sich im Rahmen der Werte der **BMAC**-Hydrogele, sodass die TLA-Hydrogele auf Grund der mechanischen Eigenschaften als alternatives Hydrogelsystem verwendet werden konnten. Erste Untersuchungen mit NSCs auf unfunktionalisierten TLA-Hydrogelen zeigten eine gute Viabilität der NSCs von über 80 % über die Dauer der Experimente. Eine Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF zeigte eine größere Zahl lebender Zellen im Vergleich zu dem unfunktionalisierten **BMAC**-Hydrogel.

## 5 Konjugation von Proteinen

In der natürlichen ECM spielen sogenannte ECM-Proteine eine entscheidende Rolle für das Verhalten der Zellen. Diese Proteine haben einen großen Einfluss auf viele Zellprozesse, wie z.B. Migration, Proliferation etc., aber auch auf die Überlebensfähigkeit der Zellen.<sup>[182]</sup> Da die verwendeten künstlichen Matrices, wie in Kapitel 3.2.3 gezeigt, ausreichend große Poren zum Transport von Proteinen aufweisen, ist eine Konjugation von Proteinen an die Matrix notwendig, um konzentrationsabhängige Untersuchungen unter gleichbleibenden Bedingungen durchzuführen. Da Proteine aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind, besitzen sie eine Vielzahl verschiedener reaktiver Gruppen, welche zur Konjugation verwendet werden können.<sup>[183]</sup> In den letzten Jahrzehnten wurden zur Konjugation von Proteinen an eine polymere Matrix, bzw. an Polymere, mehrere Strategien entwickelt. Dabei wird zwischen den drei Methoden *grafting to*, *grafting from* und *grafting through* unterschieden. *Grafting to* beschreibt einen Ansatz, bei welchem zuvor Präpolymere synthetisiert und diese anschließend mit dem Protein verknüpft werden. Als *grafting from* Methode wird die Einführung einer reaktiven Gruppe an das Protein bezeichnet, über welche, von dem Protein ausgehend, ein Polymer synthetisiert werden kann. Dies können z.B. RAFT-Gruppen für eine RAFT-Polymerisation sein. Hierbei liegt je Polymerkette ein einzelnes Protein vor. Eine Methode, um mehrere Proteine pro Polymerkette einzuführen wird als *grafting through* Methode bezeichnet. Hierbei wird das Protein durch die Einführung reaktiver Gruppen in ein Monomer verwandelt. Zusätzlich kann bei der Konjugation von Polymeren zwischen gerichteter Konjugation selektiv über eine spezifische Gruppe des Proteins oder unspezifischer Konjugation an eine der vielfach vorhandenen Seitenketten der Aminosäuren des Proteins unterschieden werden. Während sich bei der unspezifischen Konjugation an eine Seitenkette die Orientierung des Proteins bei jeder Konjugation ändern kann, ist die Ausrichtung des Proteins bei der Konjugation über eine spezifische Gruppe zu jedem Zeitpunkt identisch, weshalb die selektive Konjugation bevorzugt wird. Eine unspezifische Konjugation kann über die Reaktion von Aktivestern mit Aminen von z.B. Lysin, welche zu den proteinogenen Aminosäuren gehört, oder dem N-Terminus stattfinden. Lysine treten in Proteinen in großer Menge auf und sind häufig an der Oberfläche der Proteine zu finden, weshalb sich diese hervorragend für eine unspezifische

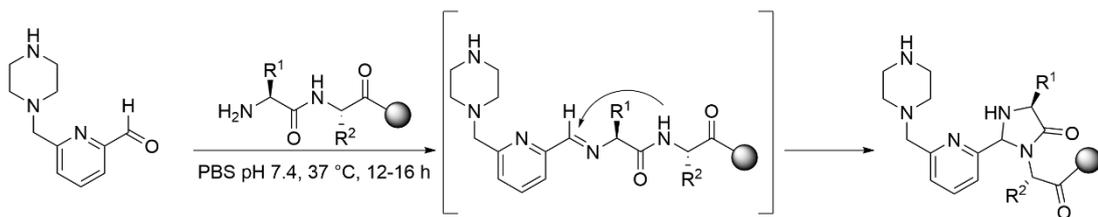
Konjugation eignen.<sup>[184]</sup> Zur selektiven Konjugation werden weitaus komplexere Methoden verwendet. Hier können entweder Aminosäuren mit einer geringen Häufigkeit, wie z.B. Tryptophan oder Cystein, oder modifizierte Proteine verwendet werden. Bei der Modifikation können z.B. Endgruppen eingeführt werden, welche anschließend in einer selektiven Reaktion adressiert werden können. Nachfolgend werden einige der wichtigsten Konjugationsmethoden dargestellt. Zur selektiven Konjugation von Polymeren über Cysteine wird häufig die bereits beschriebene Michael-Addition verwendet. Durch die geringe Häufigkeit an der Oberfläche von Proteinen wird hier im Gegensatz zu der Konjugation über Lysine eine selektive Konjugation erreicht.<sup>[184]</sup> Teilweise müssen sogar Cysteine zunächst über Gentechnik in das Protein eingebaut werden, bevor diese für eine selektive Konjugationen verwendet werden können.

Ausgehend von klassischen Methoden zur Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie wurde die Konjugation über den sogenannten Polyhistidin-tag (His<sub>6</sub>-tag) mit Metallionen wie z.B. Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> oder Co<sup>2+</sup> entwickelt. Viele Proteine werden bereits mit einem His<sub>6</sub>-tag zur Aufreinigung über Affinitätschromatographie hergestellt, sodass lediglich ein Polymer mit einem geeigneten Chelatliganden benötigt wird. Der am häufigsten verwendete Chelatligand ist Nitrilotriessigsäure (NTA), welcher z.B. ausgehend von *N*<sub>α</sub>,*N*<sub>α</sub>-Bis-(carboxymethyl)-L-lysin polymeranalog an das Polymerrückgrat gebunden werden kann.

Die Arbeitsgruppe um MAYNARD *et al.* benutzte RAFT-Reagenzien oder ATRP Initiatoren, welche zunächst an Proteine konjugiert wurden, um Polymer-Protein-Konjugate herzustellen.<sup>[185]</sup> Hierbei wurden z.B. zunächst Biotin-funktionalisierte ATRP-Initiatoren hergestellt, welche anschließend über eine starke Bindung des Biotins an das Protein SAV konjugiert wurden. Anschließend konnten über einen *grafting from* Ansatz pNIPAAm als Polymer-Protein-Konjugat hergestellt werden. Zusätzlich konnten MAYNARD *et al.* über Maleimid funktionalisierte RAFT-Reagenzien und Verwendung der Michael-Addition Protein-RAFT-Initiatoren herstellen und RAFT-Polymerisationen durchführen. Die Konjugate zeigten dabei eine gleichbleibende Aktivität der Proteine im Vergleich zu den nativen Proteinen.<sup>[186]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit und für das in Kapitel 3 beschriebene Polymersystem ist dieser Ansatz allerdings nicht geeignet, da bei der Polymerisation

zunächst ein Gel entsteht und die Polymerisation größtenteils diffusionsgesteuert ist. Für das neu entwickelte Polymersystem basierend auf Thiolactonen in Kapitel 4 hingegen könnten so Polymer-Protein-Konjugate hergestellt werden. Diese Konjugation konnte in dieser Arbeit allerdings aus zeitlichen Gründen nicht mehr untersucht werden.

Eine weitere selektive Methode zur Konjugation von Polymeren an den N-Terminus von Proteinen wurde 2015 von FRANCIS *et al.* vorgestellt.<sup>[187]</sup> Diese nutzten das 2-Pyridincarboxaldehyd (2PCA) Motiv. Dieser Aldehyd reagiert mit Aminen zunächst zu einem Imin, welches anschließend in einer Umlagerung durch ein benachbartes Amid-Stickstoff zu dem deutlich stabileren Imidazolidinon reagiert (siehe Abb. 73). Diese Reaktion findet lediglich am N-Terminus statt, da für die Umlagerung ein benachbartes Amid benötigt wird, welches durch die Peptidbindungen gegeben ist, nicht aber z.B. bei einer Lysin Seitenkette. Das 2PCA-Motiv kann mit nahezu jeder Kombination an N-terminalen Aminosäuren reagieren. Lediglich ein Prolin an zweiter Stelle verhindert die Reaktion, da hierbei das benachbarte Amid zur Bildung des stabileren Imidazolidinons nicht zugänglich ist. Der Arbeitsgruppe war es nicht nur möglich eine Vielzahl verschiedener Peptide und Proteine, wie z.B. GFP, Lysozym, Cytochrome C oder BSA, mit dem 2PCA-Motiv zu verknüpfen, sondern auch Polymerkonjugate über 2PCA-haltige Präpolymere herzustellen.<sup>[188]</sup> Dabei wurde zunächst ein Monomer mit einem 2PCA-Motiv synthetisiert und anschließend in einer Copolymerisation mit Acrylamid eingesetzt.



**Abb. 73:** Mechanismus der Reaktion des 2PCA-Motivs mit dem N-Terminus eines Peptids.

Ausgehend von den vorgestellten Methoden wurden nun verschiedene Konjugationsmethoden zur Herstellung definierter Polymer-Protein-Konjugate für Hydrogele untersucht. Als Testproteine wurden GFP mit einem His<sub>6</sub>-Tag und Lysozym verwendet.

## 5.1 Proteinkonjugation über NTA-Liganden

Zunächst wurde die Konjugation von Proteinen über einen NTA-Liganden untersucht. Dazu musste ein Präpolymer mit einem NTA-Liganden synthetisiert werden. Dies kann entweder über ein Monomer mit einer NTA-Gruppe oder eine polymeranaloge Funktionalisierung erfolgen. Die Herstellung eines Monomers wurde ausgehend von  $N_{\alpha},N_{\alpha}$ -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin über eine Schotten-Baumann-Reaktion durchgeführt (siehe Abb. 74).

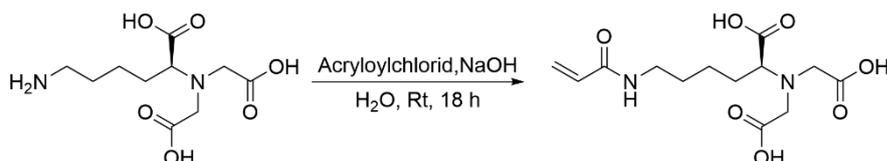
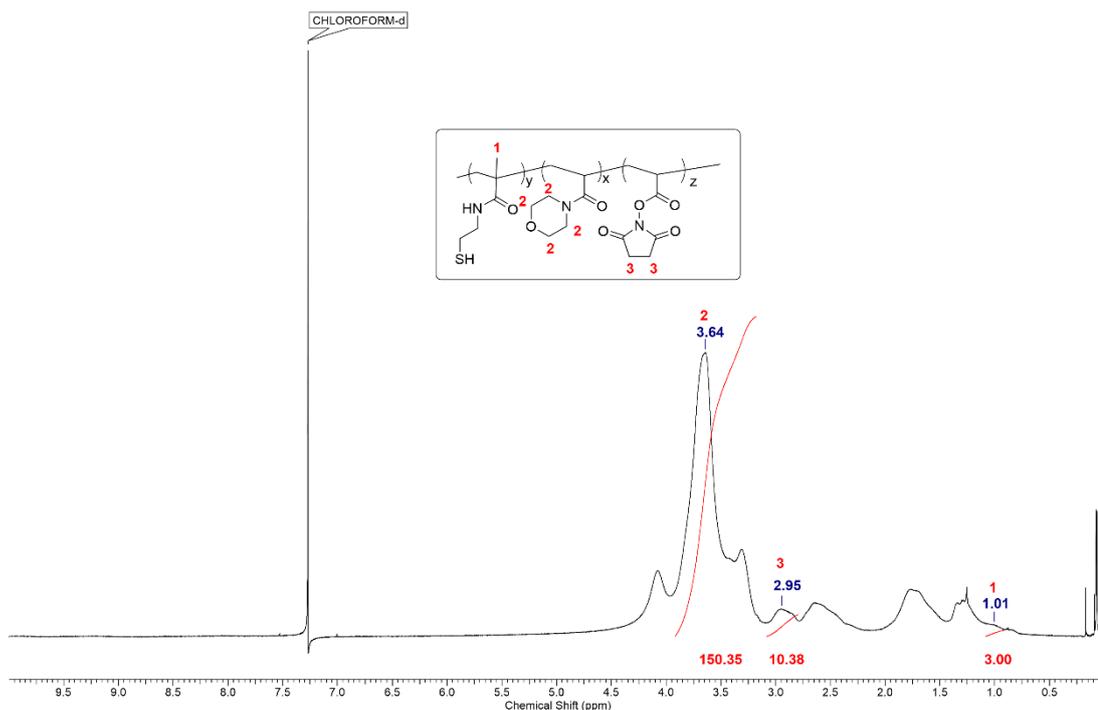


Abb. 74: Synthese des NTA-Monomers über eine Schotten-Baumann-Reaktion.

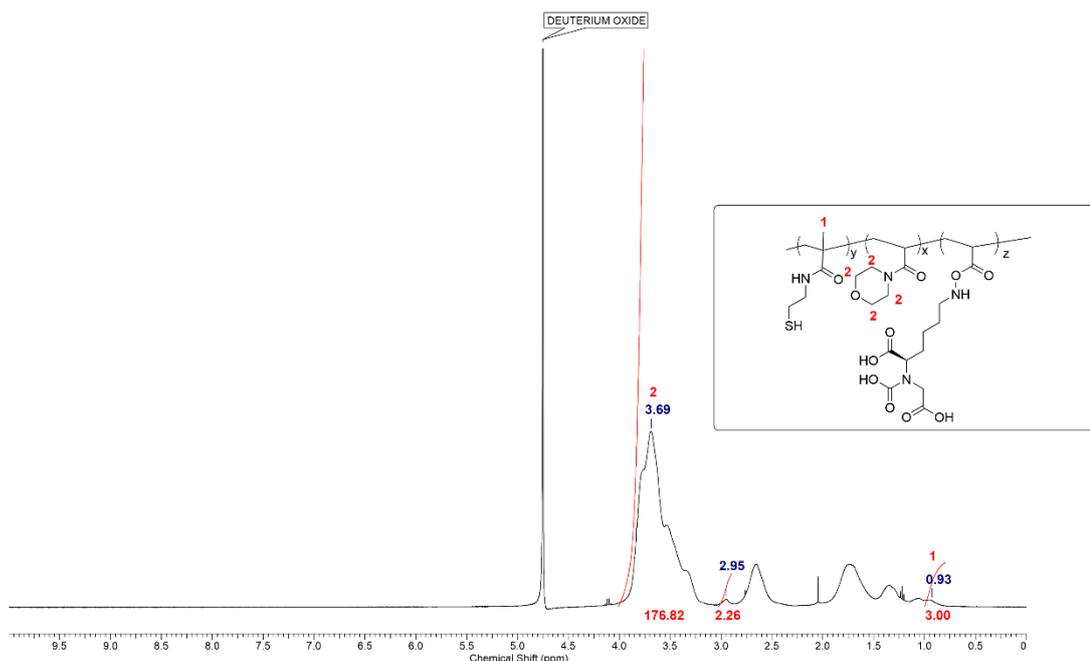
Das Produkt wurde zunächst säulenchromatographisch aufgereinigt. Allerdings konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie in keiner isolierten Fraktion das gewünschte Produkt nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte der sehr hydrophile Charakter des Monomers durch die drei Säuregruppen gewesen sein, wodurch das Produkt nicht über normale Säulenchromatographie aufgereinigt werden konnte. Eine Möglichkeit zur Auftrennung wäre die Verwendung eines Säulenmaterials mit Umkehrphase (C18) gewesen. Weiterhin könnte über die Verwendung eines Säurechlorids in Gegenwart von Säuren statt der gewünschten Reaktion mit dem primären Amin auch eine Reaktion mit den Säuren unter Ausbildung einer Anhydrid-Struktur eintreten. Da diese Reaktion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde eine alternative polymeranaloge Syntheseroute verwendet. Zur Kupplung des NTA-Liganden an das Polymer wurde ein NHS-Aktivester verwendet. Dieser konnte entweder selbst über polymeranaloge Reaktionen oder als Monomer in die Polymerstruktur eingeführt werden. Eine polymeranaloge Reaktion zur Gewinnung des Aktivesters ist von Vorteil, wenn das **BMAC**-Polymersystem aus Kapitel 3 verwendet wird, da das Spaltungsreagenz DTT mit dem Aktivester reagieren könnte. Für die polymeranaloge Reaktion wurde zunächst ein Copolymer aus **AMor**, **BMAC** und Acrylsäure mit einer molaren Verteilung von 91:4:5 hergestellt. Da Acrylsäure kein spezifisches Signal im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum aufweist, wurde diese direkt über eine EDC-Kupplung zum NHS-Aktivester umgesetzt. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des NHS-Polymers war bei einer chemischen Verschiebung von 2.95 ppm (**3**) das Signal des NHS-Esters zu sehen (siehe Abb. 75). Über das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum konnte eine

Zusammensetzung von 85.9:2.3:11.9 (**AMor:BMAC:Acrylsäure**) bestimmt werden, wobei die Menge des NHS-Esters durch das sehr kleine Signal der **BMAC**-Methylgruppe und der leichten Überlagerung der Signale stark von der theoretischen Menge abwich. Dennoch wurde dieses Polymer für die polymeranaloge Konjugation der NTA-Liganden verwendet, da bereits kleine Mengen zur Konjugation von Proteinen ausreichen sollten.



**Abb. 75:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines **PAMor-co-BMAC-co-NHSAc** Polymers in  $\text{CDCl}_3$ .

Das Polymer mit einem NTA-Liganden wurde über eine Reaktion von  $N_\alpha, N_\alpha$ -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin mit dem NHS-Ester unter basischen Bedingungen hergestellt und anschließend dialysiert. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (siehe Abb. 76) zeigte der NTA-Ligand keine alleinstehenden Signale, sodass die erfolgte Reaktion lediglich über das Verschwinden des NHS-Ester Signals bei einer chemischen Verschiebung von 2.95 ppm (**3**) bestätigt werden konnte.

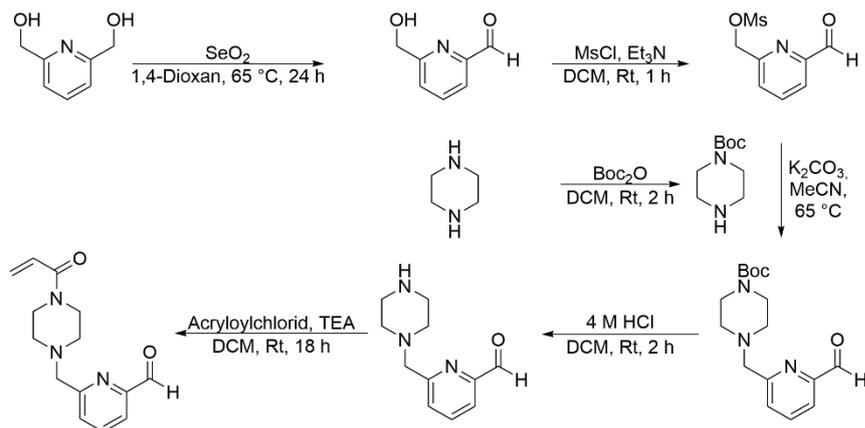


**Abb. 76:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum nach erfolgter Kupplung des NTA-Liganden an das Polymer in D<sub>2</sub>O.

Im nächsten Schritt wurde der benötigte Metallkomplex durch die Zugabe von Eisen(III)chlorid in wässriger Lösung hergestellt. Hierbei kam es zu einer Vernetzung des verwendeten Polymers. Grund hierfür war vermutlich eine Redox-Reaktion des Eisen(III)chlorids mit dem Thiol, sodass ein Disulfid, Eisen(II)chlorid und HCl entstand. Da diese Versuche eine Inkompatibilität des NTA-Liganden im Zusammenhang mit thiolhaltigen Polymersystemen nahelegte und mit dieser Methode lediglich Proteine mit einem His<sub>6</sub>-Tag an ein Polymer konjugiert werden können, wurde diese Option der Polymerkonjugation nicht weiterverfolgt.

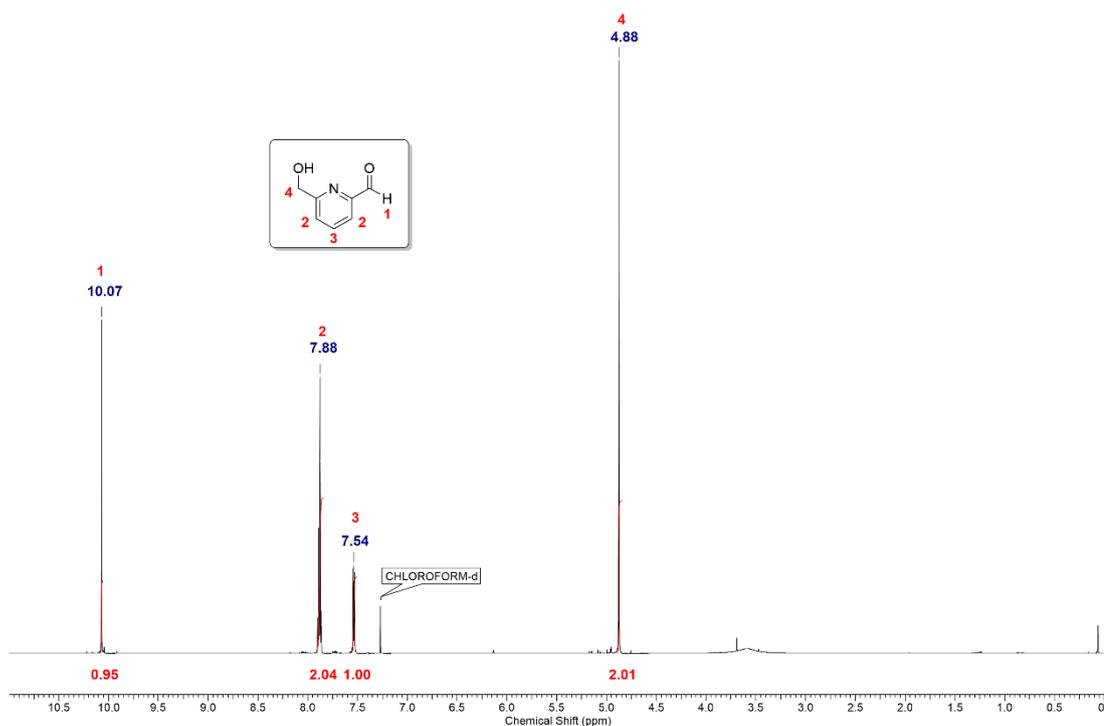
## 5.2 Proteinkonjugation über ein 2-Pyridincarboxaldehyd Motiv

Zur Herstellung von Polymer-Protein-Konjugaten synthetisierten KUMAR *et al.* zunächst ein 2PCA-Monomer ausgehend von 2,6-Pyridindimethanol (siehe Abb. 77).<sup>[188]</sup> Eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit wurde über einen Piperazinlinker zwischen dem Motiv und dem Acrylamid ermöglicht. Auch für das in dieser Arbeit verwendete Polymersystem eignete sich ein 2PCA-Acrylamid-Monomer zur Herstellung von Präpolymeren zur Konjugation von Proteinen.



**Abb. 77:** Syntheseplanung des 2PCA-Acrylamid-Monomers.

Ausgehend von 2,6-Pyridindimethanol wurde zunächst der Aldehyd 6-(Hydroxymethyl)-2-pyridincarboxaldehyd (2PCA-Alkohol) über eine Oxidation mit Selen(IV)-oxid synthetisiert. Um nur eine der zwei Hydroxygruppen zu oxidieren wurde Selen(IV)-oxid im Unterschuss mit nur 0.5 Äquivalenten verwendet. Das gewünschte Produkt wurde mit einer Ausbeute von 70 % erhalten und mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie und Massenspektrometrie untersucht. Dabei konnte das Wasserstoffaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 137.84 (ber. 138.05) gefunden werden (siehe Abb. A 27). Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Produktes in Abb. 78 zeigte das für die Aldehydgruppe charakteristische Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 10.07 ppm (**1**).



**Abb. 78:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des 2PCA-Alkohols in  $\text{CDCl}_3$ .

Damit Alkohole für eine nucleophile Substitutionsreaktion zugänglich sind, müssen diese zunächst mit z.B. Säurechloriden in eine bessere Abgangsgruppe überführt werden. Dazu werden häufig Methansulfonsäurechlorid (MsCl) oder *p*-Toluolsulfonsäurechlorid (TsCl) verwendet. In dieser Arbeit wurde der 2PCA-Alkohol mit MsCl zu dem entsprechenden Mesylat (2PCA-Ms) umgesetzt (siehe Abb. 79).

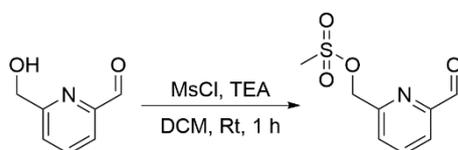


Abb. 79: Synthese von 2PCA-Ms.

Das erhaltene Produkt konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie mit einer Ausbeute von 80 % nachgewiesen werden. Im Vergleich zu dem  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des 2PCA-Alkohols in Abb. 78 zeigte das Spektrum von 2PCA-Ms (siehe Abb. 80) ein weiteres Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 3.16 ppm (**5**), welches den 3 Protonen der Methylgruppe des Mesylats zugeordnet werden konnte.

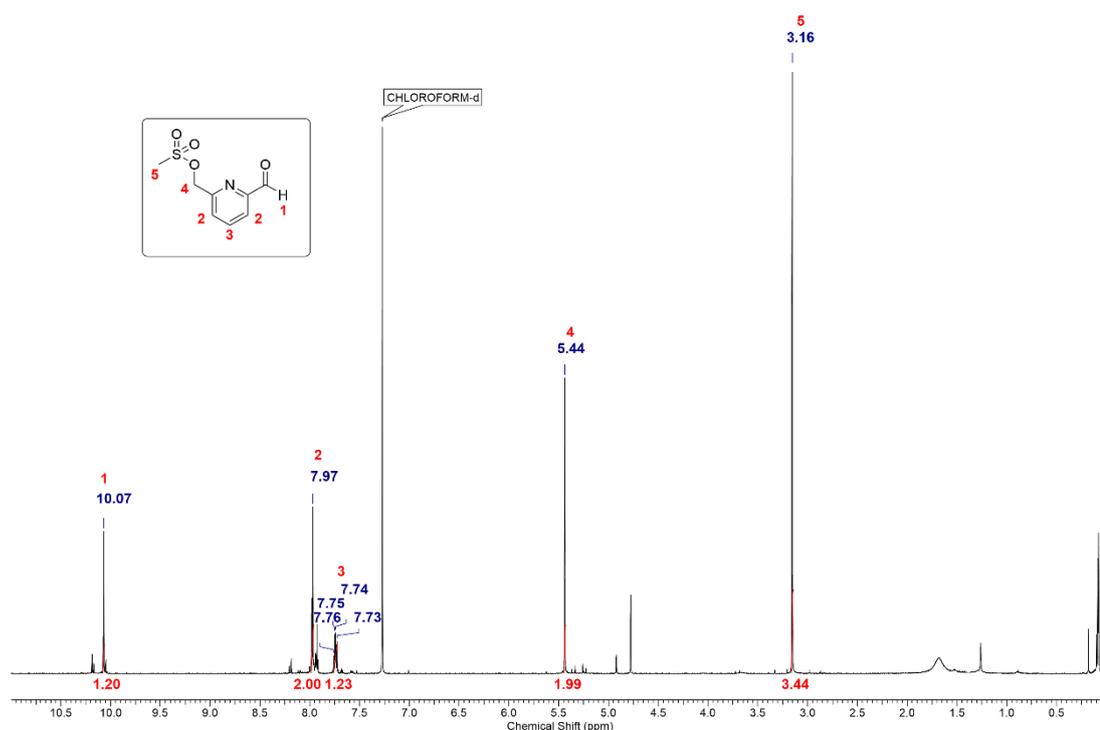


Abb. 80:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von 2PCA-Ms in  $\text{CDCl}_3$ .

Im nächsten Schritt wurde der aktivierte Alkohol mit Boc-Piperazin in einer nucleophilen Substitutionsreaktion umgesetzt. Dazu wurde zunächst das Boc-Piperazin über eine einseitige Schützung von Piperazin synthetisiert. Diese Reaktion

wurde unter denselben Bedingungen wie bei der Synthese der verschiedenen kationischen Monomere durchgeführt (siehe Abb. 35, Kapitel 3.3.4). Das geschützte Piperazin konnte mit einer sehr niedrigen Ausbeute von 23 % über  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Abb. 81). Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum zeigte das charakteristische Signal der Boc-Schutzgruppe bei einer chemischen Verschiebung von 1.45 ppm (4) und die jeweiligen Signale des Piperazins. Das breite Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 2.48 ppm (3) zeigte das einzelne Proton des sekundären Amins, sodass eine einseitige Schützung bestätigt werden konnte.

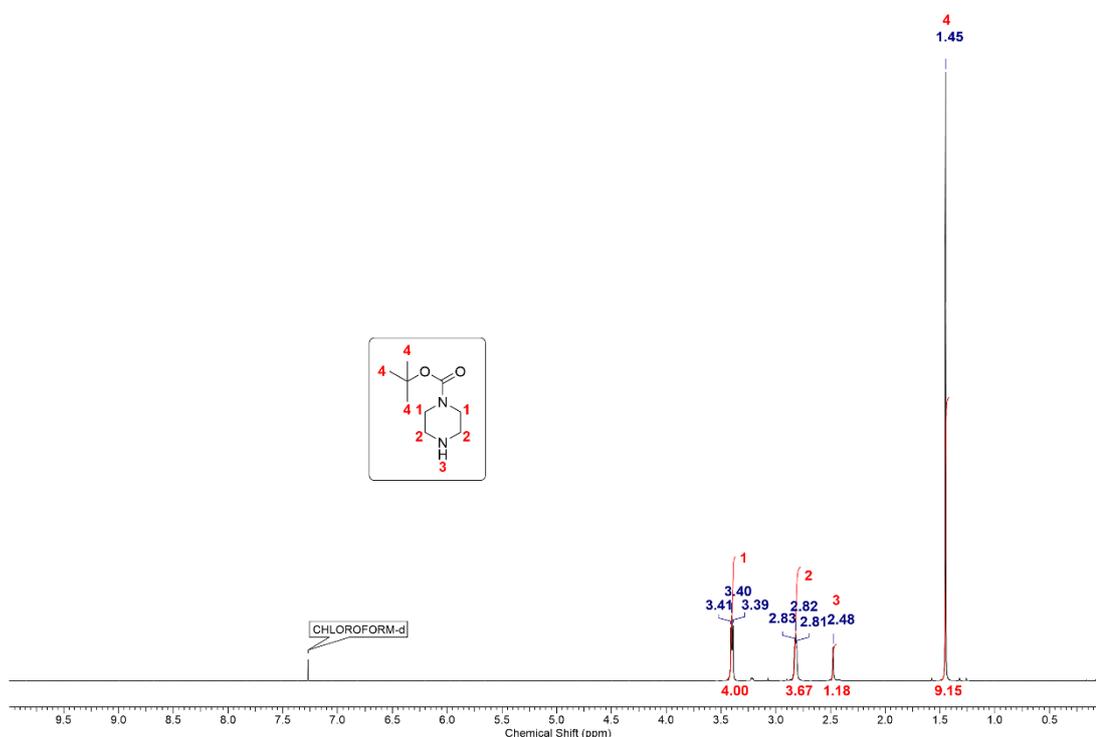
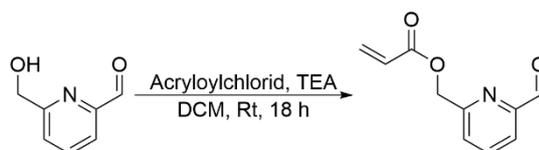


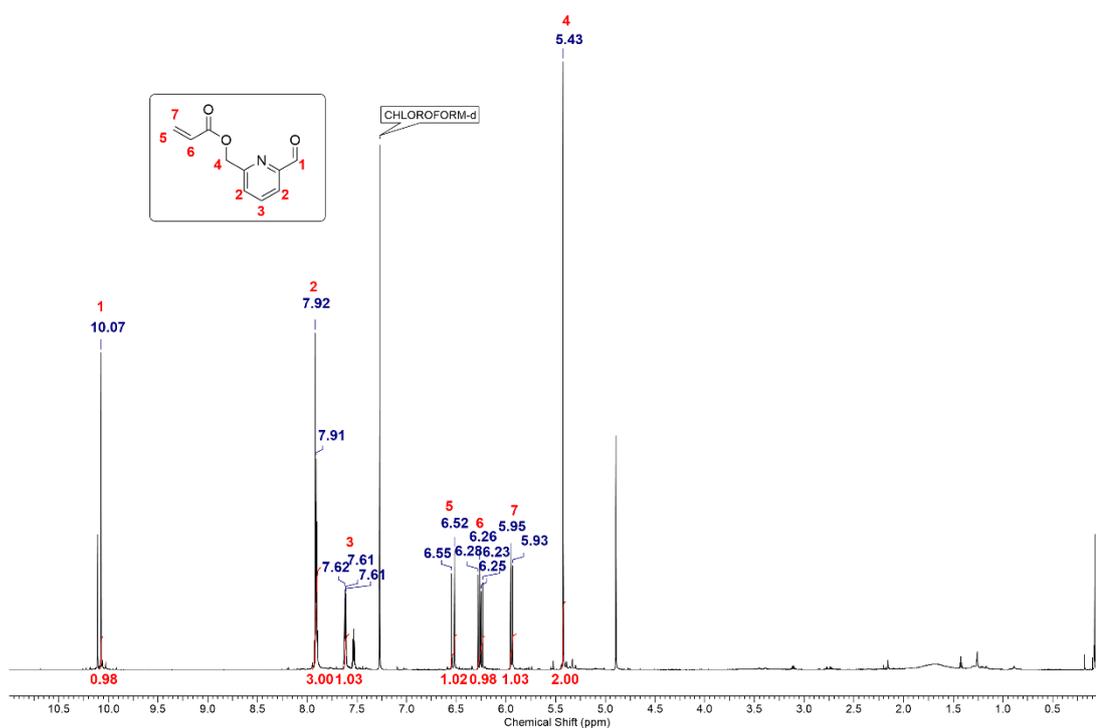
Abb. 81:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Boc-Piperazins in  $\text{CDCl}_3$ .

Die Substitutionsreaktion des 2PCA-Ms mit dem Boc-Piperazin wurde bei 60 °C in MeCN unter basischen Bedingungen durch die Verwendung von Kaliumcarbonat durchgeführt. Hierbei konnte allerdings das gewünschte Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung nicht isoliert werden. Lediglich Fraktionen mit den eingesetzten Edukten wurden isoliert, sodass diese Reaktion nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Da auf diese Weise kein geeignetes 2PCA-Monomer zur Synthese von Präpolymeren hergestellt werden konnte, sollte zunächst ein Monomer direkt aus dem 2PCA-Alkohol hergestellt werden. Wie auch zuvor bei der Synthese der Monomere wurde die Schotten-Baumann-Reaktion mit Acryloylchlorid verwendet (siehe Abb. 82).



**Abb. 82:** Synthese des 2PCA-Acrylats über eine Schotten-Baumann-Reaktion.

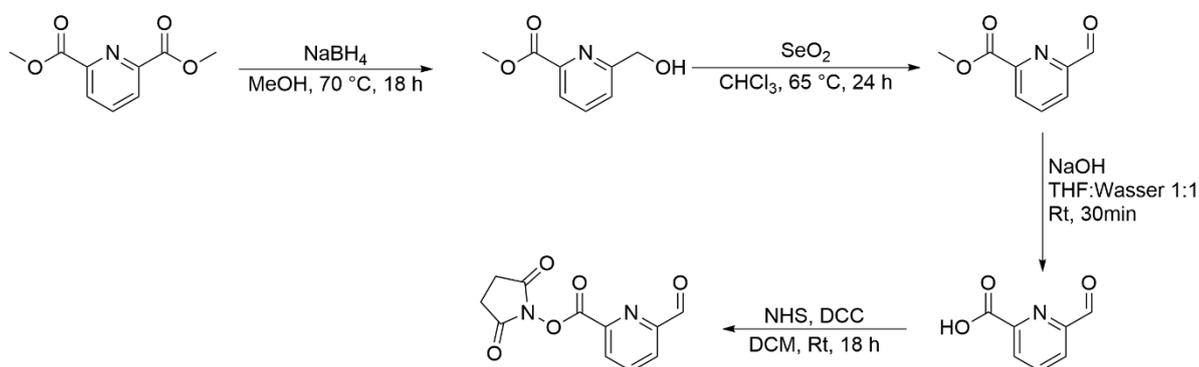
Das Produkt konnte über  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Abb. 83). Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum zeigte die typischen Acrylat-Signale bei einer chemischen Verschiebung von 5.93 - 6.55 ppm (**5,6,7**). Dennoch waren auch nach zweifacher säulenchromatographischer Aufreinigung noch Verunreinigungen durch den 2PCA-Alkohol sichtbar.



**Abb. 83:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie des 2PCA-Acrylats in  $\text{CDCl}_3$ .

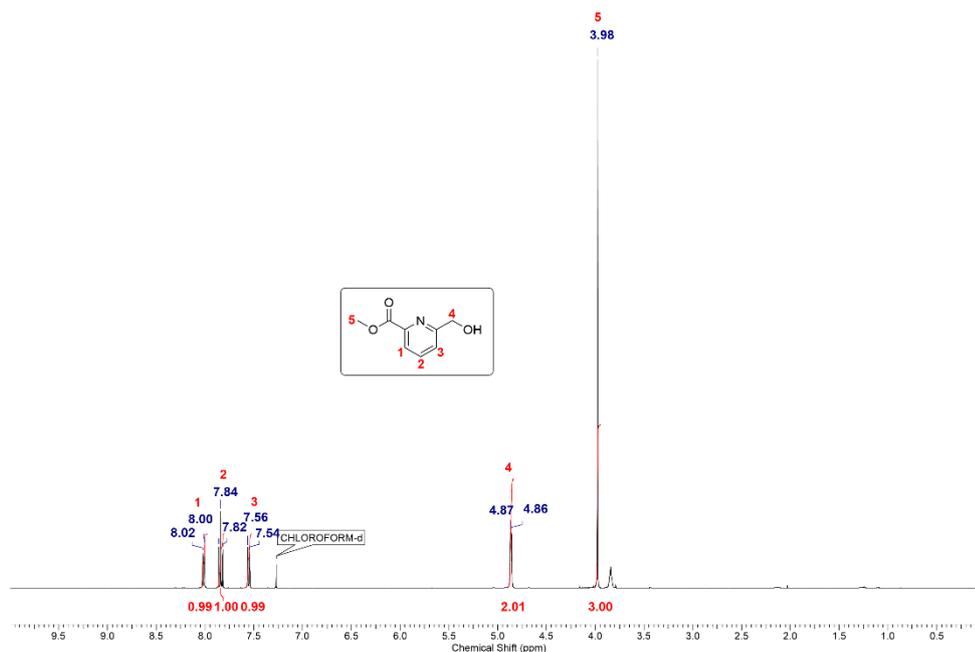
Da die Verunreinigung durch den 2PCA-Alkohol während der Polymerisation nicht stören, wurde das Monomer nachfolgend in einer Polymerisation eingesetzt. Für die Konjugation von Proteinen wäre eine geringe Konzentration des 2PCA-Motivs ausreichend. Das Polymer wurde über dieselbe Methode wie die **BMAC**-Präpolymere mit einer Zusammensetzung von 92:4:5 (**AMor:BMAC:2PCA-Acrylat**) in THF hergestellt. Die Untersuchung des Polymers mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie zeigte allerdings keinerlei Signale für das 2PCA-Acrylat. Dies könnte an der schlechten Löslichkeit des 2PCA-Motivs in THF liegen, weshalb in einem zweiten Versuch statt THF auch 1,4-Dioxan als Lösungsmittel verwendet wurde, da das Motiv in diesem löslich war. Auch hier konnte kein polymergebundenes Motiv

mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie nachgewiesen werden. Problematisch könnte der starke Unterschied in der Polarität der Monomere sein, wodurch sich **AMor**, **BMAC** und 2PCA-Acrylat nicht copolymerisieren ließen. Da eine Verwendung von 2PCA-Monomeren nicht möglich war, sollte das Motiv nun polymeranalog an ein Polymer gebunden werden. Wie bereits in Kapitel 5.1 erwähnt wurde, kann die Verwendung von Aktivestern bei der Herstellung der Präpolymere des **BMAC**-Systems durch die Spaltung mit DTT zu Problemen führen, weshalb ein 2PCA-Aktivester-Motiv synthetisiert werden sollte. Die Syntheseplanung des 2PCA-Aktivester-Motivs ist in Abb. 84 dargestellt.



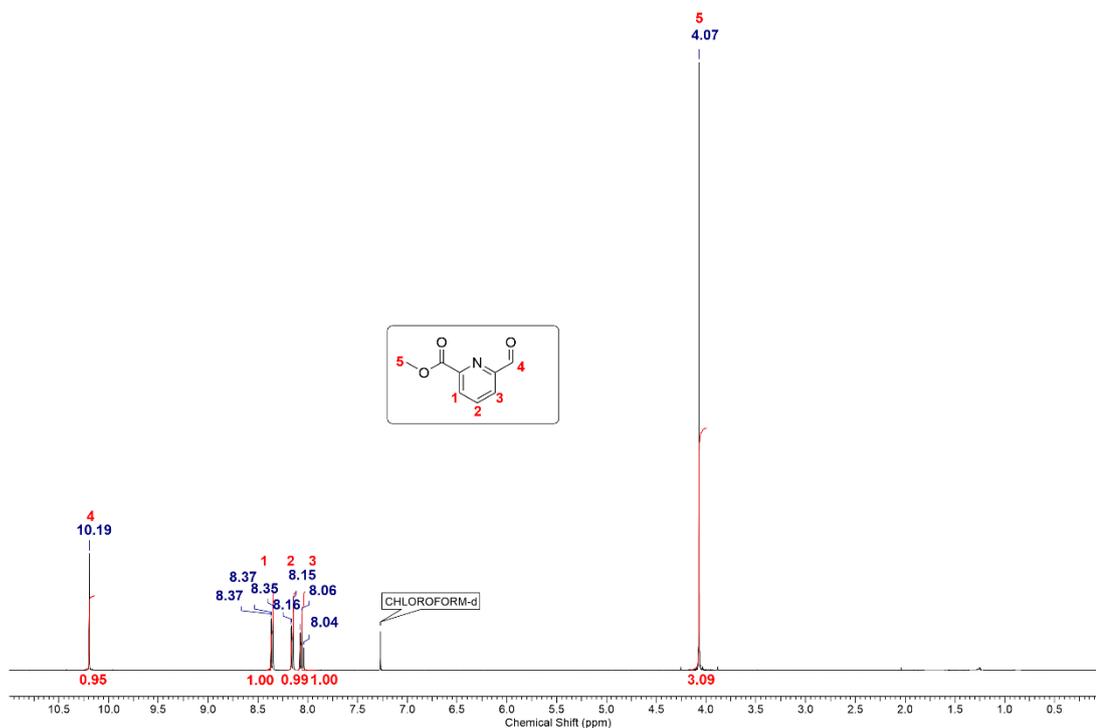
**Abb. 84:** Syntheseplanung eines 2PCA-NHS-Aktivester-Motivs.

Das 2PCA-Aktivester Motiv sollte über vier Schritte ausgehend von Pyridin-2,6-dicarboxymethylester synthetisiert werden. Im ersten Schritt wurde der Methylester unter stöchiometrischen Bedingungen zum Alkohol reduziert. Die Wahl von Methanol als Lösungsmittel spielte hierbei eine entscheidende Rolle zur Steigerung der Reaktivität, sodass auch Ester reduziert werden konnten.<sup>[189]</sup> Das Produkt konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie (siehe Abb. 85) und Massenspektroskopie (siehe Abb. A 33) mit einer Ausbeute von 52 % nachgewiesen werden. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum war das Singulett der neugebildeten Methylengruppe benachbart zu dem entstandenen Alkohol bei einer chemischen Verschiebung von 4.86 ppm (**4**) zu sehen. Zusätzlich war das Integral des Methylesters nach erfolgter Reaktion von 6 Protonen auf 3 reduziert. Mit Hilfe der Massenspektroskopie konnte das Wasserstoffaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 167.86 (ber. 168.06) und das Natriumaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 189.89 (ber. 190.05) nachgewiesen werden.



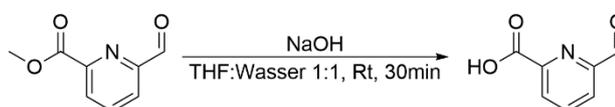
**Abb. 85:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxylat in  $\text{CDCl}_3$ .

Im nächsten Schritt wurde der neu entstandene Alkohol mit Selen(IV)oxid zum Aldehyd oxidiert. Diese Reaktion wurde wie zuvor bereits beschrieben durchgeführt. Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Produktes zeigte das typische Aldehyd-Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 10.19 ppm (4) und das Signal der Methylengruppe des Alkohols bei einer chemischen Verschiebung von 4.86 ppm war nicht mehr vorhanden. Mittels Massenspektrometrie konnte das Natriumaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 188.08 (ber. 188.03) nachgewiesen werden (Abb. A 36). Die Ausbeute betrug 52 %.



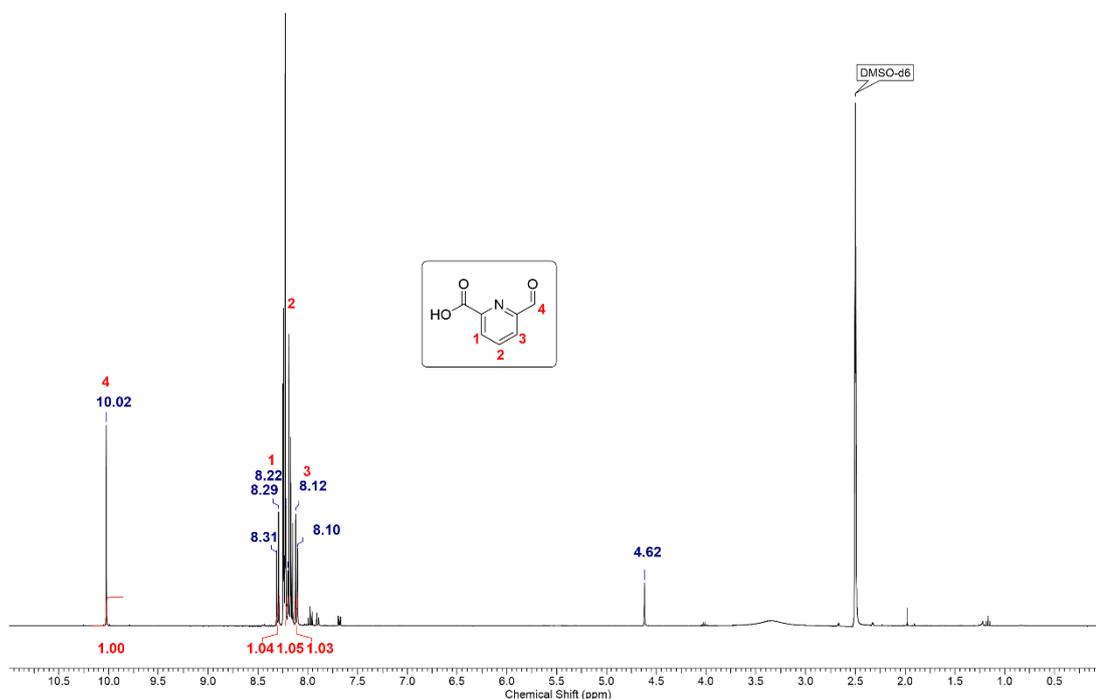
**Abb. 86:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in  $\text{CDCl}_3$ .

Anschließend wurde der zweite Methylester zur Säure hydrolysiert, sodass nachfolgend der Aktivester gebildet werden konnte. Dazu wurde der Aldehyd für 30 min in einer 1 M NaOH-Lösung gerührt (siehe Abb. 87).



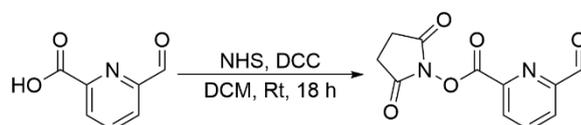
**Abb. 87:** Synthese von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure.

Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 62 % erhalten werden und mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (siehe Abb. 88) und Massenspektroskopie (Abb. A 39) untersucht werden. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des Produktes waren noch einige Verunreinigungen zu sehen. Das Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 4.62 ppm deutete hier auf eine Verunreinigung durch den Methylester als Edukt hin. Dementsprechend war die Hydrolyse des Methylesters hier nicht vollständig abgelaufen. Dennoch konnte das gewünschte Produkt mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Es wurde das Wasserstoffaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 151.87 (ber. 152.03) nachgewiesen. Gleichzeitig wurde aber auch das Edukt als Wasserstoffaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 165.84 (ber. 166.05) nachgewiesen.



**Abb. 88:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in  $\text{DMSO-d}_6$ .

Da die Herstellung des NHS-Aktivesters auch in Gegenwart des Methylesters ablaufen sollte, wurde die Reaktion trotz der Verunreinigung durchgeführt. Dabei sollte der 2PCA-NHS-Aktivester mit NHS und DCC als Kupplungsreagenz synthetisiert werden (Abb. 89).



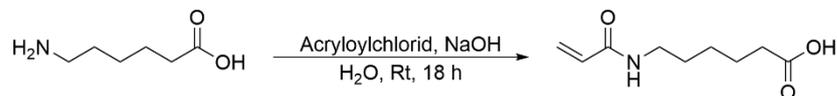
**Abb. 89:** Synthese des 2PCA-NHS-Aktivesters über eine DCC-Kupplung.

Bei der Untersuchung des Produktes mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte dieses nicht nachgewiesen werden. Aus zeitlichen Gründen wurde an dieser Stelle die weitere Untersuchung der Proteinkonjugation mit dem 2PCA-Motiv eingestellt und der Fokus auf die Etablierung des neuen Thiolactonsystems (siehe Kapitel 4) und die Durchführung der Zelleexperimente gesetzt.

### 5.3 Nicht selektive Proteinkonjugation über Aktivester

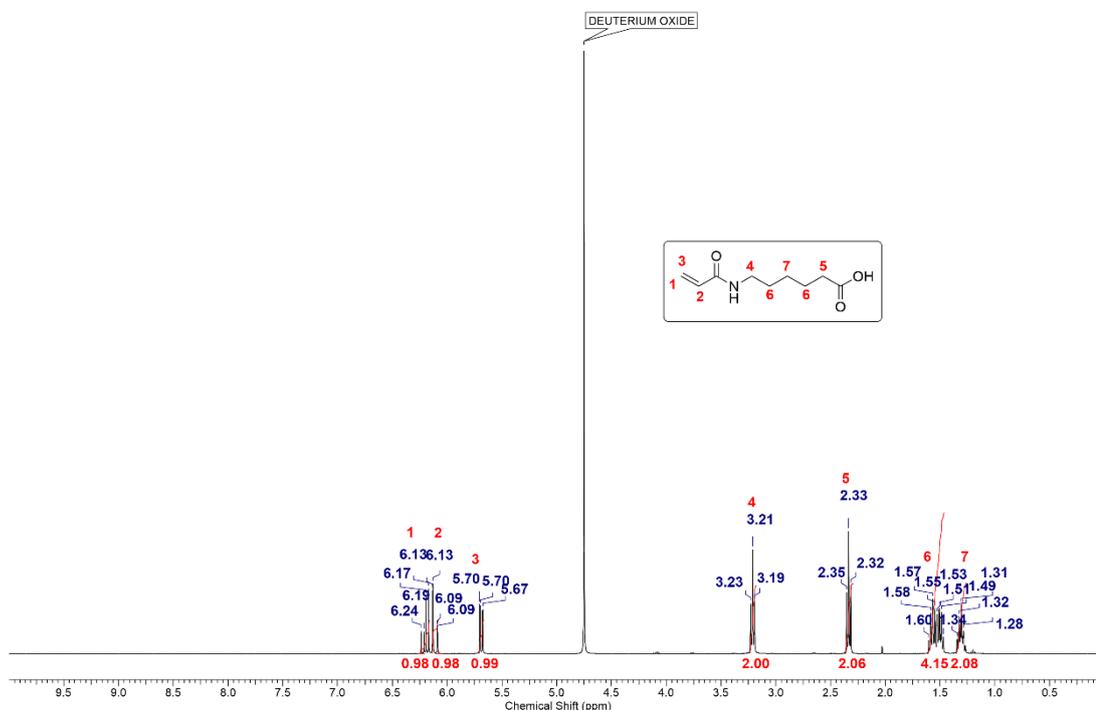
Zeitgleich mit der Untersuchung der Konjugation von Proteinen über das 2PCA-Motiv wurde die nicht-selektive Konjugation über Aktivester untersucht. Dazu wurden zwei Aktivester, welche in wässrigen Lösungen stabil waren, ausgewählt: NHS- und Pentafluorphenol-Aktivester (PFP). Zunächst wurde zur Evaluation der Konjugation von Proteinen ein Polymer ohne **BMAC** verwendet. Die Aktivester

wurden über polymeranaloge Reaktionen über Säuregruppen in die Polymerstruktur eingebracht. Dazu wurde ein Monomer synthetisiert, welches zwischen der Säure und dem Polymerrückgrat einen Spacer über sechs Kohlenstoffe besaß. Das Monomer wurde ausgehend von 6-Aminohexansäure über eine Schotten-Baumann-Reaktion hergestellt (siehe Abb. 90).



**Abb. 90:** Synthese von Hexansäureacrylamid über die Schotten-Baumann-Reaktion.

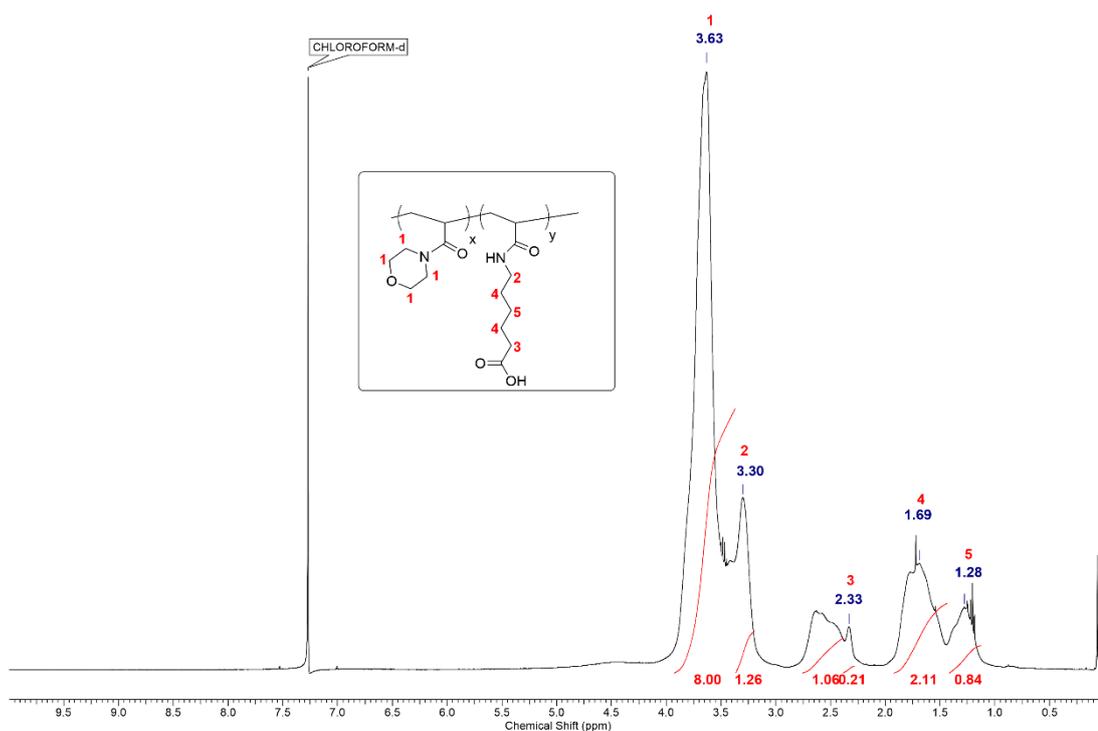
Das Produkt konnte mit  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie (siehe Abb. 91) und Massenspektrometrie mit einer Ausbeute von 42 % nachgewiesen werden. Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum zeigte die hinzugekommenen typischen Signale des Acrylats bei einer chemischen Verschiebung von 5.67 - 6.24 ppm (**1,2,3**) in einem passenden Verhältnis zu den Signalen der Methylengruppen der 6-Aminohexansäure. Mittels Massenspektrometrie konnte das Wasserstoffaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 186.17 (ber. 186.11) und das Natriumaddukt mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 208.12 (ber. 208.10) nachgewiesen werden.



**Abb. 91:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Hexansäureacrylamid in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Das Hexansäureacrylamid (HSAA) wurde im nächsten Schritt in einer Copolymerisation mit **AMor** in einem Verhältnis von 95:5 (**AMor**:HSAA) umgesetzt. Die Copolymerisation wurde unter denselben Bedingungen wie bei der

Herstellung der **BMAC**-Präpolymere durchgeführt. Da hierbei kein **BMAC** verwendet wurde, konnte das Polymer nach erfolgter Polymerisation in Diethylether gefällt werden und musste nicht zunächst gespalten und dialysiert werden. Das Polymer **P11** wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht und zeigte neben dem Signal für **AMor** bei einer chemischen Verschiebung von 3.25 - 3.8 ppm (**1**) weitere Signale bei 3.30 (**2**) und 2.33 ppm (**3**), welche den Methylengruppen des HSAA zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 92). Da die Signale der Methylengruppen mit den Signalen von **AMor**, bzw. dem Rückgrat des Polymers überlagerten, war eine Bestimmung der Zusammensetzung nicht möglich. Dennoch zeigte das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eindeutig, dass eine polymere Struktur mit beiden Monomeren gebildet wurde. Für weitere polymeranaloge Reaktionen wurde daher angenommen, dass ein vollständiger Einbau des HSAA-Monomers stattgefunden hat.



**Abb. 92:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines **PAMor-co-HSAA** Copolymers **P11** in  $\text{CDCl}_3$ .

Zur Herstellung der Aktivester Polymere wurde **P11** entweder mit PFP oder NHS in einer DCC-Kupplung umgesetzt. Beide Aktivester-Polymere besaßen keine allein stehenden Signale im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum, welche sich zur Ermittlung der Zusammensetzung eignen. Für das NHS-Aktivester-Polymer müsste eine höhere Konzentration des Aktivesters verwendet werden, sodass sich die Überlagerung mit dem Polymerrückgrat nicht so stark auf die Zusammensetzung auswirkt. Das PFP-Polymer hingegen konnte anhand von  $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektroskopie untersucht werden

und zeigte nach mehrtägiger Dialyse weiterhin Signale im  $^{19}\text{F}$ -Spektrum, sodass hier davon ausgegangen werden konnte, dass der PFP-Aktivester an dem Polymer gebunden war. Da die polymeranaloge Reaktion mit dem PFP-Aktivester funktionierte, wurde davon ausgegangen, dass auch die Reaktion mit dem NHS-Ester funktionierte, und beide Aktivester-Polymere wurden zur Konjugation von Proteinen verwendet.

Als Testproteine wurden Lysozym (14300 g/mol) und GFP<sub>His6</sub> (28000 g/mol) verwendet. Während Lysozym kommerziell erhältlich ist, wurde GFP mit einem His<sub>6</sub>-Tag von der Arbeitsgruppe BRACKMANN zur Verfügung gestellt. Zur Konjugation wurden zunächst die entsprechenden NHS- und PFP-Polymere in PBS-Puffer in einer finalen Konzentration des Aktivesters von 10 mM gelöst und anschließend das Protein hinzugegeben. Zur ausreichenden Reaktionszeit wurde eine Dauer von 2 d gewählt. Um die Polymer-Protein-Konjugate mittels MALDI oder SDS-Page zu analysieren, mussten die Salze aus der Lösung entfernt werden. Dazu wurden Zentrifugenfilter zur Entsalzung speziell für Proteine verwendet. Die Untersuchung mit MALDI ergab, dass bei keiner der Proben eine Masse detektiert werden konnte. Weder das native Protein noch das Konjugat konnten hierbei nachgewiesen werden. Dieses Problem ist entweder durch eine fehlerhafte Anwendung der Entsalzung oder aber auf die Verwendung einer falschen Matrix bei der MALDI zurückzuführen. Auch eine Analyse mit SDS-Page und einer geeigneten Protein-Leiter zeigte weder das native Protein noch das Polymer-Protein-Konjugat, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass ein Problem bei der Aufreinigung nach der Kupplung auftritt. Dieses Problem wurden aus Zeitgründen allerdings nicht weiter untersucht.

## 5.4 Fazit

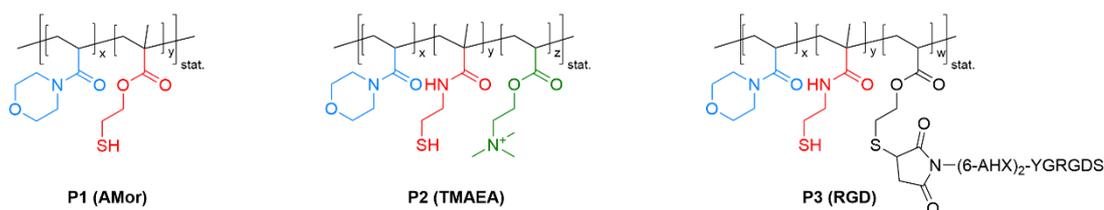
Es wurde die Konjugation von Proteinen über NTA-Liganden, 2-PCA und Aktivestern untersucht. Eine Konjugation über einen NTA-Liganden gestaltete sich einerseits durch die Herstellung eines geeigneten Polymers mit NTA-Liganden als schwierig. Andererseits führte die Verwendung von Metallionen zur Konjugation, in Kombination mit schwefelhaltigen Polymeren, zu einer Oxidation der Thiole, wodurch sich die Konjugation durch NTA-Liganden nicht für das verwendete Polymersystem eignete.

Die Herstellung eines Präpolymers mit einer 2PCA-Gruppe gestaltete sich auf Grund des hydrophoben Charakters der 2PCA-Gruppe häufig als schwierig. So war es nicht möglich ein Monomer mit einem hydrophileren *spacer* zu synthetisieren. Die Herstellung eines 2PCA-Acrylats hingegen konnte problemlos durchgeführt werden. Allerdings ließ sich dieses hydrophobe Monomer nicht mit **AMor** und **BMAC** copolymerisieren. Auch eine alternative Herstellung eines Präpolymers mit einer 2PCA-Gruppe über Aktivester, entweder am Polymer oder mit einem 2PCA-Aktivester, erwiesen sich als nicht praktikabel, sodass kein Polymer mit einer entsprechenden 2PCA-Gruppe zur Konjugation von Proteinen synthetisiert werden konnte.

Zuletzt wurde die nicht-selektive Konjugation von Proteinen über Aktivester untersucht. Hierbei konnten zwei Aktivester-Polymere mit einem NHS- bzw. PFP-Aktivester synthetisiert werden. Die Konjugation wurde mit den Proteinen GFP und Lysozym durchgeführt, doch konnte das Konjugat weder mittels MALDI noch SDS-Page nachgewiesen werden. Da bei beiden Methoden auch das native Protein nicht nachgewiesen werden konnte, trat vermutlich bei der Abtrennung der Salze des PBS-Puffers über Filtration ein Problem auf. Aus zeitlichen Gründen wurde die Proteinkopplung nicht weiter untersucht und der Fokus auf die Zellexperimente gelegt.

## 6 Zusammenfassung & Ausblick

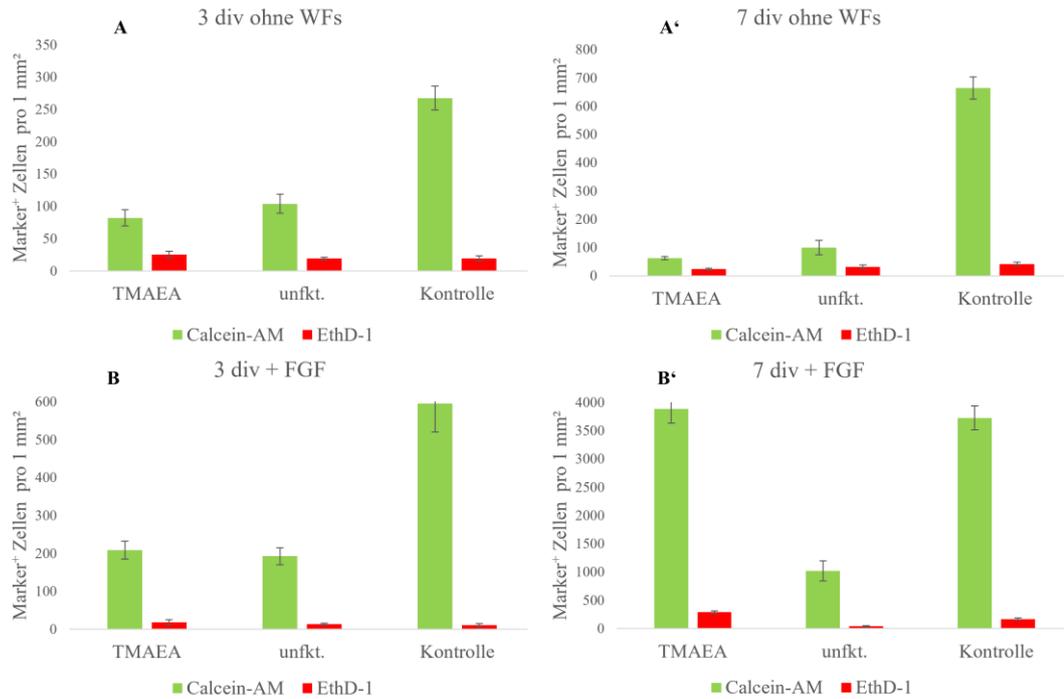
Ziel dieser Arbeit war die Herstellung modifizierter Hydrogele über definierte Präpolymere zur Kultivierung von NSCs. Im ersten Ergebniskapitel (siehe Kapitel 3, S. 23 ff.) wurden die Synthesen der Monomere und Präpolymere, die Herstellung der Hydrogele aus diesen Präpolymeren und deren Anwendung in der Kultivierung von NSCs und U251-MG Zellen behandelt. Insgesamt wurden drei verschiedene Präpolymere hergestellt: ein unfunktionalisiertes Präpolymer als Referenz (**P1**), ein Präpolymer mit einer kationischen Ladung (**P2**) und ein RGD-Peptid haltiges Polymer (**P3**). Die Grundstruktur der Präpolymere bildeten dabei immer die Monomere **AMor** und **BMAC**. Als kationisches Monomer wurde **TMAEA** verwendet (siehe Abb. 93).



**Abb. 93:** Präpolymerstrukturen zur Herstellung modifizierter Hydrogele.

Die Polymerstrukturen konnte über <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie ermittelt werden und stimmten gut mit den theoretischen Zusammensetzungen überein. Alle hergestellten Präpolymere besaßen eine molare Masse im Bereich von 25 - 35 kDa und eine Thiolkonzentration zwischen 0.28 und 0.42 mmol/g Polymer. Eine ausreichend hohe Thiolkonzentration größer als 0.2 mmol/g Polymer war notwendig zur Herstellung der Hydrogele über eine Vernetzungsreaktion von PEGDA-3500 mittels einer Michael-Addition. Die Herstellung der Hydrogele erfolgte über das Mischen einer Polymer- und einer Vernetzer-Stammlösung. Alle Hydrogele wurden rheologisch und auf ihre Quellung untersucht. Die Hydrogele **G1 - G3**, ausgehend von den Präpolymeren **P1 - P3**, zeigten unabhängig von der Struktur einen Quellwert von ca. 10 - 11 und ein Speichermodul von 2500 - 3000 Pa. Die Untersuchungen mittels REM zeigten eine poröse Struktur der Hydrogele mit einer Porengröße von 2 - 3 µm im getrockneten Zustand, welche ausreichend groß für einen Stofftransport von z.B. Proteinen oder Wachstumsfaktoren innerhalb des Gels waren (siehe Abb. 23, S. 41). Auf diesen Hydrogelen wurden in 2D-Zellexperimenten zunächst NSCs kultiviert. Hierbei stellte sich schnell ein großes Problem mit der Überlebensfähigkeit der NSCs während der Experimente heraus, weshalb zusätzlich die robustere Tumorzelllinie

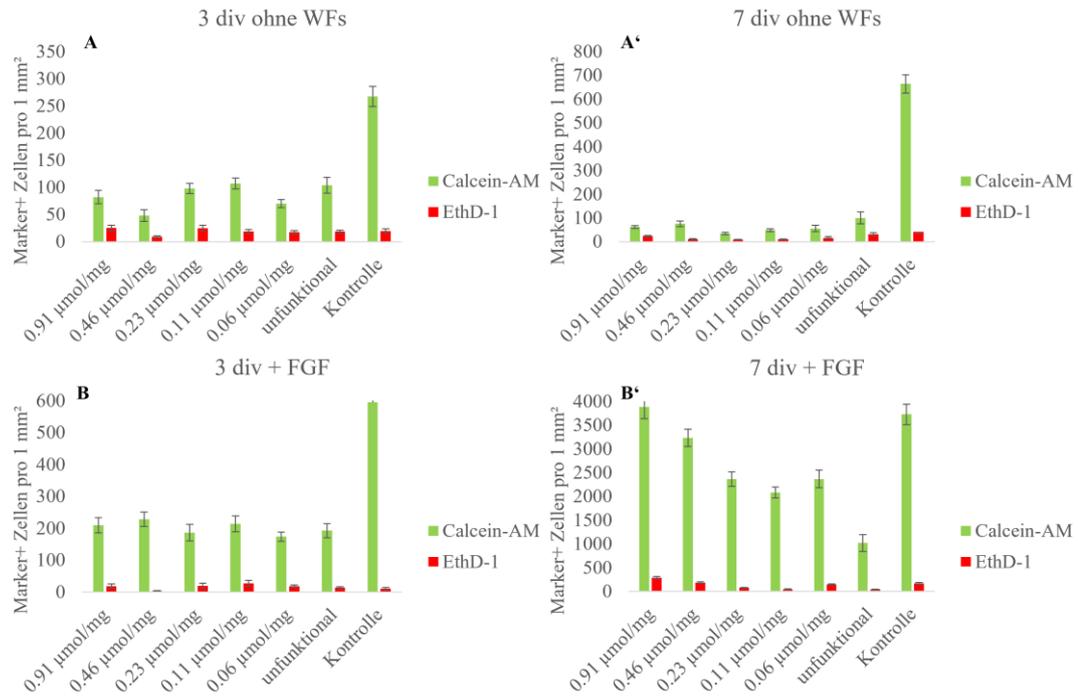
U251-MG untersucht wurde. Die U251-MG Zellen zeigten eine sehr gute Überlebensfähigkeit nach 7 div und bestätigten die grundsätzliche Kompatibilität des Hydrogels für Zelleexperimente (siehe Abb. 25, S. 45). Während das unfunktionalisierte Gel **G1** kaum adhärirte Zellen aufwies, adhärirten auf dem peptidhaltigen Gel **G3** deutlich mehr Zellen. Das kationische Hydrogel **G3** zeigte die größte Anzahl adhärirter Zellen, welche durch die Kombination von kationischen und peptidhaltigen Polymeren bei der Herstellung des Hydrogels **G4** nochmal deutlich gesteigert werden konnte. Hier zeigte sich ein synergistischer Effekt zwischen der kationischen Ladung und dem Peptid RGD, welcher auch zuvor bereits von SALLOUH *et al.* beschrieben wurde.<sup>[113]</sup> Um das Problem bei der Kultivierung von NSCs zu lokalisieren, wurden sukzessive verschiedene Parameter des Hydrogelsystems untersucht. Dazu zählten mechanische Eigenschaften, der Einfluss von Proteinen und Wachstumsfaktoren, sowie Variation der hydrophilen Komponente, des kationischen Monomers und der Vernetzer. Dabei zeigte vor allem die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF einen positiven Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen durch gesteigerte Proliferation der NSCs. Dennoch war die Überlebensfähigkeit trotz Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht optimal. Durch die Untersuchung der Vernetzer stellte sich heraus, dass bereits sehr kleine Verunreinigungen im ppm-Bereich durch z.B. Lösungsmittel die Überlebensfähigkeit der NSCs stark verringerten. Eine Dialyse der Komponenten, sowie später der Hydrogele, und somit die Entfernung von Verunreinigungen sorgte in dieser Arbeit erstmals für eine gute Überlebensfähigkeit der NSCs auf den Hydrogelen. In Kombination mit FGF zeigte das kationische Hydrogel nach 7 div fast 3900 lebende Zellen/mm<sup>2</sup>, welches eine leichte Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle mit 3700 lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> darstellte (siehe Abb. 94).



**Abb. 94:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten kationischen und unfunktionalisierten Hydrogelen (A/A') und in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF (B/B').

Zuletzt wurde der konzentrationsabhängige Einfluss der kationischen Gruppe auf die Kultivierung der NSCs und der U251-MG Zellen untersucht. Insgesamt wurden fünf verschiedene Konzentrationen untersucht (0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel bis 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel). Trotz der unterschiedlichen kationischen Konzentrationen unterschieden sich die Quellwerte der Hydrogele kaum voneinander ( $Q = 9 - 11$ ). Auch die Steifigkeit der Hydrogele unterschied sich kaum ( $G' = 2500 - 3300$  Pa), weshalb der Einfluss auf die Kultivierung der Zellen auf die Konzentration der kationischen Gruppe zurückgeführt werden konnte. Bei den U251-MG Zellen wurden sowohl dialysierte als auch nicht dialysierte Hydrogele miteinander verglichen. In beiden Fällen stellte sich eine Abhängigkeit der Anzahl adhärierter und lebender Zellen von der Konzentration kationischer Gruppen heraus. Je größer die Konzentration war, desto mehr Zellen adhärten auf den Hydrogelen. Hierbei lag eine Grenzkonzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel vor, ab welcher die Anzahl der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> zunahm. Unterhalb dieser Konzentration lagen nahezu gleich viele Zellen unabhängig der Konzentration vor. Die Dialyse der Hydrogele sorgte vor allem bei den niedrigeren Konzentrationen für einen Anstieg der adhärten Zellen. Während nach 3 div bei allen Konzentrationen nahezu gleich viele lebende Zellen/mm<sup>2</sup> vorhanden waren (ca. 600 - 700 lebende Zellen/mm<sup>2</sup>), nahm die Zahl der lebenden Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div in Abhängigkeit der Konzentration zu.

Bei den NSCs wurde zusätzlich noch die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF untersucht (siehe Abb. 95). Während die NSCs ohne Wachstumsfaktor nur eine geringe Anzahl lebender Zellen nach 7 div (maximal ca. 100) zeigten und hierbei keine Abhängigkeit von der Konzentration kationischer Gruppen deutlich wurde, zeigten die Hydrogele mit FGF einen enormen Anstieg in der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup>. Auch hier lag nach 3 div zunächst keine Abhängigkeit der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> von der Konzentration der kationischen Gruppe vor (ca. 200 lebende Zellen/mm<sup>2</sup> für alle Bedingungen). Nach 7 div hingegen war eine deutliche Abhängigkeit, wie auch bei den U251-MG Zellen, sichtbar. Auch hier lag die benötigte Konzentration für einen Anstieg der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> bei 0.46 µmol/mg Gel. Unterhalb dieser Konzentration lagen erneut für alle Bedingungen eine ähnliche Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> vor (ca. 2000 - 2200). Selbst bei diesen Konzentrationen war bereits ein 20-facher Anstieg der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu den Experimenten ohne FGF zu sehen. Den höchsten Anstieg zeigte die höchste Konzentration von 0.91 µmol/mg Gel auf 3800 Zellen/mm<sup>2</sup>, welche selbst die Kontrolle mit 3700 Zellen/mm<sup>2</sup> überstieg. Hier deutete sich nicht nur ein Einfluss durch die kationische Konzentration an, sondern auch ein synergistischer Effekt zwischen FGF und der kationischen Ladung. Die Überlebensfähigkeit der NSCs aller Hydrogele, mit oder ohne FGF, lag bei über 80 %.



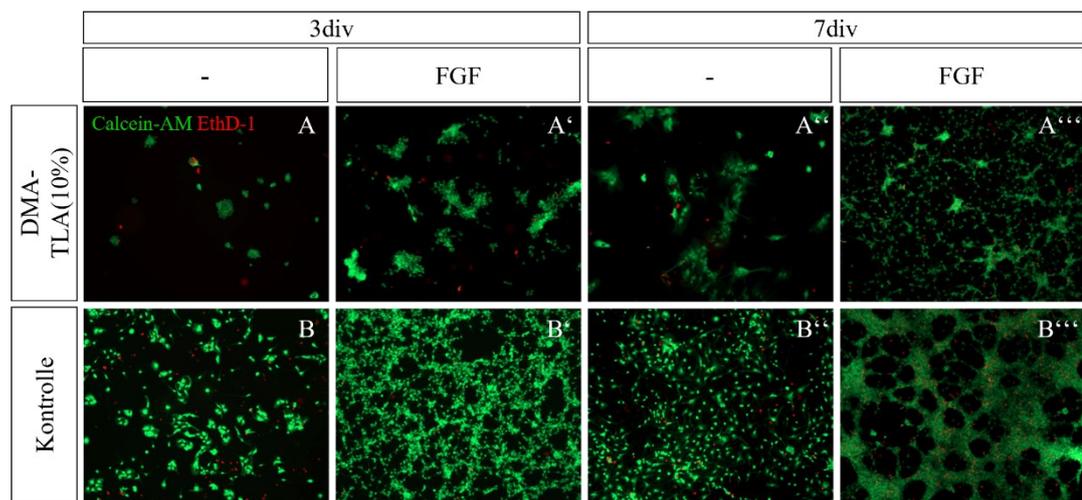
**Abb. 95:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF nach 3 (B) und 7 div (B') verwendet. Die statistische Auswertung wurde über Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Auch die Untersuchung der NSCs mit verschiedenen Markern zeigte eine Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration kationischer Gruppen. Die unfunktionalisierten Hydrogele wiesen im Vergleich zu den kationischen Hydrogelen eine Erhöhung an Zellen auf, welche zu Astrozyten differenzierten (bis ca. 50 % ohne FGF). Hingegen zeigten die kationischen Hydrogele eine erhöhte Anzahl an Neuronen, wenn diese ohne FGF kultiviert wurden. Hierbei waren mehr Neuronen zu finden, je höher die Konzentration der kationischen Gruppe war (ca. 55 % für die geringste Konzentration und ca. 71 % für die höchste Konzentration). Bei der Kultivierung mit FGF waren nach 3 div hauptsächlich teilungsaktive Zellen vorhanden, welche nach 7 div vermehrt hauptsächlich in Astrozyten und Neuronen differenzierten. Hierbei war allerdings keine Abhängigkeit von der Konzentration kationischer Gruppen sichtbar.

Da die Kultivierung der NSCs auf den synthetischen Hydrogelen erfolgreich durchgeführt werden konnte, sollten als nächstes weitere Motive und deren Einfluss auf die Kultivierung untersucht werden. So könnte der konzentrationsabhängige Einfluss von RGD, auch in Kombination mit kationischen Hydrogelen, auf die Adhäsion und die Überlebensfähigkeit der Zellen untersucht werden. Weiterhin wären solche Peptidsequenzen interessant, welche die Differenzierung der NSCs beeinflussen können. Beispiele wären VSWRAPTA oder VFDNFVLK aus dem Protein TNC, welches einen enormen Einfluss auf das Zellverhalten besitzt. Weiterhin sollte der Einfluss von weiteren Proteinen und Wachstumsfaktoren, ggf. in konzentrationsabhängigen Experimenten, untersucht werden. Auch mechanische Eigenschaften oder der Einfluss chemischer Gruppen könnten eine interessante Möglichkeit zur Beeinflussung des Zellverhaltens darstellen.

Im zweiten Ergebniskapitel (siehe Kapitel 4, S. 104 ff.) dieser Arbeit sollte ein neues Polymersystem zur Herstellung von peptidhaltigen Hydrogelen entwickelt werden. Als vielversprechendste Lösung stellte sich ein Polymersystem auf Basis von Thiolactonen heraus, welche durch Amine ringgeöffnet werden können, um ein Thiol zur Funktionalisierung freizusetzen. Dieses Polymer wurde über eine RAFT-Polymerisation mit DMA als Comonomer synthetisiert. Dabei konnte das Thiolacton mit bis zu 30 mol% zur Herstellung von wasserlöslichen Polymeren eingesetzt werden. Im Vergleich zu dem **BMAC**-Polymersystem war dies eine große Steigerung an vorhanden Thiolen zur Funktionalisierung. Die Polymere wiesen dabei die jeweilige gewünschte Verteilung der Monomere und eine molare Masse von ca. 30 kDa bei einer Dispersität im Bereich der RAFT-Polymerisation zwischen 1.17 und 1.30 auf. Zusätzlich konnten auch Copolymere mit dem kationischen Monomer **TMAEA** hergestellt werden (siehe Tabelle 7, S. 116). Während die Ringöffnung des Thiolactons polymeranalog mit verschiedenen Aminen wie z.B. *n*-Butylamin oder *N,N*-Dimethylethylendiamin (DMEDA) quantitativ ablief, konnte eine Ringöffnung mit Peptiden oder einem Diamin zur direkten Vernetzung nicht durchgeführt werden. Weiterhin konnten die entstandenen Thiole aus der Ringöffnung zur partiellen Funktionalisierung verwendet werden. So war es möglich einen Teil der Thiole quantitativ in gewünschter Menge mit Acrylaten, aber auch Peptiden zu funktionalisieren. Aus den so hergestellten funktionalisierten Präpolymeren konnten Hydrogele hergestellt werden. Dabei zeigten die peptidhaltigen Hydrogele ähnliche

Speichermodul (ca. 3000 - 4000 Pa) und Quellwerte (11 - 14) zu den Hydrogelen des **BMAC**-Polymersystems (siehe Tabelle 8, S.124). Hydrogele ohne Funktionalisierung zeigten im Falle einer Ringöffnung mit DMEDA ein erhöhtes Speichermodul von ca. 6000 Pa. Das kationische Thiolacton-Hydrogel zeigte ebenfalls einen erhöhten Speichermodul von ca. 6000 Pa mit einem Quellwert von 40. Zuletzt wurde die Kultivierung von NSCs auf einem dialysierten 10 mol%-TLA-Hydrogel, welches mit DMEDA geöffnet wurde, untersucht (siehe Abb. 96). Hierbei zeigten die Zellen auf den Hydrogelen eine gute Überlebensfähigkeit und die Zugabe des Wachstumsfaktors FGF führte erneut zu einer erheblichen Steigerung der Anzahl lebender Zellen/mm<sup>2</sup> nach 7 div. Mit dem neu entwickelten Polymersystem basierend auf Thiolactonen konnten deutlich höhere Peptidkonzentrationen erreicht werden und die Kompatibilität des neuen Hydrogels zur Kultivierung von NSCs nachgewiesen werden. Als weitere Schritte mit dem Thiolacton-Polymersystem eignet sich die Untersuchung von kationischen Thiolacton-Polymeren und deren konzentrationsabhängige Untersuchung bei der Kultivierung von Zellen. Weiterhin könnte durch die Ringöffnung des Thiolactons und durch partielle Funktionalisierung der Thiole mit wenig synthetischem Aufwand der Einfluss verschiedener chemischer Gruppen oder Motive (z.B. Peptide) auf die Kultivierung der Zellen untersucht werden.



**Abb. 96:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA- (A) nach 3 (A) und 7 div (A''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (B, B''). Zusätzlich wurden die NSCs in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A', B', A''', B'''). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) für die Überlebensfähigkeit verwendet.

Im dritten Ergebniskapitel (siehe Kapitel 5, S. 130 ff.) wurde die Konjugation von Proteinen an Polymeren untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Methoden untersucht: Verwendung eines NTA-Liganden, das 2PCA-Motiv und nicht-selektive Konjugation über Aktivester. Bei der Untersuchung des NTA-Liganden stellte sich heraus, dass durch die Verwendung von Metallionen für den Liganden die Oxidation der Thiole des Polymers eintrat. Durch dieses Problem und die Limitierung des NTA-Liganden auf His<sub>6</sub>-Tags der Proteine, eignete sich der NTA-Ligand für dieses Polymersystem nicht zur Konjugation der Proteine. Im Zusammenhang mit dem neuen Thiolacton-Polymersystem könnte diese Methode allerdings eine gute Möglichkeit zur Konjugation von Proteinen darstellen, da hier die Thiole zunächst geschützt als Thiolactone vorliegen und die Konjugation vor der Ringöffnung durchgeführt werden könnte. Bei der zweiten Konjugationsmethode über das 2PCA-Motiv stellte sich die Synthese von 2PCA-haltigen Polymeren als schwierig heraus. Während verschiedene niedermolekulare 2PCA-Motive problemlos synthetisiert werden konnten, konnte das Motiv weder als Monomer noch polymeranalog an das Polymer gebunden werden. Grund hierfür war vermutlich die niedrige Hydrophilie des Motivs. Synthese eines hydrophileren Motivs könnte zu einer erfolgreichen Konjugation von Proteinen führen. Allerdings wäre diese Variante mit einem hohen Syntheseaufwand verbunden. Bei der dritten Methode, der Proteinkonjugation über Aktivester, konnten problemlos Polymere mit NHS- und PFP-Aktivester synthetisiert werden. Allerdings konnte nach erfolgter Durchführung der Proteinkonjugation mit GFP und Lysozym weder das Konjugat noch das native Protein, mittels SDS-Page oder MALDI nachgewiesen werden. Hierbei sollten die Reaktionsbedingungen der Konjugation und die anschließende Aufarbeitung weiter untersucht werden. Da die Konjugation über Aktivester zufällig mit einem der vielfach vorhandenen Amine des Proteins stattfindet, sind selektivere Methoden zur Konjugation von Proteinen allerdings vorzuziehen.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeines

#### 7.1.1 NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopische Messungen wurden an FT-NMR Geräten der Firma *Bruker* (Typ Bruker Avance III HD Nanobay (400 MHz), Bruker Avance III HD (500, 600 und 700 MHz)) und der Firma *Agilent* (Typ Agilent Technologies DD2 (500 MHz)) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren wurde mit dem Programm ACD Labs 12.0 in der Version 12.01 durchgeführt.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  wurde in parts per million (ppm) und die Kopplungskonstante  $J$  in Hertz (Hz) angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, dd = Dublett vom Dublett, m = Multiplett, br = breit.

#### 7.1.2 UV/Vis-Spektroskopie

Photometrische Messungen wurden an einem Spektrometer der Firma *VWR* vom Typ VWR-UV6300 PC Double Beam Spectrophotometer durchgeführt. Zur Auswertung der Spektren wurde das Programm UV-Vis-Analyst in der Version 5.44 benutzt.

#### 7.1.3 Ellman`s Assay

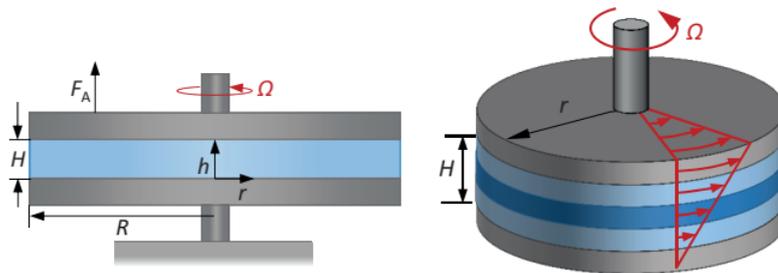
Zur Bestimmung der Thiolkonzentration der Polymere mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde der Ellman`s Assay verwendet. Dazu wurde eine Polymerstammlösung (1 mg/mL) und eine Stammlösung mit dem Ellman`s Reagenz DTNB (4 mg/ml) hergestellt. Zur Herstellung der Probenlösung wurde zunächst Phosphat Puffer vorgelegt (1.25 mL, pH = 8). Dieser wurde aus 9.4 mL einer 1 M  $K_2HPO_4$  und 0.6 mL einer 1 M  $KH_2PO_4$ , welche mit Milli-Q<sup>®</sup> Wasser auf 100 mL aufgefüllt wurden, hergestellt und anschließend der pH-Wert mit 1 M NaOH auf pH = 8 eingestellt. Anschließend wurden nacheinander 125  $\mu$ L der Polymerstammlösung und 25  $\mu$ L der DTNB-Stammlösung hinzugegeben, sodass dies ein Probenvolumen von insgesamt 1.4 mL ergab. Zur vollständigen Reaktion wurden die jeweiligen Proben für mindestens 20 Minuten auf einer Schüttelplatte agitiert.

#### 7.1.4 Rheologie

Rheologische Messungen wurden an Geräten der Firma *Anton Paar* vom Typ MCR 102 und *Bohlin Instruments* vom Typ Malvern Bohlin Gemini durchgeführt.

Zur Auswertung wurde das Programm Rheocompass in der Version 1.3 verwendet. Die Messungen wurden mit einer Platte-Platte Geometrie mit einem Durchmesser von 25 mm durchgeführt. Die zeitabhängigen Messungen wurden bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 % durchgeführt.

Unter Rheologie wird die Wissenschaft der Deformation und des Fließens von Stoffen verstanden. Für die Untersuchung von viskoelastischen Stoffen, wie z.B. Hydrogelen, werden hauptsächlich Oszillationsmessungen durchgeführt. Dafür wird ein sogenanntes Platte-Platte-System eines Oszillationsrheometers verwendet, wodurch der viskose (Verlustmodul  $G''$ ) und elastische Anteil (Speichermodul  $G'$ ) eines Materials ermittelt werden kann. Die zweite wichtige Geometrie, welche in der Oszillationsrheometrie vor allem für viskoelastische Flüssigkeiten verwendet wird, ist das Kegel-Platte-System. Ein Platte-Platte-System ist in Abb. 97 dargestellt. Bei dem Platte-Platte-System wird eine Probe zwischen zwei parallel ausgerichteten, runden Platten durch Rotation der oberen Platte geschert.



**Abb. 97:** Darstellung eines Platte-Platte Systems in einem Oszillationsrheometer mit  $H$  = Messspalthöhe,  $R$  = Radius der Platte,  $F_A$  = Kraft auf der Fläche der Probe,  $\Omega$  = Oszillationsgeschwindigkeit. Der variable Abstand und Radius der Probe wird durch  $h$  und  $r$  gekennzeichnet.<sup>[190]</sup>

Bei der Oszillationsmessung wird der Probenkörper einer sinusförmigen Scherung mit einer Amplitude  $\gamma_0$  und einer Kreisfrequenz  $\omega$  ausgesetzt und das Drehmoment  $M(t)$  bestimmt. Die Kreisfrequenz wird dabei wie folgt beschrieben:

$$\omega = 2\pi f \quad (7)$$

$\omega$ : Kreisfrequenz;  $f$ : Frequenz der Oszillation.

Daraus ergibt sich für die Deformation  $\gamma(t)$  der Probe folgende Formel:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (8)$$

$\gamma(t)$ : Deformation der Probe zum Zeitpunkt  $t$ ;  $\gamma_0$ : Deformationsamplitude;  $\omega$ : Kreisfrequenz;  $t$ : Zeit.

Bei Scherung der Probe wird das Drehmoment  $M(t)$  als Antwort des Probenkörpers gemessen, aus welchem sich die Schubspannung  $\tau$  berechnen lässt. Das Drehmoment wird analog zur ausgeübten Deformation ausgedrückt und um einen möglichen Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  erweitert:

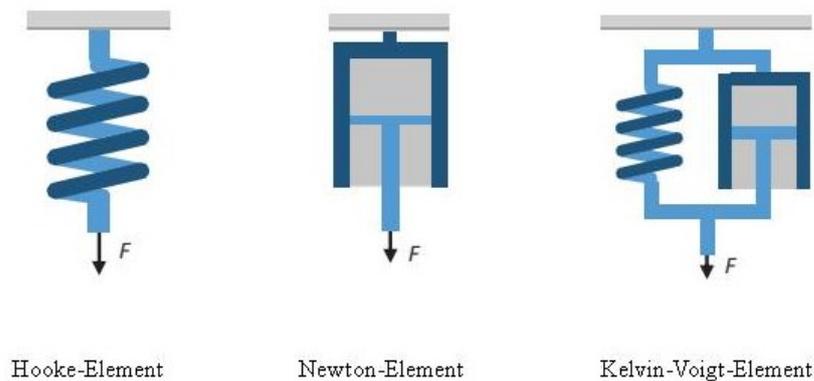
$$M(t) = M_0 \cdot \sin(\omega t - \delta) \quad (9)$$

$M(t)$ : Drehmoment der Probe zum Zeitpunkt  $t$ ;  $M_0$ : Drehmomentamplitude;  $\omega$ : Kreisfrequenz;  $t$ : Zeit;  $\delta$ : Phasenverschiebungswinkel.

$$\tau(t) = \frac{2 \cdot M(t)}{\pi \cdot r^3} \quad (10)$$

$\tau(t)$ : Schubspannung der Probe zum Zeitpunkt  $t$ ;  $M(t)$ : Drehmoment der Probe zum Zeitpunkt  $t$ ;  $r$ : Radius der Geometrie.

Für die Phasenverschiebung können drei Fälle auftreten. Ein ideal elastischer Körper weist keine Phasenverschiebung auf, d.h.  $\delta = 0^\circ$ . Die Schubspannung reagiert in diesem Fall sofort und vollständig auf die Deformation des Probenkörpers. Bei steigendem viskosem Anteil der Probe tritt eine Phasenverschiebung auf bis das Maximum bei  $\delta = 90^\circ$  erreicht wird. Die Antwort der Probe ist hierbei um  $90^\circ$  phasenverschoben und es handelt sich um eine ideal viskose oder Newtonsche Flüssigkeit. Viskoelastische Eigenschaften einer Probe führen zu einer Phasenverschiebung  $\delta$  zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$ . Diese genannten Fälle können ebenfalls über Federn und Dämpfer dargestellt werden (siehe Abb. 98).



**Abb. 98:** Schematische Darstellung des Hooke-, Newton- und Kelvin-Voigt-Elements mit Federn und Dämpfern.<sup>[190]</sup>

Das Hooke-Element, bzw. eine ideale Feder, modelliert einen ideal elastischen Stoff, bei welchem die durch eine Kraft auftretende Deformation nach dem Entlasten sofort und vollständig wieder in den Ursprungszustand zurückfällt. Ein Newton-Element modelliert eine Newtonsche Flüssigkeit, bei welcher sich die Deformation in

Abhängigkeit der Belastung ändert und die Deformation nach Entlastung bestehen bleibt. Das Kelvin-Voigt-Element kombiniert diese beiden Modelle und beschreibt einen viskoelastischen Körper durch die Parallelschaltung einer Feder und eines Dämpfers. Bei einer Belastung des Stoffes wird dieser zunächst deformiert und diese Deformierung nimmt bei steigender Belastung zu. Bei Entlastung hingegen geht diese Deformation langsam zurück in ihren Ursprungszustand, was durch die Feder verursacht wird. Im Falle eines Oszillationsrheometers kann die elastische Komponente der Probe durch die Feder dargestellt und als Speichermodul  $G'(\omega)$  beschrieben werden. Die viskose Komponente hingegen kann durch den Dämpfer dargestellt und als dynamische Viskosität  $\eta'(\omega)$  beschrieben werden, wobei diese auch als Quotient des Verlustmoduls  $G''(\omega)$  und der Kreisfrequenz  $\omega$  dargestellt werden kann:

$$\eta'(\omega) = \frac{G''(\omega)}{\omega} \quad (11)$$

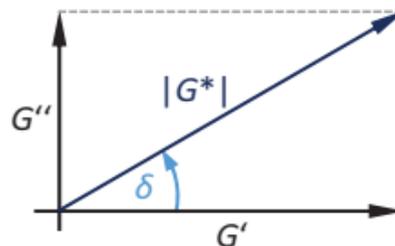
$G''$ : Verlustmodul;  $\omega$ : Kreisfrequenz.

Die gesamte Schubspannung lässt sich dementsprechend als Summe der viskosen und elastischen Komponente darstellen und wird wie folgt beschrieben:

$$\tau_g(t) = \tau_e(t) + \tau_v(t) = \gamma_0[G'(\omega) \cdot \sin(\omega t) + G''(\omega) \cdot \cos(\omega t)] \quad (12)$$

$\tau_g$ : Gesamtschubspannung;  $\tau_e$ : Schubspannung des elastischen Anteils;  $\tau_v$ : Schubspannung des viskosen Anteils;  
 $\gamma_0$ : Deformationsamplitude;  $G'$ : Speichermodul;  $G''$ : Verlustmodul;  $\omega$ : Kreisfrequenz;  $t$ : Zeit.

Aus dem sogenannten Zeigermodell kann die Abhängigkeit des Verlust- und Speichermoduls von der Phasenverschiebung  $\delta$  und des Betrags des komplexen Moduls  $G^*$  abgelesen werden (siehe Abb. 99).



**Abb. 99:** Darstellung des Zeigermodells zur Erläuterung der Abhängigkeit des Verlust- und Speichermoduls von dem komplexen Modul  $G^*$ .<sup>[190]</sup>

Daraus ergibt sich folgende Gleichung für das komplexe Modul  $G^*$ :

$$|G^*| = \sqrt{|G'^2 + G''^2|} \quad (13)$$

$G^*$ : komplexes Modul,  $G'$ : Speichermodul;  $G''$ : Verlustmodul.

Das Zeigermodell beschreibt ebenfalls den Zusammenhang zwischen Phasenwinkel und dem Verlust- und Speichermodul.

$$\delta = \arctan \frac{G''}{G'} \quad (14)$$

$\delta$ : Phasenwinkel;  $G'$ : Speichermodul;  $G''$ : Verlustmodul.

Mit Hilfe von Gleichung 14 kann der sogenannte Verlustfaktor  $\tan(\delta)$  bestimmt werden:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (15)$$

$\delta$ : Phasenwinkel;  $G'$ : Speichermodul;  $G''$ : Verlustmodul.

Durch den Verlustfaktor kann einem Stoff entweder ein viskoser Charakter ( $1 < \tan(\delta) < \infty$ ) oder ein elastischer Charakter ( $0 < \tan(\delta) < 1$ ) zugeordnet werden. Für ein Gel ist ein elastischer Charakter notwendig, weshalb  $\tan(\delta)$  kleiner 1 sein muss. Dementsprechend muss  $G'$  größer als  $G''$  sein.

Zur Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Geräten und Methoden wurde das sogenannte Elastizitätsmodul oder auch Youngsche-Modul eingeführt. Dieses stellt einen Zusammenhang zwischen dem Speichermodul und der Poissonzahl auf. Die Poissonzahl wird auch als Querkontraktionszahl bezeichnet und beschreibt die Volumenänderung eines Materials, wenn dieses in Längsrichtung gedehnt wird. Das Youngsche-Modul wird mit Hilfe folgender Gleichung beschrieben:

$$E = 2 \cdot G' \cdot (1 + \nu) \quad (16)$$

$E$ : Young-Modul;  $G'$ : Speichermodul;  $\nu$ : Poissonzahl

Da Hydrogele viskoelastische Materialien sind und dementsprechend das Volumen bei einer Deformation durch ihr gummiartiges Verhalten nahezu konstant bleibt, wird die Poissonzahl näherungsweise mit 0.5 festgesetzt.<sup>[191]</sup> Daraus ergibt sich ein Youngscher-Modul, welcher etwa dem Dreifachen des Speichermoduls entspricht:

$$E \approx 3 \cdot G' \quad (17)$$

$E$ : Young-Modul;  $G'$ : Speichermodul

### 7.1.5 Analytische HPLC & niedrigaufgelöste Massenspektrometrie

Alle niedrigaufgelösten Massen (LR-MS) wurden an einem Gerät der Firma *Knauer* (Smartline Pump 1000) ausgestattet mit einem RI-Detektor (Smartline RI Detector 2300), einem UV-Detektor (Smartline UV Detector 2600), einem Entgaser (Smartline Manager 5000), einem Säulenofen (Jetstream Oven) und einem Autosampler (Smartline Autosampler 3900) gemessen. Zur Auswertung wurde die Software Clarity Chrom in der Version 7.2.0.73 der Firma *DataApex* verwendet. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Acetonitril, MeOH oder H<sub>2</sub>O hergestellt.

### 7.1.6 Hochauflösende Massenspektrometrie

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS) wurde an einem Bruker compact der Firma *Bruker* über Elektrosprayionisation (ESI) mit einem QqTOF Massenanalysator durchgeführt. Alternativ wurde die HR-MS über ESI mit einer LTQ Orbitrap oder LTQ Orbitrap XL der Firma Thermo Scientific als Massenanalysator durchgeführt. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 0.1 mg/mL in Acetonitril, MeOH oder H<sub>2</sub>O hergestellt.

### 7.1.7 Gelpermeationschromatographie

Die Analysen der Polymere anhand von Gelpermeationschromatographie wurden an Geräten der Firma *Merck Hitachi* vom Typ L-5000 LC-Controller, 655A-11 Liquid Chromatograph, ausgestattet mit einem RI-Detektor (Smartline 2300 der Firma *Knauer*), einer Vorsäule (PSS GRAM) und zwei Trennsäulen (PSS GRAM analytical 1000 Å und PSS-Gram analytical 30 Å), sowie der Firma *PSS* vom Typ SECcurity, ausgestattet mit einem Autosampler, UV/vis-Detektor und RI-Detektor des Typs Agilent Technologies 1260, durchgeführt. Als Eluent wurde DMF, versetzt mit 5 g/L LiBr, verwendet. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 35 °C für das *Merck Hitachi*-Gerät und bei einer Temperatur von 50 °C für das *PSS*-Gerät durchgeführt. Alle Proben wurden mit einer Konzentration von 3 mg/mL hergestellt und vor der Messung mit einem 0.2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfilter filtriert.

### 7.1.8 Zetapotential

Die Messung des Zetapotentials wurde an dem Zeta Potential Analyzer der Firma *Brookhaven Instruments Corporation* mit einer Lösungsmittel-resistenten Elektrode (SREL, engl. *Solvent-resistant electrode*) in einer Polystyrol Einmalküvette durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm BIC Particle Solutions in der

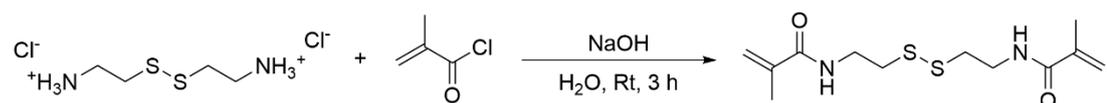
Version 3.1 verwendet. Die Messungen der Polymere wurden mit einer Konzentration von 1 mg/mL bei 25 °C und einem pH von 7 - 8 in einer 10 mM KCl-Lösung durchgeführt. Die Messwerte zeigten den Mittelwert über insgesamt 10 Messungen.

### 7.1.9 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde an einem H-S4500 FEG der Firma *Hitachi* durchgeführt. Vollständig gequollene Hydrogele wurden zunächst getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurde ein Stück des eingefrorenen Hydrogels rausgebrochen, sodass der Querschnitt des Gels betrachtet werden konnte.

## 7.2 Niedermolekulare Synthesen

### 7.2.1 Synthese von *N,N'*-Bis(methacryloylcystamid) (BMAC)



Es wurde Cystamin (10.0 g, 44.4 mmol, 1.0 Äq.) und NaOH (7.1 g, 177.6 mmol, 4.0 Äq.) in Milli-Q® Wasser (150 mL, 15 ml/g Cystamin) gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Methacryloylchlorid (8.5 mL, 88.8 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in DCM (10 mL, 1 mL/g Cystamin), langsam zur Lösung hinzugegossen und für 3 h bei Rt gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mehrfach aus Ethylacetat umkristallisiert und nach dem Erhitzen jeweils heiß filtriert. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (8.38 g, 66 %) erhalten.

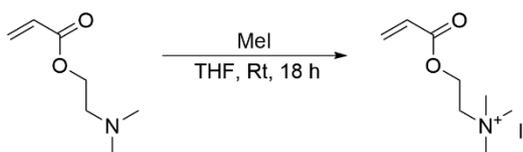
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.96 (s, 1 H), 2.88 (t, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 4 H), 3.64 (q, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 4 H), 5.35 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 5.75 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 6.64 (bs, 2 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 168.64 (1 C), 139.68 (1 C), 119.98 (1 C), 38.65 (1 C), 37.74 (1 C), 18.61 (1 C) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: 289.10 [M + H<sup>+</sup>]; gefunden 289.19.

**HR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: 289.1044 [M + H<sup>+</sup>] 311.0864 [M + Na<sup>+</sup>]; gefunden 289.1042, 311.0854.

### 7.2.2 Synthese von Trimethylaminoethylacrylat (TMAEA)



Es wurde Dimethylaminoethylacrylat (5.4 mL, 34.9 mmol, 1.0 Äq.) in THF (15 mL, 3 mL/g) gelöst. Anschließend wurde Iodmethan (2.5 mL, 40.2 mmol, 1.15 Äq.) in THF (3 mL/g Dimethylaminoethylacrylat) langsam zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit kaltem Cyclohexan gewaschen und unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt wurde als schwach gelber Feststoff (9.5 g, 95 %) erhalten.

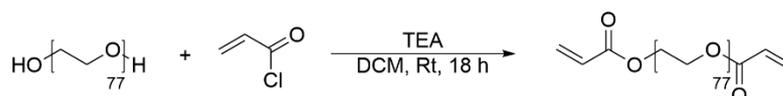
**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  3.23 (s, 9 H), 3.79 (m, 2 H), 4.65 (m, 2 H), 6.04 (d, <sup>3</sup>J = 10 Hz, 1 H), 6.24 (dd, <sup>3</sup>J = 15 Hz, <sup>2</sup>J = 10 Hz, 1 H), 6.46 (d, <sup>3</sup>J = 20 Hz, 1 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  56.36 (3 C), 60.96 (1 C), 67.09 (1 C), 129.45 (1 C), 135.80 (1 C), 169.78 (1 C) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>INO<sub>2</sub>: 158.12 [M - I<sup>-</sup>], gefunden 158.16.

**HR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>INO<sub>2</sub>: 158.1176 [M - I<sup>-</sup>], gefunden 158.1173.

### 7.2.3 Synthese von PEGDA-3500

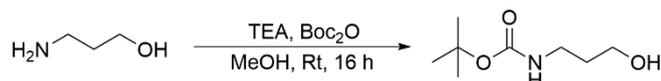


Es wurde PEG-3400 ( $M_w = 3400$  g/mol, 10.0 g, 2.9 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (75 mL, 7.5 mL/g PEG) gelöst. Zunächst wurde TEA (804  $\mu$ L, 5.8 mmol, 2.0 Äq.) hinzugegeben und anschließend Acryloylchlorid (959  $\mu$ L, 11.6 mmol, 4.0 Äq.) langsam zu der Lösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei Rt gerührt und nach beendeter Reaktion die organische Phase mit gesättigter Natriumcarbonatlösung, sowie Wasser gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in wenig DCM aufgenommen. Das Produkt wurde aus DCM in kaltem Diethylether gefällt und als feiner weißer Feststoff (8.0 g, 78 %) erhalten.

**$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  3.64 (s, 304 H), 4.30 (t,  $^3J = 5$  Hz, 5 H), 5.84 (dd,  $^3J = 10$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 2 H), 6.16 (dd,  $^3J = 15$  Hz,  $^2J = 10$  Hz, 2 H), 6.43 (dd,  $^3J = 15$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 2 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  63.66 (1 C), 69.07 (1 C), 70.51 (152 C), 128.23 (1 C), 131.02 (1 C), 166.14 (1 C) ppm.

#### 7.2.4 Synthese von Boc-Aminopropanol

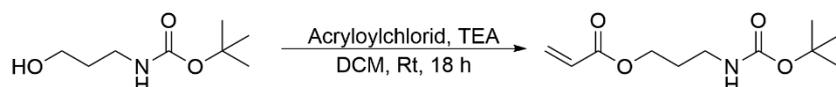


Es wurde Aminopropanol (3.1 mL, 39.9 mmol, 1.0 Äq.) und TEA (12.0 mmol, 85.9 mmol, 2.15 Äq.) in MeOH (84 mL, 28 mL/g) vorgelegt und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde langsam  $\text{Boc}_2\text{O}$  (13.1 g, 59.9 mmol, 1.5 Äq.) in MeOH (10 ml/g Aminopropanol) tropfenweise zugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde MeOH entfernt und der entstandene Feststoff in DCM aufgenommen, mit Wasser (3x) gewaschen und die organische Phase mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Entfernen des Lösungsmittels ergab einen weißen kristallinen Feststoff (4.4 g, 63 %).

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  1.45 (s, 9 H), 1.67 (t,  $^3J = 4$  Hz, 2 H), 3.29 (t,  $^3J = 4$  Hz, 2 H), 3.67 (t,  $^3J = 4$  Hz, 2 H) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  28.38 (3 C), 32.95 (1 C), 59.26 (1 C), 79.71 (1 C) ppm.

#### 7.2.5 Synthese von Boc-Aminopropylacrylat (Boc-APropAc)

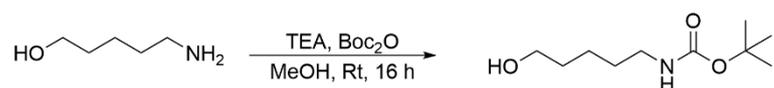


Es wurde Boc-Aminopropanol (2.1 g, 12.1 mmol, 1.0 Äq.) und TEA (5.1 mL, 36.4 mmol, 3.0 Äq.) in DCM (10 mL/g) vorgelegt und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Acryloylchlorid (1.2 mL, 14.6 mmol, 1.2 Äq.) langsam hinzugegeben und die Reaktion über Nacht bei Rt gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ - und  $\text{NaCl}$ -Lösung gewaschen, anschließend mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das organische Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc:Pentan 1:1) lieferte einen weißen kristallinen Feststoff (1.2 g, 42 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.45 (s, 9 H), 1.87 (quin,  $^3J = 5$  Hz, 2 H), 3.22 (m, 2 H), 4.24 (t,  $^3J = 5$  Hz, 2 H), 5.85 (dd,  $^3J = 10$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 1 H), 6.13 (dd,  $^3J = 20$  Hz,  $^2J = 10$  Hz, 1 H), 6.42 (dd,  $^3J = 20$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 1 H) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>: 130.09 [M - Boc + H<sup>+</sup>]; gefunden: 129.89.

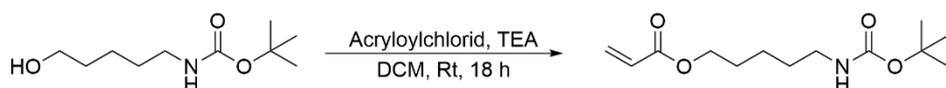
### 7.2.6 Synthese von Boc-Aminopentanol



Es wurde Aminopentanol (2.0 g, 19.4 mmol, 1.0 Äq.) und TEA (5.8 mL, 41.7 mmol, 2.15 Äq.) in MeOH (28 mL/g) vorgelegt und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Boc<sub>2</sub>O (6.4 g, 29.1 mmol, 1.5 Äq.), gelöst in MeOH (10 mL/g), tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde Methanol entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Rohprodukt wurde mit Wasser gewaschen, anschließend mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff (3.3 g, 83 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.45 (s, 9 H), 1.60 - 1.54 (m, 6 H), 2.30 (m, 3 H), 3.66 (t,  $^3J = 5$  Hz, 2 H) ppm.

### 7.2.7 Synthese von Boc-Aminopentylacrylat (Boc-APentAc)

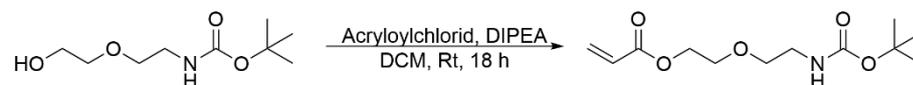


Es wurde Boc-Aminopentanol (3.1 g, 15.3 mmol, 1.0 Äq.) und TEA (6.4 mL, 45.8 mmol, 3.0 Äq.) in DCM (10 mL/g) vorgelegt und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Acryloylchlorid (1.5 mL, 18.3 mmol, 1.2 Äq.) langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und NaCl-Lösung gewaschen, anschließend mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das organische Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc:Pentan 1:1) lieferte einen weißen kristallinen Feststoff (1.9 g, 48 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.41 (m, 2 H), 1.45 (s, 9 H), 1.53 (m, 2 H), 1.70 (m, 2 H), 3.13 (bs, 2 H), 4.16 (t,  $^3J = 10$  Hz, 2 H), 5.84 (dd,  $^3J = 10$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 1 H), 6.13 (dd,  $^3J = 20$  Hz,  $^2J = 10$  Hz, 1 H), 6.42 (dd,  $^3J = 20$  Hz,  $^2J = 5$  Hz, 1 H) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>: 158.12 [M - Boc + H<sup>+</sup>]; gefunden: 158.06.

### 7.2.8 Synthese von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat



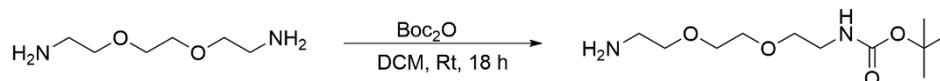
Es wurde 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethanol (3.0 g, 14.6 mmol, 1.0 Äq.) und DIPEA (3.8 mL, 21.9 mmol, 1.5 Äq.) in DCM (5 mL/g) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Acryloylchlorid (1.3 mL, 16.1 mmol, 1.1 Äq.), verdünnt in DCM (1:1), langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und die organische Phase mit Wasser, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>- und NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc:Cyclohexan 3:7) lieferte einen weißen kristallinen Feststoff (2.5 g, 67 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.45 (s, 9 H), 3.33 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 3.56 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 3.70 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 4.32 (t, <sup>3</sup>J = 4 Hz, 2 H), 5.87 (dd, <sup>3</sup>J = 12 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 6.18 (dd, <sup>3</sup>J = 16 Hz, <sup>2</sup>J = 12 Hz, 1 H), 6.45 (dd, <sup>3</sup>J = 16 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 28.39 (3 C), 40.39 (1 C), 63.51 (1 C), 68.84 (1 C), 70.19 (1 C), 79.37 (1 C), 128.17 (1 C), 131.16 (1 C), 155.93 (1 C), 166.13 (1 C) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>: 160.10 [M - Boc + H<sup>+</sup>]; gefunden: 160.06.

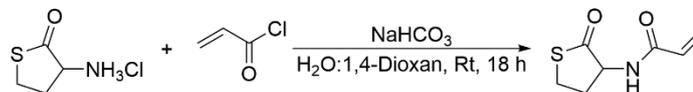
### 7.2.9 Synthese von einseitig Boc geschütztem 2,2'-(Ethylen dioxy)bis(ethylamin)



Es wurde 2,2'-(Ethylen dioxy)bis(ethylamin) (3.0 g, 20.2 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (6 mL/g) vorgelegt und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Boc<sub>2</sub>O (1.5 g, 6.7 mmol, 0.33 Äq.), gelöst in DCM (2.5 mL/g), tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Rt gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde die organische Phase eingeeengt und das Rohprodukt mit NaHCO<sub>3</sub> (3 x) gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten. Es konnte lediglich das beidseitige Produkt isoliert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.46 (s, 18 H), 3.34 (s, 4 H), 3.56 (t, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 4 H), 3.62 (s, 4 H) ppm.

### 7.2.10 Synthese von *N*-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton (TLA)



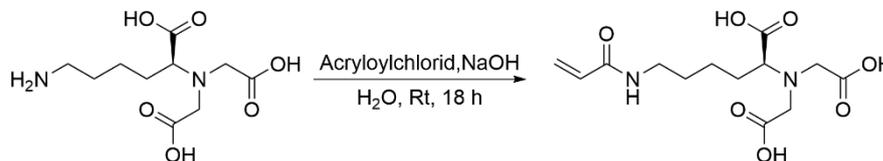
Es wurde Homocystein- $\gamma$ -thiolacton (3.0 g, 19.5 mmol, 1.0 Äq.) in einem H<sub>2</sub>O:1,4-Dioxan-Gemisch (1:1, 17 mL/g Homocystein- $\gamma$ -thiolacton) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Natriumhydrogencarbonat (8.0 g, 97.6 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung für 30 min bei 0 °C gerührt. Es wurde langsam Acryloylchlorid (3.5 g, 3.2 mL, 39.0 mmol, 2.0 Äq.) zur Reaktionslösung getropft und diese über Nacht bei Rt gerührt. Nach vollständiger Reaktion wurde die Reaktionslösung mit ges. Natriumchlorid-Lösung (17 mL/g Homocystein- $\gamma$ -thiolacton) gewaschen und mit EtOAc (3 x 100 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Rohprodukt wurde in DCM umkristallisiert und als weißer Feststoff (2.7 g, 81 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  2.10 (m, 1 H), 2.46 (m, 1 H), 3.30 (m, 1 H), 3.43 (m, 1 H), 4.70 (m, 1 H), 5.67 (dd, <sup>3</sup>J = 8 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 6.14 (dd, <sup>3</sup>J = 16 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 6.22 (dd, <sup>3</sup>J = 16 Hz, <sup>2</sup>J = 8 Hz, 1 H), 8.46 (d, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 1 H) ppm.

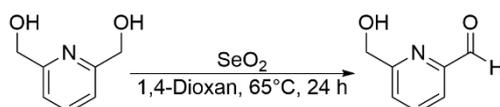
**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  27.62 (1 C), 31.92 (1 C), 59.50 (1 C), 127.70 (1 C), 129.88 (1 C), 165.85 (1 C), 205.58 (1 C) ppm.

**HR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>S: 194.0252 [M + Na<sup>+</sup>]; gefunden: 194.0246.

### 7.2.11 Synthese des NTA-Monomers



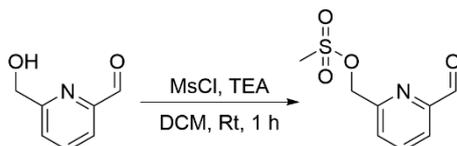
Es wurde *N*<sub>α</sub>,*N*<sub>α</sub>-Bis-(carboxymethyl)-L-lysin (500 mg, 1.9 mmol, 1.0 Äq.) in Milli-Q<sup>®</sup> Wasser (10 mL/g) vorgelegt und NaOH (153 mg, 3.8 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und langsam Acryloylchlorid (185  $\mu$ L, 2.3 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Rt gerührt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

**7.2.12 Synthese von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin**

Es wurde 2,6-Pyridindimethanol (2.0 g, 14.4 mmol, 1.0 Äq.) in 1,4-Dioxan (40 mL, 20 ml/g) gelöst und Selen(IV)oxid (0.8 g, 7.2 mmol, 0.5 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 min mit Ultraschall behandelt und anschließend für 24 h bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit DCM (30 mL/g) verdünnt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (DCM:MeOH 97.5:2.5, R<sub>f</sub> = 0.14) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger kristalliner Feststoff (1.4 g, 70 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4.88 (s, 2 H), 7.54 (m, 1 H), 7.88 (m, 2 H), 10.07 (s, 1 H) ppm.

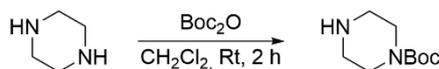
**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>: 138.06 [M + H<sup>+</sup>]; gefunden: 137.84.

**7.2.13 Synthese von (6-formylpyridin-2-yl)methyl methansulfonat**

Es wurde 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin (500 mg, 3.7 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (18.5 mL, 37 mL/g) gelöst und Triethylamin (1.5 mL, 10.9 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren Methansulfonylchlorid (339 µL, 4.4 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben. Es wurde für 1 h bei Rt gerührt und anschließend die Reaktionslösung mit gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung gequenchet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit DCM (3 x) extrahiert. Zuletzt wurden die Phasen mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff (628 mg, 80 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.16 (s, 3 H), 5.44 (s, 2 H), 7.74 (m, 1 H), 7.97 (m, 2 H), 10.07 (s, 1 H) ppm.

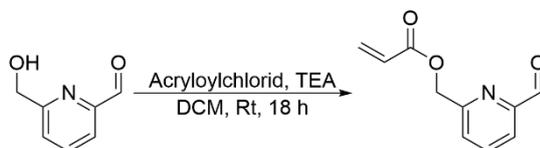
## 7.2.14 Synthese von Boc-Piperazin



Es wurde Piperazin (1.0 g, 11.6 mmol, 1.0 Äq.) unter Argon vorgelegt und in entgastem DCM (15 mL, 15 mL/g) gelöst. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und Boc<sub>2</sub>O (1.2 g, 5.6 mmol, 0.48 Äq.) in DCM (5 mL, 5 mL/g) langsam zur Reaktionslösung getropft. Es wurde für 2 h bei Rt gerührt und anschließend der entstandene Feststoff abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt in Wasser aufgenommen. Unlösliche Bestandteile wurden erneut abfiltriert und die wässrige Lösung mit K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gesättigt. Die wässrige Lösung wurde mit Diethylether (3 x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, sowie das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als weißer kristalliner Feststoff (0.37 g, 23 %) erhalten.

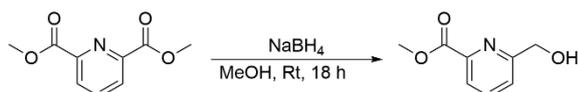
**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.45 (s, 9 H), 2.40 (bs, 1 H), 2.81 (t, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 4 H), 3.39 (t, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 4 H) ppm.

## 7.2.15 Synthese des 2PCA-Acrylats



Es wurde 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin (500 mg, 3.7 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (18.5 mL, 37 mL/g) gelöst und TEA (1.2 mL, 8.8 mmol, 2.4 Äq.) zugegeben. Anschließend wurde langsam Acryloylchlorid (354 µL, 4.4 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 48 h bei Rt gerührt, nach beendeter Reaktion mit NaHCO<sub>3</sub> gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM:MeOH 97.5:2.5) lieferte einen weißen kristallinen Feststoff.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5.43 (s, 2 H), 5.95 (dd, <sup>3</sup>J = 12 Hz, <sup>2</sup>J = 6 Hz, 1 H), 6.26 (dd, <sup>3</sup>J = 18 Hz, <sup>2</sup>J = 12 Hz, 1 H), 6.52 (dd, <sup>3</sup>J = 18 Hz, <sup>2</sup>J = 6 Hz, 1 H), 7.61 (m, 1 H), 7.91 (m, 2 H), 10.07 (s, 1 H) ppm.

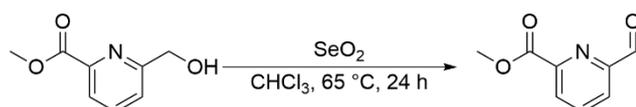
**7.2.16 Synthese von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat**

Es wurde Pyridin-2,6-dicarboxymethylester (3.0 g, 15.4 mmol, 1.0 Äq.) in trockenem MeOH:DCM (150 mL, 7:3, 50 mL/g) unter Argon gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde vorsichtig Natriumborhydrid (587 mg, 15.5 mmol, 1.01 Äq.) portionsweise hinzugegeben und nach vollständiger Zugabe für 18 h bei Rt gerührt. Die Reaktionslösung wurde vorsichtig mit ges. Ammoniumchlorid-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit DCM (3 x 20 mL) extrahiert, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und zuletzt das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM:EtOAc 2:1) lieferte einen weißen kristallinen Feststoff (0.92 g, 36 %).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  3.99 (s, 3 H), 4.88 (s, 2 H), 7.56 (d, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 1 H), 7.87 (t, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 1 H), 8.03 (d, <sup>3</sup>J = 8 Hz, 1 H) ppm.

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  52.88 (1 C), 64.46 (1 C), 123.84 (1 C), 128.02 (1 C), 137.87 (1 C), 148.17 (1 C), 160.20 (1 C), 165.02 (1 C) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>: 168.07 [M + H<sup>+</sup>], 190.05 [M + Na<sup>+</sup>]; gefunden: 167.86, 189.89.

**7.2.17 Synthese von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat**

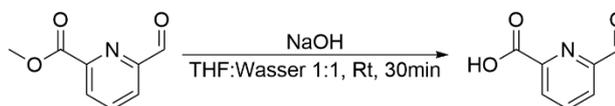
Es wurde 2,6-Pyridindimethanol (1.0 g, 6.0 mmol, 1.0 Äq.) in Chloroform (40 mL, 20 ml/g) gelöst und Selen(IV)oxid (0.86 g, 7.8 mmol, 1.3 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 min mit Ultraschall behandelt und anschließend für 24 h bei 65 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit DCM (30 mL/g) verdünnt und über Celite<sup>®</sup> filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt säulenchromatographisch (Cyclohexan:EtOAc 2:1, mit wenig MeOH auf Säule auftragen) aufgereinigt. Das Produkt wurde als beiger kristalliner Feststoff (0.82 g, 82 %) erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  4.07 (s, 3 H), 8.06 (dt, <sup>3</sup>J = 8 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 8.15 (dd, <sup>3</sup>J = 8 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 8.35 (dd, <sup>3</sup>J = 8 Hz, <sup>2</sup>J = 4 Hz, 1 H), 10.19 (s, 1 H) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  53.59 (1 C), 124.66 (1 C), 129.36 (1 C), 138.71 (1 C), 148.85 (1 C), 153.05 (1 C), 165.16 (1 C), 192.94 (1 C) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_3$ : 188.03  $[\text{M} + \text{Na}^+]$ ; gefunden: 188.08.

### 7.2.18 Synthese von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure



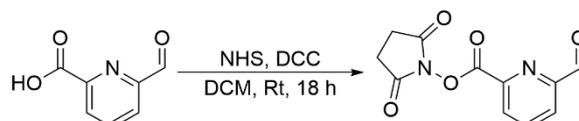
Es wurde Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat (500 mg, 3.0 mmol, 1 Äq.) in einem Gemisch aus THF und  $\text{H}_2\text{O}$  (40 mL, 80 mL/g) gelöst und 1 M NaOH (25 mL, 50 mL/g) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 30 min gerührt und anschließend THF unter vermindertem Druck entfernt. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl (30 mL, 60 mL/g) angesäuert und mit EtOAc (6 x 30 mL) extrahiert, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wurde als beiger Feststoff (0.25 g, 55 %) erhalten.

**$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.10 (dd,  $^3J = 8$  Hz,  $^2J = 4$  Hz, 1 H), 8.20 (dd,  $^3J = 8$  Hz,  $^2J = 4$  Hz, 1 H), 8.29 (dd,  $^3J = 8$  Hz,  $^2J = 4$  Hz, 1 H), 10.02 (s, 1 H) ppm.

**$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  124.27 (1 C), 127.51 (1 C), 139.24 (1 C), 148.12 (1 C), 152.25 (1 C), 165.46 (1 C), 193.10 (1 C) ppm.

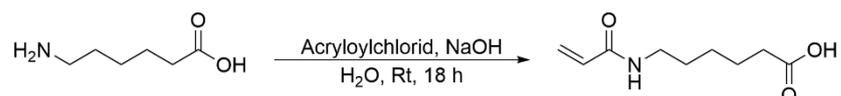
**LR-MS (ESI):** berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_3$ : 152.03  $[\text{M} + \text{H}^+]$ ; gefunden: 151.87.

### 7.2.19 Synthese des 2PCA-NHS-Aktivesters



Es wurde 6-Formylpyridin-2-carbonsäure (300 mg, 2.0 mmol, 1 Äq.) in DCM (6 mL, 20 mL/g) gelöst. Anschließend wurden EDC·HCl (457 mg, 2.4 mmol, 1.2 Äq.), 4-DMAP (24 mg, 0.2 mmol, 0.1 Äq.) und NHS (315 mg, 3.2 mmol, 1.6 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 18 h bei Rt gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die organische Phase mit Wasser (5x) gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das gewünschte Produkt konnte nicht nachgewiesen werden.

### 7.2.20 Synthese von Hexansäureacrylamid



Es wurde Aminohexansäure (2.0 g, 15.3 mmol, 1.0 Äq.) und Natriumhydroxid (2 M, 1.44 g, 36.1 mmol, 2.36 Äq.) in Wasser (18 mL, 9 mL/g) gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Es wurde Acryloylchlorid (1.4 mL, 16.8 mmol, 1.1 Äq.) in THF (2.4 mL, 1.2 mL/g) langsam unter Rühren hinzuge tropft und für 2 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit konz. HCl auf 3.0 eingestellt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde nacheinander mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Umkristallisation aus EtOAc lieferte ein farbloses Öl (1.18 g, 42 %).

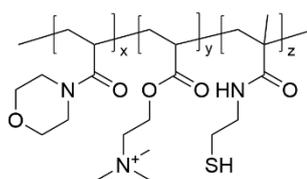
**<sup>1</sup>H-NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.32 (quin., <sup>3</sup>J = 14 Hz, 2 H), 1.48 (quin., <sup>3</sup>J = 14 Hz, 4 H), 2.33 (t, <sup>3</sup>J = 7 Hz, 1 H), 3.21 (t, <sup>3</sup>J = 14 Hz, 1 H), 5.70 (dd, <sup>3</sup>J = 21 Hz, <sup>2</sup>J = 7 Hz, 1 H), 6.09 (dd, <sup>3</sup>J = 28 Hz, <sup>2</sup>J = 7 Hz, 1 H), 6.15 (dd, <sup>3</sup>J = 28 Hz, <sup>2</sup>J = 21 Hz, 1 H) ppm.

**LR-MS (ESI):** berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>: 186.11 [M + H<sup>+</sup>], 208.10 [M + Na<sup>+</sup>]; gefunden: 151.87, 208.12.

## 7.3 Synthese von Polymeren und polymeranaloge Reaktionen

### 7.3.1 Synthese der BMAC-haltigen Präpolymere

Nachfolgend wird die Synthese eines Polymers über freie radikalische Polymerisation beispielhaft an einem kationischen Polymer **P2** bestehend aus 4-Acryloylmorpholin, TMAEA und BMAC mit einem molaren Verhältnis von 61:4:35 dargestellt. Alle weiteren Polymere wurden analog über diese Methode hergestellt. Im Falle von Polymeren, in denen TMAEA nicht enthalten war, wurde THF frei von Stabilisatoren als Lösungsmittel verwendet.



Es wurden 4-Acryloylmorpholin (1.29 g, 1.15 mL, 9.15 mmol, 15.25 Äq.), BMAC (0.17 g, 0.6 mmol, 1.0 Äq.) und TMAEA (1.50 g, 5.25 mmol, 8.75 Äq.) in DMSO

(8.8 mL) gelöst. Die entstandene Lösung wurde mit einem Argonstrom für 15 min entgast und anschließend der Initiator 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70, 46.3 mg, 0.15 mmol, 0.25 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei 42 °C in einem Heizofen ohne Agitation der Lösung erhitzt. Das entstandene vernetzte Polymer wurde zunächst mit einem Skalpell in kleine Würfel geschnitten und anschließend für 3 Tage in Wasser dialysiert. Das Wasser wurde dabei täglich gewechselt. Anschließend wurden die Disulfid-Brücken für ca. 30 min bei einem basischen pH-Wert, welcher mittels 1 M NaOH (Zugabe wenige mL) eingestellt wurde, mit Dithiothreitol (DTT, 463.0 mg, 3.0 mmol, 5.0 Äq.) gespalten, um lösliche Polymerketten zu erzeugen. Während der Spaltung wurde die Lösung mit einem Argonstrom entgast. Der pH-Wert der so entstandenen Lösung wurde anschließend mit 1 M HCl sauer eingestellt, um eine Reoxidation der Thiole hin zu Disulfiden zu verhindern, und filtriert, um nicht gespaltene Gelstücke zu entfernen. Die Lösung wurde bis auf einige mL eingengt und zweimal aus Wasser in leicht angesäuertem (wenige Tropfen HCl) IPA gefällt (maximal 2.5 mL pro 40 mL IPA) und zuletzt im Hochvakuum getrocknet. Polymere, welche nicht in IPA gefällt werden konnten, wurden stattdessen dialysiert (**P5+P6**).

**Tabelle 9:** Einwaagen zur Synthese der Polymere P1-P6.

Polymer	Komposition [mol%] AMor:BMAC :Amin	m [mg]			V [mL]	
		AMor	BMAC	Amin	V-70	Lösungs- mittel
<b>P1</b>	96:4:0	3049	260	-	69.4	12.3
<b>P2</b>	61:4:35	1292	173	1497	46.3	8.8
<b>P3</b>	92:8:0	1948	346	-	46.3	8.3
<b>P4</b>	66:4:30	1398	173	745	46.3	8.8
<b>P5</b>	66:4:30	1398	173	581	46.3	8.8
<b>P6</b>	66:4:30	1398	173	716	46.3	8.8

Acrylsäure-haltiges Polymer:

AMor: 1927 mg

BMAC: 173.1 mg

Acrylsäure: 54.1 mg

V-70: 46.3 mg

THF: 8.2 mL

Verwendete charakteristische  $^1\text{H-NMR}$  Signale:

AMor: 3.27 - 3.80 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.10 - 3.90 ( $\text{CDCl}_3$ )

BMAC: 0.80 - 1.00 ( $\text{D}_2\text{O}$ ), 0.91 - 1.06 ( $\text{CDCl}_3$ )

TMAEA: 3.08 - 3.23 ( $\text{D}_2\text{O}$ )

AEMA: 4.05 - 4.27 ( $\text{D}_2\text{O}$ )

AEEAc, APropAc (Boc-Schutzgruppe): 1.35 - 1.54 ( $\text{D}_2\text{O}$ )

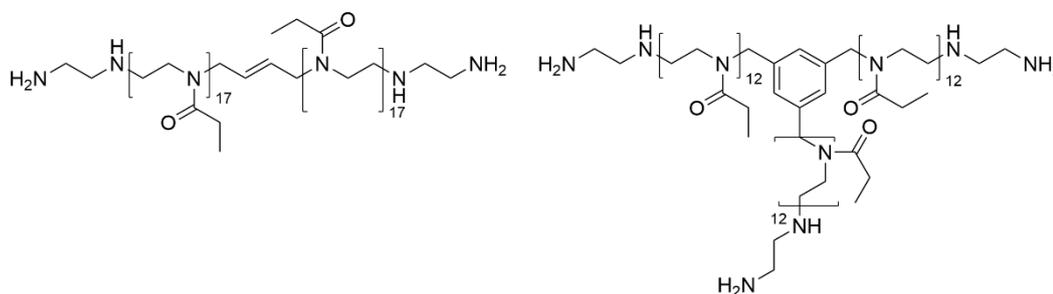
Beispiele der ausgewerteten  $^1\text{H-NMR}$  Spektren der jeweiligen Polymere sind im Anhang zu finden.

### 7.3.2 Funktionalisierung der BMAC-Präpolymere mit Peptiden

Zur Herstellung der Peptidpolymere wurde ein Präpolymer **P3** mit einem erhöhten Anteil an BMAC verwendet. Nachfolgend ist die Funktionalisierung am Beispiel des Peptids MIC-6AHX-YGRGDS dargestellt. Zunächst wurde das Peptid (175 mg, 0.18 mmol, 960.01 g/mol) und das Präpolymer **P3** (517 mg, 0.18 mmol Thiol zur Funktionalisierung, entsprach 2.86 % BMAC) jeweils separat in 3 mL entgastem Milli-Q<sup>®</sup> Wasser unter Argon gelöst und der pH-Wert jeweils auf 6.5 - 7.0 mit 1 M NaOH eingestellt. Zuletzt wurden beide Lösungen zusammengegeben und die Reaktionslösung für 24 h bei Rt gerührt. Nach erfolgter Dialyse der Reaktionslösung wurde das Peptidpolymer als weißer Feststoff erhalten.

### 7.3.3 Synthese von Poly-2-Oxazolin

Die Herstellung der Poly-2-Oxazoline ist nachfolgend am Beispiel eines zweiarmigen Poly-2-ethyloxazolins mit Amin-Endgruppen dargestellt. Im Falle von dreiarmigen Poly-2-Oxazolinen wurde 1,3,5-Tris-(bromomethyl)benzol als Initiator verwendet.



Es wurde trockenes Acetonitril (8.6 mL, 2 M bezogen auf 2-Ethyloxazolin) in einem ausgeheizten Schlenkrohr vorgelegt. Anschließend wurde destilliertes 2-Ethyloxazolin (2.0 mL, 19.77 mmol, 34.0 Äq.) hinzugegeben. Zum Starten der Polymerisation wurde Dibromethen (124 mg, 581  $\mu\text{mol}$ , 1.0 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung bei 120 °C für 1.5 h refluxiert. Nach 1.5 h wurden TEA

(2.4 mL, 17.5 mmol, 30 Äq.) und Ethylendiamin (1.2 mL, 17.5 mmol, 30 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung bei 60 °C über Nacht gerührt. Zuletzt wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt (2 x, erneutes Lösen in CHCl<sub>3</sub>) und am Hochvakuum getrocknet.

Verwendete Mengen bei der Herstellung des dreiarmligen PEtOx:

Acetonitril: 7.9 mL

EtOx: 2.0 mL

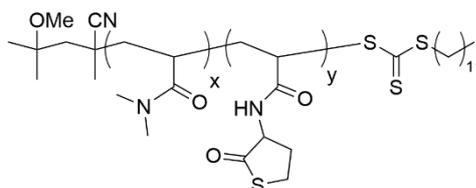
1,3,5-Tris-(bromomethyl)benzol: 196.0 mg

Ethylendiamin: 1.7 mL

TEA: -

### 7.3.4 Synthese der TLA-Polymere

Die Synthese der TLA-Polymere wird beispielhaft an einem Polymer mit 20 mol% TLA dargestellt. Im Falle der kationischen TLA-Polymere wurden diese analog der in Abschnitt 7.3.1 beschriebenen Polymere hergestellt. Hier wurden statt BMAC 10 mol% TLA verwendet.



Es wurden DMA (1.8 mL, 17.7 mmol, 211 Äq.), TLA (0.76 g, 4.4 mol, 53 Äq.) und 2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat (2C12, 29 mg, 0.08 mmol, 1 Äq.) in 1,4-Dioxan (9.25 mL, 2 M bezogen auf alle Monomere) in einem Schlenkrohr gelöst. Anschließend wurde die Reaktionslösung für 30 min mit einer Argonstrom entgast. Zuletzt wurde der Initiator 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70, 5.2 mg, 0.02 mmol, 0.2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 48 h bei 50 °C gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit wenigen mL 1,4-Dioxan verdünnt und in Diethylether gefällt. Erneute Fällung des Polymers in Diethylether aus CHCl<sub>3</sub> und Trocknung am Hochvakuum lieferte einen leicht gelblichen Feststoff.

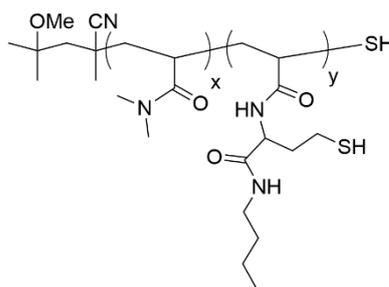
**Tabelle 10:** Einwaagen zur Synthese der Polymere P7-P10.

Polymer	Komposition [mol%] DMA:TLA: TMAEA	m [mg]					V [mL] Lösungs- mittel
		DMA	TLA	TMAEA	2C12	V-70	
<b>P7</b>	80:20:0	1757	758	-	29.0	5.2	9.3
<b>P8</b>	90:10:0	1686	291	-	23.0	2.2	7.6
<b>P9</b>	70:30:0	1725	1277	-	34.6	3.3 <sup>a)</sup>	10.6
<b>P10<sup>b)</sup></b>	60:10:30	892	256.8	1283.1	-	46.26	9.1 <sup>c)</sup>

a) Verwendung von AIBN als Initiator, b) Herstellung mittels BMAC-Methode, c) Verwendung von DMSO als Lösungsmittel.

### 7.3.5 Ringöffnung der TLA-Polymere

Die Ringöffnung wird am Beispiel der Ringöffnung mit *n*-Butylamin gezeigt. Die Verwendung von anderen Aminen zur Ringöffnung wurde analog durchgeführt. Lediglich bei der Ringöffnung mit Peptiden wurde 1 Äquivalent statt 5 Äquivalenten des Amins verwendet.



Es wurde das TLA-haltige Polymer (1 g, 1.64 mmol/g Polymer TLA, 1 Äq.) in entgastem Milli-Q<sup>®</sup> Wasser (10 mL/g) gelöst und anschließend *n*-Butylamin (810  $\mu$ L, 8.2 mmol, 5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Rt gerührt. Nach erfolgter Ringöffnung wurde eine Spatelspitze DTT hinzugegeben und erneut für 5 - 10 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in eine Dialysekammer überführt und für 24 h gegen Wasser dialysiert. Das Polymer wurde nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

### 7.3.6 Funktionalisierung der geöffneten TLA-Polymere

Es wurde das geöffnete TLA-Polymer (350 mg, 0.435 mmol Thiol/g, 1 Äq.) in entgastem Milli-Q<sup>®</sup> Wasser gelöst und anschließend Hydroxyethylmethacrylat (HEMA, 29.8  $\mu$ L, 0.257 mmol 0.59 Äq.) oder Butylacrylat (36.6  $\mu$ L, 0.257 mmol, 0.59 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei RT gerührt, eine Spatelspitze DTT hinzugegeben und erneut für 5 - 10 min gerührt. Zuletzt wurde die

Reaktionslösung für 1 d gegen Wasser dialysiert. Das Polymer wurde nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

Im Falle der Funktionalisierung mit Peptiden wurde die Reaktion analog durchgeführt. Jedoch wurde vor Zugabe der Peptide ein pH von 6.5 - 7.0 eingestellt und die Reaktionslösung für 3 d bei Rt gerührt.

Folgende Peptide und Einwaagen wurden verwendet für 300 mg Polymer mit einer Thiolkonzentration von 1.39 mmol/g. Davon sollten 0.854 mmol/g Thiol funktionalisiert werden:

Mal-GGRGDSF: 845.82 g/mol, 216.5 mg, 0.256 mmol

MAL-GVSWRAPTA: 1095.17 g/mol, 280.4 mg, 0.256 mmol

MAL-GVFDNFVLK: 1189.32 g/mol, 304.5 mg, 0.256 mmol

### **7.3.7 Polymeranaloge Synthese des NHS-Polymers**

Das Acrylsäure-haltige Polymer (0.5 g, 0.17 mmol Acrylsäure, 1.0 Äq.), NHS (27.5 mg, 0.28 mmol, 1.6 Äq.) und EDC·HCl (39.9 mg, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) wurden in DCM (11 mL/g Polymer) gelöst und die Reaktionslösung für 18 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, das Polymer erneut in 1,4-Dioxan aufgenommen und in Diethylether gefällt. Zuletzt wurde das Polymer für 3 d bei täglichem Wasserwechsel gegen Wasser dialysiert. Das Polymer wurde nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

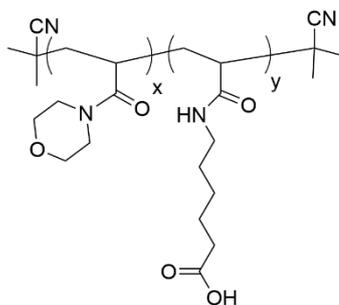
### **7.3.8 Polymeranaloge Synthese des NTA-Polymers**

Das NHS-Polymer (0.5 g, 0.17 mmol NHS-Ester, 1.0 Äq.) wurde in Milli-Q® Wasser (4 mL, 8 mL/g) gelöst. Anschließend wurde TEA (45.5 µL, 0.26 mmol, 1.5 Äq.) und  $N_{\alpha},N_{\alpha}$ -Bis-(carboxymethyl)-L-lysin (49.1 mg, 0.19 mmol, 1.1 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 18 h bei Rt gerührt. Bevor die Reaktionslösung für 3 d gegen Wasser bei täglichem Wasserwechsel dialysiert wurde, wurde TEA am Rotationsverdampfer entfernt. Das Polymer wurde nach Gefriertrocknung als weißer Feststoff erhalten.

### 7.3.9 Herstellung des NTA-Eisenkomplexes

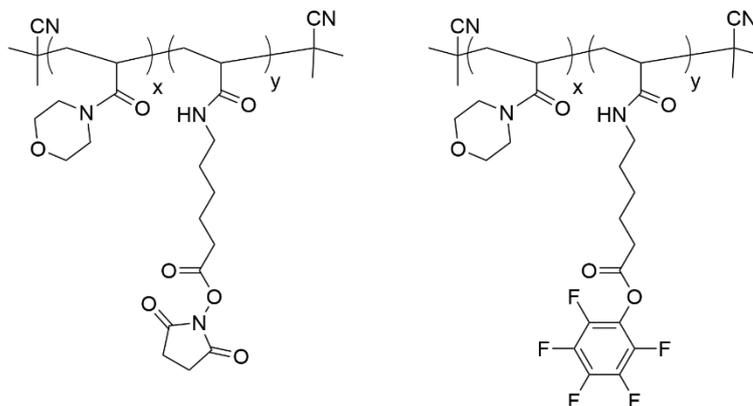
Zur Herstellung des Eisenkomplexes wurde das Polymer (200 mg, 0.17 mmol NTA-Ligand, 1.0 Äq.) in 20 mL (10 mM bezogen auf  $\text{FeCl}_3$ ) Milli-Q® Wasser gelöst. Das Hexahydrat des  $\text{FeCl}_3$  (54.1 mg, 0.20 mmol) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf ca. 2 mL eingedunstet und in IPA gefällt. Nach Trocknung des Polymers konnte dieses nicht mehr in Wasser gelöst werden.

### 7.3.10 Synthese des PAMor-*co*-HSAA-Polymers (P11)



Es wurde AMor (1.8 mL, 14.25 mmol, 19 Äq.) und HSAA (132  $\mu\text{L}$ , 0.75 mmol, 1 Äq.) in einem Schlenkrohr in THF (8.1 mL, 1.5 M bezogen auf alle Monomere) gelöst und mit einem Argonstrom für 30 min entgast. Anschließend wurde AIBN (24.6 mg, 0.15 mmol, 0.2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 18 h bei 70 °C refluxiert. Die Reaktionslösung wurde mit wenigen mL THF verdünnt und in kaltem Diethylether insgesamt 2 x gefällt. Das Polymer wurde als weißer Feststoff erhalten.

### 7.3.11 Synthese der Aktivester Polymere zur Proteinkonjugation



Es wurde das PAMor-*co*-HSAA-Polymer **P11** (500 mg, 0.35 mmol Säure pro Gramm Polymer, 0.175 mmol, 1.0 Äq.) in DCM (5 mL, 10 mL/g) gelöst. Anschließend wurde NHS (24 mg, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) oder PFP (38 mg,

0.21 mmol, 1.2 Äq.), DCC (43 mg, 0.21 mmol, 1.2 Äq.) und 4-DMAP (4.3 mg, 0.035 mmol, 0.2 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei Rt gerührt und das Polymer aus DCM in Diethylether gefällt. Dialyse gegen Wasser für 1 d und anschließende Gefriertrocknung ergab ein feines weißes Polymer.

### **7.3.12 Konjugation von Proteinen an Aktivester-Polymere**

Es wurde das Aktivester-Polymer (100 mg, 0.072 mmol Aktivester, 1.0 Äq.) in 1 mL PBS-Puffer (ca. 0.1 M Lösung bezogen auf Aktivester) gelöst. Anschließend wurde GFP (216 mg, 139  $\mu$ L einer 1.56 g/L Stammlösung, 0.0007 mmol, 0.01 Äq.) oder Lysozym (104 mg, 0.007 mmol, 0.1 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 2 d bei RT gerührt. Zuletzt wurde die Reaktionslösung gefriergetrocknet.

## **7.4 Herstellung der Hydrogele und Durchführung der Zellexperimente**

### **7.4.1 U251-MG Zelllinie**

Es wurde die menschliche Astrozytom/Glioblastom Zelllinie U251-MG (menschliche Glioblastom Zelllinie, WHO Grad IV) für die Zellexperimente verwendet. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und zur Verwendung ein Aliquot der Zellen für 1 min auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in 37 °C warmes Medium (Minimum Essential Medium Eagle Alpha) mit 0.1 % v/v Gentamicin transferiert und für 5 min bei 80 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Medium suspendiert. Die Zellen wurden in T-75 Flaschen bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 3 - 4 d ausgetauscht und die Zellen einmal pro Woche bei einer Konfluenz von 80 - 90 % mit einem Verhältnis von 1:75 geteilt. Dafür wurden die Zellen einmalig mit PBS-Puffer (0.01 M, pH = 7.4) gewaschen und anschließend mit 1 mL 0.05% Trypsin-EDTA für 6 min bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Trypsinierung wurde die Abtrennung der Zellen visuell mit einem Mikroskop untersucht. Die Verdauung wurde durch die Zugabe von 5 mL Medium gestoppt und die Zellen in ein 15 mL Zentrifugengefäß überführt, sowie erneut für 5 min bei 80 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet erneut in frischem Medium suspendiert. In einem Verhältnis von 1:75 wurde die Zellsuspension in eine T-75 Flasche transferiert und mit zusätzlichen 15 mL warmen Medium bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> kultiviert, bevor diese auf den Hydrogelen ausgesät wurden.

#### **7.4.2 Präparation der primären Neurosphären von Mäusen**

Es wurde frisches Gewebe, welches NSCs beinhaltet, sezirt und für 25 min enzymatisch gespalten (sterile Verdauungslösung: 1 mL MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha), 30 U/mL Papain, 40 µg/mL DNase I und 240 µg/mL L-Cystein). Der Verdauungsprozess wurde mit der Zugabe von äquivalenten Mengen von Ovomuroid mit L15 Medium (beinhaltet 0.1 % w/v Trypsininhibitor, 0.005 % w/v Rinderserumalbumin und 0.1 % w/v DNase I) gestoppt. Zur Generierung einer Einzelzellsuspension wurde das Gewebe vorsichtig mechanisch trituriert und für 5 min bei 200 rcf zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und 1 mL der Nährstoffmischung F12 (2 % v/v B27, 1 % v/v L-Glutamin, 1 % v/v Penicilin/Streptomycin) resuspendiert. Die Anzahl an Zellen wurde über Auszählung von 10 µL Zellsuspension in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Um eine hohe Zahl sekundärer NSCs zu generieren, wurden die NSCs für 6 d bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> in Gegenwart von 20 ng/mL EGF (Epidermal Growth Factor), 20 ng/mL FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) und 0.5 U/mL Heparin kultiviert.

Die entstandenen Neurosphären wurden vor der Kultivierung auf Hydrogelen erneut in eine Einzelzellsuspension überführt. Dazu wurden die entstandenen Sphäroidstrukturen für 2 min bei 200 rcf zentrifugiert und in 500 µL Ethylendiamintetraessigsäure mit 0.05 % w/v Trypsin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min in ein zuvor auf 37 °C erwärmtes Bad gestellt. Der Verdauungsprozess wurde mit einer äquivalenten Menge Ovomuroid beendet und die Zellen vorsichtig mechanisch trituriert, sodass eine Einzelzellsuspension entstand. Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 200 rcf zentrifugiert, um einen Rückstand an Trypsin/EDTA zu entfernen, und anschließend in 1 mL Stammzellmedium aus DMEM und 1 mL der Nährstoffmischung F12 (2 % v/v B27, 1 % v/v L-Glutamin, 1 % v/v Penicilin/Streptomycin) resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellen mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf den Hydrogelen ausgesät. Einige NSC-Kulturen wurden zusätzlich nach 1 - 2 h mit 20 ng/mL FGF2, 0.5 U/mL Heparin und 1 % Rinderserumalbumin kultiviert. Dazu wurden die gelösten Stoffe in 250 µL Differenzierungsmedium zu den Hydrogelen gegeben.

### 7.4.3 Herstellung der Hydrogele für rheologische Untersuchungen

Die Herstellung der Gele für rheologische Untersuchungen wird beispielhaft an einem kationischen 10 wt% Gel dargestellt.

Es wurde PBS-Puffer (0.01 M, pH = 7.4, 954  $\mu$ L) vorgelegt und anschließend die Polymerlösung (200 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, Thiol Konzentration von 0.337 mmol/g Polymer, 679  $\mu$ L) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7.0 - 7.6 eingestellt. Anschließend wurde die Vernetzerlösung (175 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, 366  $\mu$ L) hinzugegeben. Die entstandene Lösung wurde mittels Vortexmischer kurz vermischt und jeweils 500  $\mu$ L in eine Runde Gelierungsform ( $\varnothing$  1.6 cm) gegeben. Die Formen wurden mit Parafilm abgedeckt und für mindestens 3 h, meist über Nacht, zur vollständigen Gelierung stehen gelassen. Zuletzt wurden die entstandenen Gele mit einem Spatel aus der Form gelöst und zur vollständigen Quellung für mindestens 24 h in eine mit Mill-Q<sup>®</sup> Wasser gefüllte Petrischale gelegt.

### 7.4.4 Herstellung der Hydrogele für Zellexperimente

Die Herstellung der Gele für Zellexperimente wird beispielhaft an einem kationischen 18 wt% Gel dargestellt.

Es wurde PBS-Puffer (0.01 M, pH = 7.4, 118  $\mu$ L) vorgelegt und anschließend die Polymerlösung (200 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, Thiol Konzentration von 0.337 mmol/g Polymer, 1223  $\mu$ L) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7.0 - 7.6 eingestellt. Anschließend wurde die Vernetzerlösung (175 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, 659  $\mu$ L) hinzugegeben. Die entstandene Lösung wurde mittels Vortexmischer kurz vermischt und in eine SDS-Page Kammer der Firma *Bio Rad* mit einem Abstand von 1 mm zwischen *Glass Plate* und *Short Plate* gegeben. Die Gele wurden für 3 h zur vollständigen Gelierung stehen gelassen.

Für die Durchführung der Zellexperimente mit nicht-dialysierten Hydrogelen wurden die Hydrogele in sterilem PBS-Puffer angesetzt, sodass keine weitere Sterilisierung notwendig war. Die entstandenen Hydrogele wurden aus der SDS-Page Kammer entnommen und mit einem Kork Stanzer ( $\varnothing$  1.3 cm) Proben aus dem Hydrogel ausgestanzt. Anschließend wurden 40.000 Zellen auf den Hydrogelen ausgesät und

das Hydrogel mit Medium überschichtet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> für 3 und 7 Tage kultiviert.

Für die Durchführung der Zellexperimente mit dialysierten Hydrogelen wurden die entstandenen Hydrogele aus der SDS-Page Kammer entnommen und für mindestens 3 Tage in Milli-Q® Wasser dialysiert, wobei täglich das Wasser gewechselt wurde. Vor dem Einsatz der Hydrogele in Zellexperimenten wurden Proben aus dem entstandenen Hydrogel mit einem Kork Stanzer (Ø 1.3 cm) ausgestanzt. Die Proben wurden zur Sterilisierung in 70 % Ethanol für 1 h inkubiert und anschließend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und erneut für 1 h in Zellmedium inkubiert, bevor 40.000 Zellen auf den Hydrogelen ausgesät wurden. Die Zellen wurden mit Medium überschichtet und bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> für 3 und 7 Tage kultiviert.

#### **7.4.5 Herstellung von Hydrogelen für 3D Zellexperimenten**

Die Herstellung der Gele für 3D Zellexperimente wird beispielhaft an einem unfunktionalisierten 10 wt% Gel dargestellt.

Es wurde PBS-Puffer (0.01 M, pH = 7.4, 197 µL) vorgelegt und anschließend die Polymerlösung (200 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, Thiol Konzentration von 0.337 mmol/g Polymer, 151 µL) hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7.0 - 7.6 eingestellt. Anschließend wurde zunächst die Zellsuspension (82 µL, 100000 Zellen pro Gel in Medium) und dann die Vernetzerlösung (175 mg/mL Stammlösung in PBS-Puffer 0.01 M, pH = 7.4, 170 µL) hinzugegeben. Die entstandene Lösung wurde mittels Vortexmischer kurz vermischt und jeweils 80 µL in die Gelierungsform gegeben. Als Gelierungsform wurde hierbei Parafilm verwendet, in welches mit dem Finger runde Vertiefungen, durch Auflage auf einen 100 µL Spitzenkasten, gedrückt wurden. Die Hydrogele wurden für 1.5 h zur vollständigen Gelierung stehen gelassen und anschließend in eine 4-well Schale gelegt und zur vollständigen Quellung mit Zellmedium überdeckt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 6 % v/v CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **7.4.6 Färbung mit einem live/dead Assay**

Der live/dead Assay wurde mit einem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit für Säugetierzellen durchgeführt. Die Zellen wurden einmalig mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit der Farbstofflösung bestehend aus PBS-Puffer mit 4 µM EthD-1 und 2 µM calcein-AM für 15 min bei Rt inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen und im Anschluss Fluoreszenzaufnahmen aufgenommen.

#### **7.4.7 Immunohistochemie der U251-MG Zellen**

Das Zytoskelett der U251-MG Zellen wurde mit immunohistochemischen Färbungen visualisiert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 4 % w/v Paraformaldehyd fixiert und dreimal mit PBT-1 (PBS-Puffer mit 1 % w/v Rinderserumalbumin und 0.1 % v/v Triton-X-100) gewaschen. Primäre Antikörper (polyklonaler anti-GFAP Antikörper, 1:300, monoklonaler anti-Vimentin Antikörper, 1:300 und monoklonaler anti-Vinculin Antikörper, 1:200) wurden mit PBT-1 verdünnt. Zusätzlich wurde Phalloidin-atto 488 zur Färbung von F-Aktin verwendet. Die Zellen wurden mit den primären Antikörpern und der Phalloidin-Lösung für 1 h bei Rt unter Ausschluss von Licht auf einer Scharnierplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS/A (PBS mit 0.1 % w/v Rinderserumalbumin) gewaschen. Die sekundären Antikörper (polyklonaler anti-Maus Antikörper Cy3, 1:300 und polyklonaler anti-Kaninchen Antikörper, 1:300) wurden mit PBS/A verdünnt. Der Nukleus wurde mit Bisbenzimid (Hoechst 33258, 1:100000) angefärbt. Die sekundären Antikörper und die Nukleus Markerlösung wurden für 1 h bei Rt und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 50 % v/v PBS-Puffer und 50 % v/v Glycerin für die Mikroskopie behandelt.

#### **7.4.8 Immunohistochemie der NSCs**

Die biologische Entwicklung der NSCs wurde mit immunohistochemischen Färbungen untersucht. Folgende Reagenzien wurden für verschiedene Zelltypen verwendet: Monoklonale Antikörper gegen O4 (1:100, Maus IgM, Oligodendrozyten), Nestin (1:300, Maus igG1, RRID: AB\_94911, Vorläuferzellen),  $\beta$ III-Tubulin (1:300, Maus IgG2b, RRID: AB\_477590, Neuronen) und polyklonale Antikörper gegen GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein, 1:300, Kaninchen IgG, RRID: AB\_10013382, Astrozyten), sowie Antikörper zur Identifizierung der Proliferation über die Detektion von phosphoryliertem Histon H3 (PH3, 1:200, Kaninchen igG polyklonal, RRID: AB\_310177, proliferierende Zellen). Der Nukleus wurde mit Bisbenzimid (Hoechst 33258, 1:100000) angefärbt. Nach Kultivierung der Zellen wurden die Zellen zweifach mit Krebs-Ringer/(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure) (HEPES) (KRH) mit zusätzlich 1 g/L BSA (KRH/A) für 5 min gewaschen und gleichzeitig blockiert. Während O4 vor Fixierung der Zellen

untersucht wurde, wurden alle anderen Marker nach der Fixierung der Zellen verwendet. Die Antikörper gegen O4 wurden mit KRH/A verdünnt und die Zellen für 30 - 60 min mit diesen bei Rt auf einer Scharnierplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit KRH gewaschen und mit 4 % w/v PFA für 10 min bei Rt fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS-Puffer mit zusätzlich 0.1 % w/v Triton X-100 und 10 g/L Rinderserumalbumin (PBT-1) für 5 min gewaschen. Primäre Antikörper wurden mit PBT-1 verdünnt und die Zellen für 1 - 2 h bei Rt auf einer Scharnierplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer mit zusätzlich 1 g/L Rinderserumalbumin (PBS/A) gewaschen und erneut für 1 - 2 h bei Rt mit den spezifischen sekundären Antikörpern (Cy3 (1:300, Ziege anti Maus IgG, RRID: AB\_2338686), Alexa Fluor-488 (1:300, Ziege anti-Maus IgM, RRID: AB\_2338849, 1:300, Ziege anti-Hase IgG, RRID: AB\_2338049) oder Alexa Fluor-647 (1:300, Ziege anti Hase IgG, RRID: AB\_2338078) verdünnt in PBS/A unter Ausschluss von Licht auf einer Scharnierplatte inkubiert. Der Nukleus Farbstoff Hoechst 33528 wurde in einem Verhältnis von 1:10<sup>5</sup> v/v zu der Lösung geben und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit 50 % v/v PBS-Puffer und 50 % v/v Glycerin für die Mikroskopie behandelt.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, A. Jemal, *CA. Cancer J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30.
- [2] A. Hartley, D. C. Marshall, J. D. Saliccioli, M. B. Sikkil, M. Maruthappu, J. Shalhoub, *Circulation* **2016**, *133*, 1916–1926.
- [3] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, H. M. Arrighi, *Alzheimer`s Dement.* **2007**, *3*, 186–191.
- [4] E. R. Dorsey, R. Constantinescu, J. P. Thompson, K. M. Biglan, R. G. Holloway, K. Kiebertz, F. J. Marshall, B. M. Ravina, G. Schifitto, A. Siderowf, C. M. Tanner, *Neurology* **2007**, *68*, 384–386.
- [5] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.
- [6] M. Gironi, C. Arnò, G. Comi, G. Penton-Rol, R. Furlan, *Immune Rebalancing*, Academic Press, San Diego, **2016**.
- [7] A. A. Oliveira, H. M. Hodges, *Curr. Alzheimer Res.* **2005**, *2*, 79–95.
- [8] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, I. L. Weissman, *Nature* **2001**, *414*, 105–111.
- [9] A. Smith, *Nature* **2006**, *441*, 1060.
- [10] S. Mitalipov, D. Wolf, *Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**.
- [11] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie Der Zelle*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, **2017**.
- [12] R. Singh Mahla, *Int. J. Cell Biol.* **2016**, *1*, 1–24.
- [13] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones, *Science* **1998**, *282*, 1145–1147.
- [14] Y. Li, S. Powell, E. Brunette, J. Lebkowski, R. Mandalam, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *91*, 688–698.
- [15] H. Rohdewohld, A. M. Wobus, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* **2002**, *45*, 113–122.
- [16] K. Takahashi, S. Yamanaka, *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
- [17] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, J. A. Thomson, *Science* **2007**, *318*, 1917–1920.
- [18] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
- [19] F. Soldner, R. Jaenisch, *Science* **2012**, *338*, 1155–1156.
- [20] H. Kamao, M. Mandai, S. Okamoto, N. Sakai, A. Suga, S. Sugita, J. Kiryu, M. Takahashi, *Stem Cell Reports* **2014**, *2*, 205–218.
- [21] A. M. Rodriguez, C. Elabd, E. Z. Amri, G. Ailhaud, C. Dani, *Biochimie* **2005**, *87*, 125–128.
- [22] P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C.

- Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, M. H. Hedrick, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 4279–4295.
- [23] A. J. Wagers, I. L. Weissman, *Cell* **2004**, *116*, 639–648.
- [24] J. M. Gimble, F. Guilak, *Cytotherapy* **2009**, *5*, 362–369.
- [25] V. Solozobova, N. Wyvekens, J. Pruszek, *Stem Cell Rev. Reports* **2012**, *8*, 813–829.
- [26] “Neural Stem Cell Culture | Sigma-Aldrich,” can be found under <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/neural-stem-cell-biology.html>, **2020**.
- [27] R. Galli, U. Borello, A. Gritti, M. G. Minasi, C. Bjornson, M. Coletta, M. Mora, M. G. Cusella De Angelis, R. Fiocco, G. Cossu, A. L. Vescovi, *Nat. Neurosci.* **2000**, *3*, 986–991.
- [28] C. R. R. Bjornson, R. L. Rietze, B. A. Reynolds, M. C. Magli, A. L. Vescovi, *Science* **1999**, *283*, 534–537.
- [29] C. Nicholson, E. Syková, *Trends Neurosci.* **1998**, *21*, 207–215.
- [30] Y. T. Konttinen, E. Kaivosoja, V. Stegaev, H. D. Wagner, J. Levón, V. M. Tiainen, Z. Mackiewicz, in *Regen. Med. From Protoc. to Patient*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2011**, pp. 21–80.
- [31] S. F. Badylak, D. O. Freytes, T. W. Gilbert, *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 1–13.
- [32] A. I. Alford, K. M. Kozloff, K. D. Hankenson, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2015**, *65*, 20–31.
- [33] M. Clark, J. Choi, M. Douglas, *Biology 2E*, OpenStax, Houston, Texas, **2018**.
- [34] A. De Arcangelis, E. Georges-Labouesse, *Trends Genet.* **2000**, *16*, 389–395.
- [35] R. Schofield, C. Blood, *Blood Cells* **1978**, *4*, 7–25.
- [36] L. Li, T. Xie, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 605–631.
- [37] D. T. Scadden, *Nature* **2006**, *441*, 1075–1079.
- [38] B. Ohlstein, T. Kai, E. Decotto, A. Spradling, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 693–699.
- [39] D. T. Chu, T. T. Nguyen, N. L. B. Tien, D. K. Tran, J. H. Jeong, P. G. Anh, V. Van Thanh, D. T. Truong, T. C. Dinh, *Cells* **2020**, *9*, 563.
- [40] O. Lindvall, Z. Kokaia, A. Martinez-Serrano, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S42–S50.
- [41] V. F. M. Segers, R. T. Lee, *Nature* **2008**, *451*, 937–942.
- [42] E. Wolff, *Schweizerische Ärztezeitung* **2002**, *83*, 1726–1727.
- [43] E. D. Thomas, H. L. Lochte, W. C. Lu, J. W. Ferrebee, *N. Engl. J. Med.* **1957**, *257*, 491–496.
- [44] M. J. Evans, M. H. Kaufman, *Nature* **1981**, *292*, 154–156.
- [45] G. R. Martin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 7634–7638.

- [46] S. T. Amancio-Filho, L. A. Blaga, *Joining of Polymer-Metal Hybrid Structures*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, **2018**.
- [47] S. Alavi, S. Thomas, K. P. Sandeep, N. Kalarikkal, J. Varghese, S. Yaragalla, *Polymers for Packaging Applications*, Apple Academic Press, Inc., Oakville, Canada, **2015**.
- [48] S. Ul-Islam, B. S. Butola, *Advanced Functional Textiles and Polymers*, Wiley, **2019**.
- [49] F. Puoci, *Advanced Polymers in Medicine*, Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg, **2015**.
- [50] T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, in *J. Control. Release*, **2001**, pp. 295–302.
- [51] B. C. Isenberg, C. Williams, R. T. Tranquillo, *Circ. Res.* **2006**, *98*, 25–35.
- [52] K. Škrlová, K. Malachová, A. Muñoz-Bonilla, D. Měřinská, Z. Rybková, M. Fernández-García, D. Plachá, *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1548.
- [53] D. Levy, M. Zayat, *The Sol-Gel Handbook*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2015**.
- [54] N. Hüsing, U. Schubert, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1998**, *110*, 22–47.
- [55] A. C. Pierre, *Introduction to Sol-Gel Processing*, Springer Nature Switzerland AG, Cham, **2020**.
- [56] O. Wichterle, D. Lim, *Nature* **1960**, *185*, 117–118.
- [57] I. V. Yannas, J. F. Burke, *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, *14*, 65–81.
- [58] J. F. Burke, V. Yannas, W. C. Quinby, C. C. Bondoc, W. K. Jung, *Ann. Surg.* **1981**, *194*, 413–428.
- [59] A. S. Sawhney, C. P. Pathak, J. A. Hubbell, *Macromolecules* **1993**, *26*, 581–587.
- [60] M. Goktas, G. Cinar, I. Orujalipoor, S. Ide, A. B. Tekinay, M. O. Guler, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1247–1258.
- [61] P. Naghdi, T. Tiraihi, F. Ganji, S. Darabi, T. Taheri, K. H., *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *10*, 199–208.
- [62] M. A. Towler, E. W. Rush, M. K. Richardson, C. L. Williams, *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **2018**, *35*, 357–365.
- [63] H. Thérien-Aubin, Y. Wang, K. Nothdurft, E. Prince, S. Cho, E. Kumacheva, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3244–3251.
- [64] J. Qu, X. Zhao, P. X. Ma, B. Guo, *Acta Biomater.* **2017**, *58*, 168–180.
- [65] Y. Sun, S. Liu, G. Du, G. Gao, J. Fu, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8512–8515.
- [66] F. Ullah, M. B. H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, H. M. Akil, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 414–433.
- [67] D. A. Gyles, L. D. Castro, J. O. C. Silva, R. M. Ribeiro-Costa, *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 373–392.
- [68] R. Xing, K. Liu, T. Jiao, N. Zhang, K. Ma, R. Zhang, Q. Zou, G. Ma, X. Yan, *Adv.*

- Mater.* **2016**, *28*, 3669–3676.
- [69] R. M. Desai, S. T. Koshy, S. A. Hilderbrand, D. J. Mooney, N. S. Joshi, *Biomaterials* **2015**, *50*, 30–37.
- [70] C. B. Highley, G. D. Prestwich, J. A. Burdick, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 35–40.
- [71] M. Anguiano, C. Castilla, M. Maška, C. Ederra, R. Peláez, X. Morales, G. Muñoz-Arrieta, M. Mujika, M. Kozubek, A. Muñoz-Barrutia, A. Rouzaut, S. Arana, J. M. Garcia-Aznar, C. Ortiz-de-Solorzano, *PLoS One* **2017**, *12*, 1–24.
- [72] R. Langer, D. A. Tirrell, *Nature* **2004**, *428*, 487–492.
- [73] J. Zhu, R. E. Marchant, *Expert Rev. Med. Devices* **2014**, *8*, 607–626.
- [74] J. F. Mano, *Biomimetic Approaches for Biomaterials Development*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2012**.
- [75] A. Chrambac, D. Rodbard, *Science* **1971**, *172*, 440–451.
- [76] K. Sadler, W. Zeng, D. C. Jackson, *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 150–158.
- [77] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 223–236.
- [78] J. Mosquera, I. García, L. M. Liz-Marzán, *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2305–2313.
- [79] C. Hiemstra, L. J. Van Der Aa, Z. Zhong, P. J. Dijkstra, J. Feijen, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1548–1556.
- [80] C. M. Nimmo, S. C. Owen, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 824–830.
- [81] X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M. C. Roberts, G. D. Prestwich, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1304–1311.
- [82] N. Boehnke, C. Cam, E. Bat, T. Segura, H. D. Maynard, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2101–2108.
- [83] R. T. Chen, S. Marchesan, R. A. Evans, K. E. Styan, G. K. Such, A. Postma, K. M. McLean, B. W. Muir, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 889–895.
- [84] K. M. Gattás-Asfura, C. A. Fraker, C. L. Stabler, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *99A*, 47–57.
- [85] J. M. S. Garcia, A. Panitch, S. Calve, *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 169–179.
- [86] H. K. Kleinman, G. R. Martin, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 378–386.
- [87] C. S. Hughes, L. M. Postovit, G. A. Lajoie, *Proteomics* **2010**, *10*, 1886–1890.
- [88] E. A. Aisenbrey, W. L. Murphy, *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 539–551.
- [89] S. Koutsopoulos, S. Zhang, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5162–5169.
- [90] X. Z. Zhang, D. Q. Wu, C. C. Chu, *Biomaterials* **2004**, *25*, 3793–3805.
- [91] L. Klouda, A. G. Mikos, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 34–45.
- [92] Y. Tang, C. L. Heaysman, S. Willis, A. L. Lewis, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, *8*, 1141–1159.

- [93] T. Nakaji-Hirabayashi, K. Kato, H. Iwata, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 212–221.
- [94] Y. Liang, P. Walczak, J. W. M. Bulte, *Biomaterials* **2013**, *34*, 5521–5529.
- [95] A. Banerjee, M. Arha, S. Choudhary, R. S. Ashton, S. R. Bhatia, D. V. Schaffer, R. S. Kane, *Biomaterials* **2009**, *30*, 4695–4699.
- [96] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S. S. Skandalis, D. H. Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, C. E. H. Schmelzer, L. Duca, M. Durbeej, N. A. Afratis, L. Troeberg, M. Franchi, V. Masola, M. Onisto, *FEBS J.* **2021**, *288*, 6850–6912.
- [97] N. A. Silva, M. J. Cooke, R. Y. Tam, N. Sousa, A. J. Salgado, R. L. Reis, M. S. Shoichet, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6345–6354.
- [98] C. M. Valmikinathan, V. J. Mukhatyar, A. Jain, L. Karumbaiah, M. Dasari, R. V. Bellamkonda, *Soft Matter* **2012**, *8*, 1964–1976.
- [99] K. B. Bjugstad, D. E. Redmond, K. J. Lampe, D. S. Kern, J. R. Sladek, M. J. Mahoney, in *Cell Transplant.*, Cognizant Communication Corporation, **2008**, pp. 409–415.
- [100] N. Nishiyama, K. Kataoka, in *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer, Boston, MA, **2003**, pp. 155–177.
- [101] M. J. Mahoney, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2265–2274.
- [102] U. Freudenberg, A. Hermann, P. B. Welzel, K. Stirl, S. C. Schwarz, M. Grimmer, A. Zieris, W. Panyanuwat, S. Zschoche, D. Meinhold, A. Storch, C. Werner, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5049–5060.
- [103] K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V. Schaffer, K. E. Healy, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 4426–4438.
- [104] S. Woerly, *Neurosurg. Rev.* **2000**, *23*, 59–77.
- [105] X. Li, E. Katsanevakis, X. Liu, N. Zhang, X. Wen, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1105–1129.
- [106] Š. Kubinová, D. Horák, N. Kozubenko, V. Vaněček, V. Proks, J. Price, G. Cocks, E. Syková, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5966–5975.
- [107] S. Tan, T. Wu, D. Zhang, Z. Zhang, *Theranostics* **2015**, *5*, 863–881.
- [108] E. Yavin, Z. Yavin, *J. Cell Biol.* **1974**, *62*, 540–546.
- [109] S. R. Hynes, L. M. McGregor, M. F. Rauch, E. B. Lavik, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 1017–1030.
- [110] S. R. Hynes, M. F. Rauch, J. P. Bertram, E. B. Lavik, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2009**, *89*, 499–509.
- [111] L. Cai, J. Lu, V. Sheen, S. Wang, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1663–1674.
- [112] L. Cai, J. Lu, V. Sheen, S. Wang, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 342–349.
- [113] M. Sallouh, M. Jarocki, O. Sallouh, P. Degen, A. Faissner, R. Weberskirch, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600178.
- [114] P. Bolduan, Dissertation, Synthese Und Charakterisierung von Biologisch-Aktiven

- Hydrogelen Und Deren Anwendung in Der Stammzellforschung, Technische Universität Dortmund, **2018**.
- [115] F. Pätzold, Dissertation, Synthese Und Charakterisierung von Maßgeschneiderten Bioabbaubaren Hydrogelsystemen Für Eine Anwendung in Der Biomedizin, Technische Universität Dortmund, **2022**.
- [116] E. Ranucci, G. Spagnoli, L. Sartore, P. Ferruti, P. Caliceti, O. Schiavon, F. M. Veronese, *Macromol. Chem. Phys.* **1994**, *195*, 3469–3479.
- [117] Y. Suk Jo, A. J. van der Vlies, J. Gantz, S. Antonijevic, D. Demurtas, D. Velluto, J. A. Hubbell, *Macromolecules* **2008**, *41*, 1140–1150.
- [118] S. N. S. Alconcel, A. S. Baas, H. D. Maynard, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1442–1448.
- [119] J. L. García Ruano, A. Parra, J. Alemán, *Green Chem.* **2008**, *10*, 706–71.
- [120] C. Henríquez, C. Bueno, E. A. Lissi, M. V. Encinas, *Polymer* **2003**, *44*, 5559–5561.
- [121] W. J. Zhang, C. Y. Hong, C. Y. Pan, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 2992–2999.
- [122] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, W. W. Norton & Co., New York, **2002**.
- [123] D. G. Stupack, D. A. Cheresch, *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3729–3738.
- [124] D. Mazia, G. Schatten, W. Sale, *J. Cell Biol.* **1975**, *66*, 198.
- [125] H. Ge, L. Tan, P. Wu, Y. Yin, X. Liu, H. Meng, G. Cui, N. Wu, J. Lin, R. Hu, H. Feng, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–10.
- [126] J. E. Meredith, B. Fazeli, M. A. Schwartz, *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 953–961.
- [127] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288–6308.
- [128] R. Cruz-Acuña, M. Quirós, S. Huang, D. Siuda, J. R. Spence, A. Nusrat, A. J. García, *Nat. Protoc.* **2018**, *13*, 2102–2119.
- [129] S. Q. Liu, R. Tay, M. Khan, P. L. Rachel Ee, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang, *Soft Matter* **2009**, *6*, 67–81.
- [130] C. C. Lin, K. S. Anseth, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 631–643.
- [131] D. MacDonald, R. Breton, R. Sutcliffe, J. Walker, *SAR QSAR Environ. Res.* **2002**, *13*, 43–55.
- [132] S. D. Dimitrov, N. C. Dimitrova, J. D. Walker, G. D. Veith, O. G. Mekenyan, *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 58–68.
- [133] H.-J. Lee, A. Sen, S. Bae, J. S. Lee, K. Webb, *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 43–52.
- [134] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491–497.
- [135] R. B. Merrifield, *Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [136] T. Maeda, K. Hashino, R. Oyama, K. Titani, K. Sekiguchi, *J. Biochem.* **1991**, *110*, 381–387.
- [137] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.

- [138] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443–450.
- [139] A. Michael, *J. für Prakt. Chemie* **1887**, *35*, 349–356.
- [140] K. Kabiri, H. Omidian, M. J. Zohuriaan-Mehr, S. Doroudiani, *Polym. Compos.* **2011**, *32*, 277–289.
- [141] K. Kosemund, H. Schlatter, J. L. Ochsenhirt, E. L. Krause, D. S. Marsman, G. N. Erasala, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *53*, 81–89.
- [142] K. Onuma, N. Kanzaki, N. Kobayashi, *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 39–46.
- [143] K. Onuma, N. Kanzaki, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11799–11804.
- [144] J. D. Ziebarth, Y. Wang, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 29–38.
- [145] S. Temple, *Nature* **2001**, *414*, 112–117.
- [146] P. Liu, S. Griffiths, D. Veljanoski, P. Vaughn-Beaucaire, V. Speirs, A. Brüning-Richardson, *Expert Rev. Mol. Med.* **2021**, *23*, 1–14.
- [147] J. M. Ayuso, M. Virumbrales-Muñoz, A. Lacueva, P. M. Lanuza, E. Checa-Chavarria, P. Botella, E. Fernández, M. Doblare, S. J. Allison, R. M. Phillips, J. Pardo, L. J. Fernandez, I. Ochoa, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–16.
- [148] B. Reig-Vano, B. Tylkowski, X. Montané, M. Giamberini, *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *170*, 424–436.
- [149] D. D. Bigner, S. H. Bigner, J. Ponten, B. Westermarck, M. S. Mahaley, E. Ruoslahti, H. Herschman, L. F. Eng, Wikstrand, C. J., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1981**, *40*, 201–229.
- [150] T. Xia, W. Liu, L. Yang, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *105*, 1799–1812.
- [151] H. Colognato, P. D. Yurchenco, *Dev. Dyn.* **2000**, *218*, 213–234.
- [152] S. P. Giblin, K. S. Midwood, *Cell Adhes. Migr.* **2015**, *9*, 48–82.
- [153] K. S. Midwood, M. Chiquet, R. P. Tucker, G. Orend, *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 4321–4327.
- [154] J. Liang, J. J. Struckhoff, H. Du, P. D. Hamilton, N. Ravi, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 977–988.
- [155] M. Gorman, Y. H. Chim, A. Hart, M. O. Riehle, A. J. Urquhart, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 1809–1815.
- [156] E. A. Phelps, N. O. Enemchukwu, V. F. Fiore, J. C. Sy, N. Murthy, T. A. Sulchek, T. H. Barker, A. J. García, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 64–70.
- [157] M. B. Browning, S. N. Cereceres, P. T. Luong, E. M. Cosgriff-Hernandez, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 4244–4251.
- [158] Y. R. Yun, J. E. Won, E. Jeon, S. Lee, W. Kang, H. Jo, J. H. Jang, U. S. Shin, H. W. Kim, *J. Tissue Eng.* **2010**, *1*, 1–18.
- [159] A. S. Woods, S. C. Moyer, S. N. Jackson, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3423–3427.
- [160] G. Nie, L. Wu, Y. Du, H. Wang, Y. Xu, Z. Ding, Z. Liu, *Chem. Eng. J.* **2019**, *360*, 1128–1136.

- [161] M. Kapałczyńska, T. Kolenda, W. Przybyła, M. Zajączkowska, A. Teresiak, V. Filas, M. Ibbs, R. Bliźniak, Ł. Łuczewski, K. Lamperska, *Arch. Med. Sci.* **2018**, *14*, 910–919.
- [162] S. Dehn, R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, *Polym. Rev.* **2011**, *51*, 214–234.
- [163] A. Das, P. Theato, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1434–1495.
- [164] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540–1573.
- [165] C. N. Salinas, K. S. Anseth, *Macromolecules* **2008**, *41*, 6019–6026.
- [166] Y. Sun, H. Liu, L. Cheng, S. Zhu, C. Cai, T. Yang, L. Yang, P. Ding, *Polym. Int.* **2018**, *67*, 25–31.
- [167] S. Ravi, V. R. Krishnamurthy, J. M. Caves, C. A. Haller, E. L. Chaikof, *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 627–635.
- [168] M. G. Lin`kova, N. D. Kuleshova, I. L. Knunyants, *Russ. Chem. Rev.* **1964**, *33*, 493–507.
- [169] M. B. Finkelstein, M. W. Anders, W. Dekant, A. S. Kende, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9590–9591.
- [170] I. L. Knunyants, N. D. Kuleshova, M. G. Lin`kova, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1965**, *14*, 1043–1045.
- [171] C. M. Stevens, D. S. Tarbell, *J. Org. Chem.* **1954**, *19*, 1996–2003.
- [172] Z. Paryzek, I. Skiera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2007**, *39*, 203–296.
- [173] P. Espeel, F. E. Du Prez, *Eur. Polym. J.* **2015**, *62*, 247–272.
- [174] B. Riegel, V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.* **1935**, *112*, 149–154.
- [175] A. S. Chubarov, *Encyclopedia* **2021**, *1*, 445–459.
- [176] C. G. Overberger, J. K. Weise, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 3533–3537.
- [177] P. Espeel, F. Goethals, M. M. Stamenović, L. Petton, F. E. Du Prez, *Polym. Chem.* **2012**, *3*, 1007–1015.
- [178] S. Reinicke, P. Espeel, M. M. Stamenović, F. E. Du Prez, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 5461–5470.
- [179] J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [180] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Chem. - An Asian J.* **2013**, *8*, 1634–1644.
- [181] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken, *Polymere: Synthese, Eigenschaften Und Anwendung*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, **2014**.
- [182] F. T. Bosman, I. Stamenkovic, *J. Pathol.* **2003**, *200*, 423–428.
- [183] C. I. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Science, New York, **2012**.
- [184] B. Jung, P. Theato, *Adv. Polym. Sci.* **2013**, *253*, 37–70.

- [185] E. M. Pelegri-O'Day, H. D. Maynard, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1777–1785.
- [186] K. L. Heredia, D. Bontempo, T. Ly, J. T. Byers, S. Halstenberg, H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16955–16960.
- [187] J. I. Macdonald, H. K. Munch, T. Moore, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 326–331.
- [188] J. P. Lee, E. Kassianidou, J. I. MacDonald, M. B. Francis, S. Kumar, *Biomaterials* **2016**, *102*, 268–276.
- [189] A. Bianco, P. Passacantilli, G. Righi, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 1765–1771.
- [190] T. Schröder, *Rheologie Der Kunststoffe*, Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG, München, **2018**.
- [191] X. Banquy, F. Suarez, A. Argaw, J.-M. Rabanel, P. Grutter, J.-F. Bouchard, P. Hildgen, S. Giasson, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3984–3991.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungen

(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO, DMSO-d <sub>6</sub>	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
2D	2-dimensional
2PCA	2-Pyridincarboxaldehyd
3D	3-dimensional
4-DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
6-AHX	6-Aminohexansäure
a.	abbaubar
ABEEAA	Amino-bis-ethoxyethylacrylamid
Ac	Acrylat
AEEAc	Aminoethoxyethylacrylat
AEMA	Aminoethylmethacrylat
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
AMor	4-Acryloylmorpholin
APentAc	Aminopentylacrylat
APropAc	Aminopropylacrylat
APS	Ammoniumpersulfat
ATRP	<i>Atom Transfer Radical Polymerization</i>
BAC	Bis(acryloylcystamid)
BMAC	<i>N,N'</i> -Bis(methacryloylcystamid)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
BuA	<i>n</i> -Butylamin
BuAc	Butylacrylat
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriertes Chloroform
CNS	Zentrales Nervensystem
Đ	Dispersität
D <sub>2</sub> O	Deuteriertes Wasser
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
div	<i>Days in vitro</i> , Tage in Kultur
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacrylamid
DMAEA	<i>N,N</i> -Dimethylaminoethylacrylat
DMEDA	<i>N,N</i> -Dimethylendiamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
DVS	Divinylsulfon
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCs	Embryonale Stammzellen
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
EtOAc	Ethylacetat
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FRP	Freie radikalische Polymerisation

---

Gew.-%	Gewichtsprozent
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GPC	Gelpermeationschromatographie
HEMA	Hydroxyethylacrylat
hESCs	Menschliche embryonale Stammzellen
hiPSCs	Menschliche induziert pluripotente Stammzellen
His <sub>6</sub> -Tag	Polyhistidin-Tag
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSAA	Hexansäureacrylamid
HSCs	Hematopoetische Stammzellen
IPA	Isopropanol
iPSCs	Induziert pluripotente Stammzellen
LCST	Untere kritische Lösungstemperatur
LiBr	Lithiumbromid
LR-MS	Niedrigauflösende Massenspektrometrie
M	Übergangsmetall
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MeCN	Acetonitril
MeI	Methyliodid
MeOH	Methanol
mESCs	Maus embryonale Stammzellen
MIC	Maleimidocaprinsäure
MMA	Methylmethacrylat
mol%	Molprozent
MsCl	Mesylchlorid
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
n.a.	Nicht abbaubar
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>Nitroxide Mediated Polymerization</i>
NMR	Kernspinresonanz
NSCs	Neurale Stammzellen
NTA	Nitrilotriessigsäure
O4	Oligodendrozyt Marker O4
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEGDA	Polyethylenglykol Diacrylat
PFP	Pentafluorophenol
PH3	Phosphohiston 3
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNIPAAm	Poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid)
POx	Polyethyloxazolin
ppm	<i>Parts Per Million</i>
RAFT	<i>Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
Rt	Raumtemperatur
SAP	Super absorbierende Polymere
SDS	Natriumlaurylsulfat
TEA	Triethylamin

---

TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TLA	<i>N</i> -Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton
TMAEA	Trimethylaminoethylacrylat
TNB <sup>2-</sup>	2-Nitro-5-thiobenzoat
TNC	Tenascin-C
TosCl	Tosylchlorid
UCST	Obere Kritische Lösungstemperatur
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
vis	<i>Visible</i> , sichtbar
WF	Wachstumsfaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation

## 9.2 Symbole

<i>c</i>	Konzentration
<i>d</i>	Schichtdicke
<i>E</i>	Extinktion
<i>E</i> -Modul	Young-Modul
<i>f</i>	Frequenz
<i>F<sub>A</sub></i>	Kraft auf Fläche
<i>G</i> <sup>*</sup>	Komplexes Modul
<i>G</i> <sup>`</sup>	Speichermodul
<i>G</i> <sup>``</sup>	Verlustmodul
<i>H</i>	Höhe
<i>h</i>	Stunde
<i>h<math>\nu</math></i>	Photonenenergie, Licht
<i>M</i>	molar
<i>M</i> ( <i>t</i> )	Drehmoment in Abhängigkeit der Zeit
<i>M<sub>w</sub></i>	Molekulargewicht
<i>P<sub>i</sub></i>	Anzahl Protonen von <i>i</i>
<i>Q<sub>m</sub></i>	Quellwert
<i>R</i>	Radius
<i>S<sub>i</sub></i>	Signal von <i>i</i>
<i>t</i>	Zeit
<i>T</i>	Temperatur
<i>V</i>	Volumen
<i>x<sub>i</sub></i>	Anteil von <i>i</i>
$\beta$	Massenkonzentration
$\gamma_0$	Amplitude
$\delta$	Phasenverschiebungswinkel
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\eta'$ ( $\omega$ )	Dynamische Viskosität in Abhängigkeit der Kreisfrequenz
$\nu$	Poissonzahl
$\tau$	Schubspannung
$\Omega$	Oszillationsgeschwindigkeit
$\omega$	Kreisfrequenz

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Differenzierung von neuronalen Stammzellen in verschiedene Zelltypen. <sup>[26]</sup> ....	5
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix, ihrer Bestandteile und dessen Wechselwirkung mit der Zellmembran. <sup>[33]</sup> .....	6
<b>Abb. 3:</b> Kultivierungsprozess von Stammzellen zur Verwendung in Zelltherapien. ..	8
<b>Abb. 4:</b> Anzahl der Publikationen im Bereich der Hydrogele ab 1960. Ermittelt über „Web of Science“ mit dem Suchbegriff „Hydrogel“. Stand 28.09.2022. ....	10
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung der Vernetzung von chemischen Hydrogelen anhand des SDS-Page Gels auf Basis von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. ....	13
<b>Abb. 6:</b> Beispiele für bioorthogonale Reaktionen. ....	14
<b>Abb. 7:</b> Präpolymerstrukturen des BMAC-Hydrogelsystems. ....	21
<b>Abb. 8:</b> Mögliche Thiolacton-Polymerstrukturen und Ringöffnung zur Freisetzung der Thiole. Ringöffnung hier gezeigt mit n-Butylamin (BuA). ....	22
<b>Abb. 9:</b> Zur Präpolymerherstellung verwendete Monomere <b>AMor</b> , <b>BMAC</b> und <b>TMAEA</b> . Die für das Polymer relevanten Seitenketten sind entsprechend farblich markiert. ....	23
<b>Abb. 10:</b> Synthese von <b>BMAC</b> mittels einer Schotten-Baumann-Reaktion ausgehend von Cystamin Dihydrochlorid und Methacryloylchlorid. ....	24
<b>Abb. 11:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von <b>BMAC</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	25
<b>Abb. 12:</b> Synthese von <b>TMAEA</b> ausgehend von N,N-Dimethylaminoethylacrylat durch eine Methylierung mit Methyljodid. ....	26
<b>Abb. 13:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von <b>TMAEA</b> in D <sub>2</sub> O. ....	26
<b>Abb. 14:</b> Herstellung des Vernetzers PEGDA-3500 über eine Schotten-Baumann-Reaktion. ....	27
<b>Abb. 15:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl <sub>3</sub> . ....	28
<b>Abb. 16:</b> Schematische Darstellung der Präpolymersynthese. ....	29
<b>Abb. 17:</b> Übersicht der verschiedenen Präpolymerstrukturen. ....	30
<b>Abb. 18:</b> Beispielhaftes <sup>1</sup> H-NMR Spektrum für ein <b>PAMor-co-BMAC-co-TMAEA</b> Copolymer in D <sub>2</sub> O. ....	31
<b>Abb. 19:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines <b>PAMor-co-BMAC-co-MIC-6AHX-YGRGDS</b> Copolymers in D <sub>2</sub> O. ....	32
<b>Abb. 20:</b> Reaktionsschema des Ellman`s Assays. ....	33

- Abb. 21:** Michael-Addition am Beispiel der Vernetzungsreaktion eines Präpolymers mit PEGDA. .... 36
- Abb. 22:** Beispielhafte zeitabhängige Oszillationsmessung des unfunktionalisierten Gels **G1**, vollständig gequollen in PBS-Puffer, bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Deformation von 1 %. Das Experiment wurde in dreifach Bestimmung durchgeführt (gekennzeichnet durch die Farben Blau, Gelb und Grau). Dargestellt sind die Messdaten für das Speichermodul  $G'$  (Kreis) und Verlustmodul  $G''$  (Dreieck). ..... 38
- Abb. 23:** REM-Aufnahmen eines getrocknete kationischen 18 Gew.-% Hydrogels bei einer 130-fachen (A) und 2000-fachen (B) Vergrößerung. Bild A zeigt eine Übersicht der Poren bei einem Maßstab von 100  $\mu\text{m}$  und Bild B eine Nahaufnahme der Poren bei einem Maßstab von 7  $\mu\text{m}$ . .... 41
- Abb. 24:** Phasenkontrastaufnahmen von NSCs kultiviert auf **G1 - G4** (A-D) nach 7 div, sowie Fluoreszenzfärbung von NSCs kultiviert auf Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin als Kontrolle (E). (A) zeigt die NSCs auf einem RGD-funktionalisierten Hydrogel (**G3**), (B) auf einem kationischen Hydrogel (**G2**), (C) auf einem kombinierten Hydrogel mit kationischen Gruppen und dem RGD-Peptid (**G4**) und (D) auf einem unfunktionalisiertem Hydrogel als negativ Kontrolle (**G1**). Die Fluoreszenzfärbung der Kontrolle wurde mit Hoechst (Zellkern), GFAP (Astrozyten) und  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) durchgeführt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ . .... 42
- Abb. 25:** Fluoreszenzfärbung von U251-MG Zellen auf einem Hydrogel mit einem RGD-Peptid (**G3**, A/A'), einem kationischen Gel (**G2**, B/B'), einem kombinierten Gel mit kationischen Gruppen und RGD-Peptid (**G4**, C/C') und einem Gel ohne weitere Funktion (**G1**, D/D'). Als Kontrolle wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale verwendet (E/E'). Als Zeitpunkte der Evaluation wurden 3 div (A-E) und 7 div (A'-E') gewählt. Die Fluoreszenzfärbung wurde mit Hoechst (Nukleus), GFAP (Astrozyten) und Vimentin (Intermediärfilamente) durchgeführt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu\text{m}$ . .... 45
- Abb. 26:** Statistische Auswertung der Hoechst-positiven Zellen auf den verschiedenen Hydrogelen G1-G4 nach 3 und 7 div. .... 46
- Abb. 27:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen Hydrogelen mit unterschiedlichen Steifigkeiten. Die Bilder A und A' zeigen ein Hydrogel mit 2 kPa Steifigkeit nach 3 und 7 div und die Bilder B und B' zeigen ein Hydrogel mit 3 kPa Steifigkeit nach 3 und 7 div. Die Färbung wurde mit Hoechst (Nukleus), Phalloidin

(Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Phalloidin und Vinculin positiven Zellen ist in C und die statistische Auswertung der Hoechst positiven Zellen in D dargestellt. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm..... 47

**Abb. 28:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen (TMAEA, A-C) und unfunktionalisierten Gelen (unfkt., D-F) nach 3 (A-F) und 7 (A'-F') Tagen. Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (LN) (B/E) und Tenascin-C (TNC) (C/F) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Als Referenz wurden Hydrogele ohne Proteinzugabe verwendet (-) (A/D). Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm..... 50

**Abb. 29:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzmarker Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen in Kombination mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und ohne Proteine (-) nach 3 und 7 div. .... 52

**Abb. 30:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf kationischen Hydrogelen (A-F) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (G-L) nach 3 (A-L) und 7 div (A'-L'). Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (LN) (C/D/I/J) und Tenascin-C (TNC) (E/F/K/L) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Weiterhin wurde eine Kombination aus Proteinen und den Wachstumsfaktoren FGF (A/C/F/G/I/K) (20 ng/mL) untersucht. Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. .... 54

**Abb. 31:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A-F) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (G-L) nach 3 (A-L) und 7 div (A'-L'). Zusätzlich wurden die Proteine Laminin (C/D/I/J) und Tenascin-C (TNC) (E/F/K/L) zur initialen Zelllösung in einer Konzentration von 5 µg/mL hinzugegeben. Weiterhin wurde eine Kombination aus Proteinen und den Wachstumsfaktoren FGF (A/C/F/G/I/K) (20 ng/mL) untersucht. Zur Untersuchung der Zellen wurden die Marker Hoechst (Nukleus), Phalloidin (Zytoskelett) und Vinculin (fokale Adhäsion) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. .... 55

<b>Abb. 32:</b> Statistische Auswertung der Phalloidin- und Vinculin-Marker der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und in Kombination mit den Wachstumsfaktoren FGF nach 3 und 7 div.....	56
<b>Abb. 33:</b> Statistische Auswertung des Hoechst-Markers der NSCs auf kationischen und unfunktionalisierten Gelen mit den Proteinen Laminin (LN), Tenascin-C (TNC) und in Kombination mit den Wachstumsfaktoren FGF nach 3 und 7 div.....	57
<b>Abb. 34:</b> Monomerstrukturen der primären Amine als Alternative zu <b>TMAEA</b> .....	58
<b>Abb. 35:</b> Schützung der Amine mit einer Boc-Schutzgruppe am Beispiel von 3-Aminopropanol.....	58
<b>Abb. 36:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Gruppen (A-D) und Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (E) nach 3 (A-E) und 7 div (A`-E`). Zur Untersuchung der Zellviabilität wurden die Marker Calcein-AM (lebende Zellen) und Ethidium Homodimer-1 (tote Zellen) verwendet. Statistische Auszählung der Marker-positiven Zellen nach 3 und 7 div (F/F`). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. ....	61
<b>Abb. 37:</b> Strukturen der polymeren Vernetzer mit unterschiedlichen Monomereinheiten, Endgruppen und Längen. ....	63
<b>Abb. 38:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit den Vernetzern PEGDA-575 (A), PEGDA-3500 (B), PEG-1000 (C), PEG-3400 (D), POx-Amin (E), POx-DVS (F, abbaubar (a.)) und POx-Ac (G, nicht abbaubar (n.a.)) und zusätzlich in Kombination mit Laminin (I-O) nach 3 (A-O) und 7 div (A`-O`). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (H/H`). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.....	64
<b>Abb. 39:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert mit dialysiertem (B/E) und nicht dialysiertem PEGDA-3500 (A/D) zusätzlich in Kombination mit Laminin (D-F) nach 3 (A-F) und 7 div (A`-F`). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (C/F). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm.....	68
<b>Abb. 40:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf dialysierten kationischen (A) und unfunktionalisierten (B) Hydrogelen in Kombination mit dem	

- Wachstumsfaktor FGF (D/E) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (C/F). Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. .... 69
- Abb. 41:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten, kationischen und unfunktionalisierten Gelen (A/A'), sowie in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF (B/B'). .... 71
- Abb. 42:** Rheologisches Verhalten von kationischen (blaue Kurve) und unfunktionalisierten Hydrogelen (orange Kurve) bei Wechsel des Mediums zwischen Wasser (blauer Hintergrund) und PBS-Puffer (grüner Hintergrund) über sechs Zyklen (5 Tage). .... 76
- Abb. 43:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. Die statistische Auswertung des Zellviabilitätsassays wurde über drei Versuche nach 3 (H) und 7 div (I) durchgeführt. .... 79
- Abb. 44:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. .... 81
- Abb. 45:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F) und 7 div (A'-F'). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. Die statistische

Auswertung des Zellviabilitätsassays wurde über drei Versuche nach 3 (H) und 7 div (I) durchgeführt. .... 83

**Abb. 46:** Fluoreszenzaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion), Phalloidin (Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm..... 85

**Abb. 47:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'). Die Zellviabilität wurde mit Calcein-AM (grün, lebende Zellen) und EthD-1 (rot, tote Zellen) untersucht. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm. .... 87

**Abb. 48:** Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm<sup>2</sup> auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF nach 3 (B) und 7 div (B') verwendet. Die statistische Auswertung wurde über Dreifachbestimmungen durchgeführt. .... 89

**Abb. 49:** Überlebensfähigkeit von NSCs auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF verwendet. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM (grün) und tote Zellen mit EthD-1 (rot) markiert. .... 90

**Abb. 50:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Zusätzlich wurden die Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-G', A'''-G'''). Als Differenzierungsmarker wurden GFAP (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 µm..... 92

- Abb. 51:** Statistische Auswertung der Marker positiven NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlicher kationischer Konzentration. Als Kontrolle wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Als Differenzierungsmarker wurden GFAP (Astrozyten),  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) und O4 (Oligodendrozyten) verwendet. Nicht differenzierte Zellen, welche nicht durch die Marker angefärbt wurden, werden als andere Zellen beschrieben. Die statistische Auswertung fand über drei Versuche statt. .... 95
- Abb. 52:** Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen (A-E) und unfunktionalisierten Hydrogelen (F) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (G/G'/G''/G'''). Zusätzlich wurden die Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-G', A'''-G'''). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100  $\mu$ m..... 97
- Abb. 53:** Statistische Auswertung der Marker positiven NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlicher kationischer Konzentration und unfunktionalisierten Hydrogelen. Als Kontrolle wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen verwendet. Als Differenzierungsmarker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Nicht differenzierte Zellen, welche nicht durch die Marker angefärbt wurden, werden als andere Zellen beschrieben. Die statistische Auswertung fand über drei Versuche statt. .... 98
- Abb. 54:** Fluoreszenzaufnahmen von Kryoschnitten mit U251-MG Zellen kultiviert in 3D-Hydrogelen mit der kationischen Gruppe TMAEA (A/E/I), auf unfunktionalisierten Hydrogelen (B/F/J), mit dem Peptid RGD (C/G/K) und mit einem kombinierten Gel aus TMAEA und RGD nach 3 (A-D, A'-D'), 8 div (E-H, E'-H') und 42 div (I-L, I'-L'). Als Tumormarker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (vim, Zytoskelett), Vinculin (vinc, fokale Adhäsion), Phalloidin (Phall, Zytoskelett) und Hoechst (Nukleus) verwendet. Der Maßstab beträgt 100  $\mu$ m..... 100
- Abb. 55:** Beispiele einiger Thiolactone mit unterschiedlichen Ringgrößen..... 108
- Abb. 56:** Herstellung eines Thiolactons am Beispiel von Homocystein-Thiolacton.<sup>[174]</sup>..... 108

<b>Abb. 57:</b> Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten Trithiocarbonat-RAFT-Reagenzes (2-Cyano-2-propyldodecyltrithiocarbonat, 2C12) und eines Dithiocarbonat-RAFT-Reagenzes (5-Rhodixan A1). .....	110
<b>Abb. 58:</b> Zerfall des Initiators am Beispiel AIBN durch Thermolyse und Ausbildung zweier Radikale. ....	110
<b>Abb. 59:</b> Mechanismus der Polymerradikal Bildung und des Vorgleichgewichts..	110
<b>Abb. 60:</b> Reinitiation der RAFT-Polymerisation durch das neugebildete Radikal R. ....	111
<b>Abb. 61:</b> Hauptgleichgewicht der RAFT-Polymerisation durch Reaktion eines Polymerradikals mit der MakroRAFT-Spezies. ....	111
<b>Abb. 62:</b> Synthese des N-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolactons (TLA) über eine Schotten-Baumann-Reaktion. ....	111
<b>Abb. 63:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von N-Acryloylhomocystein- $\gamma$ -thiolacton in DMSO- $d_6$ . ....	112
<b>Abb. 64:</b> Ausschnitt des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums eines PDMA-co-TLA Copolymers mit 20 mol% TLA in $\text{CDCl}_3$ . ....	113
<b>Abb. 65:</b> Öffnung des Thiolacton-Rings durch n-Butylamin. ....	115
<b>Abb. 66:</b> Ausschnitt eines $^1\text{H-NMR}$ Spektrums eines mit n-Butylamin geöffneten 20 mol% TLA-Polymers in $\text{CDCl}_3$ . ....	116
<b>Abb. 67:</b> Strukturen der für die Ringöffnung verwendeten Amine. ....	118
<b>Abb. 68:</b> Funktionalisierung der Thiole des Polymers mit Butylacrylat. ....	118
<b>Abb. 69:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Mal-GGRGDSF funktionalisierten 20 mol% TLA-Präpolymers in $\text{D}_2\text{O}$ . ....	121
<b>Abb. 70:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Mal-GVSWRAPTA funktionalisierten 20 mol% TLA-Präpolymers in $\text{D}_2\text{O}$ . ....	121
<b>Abb. 71:</b> Ausschnitt eines $^1\text{H-NMR}$ Spektrums von PDMA-co-TMAEA-co-TLA in $\text{D}_2\text{O}$ . ....	123
<b>Abb. 72:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA- (A/C/E) nach 3 (A-F, A'-F') und 7 div (A''-F'', A'''-F'''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (B/D, F-B'', D'''/F'''). Zusätzlich wurden die NSCs in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A'-F', A'''-F'''). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) für die Überlebensfähigkeit verwendet. Zur Untersuchung der Differenzierung wurden $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten), Nestin	

(Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) als Marker verwendet. Der Maßstab der Aufnahmen beträgt 100 $\mu\text{m}$ . .....	127
<b>Abb. 73:</b> Mechanismus der Reaktion des 2PCA-Motivs mit dem N-Terminus eines Peptids. ....	132
<b>Abb. 74:</b> Synthese des NTA-Monomers über eine Schotten-Baumann-Reaktion. .	133
<b>Abb. 75:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-NHSAc Polymers in $\text{CDCl}_3$ . ....	134
<b>Abb. 76:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum nach erfolgter Kupplung des NTA-Liganden an das Polymer in $\text{D}_2\text{O}$ . ....	135
<b>Abb. 77:</b> Synthesepfung des 2PCA-Acrylamid-Monomers.....	136
<b>Abb. 78:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des 2PCA-Alkohols in $\text{CDCl}_3$ . ....	136
<b>Abb. 79:</b> Synthese von 2PCA-Ms.....	137
<b>Abb. 80:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 2PCA-Ms in $\text{CDCl}_3$ . ....	137
<b>Abb. 81:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Boc-Piperazins in $\text{CDCl}_3$ . ....	138
<b>Abb. 82:</b> Synthese des 2PCA-Acrylats über eine Schotten-Baumann-Reaktion.....	139
<b>Abb. 83:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie des 2PCA-Acrylats in $\text{CDCl}_3$ . ....	139
<b>Abb. 84:</b> Synthesepfung eines 2PCA-NHS-Aktivester-Motivs. ....	140
<b>Abb. 85:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridine-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ . ....	141
<b>Abb. 86:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ . ....	142
<b>Abb. 87:</b> Synthese von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure. ....	142
<b>Abb. 88:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in $\text{DMSO-d}_6$ . ..	143
<b>Abb. 89:</b> Synthese des 2PCA-NHS-Aktivesters über eine DCC-Kupplung. ....	143
<b>Abb. 90:</b> Synthese von Hexansäureacrylamid über die Schotten-Baumann-Reaktion. ....	144
<b>Abb. 91:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Hexansäureacrylamid in $\text{D}_2\text{O}$ . ....	144
<b>Abb. 92:</b> $^1\text{H-NMR}$ Spektrum eines PAMor-co-HSAA Copolymers <b>P11</b> in $\text{CDCl}_3$ . ....	145
<b>Abb. 93:</b> Präpolymerstrukturen zur Herstellung modifizierter Hydrogele.....	148
<b>Abb. 94:</b> Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro $1 \text{ mm}^2$ auf dialysierten kationischen und unfunktionalisierten Hydrogelen (A/A') und in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF (B/B'). ....	150

<b>Abb. 95:</b> Statistische Auswertung der Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) Marker positiven NSCs pro 1 mm <sup>2</sup> auf dialysierten Hydrogelen mit unterschiedlichen kationischen Konzentrationen und unfunktionalisierten Hydrogelen nach 3 (A) und 7 div (A'). Zusätzlich wurden Hydrogele in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF nach 3 (B) und 7 div (B') verwendet. Die statistische Auswertung wurde über Dreifachbestimmungen durchgeführt. ....	152
<b>Abb. 96:</b> Fluoreszenzaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA- (A) nach 3 (A) und 7 div (A''). Als Kontrolle wurden Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin verwendet (B, B''). Zusätzlich wurden die NSCs in Kombination mit dem Wachstumsfaktor FGF kultiviert (A', B', A'', B''). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) für die Überlebensfähigkeit verwendet. ....	154
<b>Abb. 97:</b> Darstellung eines Platte-Platte Systems in einem Oszillationsrheometer mit $H$ = Messspalthöhe, $R$ = Radius der Platte, $F_A$ = Kraft auf der Fläche der Probe, $\Omega$ = Oszillationsgeschwindigkeit. Der variable Abstand und Radius der Probe wird durch $h$ und $r$ gekennzeichnet. <sup>[190]</sup> .....	157
<b>Abb. 98:</b> Schematische Darstellung des Hooke-, Newton- und Kelvin-Voigt-Elements mit Federn und Dämpfern. <sup>[190]</sup> .....	158
<b>Abb. 99:</b> Darstellung des Zeigermodells zur Erläuterung der Abhängigkeit des Verlust- und Speichermoduls von dem komplexen Modul $G^*$ . <sup>[190]</sup> .....	159
<b>Abb. A 1:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von BMAC in CDCl <sub>3</sub> .....	220
<b>Abb. A 2:</b> <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von BMAC in CDCl <sub>3</sub> . ....	220
<b>Abb. A 3:</b> LR-MS Spektrum von BMAC.....	220
<b>Abb. A 4:</b> HR-MS Spektrum von BMAC. ....	221
<b>Abb. A 5:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von TMAEA in D <sub>2</sub> O.....	221
<b>Abb. A 6:</b> <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von TMAEA in D <sub>2</sub> O.....	222
<b>Abb. A 7:</b> LR-MS Spektrum von TMAEA. ....	222
<b>Abb. A 8:</b> HR-MS Spektrum von TMAEA.....	222
<b>Abb. A 9:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl <sub>3</sub> .....	223
<b>Abb. A 10:</b> <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl <sub>3</sub> .....	223
<b>Abb. A 11:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum von Boc-Aminopropanol in CDCl <sub>3</sub> . ....	223
<b>Abb. A 12:</b> <sup>13</sup> C-NMR Spektrum von Boc-Aminopropanol in CDCl <sub>3</sub> . ....	224

---

<b>Abb. A 13:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Boc-Aminopropylacrylat in $\text{CDCl}_3$ . .....	224
<b>Abb. A 14:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Boc-Aminopropylacrylat in $\text{CDCl}_3$ . .....	224
<b>Abb. A 15:</b> LR-MS Spektrum von Boc-Aminopropylacrylat. ....	225
<b>Abb. A 16:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Boc-Aminopentanol in $\text{CDCl}_3$ . .....	225
<b>Abb. A 17:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Aminopentylacrylat in $\text{CDCl}_3$ . ....	226
<b>Abb. A 18:</b> LR-MS Spektrum von Aminopentylacrylat. ....	226
<b>Abb. A 19:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat in $\text{CDCl}_3$ . .....	226
<b>Abb. A 20:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat in $\text{CDCl}_3$ . .....	227
<b>Abb. A 21:</b> LR-MS Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat. ....	227
<b>Abb. A 22:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Boc geschützten 2,2'-(Ethylen dioxy)bis(ethylamin) in $\text{CDCl}_3$ . ....	227
<b>Abb. A 23:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von N-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton in DMSO- $d_6$ . ....	228
<b>Abb. A 24:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von N-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton in $\text{CDCl}_3$ . .....	228
<b>Abb. A 25:</b> HR-MS Spektrum von N-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton. ....	229
<b>Abb. A 26:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin in $\text{CDCl}_3$ . .....	229
<b>Abb. A 27:</b> LR-MS Spektrum von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin. ....	229
<b>Abb. A 28:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von (6-formylpyridin-2-yl)methyl methansulfonat in $\text{CDCl}_3$ . ....	230
<b>Abb. A 29:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Boc-Piperazin in $\text{CDCl}_3$ . ....	230
<b>Abb. A 30:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des 2PCA-Acrylats in $\text{CDCl}_3$ . ....	231
<b>Abb. A 31:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ . ....	231
<b>Abb. A 32:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ . ....	232
<b>Abb. A 33:</b> LR-MS Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat. .....	232
<b>Abb. A 34:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ . .....	232

<b>Abb. A 35:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in $\text{CDCl}_3$ .	233
<b>Abb. A 36:</b> LR-MS Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat.	233
<b>Abb. A 37:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in $\text{DMSO-d}_6$ .	233
<b>Abb. A 38:</b> $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in $\text{DMSO-d}_6$ .	234
<b>Abb. A 39:</b> LR-MS Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure.	234
<b>Abb. A 40:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Hexansäureacrylamid in $\text{D}_2\text{O}$ .	234
<b>Abb. A 41:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC Präpolymers <b>P1</b> in $\text{CDCl}_3$ .	235
<b>Abb. A 42:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-TMAEA Präpolymers <b>P2</b> in $\text{D}_2\text{O}$ .	235
<b>Abb. A 43:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-MIC-6AHX-YGRGDS Präpolymers <b>P3</b> in $\text{D}_2\text{O}$ .	235
<b>Abb. A 44:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-AEMA Präpolymers <b>P4</b> in $\text{D}_2\text{O}$ .	236
<b>Abb. A 45:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-APropAc Präpolymers <b>P5</b> in $\text{CDCl}_3$ .	236
<b>Abb. A 46:</b> Beispielhaftes $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-AEEAc Präpolymers <b>P6</b> in $\text{CDCl}_3$ .	237
<b>Abb. A 47:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines zweiarmigen PEtOx Polymers mit Ethylendiamin Endgruppe in $\text{CDCl}_3$ .	237
<b>Abb. A 48:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines dreiarmigen PEtOx Polymers mit Ethylendiamin Endgruppe in $\text{CDCl}_3$ .	238
<b>Abb. A 49:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 20 mol% TLA in $\text{CDCl}_3$ .	238
<b>Abb. A 50:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 10 mol% TLA in $\text{CDCl}_3$ .	239
<b>Abb. A 51:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 30 mol% TLA in $\text{CDCl}_3$ .	239
<b>Abb. A 52:</b> $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PDMA-co-TLA-co-TMAEA Polymers mit 10 mol% TLA und 30 mol% TMAEA in $\text{D}_2\text{O}$ .	240

<b>Abb. A 53:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines mit Butylamin geöffneten 20 mol% TLA Polymers in CDCl <sub>3</sub> .....	240
<b>Abb. A 54:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines mit Butylacrylat funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in D <sub>2</sub> O. ....	241
<b>Abb. A 55:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines mit HEMA funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in D <sub>2</sub> O.....	241
<b>Abb. A 56:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines mit Mal-GGRGDSF funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in D <sub>2</sub> O. ....	242
<b>Abb. A 57:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines mit Mal-GVSWRAPTA funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in D <sub>2</sub> O. ....	242
<b>Abb. A 58:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines NHS-haltigen BMAC-Polymers in CDCl <sub>3</sub> ..	243
<b>Abb. A 59:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines NTA-haltigen BMAC-Polymers in CDCl <sub>3</sub> ..	243
<b>Abb. A 60:</b> <sup>1</sup> H-NMR Spektrum eines PAMor-co-HSAA Polymers in CDCl <sub>3</sub> .....	244
<b>Abb. A 61:</b> Großaufnahmen der NSCs kultiviert auf <b>G1-G4</b> (A-D) nach 7 div, sowie Fluoreszenzfärbung von NSCs kultiviert auf Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin als Kontrolle (E). (A) zeigt hierbei die NSCs auf einem RGD-funktionalisierten Hydrogel ( <b>G3</b> ), (B) auf einem kationischen Hydrogel ( <b>G2</b> ), (C) auf einem kombinierten Hydrogel mit kationischen Funktionalitäten und dem RGD-Peptid ( <b>G4</b> ) und (D) auf einem unfunktionalisiertem Hydrogel ( <b>G1</b> ). Die Fluoreszenzfärbung der Kontrolle wurde mit Hoechst (Zellkern), GFAP (Astrozyten) und $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) durchgeführt. ....	245
<b>Abb. A 62:</b> Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit RGD (A, A'), TMAEA (B, B') und TMAEA in Kombination mit RGD (C, C') für 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Intermediärfilamente) und Hoechst (Nukleus) verwendet. ....	246
<b>Abb. A 63:</b> Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, A') und einer mit Polyornithin beschichteten Zellkulturschale (B, B') für 3 (A-B) und 7 div (A'-B'). Als Marker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Intermediärfilamente) und Hoechst (Nukleus) verwendet. ....	247
<b>Abb. A 64:</b> Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit einer Steifigkeit von 2 kPa (A, A') und 3 kPa (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. ....	247

- Abb. A 65:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen (A, A'), in Kombination mit Laminin (B, B') und in Kombination mit TNC (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 248
- Abb. A 66:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, A'), in Kombination mit Laminin (B, B') und in Kombination mit TNC (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 249
- Abb. A 67:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen in Kombination mit FGF (A, A'), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin und FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 250
- Abb. A 68:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 251
- Abb. A 69:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit FGF (A, A'), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 252
- Abb. A 70:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 253
- Abb. A 71:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen in Kombination mit FGF (A), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (B', C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 254
- Abb. A 72:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und

- 7 div (A`-C`). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 255
- Abb. A 73:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen hydrophilen Monomeren nach 3 (A-C) und 7 div (A`-C`). Es wurde TMAEA (A, A`), AEMA (B, B`) und APropAc (C, C`) als hydrophiles Monomer verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 256
- Abb. A 74:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit AEEAc (A, A`) als hydrophile Komponente und auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (B, B`) nach 3 (A, B) und 7 div (A`, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 257
- Abb. A 75:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-575 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 257
- Abb. A 76:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-3500 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 258
- Abb. A 77:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEG-1000 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 258
- Abb. A 78:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEG-3400 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 259
- Abb. A 79:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-Amin (A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 259
- Abb. A 80:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-DVS (abbaubar, A, B) und in Kombination mit Laminin (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div

(B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 260

**Abb. A 81:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-Ac (nicht abbaubar, A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B'), sowie Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen (C, C') nach 3 (A, A', C) und 7 div (B, B', C'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 261

**Abb. A 82:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-3500(A-C) und in Kombination mit Laminin (A'-C') nach 3 (A, A' C) und 7 div (B, B', C'). Für C und C' wurde der dialysierte PEGDA-3500 Vernetzer verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 262

**Abb. A 83:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem dialysierten Vernetzer PEGDA-3500(A, A') nach 7 div und auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (B, C), sowie in Kombination mit Laminin (B', C') nach 3 (B, B') und 7 div (C, C'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 263

**Abb. A 84:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf dialysierten Hydrogelen nach 3 und 7 div. Es wurde ein kationisches Hydrogel (A, B), sowie in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B') verwendet. Zusätzlich wurde ein unfunktionalisiertes Hydrogel (C), sowie in Kombination mit FGF (C') nach 3 div betrachtet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 264

**Abb. A 85:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf einem dialysierten, unfunktionalisierten Hydrogel (A), sowie in Kombination mit FGF (A') nach 7 div. Zusätzlich wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale (B, C), sowie in Kombination mit FGF (B', C') nach 3 (B, B') und 7 div (C, C') betrachtet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 265

**Abb. A 86:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, A') und 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 266

- Abb. A 87:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, A') und 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 266
- Abb. A 88:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, A') und einem unfunktionalisierten Hydrogel (B, B') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Zusätzlich wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen (C, C') verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 267
- Abb. A 89:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 268
- Abb. A 90:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 268
- Abb. A 91:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 269
- Abb. A 92:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 269
- Abb. A 93:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 270
- Abb. A 94:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). .... 270

- Abb. A 95:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 271
- Abb. A 96:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, A') und 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 271
- Abb. A 97:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, A') und 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 272
- Abb. A 98:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, A') und auf einem unfunktionalisierten Hydrogel (B, B') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Zusätzlich wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale (C, C') verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 273
- Abb. A 99:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 274
- Abb. A 100:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 274
- Abb. A 101:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 275
- Abb. A 102:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 275

- Abb. A 103:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B')..... 276
- Abb. A 104:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten unfunktionalisierten Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 276
- Abb. A 105:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). ..... 277
- Abb. A 106:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 277
- Abb. A 107:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 278
- Abb. A 108:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 278
- Abb. A 109:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 279
- Abb. A 110:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 279
- Abb. A 111:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div

(B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet. .... 280

**Abb. A 112:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet..... 280

**Abb. A 113:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .. 281

**Abb. A 114:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .. 281

**Abb. A 115:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .. 282

**Abb. A 116:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .. 282

**Abb. A 117:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .. 283

**Abb. A 118:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 283

**Abb. A 119:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 284

- Abb. A 120:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 284
- Abb. A 121:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 285
- Abb. A 122:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 285
- Abb. A 123:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 286
- Abb. A 124:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 286
- Abb. A 125:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet. .... 287
- Abb. A 126:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet..... 287
- Abb. A 127:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit der kationischen Funktionalität TMAEA mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A'-C') nach 3 (A, A'), 8 (B, B') und 42 div (C, C'). .... 288
- Abb. A 128:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in unfunktionalisierten 3D Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer

---

Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A`-C`) nach 3 (A, A`), 8 (B, B`) und 42 div (C, C`).	289
<b>Abb. A 129:</b> Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit dem RGD-Motiv mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A`-C`) nach 3 (A, A`), 8 (B, B`) und 42 div (C, C`).	290
<b>Abb. A 130:</b> Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit der kationischen Funktionalität TMAEA und dem RGD-Motiv mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A`-C`) nach 3 (A, A`), 8 (B, B`) und 42 div (C, C`).	291
<b>Abb. A 131:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.	292
<b>Abb. A 132:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.	292
<b>Abb. A 133:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.	293
<b>Abb. A 134:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`) aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.	293
<b>Abb. A 135:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`) aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.	294
<b>Abb. A 136:</b> Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A`, B`) nach 3 (A, A`) und 7 div (B, B`) aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.	294

---

## 9.4 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit verwendeten Präpolymere. ....	35
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die Materialeigenschaften der Gele <b>G1-3</b> .....	40
<b>Tabelle 3:</b> Daten der aminhaltigen Polymere. ....	59
<b>Tabelle 4:</b> Daten der in PBS-Puffer gequollenen Hydrogele. ....	72
<b>Tabelle 5:</b> Daten der in Milli-Q® Wasser gequollenen Hydrogele.....	74
<b>Tabelle 6:</b> Rheologische Daten des kationischen und unfunktionalisierten Hydrogels bei einem Wechsel des Mediums über 5 Tage. ....	77
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der analytischen Daten der TLA Präpolymere mit verschiedenen Mengen an TLA. ....	117
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht der untersuchten TLA-Hydrogele und deren rheologischen Eigenschaften. ....	124
<b>Tabelle 9:</b> Einwaagen zur Synthese der Polymere P1-P6. ....	173
<b>Tabelle 10:</b> Einwaagen zur Synthese der Polymere P7-P10. ....	176

## 9.5 Spektren und weitere Abbildungen

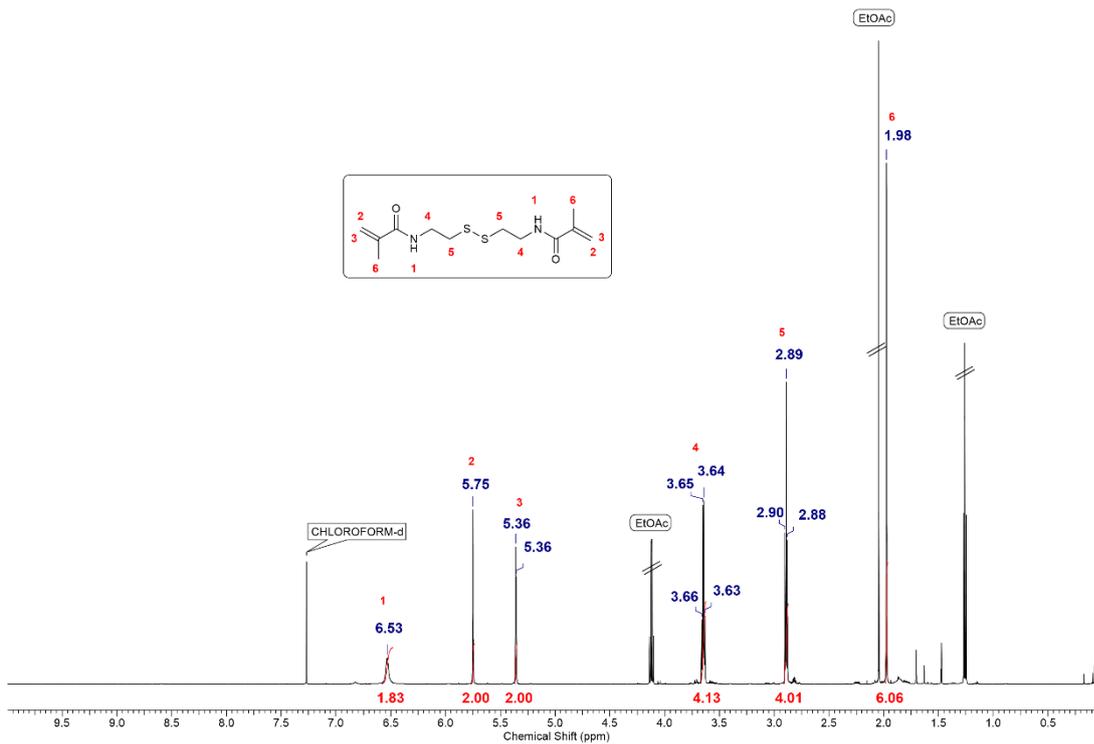


Abb. A 1: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von BMAC in CDCl<sub>3</sub>.

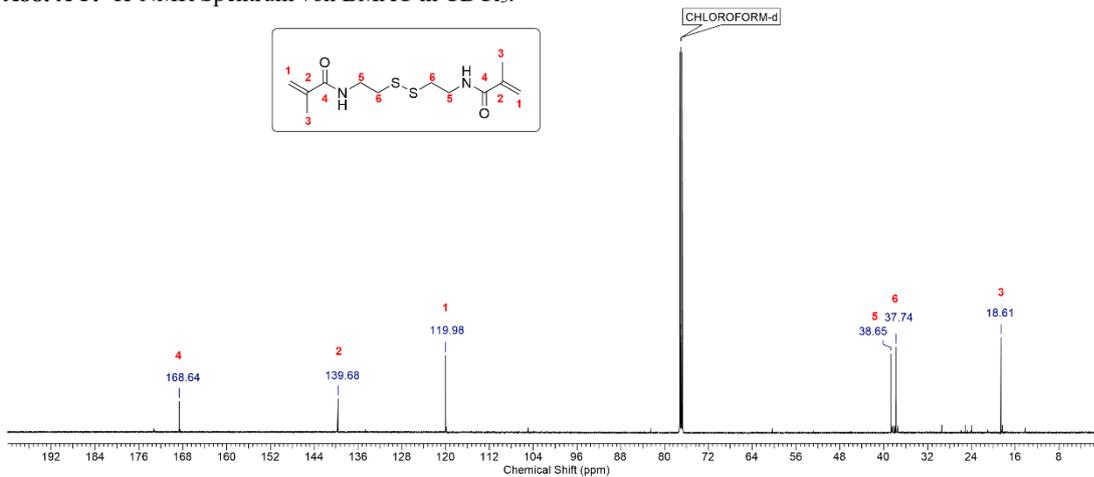


Abb. A 2: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von BMAC in CDCl<sub>3</sub>.

Peak #1 - 0.106 - QDa 1: MS Scan

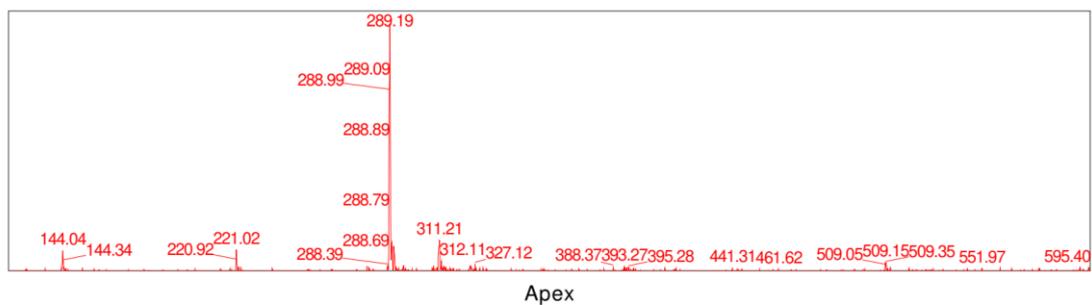


Abb. A 3: LR-MS Spektrum von BMAC.

NS-CA-03 #16-42 RT: 0.19-0.51 AV: 27 NL: 1.77E7  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

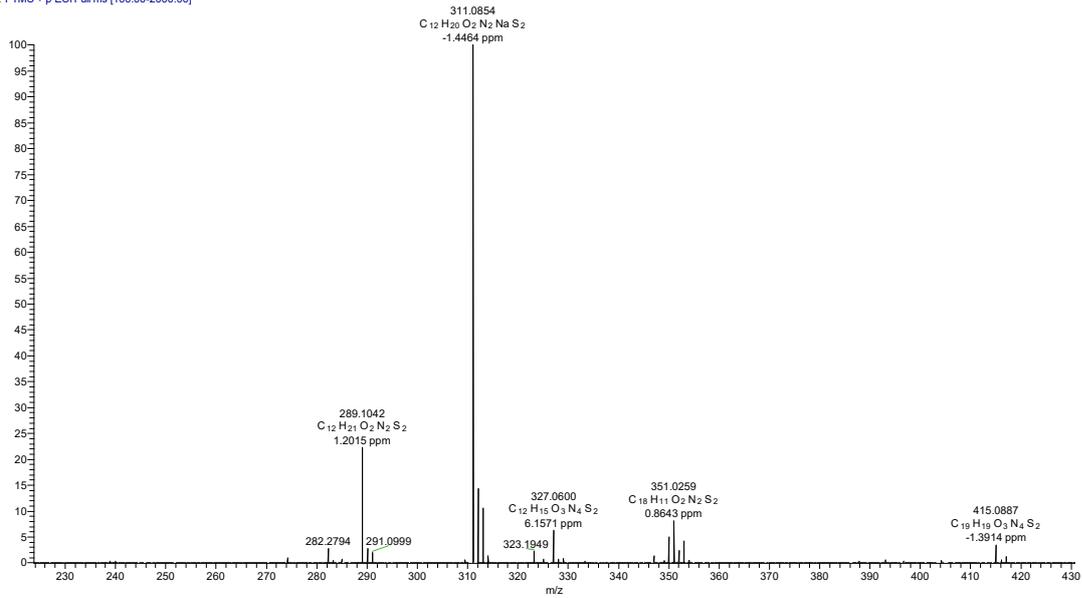


Abb. A 4: HR-MS Spektrum von BMAC.

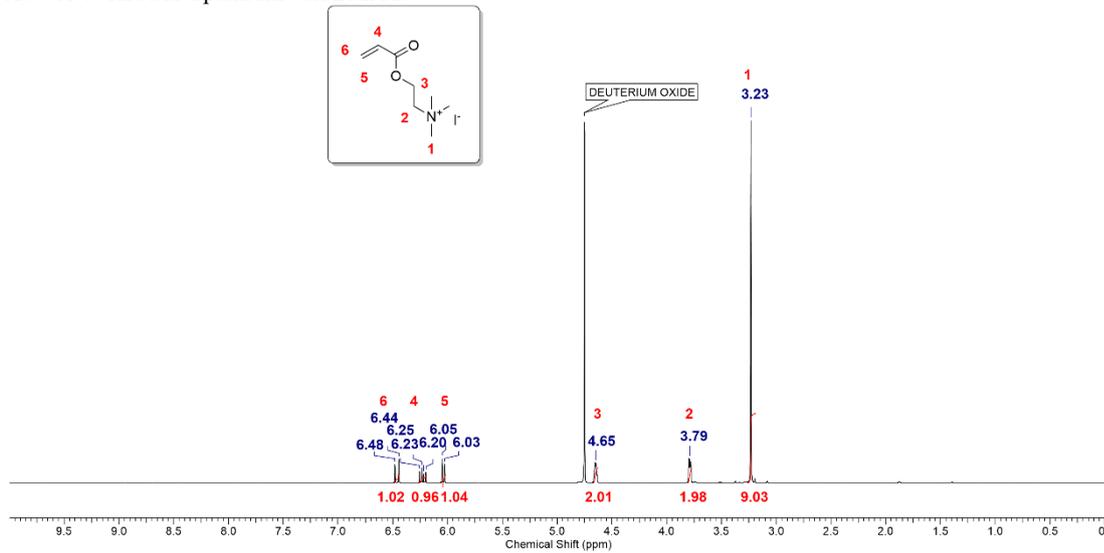
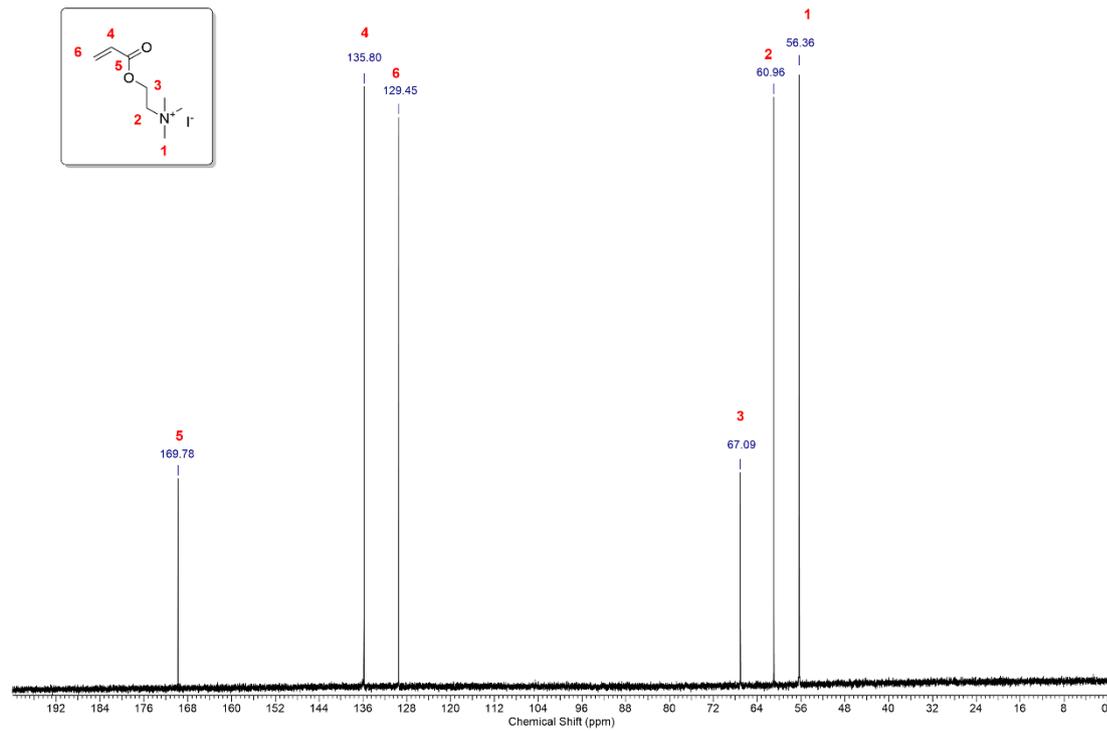
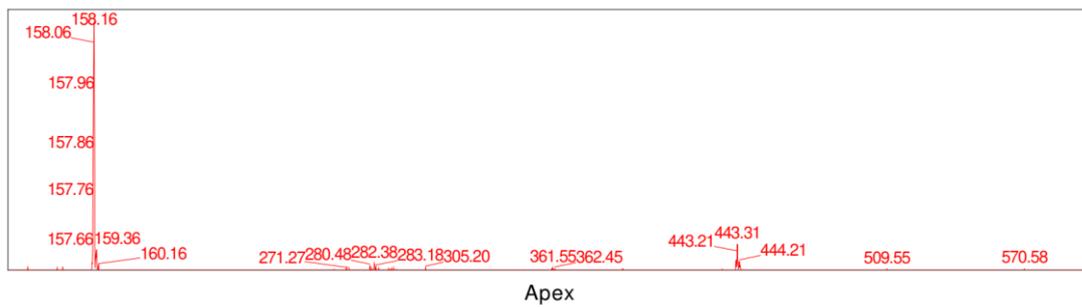


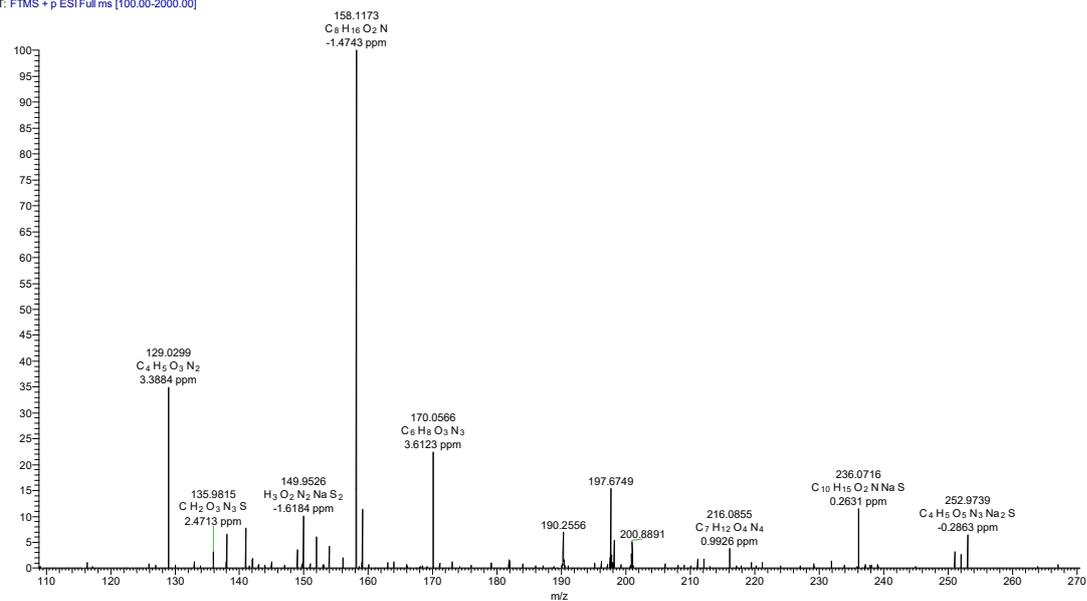
Abb. A 5:  $^1H$ -NMR Spektrum von TMAEA in  $D_2O$ .



**Abb. A 6:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von TMAEA in  $\text{D}_2\text{O}$ .  
Peak #1 - 0.105 - QDa 1: MS Scan



**Abb. A 7:** LR-MS Spektrum von TMAEA.  
NS-CA-06 #21-22 RT: 0.23-0.24 AV: 2 NL: 1.52E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



**Abb. A 8:** HR-MS Spektrum von TMAEA.

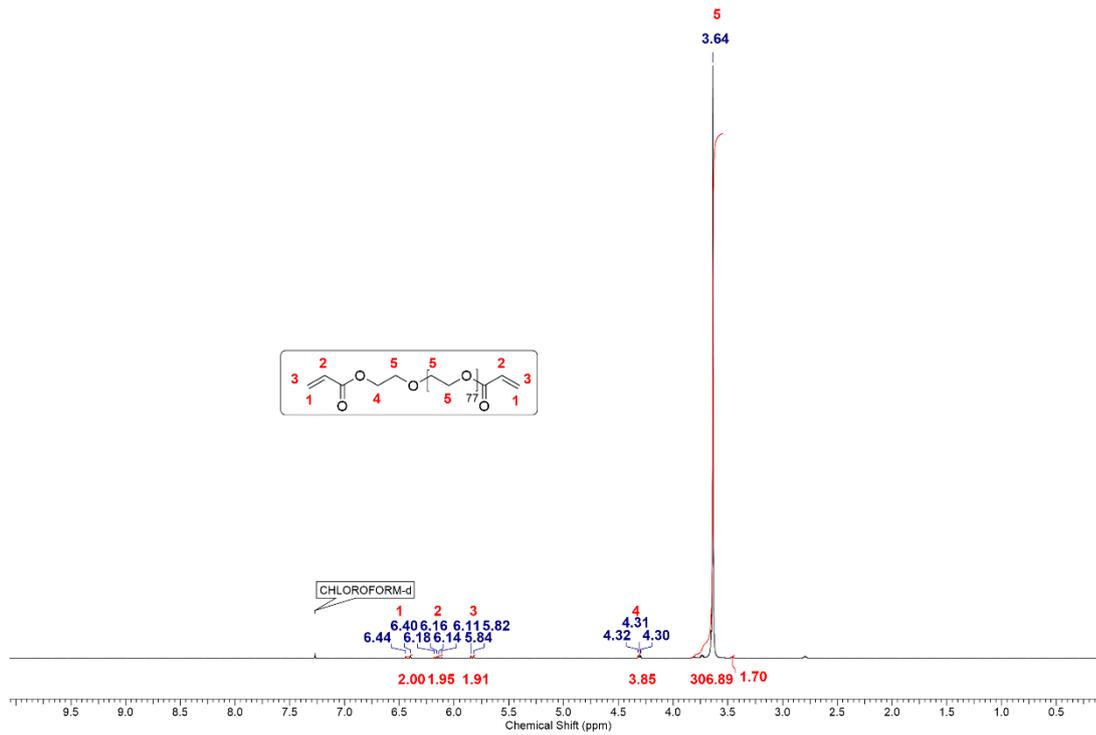


Abb. A 9: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl<sub>3</sub>.

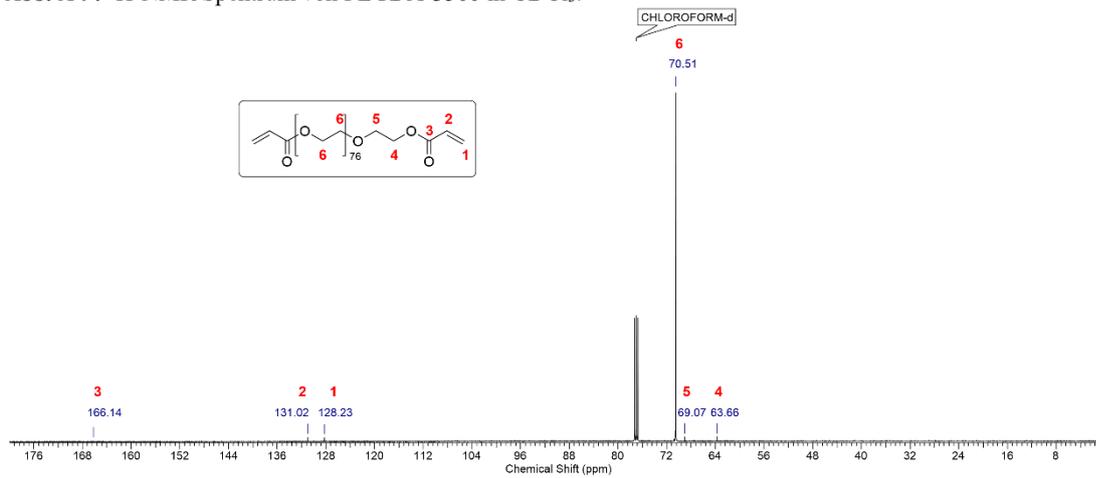


Abb. A 10: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von PEGDA-3500 in CDCl<sub>3</sub>.

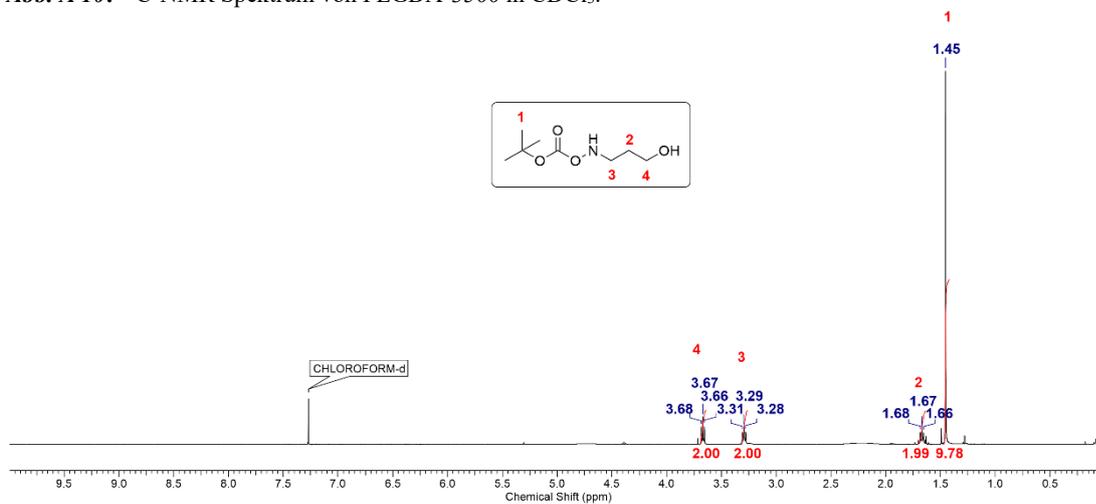
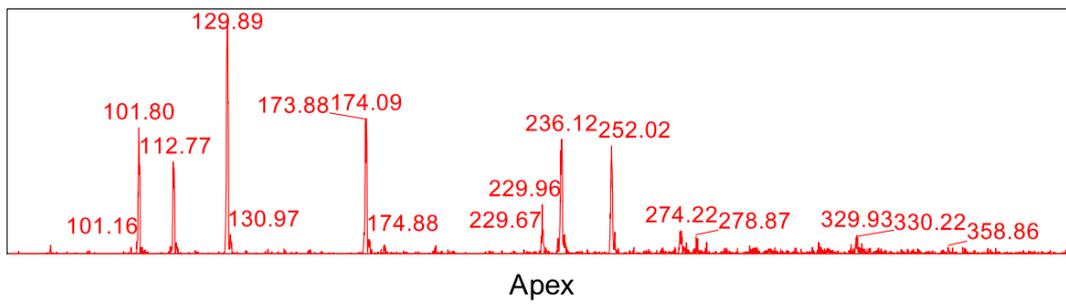
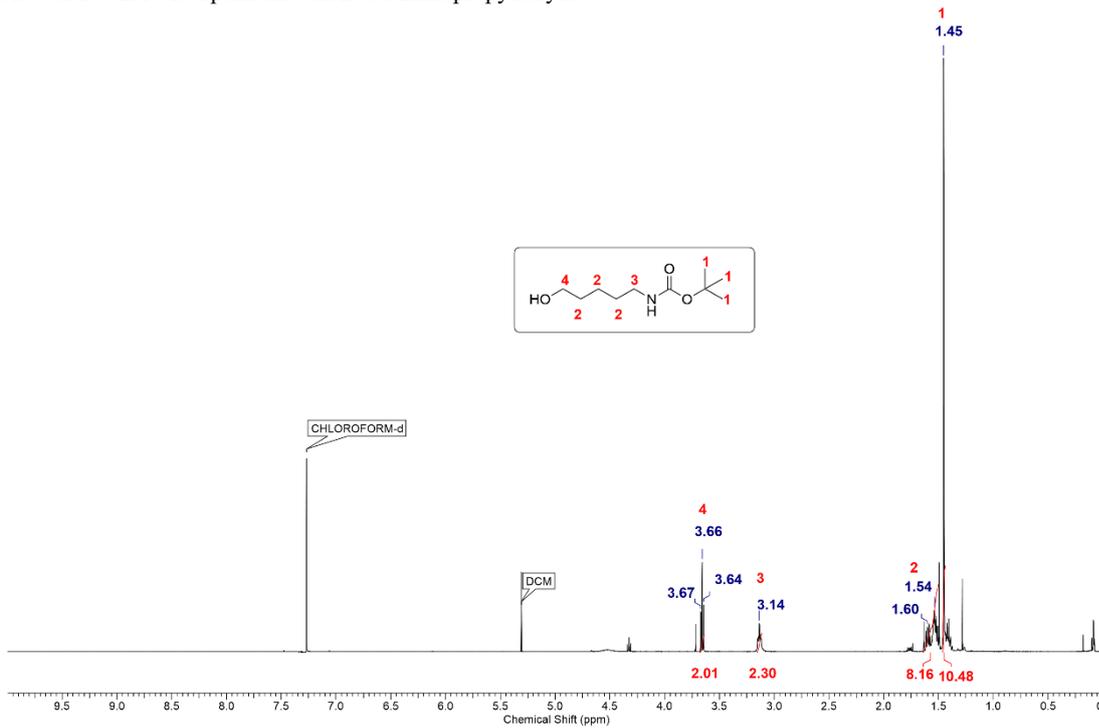


Abb. A 11: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Boc-Aminopropanol in CDCl<sub>3</sub>.



Peak #1 - 0.199 - QDa 1: MS Scan

**Abb. A 15:** LR-MS Spektrum von Boc-Aminopropylacrylat.**Abb. A 16:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Boc-Aminopentanol in CDCl<sub>3</sub>.

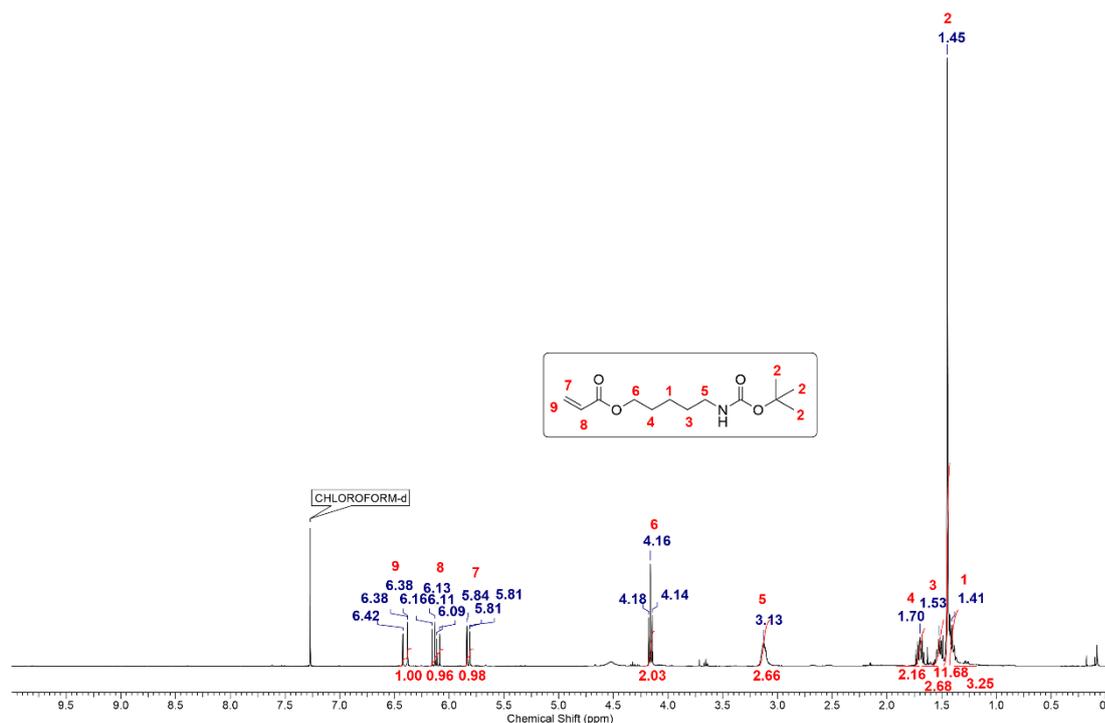
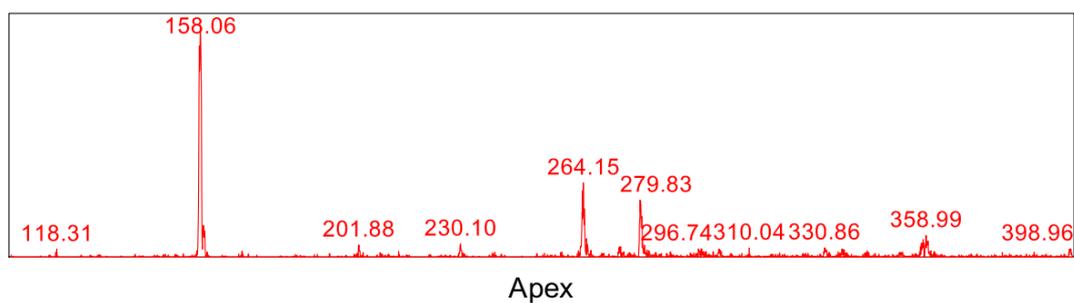


Abb. A 17: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Aminopentylacrylat in CDCl<sub>3</sub>.

Peak #1 - 0.173 - QDa 1: MS Scan



Apex

Abb. A 18: LR-MS Spektrum von Aminopentylacrylat.

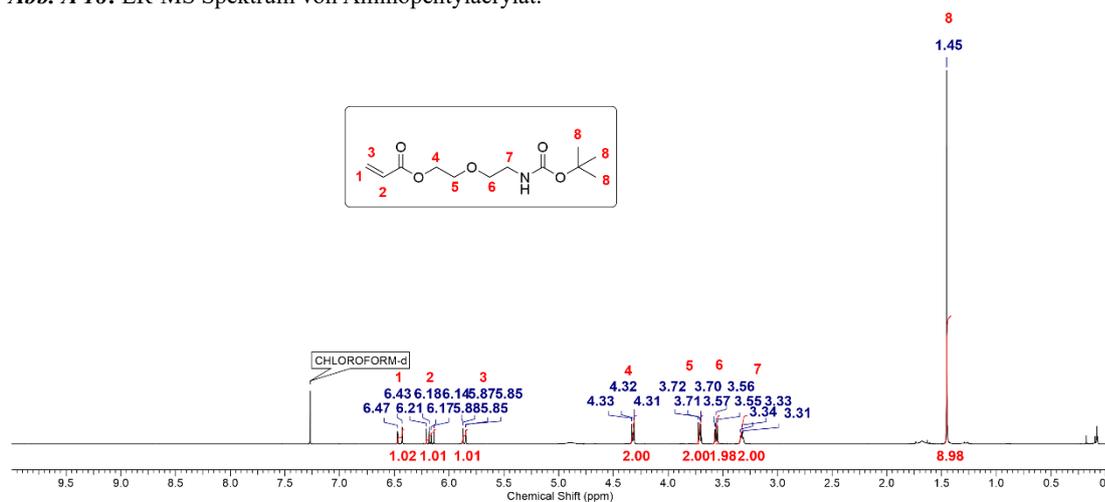
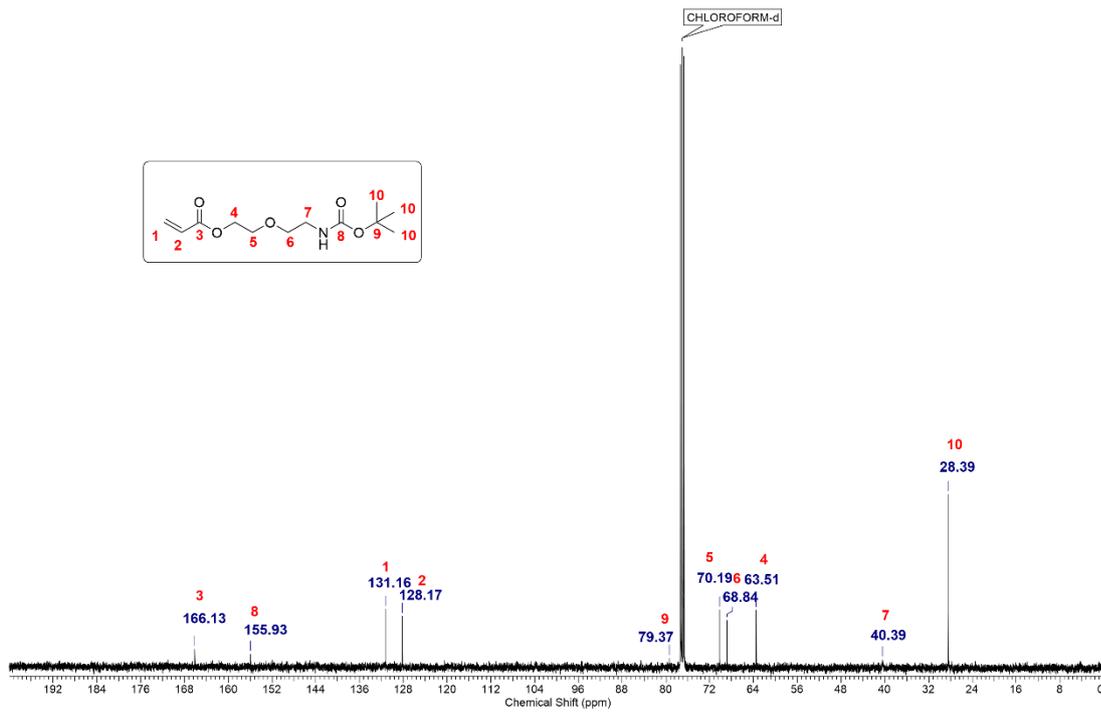
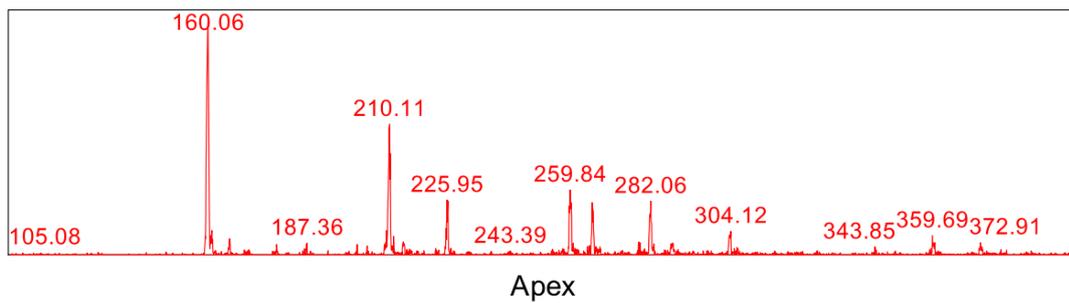


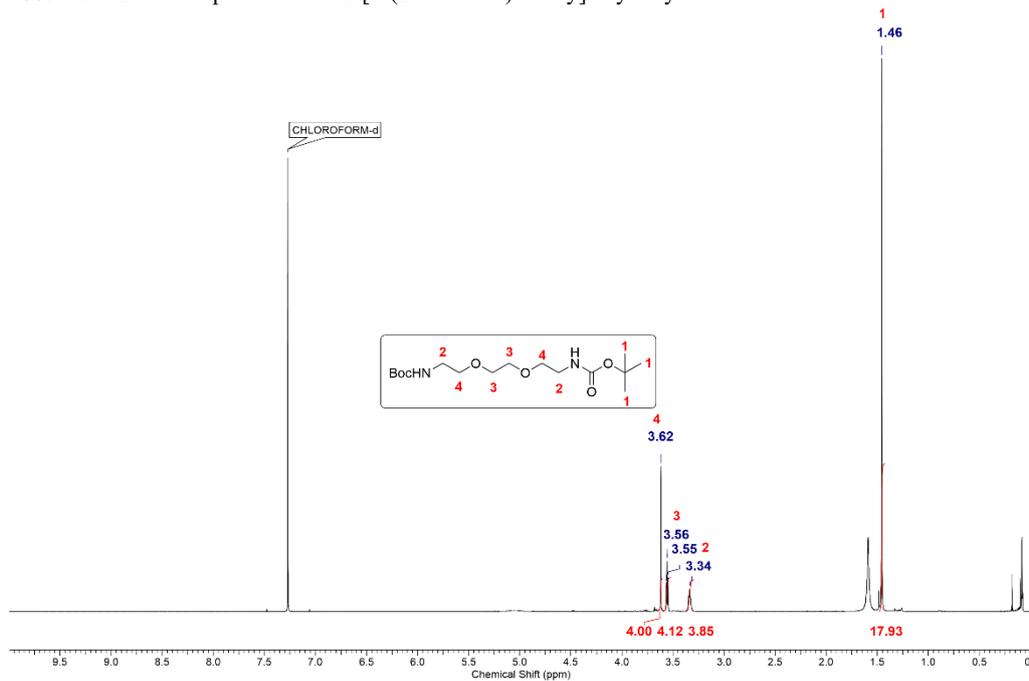
Abb. A 19: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat in CDCl<sub>3</sub>.



**Abb. A 20:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat in  $\text{CDCl}_3$ .  
Peak #1 - 0.266 - QDa 1: MS Scan



**Abb. A 21:** LR-MS Spektrum von 2-[2-(Boc-amino)ethoxy]ethylacrylat.



**Abb. A 22:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Boc geschützten 2,2'-(Ethylene dioxy)bis(ethylamin) in  $\text{CDCl}_3$ .

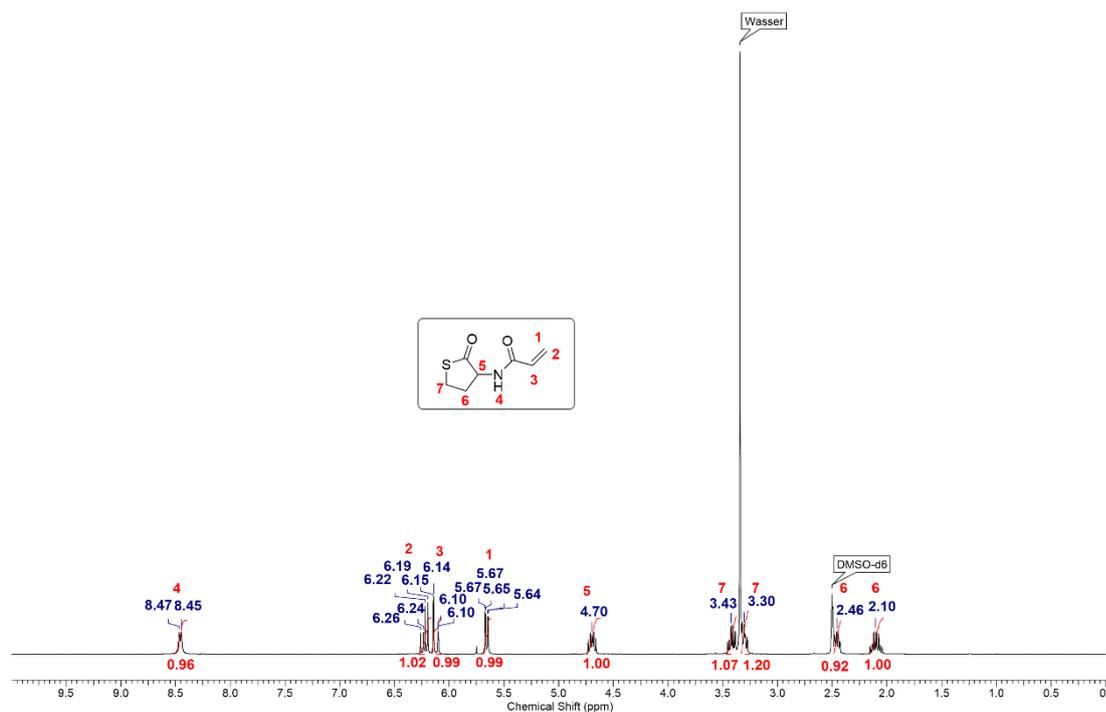


Abb. A 23:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von *N*-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton in  $\text{DMSO-d}_6$ .

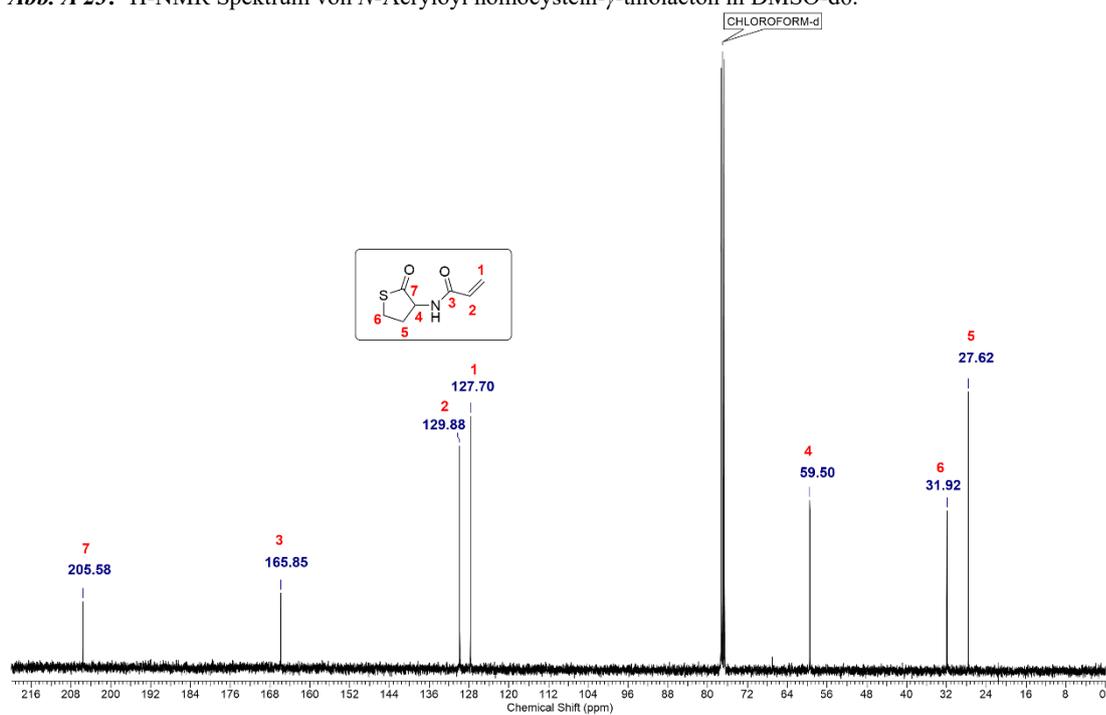


Abb. A 24:  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von *N*-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton in  $\text{CDCl}_3$ .

NS-CA-05 #17-60 RT: 0.18-0.60 AV: 44 NL: 2.36E6  
T: FTMS + p ESI Full.ms [100.00-2000.00]

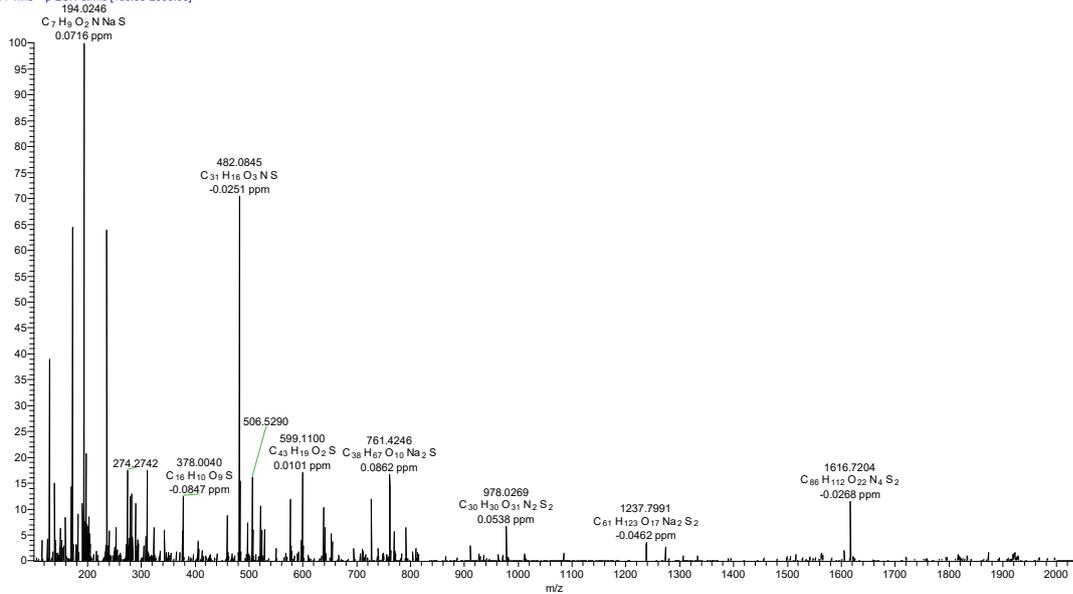


Abb. A 25: HR-MS Spektrum von *N*-Acryloyl homocystein- $\gamma$ -thiolacton.

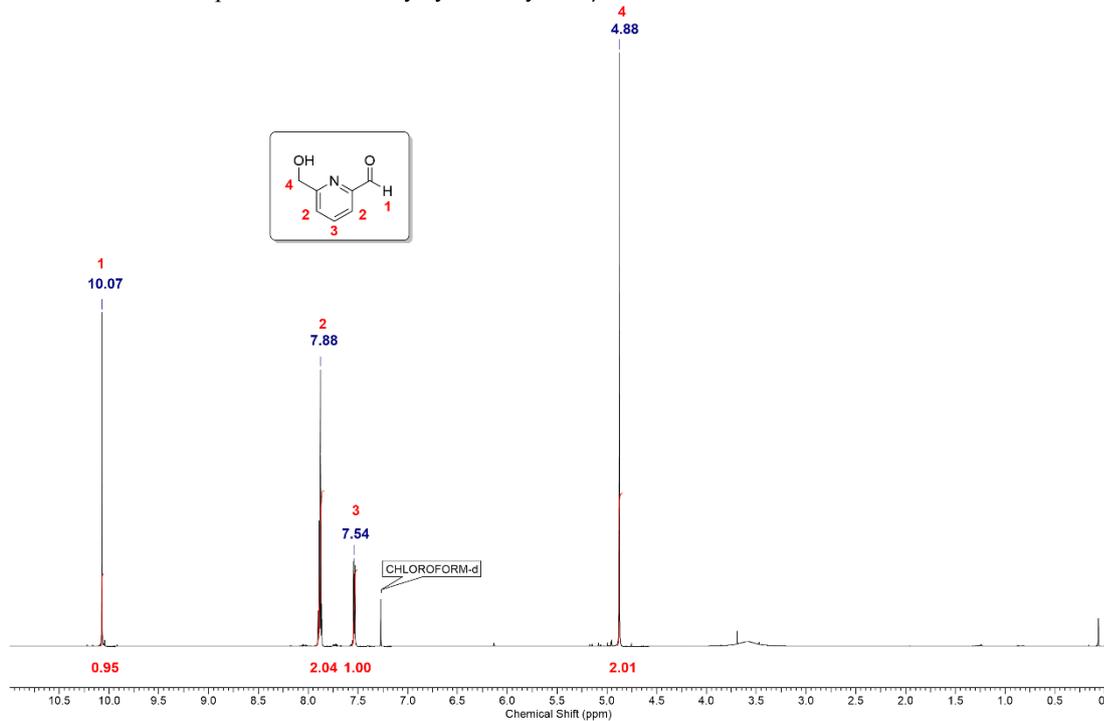


Abb. A 26:  $^1H$ -NMR Spektrum von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin in  $CDCl_3$ .  
Peak #1 - 0.134 - QDa 1: MS Scan

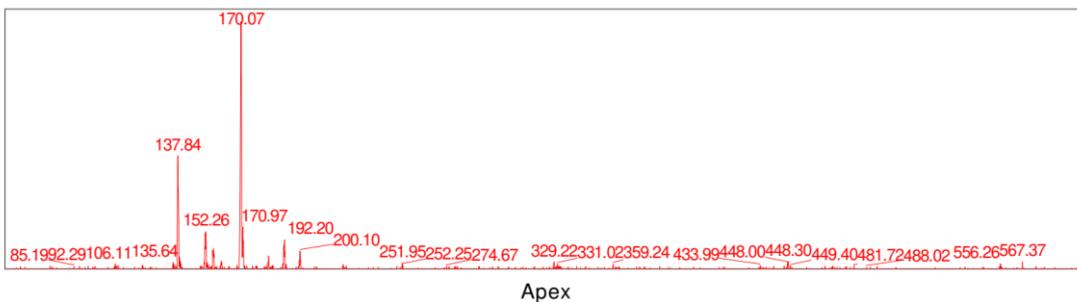


Abb. A 27: LR-MS Spektrum von 6-(2-Hydroxymethyl)formylpyridin.

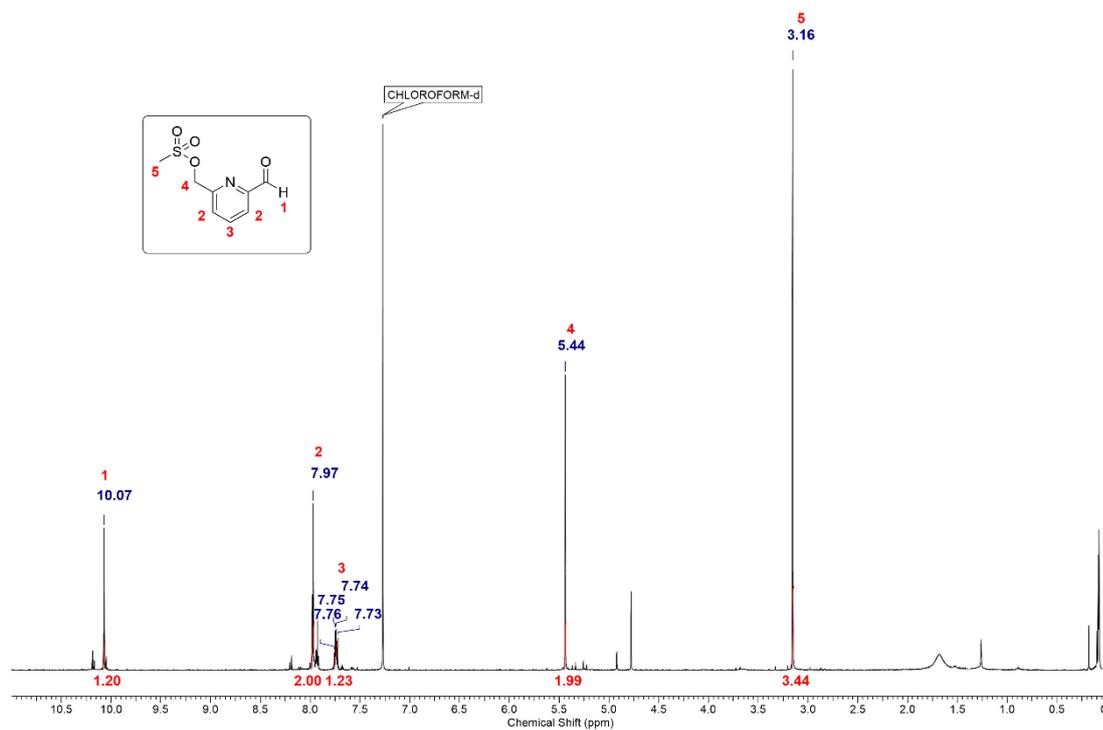


Abb. A 28: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von (6-formylpyridin-2-yl)methyl methansulfonat in CDCl<sub>3</sub>.

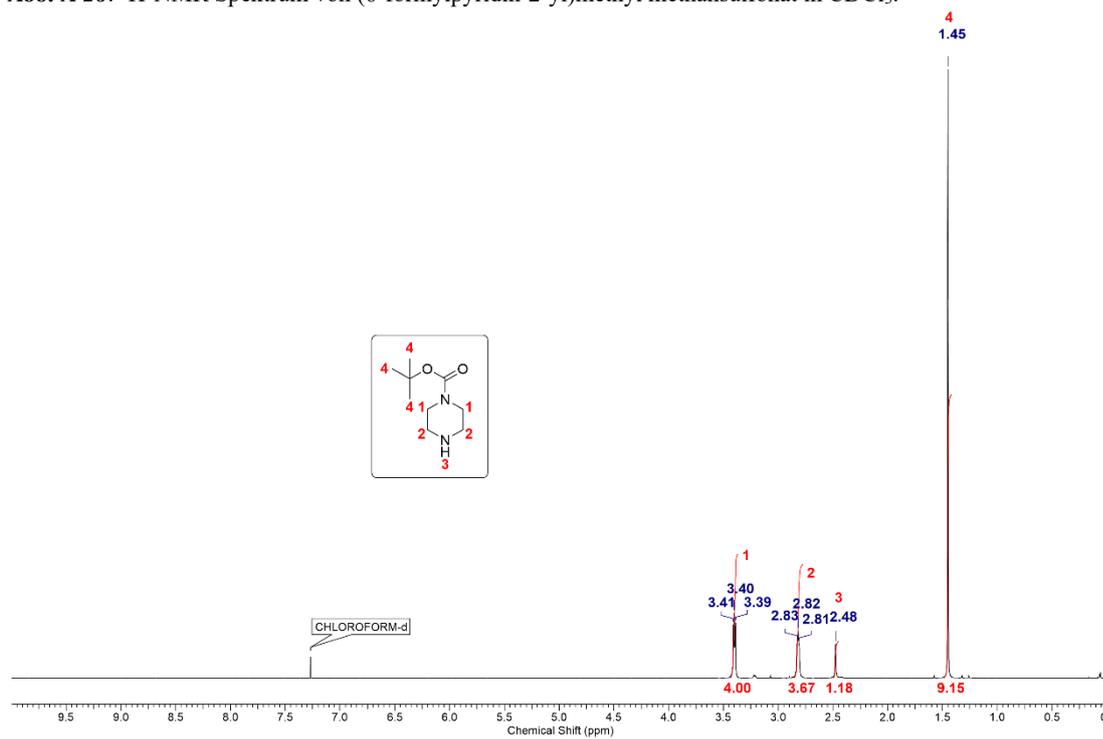


Abb. A 29: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Boc-Piperazin in CDCl<sub>3</sub>.

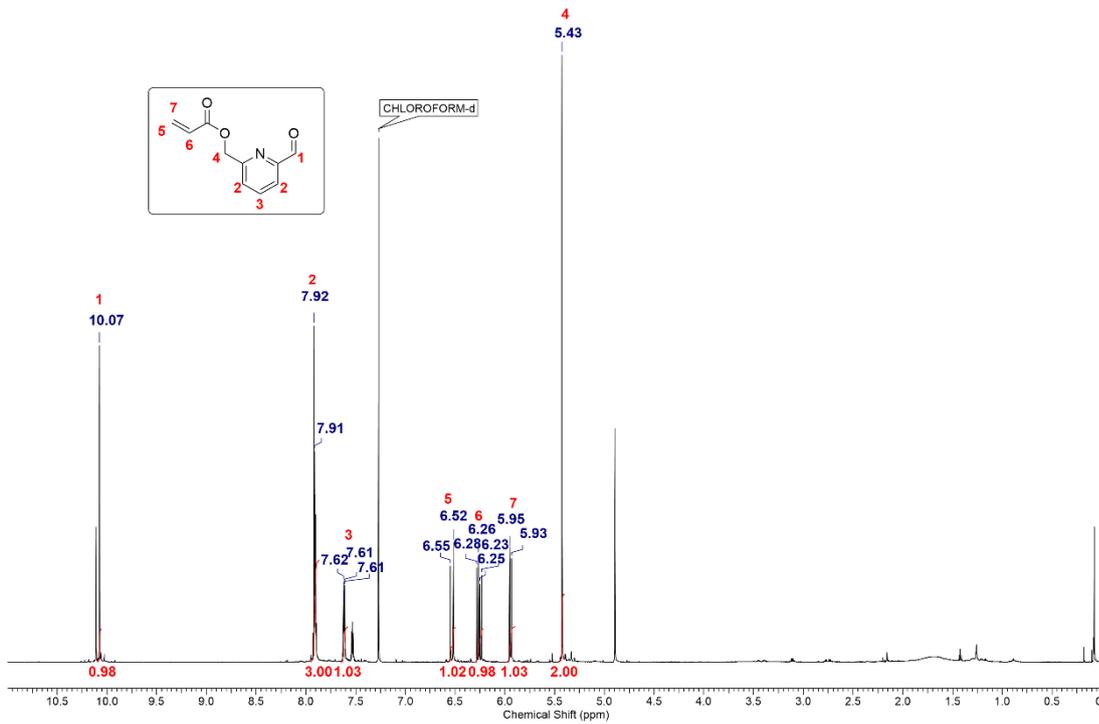


Abb. A 30:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum des 2PCA-Acrylats in  $\text{CDCl}_3$ .

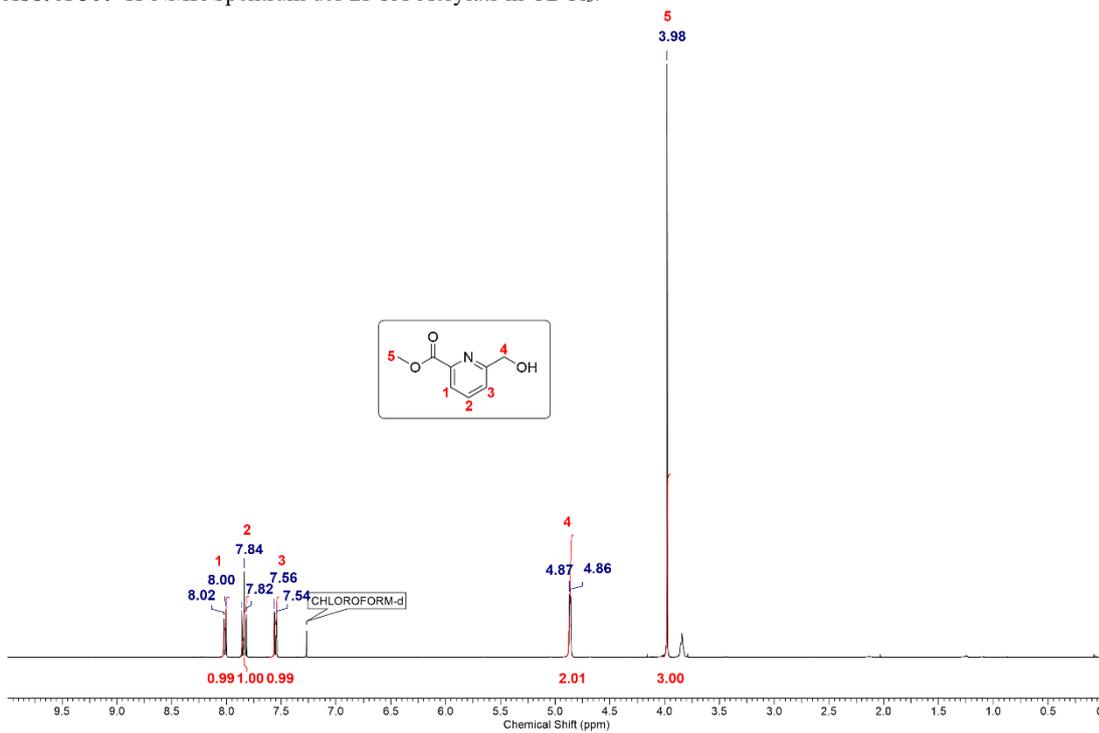


Abb. A 31:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat in  $\text{CDCl}_3$ .

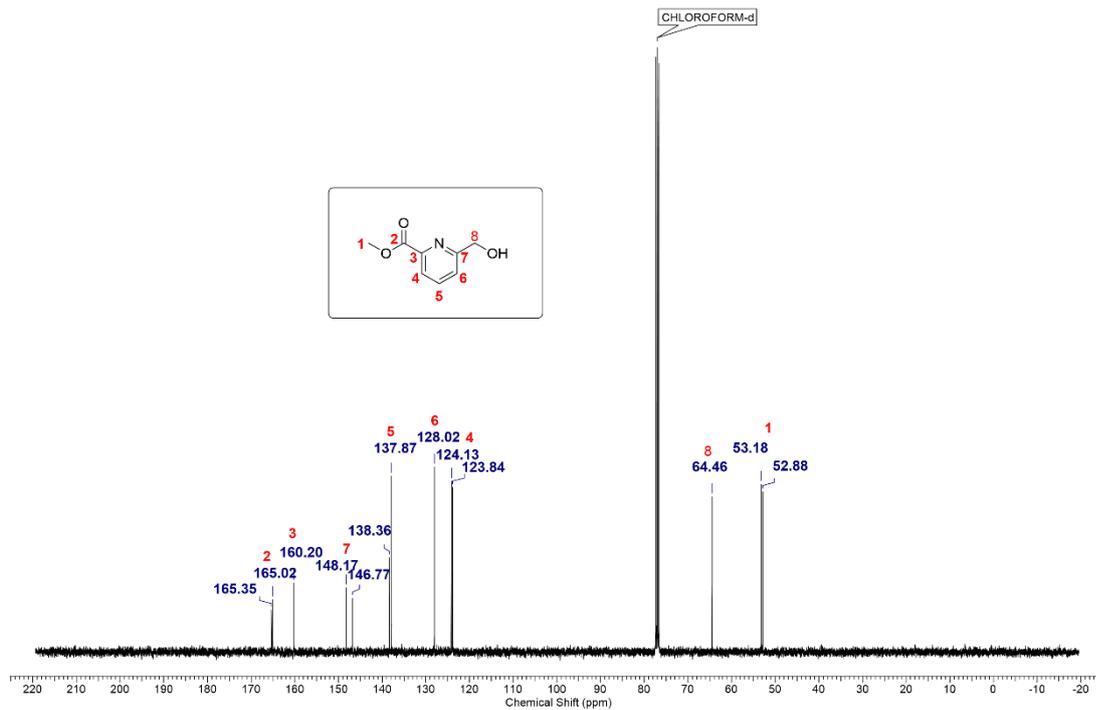


Abb. A 32: <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat in CDCl<sub>3</sub>.  
Peak #1 - 0.181 - QDa 1: MS Scan

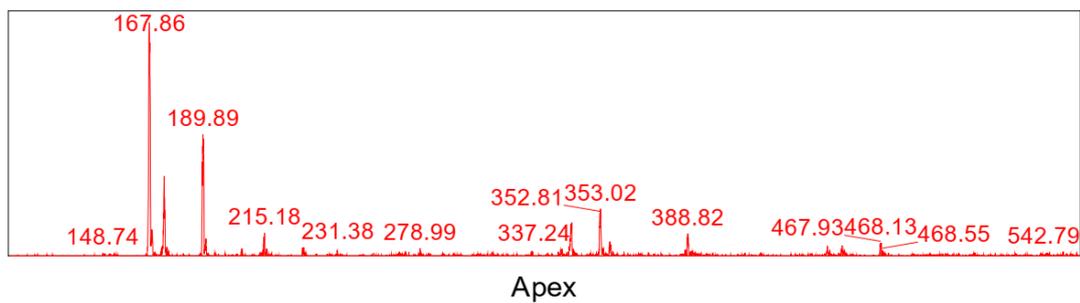


Abb. A 33: LR-MS Spektrum von Methyl-6-(hydroxymethyl)pyridin-2-carboxylat.

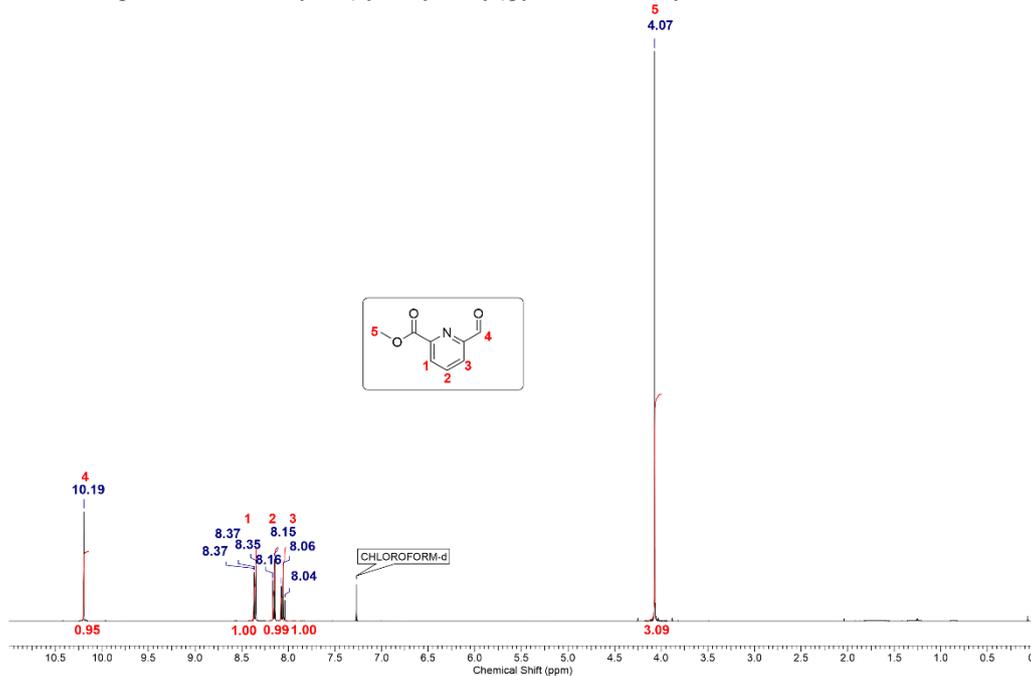
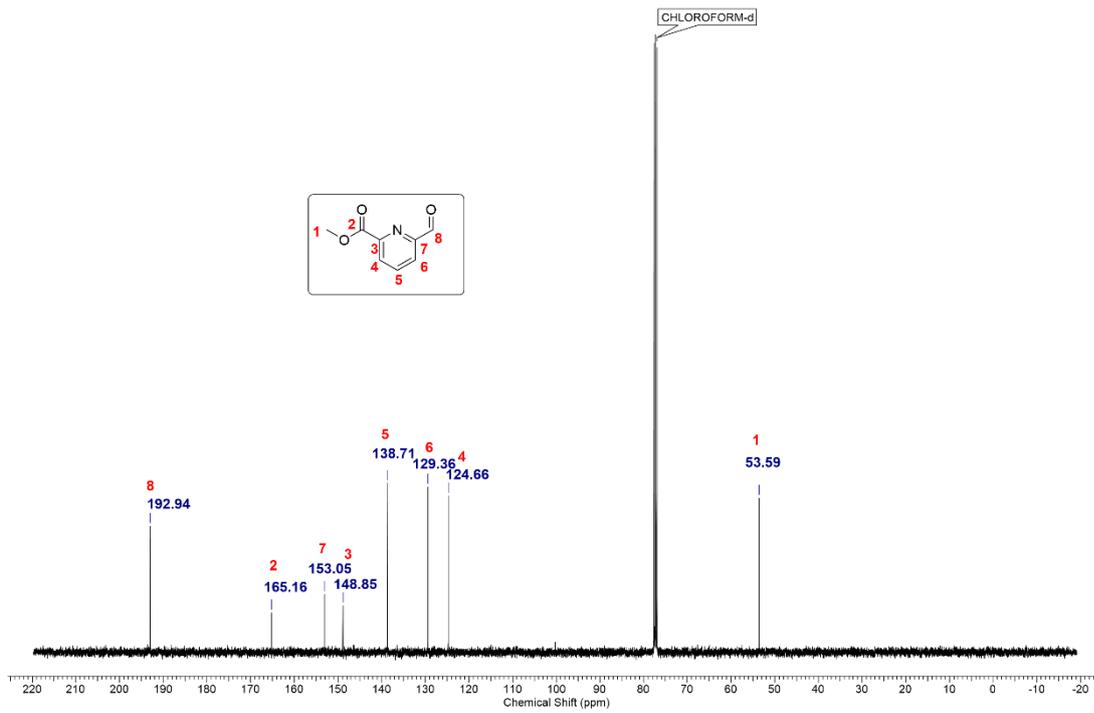
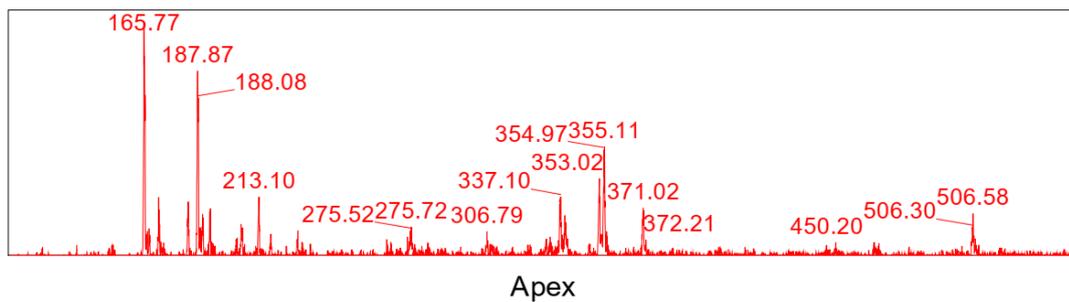


Abb. A 34: <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in CDCl<sub>3</sub>.

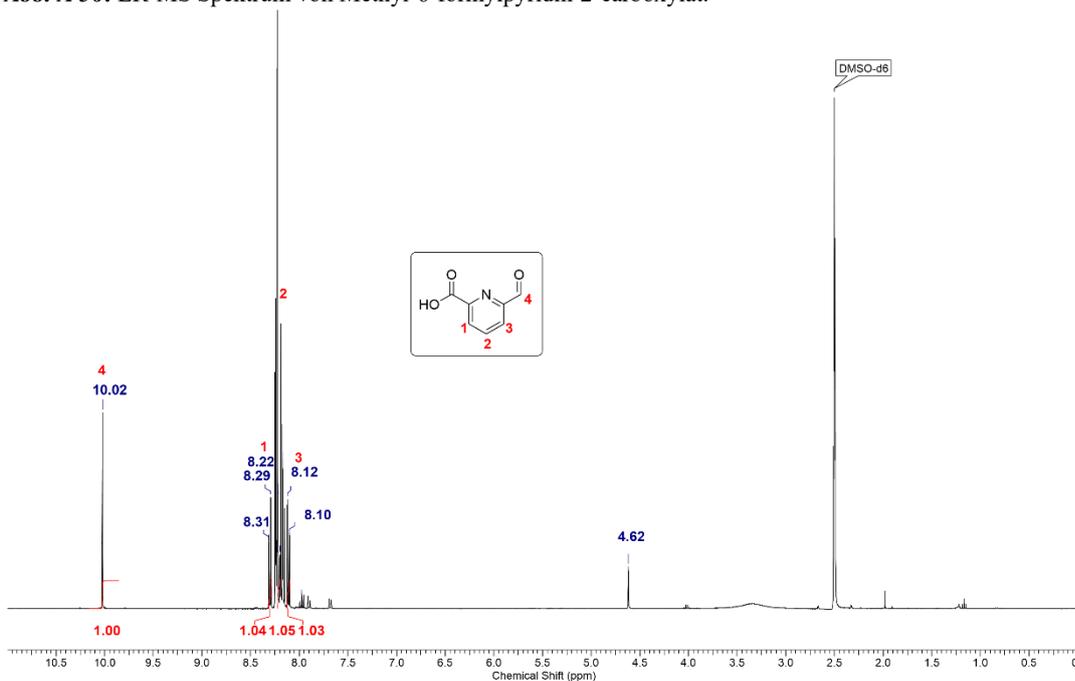


**Abb. A 35:** <sup>13</sup>C-NMR Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat in CDCl<sub>3</sub>.  
Peak #1 - 0.202 - QDa 1: MS Scan



Apex

**Abb. A 36:** LR-MS Spektrum von Methyl-6-formylpyridin-2-carboxylat.



**Abb. A 37:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in DMSO-d<sub>6</sub>.

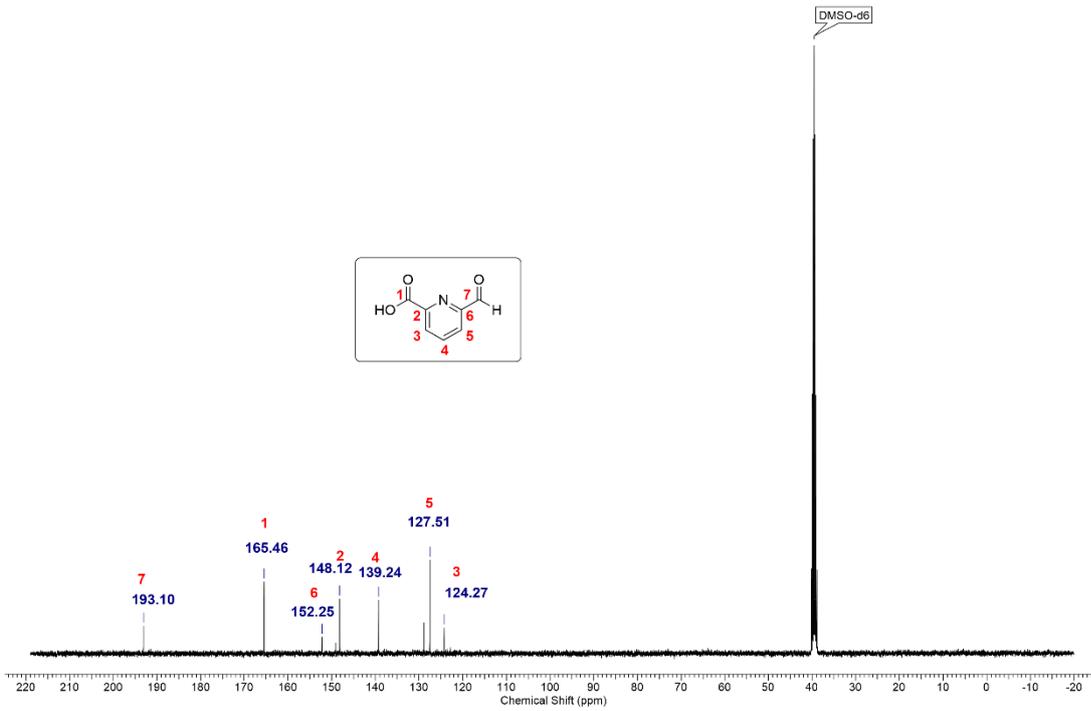


Abb. A 38:  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure in DMSO- $d_6$ .  
Peak #1 - 0.191 - QDa 1: MS Scan

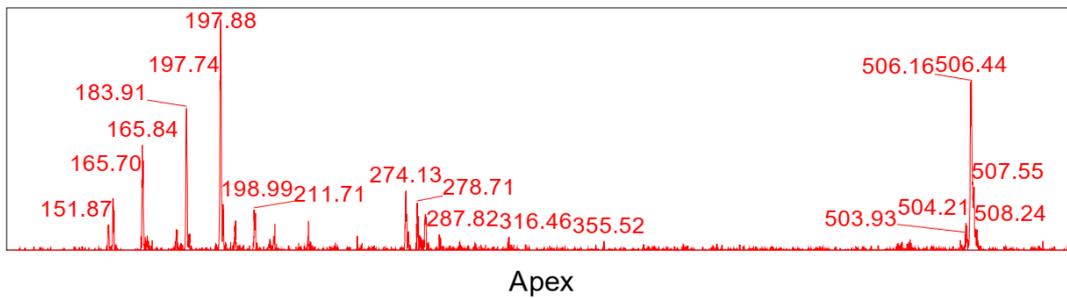


Abb. A 39: LR-MS Spektrum von 6-Formylpyridin-2-carbonsäure.

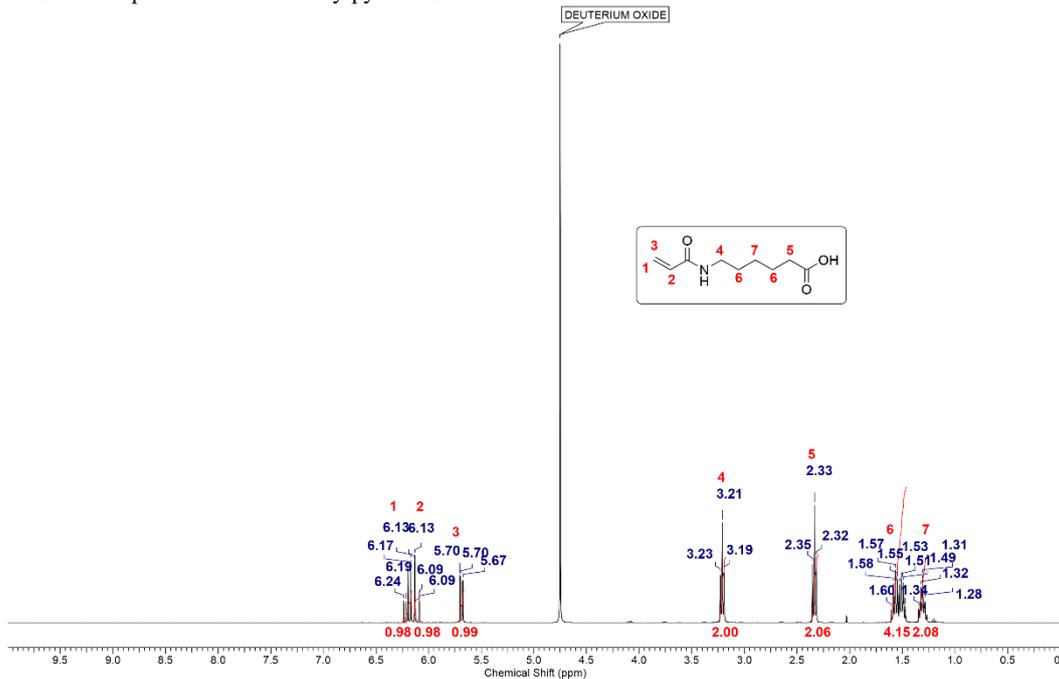


Abb. A 40:  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Hexansäureacrylamid in  $\text{D}_2\text{O}$ .

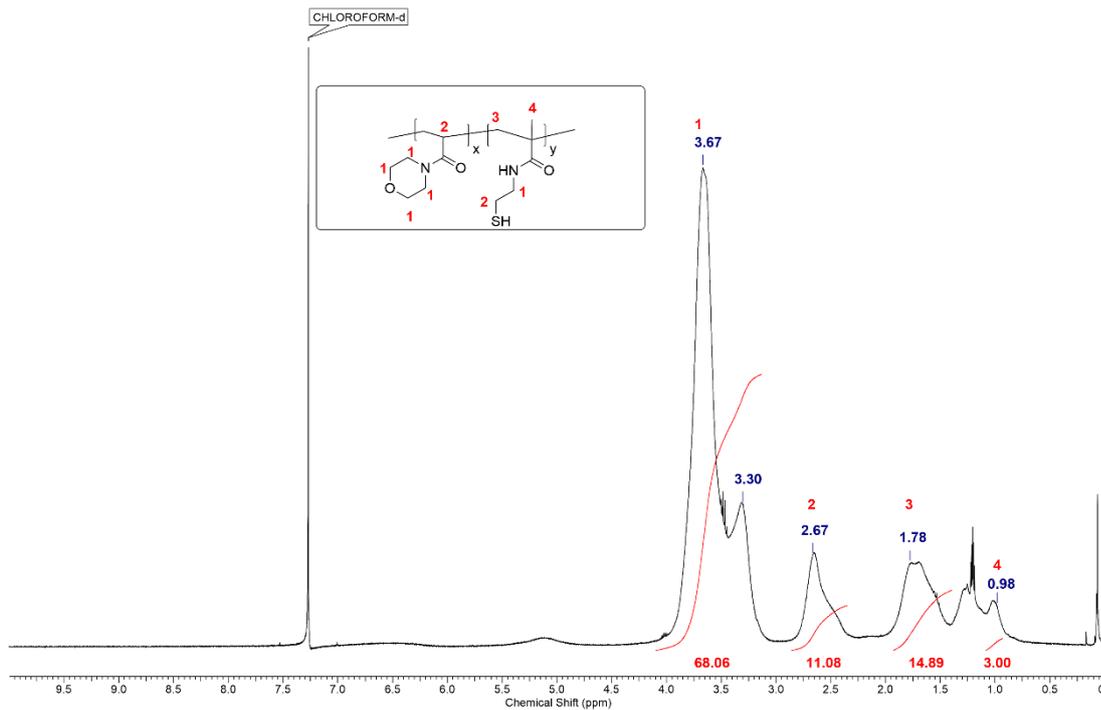


Abb. A 41: Beispielhaftes  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PAMor-co-BMAC Präpolymers P1 in  $\text{CDCl}_3$ .

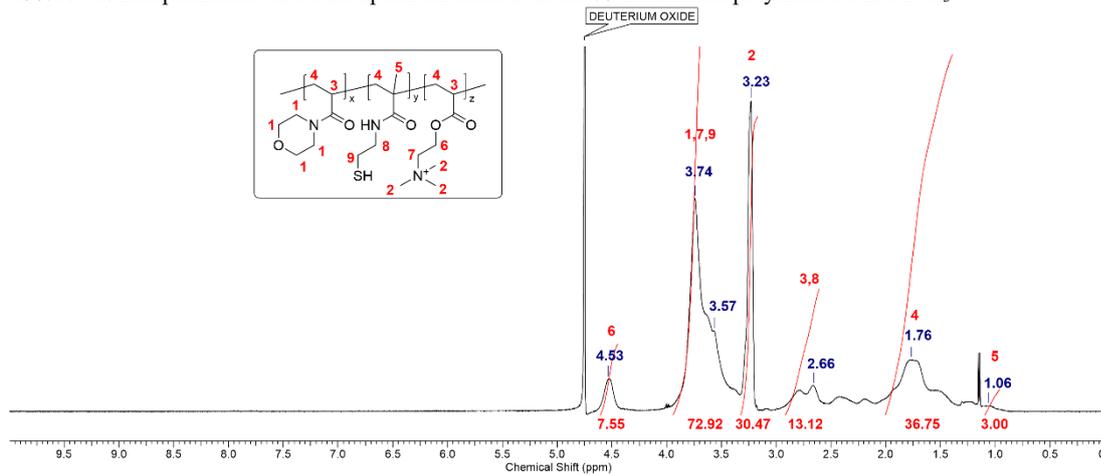


Abb. A 42: Beispielhaftes  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-TMAEA Präpolymers P2 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

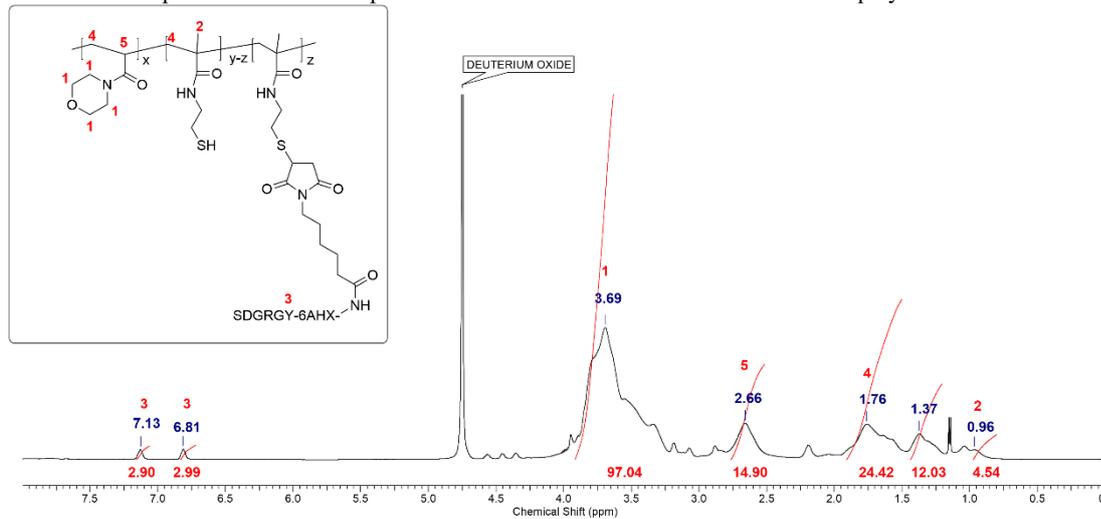


Abb. A 43: Beispielhaftes  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-MIC-6AHX-YGRGDS Präpolymers P3 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

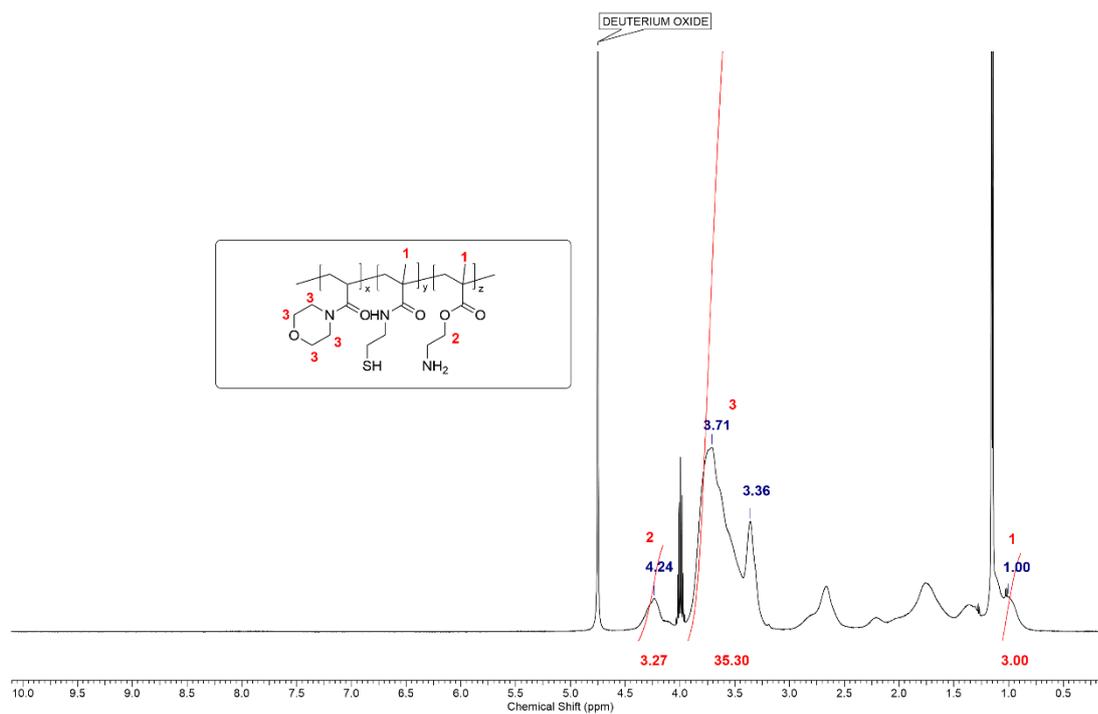


Abb. A 44: Beispielhaftes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-AEMA Präpolymers P4 in  $\text{D}_2\text{O}$ .

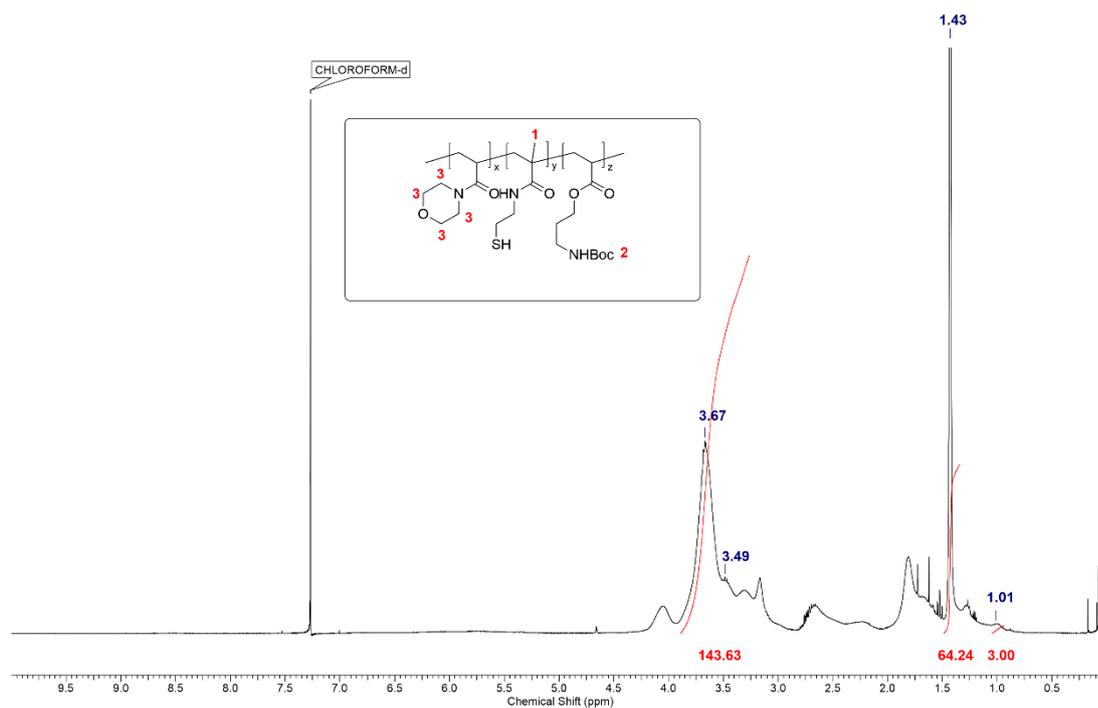
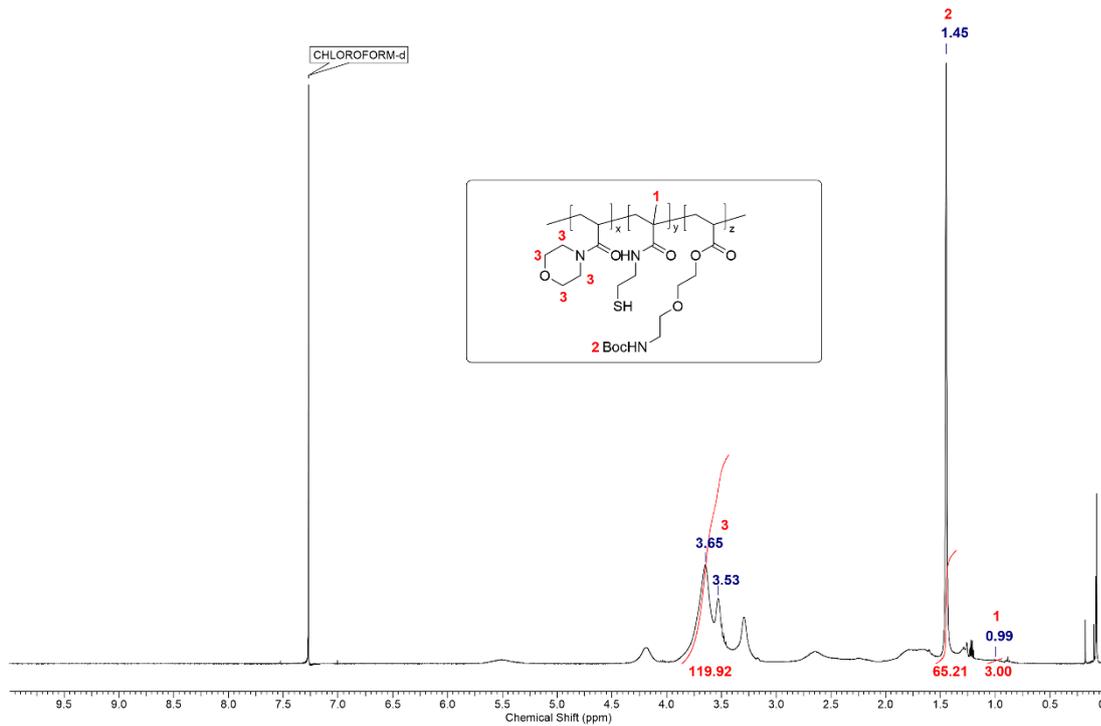
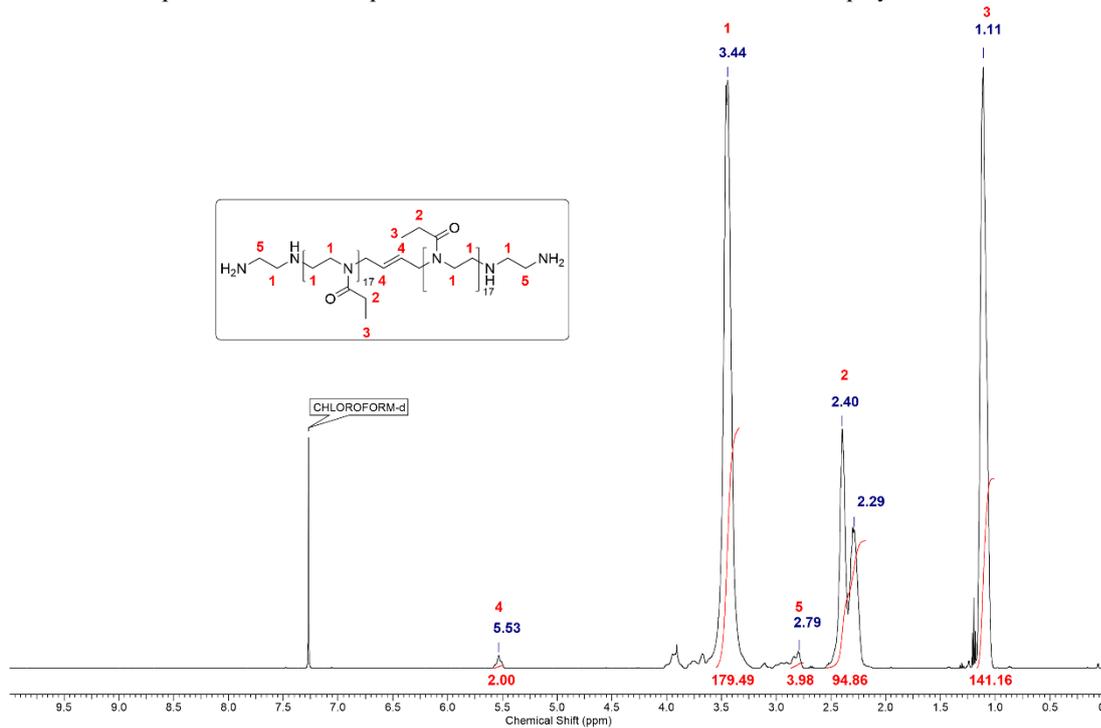


Abb. A 45: Beispielhaftes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-APropAc Präpolymers P5 in  $\text{CDCl}_3$ .



**Abb. A 46:** Beispielhaftes  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines PAMor-co-BMAC-co-AEEAc Präpolymers **P6** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Abb. A 47:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum eines zweiarmigen PEtOx Polymers mit Ethylendiamin Endgruppe in  $\text{CDCl}_3$ .

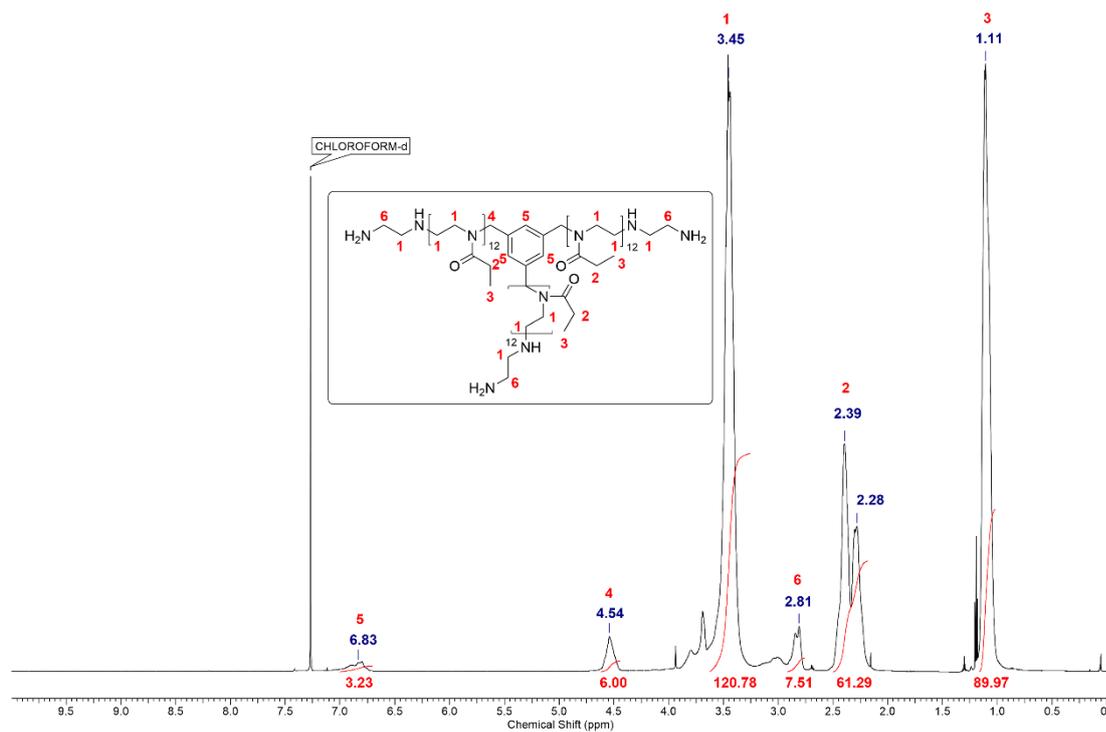


Abb. A 48:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines dreiarmligen PEtOx Polymers mit Ethylendiamin Endgruppe in  $\text{CDCl}_3$ .

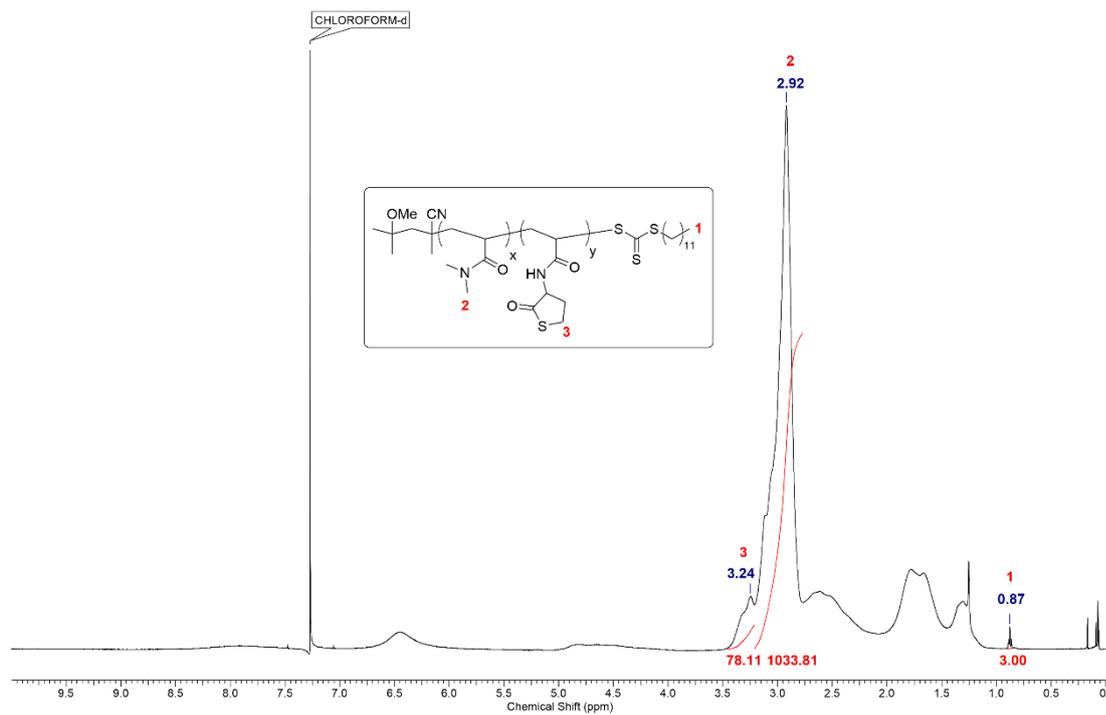


Abb. A 49:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 20 mol% TLA in  $\text{CDCl}_3$ .

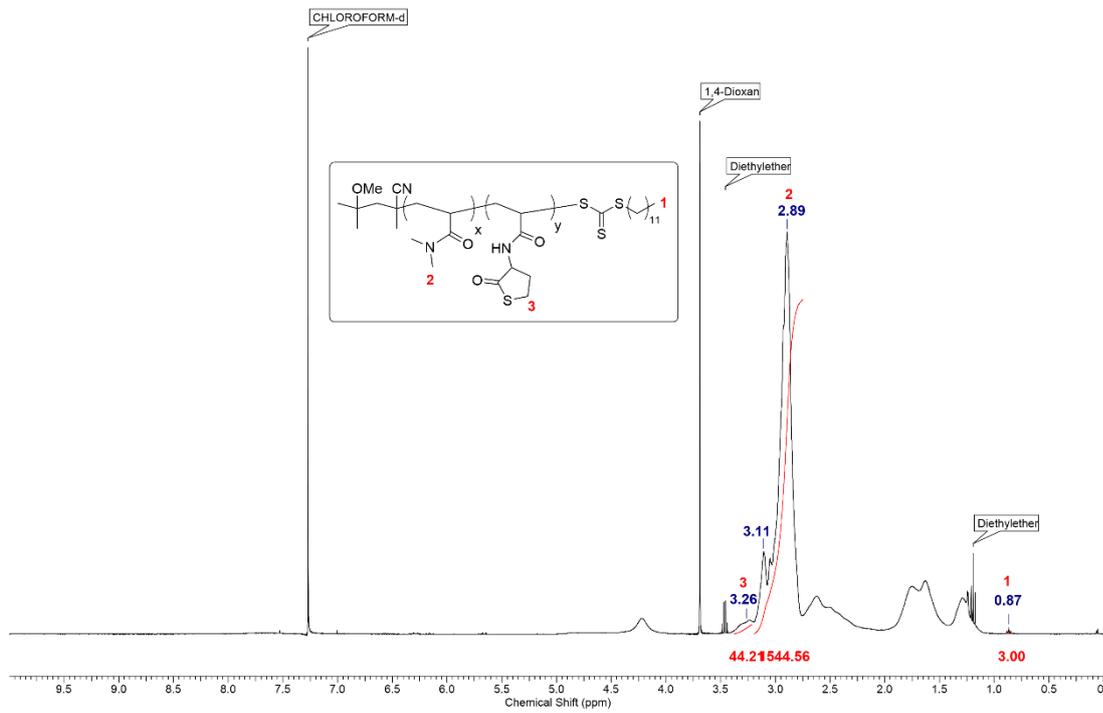


Abb. A 50:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 10 mol% TLA in  $\text{CDCl}_3$ .

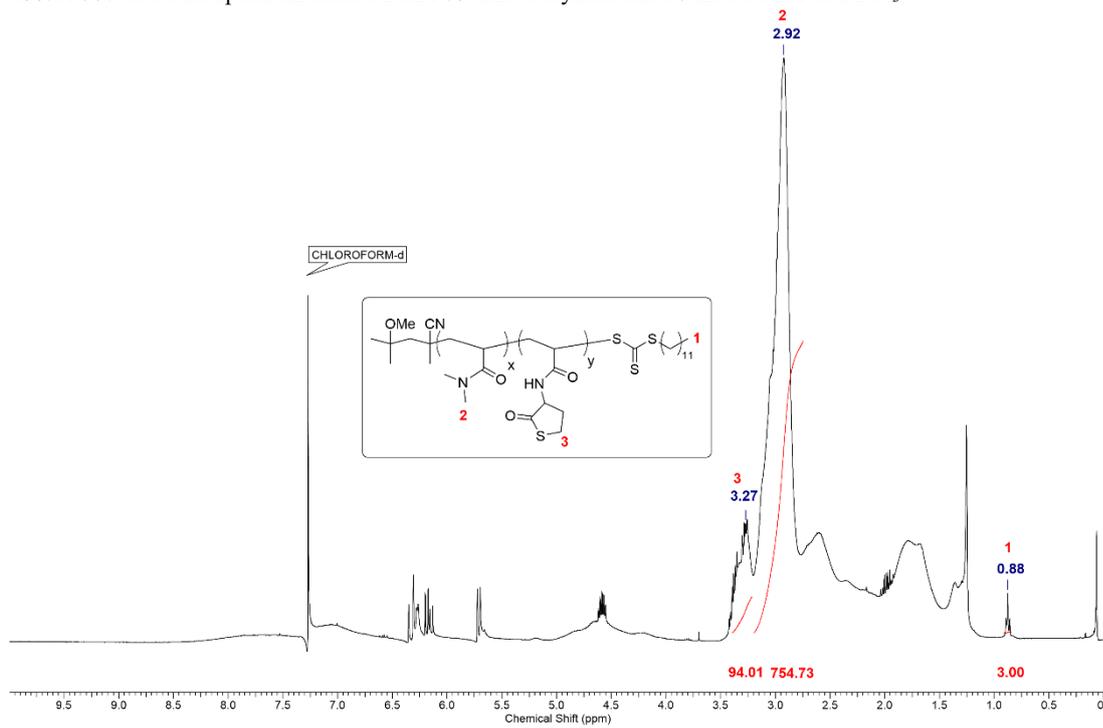
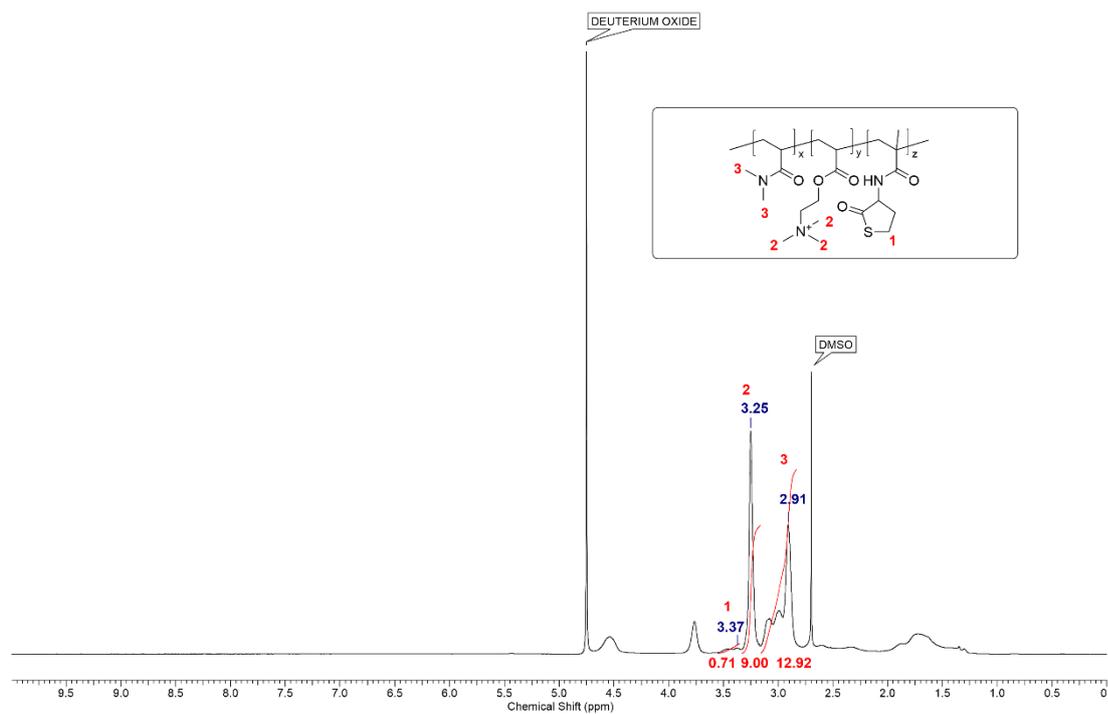
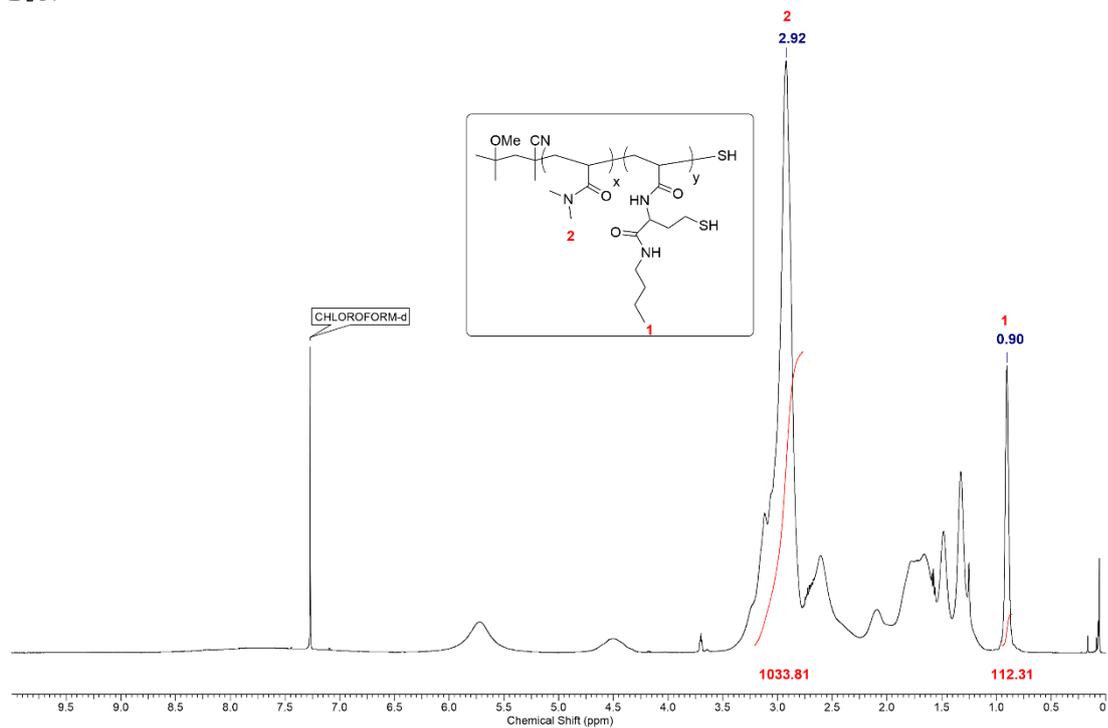


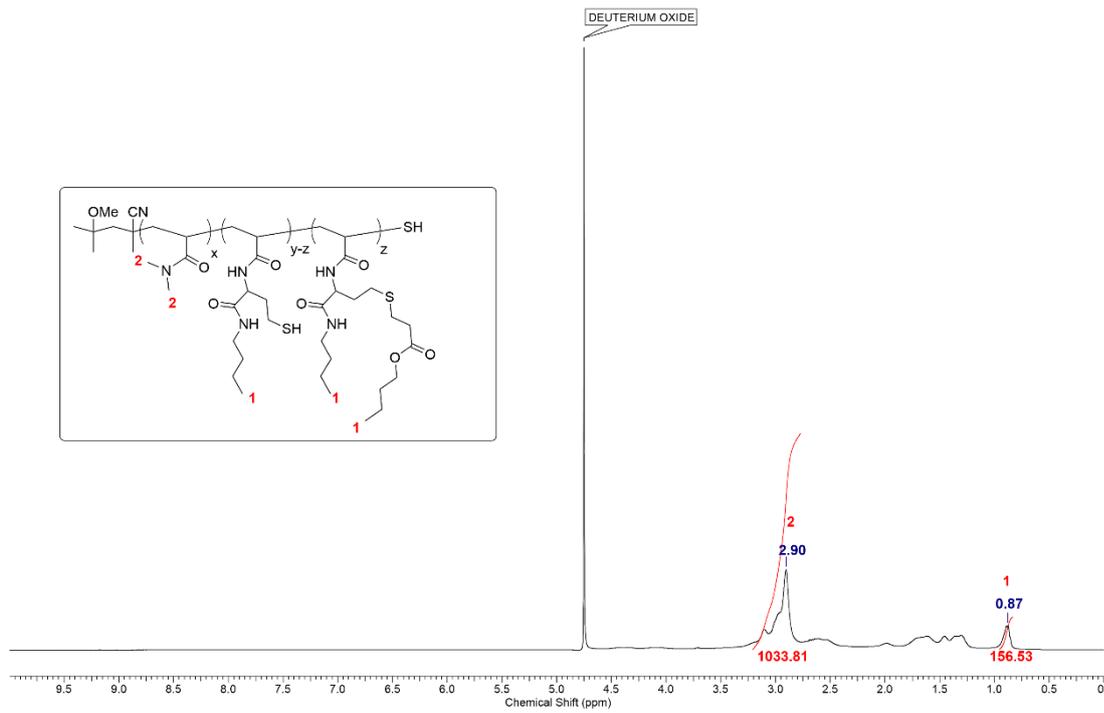
Abb. A 51:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PDMA-co-TLA Polymers mit 30 mol% TLA in  $\text{CDCl}_3$ .



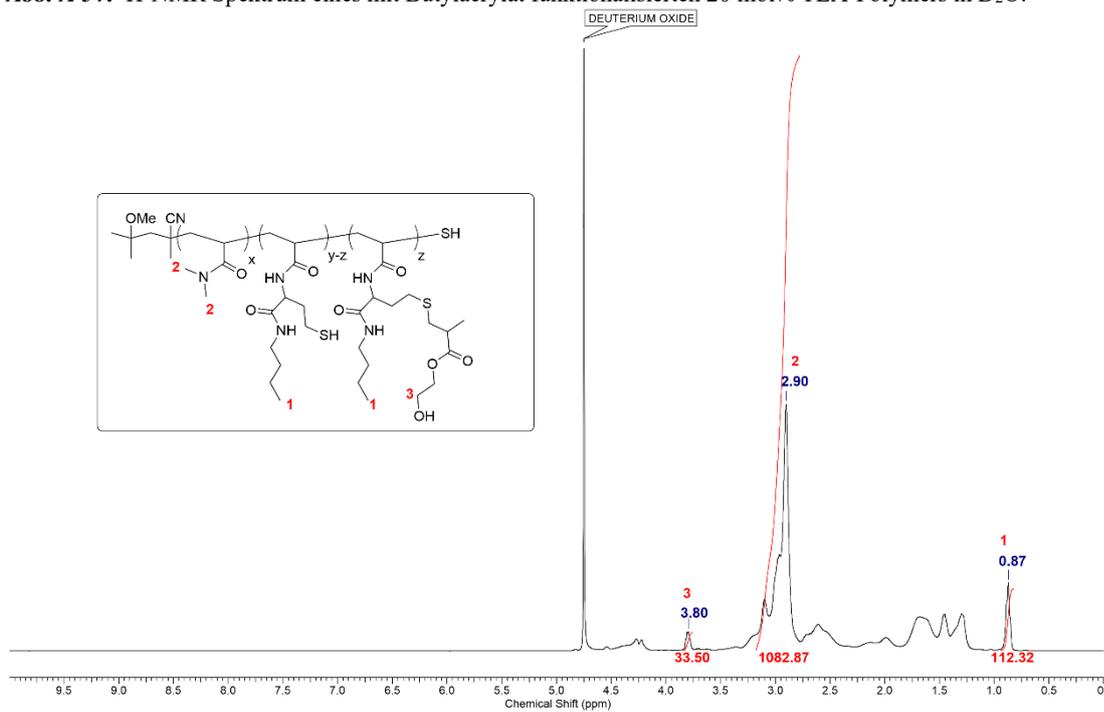
**Abb. A 52:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum eines PDMA-*co*-TLA-*co*-TMAEA Polymers mit 10 mol% TLA und 30 mol% TMAEA in D<sub>2</sub>O.



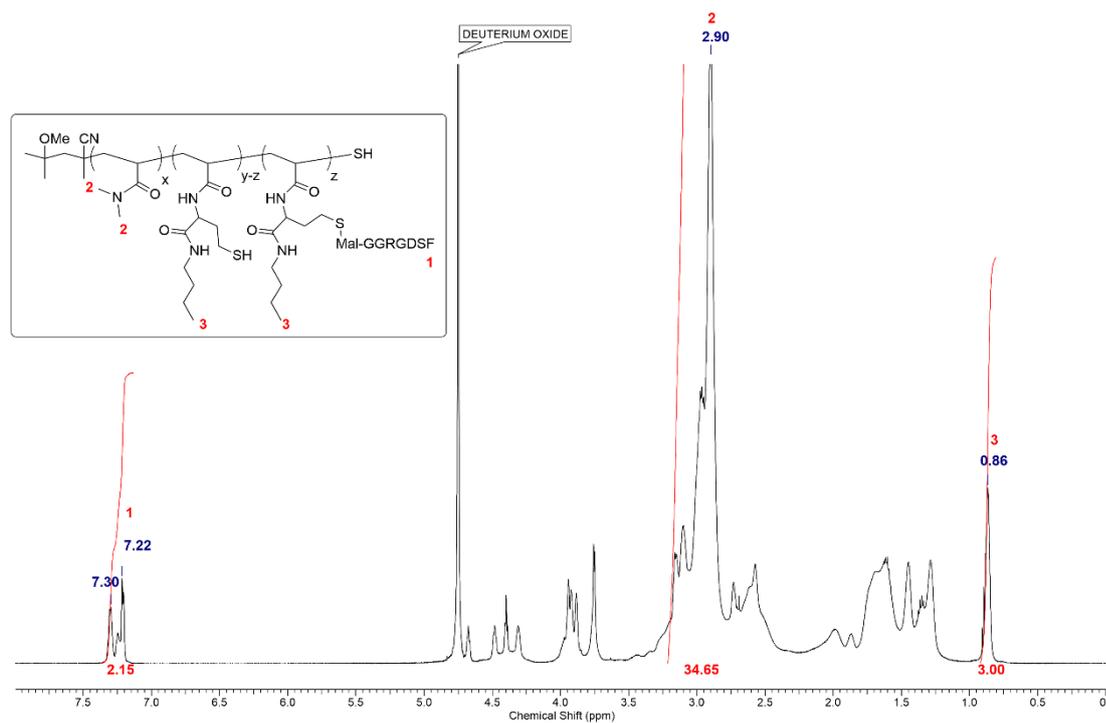
**Abb. A 53:** <sup>1</sup>H-NMR Spektrum eines mit Butylamin geöffneten 20 mol% TLA Polymers in CDCl<sub>3</sub>.



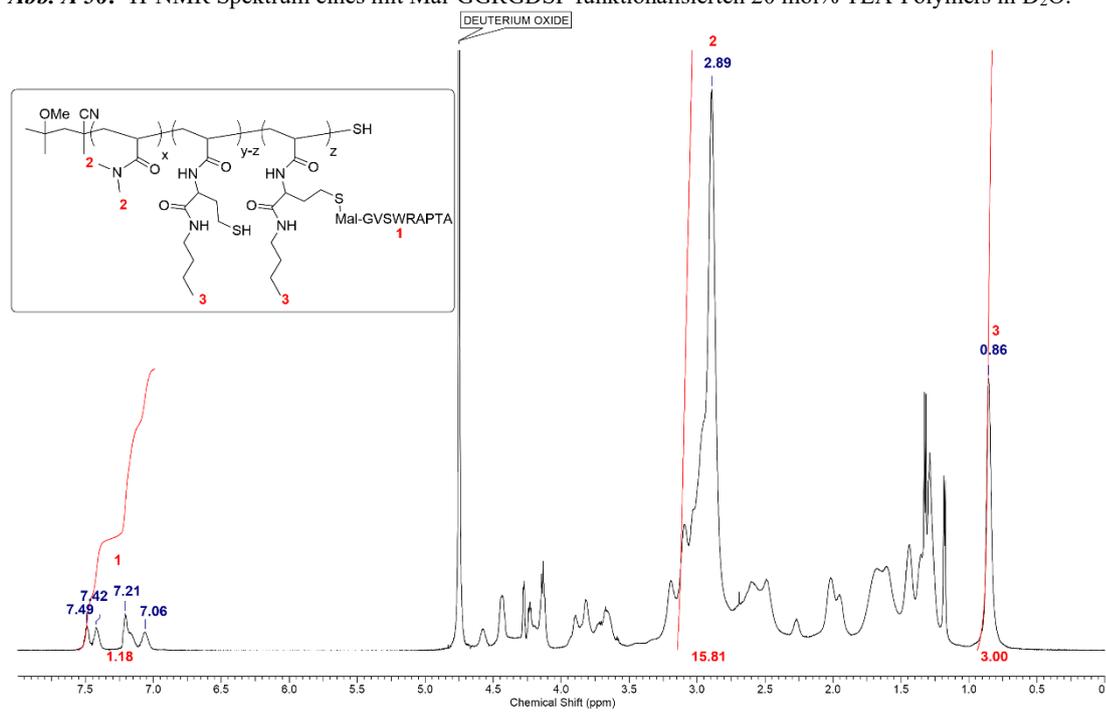
**Abb. A 54:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines mit Butylacrylat funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$ .



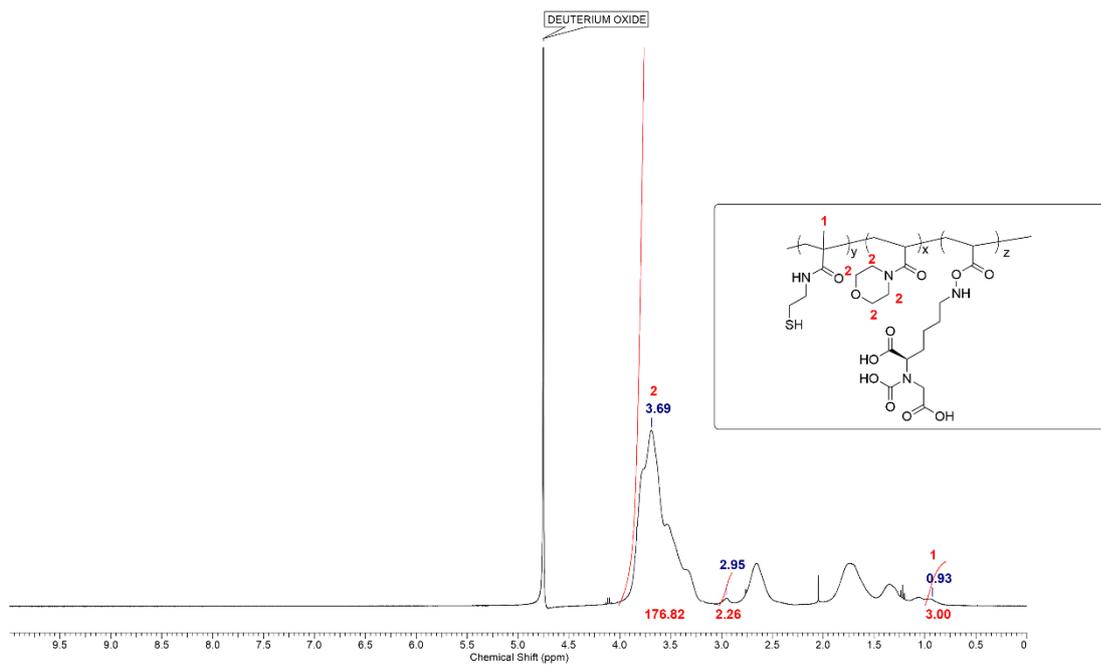
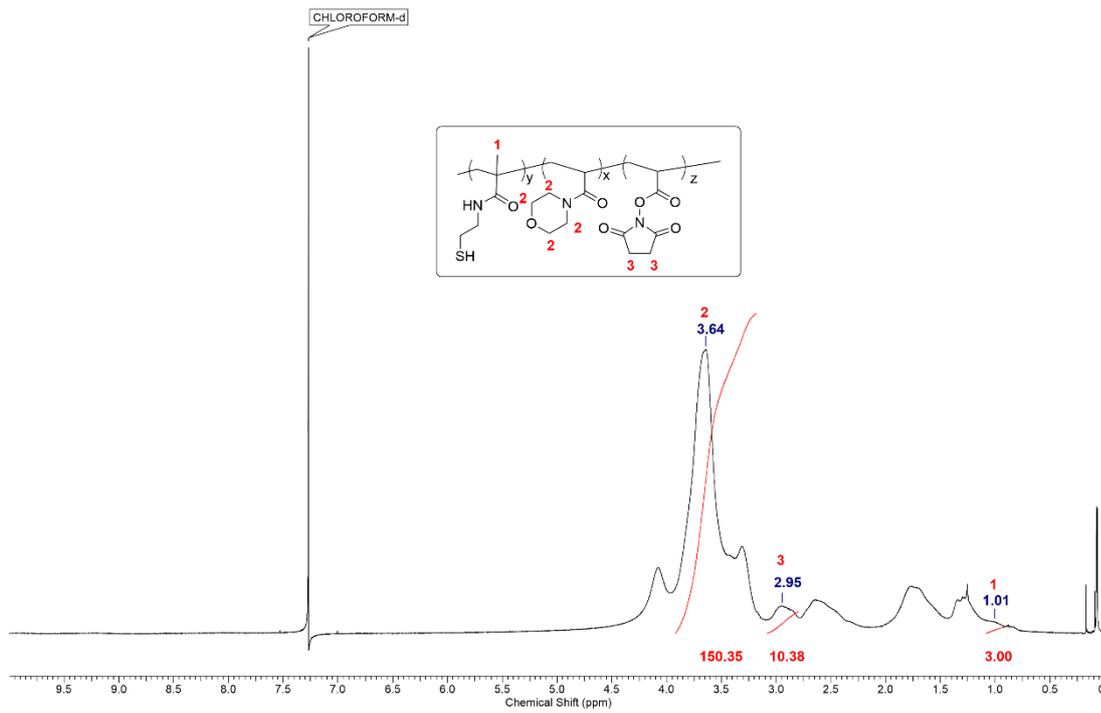
**Abb. A 55:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines mit HEMA funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Abb. A 56:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines mit Mal-GGRGDSF funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Abb. A 57:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines mit Mal-GVSWRAPTA funktionalisierten 20 mol% TLA-Polymers in  $\text{D}_2\text{O}$ .



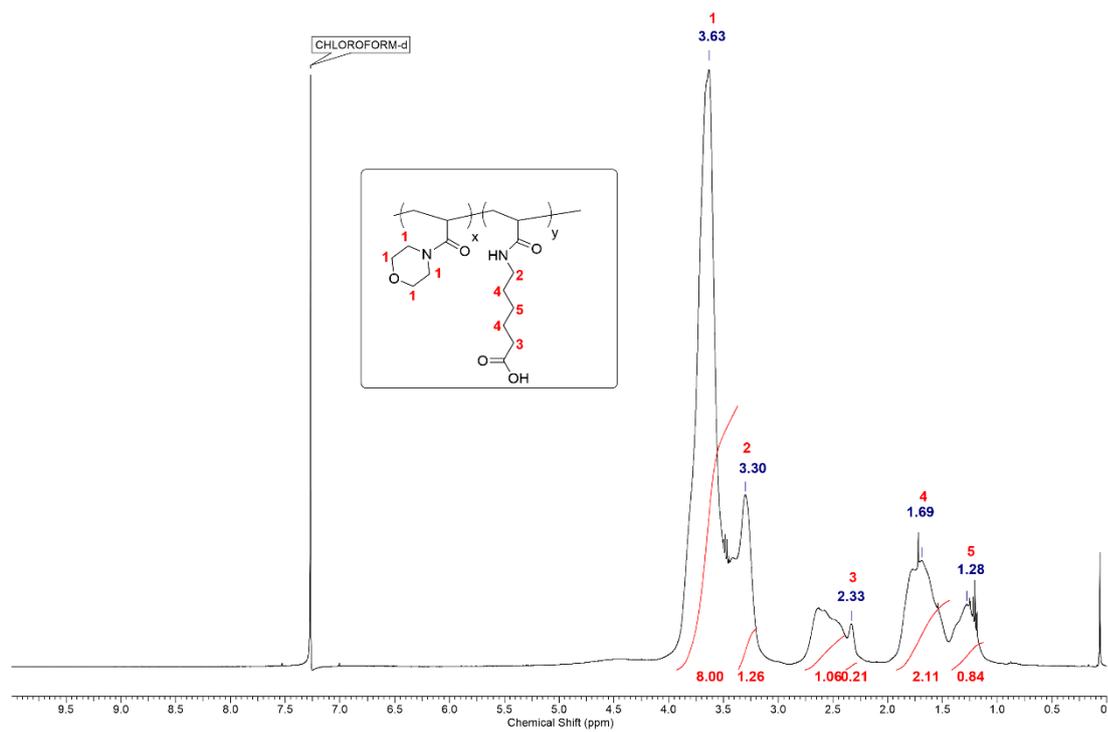
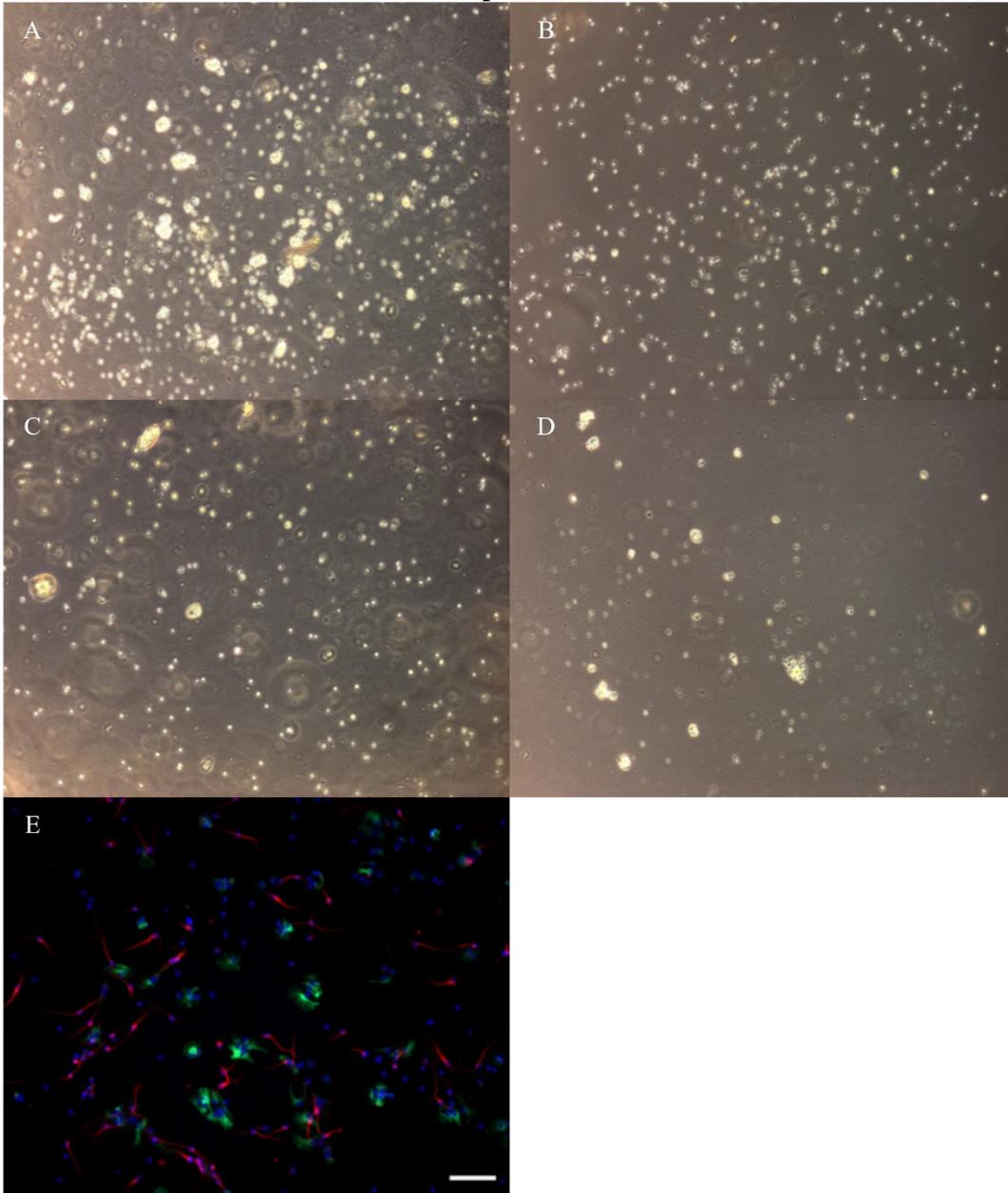
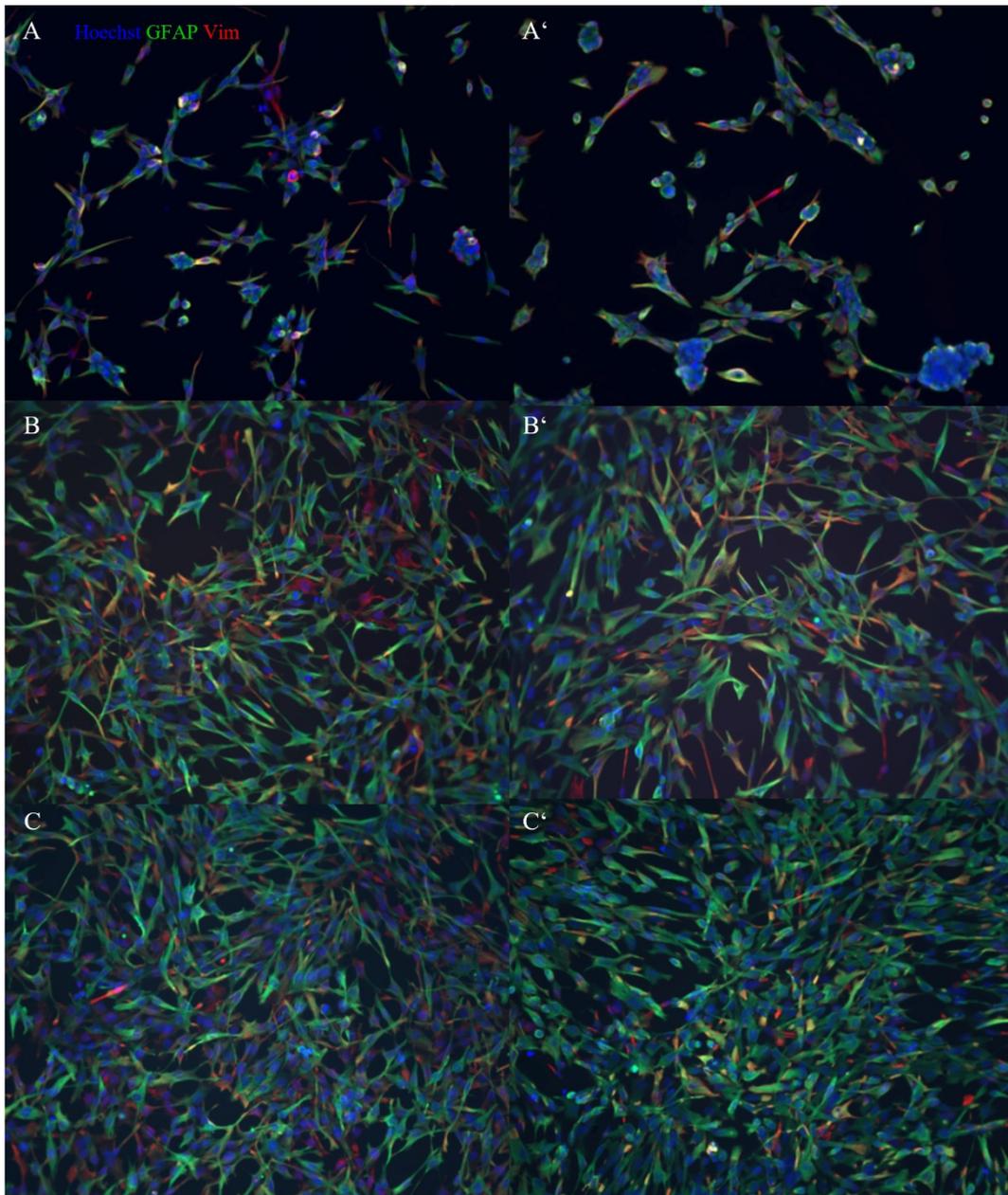


Abb. A 60:  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines PAMor-co-HSAA Polymers in  $\text{CDCl}_3$ .

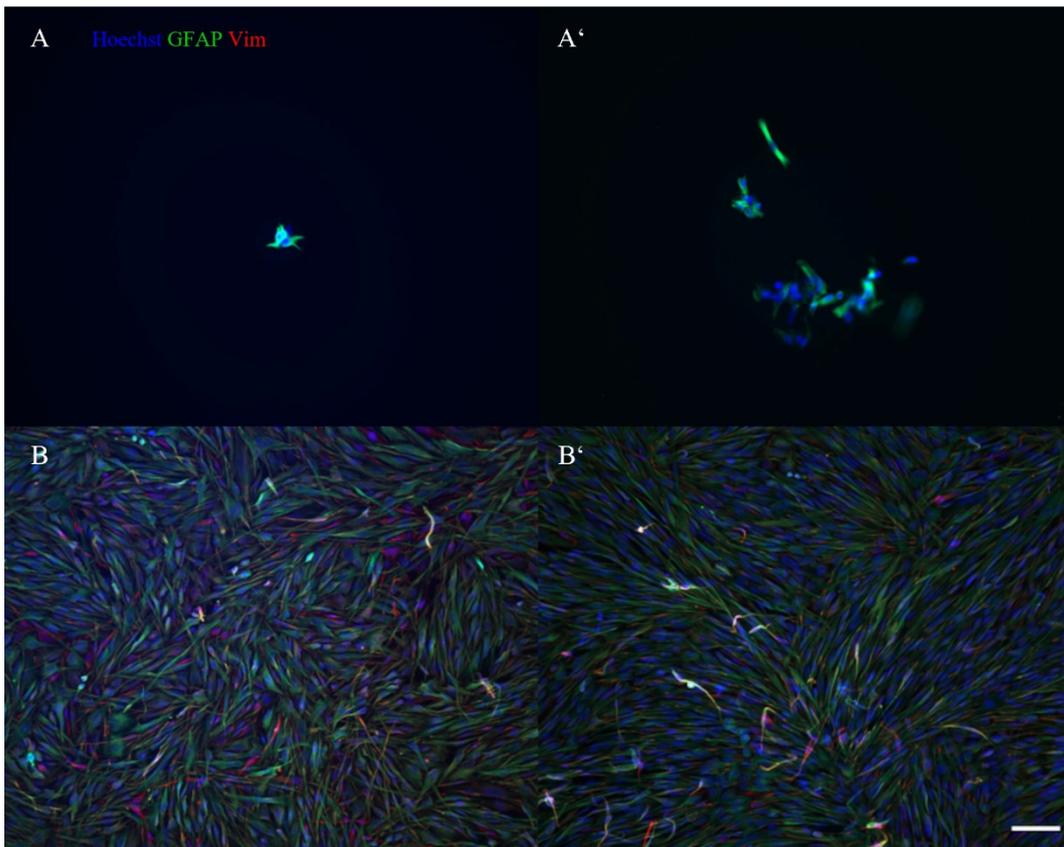
## Zelleexperimente



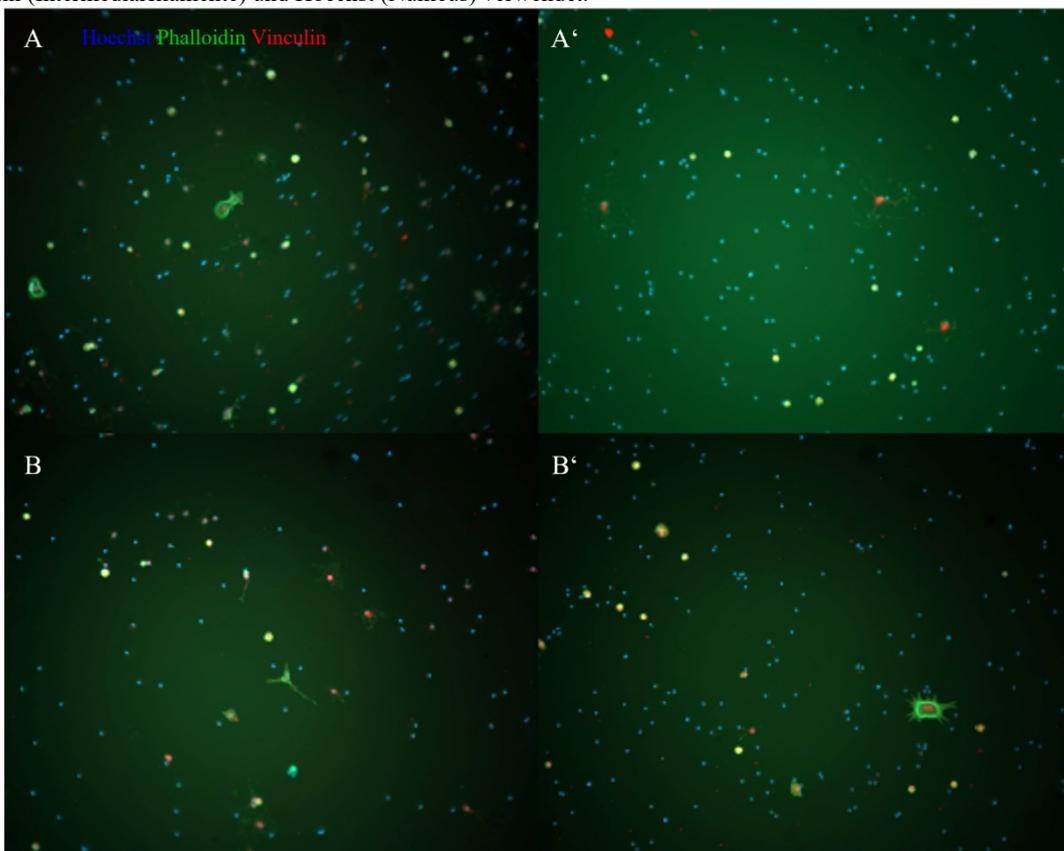
**Abb. A 61:** Großaufnahmen der NSCs kultiviert auf **G1-G4** (A-D) nach 7 div, sowie Fluoreszenzfärbung von NSCs kultiviert auf Zellkulturschalen beschichtet mit Polyornithin als Kontrolle (E). (A) zeigt hierbei die NSCs auf einem RGD-funktionalisierten Hydrogel (**G3**), (B) auf einem kationischen Hydrogel (**G2**), (C) auf einem kombinierten Hydrogel mit kationischen Funktionalitäten und dem RGD-Peptid (**G4**) und (D) auf einem unfunktionalisiertem Hydrogel (**G1**). Die Fluoreszenzfärbung der Kontrolle wurde mit Hoechst (Zellkern), GFAP (Astrozyten) und  $\beta$ III-Tubulin (Neuronen) durchgeführt.



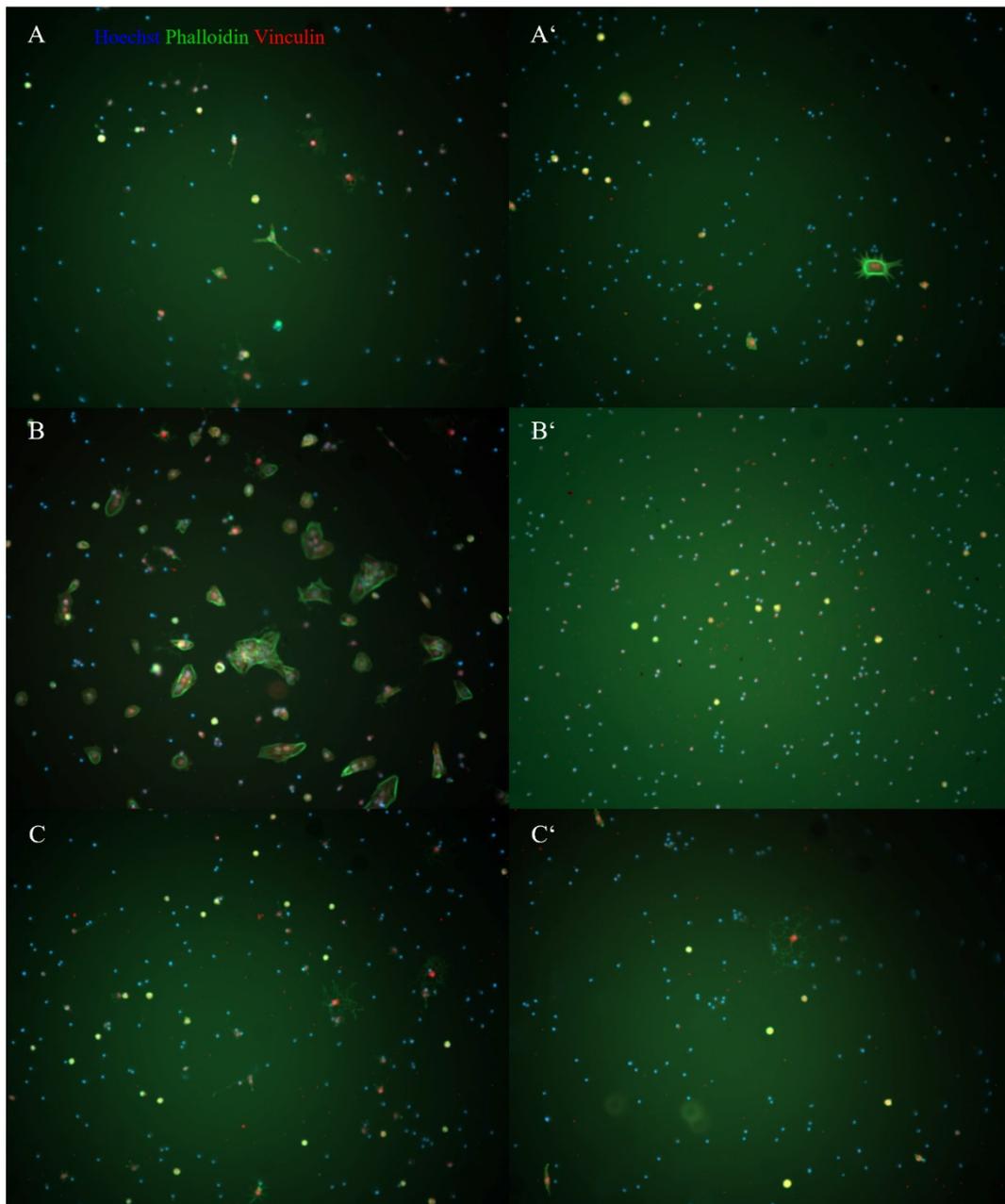
**Abb. A 62:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Hydrogelen mit RGD (A, A'), TMAEA (B, B') und TMAEA in Kombination mit RGD (C, C') für 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Intermediärfilamente) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



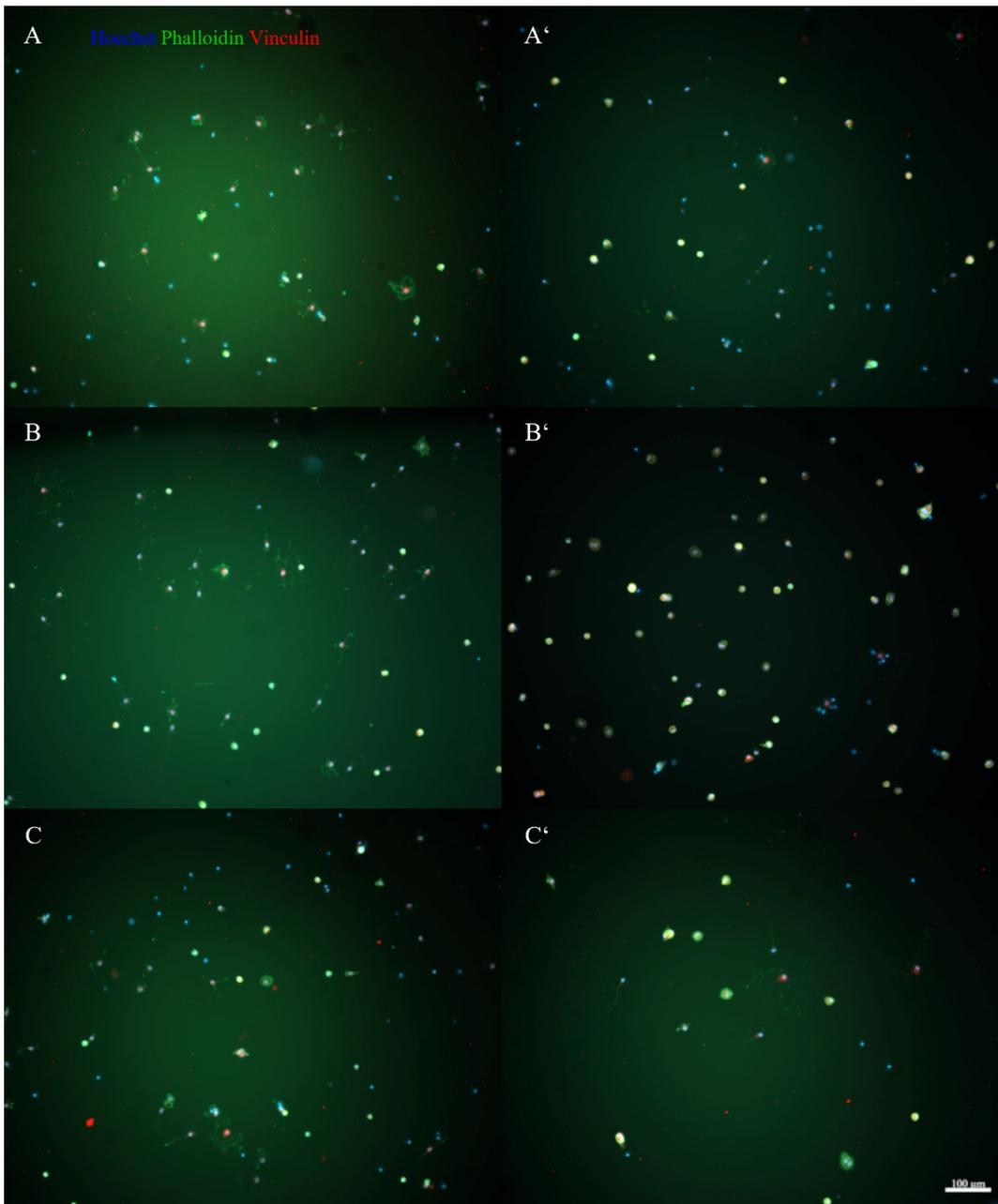
**Abb. A 63:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, A') und einer mit Polyornithin beschichteten Zellkulturschale (B, B') für 3 (A-B) und 7 div (A'-B'). Als Marker wurden GFAP (Astrozyten), Vimentin (Intermediärfilamente) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



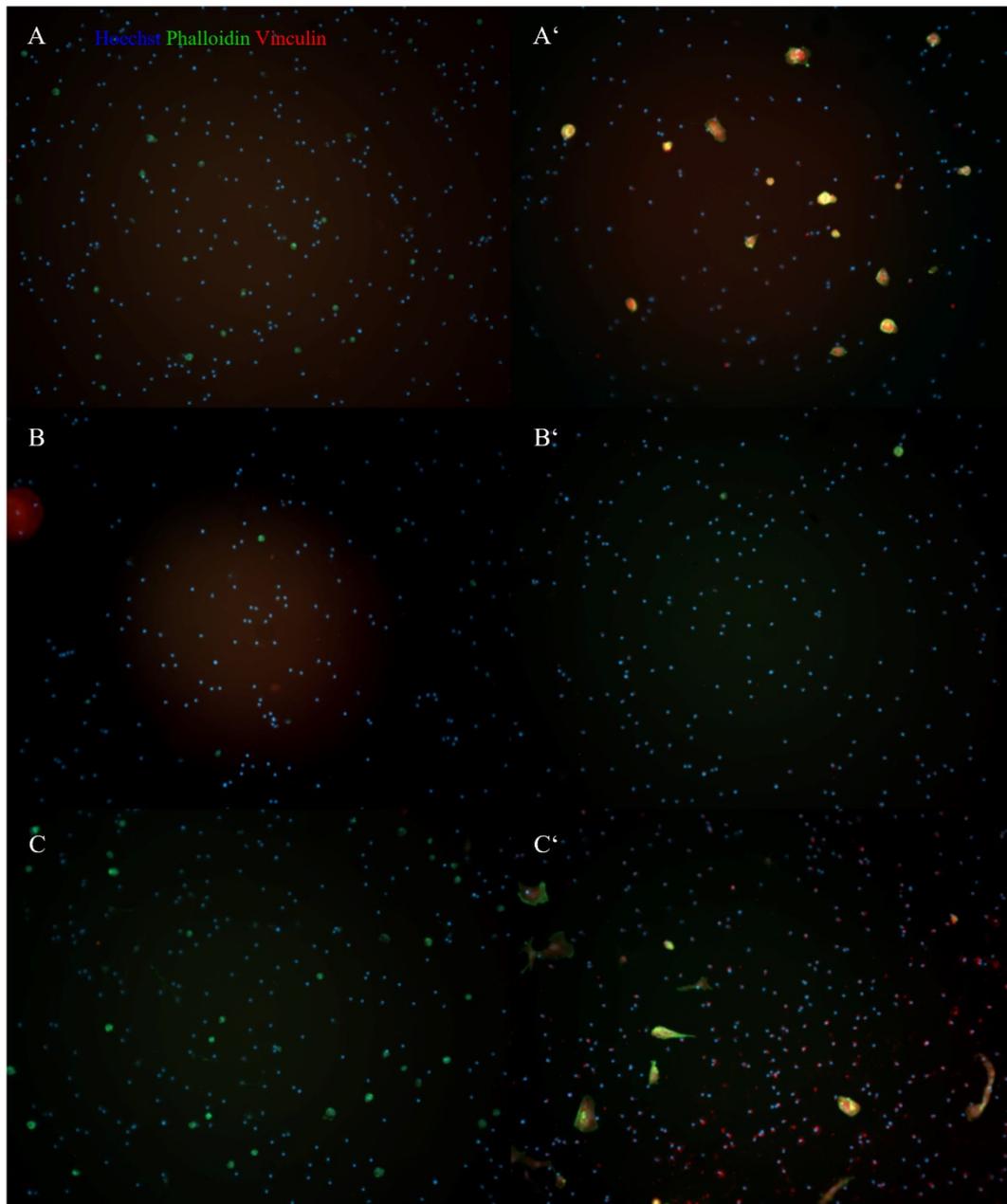
**Abb. A 64:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit einer Steifigkeit von 2 kPa (A, A') und 3 kPa (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



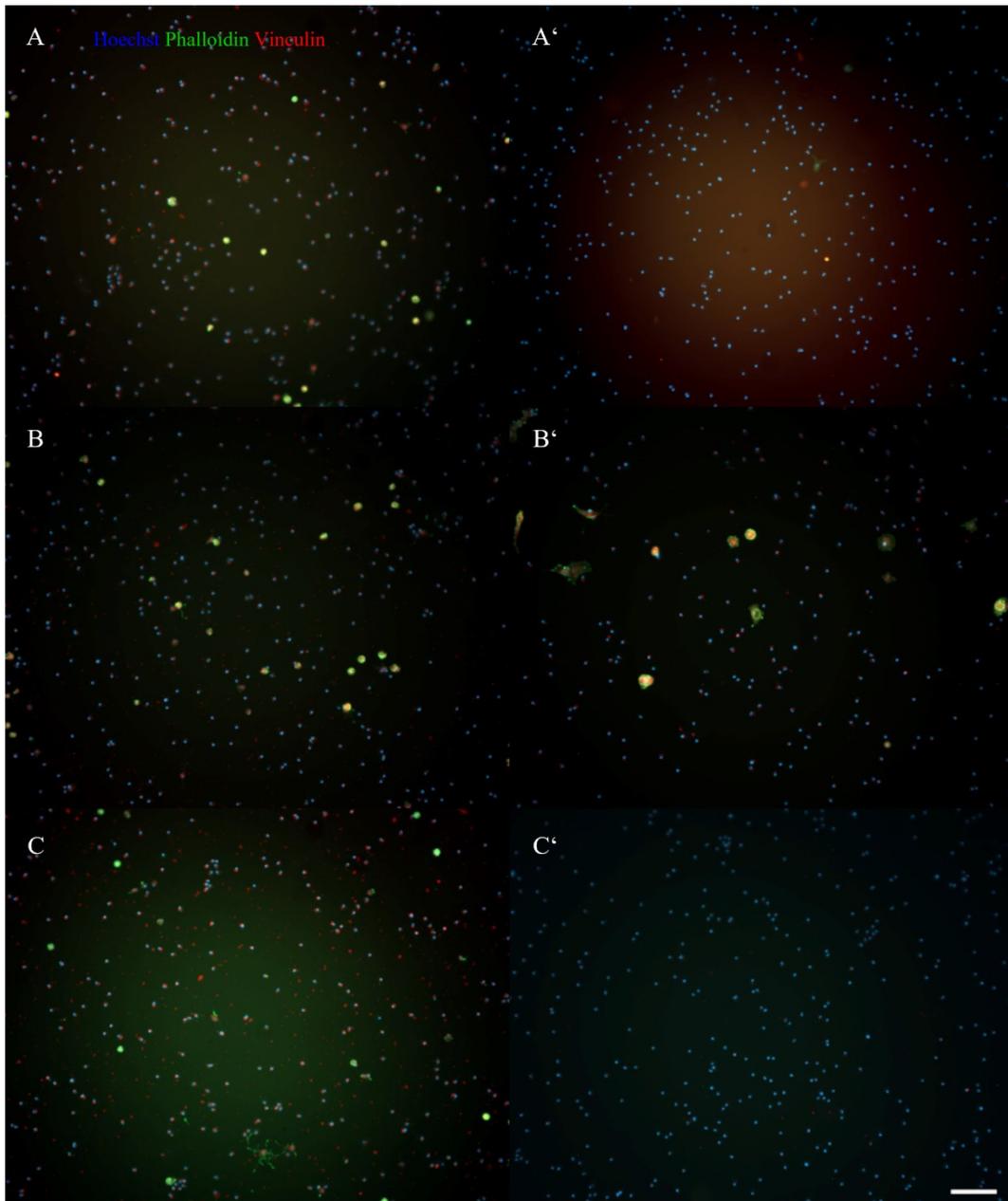
**Abb. A 65:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen (A, A'), in Kombination mit Laminin (B, B') und in Kombination mit TNC (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



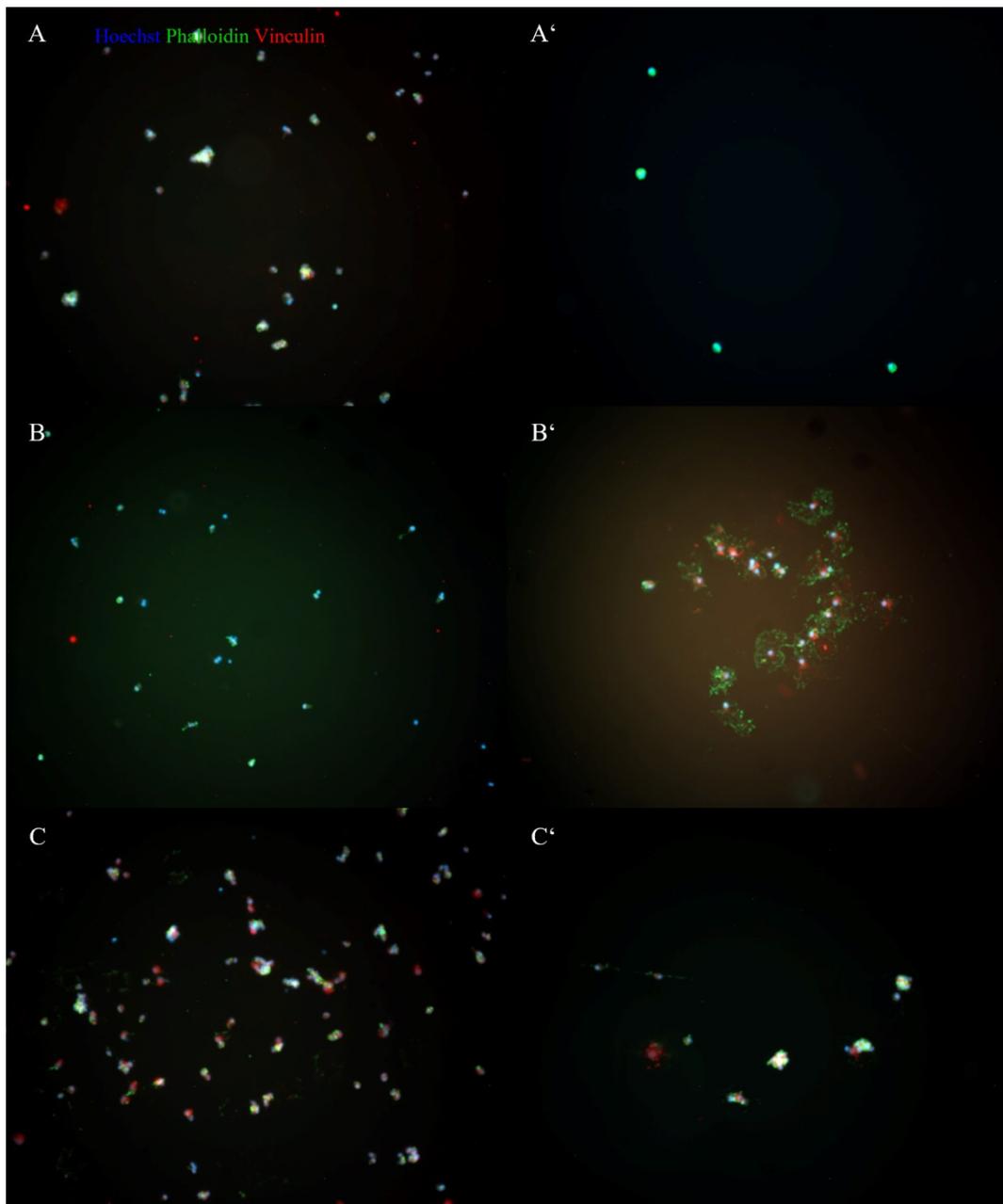
**Abb. A 66:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, A'), in Kombination mit Laminin (B, B') und in Kombination mit TNC (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



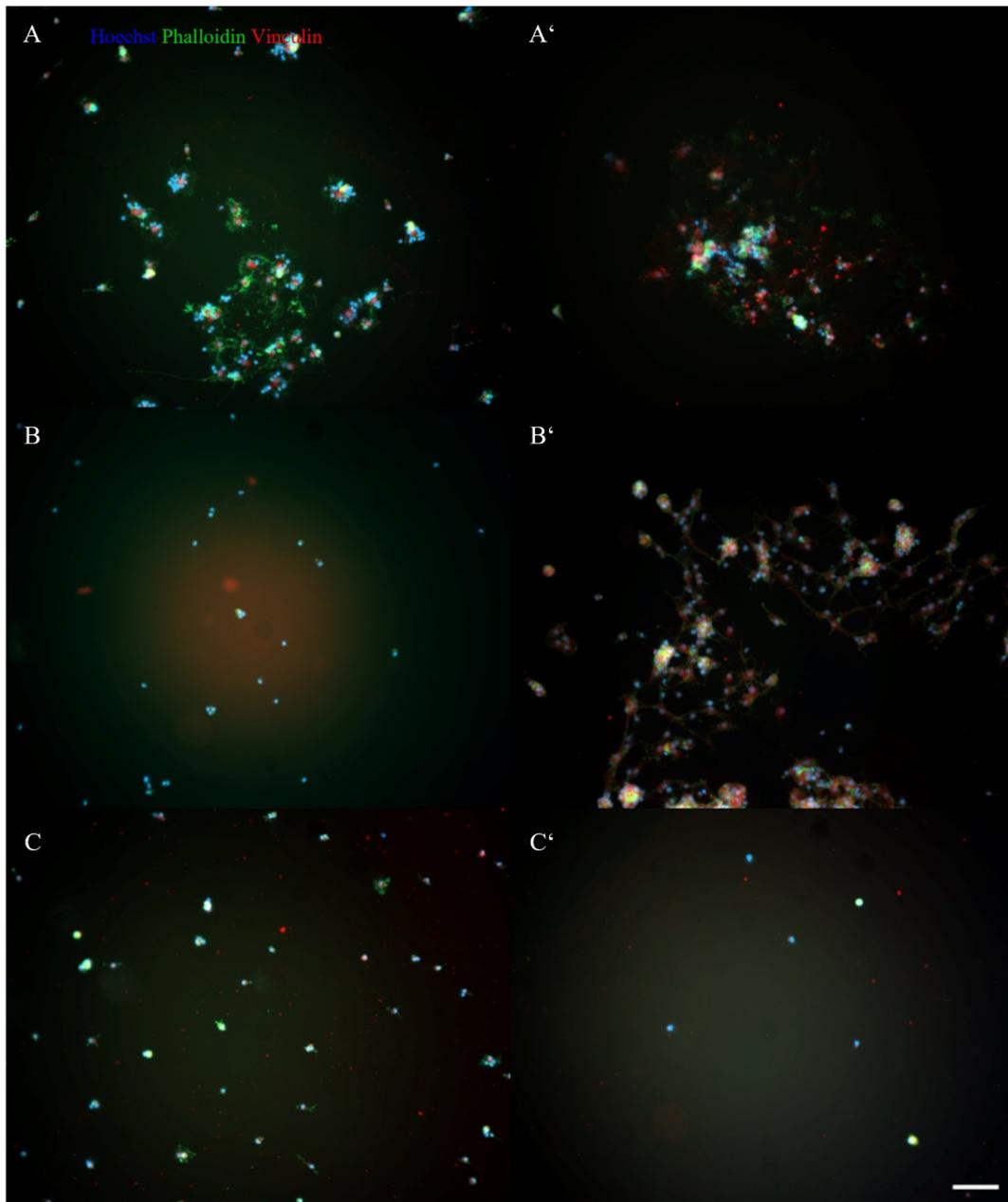
**Abb. A 67:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen in Kombination mit FGF (A, A'), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin und FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



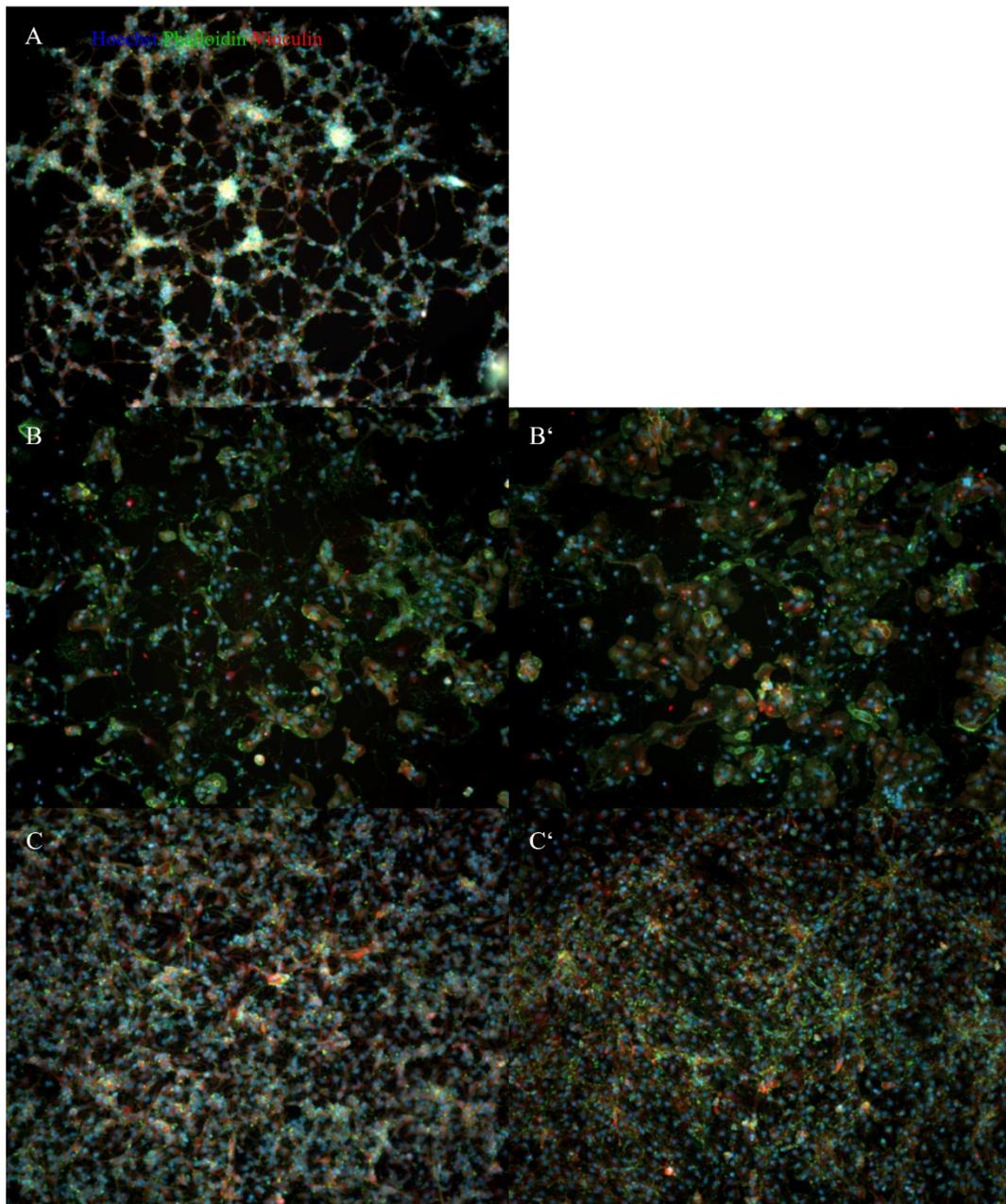
**Abb. A 68:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



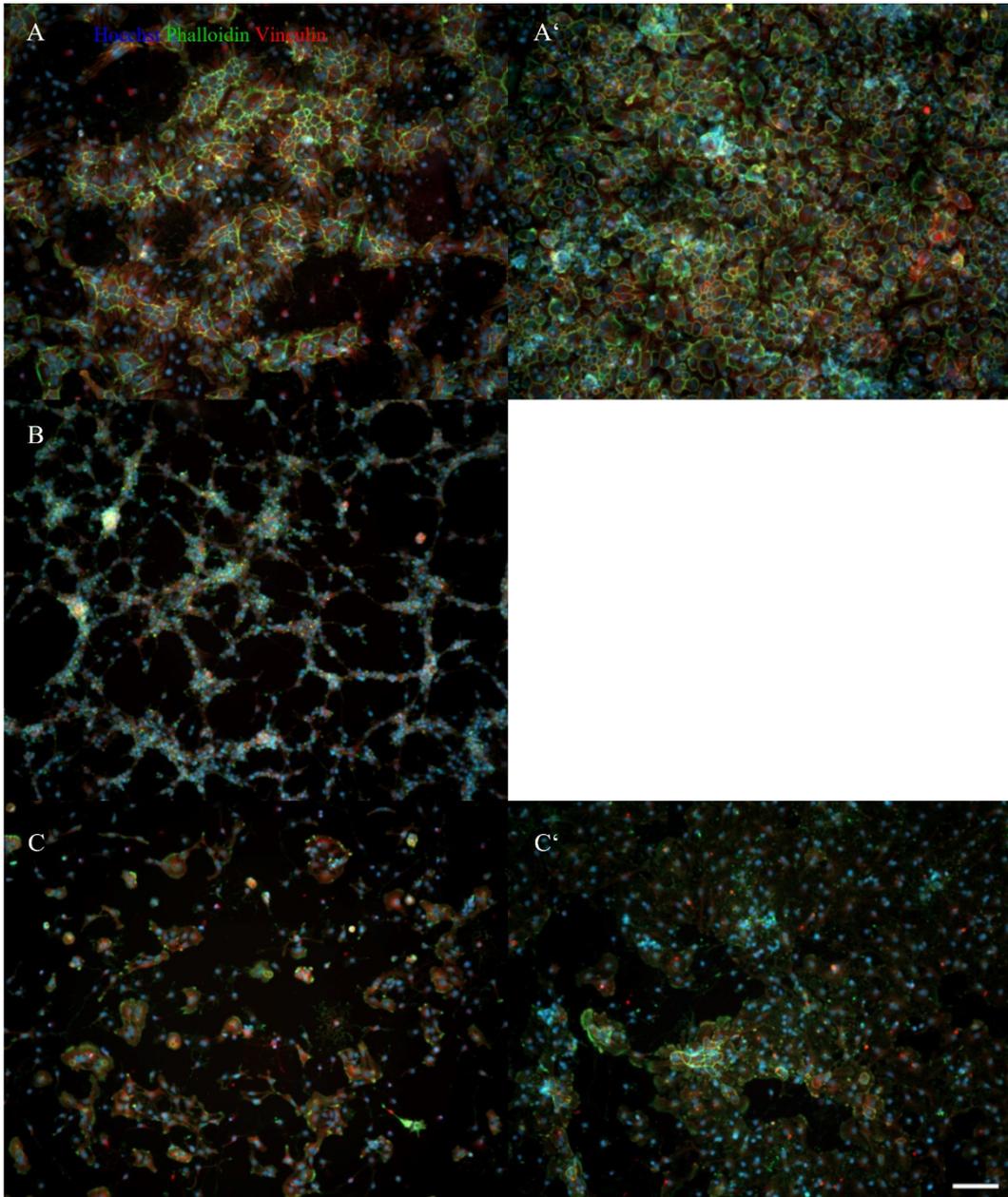
**Abb. A 69:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit FGF (A, A'), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



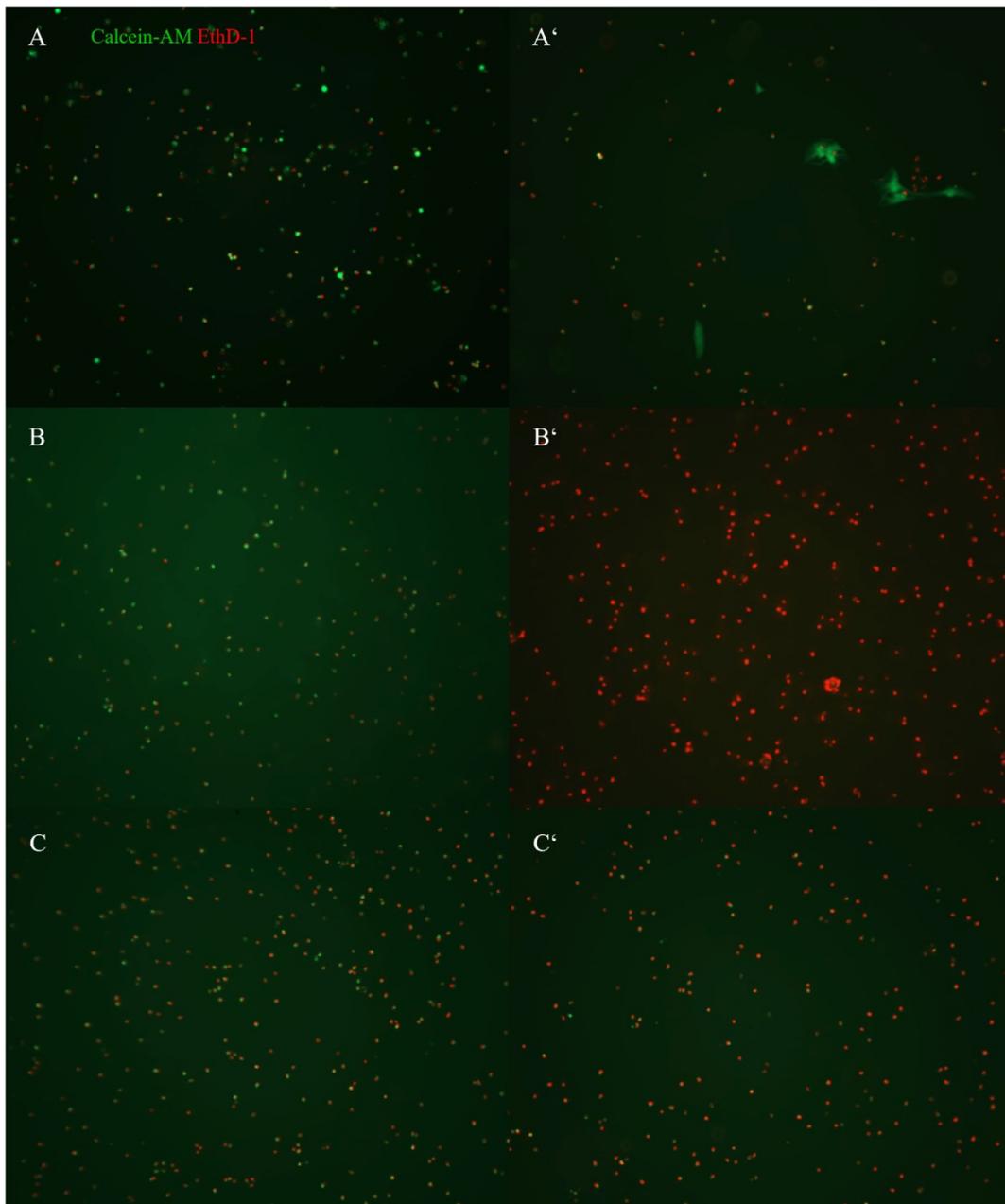
**Abb. A 70:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



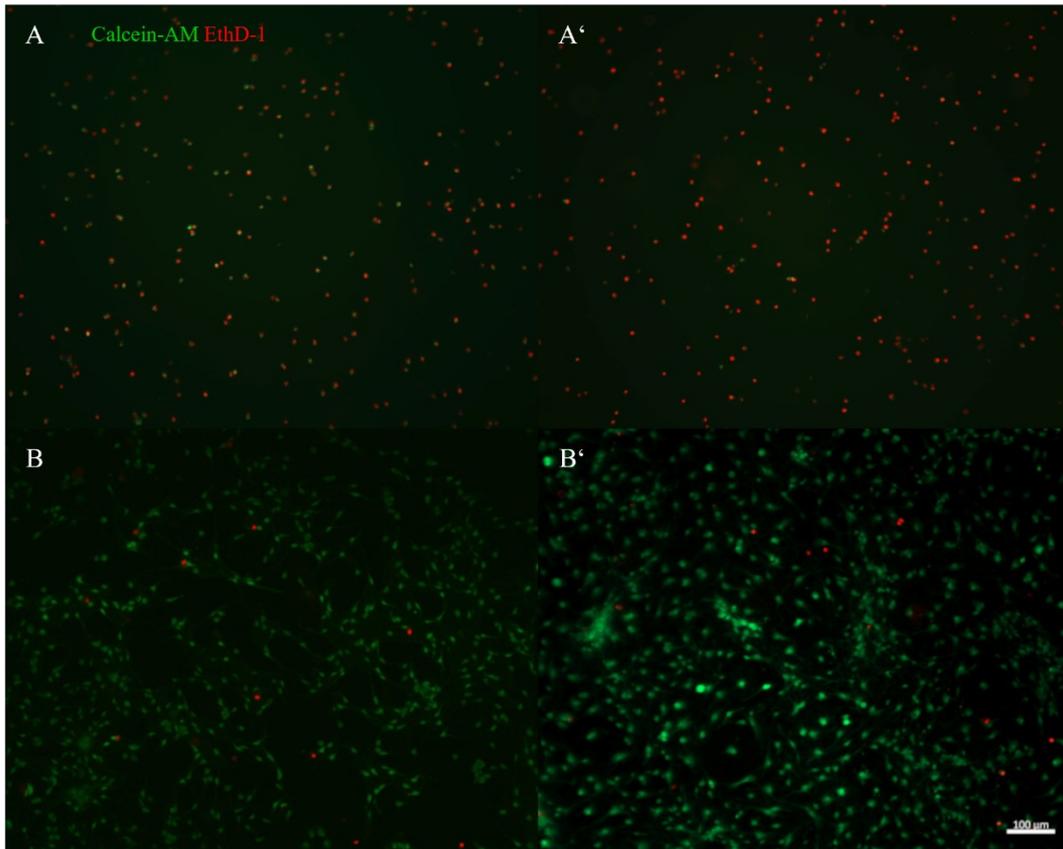
**Abb. A 71:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen in Kombination mit FGF (A), ohne FGF (B, B') und in Kombination mit Laminin (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (B', C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



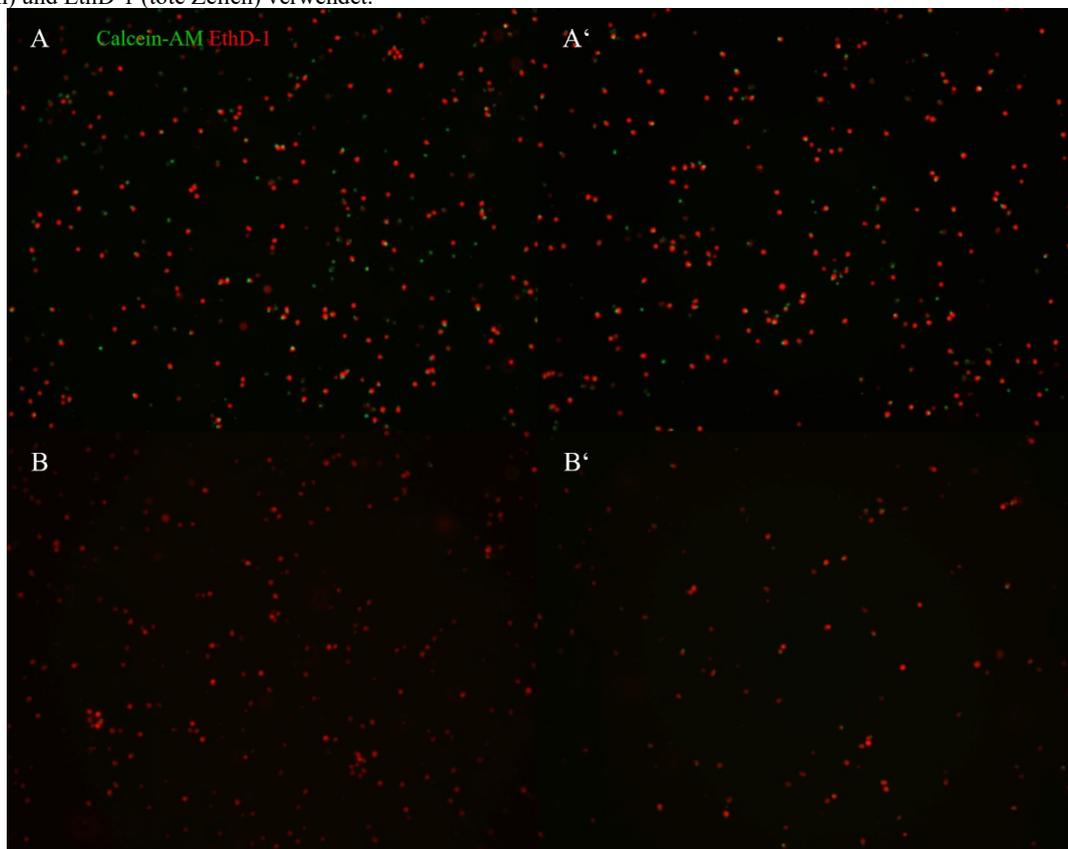
**Abb. A 72:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen in Kombination mit Laminin (A, A'), in Kombination mit TNC und FGF (B, B') und in Kombination mit TNC ohne FGF (C, C') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Als Marker wurden Phalloidin (Zytoskelett), Vinculin (fokale Adhäsion) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



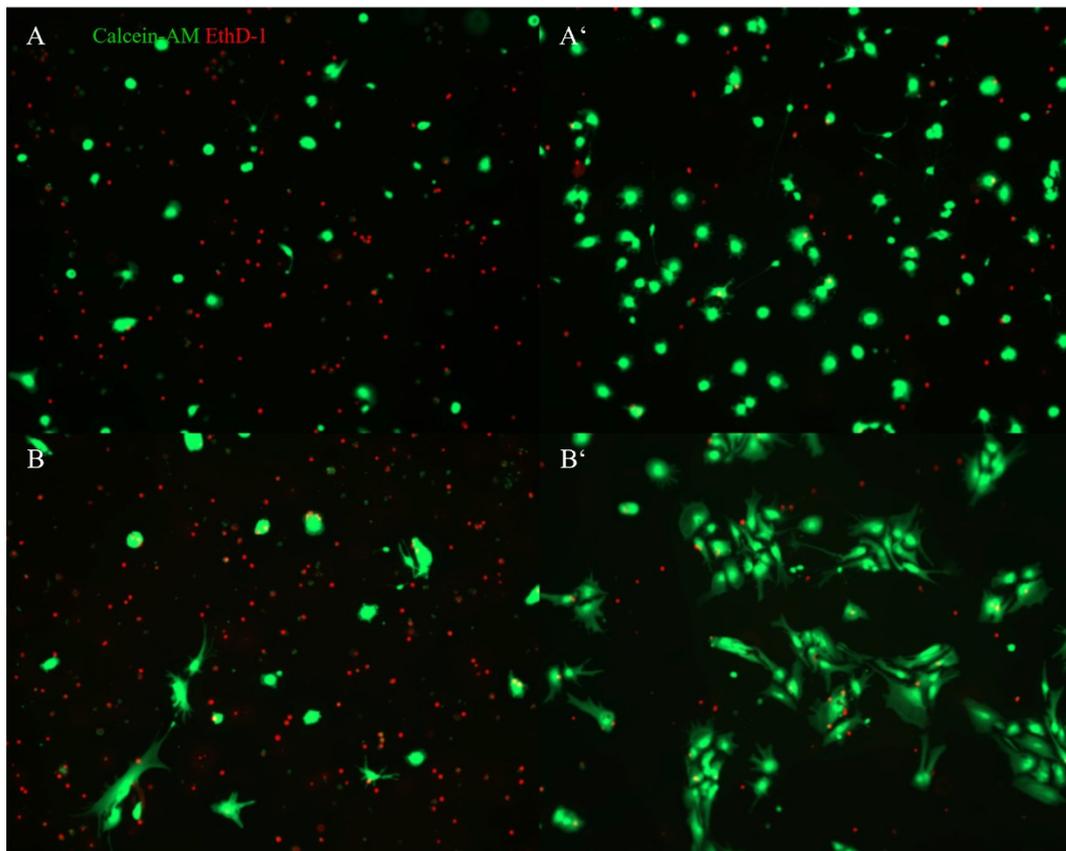
**Abb. A 73:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit unterschiedlichen hydrophilen Monomeren nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Es wurde TMAEA (A, A'), AEMA (B, B') und APropAc (C, C') als hydrophiles Monomer verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



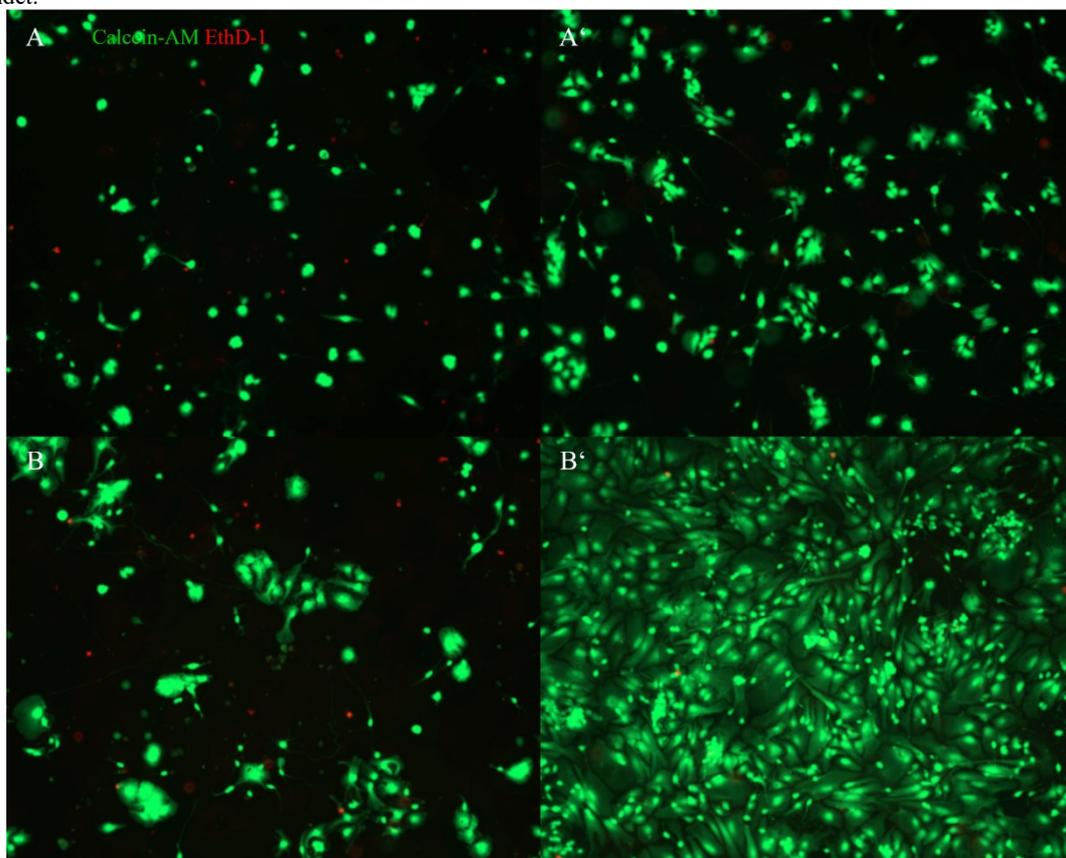
**Abb. A 74:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf Hydrogelen mit AEEAc (A, A') als hydrophile Komponente und auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



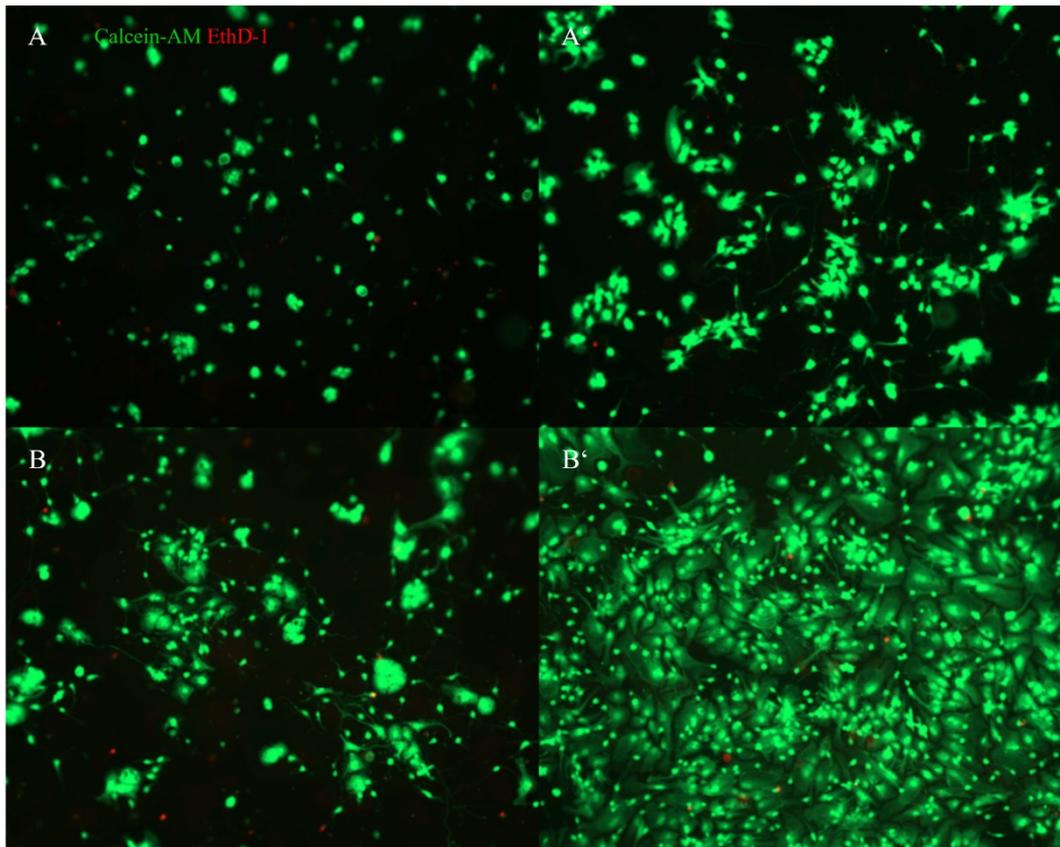
**Abb. A 75:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-575 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



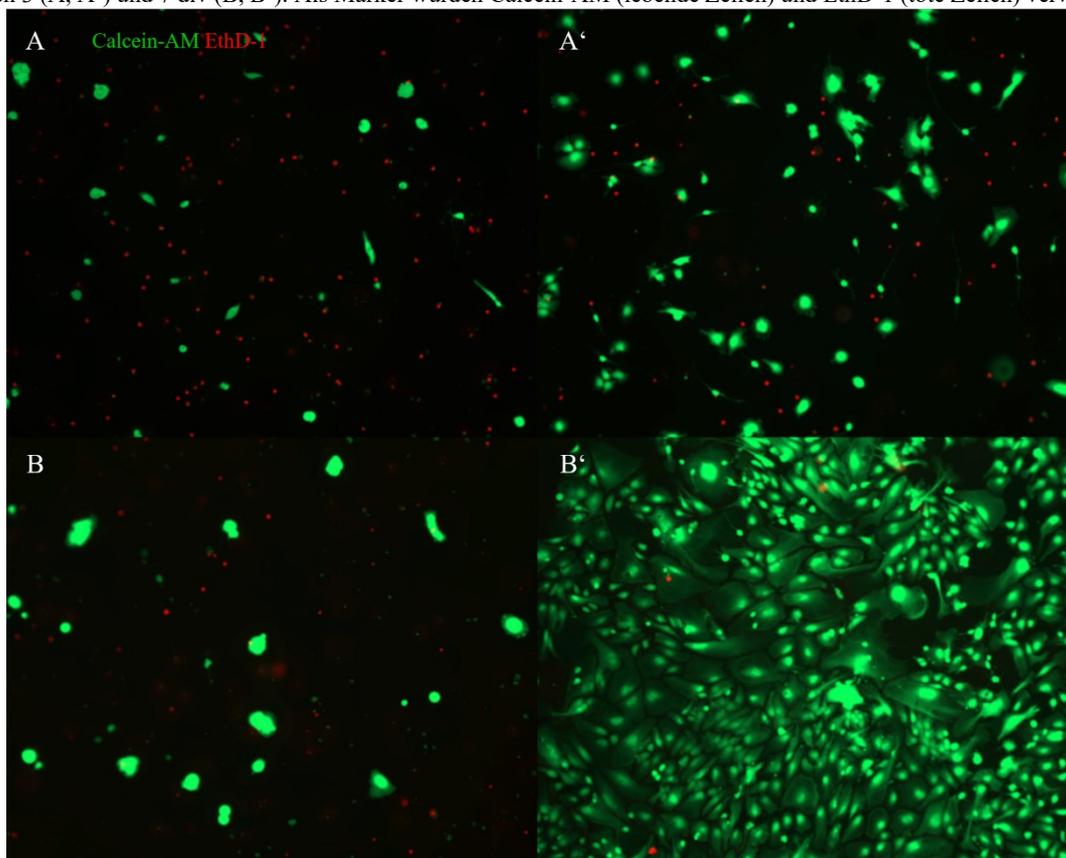
**Abb. A 76:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-3500 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



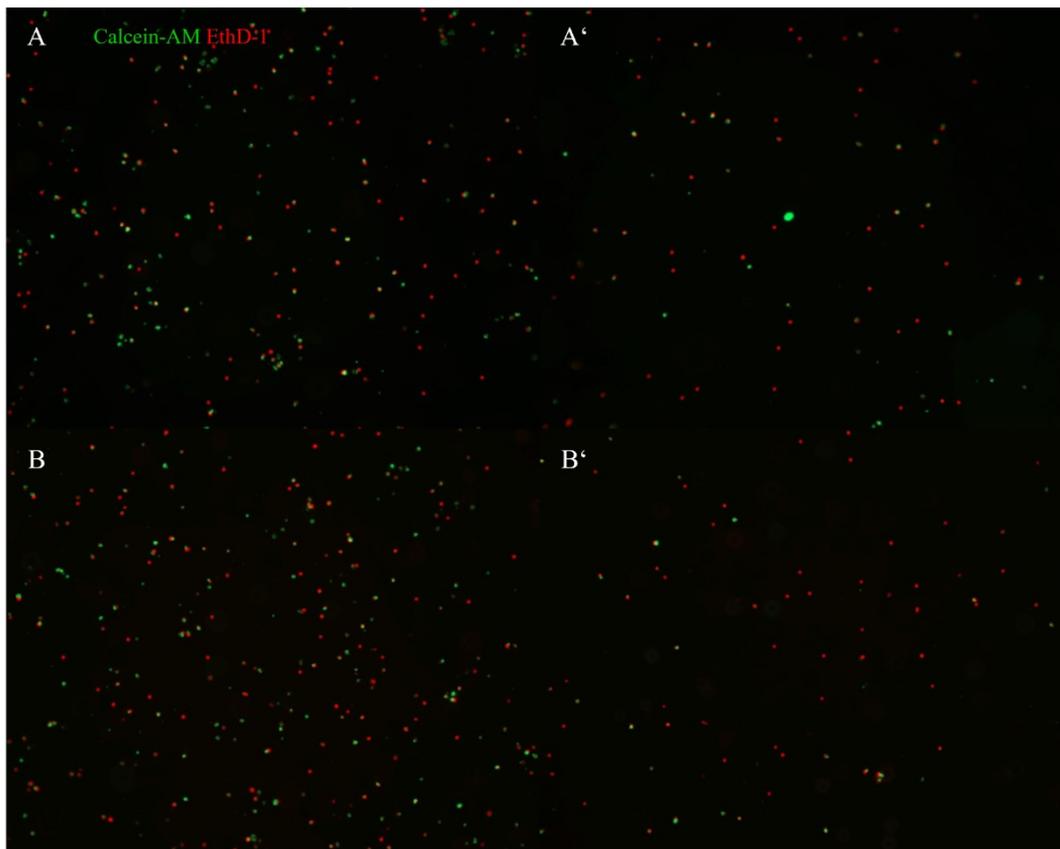
**Abb. A 77:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEG-1000 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



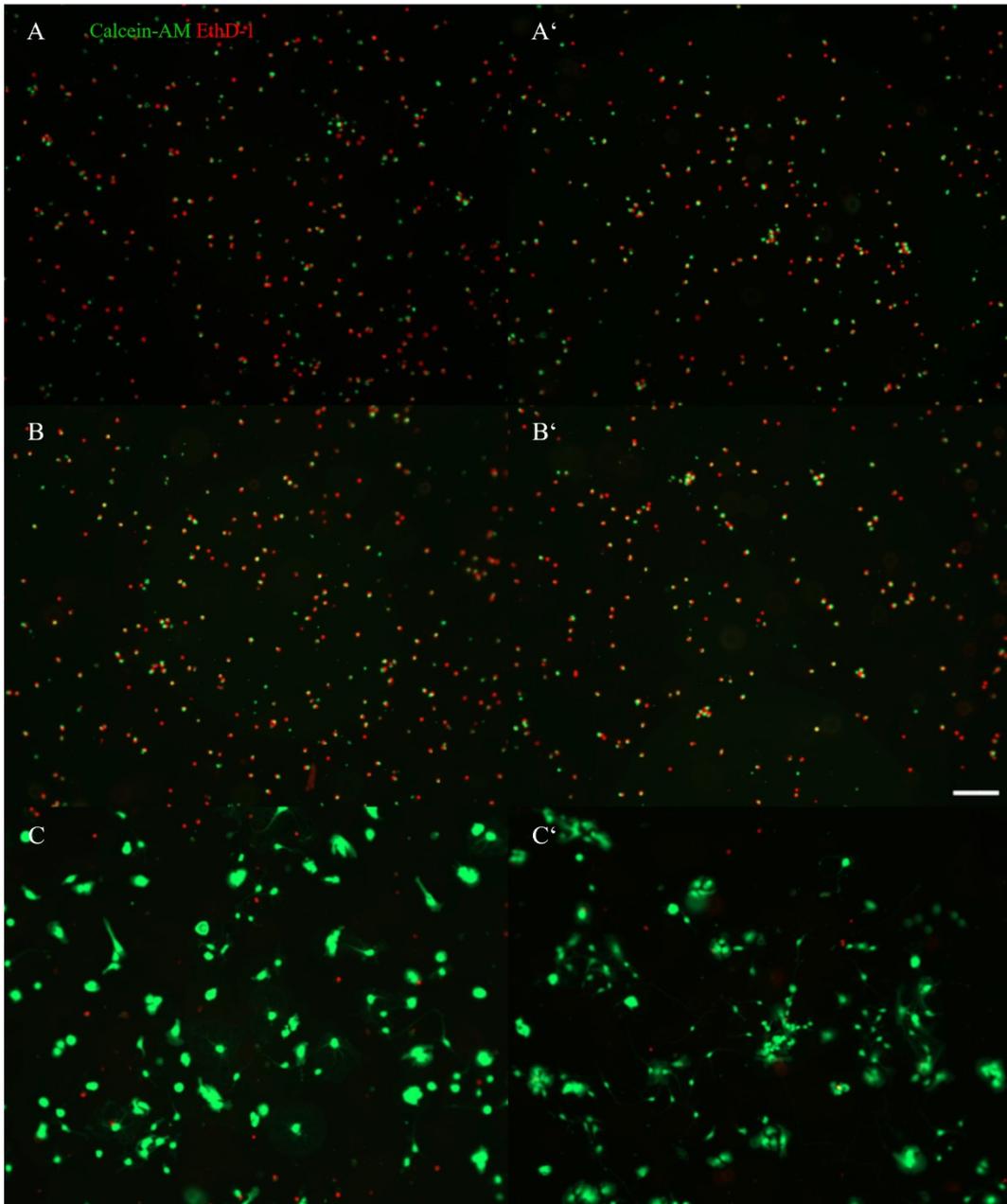
**Abb. A 78:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEG-3400 (A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



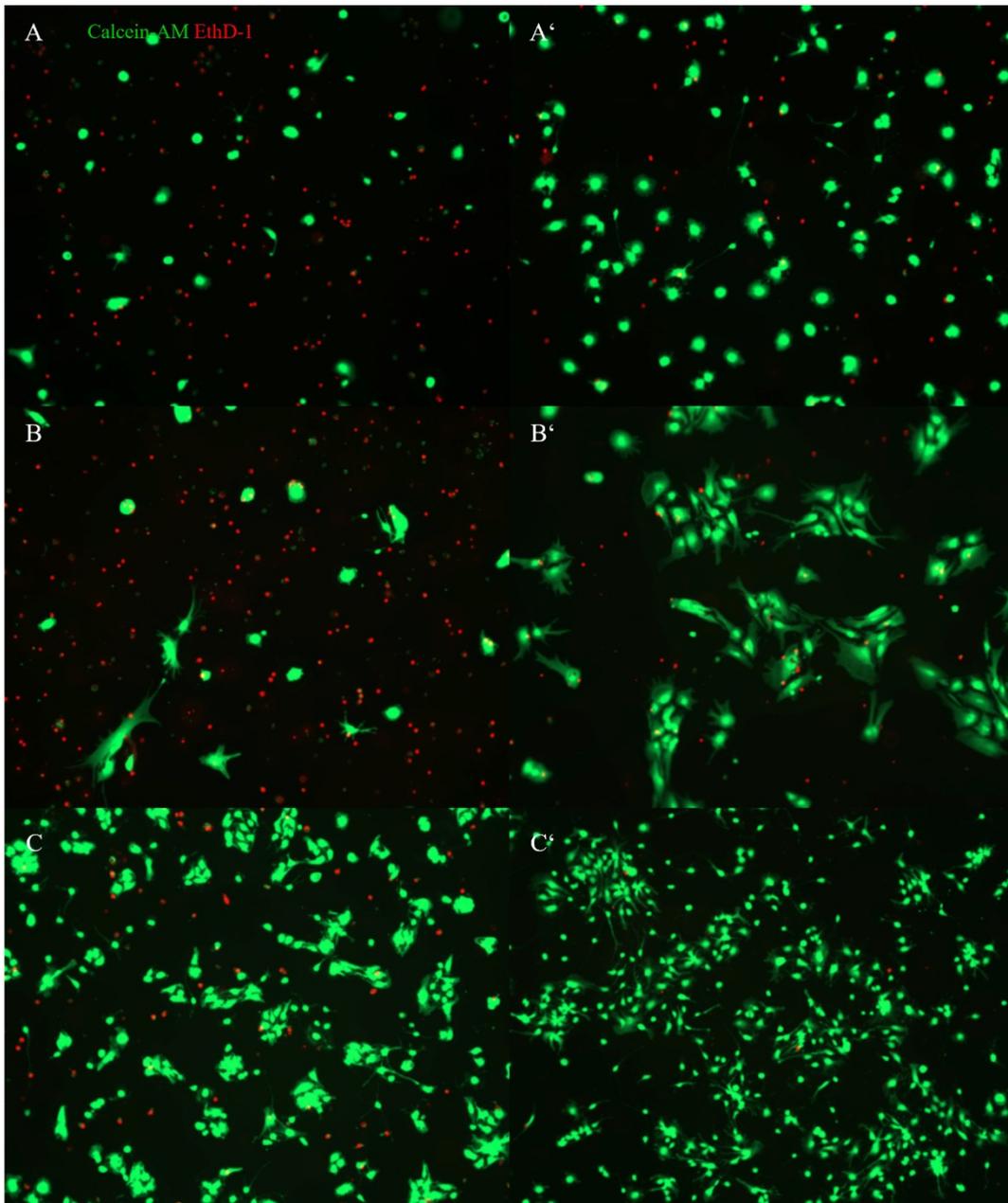
**Abb. A 79:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-Amin (A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



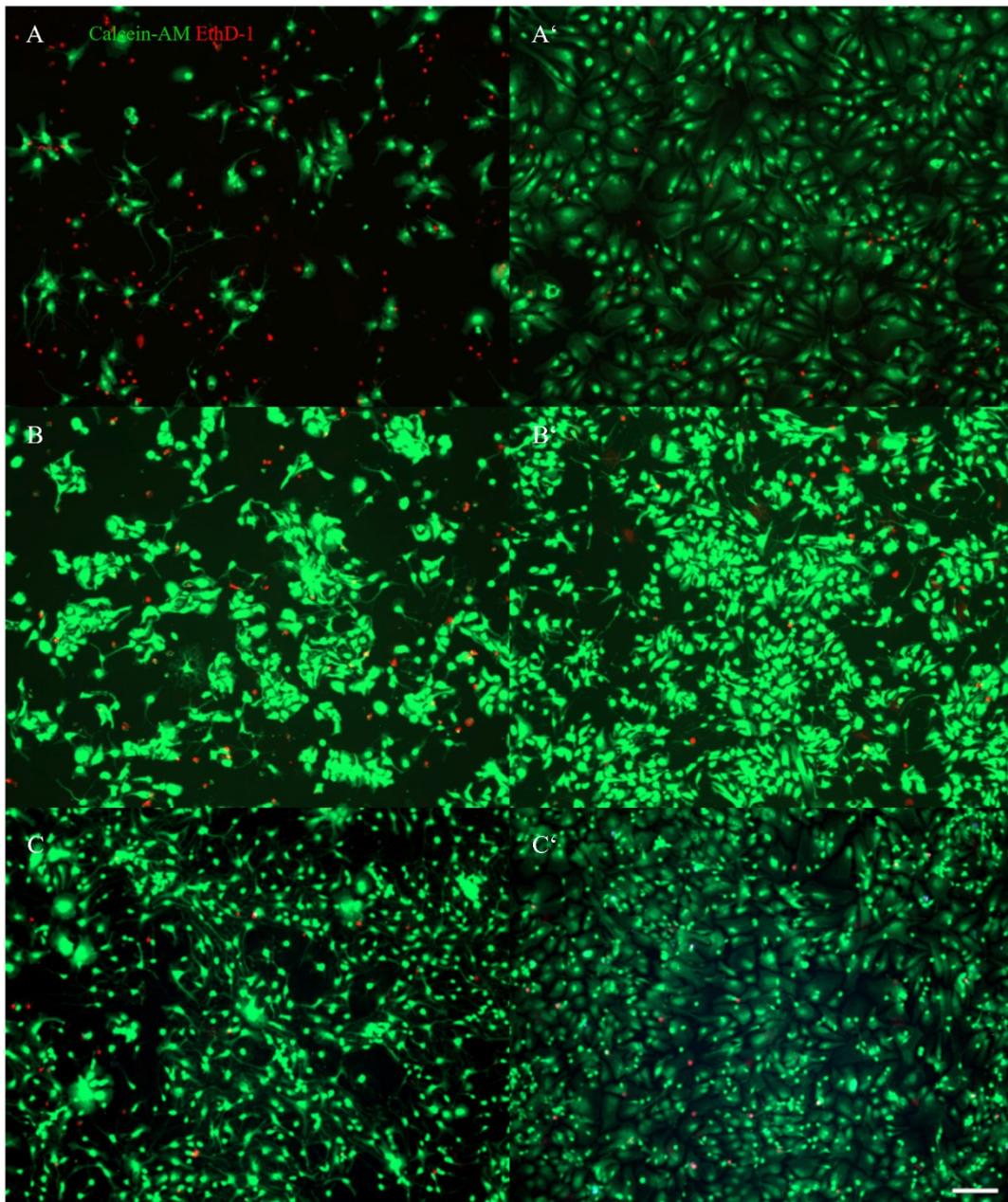
**Abb. A 80:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-DVS (abbaubar, A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



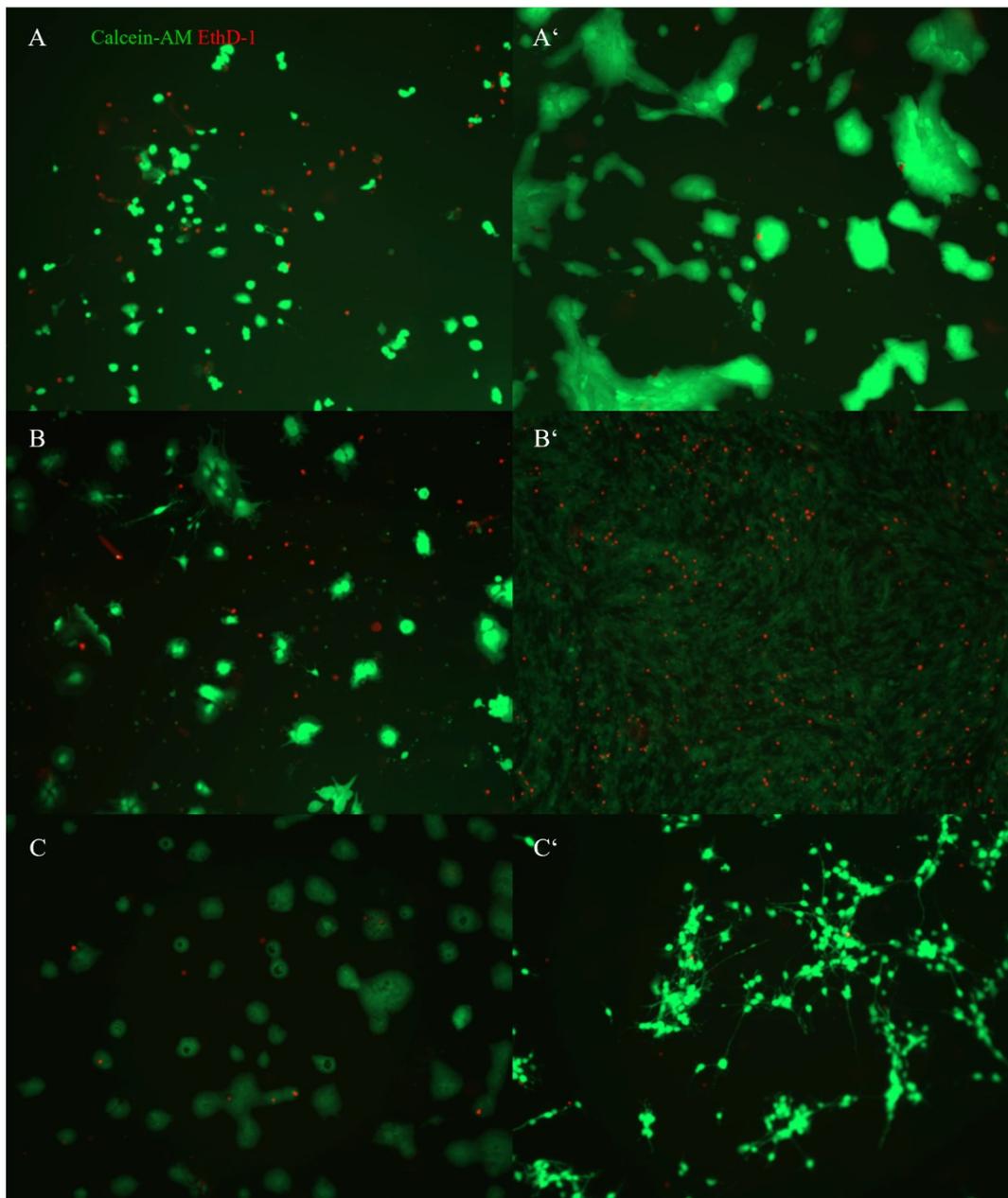
**Abb. A 81:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer POx-Ac (nicht abbaubar, A, B) und in Kombination mit Laminin (A', B'), sowie Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen (C, C') nach 3 (A, A', C) und 7 div (B, B', C'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



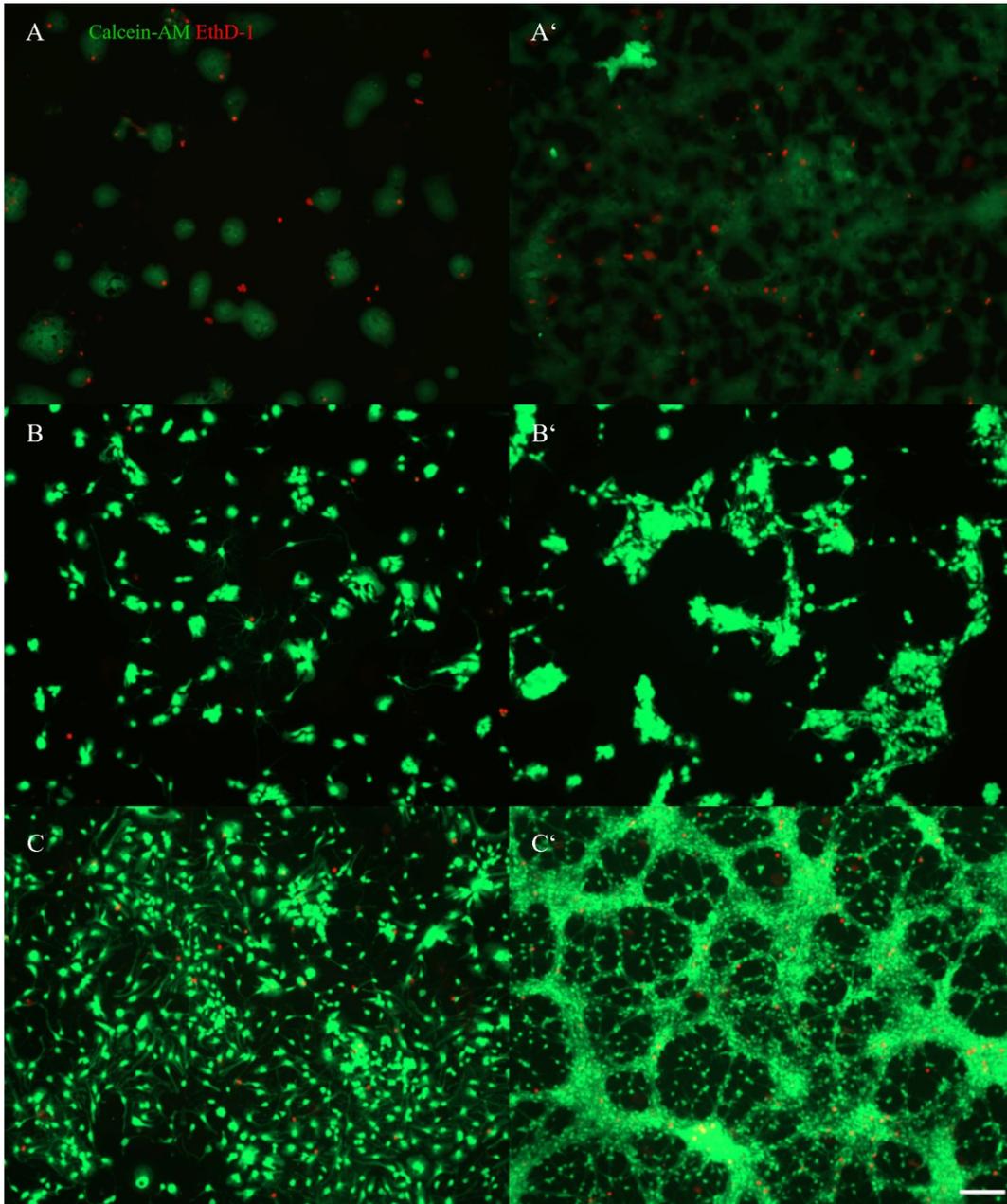
**Abb. A 82:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem Vernetzer PEGDA-3500(A-C) und in Kombination mit Laminin (A'-C') nach 3 (A, A' C) und 7 div (B, B', C'). Für C und C' wurde der dialysierte PEGDA-3500 Vernetzer verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



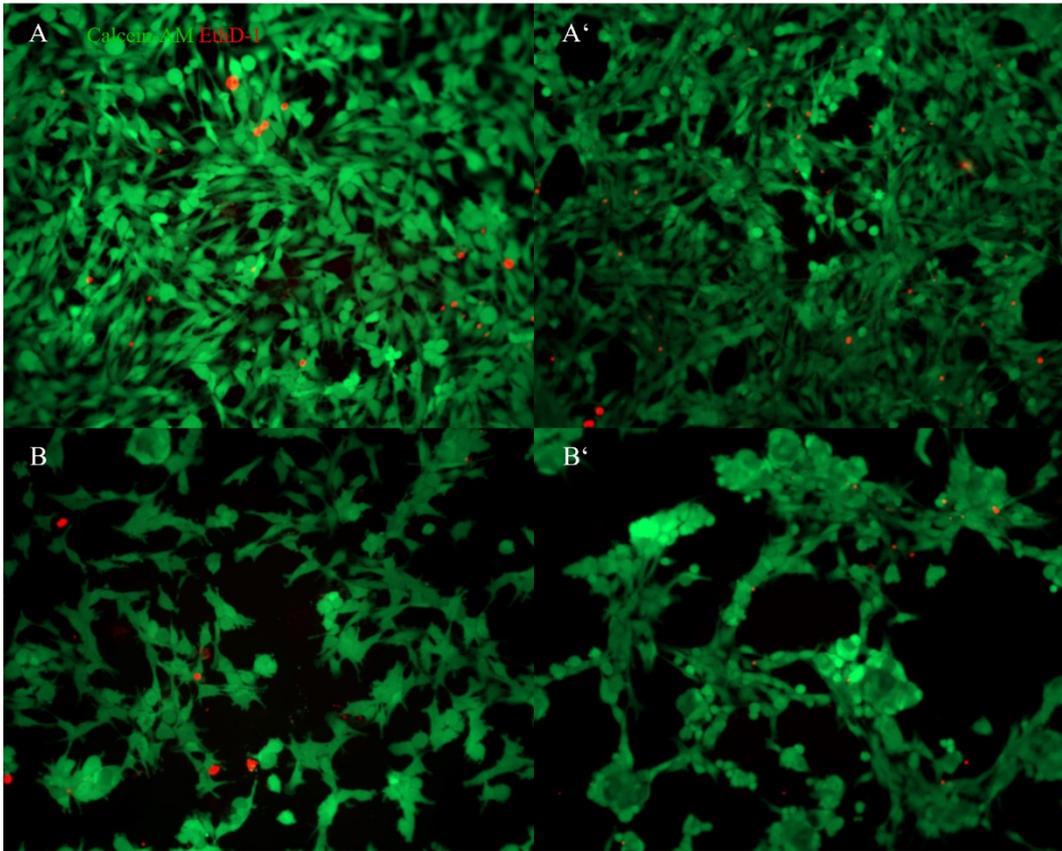
**Abb. A 83:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert mit dem dialysierten Vernetzer PEGDA-3500(A, A') nach 7 div und auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (B, C), sowie in Kombination mit Laminin (B', C') nach 3 (B, B') und 7 div (C, C'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



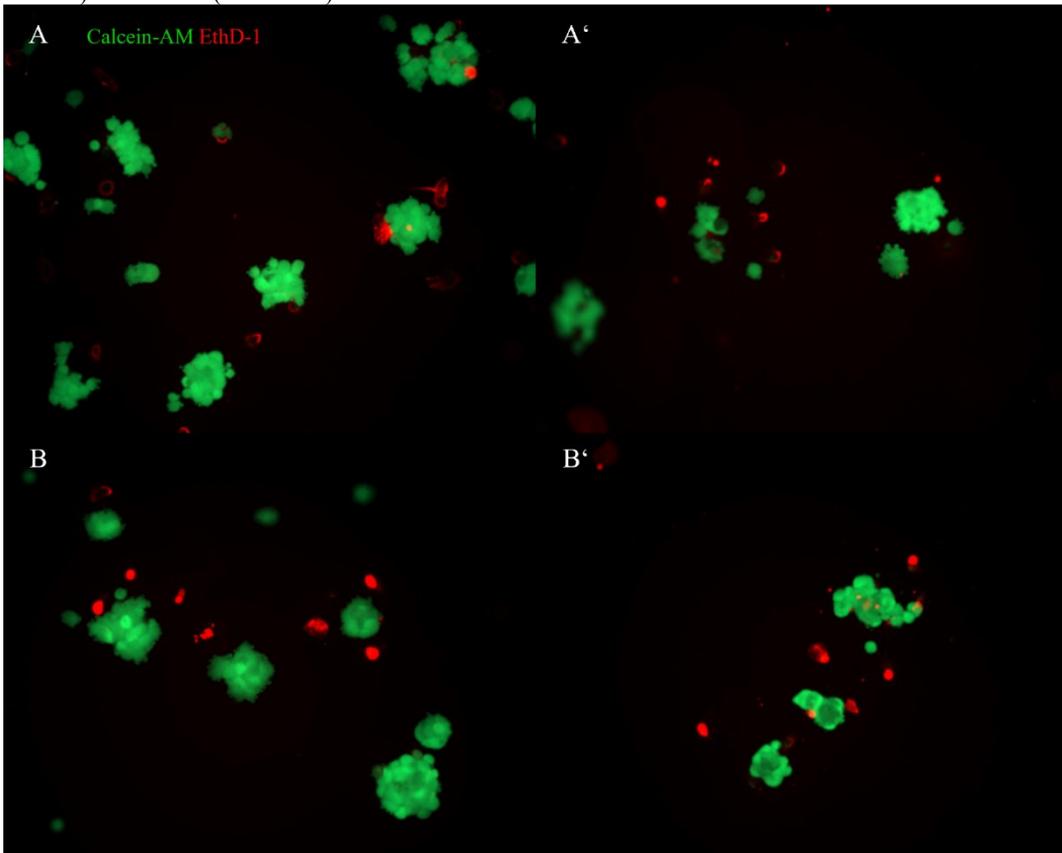
**Abb. A 84:** Grobaufnahme von NSCs kultiviert auf dialysierten Hydrogelen nach 3 und 7 div. Es wurde ein kationisches Hydrogel (A, B), sowie in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B') verwendet. Zusätzlich wurde ein unfunktionalisiertes Hydrogel (C), sowie in Kombination mit FGF (C') nach 3 div betrachtet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



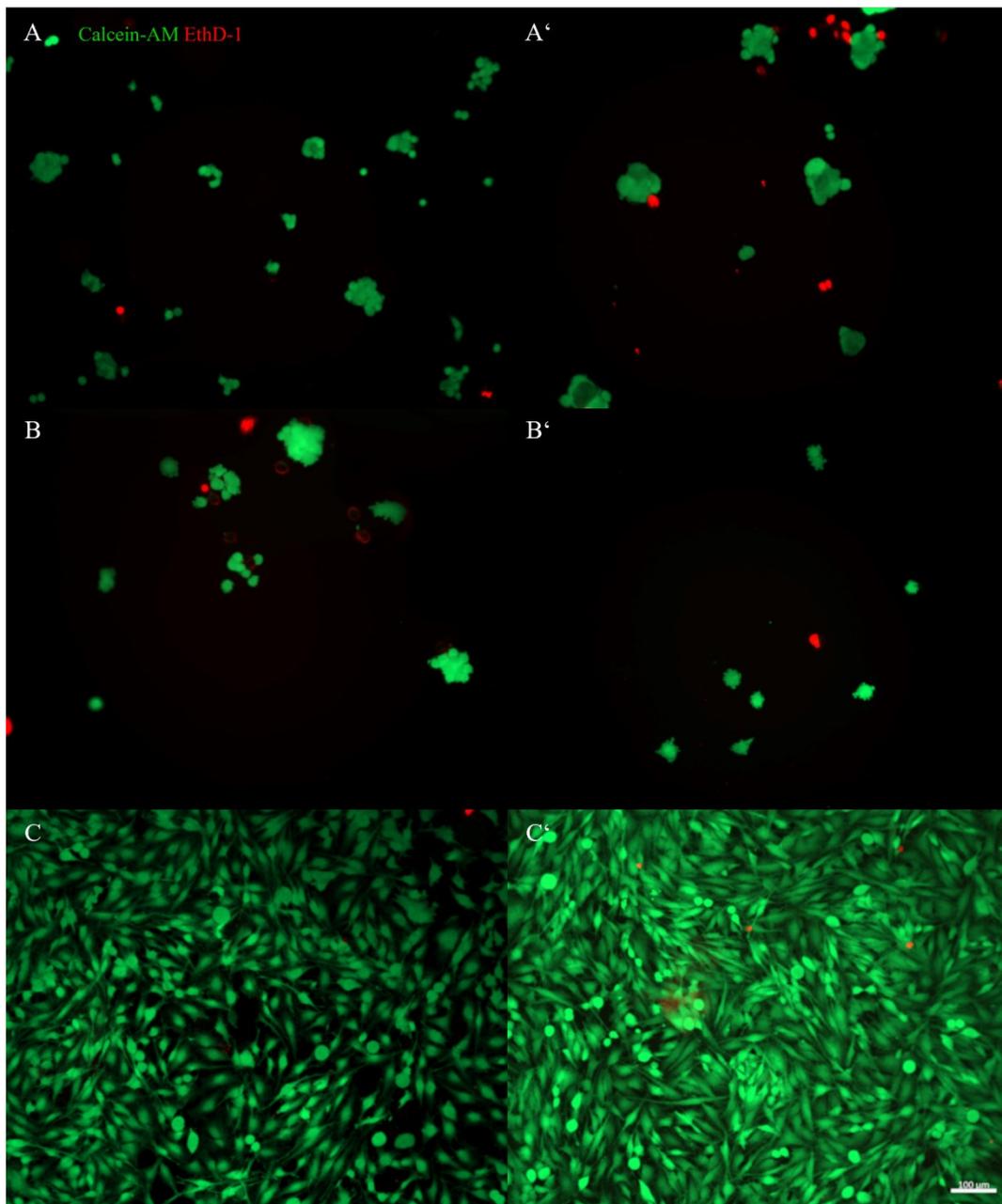
**Abb. A 85:** Großaufnahme von NSCs kultiviert auf einem dialysierten, unfunktionalisierten Hydrogel (A), sowie in Kombination mit FGF (A') nach 7 div. Zusätzlich wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale (B, C), sowie in Kombination mit FGF (B', C') nach 3 (B, B') und 7 div (C, C') betrachtet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



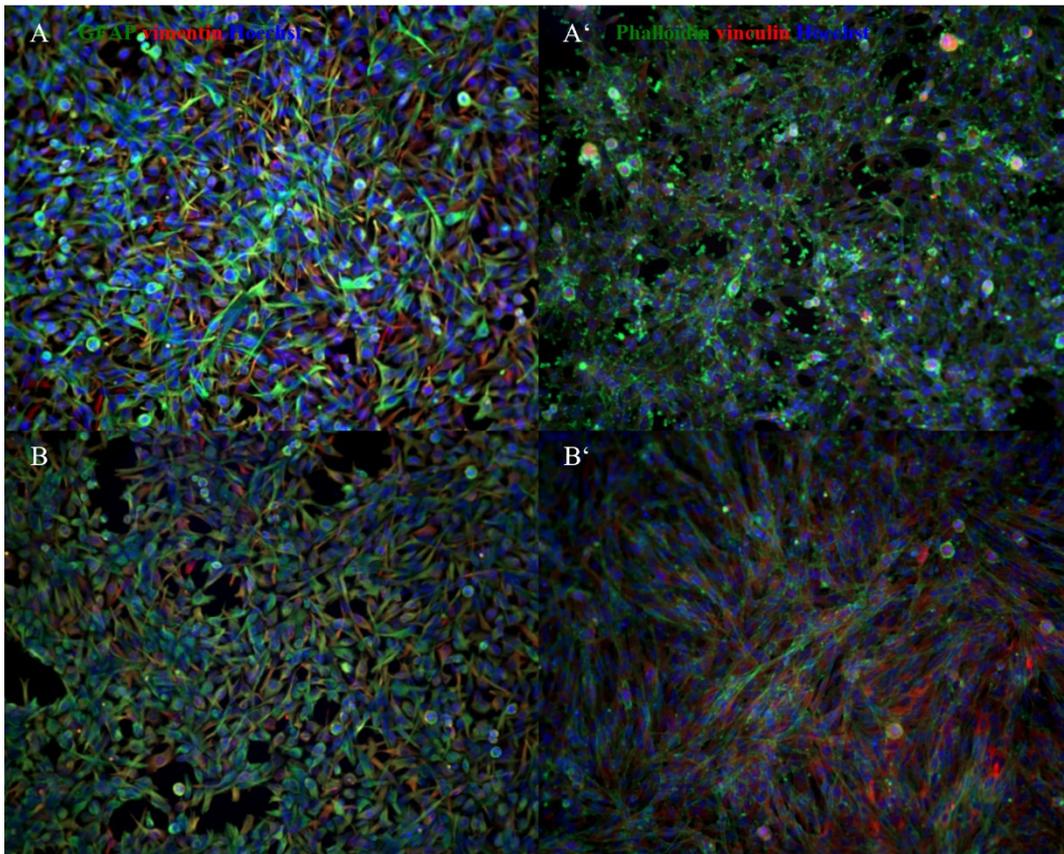
**Abb. A 86:** Grob­aufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91 µmol/mg Gel (A, A') und 0.46 µmol/mg Gel (B,B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



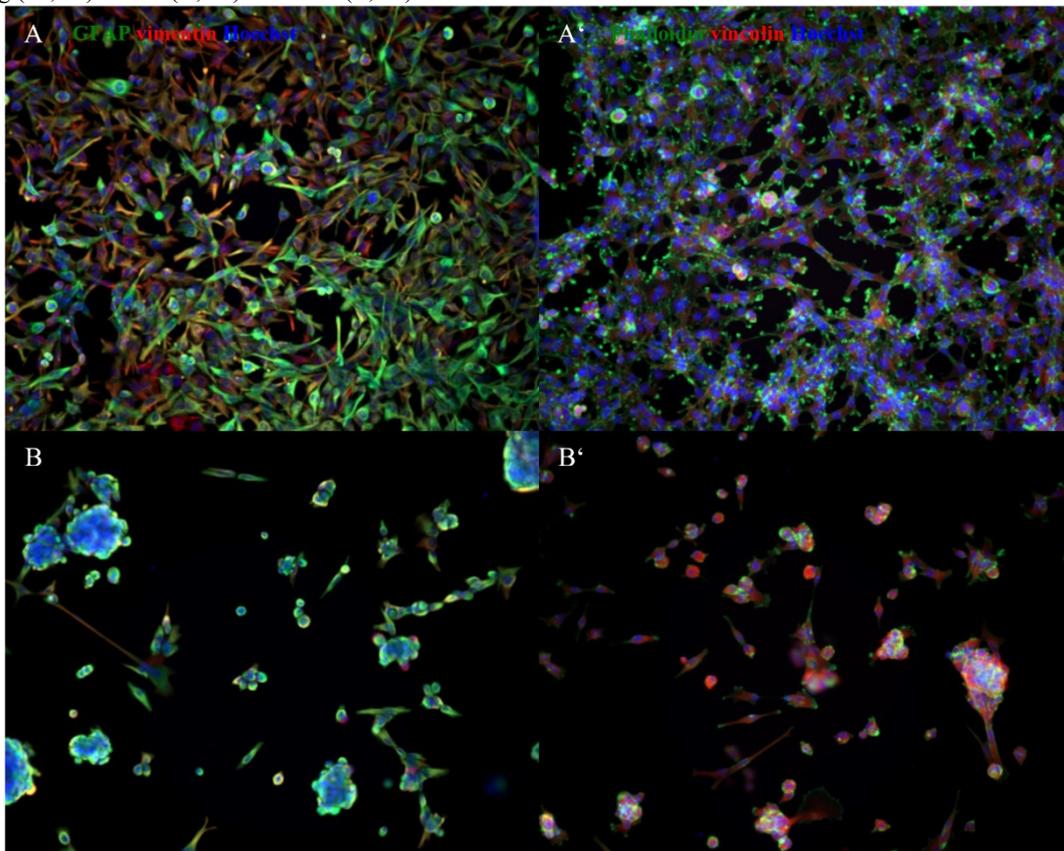
**Abb. A 87:** Grob­aufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23 µmol/mg Gel (A, A') und 0.11 µmol/mg Gel (B,B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



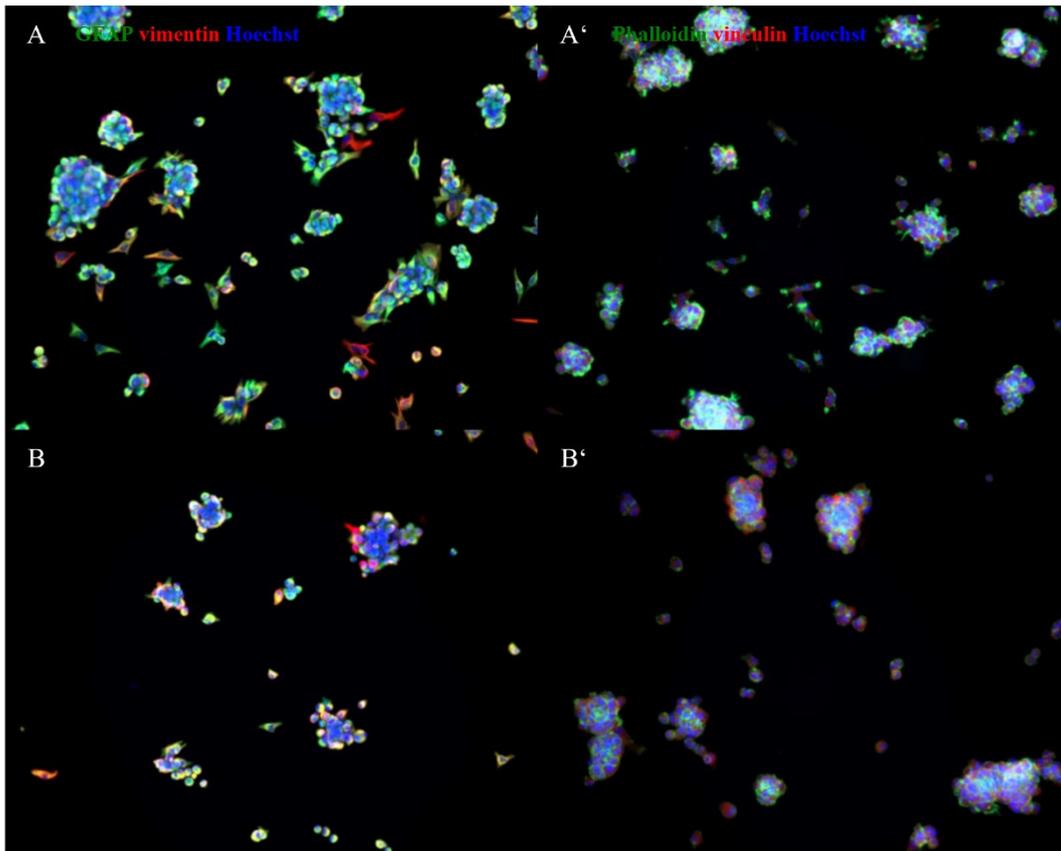
**Abb. A 88:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel (A, A') und einem unfunctionalisierten Hydrogel (B, B') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Zusätzlich wurden mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschalen (C, C') verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



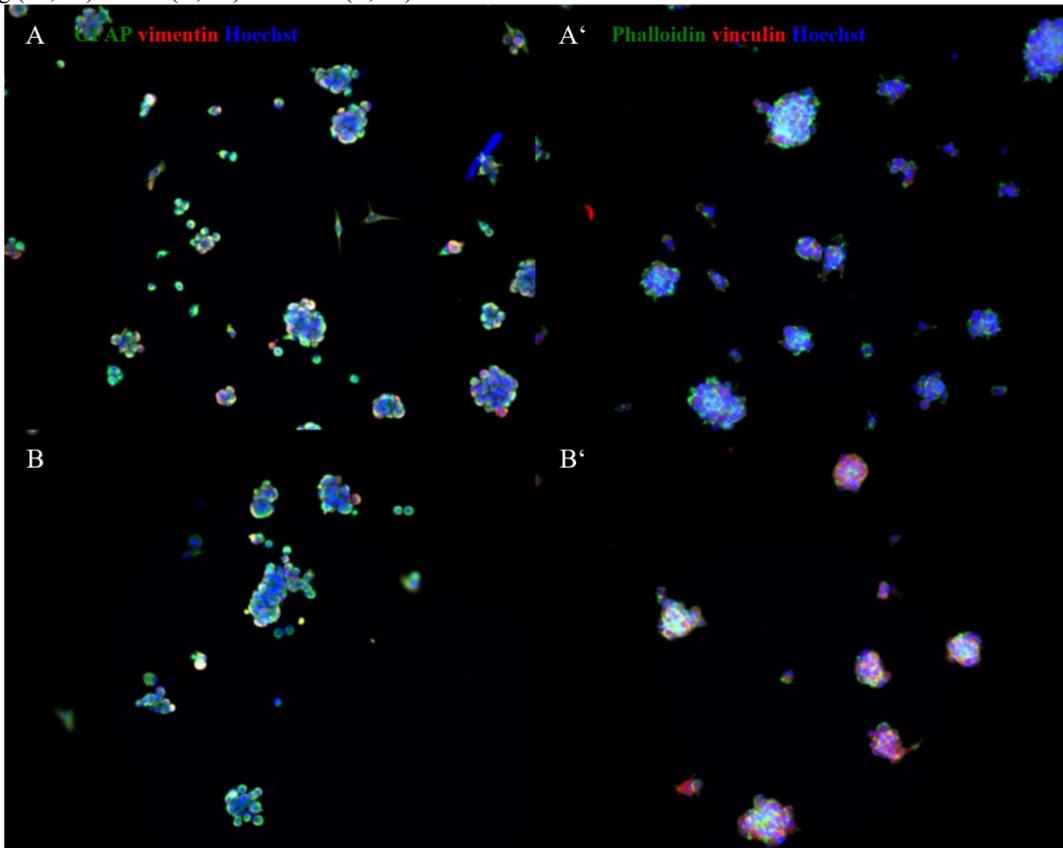
**Abb. A 89:** Grob­aufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91 µmol/mg Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



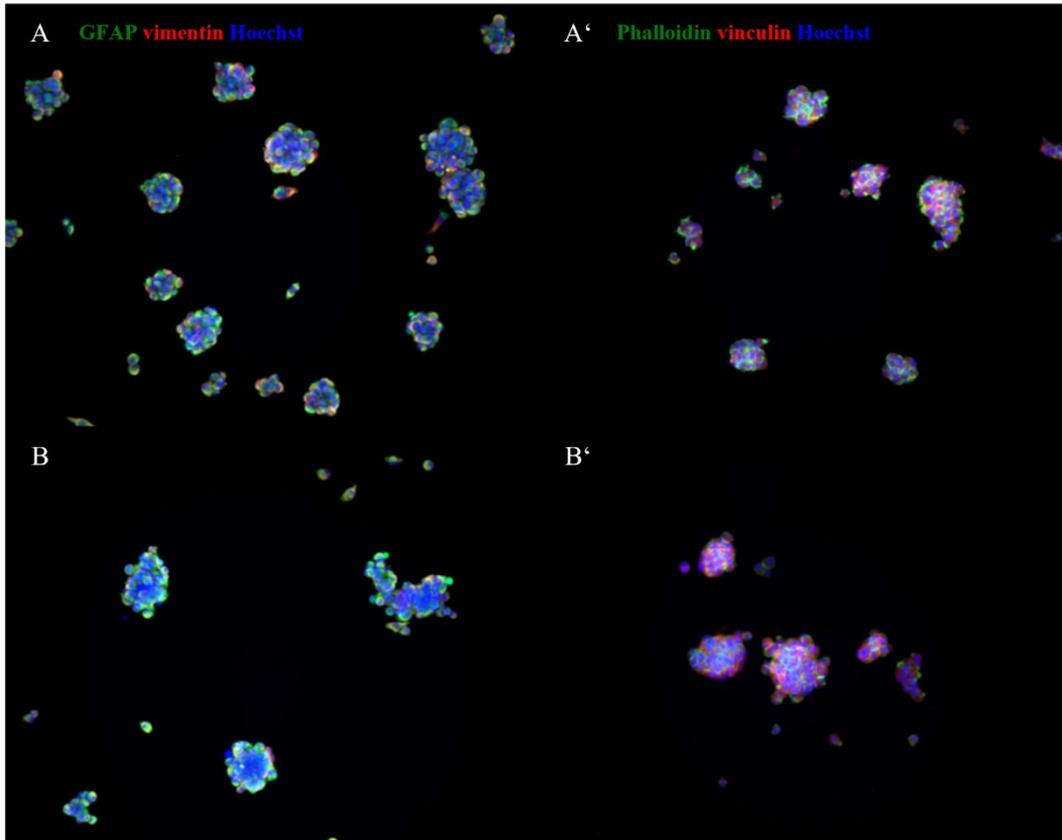
**Abb. A 90:** Grob­aufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46 µmol/mg Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



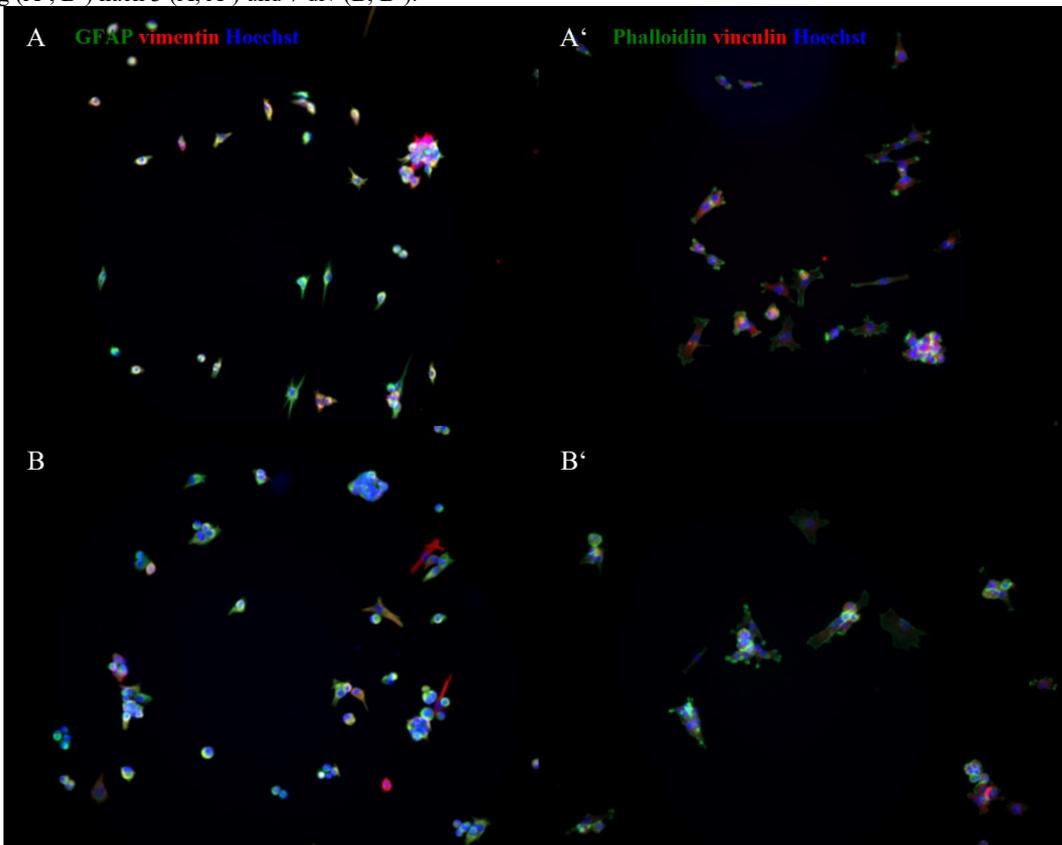
**Abb. A 91:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.23 \mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



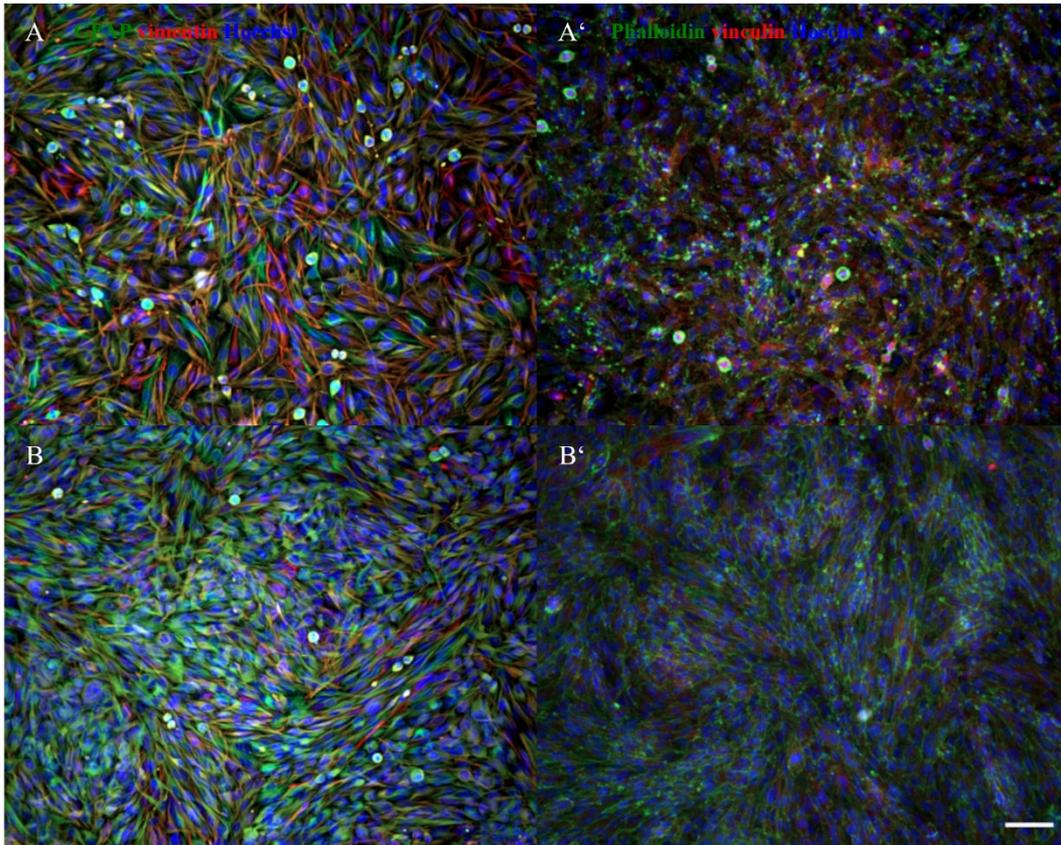
**Abb. A 92:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.11 \mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



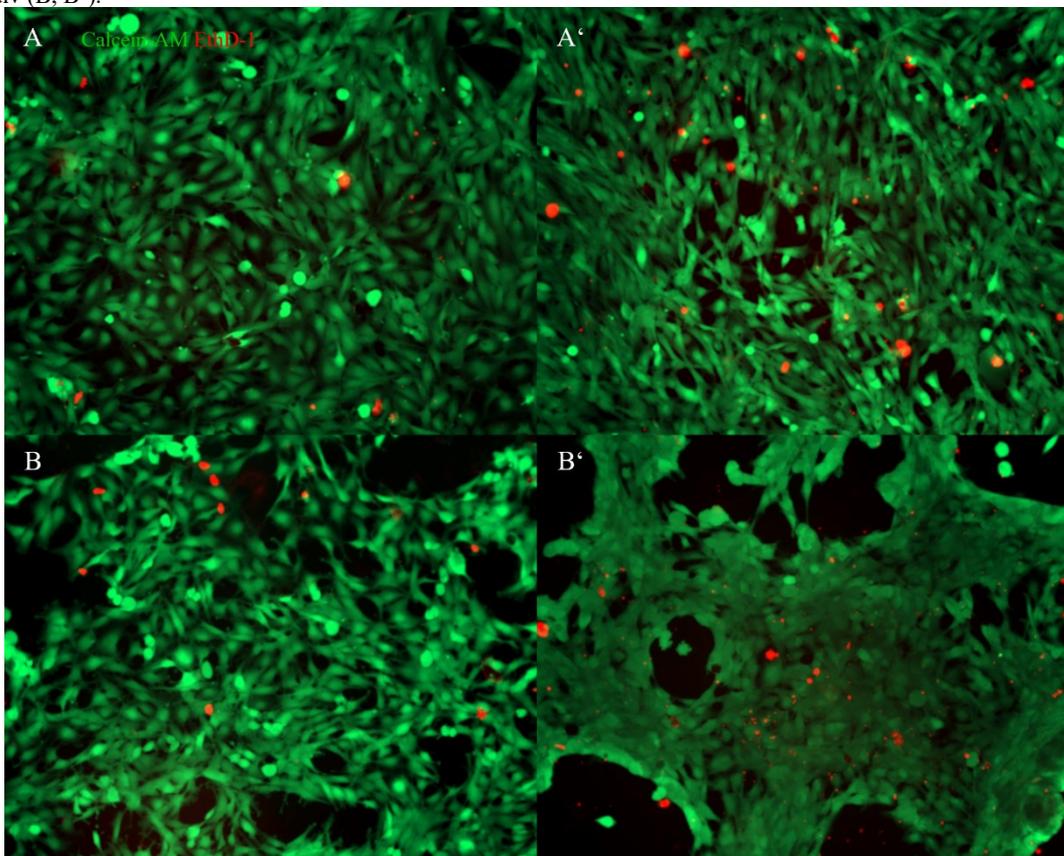
**Abb. A 93:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



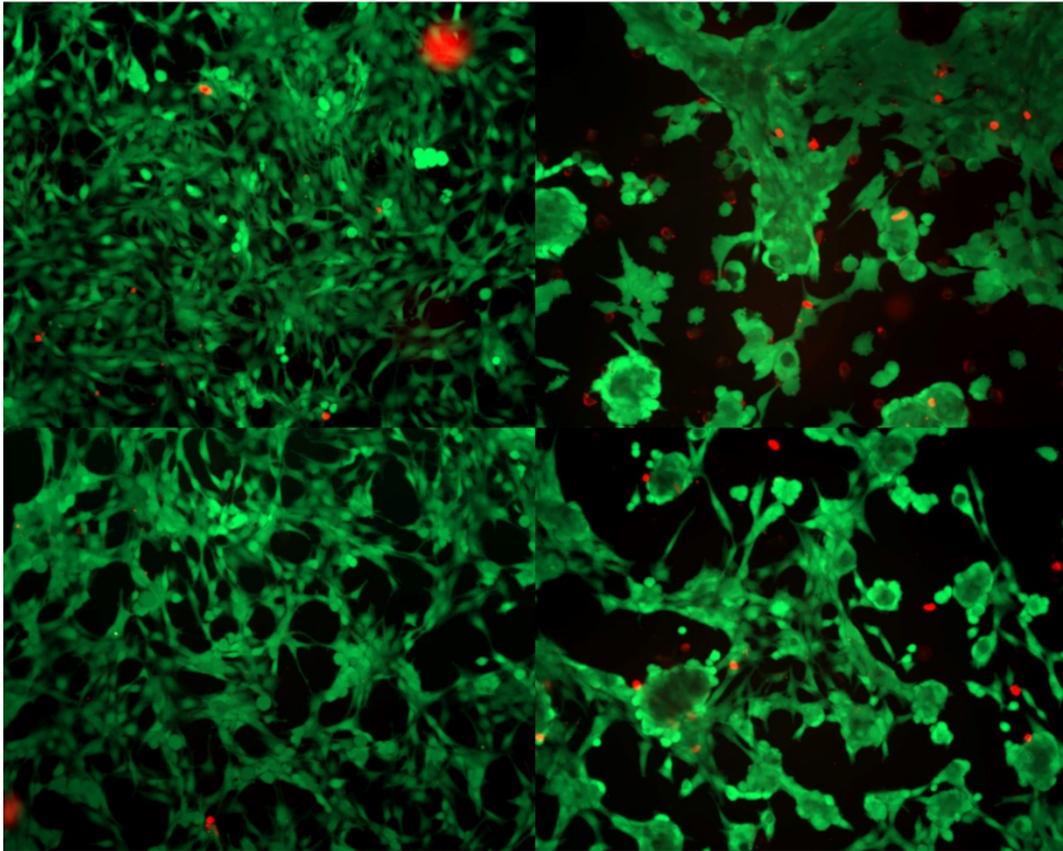
**Abb. A 94:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf unfunctionalisierten Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



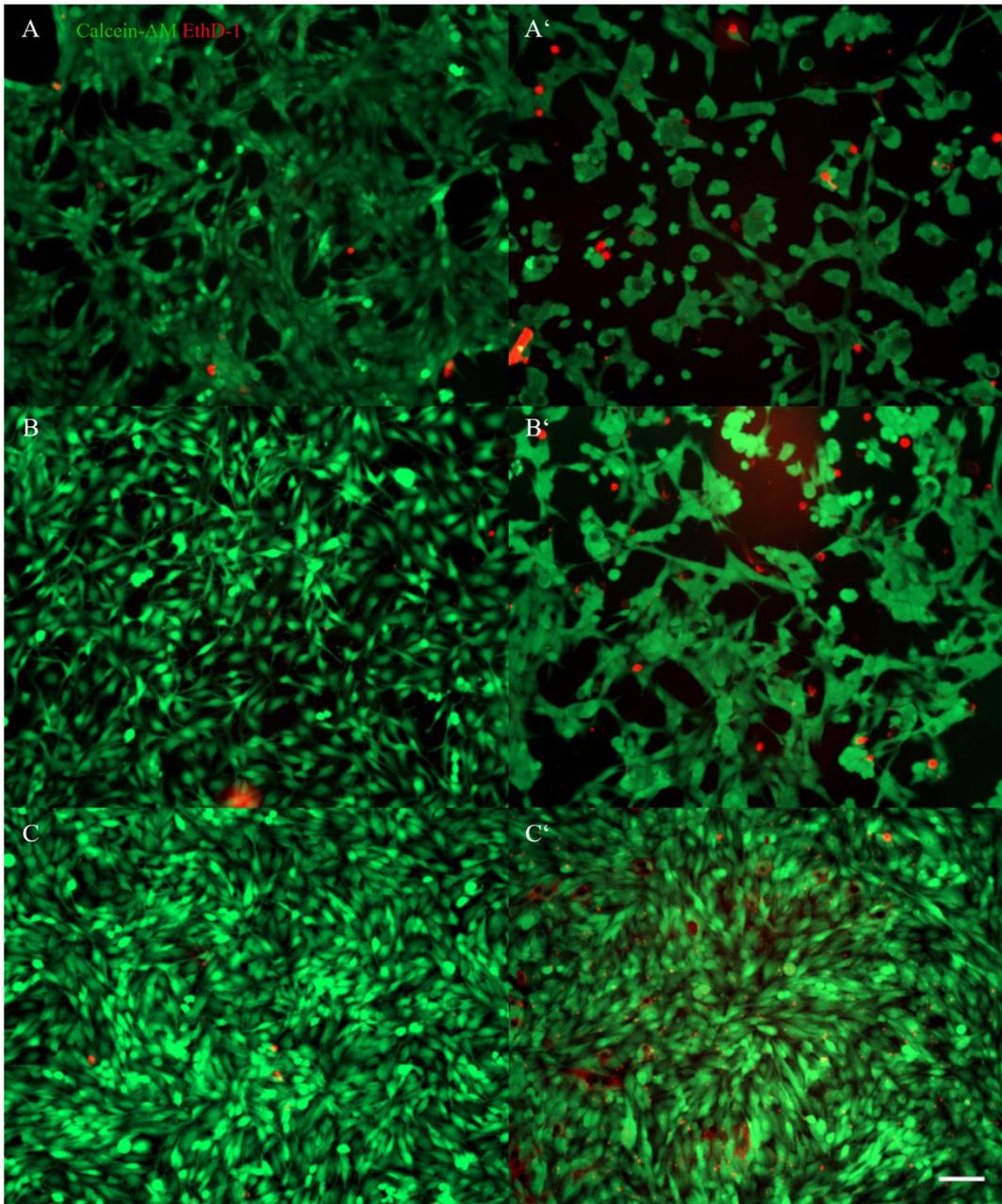
**Abb. A 95:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



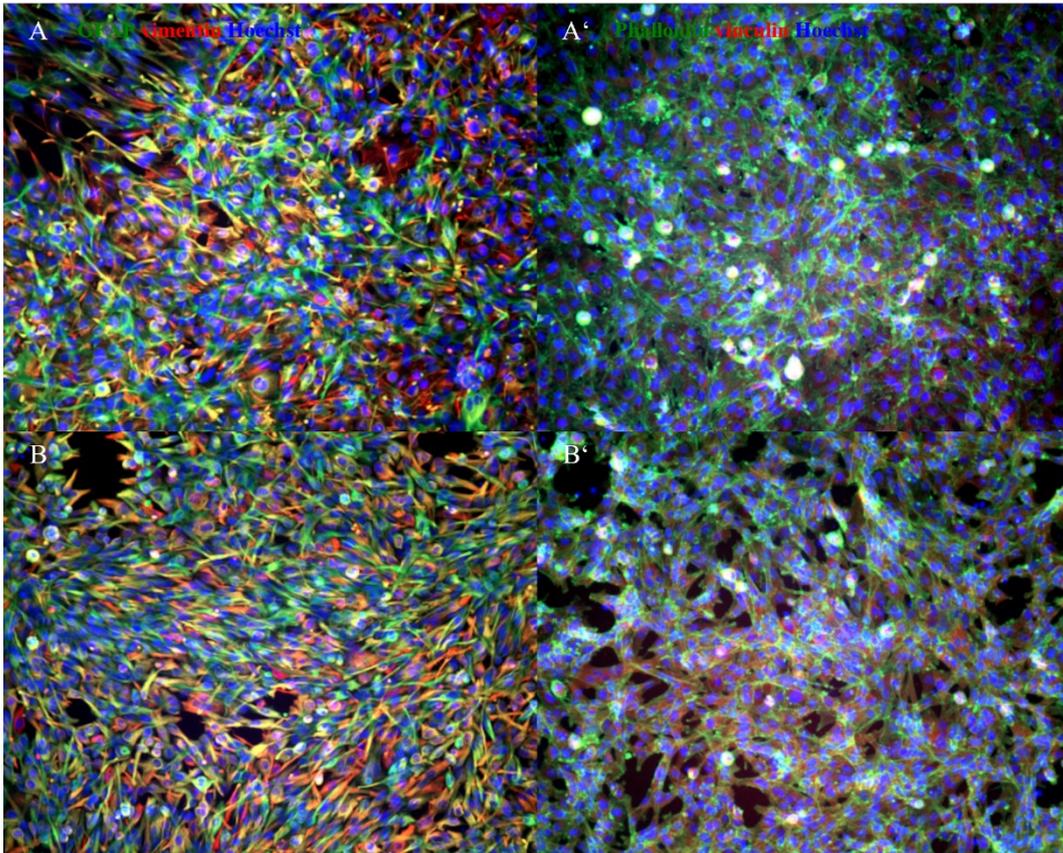
**Abb. A 96:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, A') und 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (B, B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



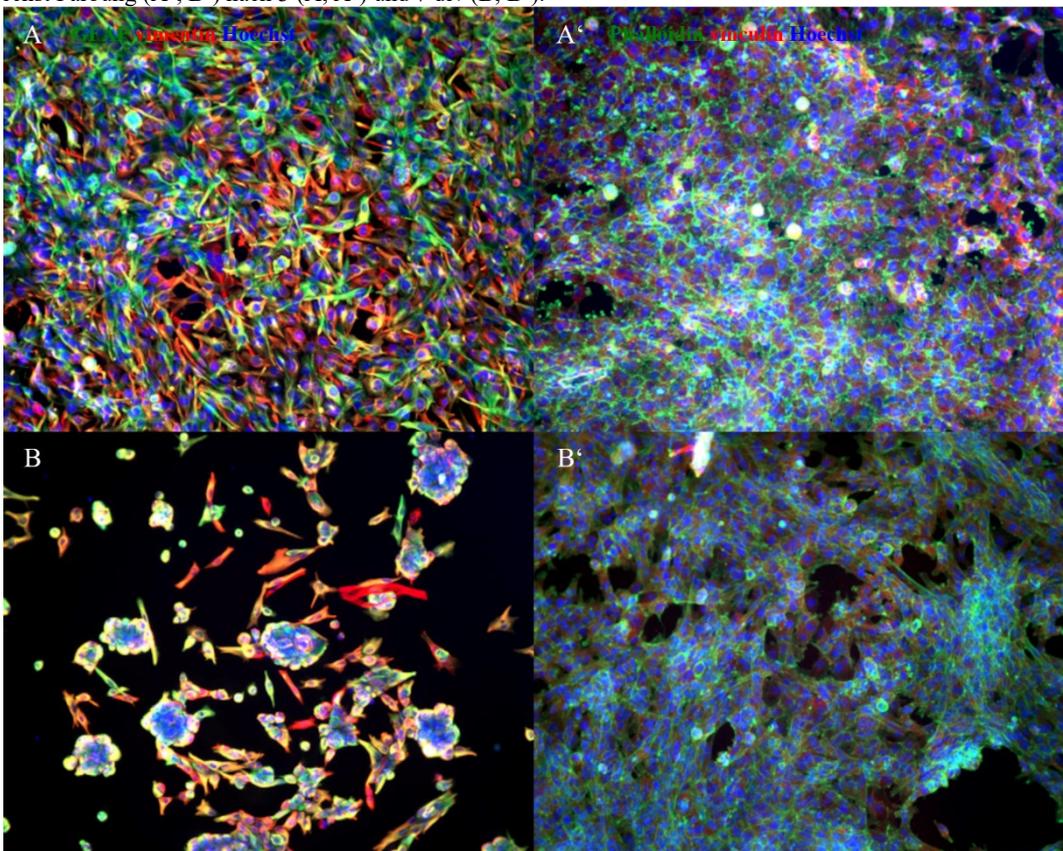
**Abb. A 97:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, A') und 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (B,B') nach 3 (A, B) und 7 div (A', B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



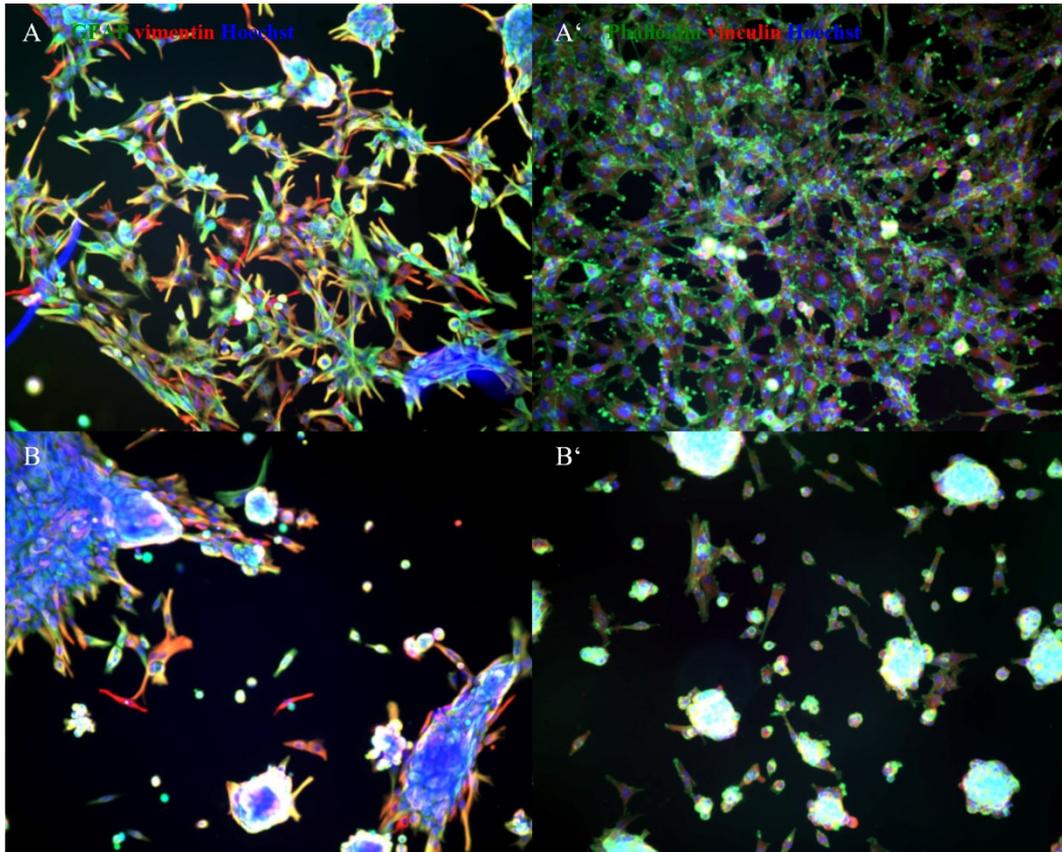
**Abb. A 98:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol/mg}$  Gel (A, A') und auf einem unfunktionalisierten Hydrogel (B, B') nach 3 (A-C) und 7 div (A'-C'). Zusätzlich wurde eine mit Polyornithin beschichtete Zellkulturschale (C, C') verwendet. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



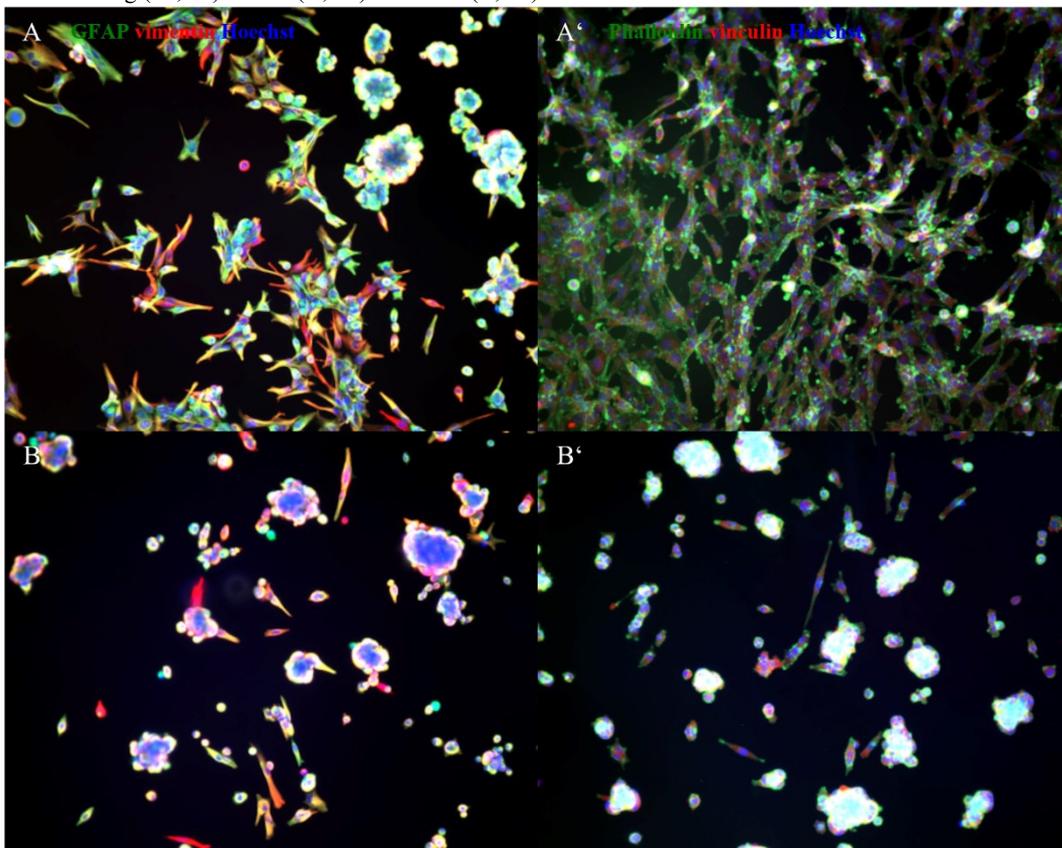
**Abb. A 99:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



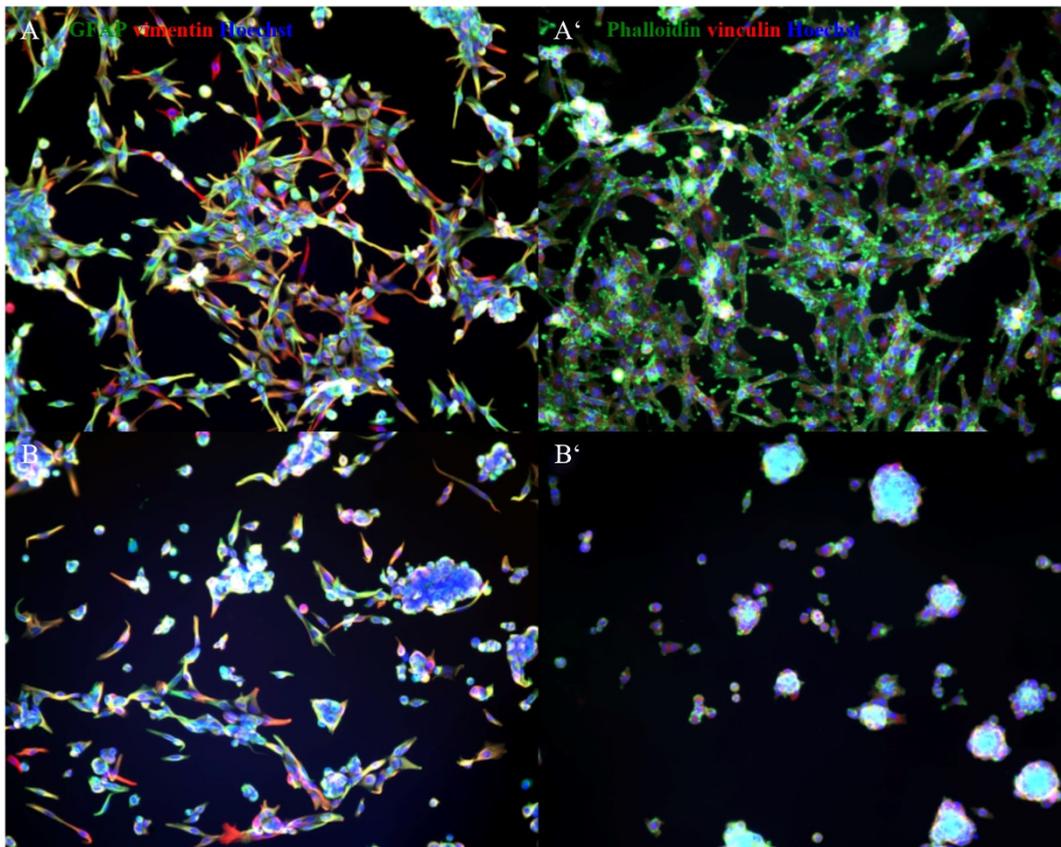
**Abb. A 100:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



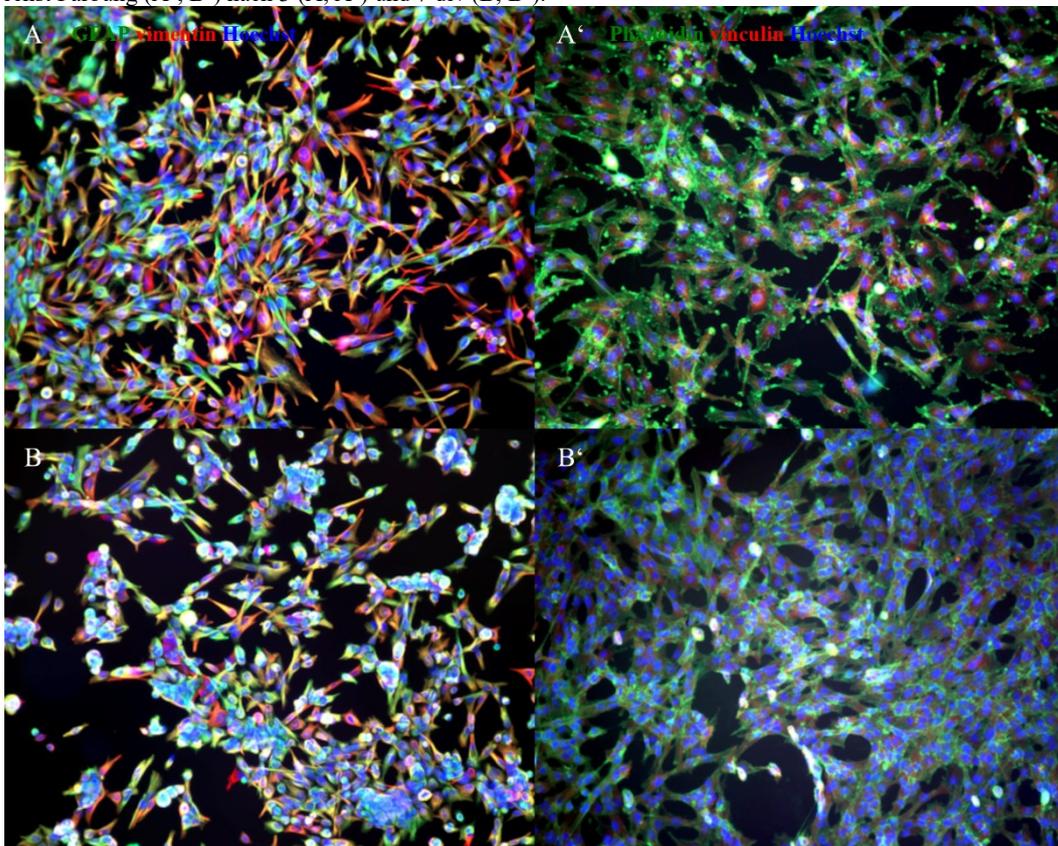
**Abb. A 101:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



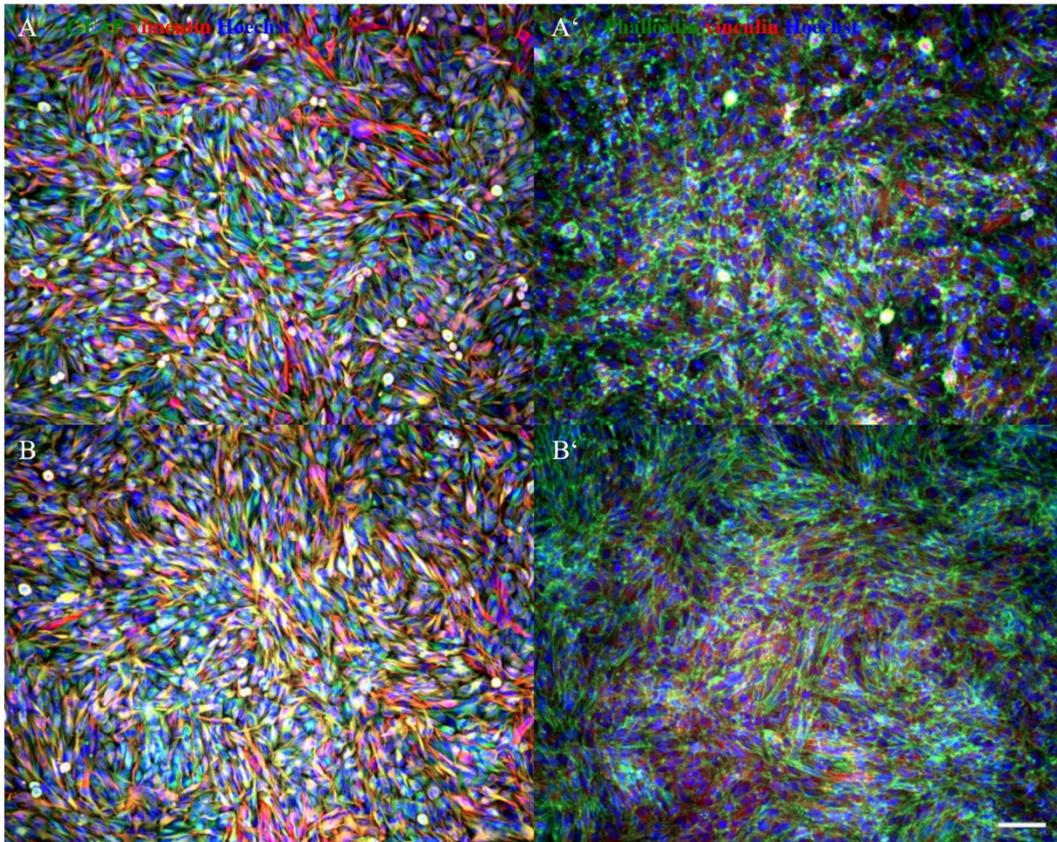
**Abb. A 102:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



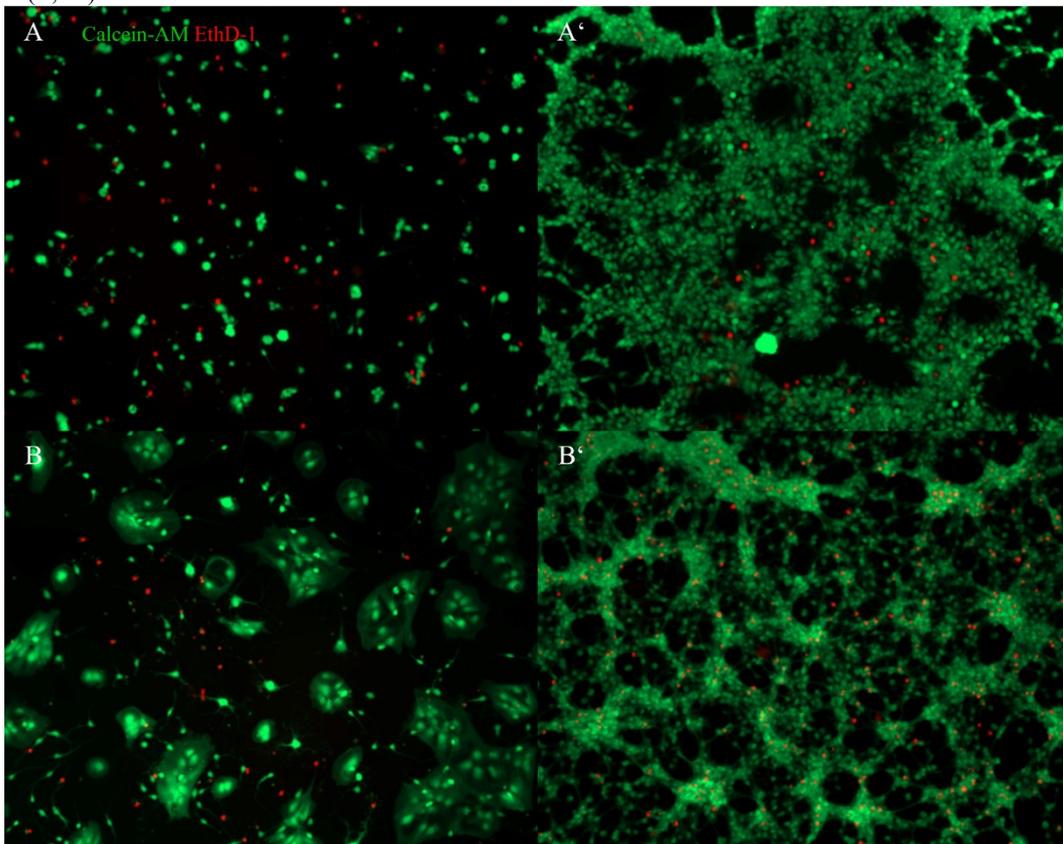
**Abb. A 103:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



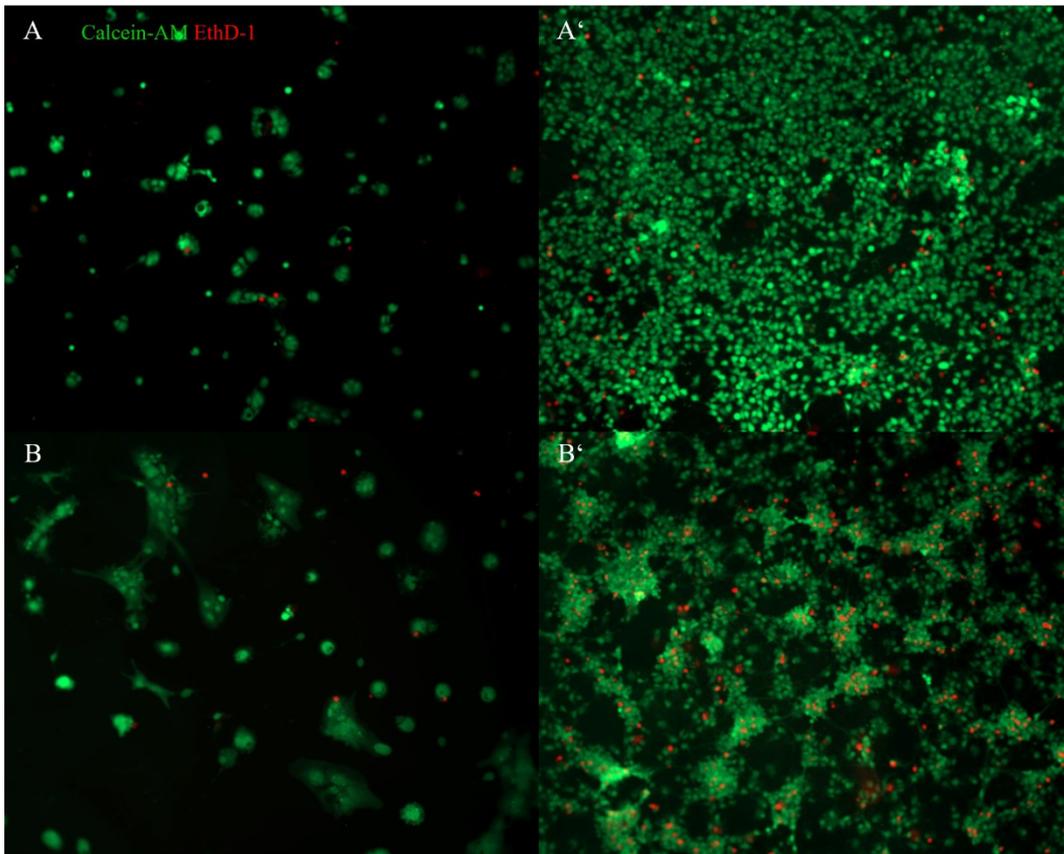
**Abb. A 104:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf dialysierten unfunctionalisierten Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



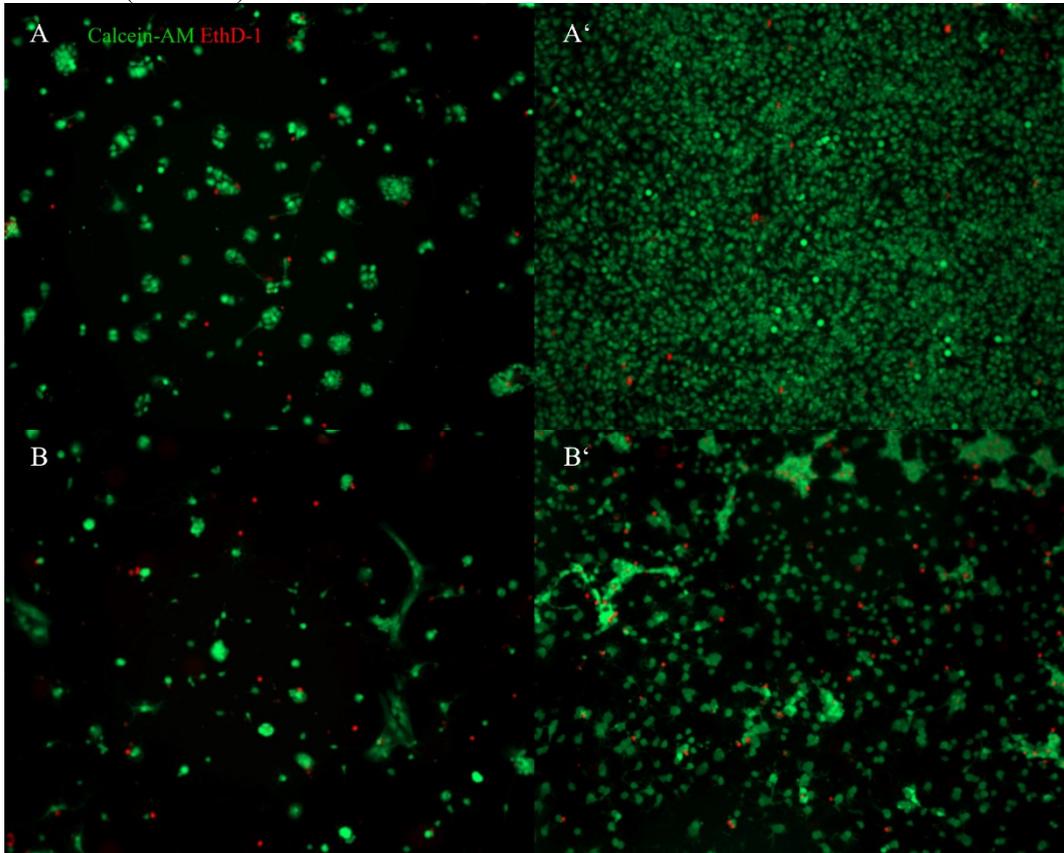
**Abb. A 105:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A, B) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B').



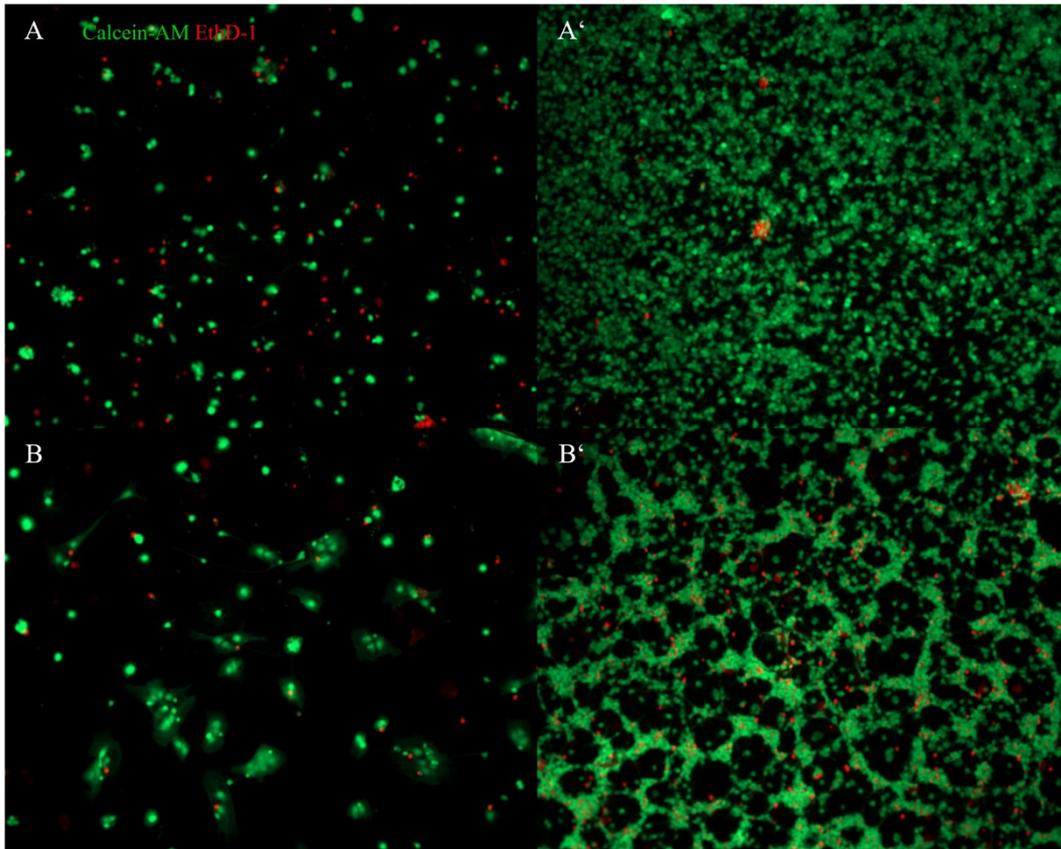
**Abb. A 106:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



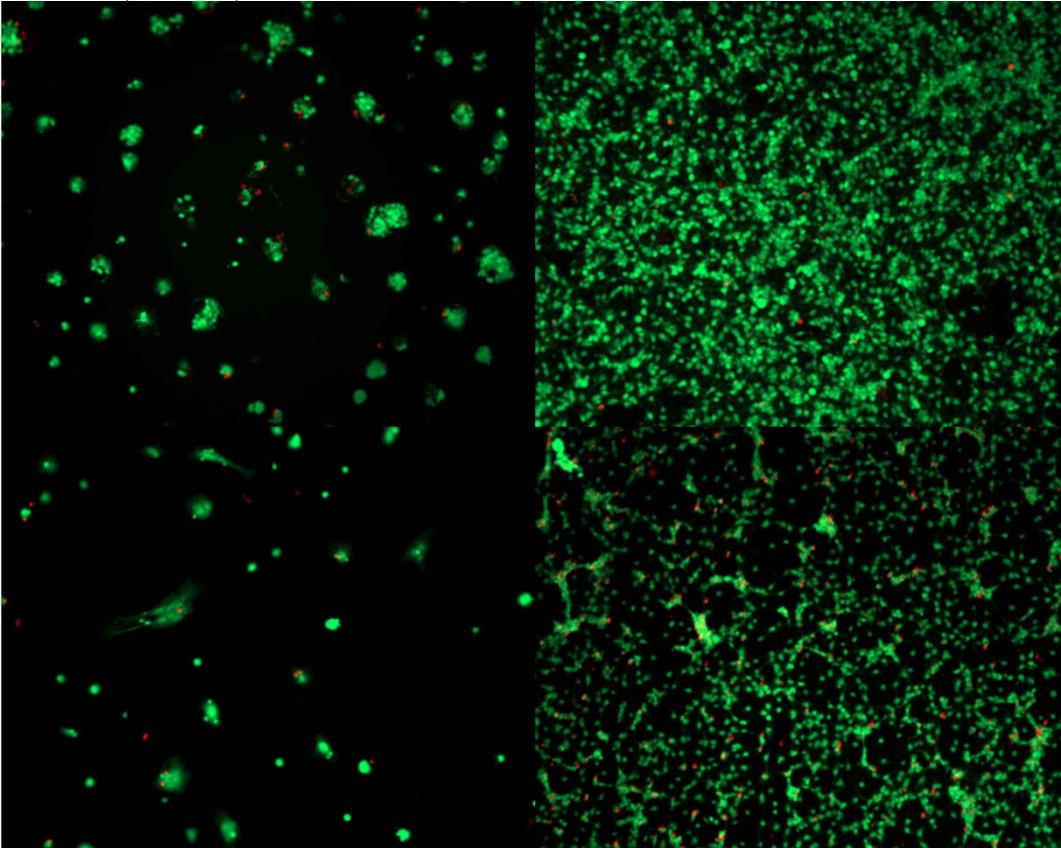
**Abb. A 107:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



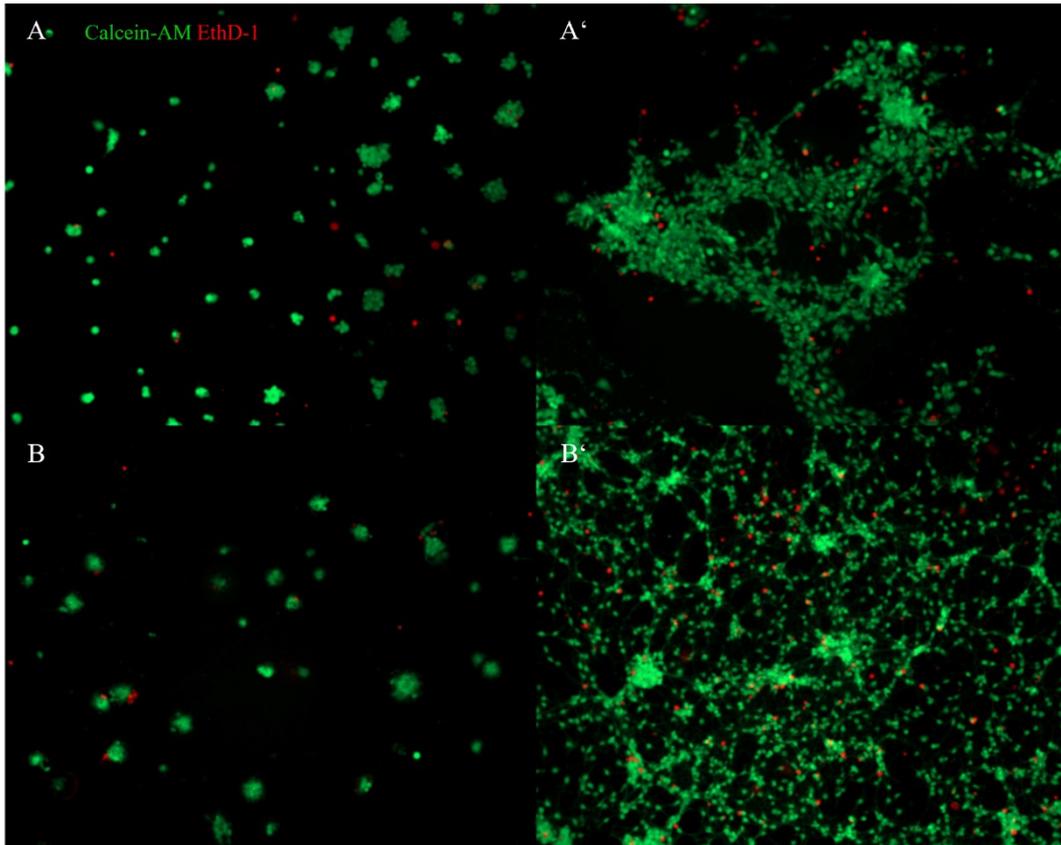
**Abb. A 108:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



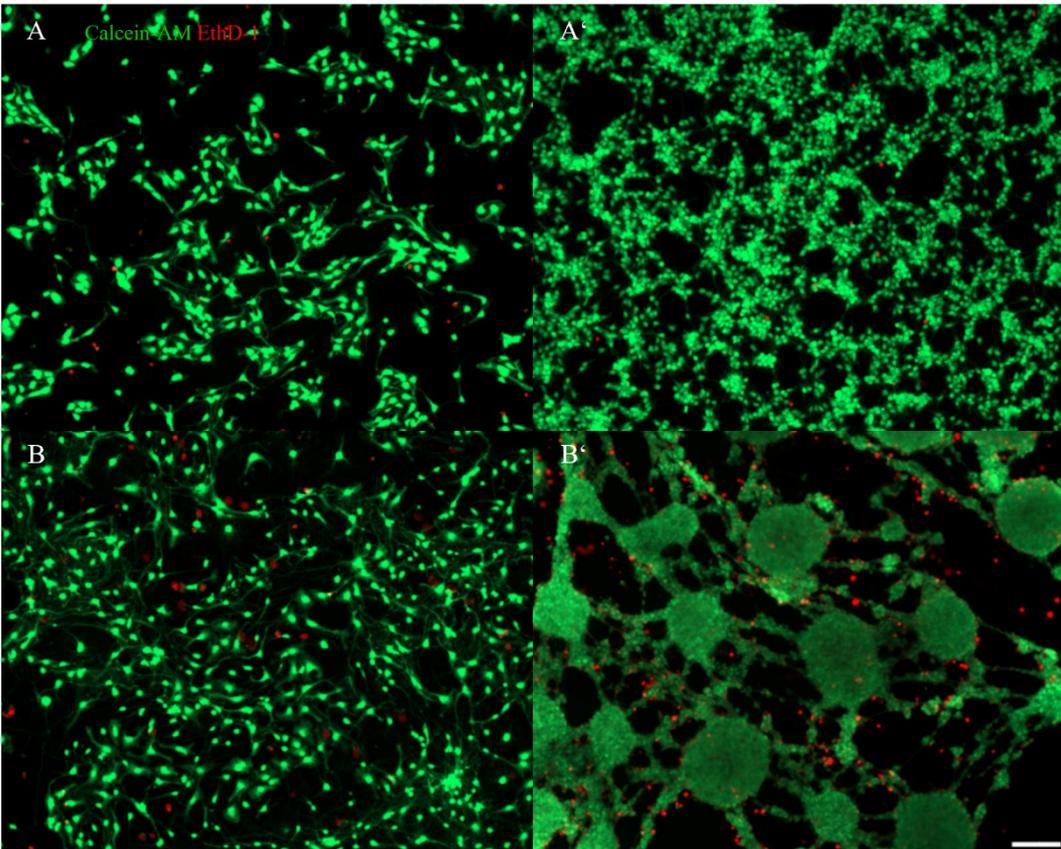
**Abb. A 109:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



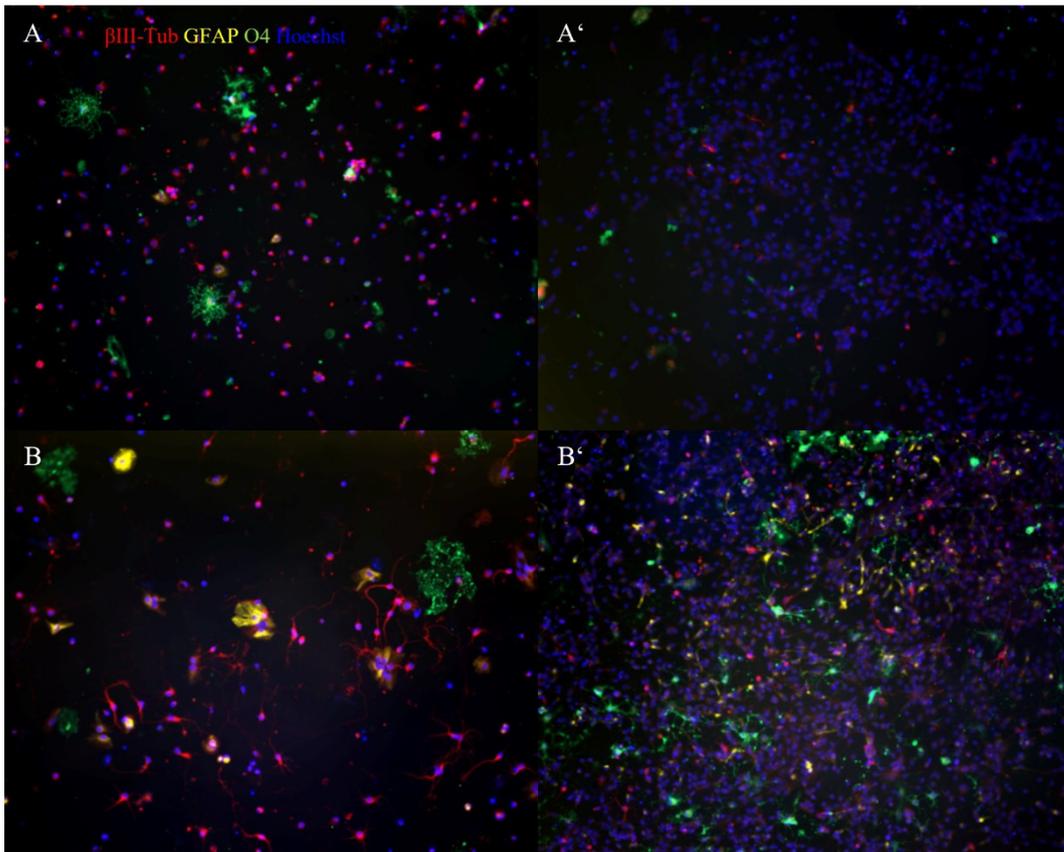
**Abb. A 110:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



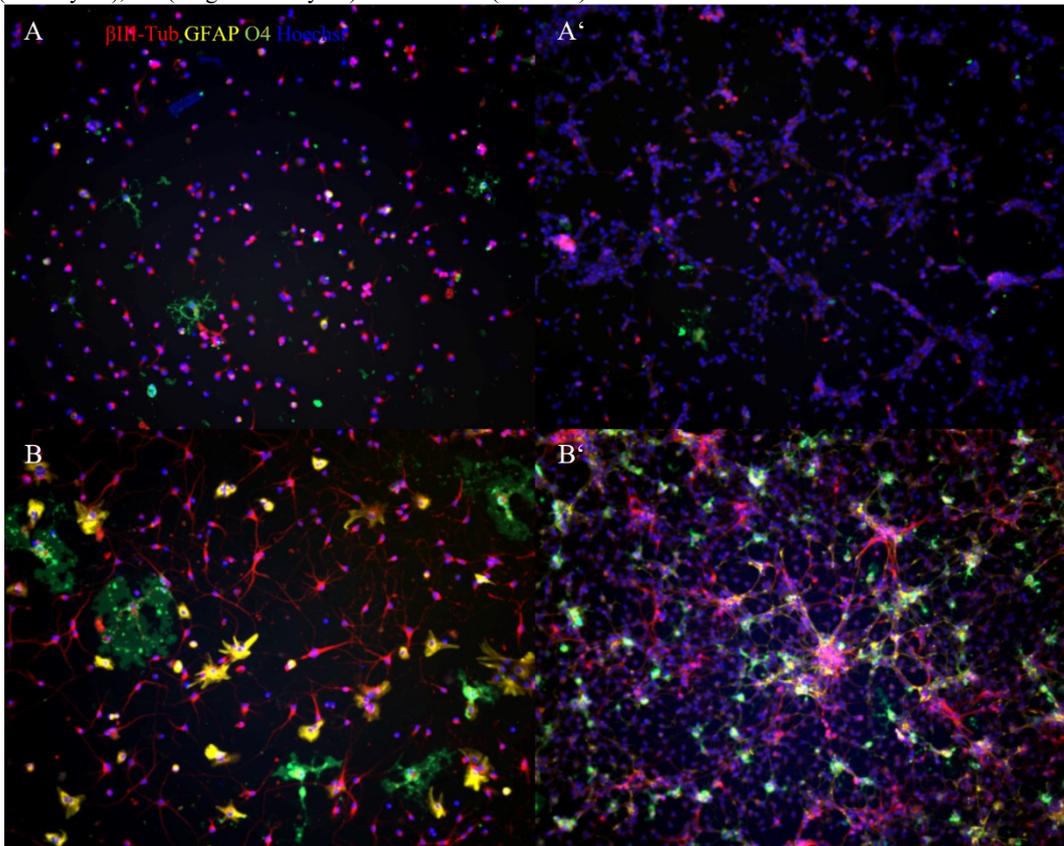
**Abb. A 111:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



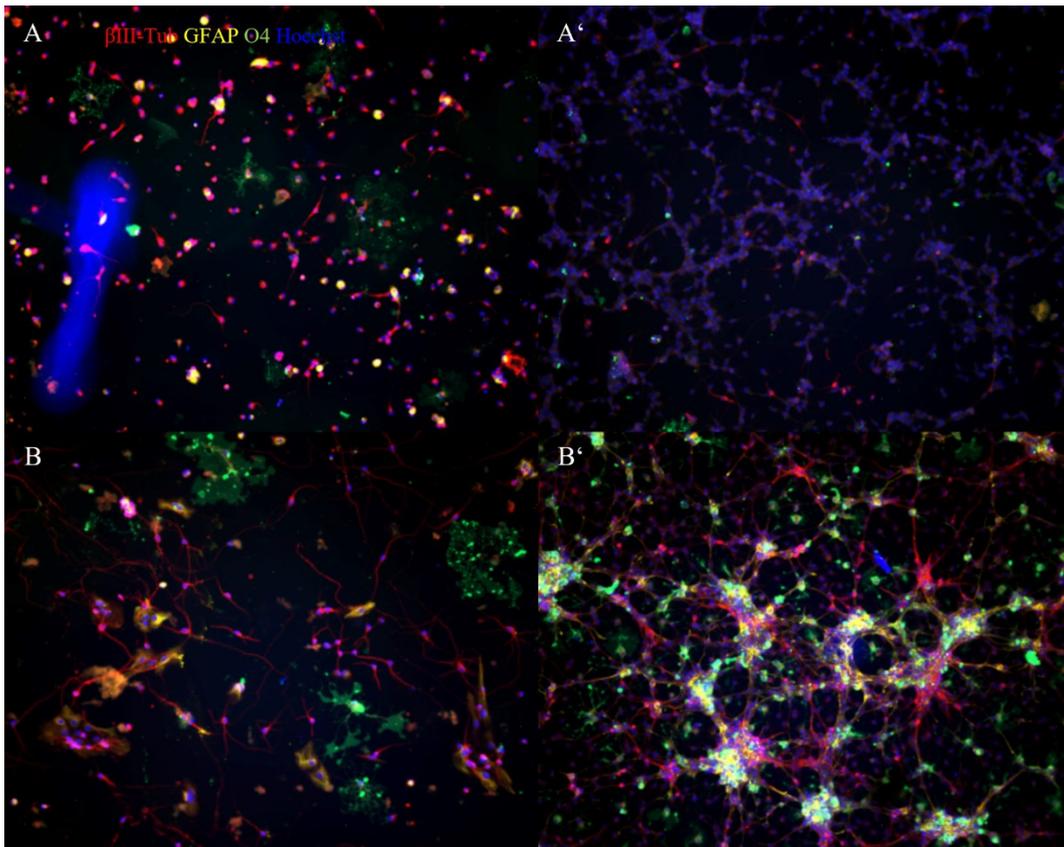
**Abb. A 112:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



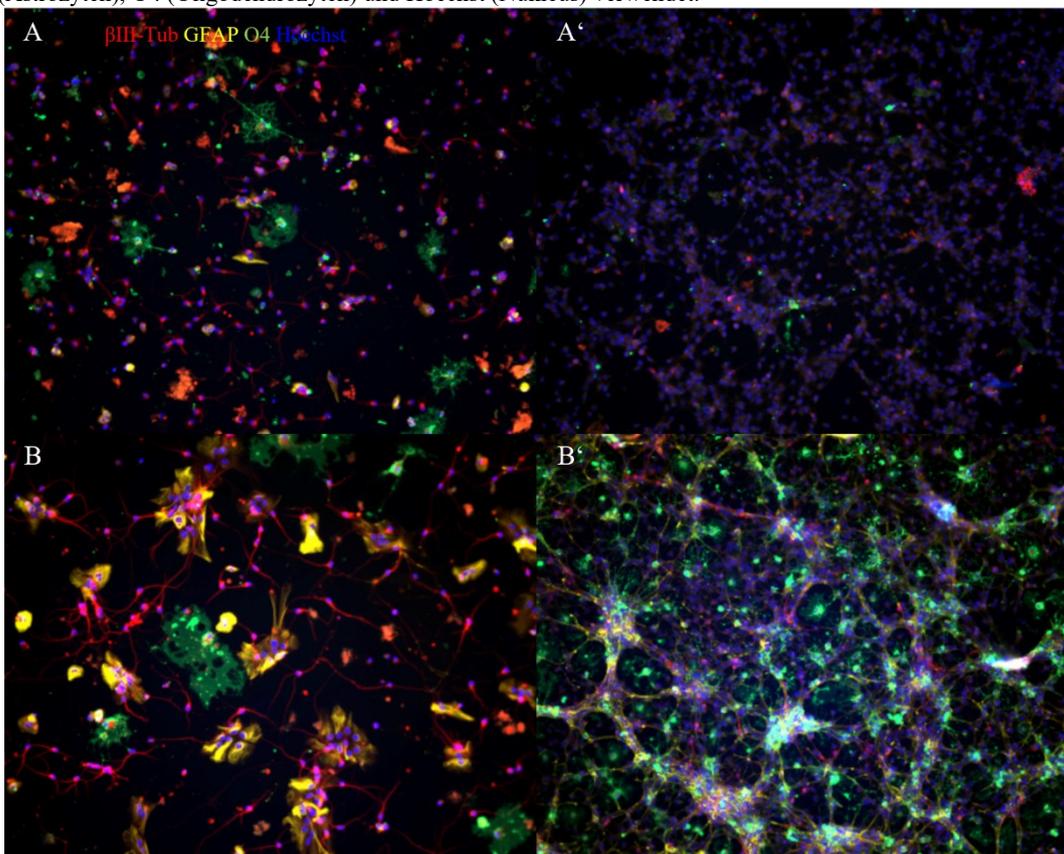
**Abb. A 113:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.91  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



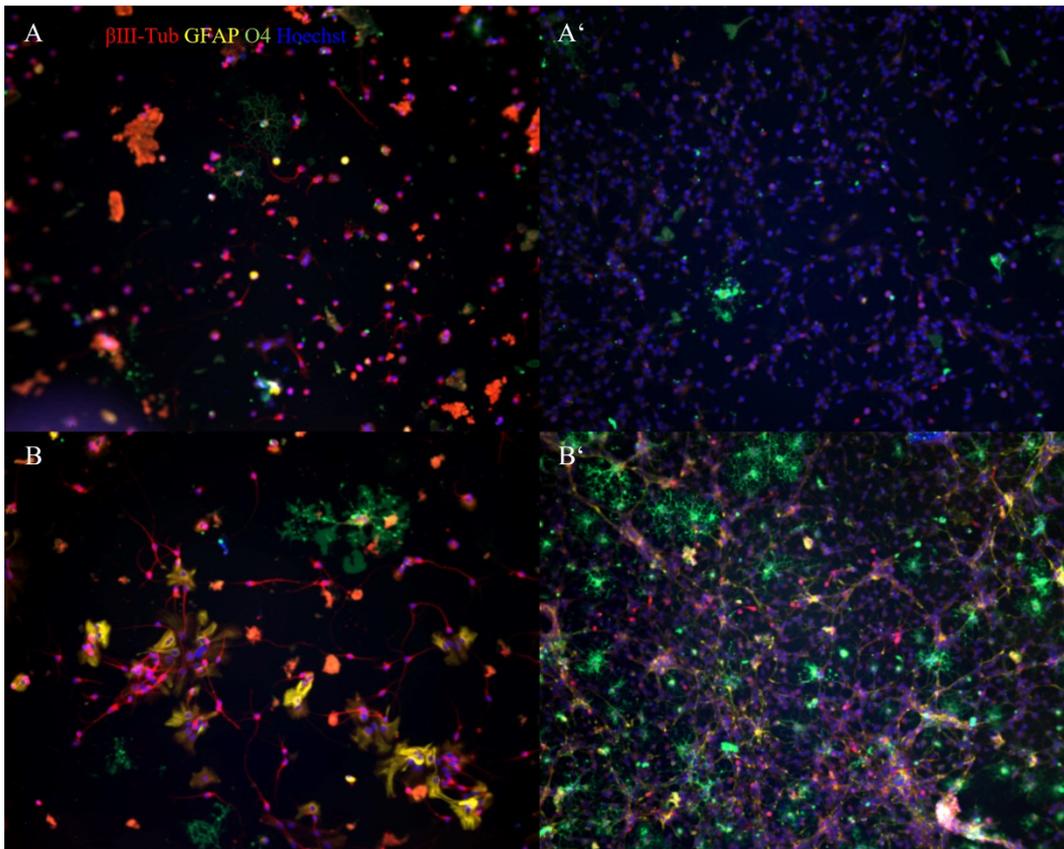
**Abb. A 114:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta\text{III-Tub}$  (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



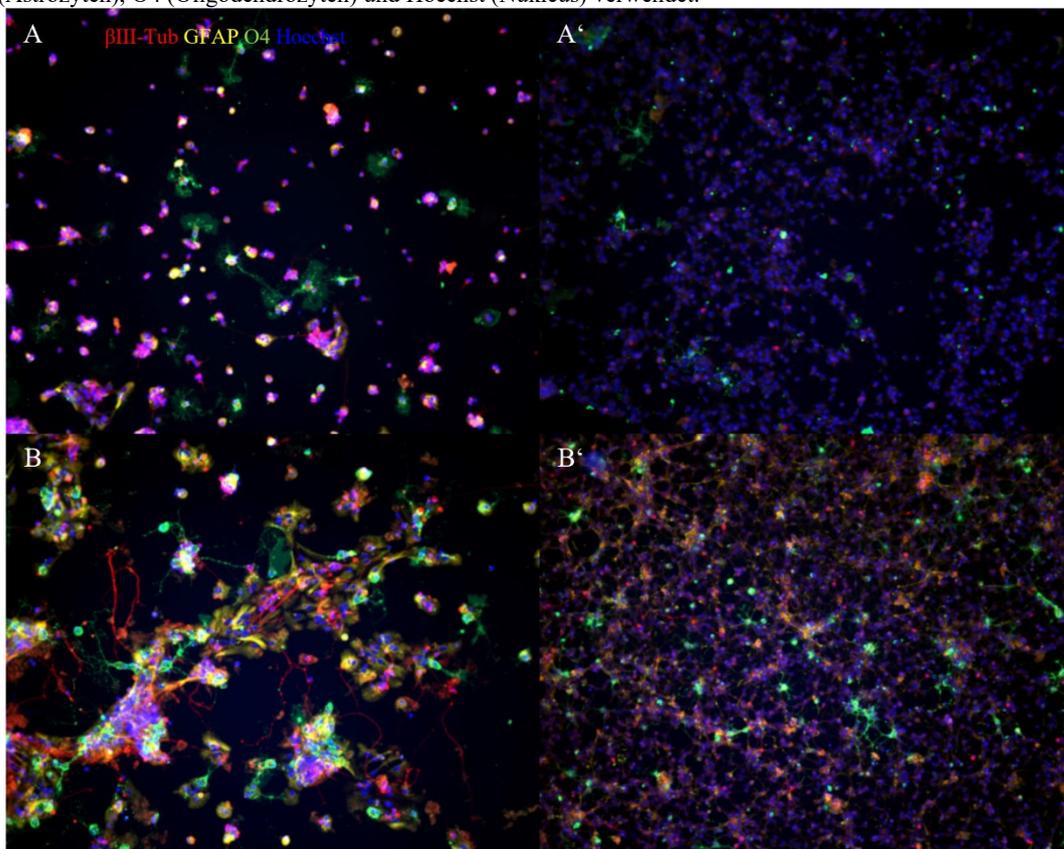
**Abb. A 115:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23 µmol/mg Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden βIII-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



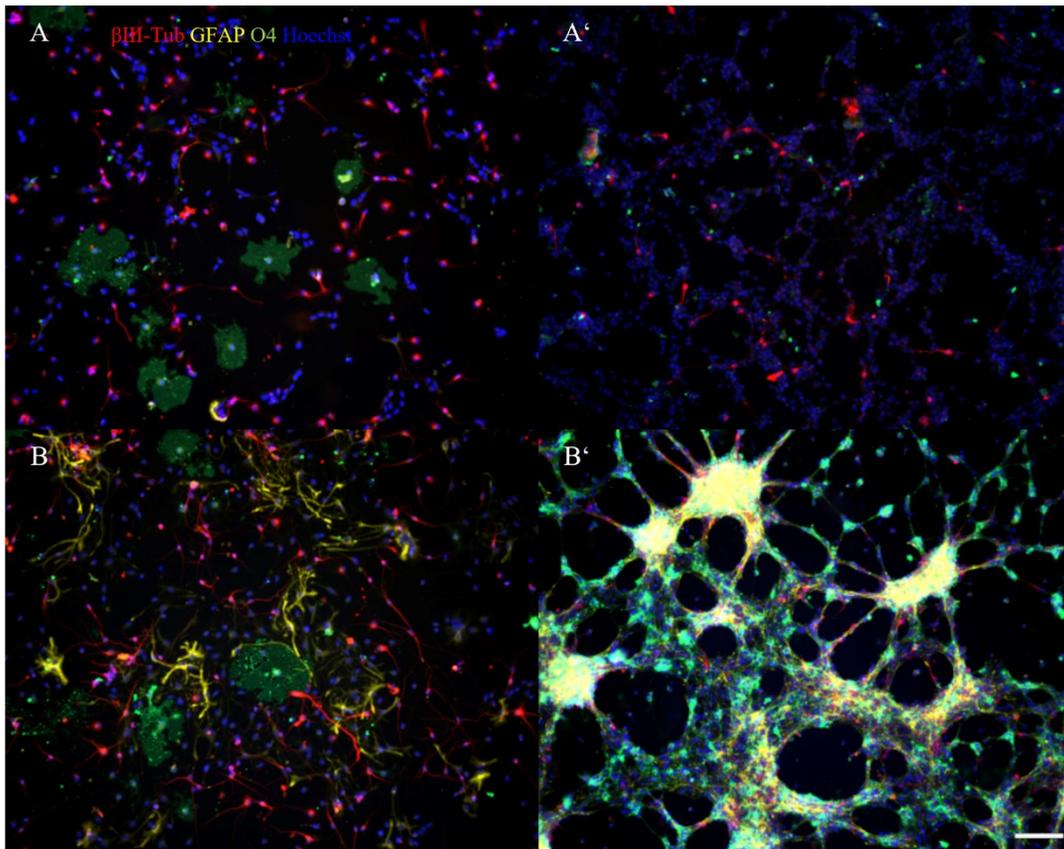
**Abb. A 116:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11 µmol/mg Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden βIII-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



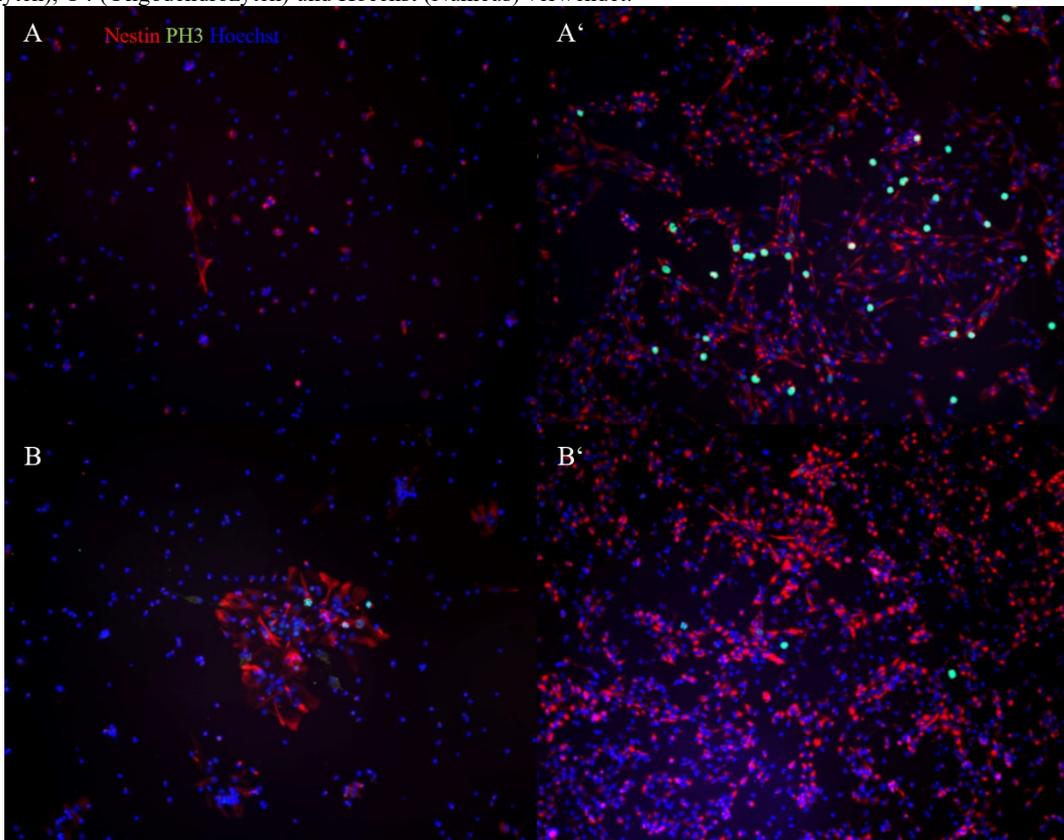
**Abb. A 117:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.06 \mu\text{mol}/\text{mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



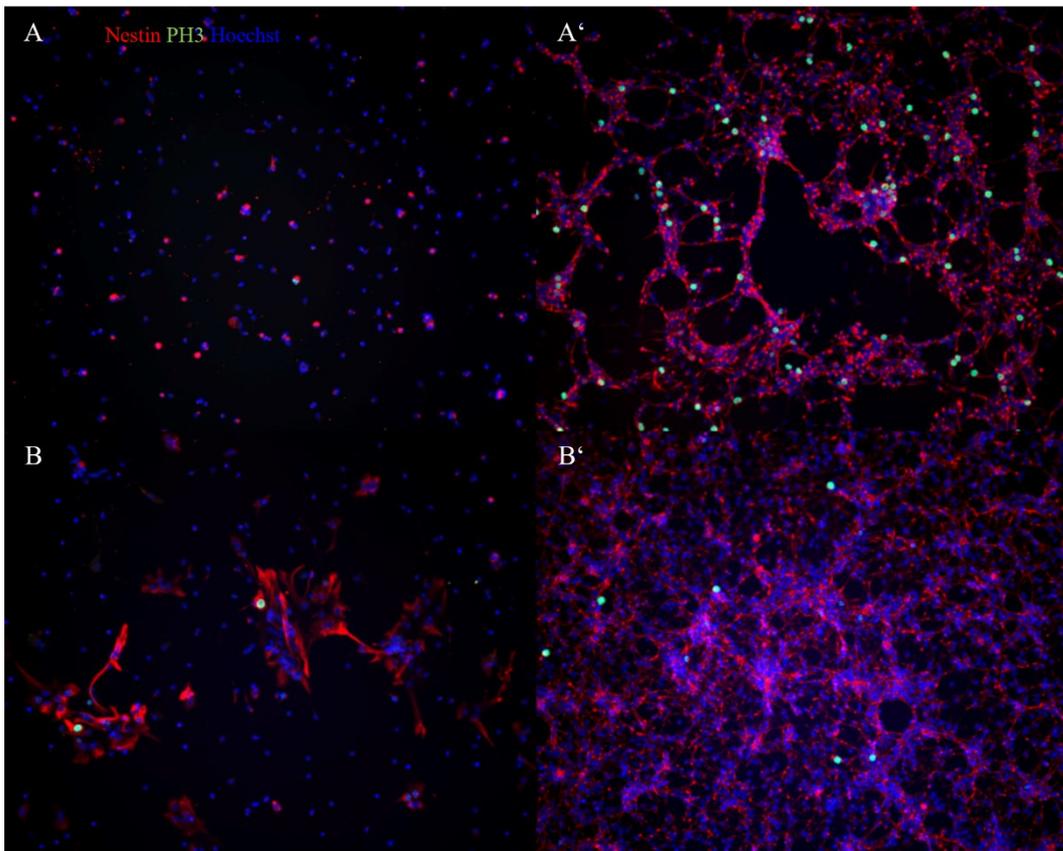
**Abb. A 118:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



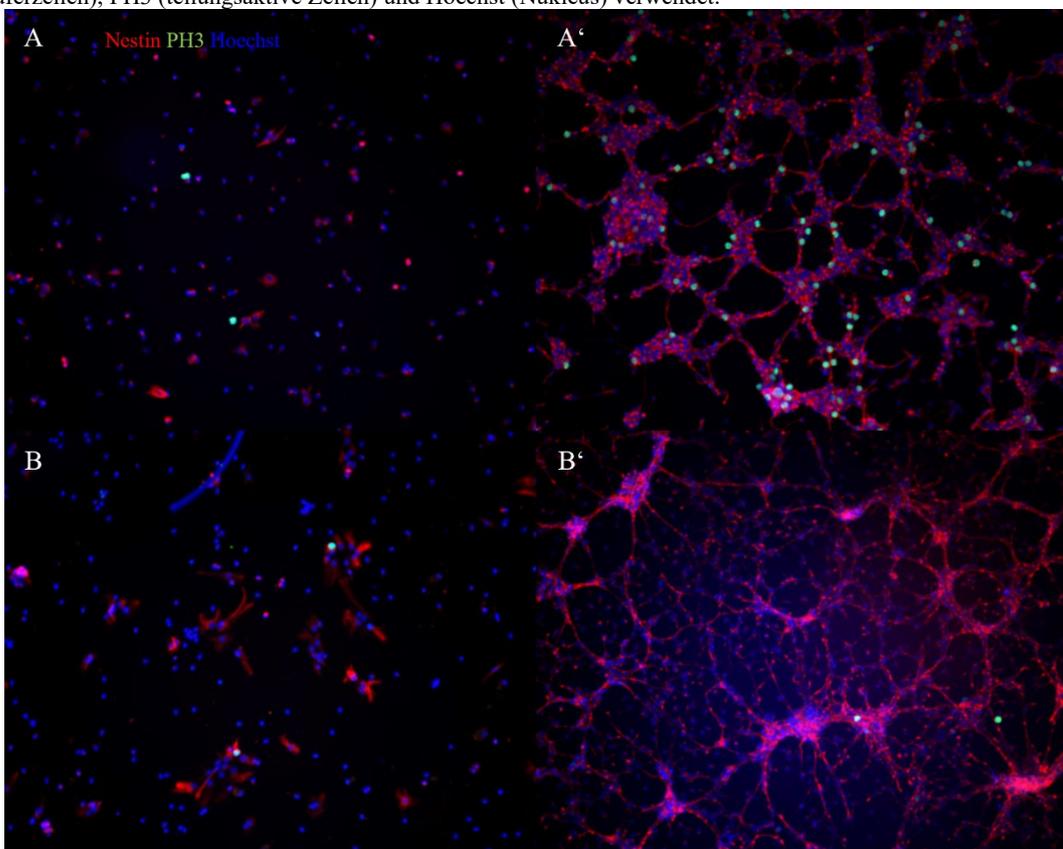
**Abb. A 119:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



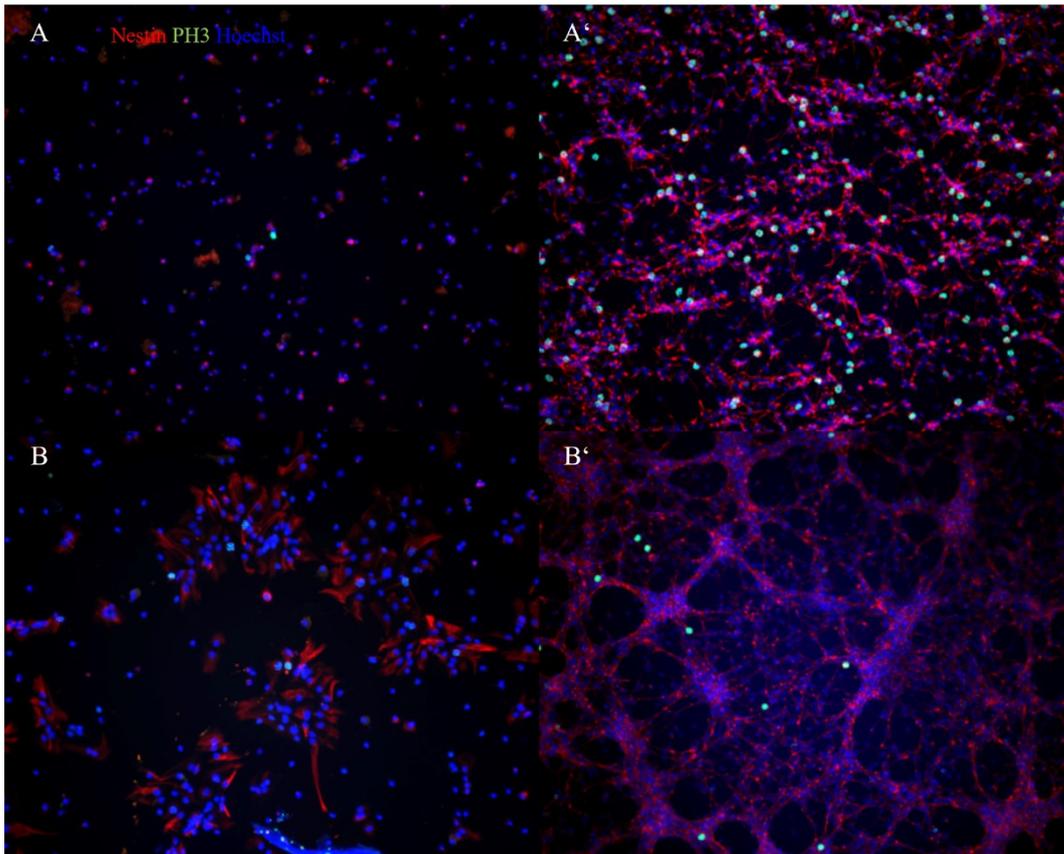
**Abb. A 120:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von  $0.91 \mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



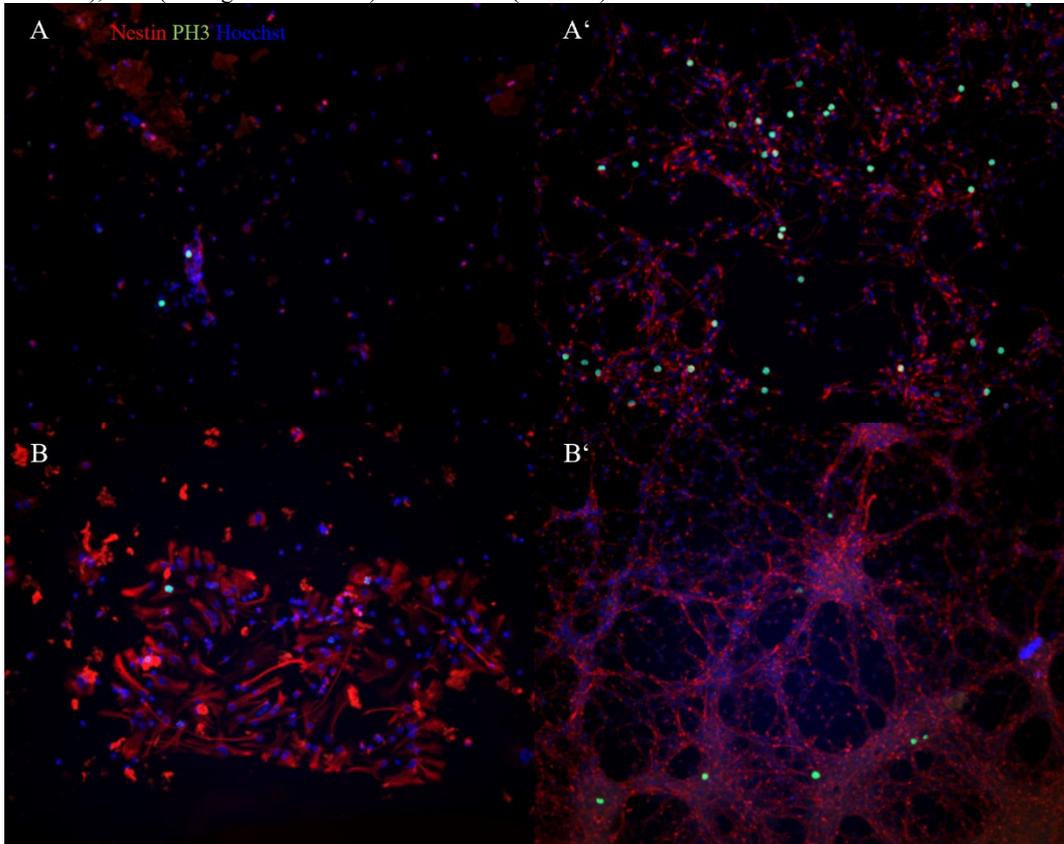
**Abb. A 121:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.46  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



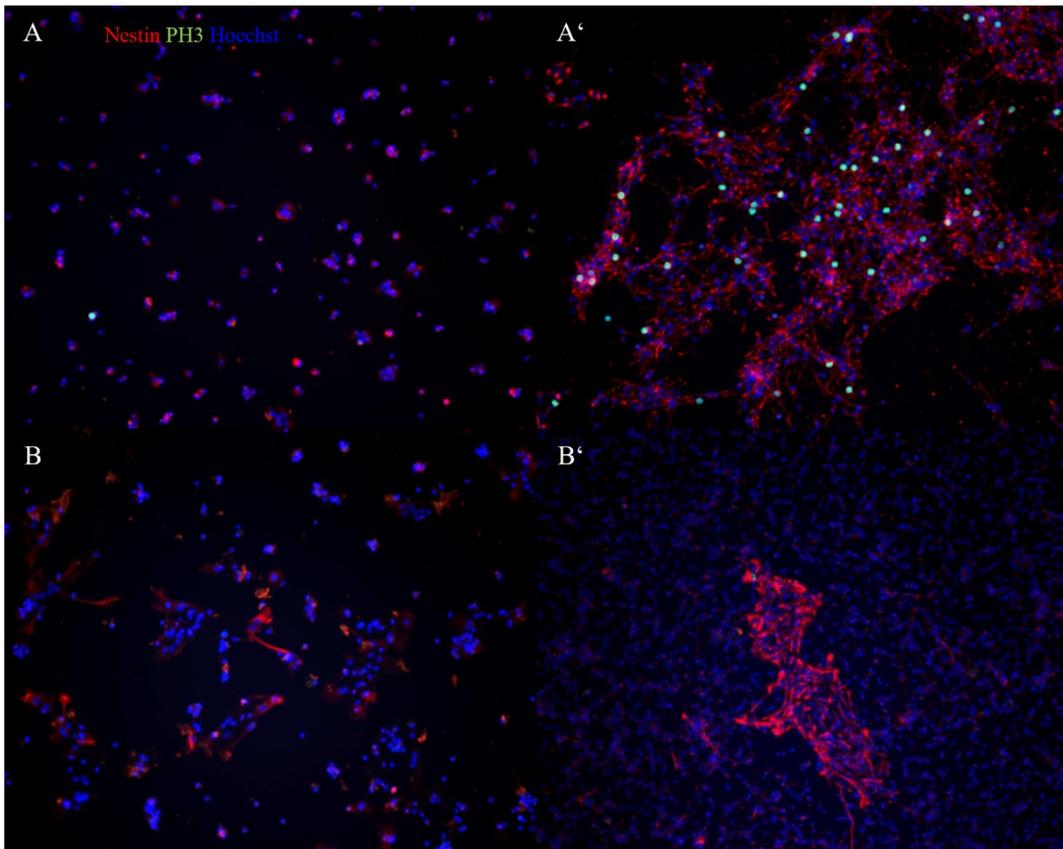
**Abb. A 122:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.23  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



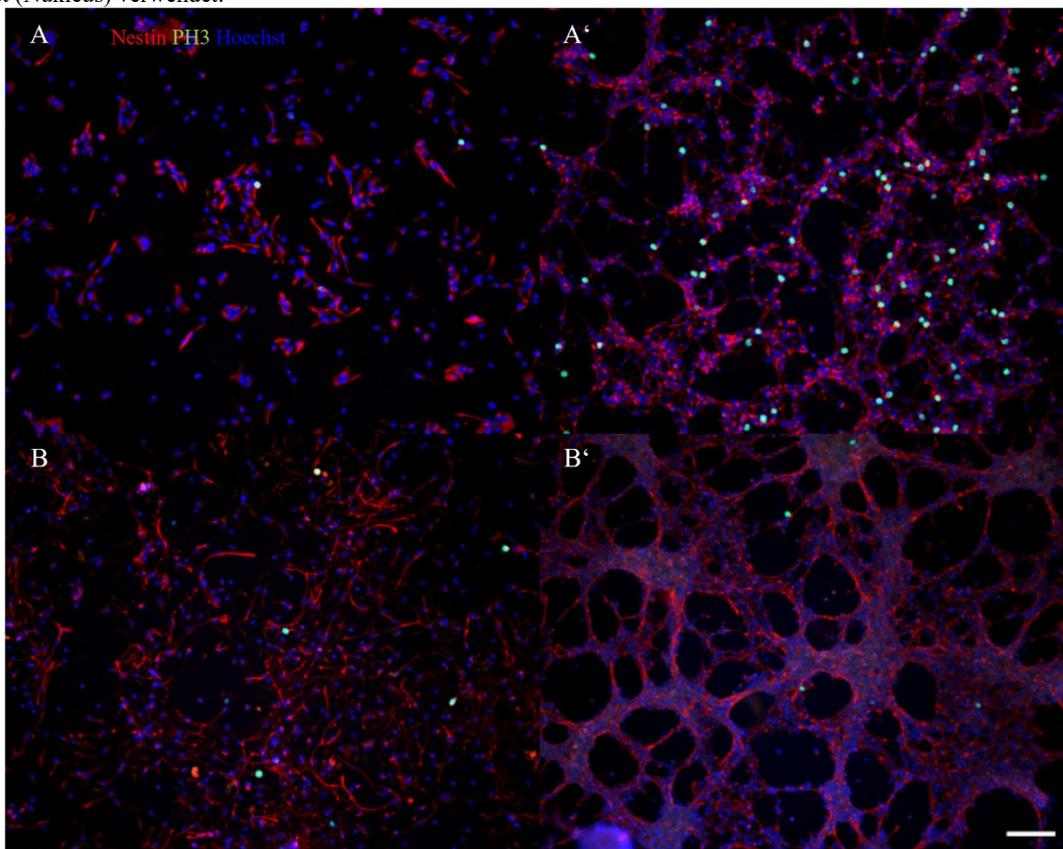
**Abb. A 123:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.11  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



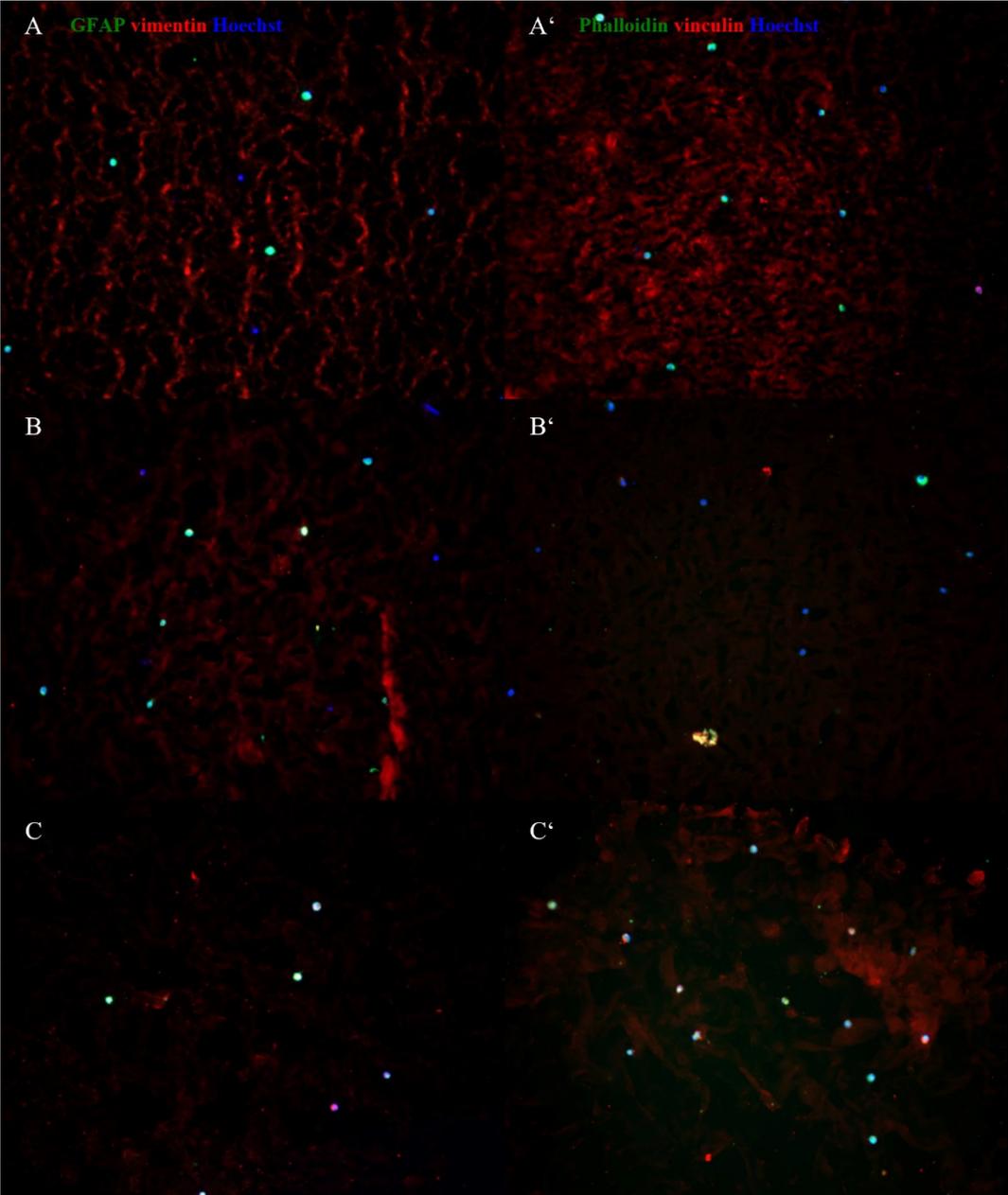
**Abb. A 124:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf kationischen Hydrogelen mit einer Konzentration von 0.06  $\mu\text{mol/mg}$  Gel (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



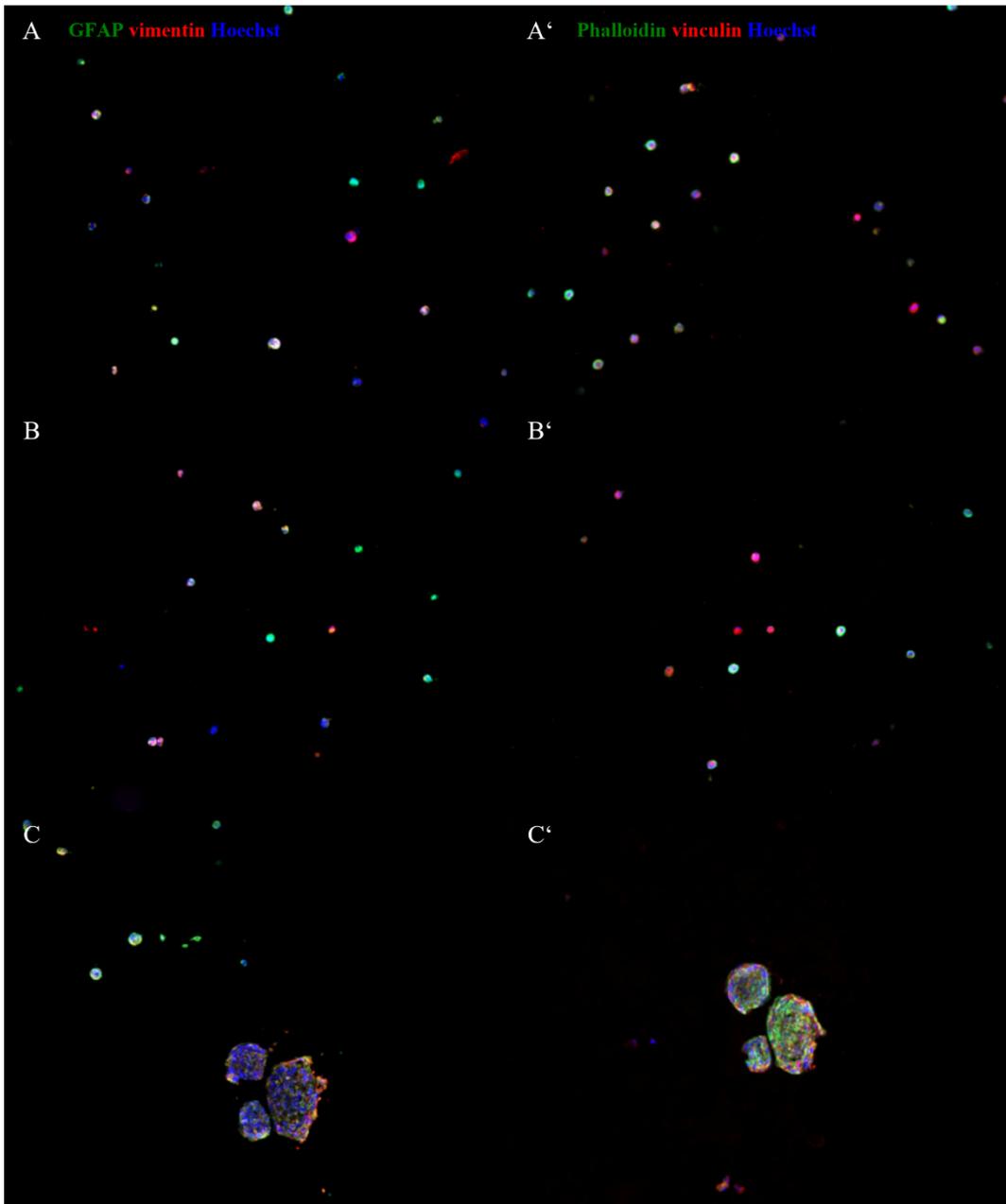
**Abb. A 125:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf unfunktionalisierten Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



**Abb. A 126:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



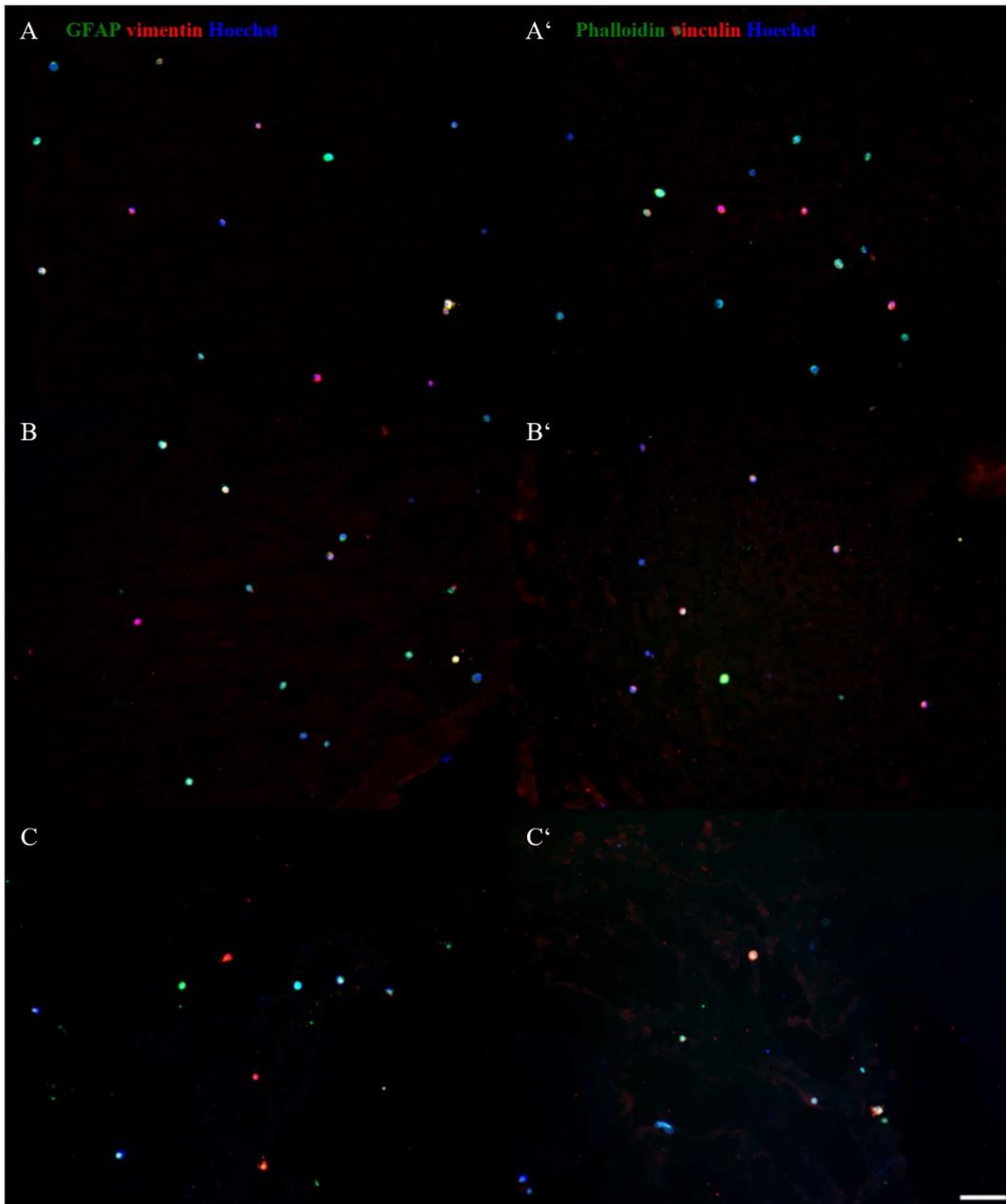
**Abb. A 127:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit der kationischen Funktionalität TMAEA mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A'-C') nach 3 (A, A'), 8 (B, B') und 42 div (C, C').



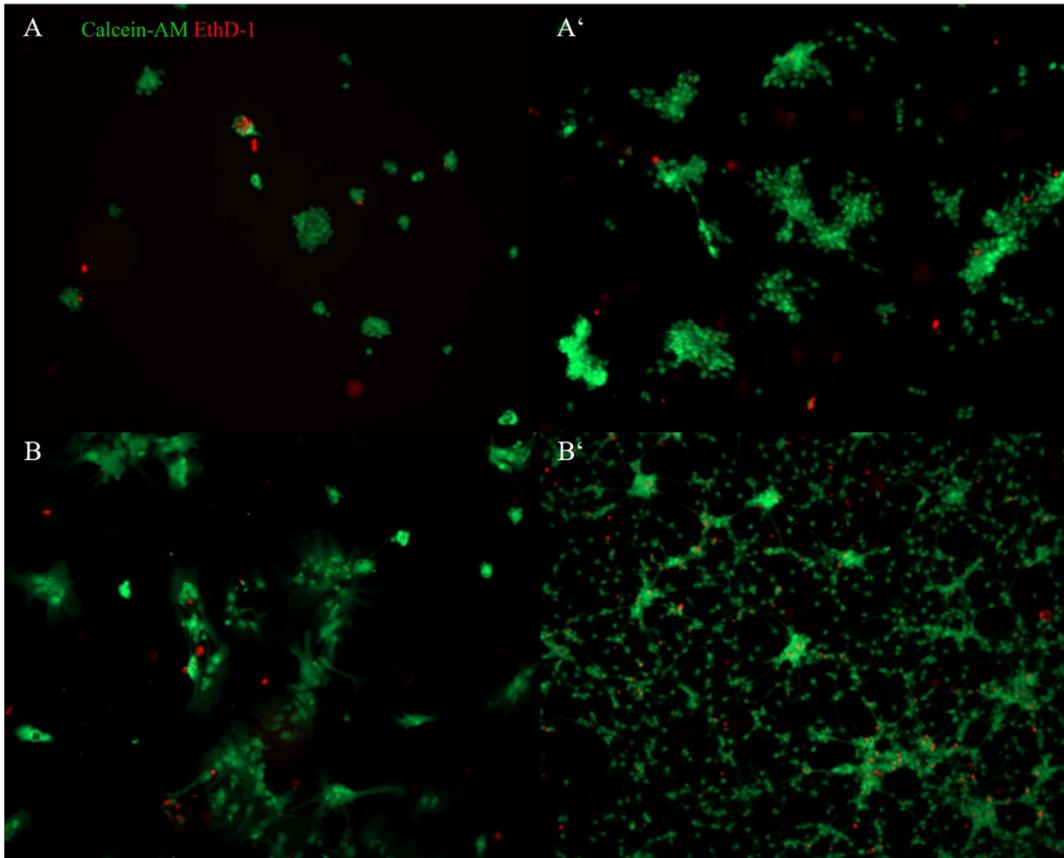
**Abb. A 128:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in unfunktionalisierten 3D Hydrogelen mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A'-C') nach 3 (A, A'), 8 (B, B') und 42 div (C, C').



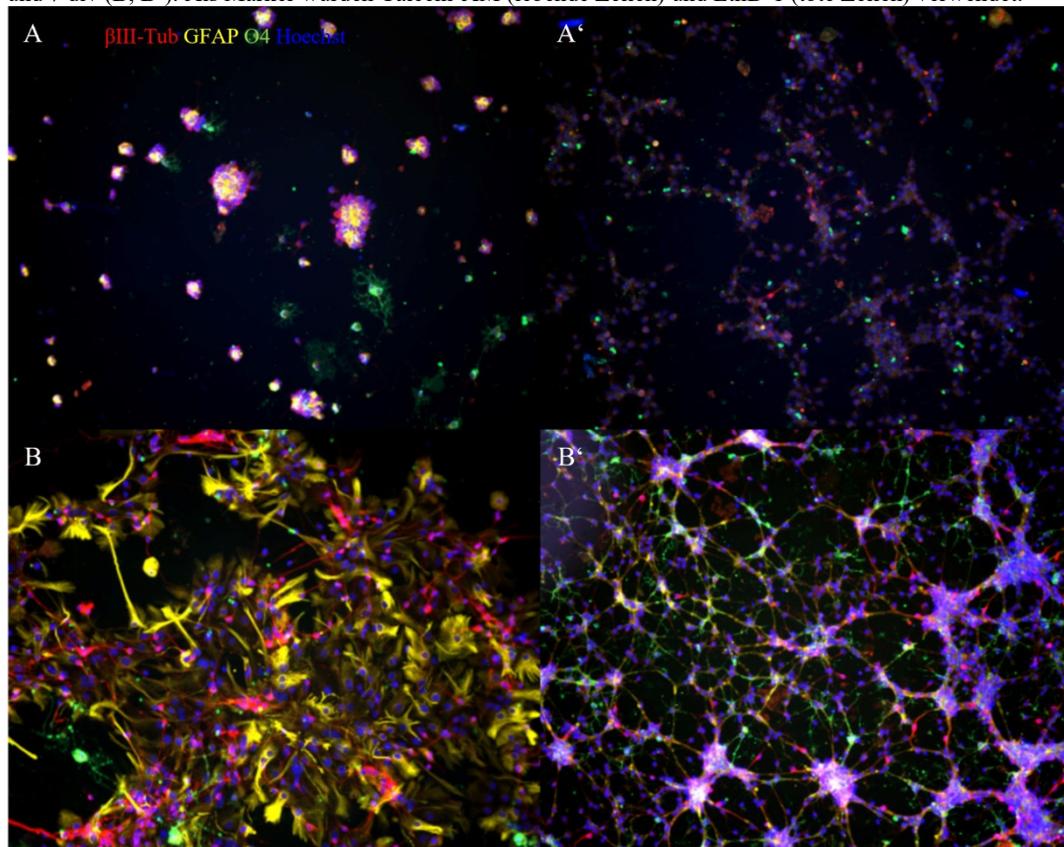
**Abb. A 129:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit dem RGD-Motiv mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A'-C') nach 3 (A, A'), 8 (B, B') und 42 div (C, C').



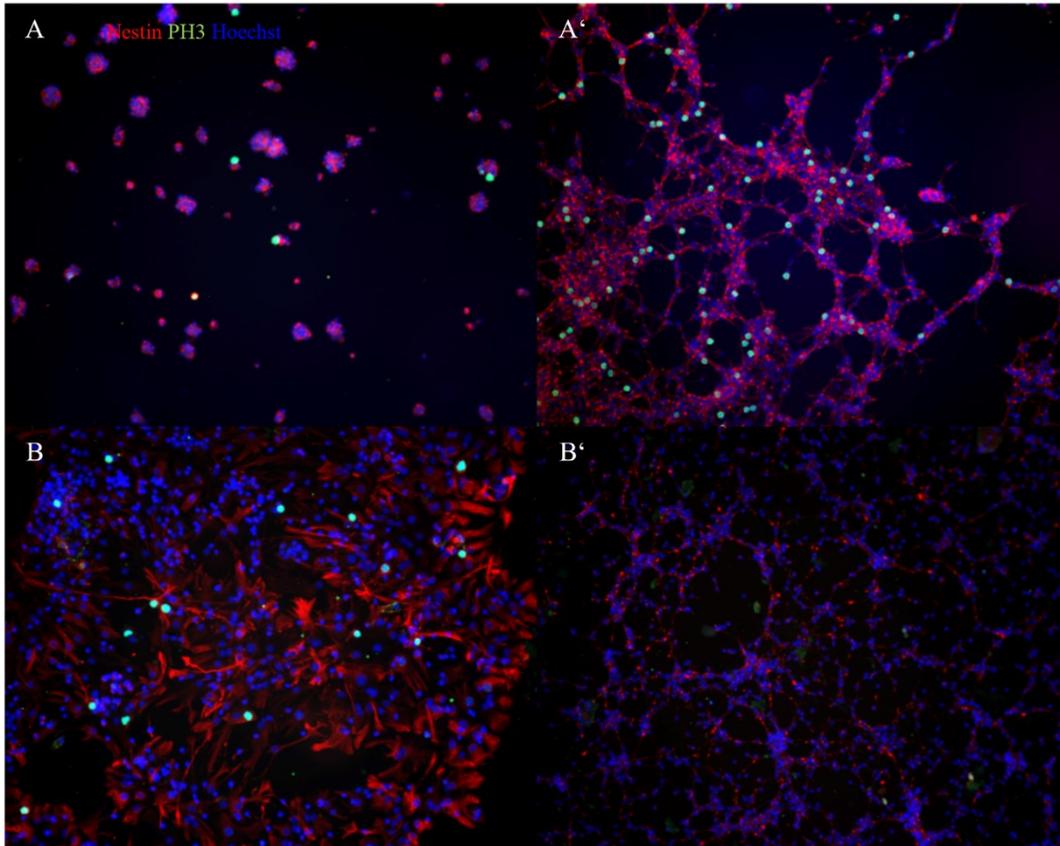
**Abb. A 130:** Großaufnahmen von U251-MG Zellen kultiviert in 3D Hydrogelen mit der kationischen Funktionalität TMAEA und dem RGD-Motiv mit einer GFAP, Vimentin und Hoechst Färbung (A-C) und einer Phalloidin, Vinculin und Hoechst Färbung (A'-C') nach 3 (A, A'), 8 (B, B') und 42 div (C, C').



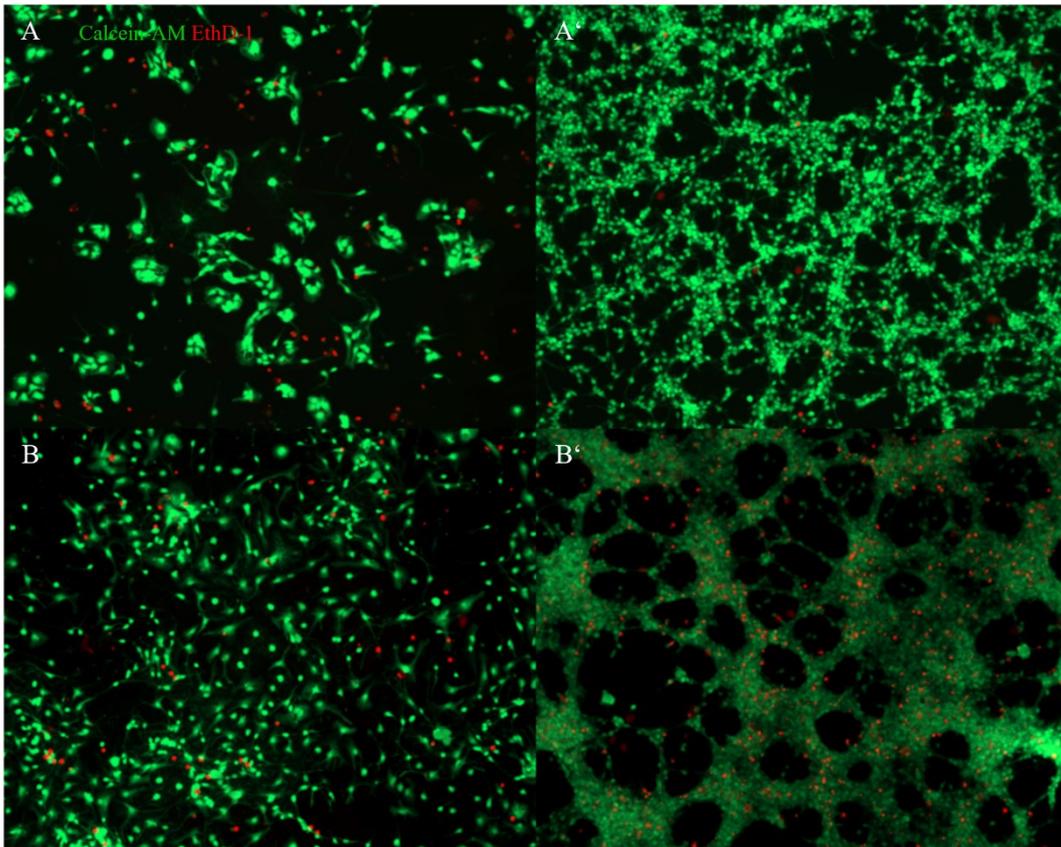
**Abb. A 131:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



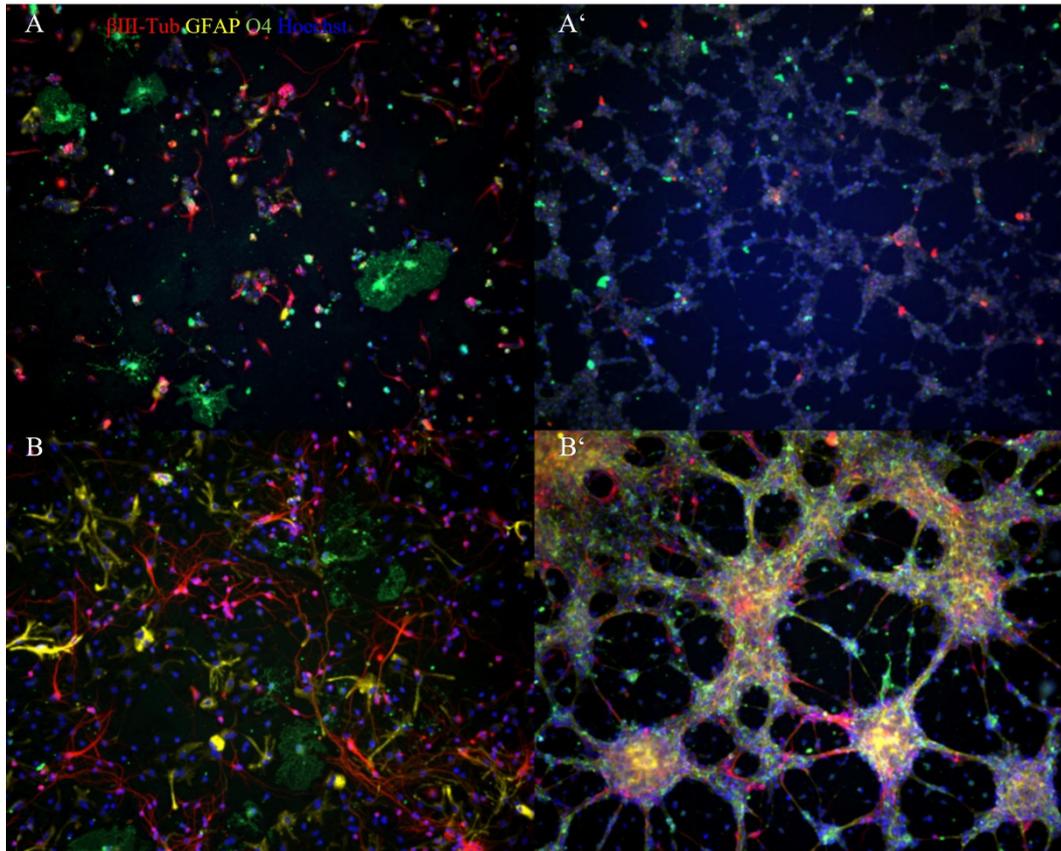
**Abb. A 132:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



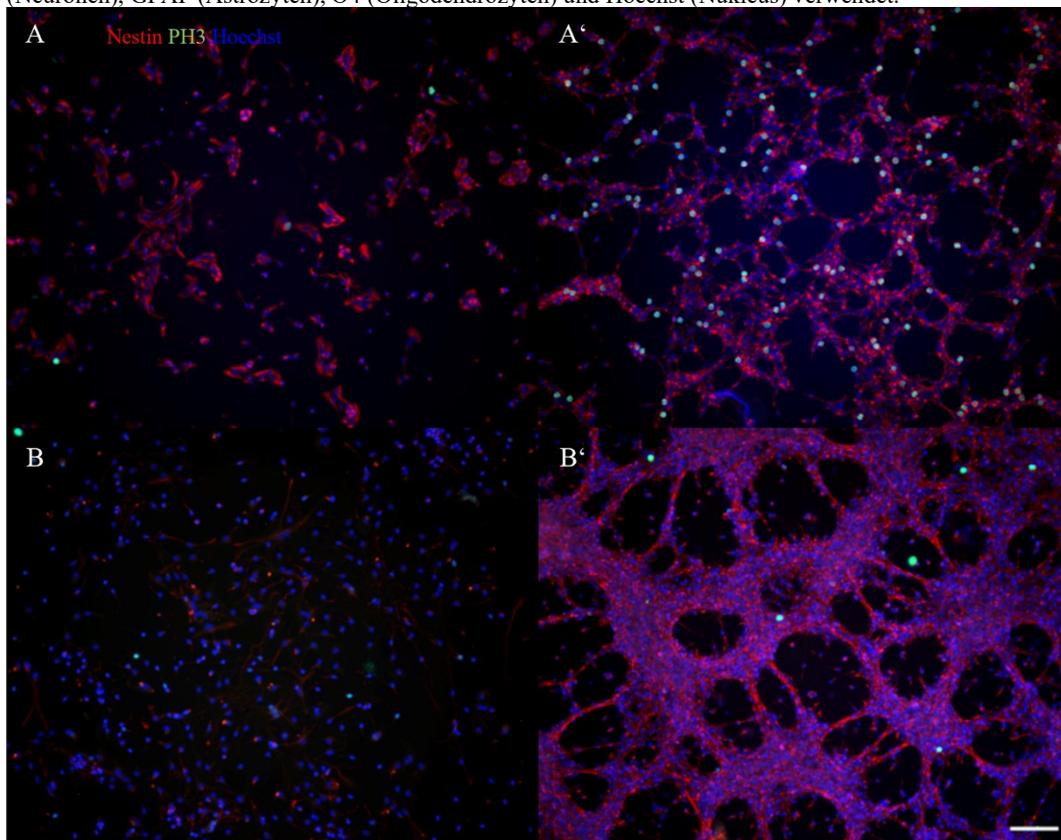
**Abb. A 133:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf TLA-Hydrogelen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B'). Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



**Abb. A 134:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B') aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden Calcein-AM (lebende Zellen) und EthD-1 (tote Zellen) verwendet.



**Abb. A 135:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B') aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden  $\beta$ III-Tub (Neuronen), GFAP (Astrozyten), O4 (Oligodendrozyten) und Hoechst (Nukleus) verwendet.



**Abb. A 136:** Großaufnahmen von NSCs kultiviert auf Polyornithin beschichteten Zellkulturschalen (A, B) und in Kombination mit FGF (A', B') nach 3 (A, A') und 7 div (B, B') aus den TLA-Experimenten. Als Marker wurden Nestin (Vorläuferzellen), PH3 (teilungsaktive Zellen) und Hoechst (Nukleus) verwendet.