

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Untersuchung Thiol-En vernetzter Gelatine Hydrogele und Vergleich mit
Alginate-Gelatine in Bezug auf das in vitro Zellverhalten von Fibroblasten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Haschke
aus Bischofsheim in der Rhön

Würzburg, März 2021

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2021

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	1
2 KENNTNISSTAND	4
2.1 Biofabrikation	4
2.2 Methoden der Biofabrikation.....	4
2.2.1 Bioassemblierung.....	4
2.2.2 3D-Biodruck	5
2.3 Materialien für die Biofabrikation	8
2.4 Hydrogel-basierte Biotinten.....	10
2.4.1 Vernetzungsmechanismen	10
2.4.2 Polymerherkunft.....	12
2.4.3 Alginate-Gelatine	14
2.4.4 Photovernetzbare Gelatinederivate.....	15
2.4.4.1 GelMA.....	16
2.4.4.2 GelAGE.....	17
2.5 Biologische Evaluation	20
2.5.1 Verwendete Zellen.....	20
2.5.2 Verwendete Methoden.....	21
3 MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 Material	24
3.1.1 Technische Geräte.....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3 Verwendete Chemikalien, Farbstoffe und Kits	27
3.1.4 Verwendete Hydrogel Komponenten.....	29
3.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen	30
3.1.6 Zellen und Zellkulturmedium.....	31
3.2 Methoden	31
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	31
3.2.2 Herstellung der Biotinten.....	32
3.2.2.1 Alginate-Gelatine	32
3.2.2.2 GelAGE.....	33
3.2.3 Live/Dead Assay.....	35
3.2.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität	36

3.2.5 DNA-Assay	37
3.2.5.1 DNA-Gehalt im Hydrogel.....	37
3.2.5.2 DNA-Gehalt auf Plattenboden.....	39
3.2.6 Phalloidin-Färbung	40
4 ERGEBNISSE	42
4.1 Vorversuche	42
4.1.1 Vernetzungstests GelAGE.....	42
4.1.2 Automatische vs. manuelle Auswertung des Live/Dead Assays	45
4.1.3 Auswandern von Zellen	47
4.2 Alginate-Gelatine Hydrogele	50
4.2.1 Vitalität.....	50
4.2.2 DNA-Gehalt.....	54
4.2.3 Metabolische Aktivität	55
4.2.4 Zellmorphologie	57
4.3 GelAGE G1MM Hydrogele	61
4.3.1 Vitalität.....	61
4.3.2 DNA-Gehalt.....	63
4.3.3 Metabolische Aktivität	64
4.3.4 Zellmorphologie	65
4.4 GelAGE G2LH Hydrogele	69
4.4.1 Vitalität.....	69
4.4.2 DNA-Gehalt.....	71
4.4.3 Metabolische Aktivität	72
4.4.4 Zellmorphologie	73
5 DISKUSSION	76
5.1 Diskussion der Methodik.....	76
5.2 Etablierung des Hydrogelsystems GelAGE für weitere Versuche	78
5.3 Vergleich der verschiedenen Hydrogelmaterialien.....	79
5.3.1 Vergleich Alginate-Gelatine und GelAGE	79
5.3.2 Einfluss von HPL auf das Zellverhalten von Fibroblasten	84
5.3.3 Fazit und Ausblick.....	86
6 ZUSAMMENFASSUNG	88
7 LITERATURVERZEICHNIS	90
APPENDIX	

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

II ABBILDUNGSVERZEICHNIS

III TABELLENVERZEICHNIS

IV LIZENZEN

V DANKSAGUNG

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Der Organmangel in der Transplantationsmedizin ist weiterhin eines der Hauptprobleme im Gesundheitswesen [1]. Daten der Stiftung Eurotransplant verdeutlichen die Differenz zwischen Angebot und Nachfrage [2]: Im Jahr 2019 wurden in Deutschland 3543 Transplantationen von verstorbenen Spendern durchgeführt, während insgesamt mehr als 9000 Patienten auf einer Warteliste registriert wurden. Im selben Jahr wurden 1095 Patienten wieder von der Warteliste gestrichen, da ihr gesundheitlicher Zustand keine Transplantation mehr ermöglichte oder sie aufgrund des Spendermangels verstarben. Neben diesen lebensrettenden Operationen besteht auch im Bereich lebensverbessernder Therapien der Wunsch nach neuen Behandlungsmöglichkeiten, welche den Ersatz von defektem oder erkranktem Gewebe reformieren sollen. Bspw. führen traumatische Knorpelverletzungen und osteochondrale Defekte häufig zu sekundärer Osteoarthritis, welche bei betroffenen Patienten zu schweren klinischen Problemen führen kann [3]. Die gegenwärtigen chirurgischen Behandlungsmethoden sind nicht in der Lage den hyalinen Knorpel zu reproduzieren. Damit ist die Wiederherstellung einer physiologischen Gelenkfunktion nicht gewährleistet [4].

Tissue Engineering und das Feld der Regenerativen Medizin liefern schon seit einigen Jahren vielversprechende Ansätze zum Ausgleich des Spendermangels und zur Verbesserung der gegenwärtigen therapeutischen Ansätze [5]. Dabei bieten additive Fertigungstechniken der Biofabrikation die Möglichkeit zur Herstellung gewebeähnlicher Konstrukte, um beschädigtes oder krankes menschliches Gewebe zu heilen oder zu ersetzen. Neben dem noch recht futuristischen Ziel physiologisch funktionierende Organe zu fertigen, können diese Konstrukte im Bereich der Arzneimittelforschung und -prüfung sowie für die Untersuchung von Krankheitsprozessen von Nutzen sein [6].

Der dreidimensionale (3D) Biodruck ist einer der wichtigsten Ansätze der Biofabrikation und ermöglicht das computergesteuerte Ablegen von Zellen und Biomaterialien, sogenannten Biotinten, um biologisch funktionelle

3D-Konstrukte zu erzeugen [7-9]. Als Druckmaterial werden häufig Hydrogele verwendet: Eine Klasse hydrophiler Polymernetzwerke, die in der Lage sind große Mengen an Wasser aufzunehmen, ohne sich dabei selbst aufzulösen [10]. Der hohe Wassergehalt verhindert das Austrocknen der Zellen und macht diese Materialklasse somit zu einem idealen Kandidaten für die Zellkultur [11]. Großes Potenzial wird dabei Gelatine-basierten Hydrogelen zugeschrieben, da diese unter anderem verschiedene Peptidsequenzen aufweisen, welche die Zelladhäsion und Zellproliferation unterstützen [12].

Der Fortschritt auf diesem Gebiet wird jedoch nach wie vor durch einen Mangel an geeigneten Biotinten gebremst. Die Entwicklung gestaltet sich als äußerst herausfordernd, da entsprechende Materialien teilweise konträre Anforderungen erfüllen müssen. So sollen Biotinten sowohl als zytokompatible Gerüststruktur bzw. extrazelluläre Matrix für Zellen dienen als auch den mechanischen Anforderungen an den Biofabrikationsprozess selbst gerecht werden [13, 14]. Insbesondere die Vereinbarung geforderter physikalisch-chemischer Eigenschaften mit einer zwingend notwendigen Zytokompatibilität gilt als eine der Haupthürden für ein weiterhin erfolgreiches Voranschreiten auf diesem Forschungsfeld [7, 15, 16]. Daher ist die Entwicklung und die Evaluation neuer Biotinten von zentraler Bedeutung. Alginate-Gelatine (Alg-Gel) ist eines der am häufigsten verwendeten natürlichen Polymere für den Biodruck [17]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei GelAGE um ein noch relativ unerforschtes Hydrogelsystem, welches jedoch schon den grundlegenden Anforderungen der Druckbarkeit gerecht werden konnte und das Überleben von Chondrozyten über einen längeren Zeitraum gewährleistete [18, 19]. Systematische Untersuchungen, die für die *in vitro* Zellkultur relevanten Eigenschaften von GelAGE, stehen jedoch noch aus.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist die biologische Evaluation des am Lehrstuhl etablierten Gelatine-basierten Hydrogelsystems GelAGE und der Vergleich zu den im Feld der Biofabrikation sehr gut erforschten Alginate-Gelatine Biotinten. Dabei soll überprüft werden, inwiefern der Ablauf

der Vernetzungsreaktion, die Polymerkonzentration und der Zusatzstoff Humanes Plättchenlysat (HPL) einen Einfluss auf die Zytokompatibilität des Materials haben. Weiterhin soll überprüft werden, ob eine unterschiedliche Zell-Material-Interaktion zwischen der thermoresponsiven und der nicht-thermoresponsiven GelAGE Variante nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zweck sollen Vitalität, DNA-Gehalt, metabolische Aktivität und Morphologie der Zellen als Parameter für eine nachvollziehbare Beurteilung der biologischen Eigenschaften herangezogen werden. Für eine Einschätzung der Vitalität soll eine Live/Dead Färbung durchgeführt werden, deren Auswertung in der Literatur allerdings nur wenig erforscht ist. Daher soll zudem ein schlüssiger Weg zur Analyse von Live/Dead Aufnahmen erörtert werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Biofabrikation

Die Biofabrikation ist ein aufstrebendes Forschungsgebiet und bietet durch die Zusammenführung von Erkenntnissen aus Biologie, Technik und Materialforschung großes Potenzial für die Medizin. Vereinfacht kann der Begriff Biofabrikation als ein Prozess beschrieben werden, welcher zu einem strukturiert aufgebauten Produkt mit biologischer Funktionalität führt [9]. Für die Anwendung im Feld des Tissue Engineerings und der Regenerativen Medizin ist jedoch eine genauere Beschreibung des Begriffs von Nöten. So definierte Groll *et al.* 2010 **Biofabrikation** für das Tissue Engineering und die Regenerative Medizin als *'the automated generation of biologically functional products with structural organization from living cells, bioactive molecules, biomaterials, cell aggregates such as micro-tissues, or hybrid cell-material constructs, through Bioprinting or Bioassembly and subsequent tissue maturation processes'* [9]. Demnach generieren automatisierte Prozesse Konstrukte, welche die Hierarchie von natürlichem Gewebe nachahmen sollen. Diese Hierarchie kann entweder durch das direkte Ablegen von Zellen in oder auf dem Konstrukt erfolgen oder aber durch Konstrukte, welche selbst ein Einwandern von Zellen induzieren. Als weiterer wichtiger Schritt schließt sich der automatisierten Herstellung ein Reifungsprozess an. Dieser kann sowohl *in vitro* mit einer Kulturphase als auch *in-vivo* nach einer Transplantation erfolgen und führt zu einem hierarchischen, biologisch funktionalen Konstrukt [9].

2.2 Methoden der Biofabrikation

Wie bereits angedeutet, können die in der Biofabrikation eingesetzten Strategien entweder als Bioassemblierung oder als Biodruck bezeichnet werden [20].

2.2.1 Bioassemblierung

Der Begriff **Bioassemblierung** beschreibt eine Methode, bei der hierarchische Konstrukte mit einer definierten 2D- oder 3D-Struktur durch den

automatisierten Zusammenbau vorgefertigter zellenthaltender Bausteine erzeugt werden [20]. Die dabei verwendeten Zellaggregate, Zellfasern oder komplexere Strukturen wie Organoide, werden durch zellgetriebene Selbstorganisation in Kultur gebildet. Des Weiteren können auch hybride Zell-Material-Konstrukte, wie bspw. zellbeladene Mikrogele, als Bausteine eingesetzt werden [9]. Aufgrund des komplexen Aufbaus der einzelnen Bausteine ist eine Verarbeitung über den Biodruck nur noch bedingt möglich. Umgekehrt müssen die einzelnen Bestandteile eine gewisse Mindestgröße aufweisen, um den automatisierten Zusammenbau erst zu ermöglichen.

2.2.2 3D-Biodruck

Mit dem Begriff 3D-Druck werden im Allgemeinen Fertigungsverfahren beschrieben, bei denen durch das computergesteuerte schichtweise Auftragen von Materialien dreidimensionale Werkstücke erzeugt werden [21].

Diese grundlegende Funktionsweise findet sich auch im medizinisch relevanten 3D-Biodruck wieder, welcher als zweite wichtige Methode der Biofabrikation gilt. Definiert wurde der Begriff **Biodruck** von Guillemot *et al.* im Jahr 2010 als die Anwendung computergestützter Verfahren, mit deren Hilfe lebende und nicht lebende Materialien zu Konstrukten mit einer definierten 2D- oder 3D-Struktur zusammengebaut werden [22]. Diese biotechnologisch gefertigten Konstrukte finden Anwendung in der Regenerativen Medizin, der Pharmakokinetik, sowie in grundlegenden zellbiologischen Studien [22].

Es gibt drei weit verbreitete Verfahren, welche geeignet sind, um aus Biotinten komplexe 3D-Strukturen herzustellen (Abbildung 1). Hierzu gehören der Tintenstrahl-basierte Biodruck (Injekt Bioprinting), der Laser-basierte Biodruck (Laser-induced forward transfer; LIFT) und der Extrusions-basierte Biodruck (Extrusion Bioprinting) [7, 8, 16, 23]. Alle diese Techniken haben die Gemeinsamkeit, dass sie zuvor am Computer konstruierte dreidimensionale Modelle mithilfe automatisierter Prozesse Schicht für Schicht zu realen Objekten verarbeiten können. Dazu kann das gedruckte Material vor, nach oder während

des Druckvorgangs vernetzt (Crosslinking) werden, um die endgültige Form, Struktur und Architektur des entworfenen Konstrukts zu erzeugen bzw. zu fixieren [7, 24].

Im Gegensatz zu konventionellen 3D-Druckverfahren muss die Verarbeitung unter physiologischen bzw. zell-freundlichen Bedingungen ablaufen und zytotoxische Einflüsse müssen möglichst vermieden werden. Die verschiedenen Druckverfahren haben jeweils eigene Vor- und Nachteile. Welches Verfahren letztendlich verwendet wird, ist hauptsächlich von dem zu verarbeitenden Material und der zu erschaffenden Struktur (Größe, Geometrie, Auflösung) abhängig [8].

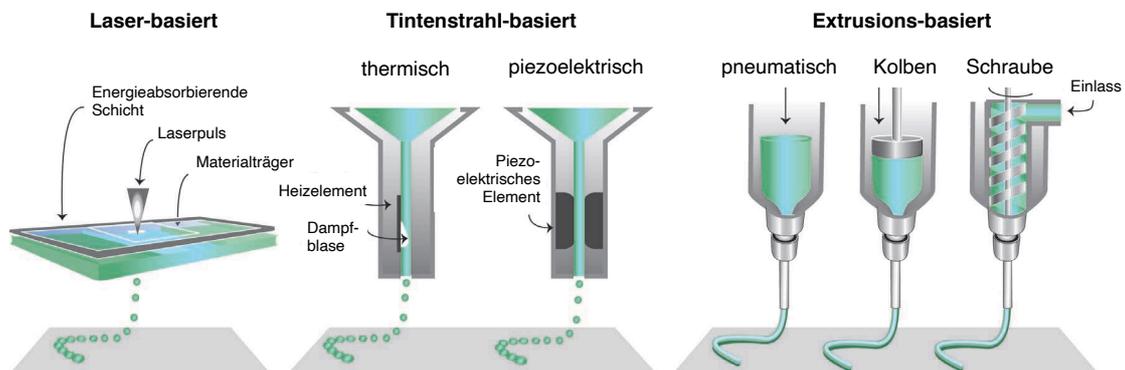


Abbildung 1: Überblick über die am weitesten verbreiteten Biodruck Verfahren. Bild modifiziert nach Malda *et al.* [7]. (mit freundlicher Genehmigung von *John Wiley and Sons, Adv. Mater.* 2013)

Tintenstrahl-basierter Biodruck

Der Tintenstrahl-basierte Biodruck hat seinen Ursprung im konventionellen 2D-Tintenstrahldruck und gilt als das älteste Verfahren [25]. Hierbei wird die Biotinte mittels thermischer oder piezoelektrischer Regulation durch eine feine Düse in Form von Tröpfchen auf einem vorgegebenen Bereich deponiert. Die thermisch kontrollierte Mobilisierung erfolgt durch ein kleines Heizelement, welches die Biotinte lokal verdampfen lässt und somit einen Druckimpuls auslöst, welcher die Tröpfchen aus dem Druckkopf ausstößt. Dieser Impuls wird bei piezoelektrischen Systemen über die akustischen Wellen eines piezoelektrischen Elements ausgelöst. Beide Methoden zeigen eine hohe Zellvitalität und sind aufgrund des einfachen Aufbaus sehr kostengünstig [26].

Allerdings erlaubt der kleine Öffnungsdurchmesser des Druckkopfs nur die Verarbeitung relativ dünnflüssiger Materialien, da sonst die Düsen verstopfen und hohe Scherspannungen entstehen können [25].

Laser-basierter Biodruck

Laser-basierte Drucksysteme bestehen in der Regel aus drei Hauptkomponenten: Einer gepulsten Laserquelle, einem mit der Biotinte beschichteten, energieabsorbierenden Träger und dem Empfängersubstrat. Während des Druckvorgangs wird der gepulste Laserstrahl auf einen kleinen Bereich der absorbierenden Trägerschicht fokussiert und erzeugt dadurch eine lokale Verdampfung. Infolge des hohen Gasdrucks wird die Biotinte in Form von Tröpfchen in das Empfängersubstrat ausgestoßen und anschließend vernetzt. Durch den düsenunabhängigen Druckprozess können Biotinten mit verschiedensten Eigenschaften in hoher Präzision und ohne Verstopfungsprobleme gedruckt werden [27]. Zudem wird keine mechanische Belastung auf die Zellen ausgeübt. Allerdings ist der Druckvorgang sehr kostenintensiv und zeitaufwändig [25].

Extrusions-basierter Biodruck

Der Extrusions-basierte Biodruck ist eine der am häufigsten verwendeten Techniken der Biofabrikation [28]. Hierbei wird das Material in eine Kartusche geladen und durch pneumatischen oder mechanischen (Kolben oder Schrauben) Druck aus einer Kanüle ausgestoßen. Anstatt einzelne Tröpfchen zu bilden, wird die Biotinte durch die kontinuierlich aufgebrachte Kraft als Strang auf einer Kollektorplatte abgelegt. Dabei bewegt sich entweder die Kanüle oder die Kollektorplatte entlang der x-, y- und z-Achse, um Schicht für Schicht ein dreidimensionales Objekt zu erzeugen [13]. Durch dieses Vorgehen lassen sich viele verschiedene Materialien mit unterschiedlicher Viskosität verarbeiten [24]. Allerdings ist die mit dieser Technik erzielte Auflösung die niedrigste unter allen drei Methoden [25]. Dennoch bietet dieses Verfahren die technische Grundlage für die meisten kommerziell verwendeten Biodruckgeräte, da es die Möglichkeit

bietet, Objekte in einem realistischen Zeitrahmen in klinisch relevanter Größe herzustellen [8, 29].

2.3 Materialien für die Biofabrikation

Bei den verschiedenen Methoden der Biofabrikation sind die verwendeten Materialien von zentraler Bedeutung. Da die beiden Begriffe Biofabrikation und Biodruck eng miteinander verwandt sind und sich sogar überschneiden, ist eine Unterscheidung der eingesetzten Materialien jedoch schwierig [9, 30]. Allerdings kann der an den konventionellen (nicht biologischen) Druck angelehnte Begriff der Biotinte deutlich von der Gruppe der Biomaterial Tinten abgegrenzt werden (Abbildung 2).

So bezeichnet der Begriff **Biomaterial-Tinten** Materialien, die beim Druckprozess keine Zellen enthalten, deren azelluläre Konstrukte in einem zweiten Schritt jedoch mit Zellen besiedelt werden können [30]. Dazu gehörige Materialien wie thermoplastische Polymere oder Zemente werden bspw. bei der Herstellung von Implantaten, Bioreaktoren oder der mechanischen Stabilisierung von Konstrukten aus Biotinten verwendet [30].

Im Gegensatz dazu sind **Biotinten** durch das obligatorische Enthalten von Zellen definiert [30]. Die Biotinte wird also als Zelltransportmedium genutzt. Die zellulären Bestandteile können dabei in Form von einzelnen Zellen, umhüllten Zellen und Zellaggregaten, aber auch in Kombination mit Materialien, wie bspw. eingebettet in Mikrogelen, vorliegen [30]. Optionale weitere Komponenten sind bioaktive Substanzen wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder weitere Biomaterialien, welche sich letztendlich gemeinsam mit den zellulären Bestandteilen durch additive Verfahren der Biofabrikation verarbeiten lassen müssen [30].

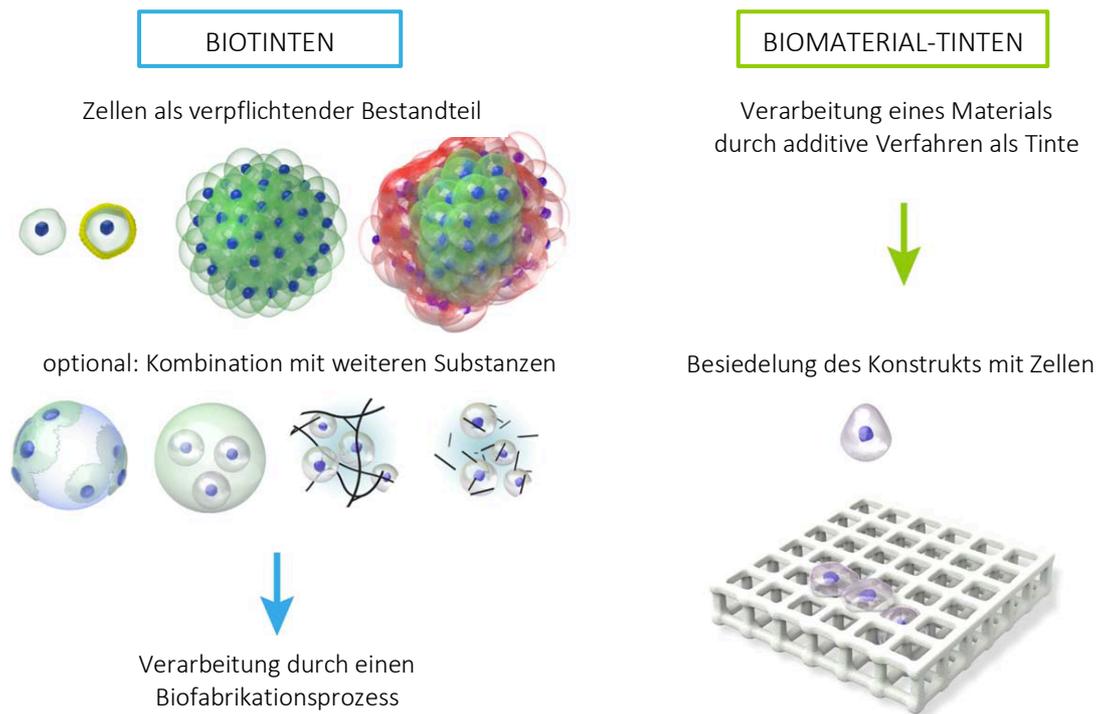


Abbildung 2: Biotinten und ihre Abgrenzung zu Biomaterial-Tinten. Biotinten sind durch das obligatorische Enthalten von Zellen definiert, wohingegen bei den Biomaterial-Tinten der Zellkontakt erst nach dem Druckprozess stattfindet. Bild modifiziert nach Groll *et al.* [30]. (freie Nutzung dank CC-BY Lizenz; Autor: Groll *et al.*)

Beim Biodruck lassen sich die am häufigsten verwendeten Biotinten in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe beschreibt Biotinten bei denen Zellen in Form von Gewebeschärfen, Zellpellets oder Gewebesträngen ohne Verwendung eines weiteren Biomaterials verdrukt werden [10]. Dabei gewährleisten sehr hohe Zellkonzentration die nötige Druckbarkeit auch ohne weitere Komponenten [31].

Die zweite und bekanntere Gruppe umfasst Biotinten, bei denen die Zellen in Verbindung mit Biomaterialien verarbeitet werden [31]. Meist wird das Gerüstmaterial der hergestellten Konstrukte anschließend wieder biologisch abgebaut und der übrig gebliebenen Raum durch die zurück bleibenden Zellen eingenommen [32]. Für diesen Zweck werden meistens Hydrogele bzw. Hydrogelvorstufen verwendet, welche aufgrund ihres hohen Wassergehalts und der geringen Toxizität positive Wechselwirkung mit Zellen aufweisen [16]. Daher fokussiert sich die vorliegende Arbeit auf diese Gruppe von Biotinten.

2.4 Hydrogel-basierte Biotinten

Für eine ideale Biotinte ist es unerlässlich gewisse Anforderungen sowohl mechanischer, rheologischer als auch biologischer Art zu erfüllen. So haben sich Hydrogele als ein vielversprechendes Material für den Biodruck etabliert, da sie ein breites Spektrum dieser geforderten Eigenschaften abdecken [4, 25].

Hydrogele können als eine Klasse dreidimensionaler Polymernetzwerke definiert werden, welche die Fähigkeit besitzen in Wasser zu quellen und einen wesentlichen Teil davon in ihrer Struktur zurückzuhalten, ohne sich jedoch in Wasser aufzulösen [11, 33]. Aufgrund zahlreicher positiver Eigenschaften sind sie ein interessanter Kandidat für biomedizinische Anwendungen. So zeigen Hydrogele allgemein eine gute Zytokompatibilität, da der hohe Wassergehalt eine der natürlichen extrazellulär Matrix ähnelnde 3D-Umgebung schafft, welche gleichzeitig biologisch abbaubar ist [7, 34]. Ihre Zusammensetzung sorgt weiterhin dafür, dass die eingekapselten Zellen vor schädigenden Einflüssen geschützt sind, während immer noch Sauerstoff, Nährstoffe und Stoffwechselprodukte leicht in das Hydrogel diffundieren können [5]. Darüber hinaus weisen die meisten der in der Biofabrikation eingesetzten Polymere spezifische Bindungsstellen für Zellen auf, welche für deren Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Nöten sind [17].

2.4.1 Vernetzungsmechanismen

Für den 3D-Biodruck werden meist keine schon vernetzten Hydrogele eingesetzt, sondern deren nicht vernetzte noch flüssige Vorstufen, in welchen die Zellen suspendiert vorliegen [30, 35]. Um eine langfristige Formbeständigkeit des gedruckten Konstrukts zu gewährleisten, ist eine Vernetzungsreaktion (Crosslinking) nötig, da selbst Hydrogelvorstufen mit einer sehr hohen Viskosität ohne diese nach einer gewissen Zeitspanne kollabieren [7]. Durch die Vernetzung wird außerdem eine Auflösung der hydrophilen Polymerketten in die wässrige Phase vermieden und die Zellen bleiben eingekapselt [36]. Je nach Art der zu Grunde liegenden Vernetzungsreaktion können Hydrogele in chemisch vernetzte und physikalisch vernetzte Hydrogele eingeteilt werden,

wobei vor allem bei Mehrkomponentenbiotinten auch die Kombination von beiden Mechanismen möglich ist [37, 38]. Darüber hinaus kann zwischen Vernetzungsreaktionen unterschieden werden, welche vor (Pre-crosslinking), nach (Post-crosslinking) oder auch während des Druckvorgangs (In-situ-crosslinking) erfolgen [28].

Physikalisch vernetzte Hydrogele

Physikalisch vernetzte Hydrogele werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten gebildet. Meist erfolgt die Vernetzung durch ionische Wechselwirkungen oder, im Falle von thermoresponsiven Polymeren, aufgrund von temperaturinduzierten Veränderungen der Materialeigenschaften [7]. Diese Art der Vernetzung wird sehr gerne verwendet, da unter anderem potenziell schädliche Vernetzer (Crosslinker) vermieden und somit zellfreundliche Bedingungen geschaffen werden [7, 36].

Da die nicht-kovalenten Wechselwirkungen reversibel sind und von den Umgebungsbedingungen beeinflusst werden, zeigen physikalisch vernetzte Hydrogele in der Regel schlechtere mechanische Eigenschaften im Vergleich zu chemisch vernetzten Hydrogelen [39]. Daher ist häufig eine Modifikation mit funktionellen Gruppen, welche eine chemische Nachvernetzung ermöglichen, nötig [23, 37, 40]. Ein bekanntes Beispiel für diese Gruppe von Hydrogelen ist das Polysaccharid Alginat, welches durch ionische Wechselwirkungen mit zweiwertigen Kationen, normalerweise Calcium-Ionen, rasch vernetzt [36].

Chemisch vernetzte Hydrogele

Chemisch vernetzte Hydrogele entstehen durch die irreversible Bildung kovalenter Bindungen, welche zu einer deutlich höheren mechanischen Stabilität führen [8]. Ein irreversibles Polymernetzwerk kann durch verschiedene chemische Reaktionen, wie der Michael-Addition, enzymatischen Reaktionen oder Photopolymerisation gebildet werden [41-44]. Wichtig ist, dass diese Reaktionen unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Es sollten also keine

zytotoxischen Produkte verwendet werden oder als Nebenprodukte entstehen und potenziell zellschädigende (UV-) Strahlung vermieden werden [7].

Unter den verschiedenen chemischen Vernetzungsreaktionen ist die Photopolymerisation ein besonders beliebter Ansatz, da so sehr schnelle Vernetzungsreaktionen mit präziser zeitlicher und räumlicher Kontrolle ermöglicht werden [4, 24]. Dabei werden Photoinitiatoren durch das Licht einer bestimmten Wellenlänge in freie Radikale gespalten. Diese bilden daraufhin kovalente Bindungen zwischen den Polymerketten im Hydrogel. Solche Photovernetzungsreaktionen können jedoch eine vorübergehende zytotoxische Umgebung schaffen, welche die Zellebensfähigkeit oder den Phänotyp beeinträchtigen kann [12, 45]. Ein gut erforschtes Beispiel für diese Art der Vernetzung ist die radikalische Photopolymerisation von Gelatine Methacrylat (GelMA) [46-50].

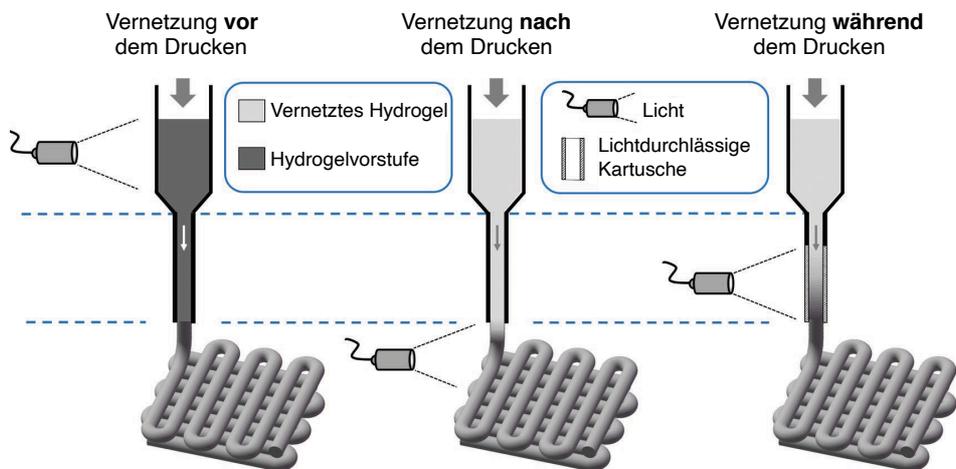


Abbildung 3: Vernetzungsreaktion von Hydrogelvorstufen. Das Bild zeigt als Beispiel die Licht-induzierte Photopolymerisation, welche zu verschiedenen Zeitpunkten des Druckvorgangs erfolgen kann. Bild modifiziert nach Ouyang *et al.* [51]. (mit freundlicher Genehmigung von *John Wiley and Sons, Adv. Mater.* 2016)

2.4.2 Polymerherkunft

Im Hinblick auf die Polymerherkunft gibt es grundsätzlich zwei Gruppen von Hydrogelen: Hydrogele auf Basis natürlicher Polymere und Hydrogele auf Basis synthetischer Polymere.

Hydrogele natürlicher Herkunft

Historisch gesehen basieren für das Tissue-Engineering eingesetzte Hydrogele überwiegend auf natürlich gewonnen Polymeren, darunter auch die häufig verwendeten Polymere Alginat, Gelatine und Hyaluronsäure [7, 52-54]. Diese Materialien eignen sich für biomedizinische Anwendungen besonders gut, da sie sowohl eine natürliche Zytokompatibilität und biologische Abbaufähigkeit aufweisen als auch durch ihre strukturelle Zusammensetzung der extrazellulär Matrix ähneln [31]. Darüber hinaus besitzen bspw. Gelatine-basierte Hydrogele zelladhäsive Bindungssequenzen (Arginin-Glycin-Asparaginsäure; RGD-Sequenzen), welche die Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung begünstigen [4, 55, 56]. Allerdings zeigen Hydrogele natürlicher Herkunft oft unzureichende mechanische Eigenschaften, unterschiedliche Druckbarkeit und eine hohe batch-to-batch Variation, was die Herstellung von Hydrogelen mit reproduzierbaren Eigenschaften erschweren kann [7, 31].

Hydrogele synthetischer Herkunft

Im Gegensatz zu natürlichen Polymeren ermöglichen Hydrogele synthetischer Herkunft, wie Polyethylenglykol (PEG) und Pluronic, in der Regel eine präzise Kontrolle ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften [7, 57]. Infolgedessen können Vernetzungsraten und mechanische Eigenschaften gezielt reguliert werden und Hydrogele auf reproduzierbare Weise hergestellt werden [35]. Allerdings besitzen diese Materialien keine bioaktiven Moleküle, welche die wichtige Zellinteraktion sowie den enzymvermittelten Ab- und Umbau fördern [31, 58].

Da beide Gruppen von Hydrogelen ihre spezifischen Vor- und Nachteile aufweisen, können sie zur Optimierung ihrer mechanobiologischen Eigenschaften mit weiteren Polymeren kombiniert (bspw. Alginat-Gelatine) oder mit funktionellen Gruppen (bspw. GelMA) und bioaktiven Bestandteilen wie Wachstumsfaktoren und Peptiden modifiziert werden [10, 32, 59].

Zusatzstoffe

Hydrogele werden meist durch die Lösung von Feststoffen in Puffern wie PBS hergestellt. Selbst wenn das Hydrogelmaterial genügend zelladhäsive RGD-Sequenzen bereitstellt, fehlen dennoch typische Adhäsionsproteine wie Fibronectin, die aus dem Medium in das Hydrogel diffundieren müssen [60]. Daher können die Hydrogeleigenschaften durch verschiedene Zusatzstoffe optimiert werden. So enthält bspw. Humanes Plättchenlysate (HPL) neben wichtigen Proteinen wie Albumin und Fibrinogen auch verschiedene Wachstumsfaktoren und biochemische Signalstoffe [61]. So konnte schon in verschiedenen Studien durch die direkte Zugabe von HPL in die Hydrogele ein positiver Effekt auf die Proliferation, Differenzierung und Morphologie von Zellen nachgewiesen werden [60-65].

2.4.3 Alginat-Gelatine

Alginat ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, das aus Algen gewonnen wird. In der Biomedizin findet Alginat häufige Anwendung, da es eine gute Zytokompatibilität und geringe Zytotoxizität bei niedrigen Kosten zeigt [66]. Aufgrund der schnellen Vernetzungsreaktion unter physiologischen Bedingungen durch zweiwertige Kationen (bspw. Ca^{2+} -Ionen) und einer allgemein guten Druckbarkeit ist es eines der am häufigsten verwendeten natürlichen Polymere für den Biodruck und wahrscheinlich das am häufigsten verwendete Material für Proof-of-Concept-Studien [17]. Alginat kann zwar gute Vernetzungseigenschaften aufweisen, hat selbst jedoch keine Möglichkeit mit Zellen zu interagieren, da es keine zellbindenden Motive besitzt und somit als biologisch inert gilt [67]. Daher ist eine Modifikation mit zellulären Adhäsionsmolekülen oder die Kombination mit einem weiteren Polymer nötig. Eine einfache und etablierte Methode ist hierbei die Herstellung einer Multikomponenten Biotinte aus Alginat und nicht funktionalisierter Gelatine. Gelatine ist eine Mischung von Peptidsequenzen, die durch die Denaturierung von Kollagen hergestellt wird und im Gegensatz zu Alginat zelladhäsive Bindungssequenzen besitzt [68]. Weiterhin ist es biokompatibel, biologisch

abbaubar, einfach zu verarbeiten und günstig. Allerdings ist Gelatine aufgrund der thermoresponsiven Eigenschaften von einer schlechten mechanischen Stabilität gekennzeichnet: Bei physiologischer Temperatur (37 °C) ist Gelatine eine Lösung, kann aber beim Abkühlen unterhalb ihrer Lösungstemperatur von 25 – 35 °C reversibel in eine Gelform übergehen [49, 69]. Daher sind Hydrogele auf Gelatinebasis unter physiologischen Temperaturen nicht stabil und erfordern eine chemische Vernetzung oder die Kombination mit weiteren Materialien.

Die Kombination der Polymere Alginat und Gelatine zu dem gut verfügbaren und etablierten Hydrogelsystem Alginat-Gelatine vereint somit die Vorteile beider Komponenten. Daher wurden schon verschiedene Forschungsarbeiten zur Untersuchung der Eigenschaften dieser Biotinte durchgeführt [70-76]: So wurden bspw. schon Weichgewebekonstrukte aus Alginat-Gelatine und Myoblasten hergestellt [77] oder menschliche Osteosarkomzellen zu Hartgewebekonstrukten verdrückt [78].

Wie erwähnt bietet die Verwendung beider Materialien in einem System, die Möglichkeit Vernetzungsreaktionen verschiedener Art zu nutzen. So können Alginat-Gelatine Hydrogele nicht nur durch ionische Wechselwirkungen vernetzt werden, sondern unter anderem auch durch Kühlung oder durch eine enzymatische Vernetzung, wie bspw. mit dem in der Lebensmittelindustrie verwendeten Enzym Transglutaminase. Transglutaminase wird als das am besten untersuchte Enzym beschrieben, das für die Protein-basierte Hydrogelvernetzung im Bereich Tissue-Engineering verwendet wird [43]. Daher wurde es in der vorliegenden Arbeit zur Nachvernetzung der Gelatine eingesetzt.

2.4.4 Photovernetzbare Gelatinederivate

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert ist Gelatine ein vielversprechendes Material für biomedizinische Anwendungen, mit dem Nachteil der Instabilität bei Körpertemperatur. Da die meisten Zellkulturexperimente jedoch bei

physiologischer Temperatur durchgeführt werden, muss Gelatine bei alleiniger Verwendung im Allgemeinen mit funktionellen Gruppen modifiziert werden, die eine kovalente Vernetzung ermöglichen [18]. Photovernetzbare Gelatinederivate sind dabei eine interessante Variante der Modifikation, da sie eine Vernetzung unter physiologischen Bedingungen (Raumtemperatur, pH-Wert, wässrige Umgebung) und eine sowohl zeitlich als auch räumlich kontrollierte Vernetzungsreaktion ermöglichen [79]. Außerdem ermöglicht die Modifikation eine Optimierung der mechanischen Eigenschaften des vernetzten Hydrogels [80, 81].

2.4.4.1 GelMA

Die Funktionalisierung mit Methacrylatgruppen ist der bekannteste Ansatz für eine zytokompatible Photopolymerisation von Gelatine [50, 82]. Das modifizierte Material wird typischerweise als GelMA bezeichnet. Dabei werden die primären Amine der Gelatine meist mit Methacrylsäureanhydrid modifiziert, wodurch ein Polymer entsteht, das bei Belichtung mit UV-Licht in Gegenwart eines Photoinitiators eine radikalische Kettenpolymerisation durchläuft [69, 83, 84]. Dies führt zu einer Vernetzung und dauerhaften Stabilisierung. Positiv hervorzuheben ist die hohe mechanische Stabilität und die einfache Anwendung von GelMA, da keine zusätzlichen Vernetzer nötig sind [59]. Allerdings führen Kettenpolymerisationsreaktionen zu einem relativ heterogenen Netzwerk mit Polymerketten unkontrollierter Länge [85-87]. Darüber hinaus ist diese Art der Polymerisation anfällig für eine Sauerstoffinhibition: Dabei werden die freigesetzten Radikale durch Sauerstoff abgefangen, was zu einer unvollständigen Vernetzung führen kann [12].

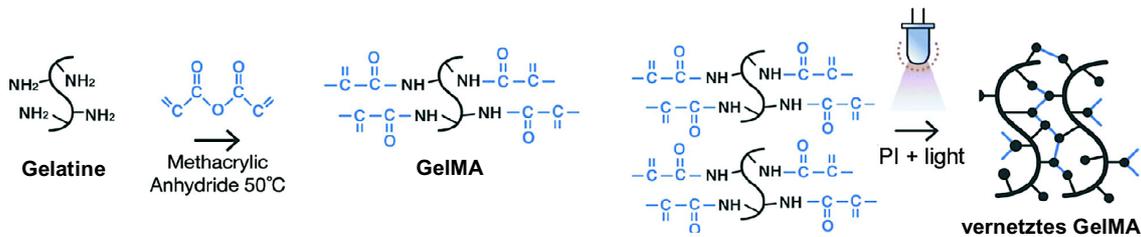


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Synthese und Vernetzung von GelMA. GelMA kann durch die Reaktion von Methacrylsäureanhydrid mit den Amingruppen der Gelatine synthetisiert werden. Bei der Erzeugung freier Radikale durch Photoinitiatoren und Licht adäquater Wellenlänge startet eine radikalische Polymerisationsreaktion. Diese führt zu einem Netzwerk von Gelatineketten, welche durch Polymethacrylatketten vernetzt sind. Bild modifiziert nach Lee *et al.* [4]. (freie Nutzung dank CC-BY Lizenz; Autor: Lee *et al.*)

Trotz einiger Nachteile durch den Reaktionstyp, hat sich GelMA als ein vielversprechendes Hydrogelsystem etabliert, da die Vernetzungsdichte und damit die physikalisch-chemischen Eigenschaften des gedruckten Konstrukts leicht über den Modifikationsgrad, die Konzentration an Polymer und Photoinitiator oder den Polymerisationsvorgang kontrolliert und optimiert werden können [50]. Aufgrund dieser Möglichkeit wurde GelMA für zahlreiche Biofabrikations- und Tissue-Engineeringansätze verwendet, darunter auch Studien mit dem Ziel der Regeneration von Nervengewebe, Knorpel oder Haut [50]. Dabei wird GelMA häufig über das Verfahren des Extrusions-basierten Biodruck mit einer typischen Konzentration zwischen 7 – 15 % (m/v) verarbeitet [88]. So wurden schon Chondrozyten [49, 89, 90], Leberzellen [91], Osteoblasten [92] und mesenchymale Stammzellen [93] in GelMA verdruckt. Außerdem ist GelMA bei verschiedenen Herstellern von Forschungsmaterialien kommerziell verfügbar, wodurch die Forschung und Optimierung dieser Biotinte weiter vorangetrieben wird.

2.4.4.2 GelAGE

Polymerisationsreaktionen vom Stufenwachstumstyp stellen eine wichtige Alternative zur Kettenpolymerisationreaktion von GelMA dar. Die zahlreichen Vorteile, wie eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit, geringere Sauerstoffempfindlichkeit oder die homogenere Vernetzung macht sich auch die

durch Allylglycidylether (AGE; Allylfunktionalisierung) modifizierte Gelatine (GelAGE) zunutze [94].

Bei der GelAGE Synthese reagiert Gelatine mit AGE für 1 - 24 h bei 65 °C unter alkalischen Bedingungen zu einer nicht-thermoresponsiven (G1MM) und einer thermoresponsiven (G2LH) GelAGE Variante, welche entsprechend ihrer Reaktionsbedingungen benannt werden (siehe Tabelle 1) [18]. Jedes Biofabrikationsverfahren stellt sehr spezifische Anforderungen an das zu verarbeitende Material. So benötigt der Extrusions-basierte Biodruck, als Biodruckverfahren mit der größten klinischen Relevanz, Biotinten mit einer ausreichend hohen Viskosität oder thermoresponsiven Eigenschaften, weshalb ohne weitere Zusatzstoffe nur das G2LH für dieses Druckverfahren verwendet werden kann.

Tabelle 1: Reaktionsprodukte der Synthese von GelAGE

G1MM	<ul style="list-style-type: none"> - Reaktionsdauer = 1 h - Mittlere NaOH-Konzentration (2,0 mmol) - Mittlere AGE-Konzentration (12 mmol) - Funktionalisierung: 2,13 mmol Allyl/g Gelatine 	Niedrige Viskosität Nicht-thermoresponsiv $M_w = 6,078$ KDa
G2LH	<ul style="list-style-type: none"> - Reaktionsdauer = 2 h - Niedrige NaOH-Konzentration (0,4 mmol) - Hohe AGE-Konzentration (60 mmol) - Funktionalisierung: 0,92 mmol Allyl/g Gelatine 	Weniger funktionalisiert Thermoresponsiv $M_w = 17,212$ KDa

Bei der Stufenwachstumsreaktion von GelAGE handelt es sich um eine Thiol-En Reaktion der sogenannten Click-Chemie. Dabei werden nach einer lichtinduzierten Radikalbildung kovalente Bindungen zwischen den Thiolen von Vernetzern, wie Dithiothreitol (DTT) oder thioliertem Polyethylenglykol (PEG), und den Alkengruppen des GelAGE gebildet [18, 87, 95, 96]. Im Vergleich zur Kettenpolymerisation kann so eine besser kontrollierbare Reaktion und eine höhere Homogenität im resultierenden Netzwerk erreicht werden [94]. Allerdings ist ein Vernetzer als zusätzliche Komponenten im Reaktionsgemisch nötig.

Da UV-Licht potenziell schädlich für Zellen sein kann und eine geringe Eindringtiefe aufweist, werden inzwischen immer häufiger auch Polymerisationsverfahren im Bereich des sichtbaren Lichts verwendet [12, 97]. Die Kombination der Photoinitiatoren Ruthenium und Sodiumpersulfat (Ru/SPS) ist dabei eine besonders interessante Option, da dieses System ein Absorptionsvermögen im Bereich des sichtbaren Lichts, eine hohe Eindringtiefe und eine effiziente Vernetzung bei relativ niedriger Konzentration zeigt [98, 99].

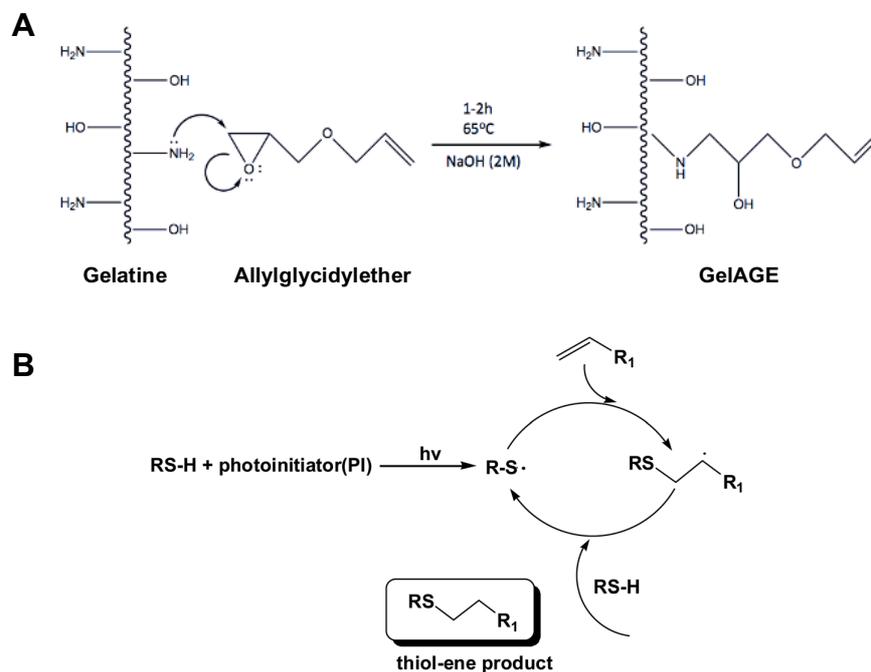


Abbildung 5: Schematische Darstellung der GelAGE-Synthese und des Mechanismus der Thiol-En Reaktion. A: GelAGE kann durch die Modifikation von Gelatine mit Allylglycidylether hergestellt werden (eigene Darstellung). B: Bei der Erzeugung freier Radikale durch einen Photoinitiator und Licht adäquater Wellenlänge startet eine radikalische Stufenwachstumspolymerisation. Bild modifiziert nach Zuo *et al.* [100]. (mit freundlicher Genehmigung der *Royal Society of Chemistry, J. Mater. Chem.* 2014)

GelAGE ist ein im Vergleich zu Alginat-Gelatine und GelMA noch relativ unbekanntes Material und daher in der Literatur wenig erforscht. Bertlein *et al.* 2017 [18] untersuchten die Überlebensfähigkeit von Chondrozyten (HACs) in mittels Extrusions-basierten Biodruck hergestellten Konstrukten: Die Zellen zeigten an Tag 1 in 20 Gew.-% Hydrogelen eine Vitalität von über 90 % und an Tag 7 Werte von knapp unter 90 %. Soliman *et al.* 2020 [19] berichteten eine

niedriger liegende Vitalität von HACs in 10 Gew.-% GelAGE Konstrukten in Höhe von 76,6 % an Tag 1, welche an Tag 7 allmählich zunahm auf 80,5 %. Weiterhin konnten Soliman *et al.* 2020 auch mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ähnliche Ergebnisse nachweisen.

2.5 Biologische Evaluation

Der wichtigste Faktor, der ein Biomaterial auszeichnet, ist die Fähigkeit im Kontakt mit Gewebe des menschlichen Körpers zu existieren, ohne eine Schädigung zu verursachen [101]. Da Biotinten als Zelltransportmedium genutzt werden, müssen die verwendeten Materialien den eingekapselten Zellen zusätzlich optimale Lebensbedingungen bieten. Allerdings birgt der Biodruckprozess viele Aspekte mit möglicher Zytotoxizität: Exemplarisch wären hier UV-Licht beim Vernetzungsprozess, toxische Komponenten wie Photoinitiatoren, freie Radikale, Scherspannungen oder die schlechte Diffusion von Nährstoffen durch die vernetzten Hydrogele zu nennen [12]. Letztendlich müssen zellschädigende Einflüsse möglichst minimiert werden, um ein vernetztes Hydrogel mit optimaler mechanischer Festigkeit, maximaler Zellebensfähigkeit und minimaler DNA-Schädigung zu erhalten [12]. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Auswahl eines geeigneten Zelltyps und sinnvoller biologischer Methoden entscheidend.

2.5.1 Verwendete Zellen

Je nach Forschungsziel finden bei Zellkulturexperimenten sowohl Zelllinien, humane Primärzellen als auch Stammzellen Einsatz. Meist liegt der Gedanke nahe, Zellen zu verwenden, die dem gewünschten Zielgewebe ihre primäre Funktion verleihen [102]. Ist ein Material jedoch relativ unerforscht und hat man gegebenenfalls noch keine konkrete Vorstellung über ein mögliches Zielgewebe, dann ist die Anwendung von Zelllinien besonders interessant. Zelllinien bestehen aus transformierten Zellpopulationen mit der Fähigkeit der unbegrenzten Zellteilung [102]. Sie bieten zahlreiche Vorteile, da sie reproduzierbare Ergebnisse liefern, kostengünstig sind und einen

unkomplizierten Umgang gewährleisten [103]. So eignen sie sich vor allem für Forschungsfragen, bei denen man einen umfassenden Überblick durch die Durchführung vieler materialfordernder Experimente erlangen möchte. Allerdings schließt sich im weiteren Verlauf meist die Reproduktion und Vertiefung dieser durch Zelllinien gewonnen Erkenntnisse mit anderen Zellen wie Stammzellen an [102, 103]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten L929-Zellen stellen eine aus dem subkutanen Bindegewebe von Mäusen isolierte Fibroblasten-Zelllinie dar und wurden schon in verschiedenen ähnlichen Ansätzen zur Erforschung von Hydrogelen verwendet [104-107].

2.5.2 Verwendete Methoden

Um die biokompatiblen bzw. zytokompatiblen Eigenschaften eines neuartigen Materials zu erforschen, bedient man sich meist verschiedener *in vitro* Testverfahren. Dabei verschafft man sich durch Parameter wie Vitalität, Proliferation, Differenzierung oder phänotypischer Morphologie einen Überblick zur Beurteilung der zellulären Reaktion auf ein Material.

Zellvitalität

Für die Qualitätskontrolle neuer Biomaterialien ist die Bestimmung der Zellvitalität ein zentraler Aspekt [108, 109]. Im Tissue-Engineering ist es darüber hinaus entscheidend zu wissen, ob die Zellen direkt nach der Konstruktherstellung oder nach einer bestimmten Zeitdauer noch vital sind. Die Zellvitalität kann dabei durch verschiedene Testverfahren wie der Laktatdehydrogenase (LDH)-Färbung, dem Live/Dead Assay oder der Zellzählung mittels Trypanblau nach Verdau bestimmt werden [110]. Bei der häufig verwendeten Live/Dead Färbung lassen sich lebende und tote Zellen direkt im Gerüst oder Gewebe anfärben [4, 110]. Der grün fluoreszierende Farbstoff Calcein-AM weist dabei auf die intrazelluläre Esteraseaktivität lebender Zellen hin, wohingegen der rot fluoreszierende Farbstoff EthD-1 nur in Zellen mit geschädigter Plasmamembran eindringen kann. Durch die

Visualisierung der gefärbten Zellen mittels Fluoreszenzbildgebung kann anschließend das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen berechnet werden:

$$\text{Vitalität} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtanzahl Zellen}}$$

Neben dieser rein quantitativen Information bietet dieses Verfahren die Möglichkeit zusätzlich einen Eindruck über die Morphologie und räumliche Verteilung der Zellen innerhalb des Hydrogels zu gewinnen. Jedoch können schon länger tote Zellen aufgrund der Nukleinsäurezersetzung oder Zellen mit einem stark clusterartigen Wachstum eine genaue Vitalitätsbestimmung erschweren [108].

Metabolische Aktivität

Andere Assays nutzen die zelluläre Stoffwechselaktivität, um die Anzahl der lebensfähigen Zellen in einer Probe abzuschätzen. In Kombination mit der Live/Dead Färbung wird so eine umfassendere Beurteilung der zellulären Gesundheit bzw. Lebensfähigkeit ermöglicht [4]. Dabei reduzieren lebensfähige Zellen mit aktivem Stoffwechsel ein Substrat zu einem fluoreszierenden oder lichtabsorbierenden Produkt, das mit einem Spektralphotometer gemessen und quantifiziert werden kann [111].

Das in dieser Arbeit verwendete Cell Counting Kit-8 (CCK-8) basiert auf dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz (2-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, Mononatriumsalz), das durch die Dehydrogenasen gesunder und metabolisch aktiver Zellen in gelbes Formazan umgesetzt wird und der dadurch entstehende Farbumschlag mittels einer Absorptionsmessung quantifiziert werden kann [112].

Zellproliferation: DNA-Bestimmung

Unter Zellproliferation versteht man eine Erhöhung der Zellzahl durch Zellteilung. Gesunde Zellen proliferieren aktiv, wohingegen wachstumsgestörte, tote oder sterbende Zellen nicht proliferieren. Unter den verschiedenen zur

Verfügung stehenden Assays zur Messung der Zellproliferation ist die Messung des DNA-Gehalts durch DNA-bindende Fluorophore wie PicoGreen eine etablierte Methode [113]. PicoGreen bindet selektiv an Doppelstrang-DNA und erzeugt dabei einen im Vergleich zum frei gelösten Farbstoff stark lumineszierenden Komplex [114]. Nach dem Messen dieser Fluoreszenz kann anhand einer passenden Standardkurve die DNA-Konzentration berechnet werden. Mit einer Sensitivität von nur rund 100 Zellen bzw. 25 pg/ μ l liefert dieser Assay sehr präzise als auch reproduzierbare Ergebnisse [113, 115]. Allerdings kann das PicoGreen intakte Zellmembranen nicht durchdringen, weshalb die Proben zuvor einen enzymatischen Verdau durchlaufen haben müssen [116].

Zellverteilung und Morphologie

Wie schon erwähnt ermöglicht die Live/Dead Färbung einen ersten Blick auf die Zellmorphologie. Für eine detaillierte Untersuchung sind jedoch andere Methoden geeigneter: Das bityklische Peptid Phalloidin bindet spezifisch an den Aktin-Filamenten (F-Aktin) von Zellen [117, 118]. Ist dem Phalloidin ein fluoreszierender Farbstoff angebunden, kann mittels Fluoreszenzmikroskopie die Struktur des Aktinzytoskeletts von fixierten Zellen dargestellt und somit die Zellmorphologie detailliert betrachtet werden. Darüber hinaus können räumliche Informationen über die Position der Zellen innerhalb des Hydrogels gewonnen werden, was bspw. die Beobachtung einer ortsabhängig unterschiedlichen Zellverteilung ermöglicht.

Neben den erwähnten biologischen Untersuchungsmethoden gibt es noch viele weitere Möglichkeiten zur Bewertung der zellulären Reaktion auf ein Material, die meist anhand des verwendeten Zelltyps ausgewählt werden. So kann bspw. mittels der *van Gieson-Färbung* von Fibroblasten gebildetes Kollagen visualisiert oder der Phänotyp von MSCs über eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden [119, 120].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Technische Geräte

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Arbeitsgeräte und sonstiger Hilfsmittel

Gerät	Hersteller
Analysewaage SBA 32	ScalTec GmbH, Heiligenstadt (D)
Analysewaage XPE 26 Delta Range	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (D)
Bechergläser	Schott AG, Mainz (D)
Destillierapparat	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel (D)
Direktverdrängungspipetten M100, M1000 und Kapillarkolbenspitzen	Gilson, Middleton (USA)
Eismaschine	Scotsman Ice Srl., Mailand (I)
Gefrierschrank Liebherr Medline	Liebherr, Bulle FR (CH)
Glasflaschen	Schott AG, Mainz (D)
Glaskolben und -zylinder	Schott AG, Mainz (D)
Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Heizplatte	Individuelle Anfertigung FMZ
Inkubator HERAcell 150i CO ₂	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Inverses Fluoreszenzmikroskop ZEISS Axio Observer / Colibri 7 / Axiocam 506 mono	Carl Zeiss AG, Oberkochen (D)
Konfokalmikroskop Leica TCS SP8 STED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (D)
Kühlschrank Liebherr Premium NoFrost	Liebherr, Bulle FR (CH)
Laborhebebühne	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Lampe Jobmate IP65 JMWW20P-S 20W LED	Steelfort, Palmerston North (NZ)
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Magnetrührer CombiMag RET	IKA Werke GmbH, Staufen (D)
Magnetrührstäbchen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)

Mikroskop VisiScope IT 404 / Axiocam 105 color	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Multikanal Pipette Pipete-Lite XLS	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (D)
Multimode-Mikroplatten-Lesegerät, Spark® 20M	Tecan Group AG, Männedorf (CH)
Ofen Universalschrank UN30	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
pH-Meter inoLab Multi Level 1	WTW GmbH & Co. KG, Tuttingen (D)
Pinzetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Pipette, PIPETMAN® (1-10 µl)	Gilson, Middleton (USA)
Pipetten, Eppendorf Research® plus (10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim (D)
Schüttler rotierend Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & co. KG, Schwabach (D)
Schüttler Tilt Shaker WS 10	Edmund Bühler, Bodelshausen (D)
Sicherheitswerkbank Heraeues HS 12/2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Silikonformen	Individuelle Anfertigung FMZ (s. Chemikalien)
Spatel, Löffelspatel	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Taumel Rollenmischer Assistent RM 5	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön (D)
Thermomixer	Hettich AG, Bäch (CH)
Tischzentrifuge Mini Star	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Tissue lyser LT	Qiagen, Hilden (D)
Ultra Tiefkühlergerät Telstar Igloo U570	Telstar Technologies S.L, Terrassa (ESP)
Universalzentrifuge Heraeus™	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Multifuge™ X3R	
UV-Lampe	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Varioklav Dampfsterilisator	HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim (D)

Vortex REAX 1R	Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim (D)
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach (D)
Wipp Schüttler Rocker-Shaker PMR- 100	Keison Products, Essex (UK)
Zählkammer Neubauer improved	Marienfeld, Lauda Königshofen (D)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Melitta, Minden (D)
Cellophanfolie	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Cellstar® Tubes mit konischem Boden (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Einmal-Feindosierspritzen Injekt®-F	B. Braun Meslungen AG, Melsungen (D)
Einmalkanülen Sterican® Gr. 16	B. Braun Meslungen AG, Melsungen (D)
Einmalpipetten (2,5; 5; 10; 25; 50 ml)	Corning GmbH, Bodenheim (D)
Einmalspritzen 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Flaschenaufsatz- Vakuumfiltrationssystem	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Frischhaltefolie	Lidl Stiftung & Co. KG, Würzburg (D)
Glasbodenschale WillCo-dish®, GWSB 5030	WillCo Wells, Amsterdam (NL)
Küchenrolle Clean and Clever	IGEFA Handelsgesellschaft GmbH & Co. KG, Ahrensfelde (D)
Labormarker	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Latexhandschuhe, puderfrei	Zentrallager des Universitätsklinikums Würzburg
Microplatte 96-well schwarz (655209)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Nunclon™ Delta Surface Zellkulturplatten (24-, 48-, 96-Well)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)

Parafilm	Bemis Company Inc., Braine L'Alleud (BE)
Pasteurpipetten	Scherf GmbH, Meiningen (D)
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen LTS 300 µl	Mettler-Toldeo GmbH, Gießen (D)
Precision Wipes™ Wischtücher	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Reagenzienbehälter CE-IVD ClearLine®	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt (D)
Reagiergefäß SafeSeal (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (D)
Rollrandgläser 10 ml mit Deckel	A. Hartenstein, Würzburg (D)
Serologische Pipetten CELLSTAR® (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Spritzen BD Discardit™ II (2 ml, 20 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (D)
Spritzenvorsatzfilter Filtrapur S 0.2, 0.45	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (D)
Spritzenvorsatzfilter Nalgene™ 0.2 µm 13 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Urinbecher	VWR International GmbH, Darmstadt (D)
Zellkulturflasche Cellstar® TC 200 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Zellsieb EASYstrainer 70 µM	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)

3.1.3 Verwendete Chemikalien, Farbstoffe und Kits

Tabelle 4: Übersicht verwendeter Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase® solution	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Calciumchlorid (CaCl ₂), wasserfrei	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)

Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4), wasserfrei	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (10x, ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+})	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1X) + GlutaMAX	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Roskilde (D)
EDTA ED4SS	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Ethanol, absolut (99%)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Fetales Kälberserum, Fetal bovine serum	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
HEPES solution 1M	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Isopropanol	Apotheke des Klinikums, Universität Würzburg (D)
L-Cystein	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Magnesiumchlorid (MgCl_2), wasserfrei	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), wasserfrei	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Papainase Papain Suspension (Lot.: 39C19199, 1126 U/ml)	Worthington, Lakewood (USA)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml)	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Roskilde (D)
Reinstwasser	Destillierapparat (s. Technische Geräte, Tabelle 2)
Roti®-Histofix 4,5%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe (D)
Silikon Dublisisil® 15	Dreve Dentamid GmbH, Unna (D)
Thesit®	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Trypanblau, Lot.: RNBD3142	Gibco/Thermo Fisher Scientific, Roskilde, (D)
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)

Tabelle 5: Übersicht verwendeter Farbstoffe und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cell Counting Kit-8	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Hoechst 33342	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Molecular Probes™ LIVE/DEAD™ Viabilitäts-/Zytoxizitäts-Kit für Säugetierzellen: Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM), Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Phalloidin-iFluor 555	Abcam, Cambridge (UK)
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham (USA)

3.1.4 Verwendete Hydrogel Komponenten

Die für diese Arbeit verwendete Allyl-funktionalisierte Gelatine (GelAGE) wurde am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg von Alessandro Cianciosi synthetisiert und für die Versuche dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Hydrogelkomponenten

Bezeichnung	Hersteller
4arm PEG Thiol (PEG-4-SH; MW=5000 Da; Lot.: ZZ326P113)	JenKem Technology, Plano (USA)
Alginat Protanal LF 10/60 FT (Lot.: G4001601)	FMC Biopolymer, Philadelphia (USA)
GelAGE	Synthetisiert am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ), Universität Würzburg (D)
Gelatine G1890-500G (Lot.: SLBR2368)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)

Heparin PLSupplement (5000 U/ml)	PL BioScience GmbH, Aachen (D)
Platelet Lysate PL Solution (sterilfiltriert und anschließend mit 20 IU Heparin / ml ergänzt)	PL BioScience GmbH, Aachen (D)
Sodium persulfate (SPS; Lot.: BCBQ4652V)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)
Transglutaminase	Würzteufel GmbH, Nagold-Hochdorf (D)
Tris(2,2-bipyridyl)dichloro-ruthenium(II) hexyhydrate (Ruthenium; MW=748,62 Da; Lot.: MKCJ0261)	Sigma-Aldrich, Darmstadt (D)

3.1.5 Verwendete Puffer und Lösungen

- 0,5 % Thesit-H₂O: 100 ml Reinstwasser und die Thesitglasflasche wurden im 37 °C Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde 500 µl Thesit zum Reinstwasser dazu gegeben und mittels Vortexens gelöst.
- Papainase-Puffer: 20 ml PBE-Puffer, 17 mg L-Cystein, 2 U/ml Papainase. Mit Spritzenaufsatzfilter steril filtriert.
- PBE-Puffer: 6,53 g Na₂HPO₄, 6,48 g NaH₂PO₄ und 10 ml 500 mM EDTA wurden in 900 ml ddH₂O gelöst. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt. Mit Flaschenaufsatzfilter steril filtriert.
- PBS-Puffer: *Ohne MgCl₂ / CaCl₂*: 1 Teil PBS 10x (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) auf 9 Teile Reinstwasser.
Mit MgCl₂ / CaCl₂ (Um das Auflösen der Alg-Gel Proben zu vermeiden, war es wichtig die Alg-Gel Hydrogele ausschließlich in PBS mit Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen zu waschen, zu lagern etc.): Ein Teil PBS 10x (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline), 1 Teil MgCl₂ (1 g/l), ein Teil CaCl₂ (1 g/l) und 7 Teile Reinstwasser.
- Transglutaminase: Es wurde 1 g Transglutaminase in 10 ml Reinstwasser gelöst und nach 2 h auf dem Rollschüttler durch ein Zellsieb gegeben. Die übrig gebliebene Lösung wurde steril filtriert und auf 25 ml mit PBS aufgefüllt.

3.1.6 Zellen und Zellkulturmedium

L929-Zellen:	L929 CCL 1 murine fibroblast (ATCC, via Institut für angewandte Zellkultur Dr. Toni Lindl GmbH, München)
Zellkulturmedium:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM 1X) + GlutaMAX) ergänzt mit 10 % FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% HEPES

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Nach dem Auftauen der L929-Zellen bei 37 °C im Wasserbad wurden diese in 5 ml Zellkulturmedium für 5 min bei 400x g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend in T75 Zellkulturflaschen mit 15 ml Zellkulturmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Erreichten die Zellen die Konfluenz vor Versuchsbeginn, wurden sie kontinuierlich auf neue Zellkulturflaschen verteilt und weitergeführt. Am Versuchstag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml Accutase für 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ abgelöst und die Reaktion anschließend mit 4 ml Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspensionen mehrerer Flaschen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und die lebende Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau bestimmt. Um eine konstante Konzentration von 5 Mio. Zellen pro ml Hydrogel in allen Gruppen zu erreichen, wurde das entsprechende Volumen an Zellsuspension in ein weiteres Zentrifugenröhrchen gegeben und die Zellen für 5 min bei 400x g abzentrifugiert. Bei der Herstellung mehrerer Gruppen in einem Versuch, erfolgte die Lagerung der Zellsuspensionen bis zum Abzentrifugieren bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.2 Herstellung der Biotinten

3.2.2.1 Alginate-Gelatine

Für die Alginate-Gelatine Hydrogele wurde eine von Wüst *et al.* 2015 [76] berichtete Zusammensetzung verwendet: Durch Mischung einer 4 % (m/v) Alginate-Lösung mit einer 20 % (m/v) Gelatine-Lösung zu gleichen Teilen wurde eine Alginate-Gelatine Biotinte mit Endkonzentrationen in Höhe von 2 % bzw. 10 % (m/v) erreicht.

Am Vortag eines Versuches wurden 200 mg Gelatine und 40 mg Alginate jeweils in 10 ml Rollrandgläsern abgewogen, für 20 min mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sterilisiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in 900 μl (Gelatine) bzw. 1000 μl (Alginate) PBS gelöst. Bei einer Modifikation der Hydrogelzusammensetzung mittels Humanem Plättchenlysate (HPL) wurde das zum Lösen des Alginats verwendete PBS teilweise (150 μl) oder komplett (1000 μl) durch HPL ersetzt, um Endkonzentrationen an HPL von 7,5 bzw. 50 % zu erreichen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung der Alginate-Gelatine Hydrogele

Alg-Gel	<ul style="list-style-type: none">- 200 mg Gelatine, gelöst in 900 μl PBS- 40 mg Alginate, gelöst in 1000 μl PBS- 100 μl PBS-Zellsuspension
Alg-Gel 7,5 % HPL	<ul style="list-style-type: none">- 200 mg Gelatine, gelöst in 900 μl PBS- 40 mg Alginate, gelöst in 850 μl PBS + 150 μl HPL- 100 μl PBS-Zellsuspension
Alg-Gel 50 % HPL	<ul style="list-style-type: none">- 200 mg Gelatine, gelöst in 900 μl PBS- 40 mg Alginate, gelöst in 1000 μl HPL- 100 μl PBS-Zellsuspension

Das zuvor abzentrifugierte Zellpellet wurde in 100 μl PBS resuspendiert und in die verflüssigte Gelatine gegeben. Die Lagerung beider Rollrandgläser auf einer 37 °C warmen Heizplatte verhinderte die vorzeitige Gelierung des Materials. Aufgrund der hohen Viskosität wurde die Gelatine mittels Direktverdrängungspipetten zur Alginate-Lösung transferiert und durch Mischen

mit einer Pipettenspitze eine homogene, zellbeladene Biotinte hergestellt. Das finale Gesamtvolumen betrug 2 ml mit Endkonzentrationen in Höhe von 10 % (m/v) für die Gelatine und 2 % (m/v) für das Alginat. Weitere 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank dienten der Beseitigung der beim Mischen entstandener Luftblasen.

Anschließend wurden eigens angefertigte Silikonformen mit den Abmessungen 6 x 1 mm mit Direktverdrängungspipetten und einem Volumen von 30 µl Biotinte befüllt. Die Vernetzung erfolgte mit 20 mM CaCl₂ für 10 min. Die Hydrogele wurden dann mit einem sterilen Spatel aus den Formen entnommen und in Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Für eine Nachvernetzung mit Transglutaminase wurden die Proben nach dem Vernetzen zusätzlich für 2 h in einem Transglutaminasebad bei Raumtemperatur gelagert und erst dann in das Zellkulturmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.2.2 GelAGE

Für Hydrogele mit einer Polymerkonzentration von 6 % (m/v) wurden jeweils 30 mg GelAGE und 30 mg PEG-4-SH in einem 10 ml Rollrandglas abgewogen und für 20 min mittels UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) sterilisiert. Für 15 % (m/v) Hydrogele wurden jeweils 75 mg an GelAGE und 75 mg PEG-4-SH eingesetzt. Anschließend wurden 7,49 mg Ruthenium und 19,04 mg SPS abgewogen und in jeweils 2 ml PBS gelöst, um einen 5 mM Ru-Stock und einen 40 mM SPS-Stock zu erhalten. Um möglichst wenig Volumen zu verlieren, erfolgte die Sterilisierung mittels kleineren 13 mm Spritzenaufsatzfiltern. Aufgrund möglicher Oxidation oder Reaktion mit Licht wurden die Photoinitiatorstocklösungen für jedes Experiment frisch hergestellt.

Zur Lösung von GelAGE bzw. PEG-4-SH wurden 450 µl PBS, 200 µl Ru-Stock und 250 µl SPS-Stock in ein Rollrandglas gegeben und für 9 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank gelagert. Eine homogene Lösung der Gelatine wurde durch sanftes Schwenken des Rollrandglas nach etwa 5 min gewährleistet. Das zuvor abzentrifugierte Zellpellet wurde dann in 100 µl PBS resuspendiert und

zum gelösten GelAGE gegeben. Eine homogene Vermischung der Zellen im Hydrogel wurde durch sanftes Schwenken des Rollrandglas gewährleistet. Das finale Gesamtvolumen betrug 1 ml mit Endkonzentrationen der Photoinitiatoren Ru/SPS in Höhe von 1/10 mM. Bei einer Modifikation der Hydrogelzusammensetzung mit HPL wurde das zum Lösen des GelAGEs verwendete PBS teilweise (75 µl bzw. 400 µl) durch HPL ersetzt und die Zellen gegebenenfalls in HPL statt PBS resuspendiert. Somit wurden Endkonzentrationen an HPL in Höhe von 7,5 bzw. 50 % erreicht (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Zusammensetzung der GelAGE Hydrogele

6 % GelAGE	<ul style="list-style-type: none"> - 30 mg GelAGE, 30 mg PEG-4-SH - 450 µl PBS, 200 µl Ru-Stock, 250 µl SPS-Stock - 100 µl PBS-Zellsuspension
6 % GelAGE 7,5 % HPL	<ul style="list-style-type: none"> - 30 mg GelAGE, 30 mg PEG-4-SH - 375 µl PBS, 200 µl Ru-Stock, 250 µl SPS-Stock, 75 µl HPL - 100 µl PBS-Zellsuspension
6 % GelAGE 50 % HPL	<ul style="list-style-type: none"> - 30 mg GelAGE, 30 mg PEG-4-SH - 50 µl PBS, 200 µl Ru-Stock, 250 µl SPS-Stock, 400 µl HPL - 100 µl HPL-Zellsuspension
15 % GelAGE	<ul style="list-style-type: none"> - 75 mg GelAGE, 75 mg PEG-4-SH - 450 µl PBS, 200 µl Ru-Stock, 250 µl SPS-Stock - 100 µl PBS-Zellsuspension

Um ein vorzeitiges Vernetzen zu vermeiden, war das Arbeiten unter möglichst wenig Lichteinfall nötig. Lichtdurchlässige Behältnisse wie die Reaktionsgefäße oder Rollrandgläser wurden stets mit lichtundurchlässiger Aluminiumfolie bedeckt.

Anschließend wurden die 6 x 1 mm großen Silikonformen mit 30 µl Biotinte befüllt. Die Vernetzung erfolgte durch sichtbares Licht (Jobmate IP65) für 20 s (Abbildung 6). In einem Vorversuch wurde der Abstand zwischen Proben und Lichtquelle von 2,5 – 10 cm variiert (siehe 4.1.1). Alle weiteren Versuche erfolgten mit einem Abstand von 10 cm zur Lichtquelle, gemessen vom Austrittsfenster der Lampe bis zur Oberkante der Silikonformen. Die Hydrogele wurden nach

dem Bestrahlen mit einem sterilen Spatel aus den Formen entnommen und in Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche.



Abbildung 6: Vernetzung GelAGE Proben

3.2.3 Live/Dead Assay

Die Hydrogele wurden zweimal mit PBS für je 10 min auf einem Schüttler gewaschen. Um das Auflösen der Alg-Gel Proben zu vermeiden, war es wichtig die Alg-Gel Hydrogele ausschließlich in PBS mit Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen zu waschen. In der Zwischenzeit wurde die Färbelösung mit Calcein-AM

(20 µl / 10 ml) und EthD-1 (5 µl / 10 ml) in PBS hergestellt. Die Proben wurden mit der Färbelösung bedeckt und 40 min lang im Dunkeln bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Hydrogele wieder in PBS überführt und vor dem Mikroskopieren auf eine WillCo-dish® Glasbodenschale übertragen.

Jede Gruppe wurde an den Tagen 1, 4 und 7 in Triplikaten analysiert. Die Bildgebung erfolgte mit dem Inversen Fluoreszenzmikroskop. Zusätzlich zu den Übersichtsaufnahmen (10x Objektiv) wurden pro Probe sechs Bilder (20x Objektiv) an verschiedenen Positionen im Hydrogel aufgenommen, um einen repräsentativen Überblick über die gesamte Probe zu erhalten.

Die Quantifizierung von lebenden und toten Zellen erfolgte mit der Open Source Bildverarbeitungssoftware Fiji (Version 2.1.0/1.54c, macOS) [121]. Dabei wurden die Aufnahmen entweder manuell ausgezählt oder mittels eines geschriebenen Makros für Fiji automatisiert analysiert. Das Makro bestand aus einem Konvertierungsschritt in den 8-Bit-Modus, der Anpassung von Helligkeit und Kontrast und der finalen Zellzählung mittels der *Analyze Particles* Funktion. Die jeweiligen Parameter zur individuellen Anpassung von Helligkeit, Kontrast und Pixelgröße wurden für jeden Versuch vor der automatischen Auswertung anhand manuell ausgezählter Beispielaufnahmen bestmöglich angepasst. Zudem erfolgte eine stichprobenartige Sichtkontrolle der automatisiert ausgewerteten Zellzahlen.

3.2.4 Quantifizierung der metabolischen Aktivität

Für die Quantifizierung der metabolischen Aktivität wurde das Cell counting Kit-8 verwendet. Bei diesem Assay wird das wasserlösliche WST-8 Salz durch die Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen umgesetzt, was sich als Farbumschlag bemerkbar macht.

Jede Testgruppe wurde an den Tagen 1, 4 und 7 in Triplikaten analysiert. Die Proben wurden wie oben beschrieben mit PBS gewaschen, anschließend wurde das Feuchtgewicht bestimmt, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und auf 250 mg mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Außerdem wurde ein Reaktionsgefäß für die Verwendung als Leerwert nur mit 250 µl Zellkulturmedium aufgefüllt. Nach

dem Hinzufügen von jeweils 2,5 µl CCK-8 Reagenz erfolgte eine Inkubationsdauer von 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Dunkeln.

100 µl des Überstandes aller Proben, sowie des Leerwerts, wurden in eine 96-well Zellkulturplatte gegeben. Luftblasen wurden mit einer spitzen Kanüle zerstochen, um die Messung nicht zu verfälschen. Die Absorption wurde in dem Multimode-Mikroplatten-Lesegerät Tecan Spark® 20M bei 450 nm und 650 nm als Referenz gemessen. Die relative metabolische Aktivität wurde anschließend durch Subtraktion des Hintergrundsignals berechnet.

3.2.5 DNA-Assay

3.2.5.1 DNA-Gehalt im Hydrogel

Die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen in den Hydrogelen erfolgte nach dem Ende eines Versuchs gebündelt für alle Proben von Tag 1, 4 und 7 in Triplikaten. Nach dem CCK-8-Assay wurden die Gele zweimal mit PBS für je 10 min auf einem Schüttler gewaschen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

Die Pufferlösung für den Papainaseverdau wurde durch das Lösen von L-Cystein (17 mg / 20 ml Puffer) in PBE-Puffer (pH = 6,5) in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen hergestellt. Die Lösung wurde steril filtriert und anschließend wurden je 125 µl zu jeder Probe in die 2 ml Reaktionsgefäße hinzugegeben. Danach wurde die Papainase Arbeitslösung (60 U / 10 ml) hergestellt und erneut je 125 µl den Proben hinzugefügt. Somit wurde ein Gesamtvolumen von 250 µl pro Hydrogel verwendet. Demnach befand sich beim Verdau insgesamt ein Volumen 250 µl plus das Feuchtgewicht der Hydrogele in den Reaktionsgefäßen. Die Proben wurden über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank inkubiert.

Für die DNA-Analyse mit dem PicoGreen-Reagenz wurde 1x TE-Puffer hergestellt, indem 20x TE-Puffer 1:20 in sterilem Wasser verdünnt wurde. Das PicoGreen-Reagenz wurde 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt und im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für die High-range Standardkurve wurde ein 2 µg / ml λ-DNA-Stock hergestellt (22 µl DNA-Standard des

Assaykits und 1078 µl PBE/Cystein-Puffer). Das Pipettierschema der High-Range Standardreihe ist Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Pipettierschema der High-Range DNA-Standardkurve für den PicoGreen-DNA-Assay

Standard	Konzentration [ng/ml]	Volumen 2 µg/ml DNA-Stock [µl]	Volumen PBE/Cystein-Puffer [µl]
A	1000	300	0
B	800	280	70
C	600	210	140
D	400	140	210
E	200	70	280
F	100	35	315
G	10	4	396
H	1	35 (aus Nr. G)	315
Standardblank	0	0	300

Die Standards wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, die auf Eis gelagert wurden. Um in die High-Range Standardreihe zu fallen, wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Hierfür wurden 80 µl PBE/Cystein-Puffer in Duplikaten in eine schwarze 96-well Zellkulturplatte gegeben und nach sorgfältigem Vortexen der Reaktionsgefäße wurden je 20 µl Probe hinzugefügt. Anschließend wurden je 100 µl der Standards und des Leerwerts in Duplikaten in die Platte pipettiert und 100 µl der PicoGreen Gebrauchslösung zügig mittels einer Mehrkanalpipette zu jedem Well gegeben. Nach 2 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss auf einem Schüttler wurde die Fluoreszenz mit dem Multimode-Mikroplatten-Lesegerät Tecan Spark® 20M (Ex.: 485 nm, Em.: 535 nm) gemessen. Die DNA-Konzentrationen in der 96-well Zellkulturplatte wurden durch Aufzeichnen der Standardgeraden und Zurückrechnen der Messwerte über folgende Formel berechnet (m = Steigung der Standardgeraden; t = y-Achsenabschnitt der Standardgeraden):

$$Intensität = \left[m * DNA \left(\frac{ng}{ml} \right) + t \right]$$

Um den absoluten DNA-Gehalt zu berechnen, musste der Verdünnungsfaktor sowie das gesamte Verdauvolumen in Höhe von 250 µl inklusive Feuchtgewicht bzw. Volumen der jeweiligen Hydrogele berücksichtigt werden, von dem nur 100 µl verwendet wurden:

$$DNA\ abs.\ [ng] = DNA\ \left(\frac{ng}{ml}\right) * Verdünnungsfaktor * (0,25\ ml + Feuchtgewicht)$$

3.2.5.2 DNA-Gehalt auf Plattenboden

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts, der aus den Hydrogelen abgewanderten und auf dem Plattenboden adhären Zellen, wurden die Proben an jedem Tag in eine neue Platte überführt. An Tag 1, 4 und 7 wurden die Proben aus den Platten für die weiteren Assays entfernt, das Medium abgesaugt und zwei Waschvorgänge mit PBS für je 5 min durchgeführt. Anschließend wurden 500 µl 0,5 % Thesit-H₂O für 5 min auf den Plattenboden gegeben und die Zellen anschließend durch mehrmaliges Abwaschen und Resuspendieren abgelöst. Dabei war das Vermeiden von Bläschen oder Schaum entscheidend, um anschließend das volle Volumen an Thesit-Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß zu überführen. Die Thesit-Zellsuspension wurde anschließend bis zum DNA-Assay bei -20 °C eingelagert.

Für die DNA-Analyse mit dem PicoGreen-Reagenz wurde, wie für die Hydrogele erläutert (siehe 3.2.5.1), 1x TE-Puffer und das PicoGreen-Reagenz hergestellt. Da ein deutlich geringerer DNA-Gehalt als in den Hydrogelen zu erwarten war, wurde in diesem Experiment eine Low-range Standardkurve erstellt. Hierfür wurde ein 50 ng / ml λ-DNA-Stock (27,5 µl eines 2 µg/ml DNA-Stocks und 1072,5 µl PBE/Cystein-Puffer) angesetzt. Das Pipettierschema der Low-Range Standardreihe ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Pipettierschema der Low-Range DNA-Standardkurve für den PicoGreen-DNA-Assay

Standard	Konzentration [ng/ml]	Volumen 2 µg/ml DNA-Stock [µl]	Volumen PBE/Cystein-Puffer [µl]
A	25	300	0
B	20	280	140
C	15	210	210
D	10	140	280
E	5	70	315
F	2,5	35	332,5
G	0,25	4	343
H	0,025	35 (aus Nr. G)	315
Standardblank	0	0	300

Der weitere Ablauf des Assays erfolgte wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben. Allerdings wurde hierbei das Zelllysate unverdünnt eingesetzt. Um den absoluten DNA-Gehalt der Zellen auf den Zellkulturplattenboden zu berechnen, musste das gesamte zum Ablösen der Zellen verwendete Volumen in Höhe von 500 µl berücksichtigt werden:

$$DNA\ abs.\ [ng] = DNA\ \left(\frac{ng}{ml}\right) * 0,5\ ml$$

3.2.6 Phalloidin-Färbung

An Tag 7 wurden zusätzliche Proben ebenfalls in eine neue Platte überführt und zweimal mit PBS für je 10 min auf einem Horizontalschüttler gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Hydrogele mit Roti®-Histofix und die Lagerung bei 4 °C bis zur weiteren Färbung.

Für die Färbung wurden die Gele in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für dreimal je 5 min in 0,5 ml 0,1 % TWEEN-20-PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und die Gele weitere 1,5 h in je 0,5 ml 2 % Triton X-100-PBS gewaschen. Danach wurde der Überstand erneut abgenommen und pro Probe 500 µl 2 % Triton X-100-PBS und 0,5 µl Phalloidin-iFluor 555 (1:1000) dazu gegeben. Die Proben wurden über Nacht auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut dreimal je 5 min in PBS gewaschen und anschließend 0,5 ml des DNA-Farbstoffs Hoechst

33342 mit PBS (1:2000) den Reaktionsgefäßen zugegeben. Es folgte eine erneute Inkubation von 30 min und die anschließende Überführung der Hydrogele in PBS.

Um eine Photobleichung zu vermeiden, wurde stets unter Lichtausschluss gearbeitet bzw. die gefärbten Proben in einem lichtgeschützten Behälter aufbewahrt, bis sie mit dem Konfokalmikroskop mikroskopiert wurden. Hierbei wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme der Hydrogeloberfläche aufgenommen und anschließend eine weitere Übersichtsaufnahme 100 μm unterhalb der Hydrogeloberfläche angefertigt. Darauf folgten drei Detailaufnahmen ausgehend von der Hydrogeloberfläche bis hin zu 25 μm bzw. 50 μm im Hydrogel.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

Die in dieser Arbeit verwendeten Hydrogelsysteme Alginat-Gelatine (Alg-Gel) und GelAGE sind am FMZ etablierte Materialien. Trotzdem mussten offene Fragestellungen zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Vorversuche bearbeitet werden. Dazu gehörten die Evaluation einer formstabilen Polymerkonzentration für GelAGE, die Auswertung der Live/Dead Aufnahmen und die Überprüfung der Zellauswanderung aus den Hydrogelen.

4.1.1 Vernetzungstests GelAGE

Wie unter 3.2.2.1 erläutert wurden die Alginat-Gelatine Proben nach einer von Wüst *et al.* 2015 [76] beschriebenen Zusammensetzung und etablierten Vernetzungsreaktion hergestellt. Für GelAGE fehlten diese Informationen zu einem genauen Herstellungsprotokoll jedoch. In der Literatur wird unter anderem im Zusammenhang mit GelMA darauf hingewiesen, dass niedrige Polymerkonzentrationen mit einer höheren Zytokompatibilität einhergehen [10, 58, 79, 122]. Daher sollte zunächst die niedrigste Hydrogelkonzentration identifiziert werden, welche über die gesamte Versuchsdauer eine ausreichende Formstabilität aufweisen konnte.

Bei einer Konzentration von mindestens 6 % (m/v) an Gesamtpolymer war auch nach 7 Tagen in Kultur eine ausreichende Formstabilität gewährleistet, wohingegen die 5 % (m/v) Hydrogele einen deutlichen Formverlust aufwiesen (Abbildung 7).

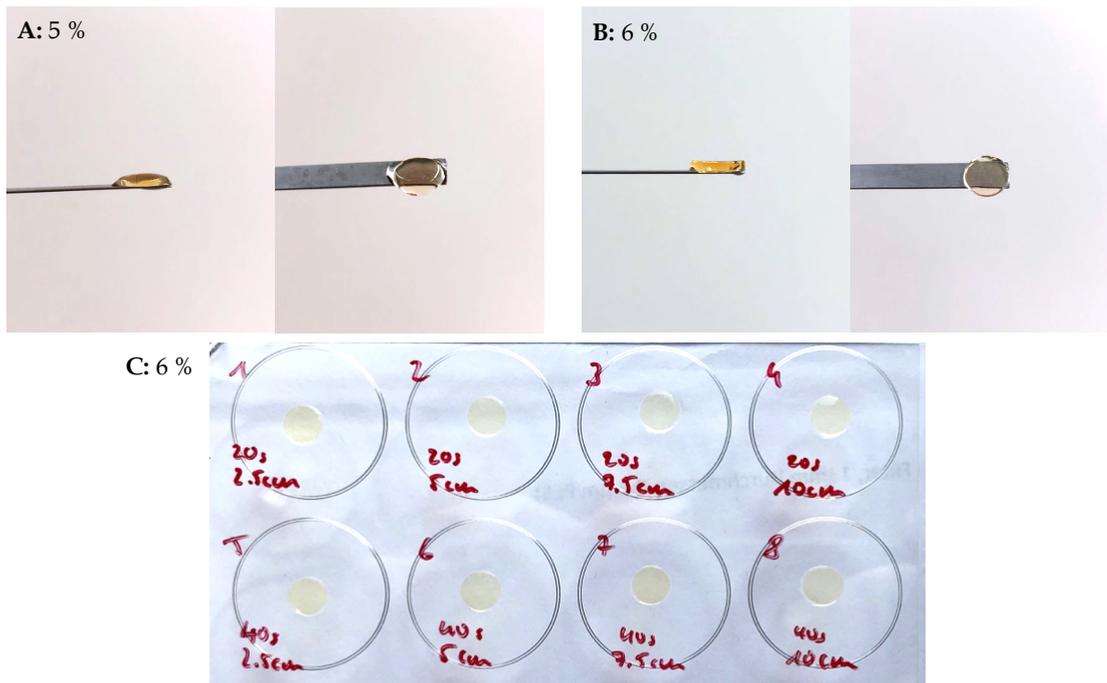


Abbildung 7: GelAGE Vernetzungs Tests. A + B: 5 % (A) bzw. 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogele direkt nach dem Vernetzen, einer Bestrahlungszeit von 20 s und 2,5 cm Abstand zur Lichtquelle. C: 6 % (m/v) GelAGE Hydrogele nach 7 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ in Medium kultiviert und Bestrahlungszeiten von 20 bzw. 40 s mit variierendem Abstand von 2,5 - 10 cm zur Lichtquelle.

Da die zum Vernetzen verwendete Lampe eine sehr starke Wärmeentwicklung aufwies, musste anschließend ein zellverträglicher Belichtungsabstand mit adäquater Belichtungsdauer gewählt werden. Bei einem Abstand von 10 cm zwischen Probe und Lichtquelle und einer Belichtungsdauer von 20 s konnte an Tag 1 eine Vitalität von durchschnittlich $79 \pm 9 \%$ und an Tag 7 $83 \pm 7 \%$ erreicht werden (Abbildung 9). Die geringeren Abstände 2,5 cm, 5 cm und 7,5 cm führten zu einer sehr hohen Anzahl an toten Zellen mit einer Vitalität im Bereich von 60 % an Tag 1 und 29 - 39 % an Tag 7 (Abbildung 8 und 9). Die diesen Werten zugrunde liegende automatische Auswertung der Live/Dead Aufnahmen wird im folgenden Kapitel (4.1.2) behandelt.

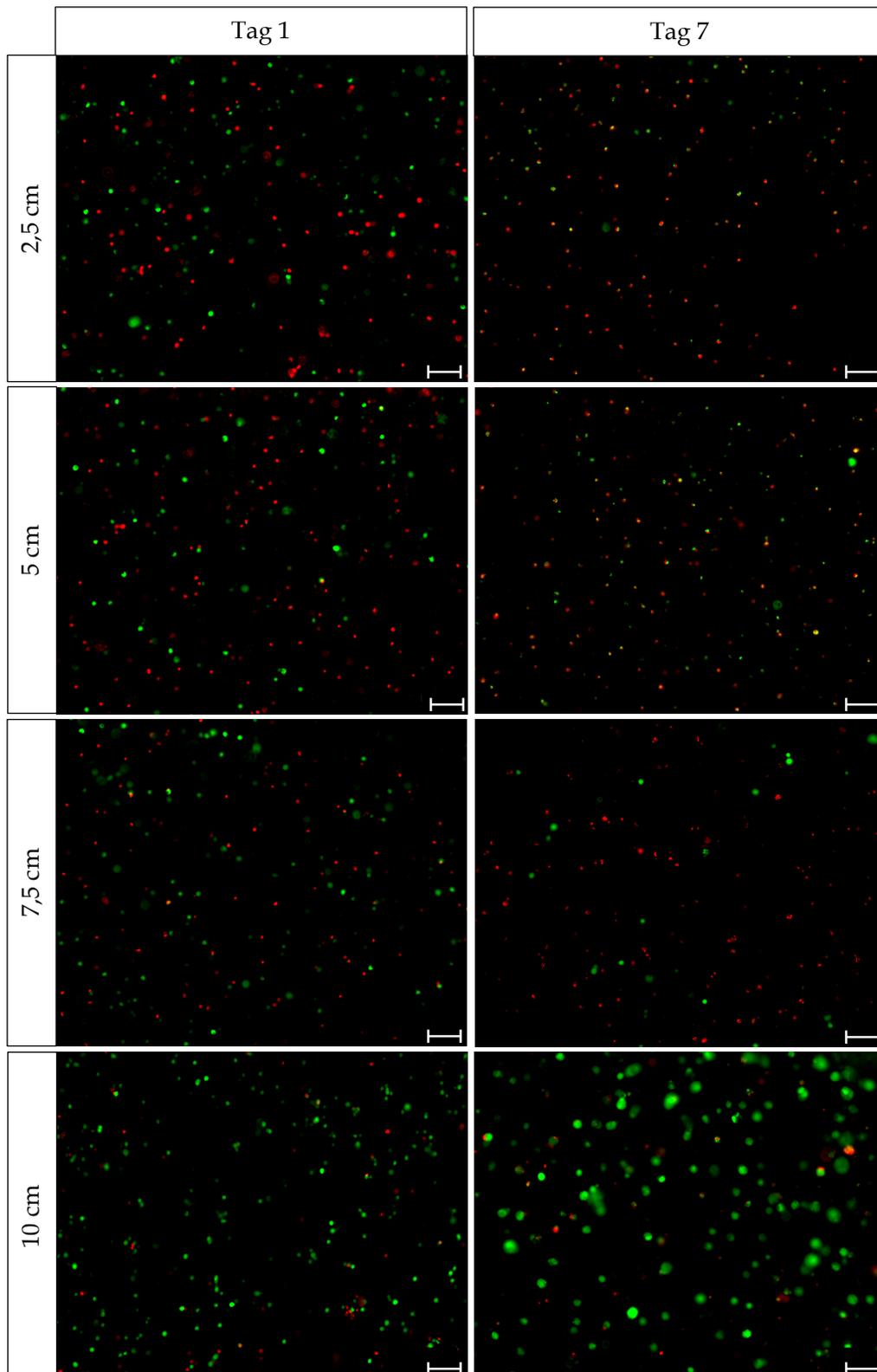


Abbildung 8: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen bei unterschiedlichen Abständen zur Lichtquelle. Repräsentative Aufnahmen des Live/Dead Assays nach 1 bzw. 7 Tagen. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m.

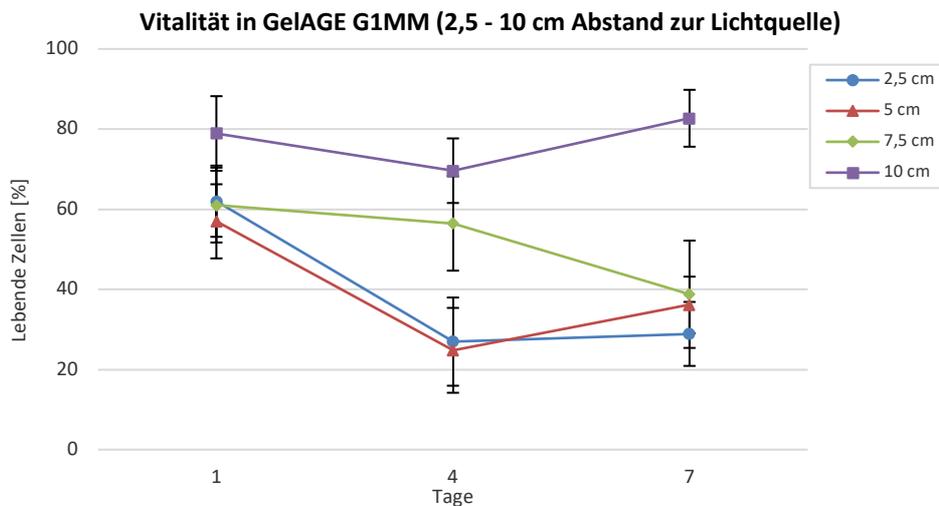


Abbildung 9: Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen bei unterschiedlichen Abständen zur Lichtquelle. Die Belichtungszeit betrug bei allen Gruppen 20 s. Die Zellvitalität wurde an Tag 1, 4 und 7 anhand der automatischen Auswertung des Live/Dead Assays in Fiji ermittelt und als das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl definiert.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche wurde für GelAGE im weiteren Verlauf der Arbeit eine Konzentration von 6 % (m/v) an Gesamtpolymere verwendet und alle GelAGE Proben mit einer Belichtungsdauer von 20 s bei 10 cm Abstand zur Lichtquelle hergestellt.

4.1.2 Automatische vs. manuelle Auswertung des Live/Dead Assays

Um festzustellen, welche Art der Auswertung der Live/Dead Aufnahmen für die spätere Quantifizierung der Vitalität am besten geeignet ist, wurden 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogele mit L929-Zellen in mehreren Versuchen für 7 Tage kultiviert und wie unter 3.2.3 beschrieben an Tag 1, 4 und 7 repräsentative Aufnahmen der Proben angefertigt. Diese Bilder wurden anschließend entweder manuell ausgezählt (manuelles Zählen der lebenden und toten Zellen per Hand) oder mittels Fiji automatisiert analysiert (siehe Kapitel 3.2.3).

Der Vergleich der manuellen mit der automatischen Auswertung von Triplikaten ($n = 3$) innerhalb eines Versuches ergab keine erheblichen Differenzen im Hinblick auf die Vitalität (Abbildung 10): So war an Tag 1 eine Vitalität in Höhe von 79 ± 7 % (manuell) bzw. 77 ± 9 % (automatisch) und an

Tag 7 eine Vitalität in Höhe von 82 ± 6 % (manuell) bzw. 84 ± 7 % (automatisch) zu beobachten. Auch die Auswertung verschiedener Gruppen der gleichen Konzentration innerhalb eines Versuches ($n = 9$) und die zusammengefasste Auswertung aus verschiedenen Versuchen ($n = 18$) zeigte weiterhin eine Vergleichbarkeit der zwei Auswertungsmethoden (Abbildung 11).

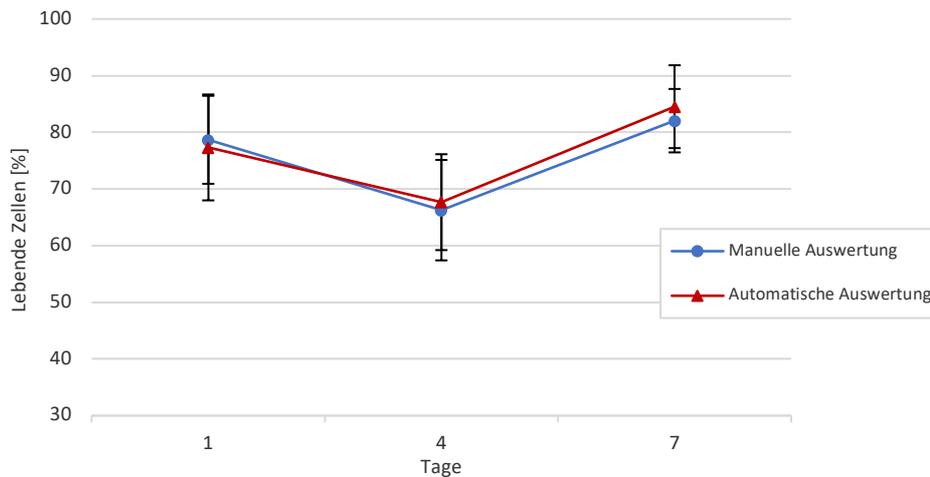


Abbildung 10: Automatische vs. manuelle Auswertung (n = 3). Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen nach 1, 4 und 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die automatische Quantifizierung von lebenden/toten Zellen wurde in Fiji durchgeführt

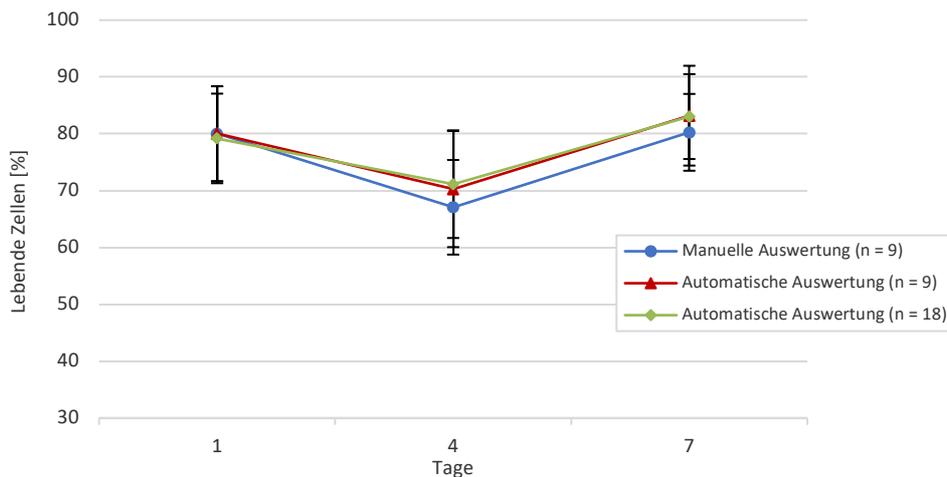


Abbildung 11: Automatische vs. manuelle Auswertung (n = 9 bzw. 18). Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen nach 1, 4 und 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die automatische Quantifizierung von lebenden/toten Zellen wurde in Fiji durchgeführt.

Somit konnte die automatisierte Bestimmung der Vitalität als valide Methode etabliert und eine effiziente Auswertung in den anschließenden Versuchen ermöglicht werden.

4.1.3 Auswandern von Zellen

In anderen Experimenten am FMZ mit dem Material GelAGE hat sich gezeigt, dass das Auswandern von Zellen aus GelAGE Hydrogelen ein Problem darstellen könnte, da sich während der Kulturphase Zellen außerhalb der Hydrogele zeigten. Deshalb wurde dieses Phänomen mittels Mikroskopie und DNA-Assay genauer untersucht und mit dem Zellverhalten in Alg-Gel Proben verglichen.

Zuerst wurde durch den nahezu identischen DNA-Gehalt direkt nach Probenherstellung (Tag 0 DNA-Gehalt) die Vergleichbarkeit der zwei verschiedenen Hydrogelsysteme nachgewiesen (Abbildung 12). Die Proben wurden demnach trotz unterschiedlicher Pipettiereigenschaften mit einer identischen Menge an Zellen versehen.

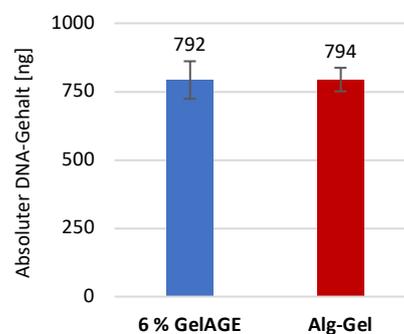


Abbildung 12: Tag 0 DNA-Gehalt von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM und Alg-Gel Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 0, direkt nach Probenherstellung (n = 5).

Abbildung 13 zeigt das Zellverhalten in den beiden Materialien: Bei den GelAGE Hydrogelen zeigten sich an Tag 0 viele freischwimmende Zellen im Medium, die an Tag 1 am Plattenboden adhärent vorlagen. Nach der täglichen Umlagerung in eine neue Zellkulturplatte zeigten sich an Tag 4 und Tag 7 wenige bis keine neuen Zellen am Plattenboden. In der Alg-Gel Gruppe konnten an Tag 0 und Tag 1 keine Zellen außerhalb der Hydrogele nachgewiesen werden. Durch

allmähliches Auflösen des Gels ab Tag 4 gelangten Zellen ins Medium. Mit Transglutaminase behandelte Alg-Gel Hydrogele wiesen auch noch an Tag 7 einen scharf begrenzten Randbereich auf.

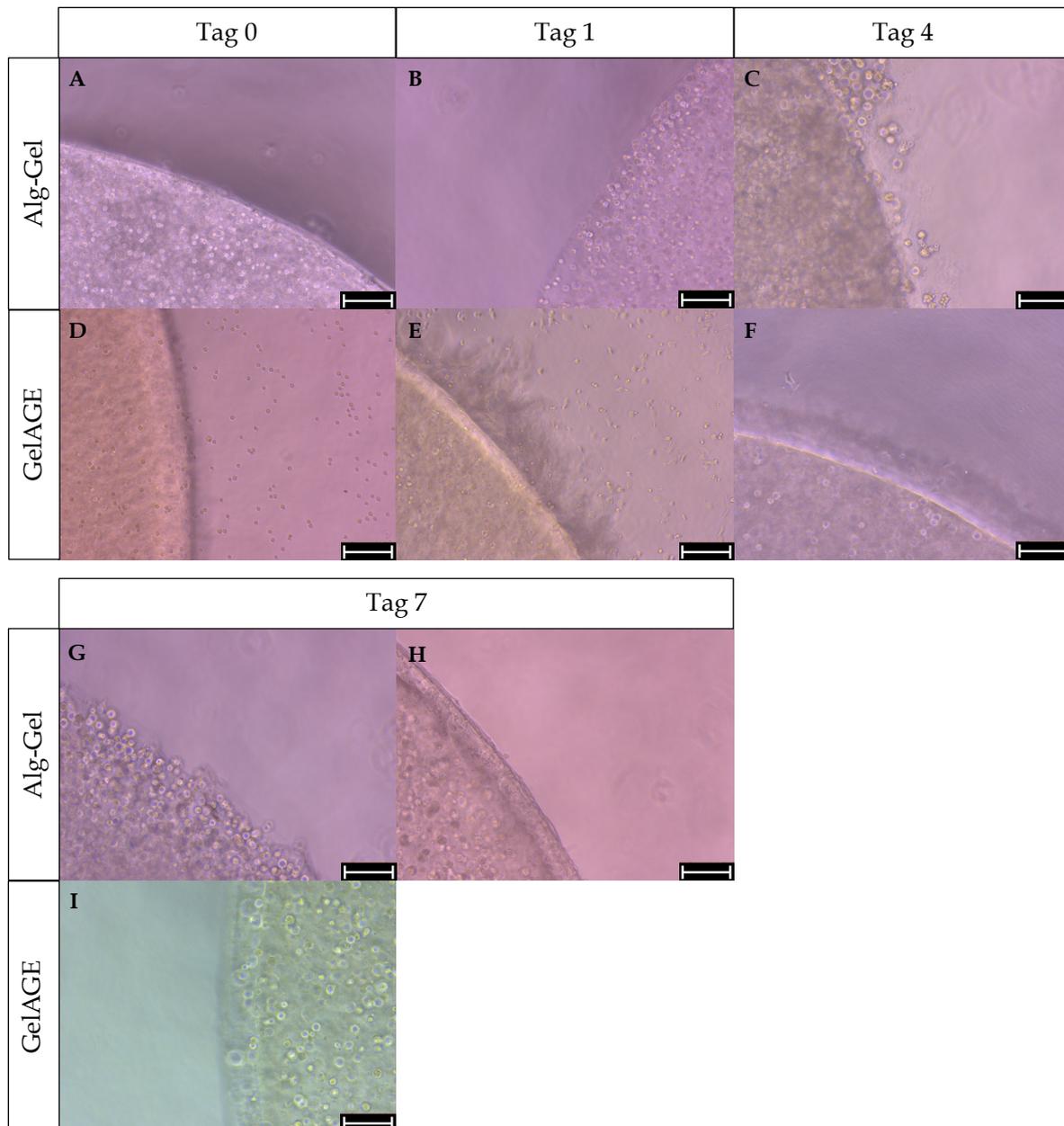


Abbildung 13: Aufnahmen in Medium kultivierter Alg-Gel und 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogele. Die Proben wurden ab Tag 1 täglich in eine neue Zellkulturplatte umgelagert. In der Alg-Gel Gruppe konnten an Tag 0 (A) und Tag 1 (B) keine Zellen außerhalb der Hydrogele nachgewiesen werden. Durch allmähliches Auflösen des Gels ab Tag 4 (C + G) gelangten Zellen ins Medium. Mit Transglutaminase behandelte Alg-Gel Hydrogele zeigten auch noch an Tag 7 einen scharf begrenzten Randbereich (H). Bei den GelAGE Hydrogelen zeigten sich schon an Tag 0 viele freischwimmende Zellen im Medium (D), welche an Tag 1 am Plattenboden adhären vorlagen (E). An Tag 4 (F) und Tag 7 (I) zeigten sich wenige bis keine neuen Zellen am Plattenboden. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 µm.

Zur Quantifizierung und Einordnung der Anzahl der aus den GelAGE Hydrogelen abgewanderten Zellen, wurden die auf dem Plattenboden adhären Zellen an Tag 1, 4 und 7 vom Plattenboden gelöst und mit dem DNA-Gehalt in den Proben verglichen. Es zeigte sich, dass nur ein sehr geringer Anteil der Gesamtzellzahl auf dem Plattenboden aufzufinden war (Abbildung 14).

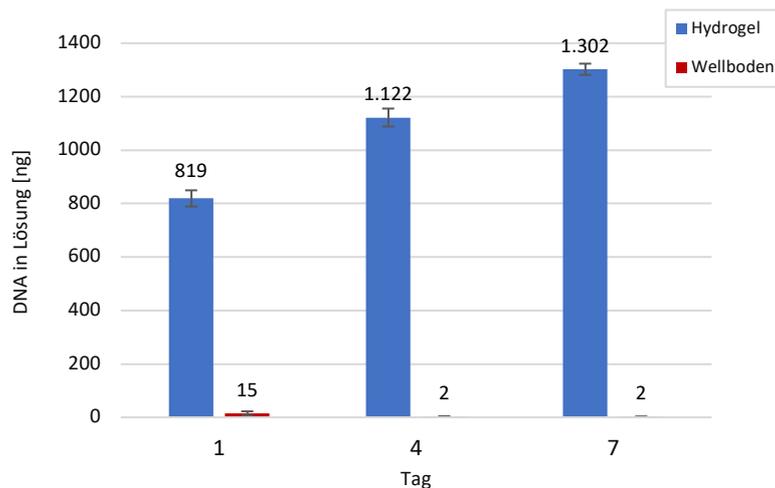


Abbildung 14: DNA-Gehalt im gesamten Hydrogel und auf dem Plattenboden. Gesamt-DNA-Gehalt an Tag 1, 4 und 7 in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen. An den jeweiligen Erntezeitpunkten wurden zudem die auf den Plattenböden adhären Zellen abgelöst und deren DNA-Gehalt quantifiziert (n = 9). Beobachtungszeitraum Tag 1 bis Tag 7.

Somit konnte gezeigt werden, dass über eine Kultivierungsdauer von 7 Tagen nur ein sehr kleiner Anteil der Zellen die Hydrogele verlässt, weshalb dies in den folgenden Versuchen als zu vernachlässigen betrachtet wurde.

4.2 Alginat-Gelatine Hydrogele

Um die Zytokompatibilität der verschiedenen Hydrogelzusammensetzungen zu untersuchen, wurden L929-Zellen für 7 Tage *in vitro* kultiviert und mittels Live/Dead Assay, DNA-Assay, CCK-8-Assay und Phalloidin-Färbung analysiert. Die Alginat-Gelatine (Alg-Gel) Hydrogele wurden teilweise mit dem Zusatz von Humanem Plättchenlysate (HPL) modifiziert, um die Zytokompatibilität zu verbessern. Weiterhin erfolgte eine Nachvernetzung mit Transglutaminase (TG), um die Gelatine in den Proben zu halten bzw. die Netzwerkdicke der Hydrogele zu erhöhen.

4.2.1 Vitalität

Die Abbildungen 15 und 16 geben einen guten Eindruck über die Zellmorphologie in den Alg-Gel Hydrogelen: Schon an Tag 1 lagen die Zellen in hantelförmigen Zellpaaren vor. Diese Erscheinung deutete auf eine initial hohe Zellteilungsrate hin. In allen Gruppen war sowohl an Tag 1 als auch Tag 7 eine runde Zellmorphologie zu beobachten. Allerdings erschienen die Zellen bzw. Zellcluster mit steigender Konzentration an HPL vergrößert. Die Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts (siehe 4.2.4) ermöglichte eine detailliertere Formanalyse der einzelnen Zellen.

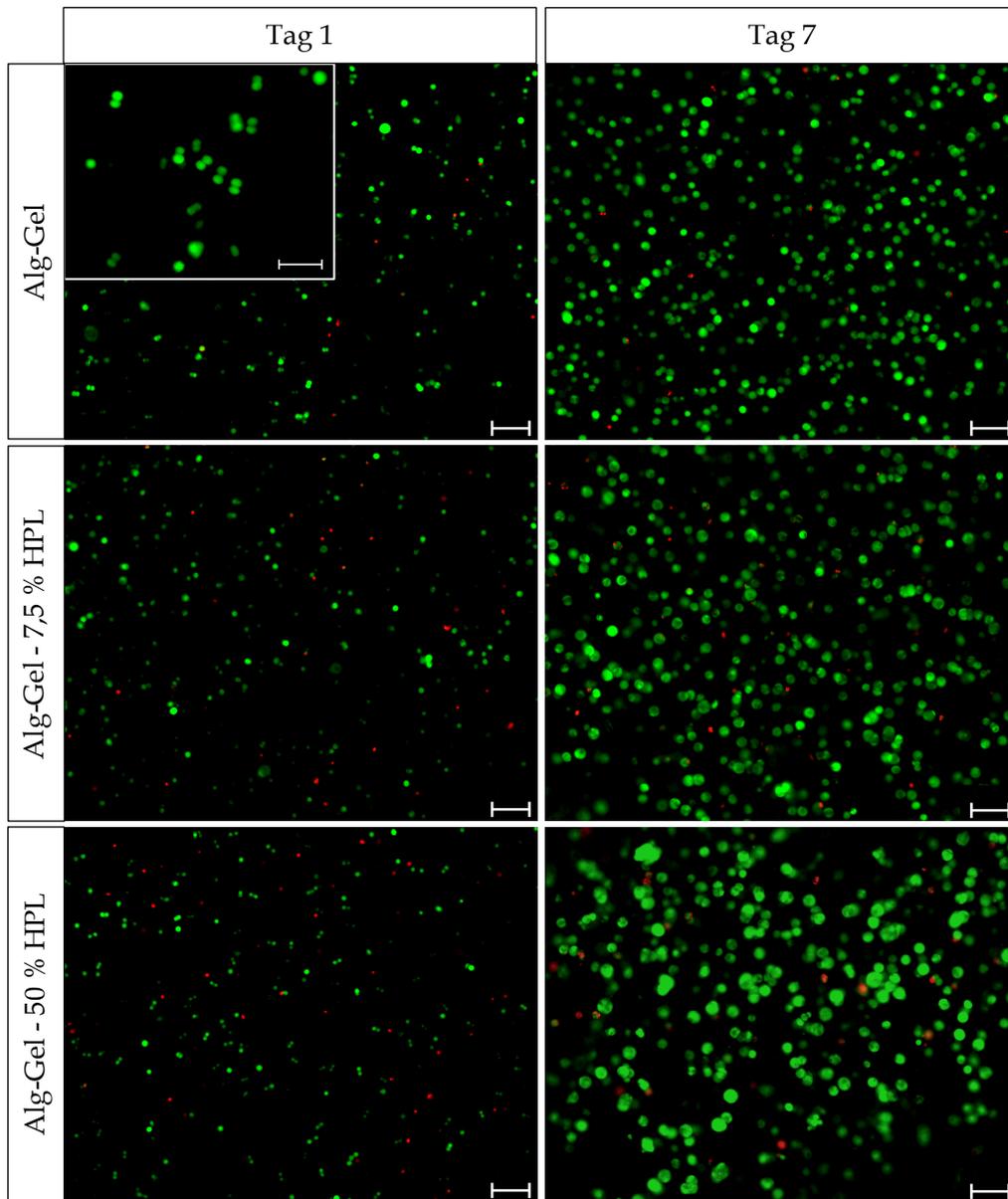


Abbildung 15: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen. Repräsentative Aufnahmen des Live/Dead Assays nach 1 bzw. 7 Tagen. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Zur besseren Beurteilung der Zellmorphologie an Tag 1, ist der reinen Alg-Gel Variante ein vergrößerter Ausschnitt beigelegt. Der Maßstabsbalken hierfür entspricht 50 µm.

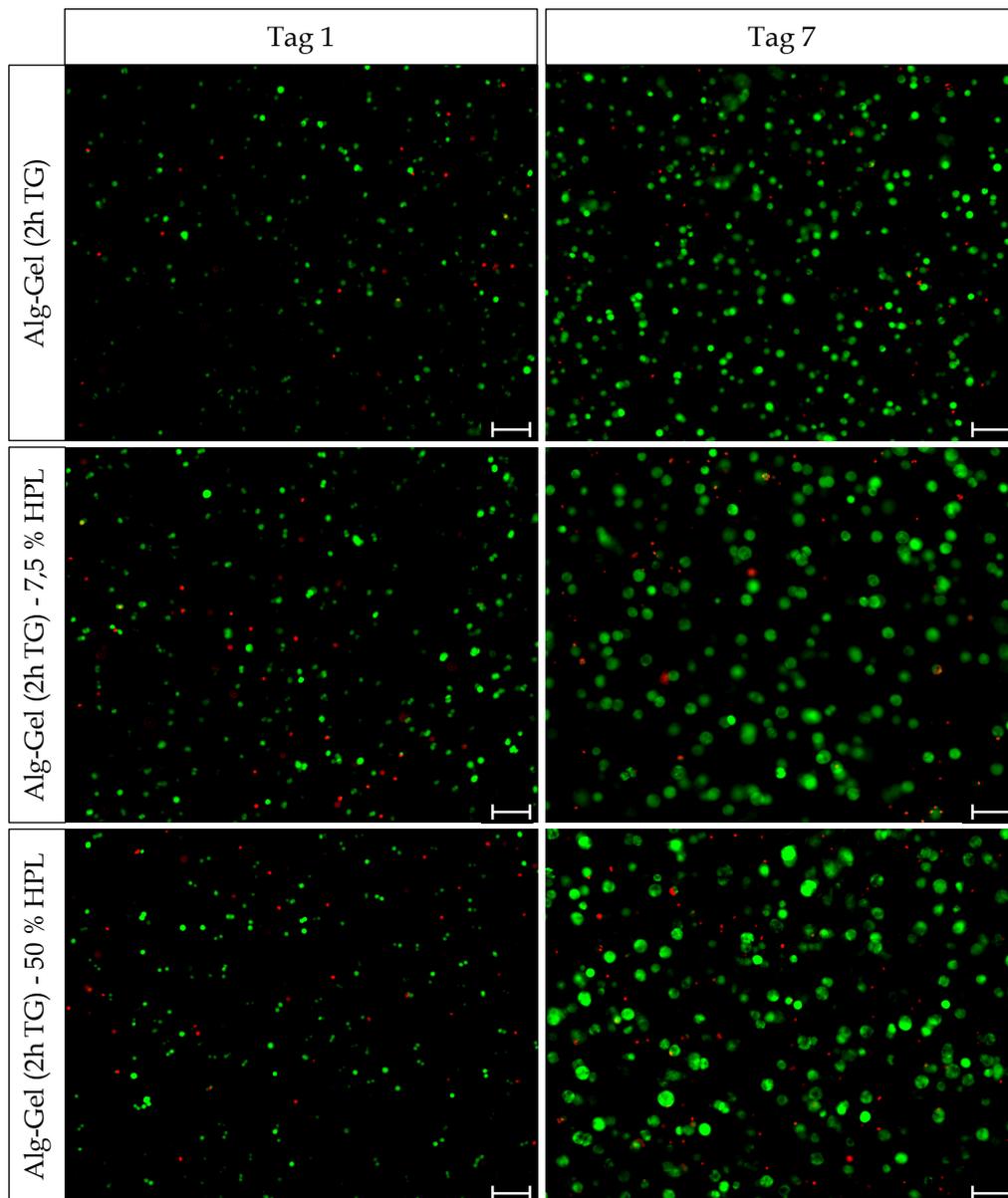


Abbildung 16: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen mit 2 h Transglutaminase (TG) Nachvernetzung. Repräsentative Aufnahmen des Live/Dead Assays nach 1 bzw. 7 Tagen. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

In Abbildung 17 ist der Verlauf der Vitalität dargestellt: Die Auswertung der Live/Dead Aufnahmen ergab in allen Alg-Gel Gruppen ohne Nachvernetzung mit Transglutaminase eine gute Zellvitalität über die siebentägige Kultivierungsdauer. Diese lag an Tag 1 bei 83 – 90 % und an Tag 7 bei etwa 90 %. Dabei war ein relativ konstanter Verlauf von Tag 1 zu Tag 7 und keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu erkennen.

Zwar kam es durch die relativ hohen Standardabweichungen zu einer Überlagerung der Messwerte. Dennoch führte die Kombination aus Transglutaminase und HPL zu tendenziell mehr toten Zellen. So war in den nachvernetzten Alg-Gel Hydrogelen mit 50 % HPL an Tag 1 die niedrigste Vitalität in Höhe von 76 ± 6 % und an Tag 7 ein Wert von 75 ± 5 % zu beobachten. Die Vitalität nahm dabei von Tag 1 zu Tag 4 ab und stieg erst zum Ende des Beobachtungszeitraums wieder an.

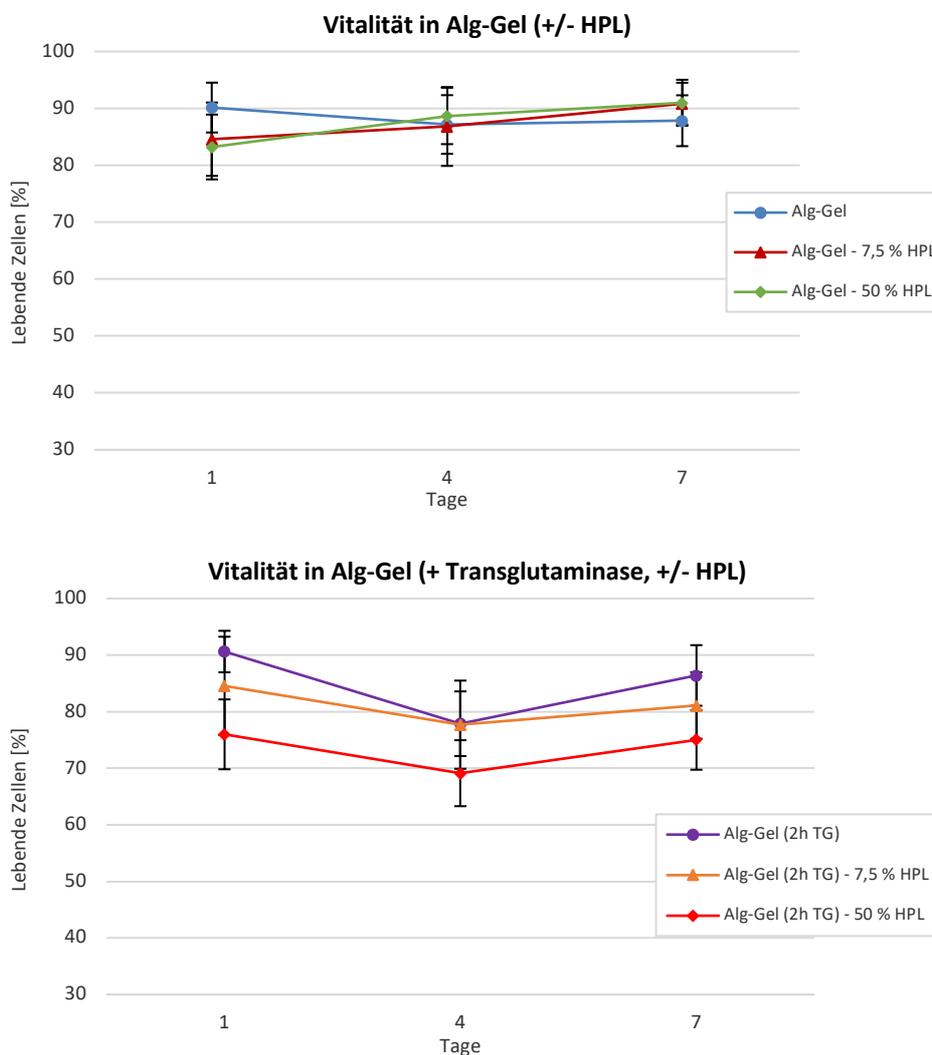


Abbildung 17: Vitalität von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen. Die Zellvitalität wurde an Tag 1, 4 und 7 anhand der automatischen Auswertung des Live/Dead Assays in Fiji ermittelt und als das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl definiert.

4.2.2 DNA-Gehalt

Die Hydrogele wurden für 7 Tage *in vitro* Kultur genommen und der absolute DNA-Gehalt in der gesamten Probe zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In Abbildung 18 ist der Verlauf dieser Messungen dargestellt: Der DNA-Gehalt nahm in allen Alg-Gel Gruppen zu und lag an Tag 1 um 1300 ng. Tendenziell zeigten sich in den Transglutaminase nachvernetzten Hydrogelen zum Ende des Beobachtungszeitraums niedrigere DNA-Werte. So war in den Alg-Gel Proben ohne Transglutaminase-Nachvernetzung mit 7,5 % HPL an Tag 7 der höchste DNA-Gehalt in Höhe von 1749 ± 51 ng festzustellen. Der niedrigste absolute DNA-Gehalt war mit 1548 ± 77 ng in der Gruppe der Hydrogele mit Transglutaminase-Nachvernetzung und 50 % HPL-Zusatz zu beobachten. Weitere relevante Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen mit bzw. ohne Nachvernetzung konnten nicht festgestellt werden.

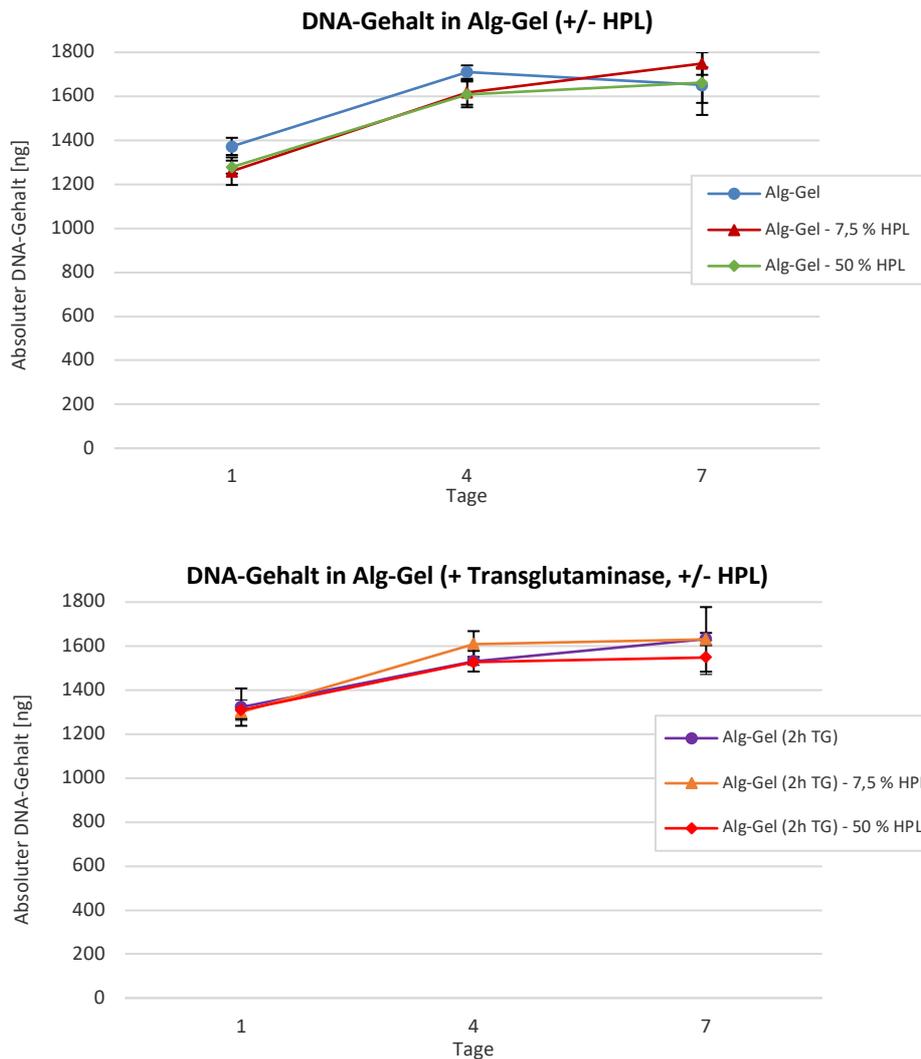


Abbildung 18: DNA-Gehalt von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur.

4.2.3 Metabolische Aktivität

Zur weiteren Beurteilung der zellulären Gesundheit wurde die metabolische Aktivität der L929-Zellen mit dem CCK-8 Reagenz untersucht. Die Werte sind nicht absolut, sondern relativ und müssen daher in Bezug auf die Ergebnisse weiterer Zeitpunkte oder Gruppen betrachtet werden.

Die metabolische Aktivität nahm von Tag 1 zu Tag 7 in allen Gruppen etwa um 100 % zu (Abbildung 19). Auffällig war, dass die Alg-Gel Gruppen mit HPL keine (ohne Transglutaminase) oder nur eine geringe (mit Transglutaminase) Steigerung der metabolischen Aktivität von Tag 1 zu Tag 4 aufwiesen. Ohne Transglutaminase-Nachvernetzung zeigten sowohl die Proben mit als auch ohne

HPL-Zusatz ähnliche Messwerte. Diese lagen an Tag 1 zwischen 0,08 – 0,12 und Tag 7 um 0,2.

In den Hydrogelen mit Transglutaminase-Nachvernetzung war an Tag 1 bei HPL-Zusatz eine höhere Aktivität ($0,11 \pm 0,01$ bzw. $0,12 \pm 0,01$) als in den reinen Alg-Gel Proben feststellbar ($0,08 \pm 0,01$). Diese Beobachtung wiederholte sich auch an Tag 7. Mit steigender Konzentration an HPL zeigten sich auch höhere Messwerte, so dass die metabolische Aktivität bei $0,15 \pm 0,01$ (ohne HPL), $0,20 \pm 0,02$ (7,5 % HPL) bzw. $0,23 \pm 0,01$ (50 % HPL) lag.

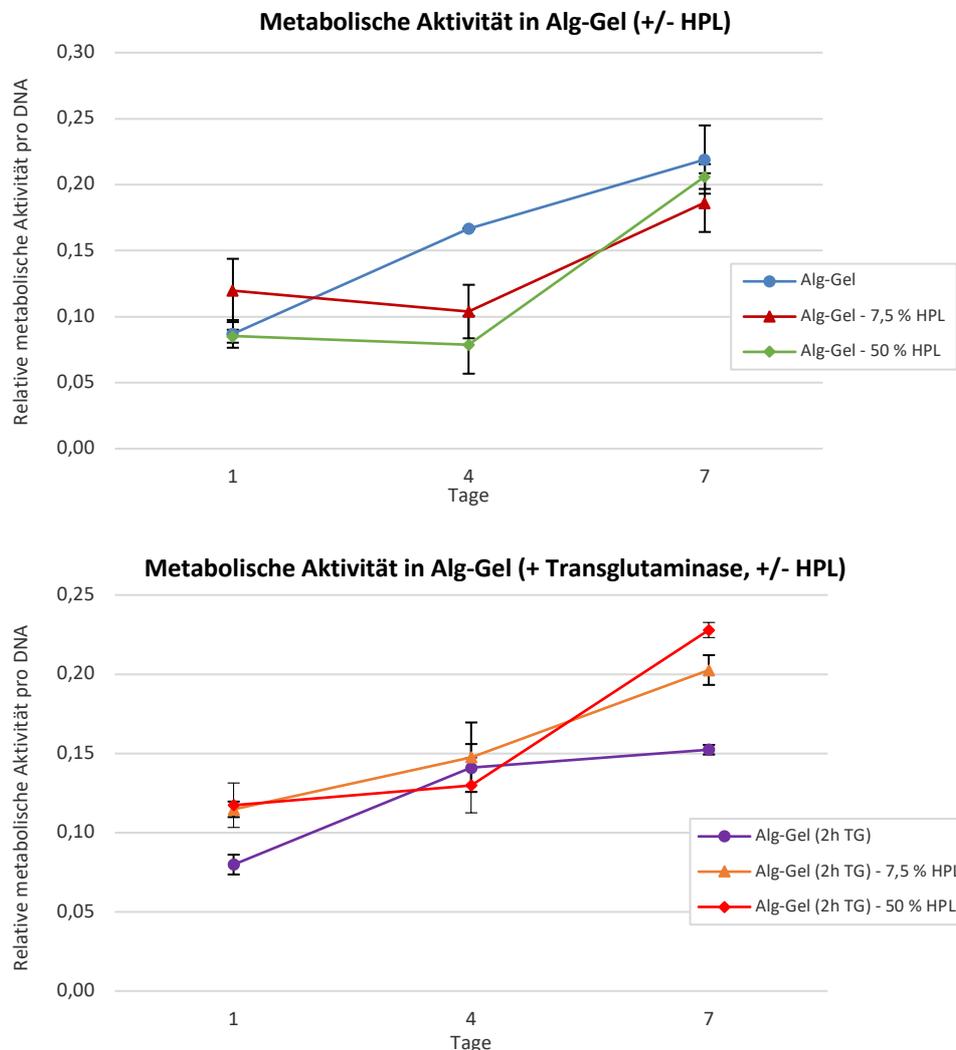


Abbildung 19: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen. Gemessen mit dem Cell Counting Kit-8 an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur. Die Werte sind relativ und müssen in Bezug auf die vorherige Zeitpunktmessung betrachtet werden. Die Normierung erfolgte auf den Gesamt-DNA-Gehalt.

4.2.4 Zellmorphologie

Durch die Phalloidin-Färbung konnten weitere Informationen über die Zellmorphologie und die Zellverteilung gesammelt werden. Die Färbung erfolgte in Form von Kompletpräparaten (Whole-mount staining) und nicht über die Herstellung von Kryoschnitten. Die Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop angefertigt, um einen besseren Eindruck über die räumliche Position der Zellen innerhalb der Proben zu erlangen. So konnte auch die Beobachtung einer ortsabhängig unterschiedlichen Zellverteilung ermöglicht werden. Die Priorität lag dabei auf der Untersuchung der verschiedenen Hydrogelnetzwerkdichten, weshalb aufgrund des zusätzlich hohen Zeitaufwandes die Gruppen mit HPL Modifikation nicht mit dem Konfokalmikroskop untersucht wurden.

In der Übersichtsaufnahme von reinem Alg-Gel zeigten sich die L929-Zellen gleichmäßig über die Hydrogeloberfläche und im Probeninneren verteilt (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu zeigte sich auf der Oberfläche der mit Transglutaminase nachvernetzten Alg-Gel Proben eine höhere Zelldichte als im Probeninneren (Abbildung 21). Aufgrund der sehr gewellten Oberfläche war es jedoch nicht möglich diese Oberflächenmorphologie exakt in einer Bildebene festzuhalten. Dunkle Löcher in der Hydrogelstruktur wurden auf die beginnende Zersetzung der Hydrogelsubstanz zurückgeführt.

Die Detailaufnahmen (Abbildung 22) zeigen eine runde Zellmorphologie. Besonders auffällig war dabei das clusterartige Wachstum in Zellaggregaten. Durch das Anfärben der Zellkerne konnten die multiplen Zellkerne innerhalb eines Clusters dargestellt werden. Auf der Oberfläche der mit Transglutaminase nachvernetzten Hydrogele zeigte sich eine gespreizte Morphologie der L929-Zellen, welche sonst an keiner anderen Lokalisation im Gel bzw. in keiner anderen Gruppe zu beobachten war.

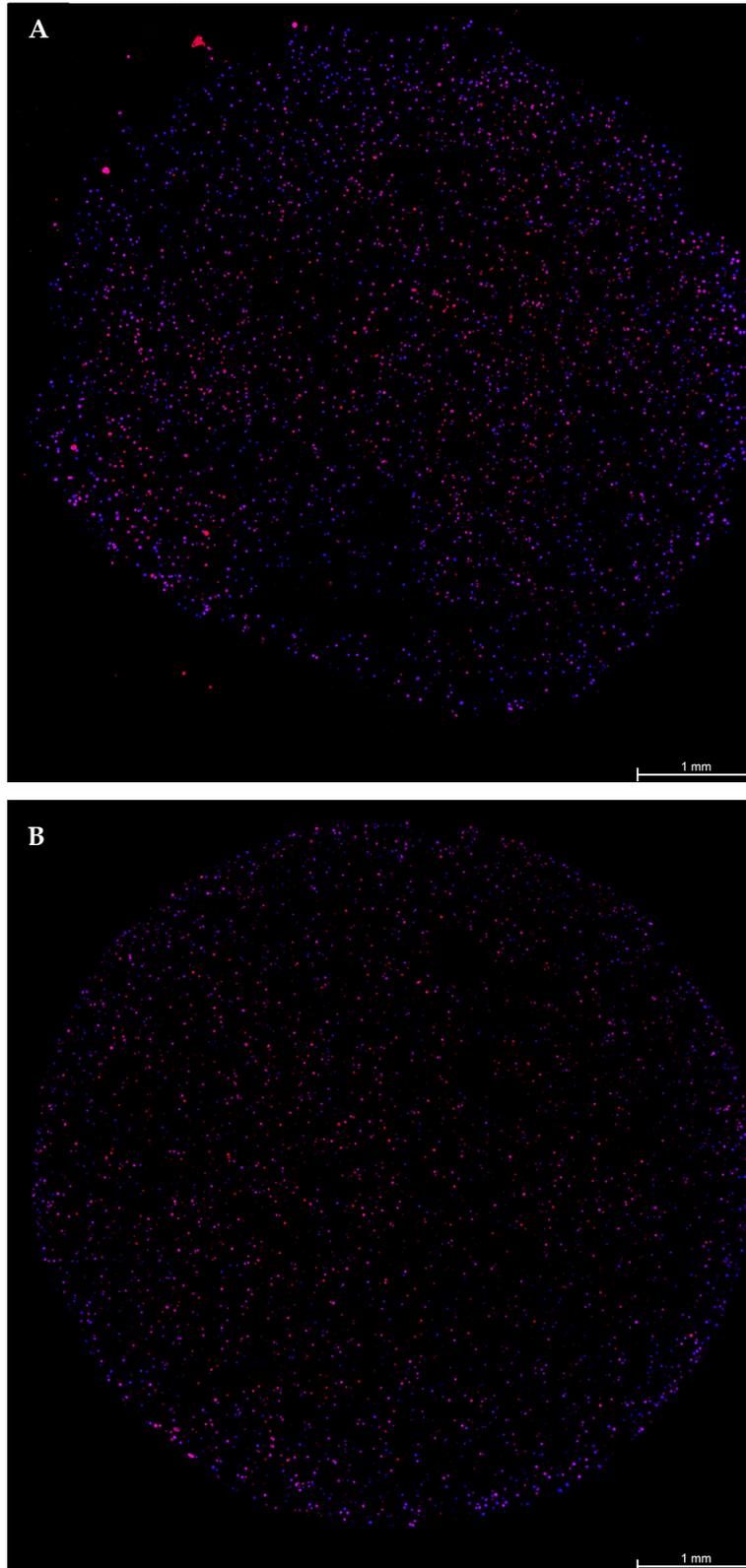


Abbildung 20: Übersichtsaufnahme eines Alginate-Gelatine Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 100 μm tiefer in der Probe liegende Schicht (B). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

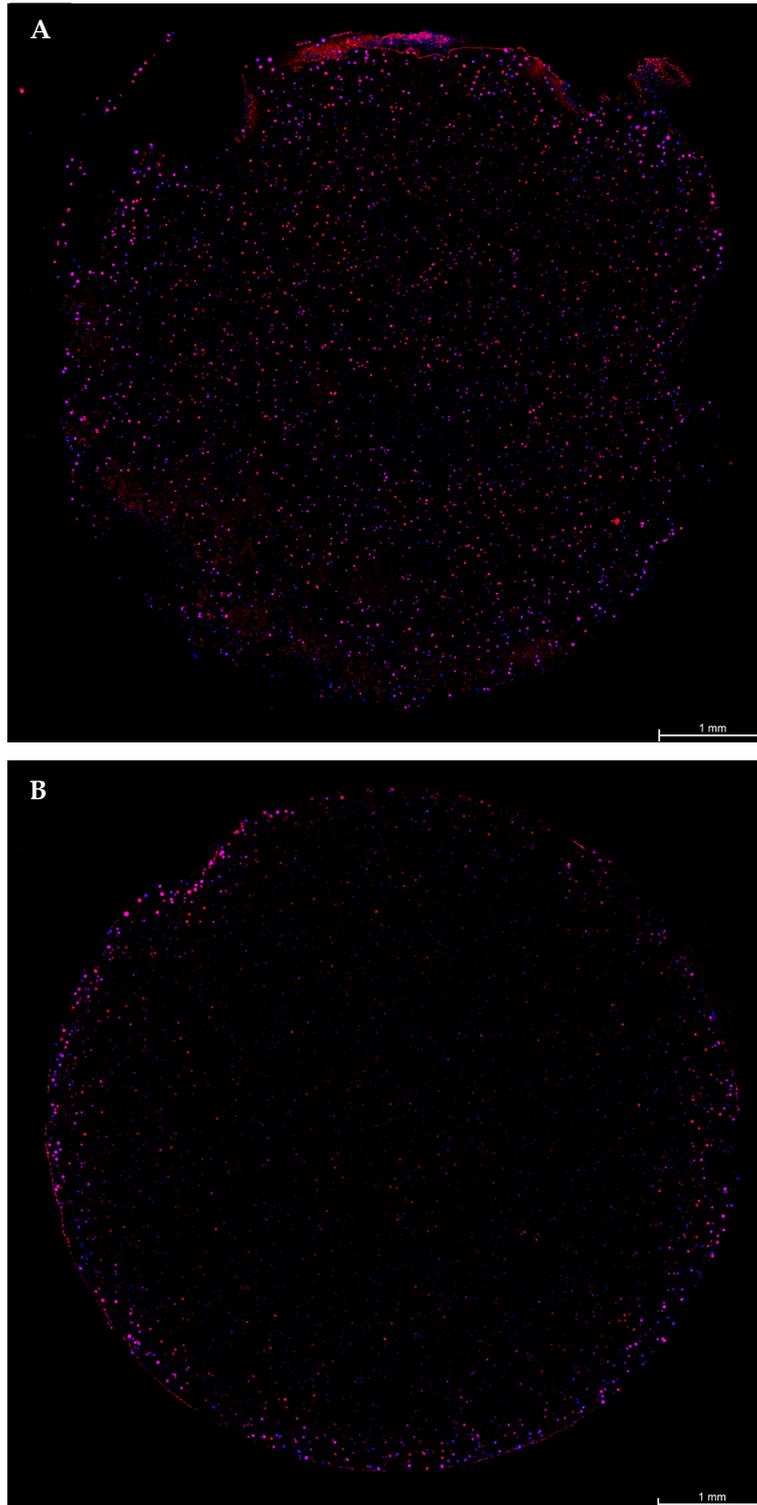


Abbildung 21: Übersichtsaufnahme eines Alginat-Gelatine Hydrogels mit 2 h Transglutaminase-Nachvernetzung nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 100 μm tiefer in der Probe liegende Schicht (B). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

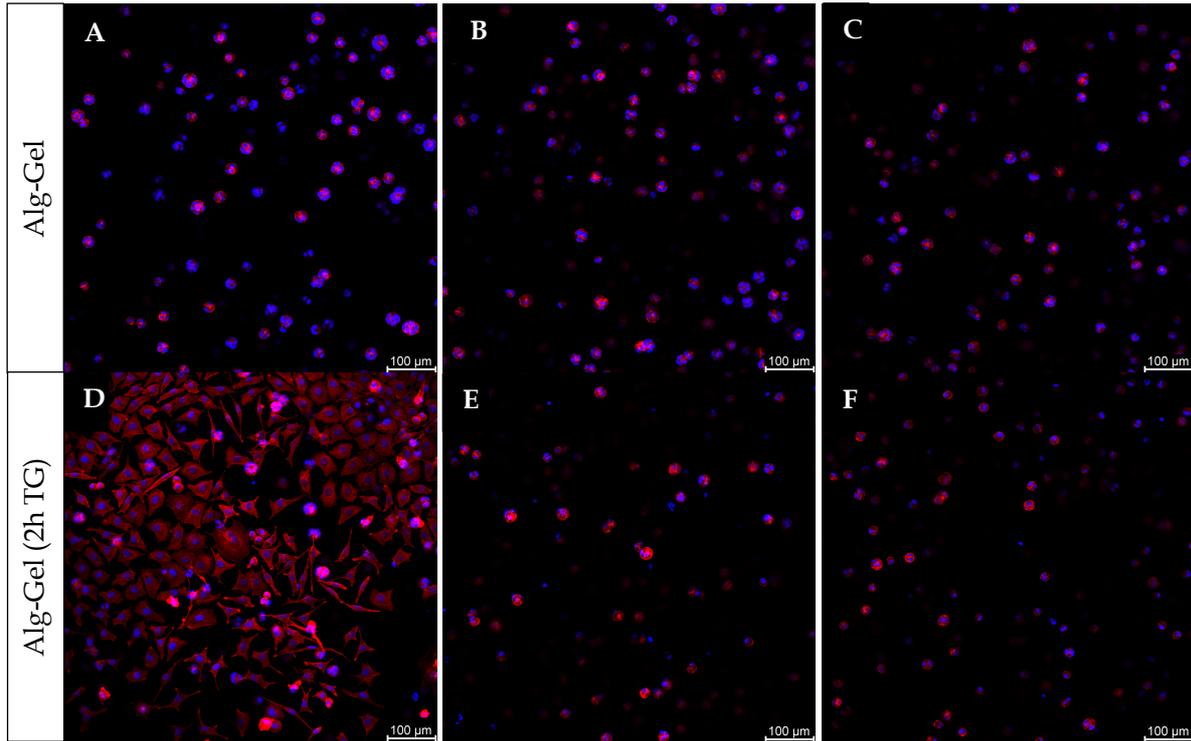


Abbildung 22: Detailaufnahmen eines Alginate-Gelatine (A-C) Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur, D-F mit 2 h Transglutaminase (TG) Nachvernetzung. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A, D) und anschließend auf eine 25 μm (B, E) bzw. 50 μm (C, F) tiefer in der Probe liegende Schicht. Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm.

4.3 GelAGE G1MM Hydrogele

Die Hydrogele der nicht-thermorensponsiven GelAGE Variante G1MM wurden unter Verwendung des Vernetzers PEG-4-SH als Thiol-Komponente und dem Photoinitiatorsystem Ru/SPS hergestellt. Die Vernetzung erfolgte dabei mit einem Abstand von 10 cm zur Lichtquelle und einer Belichtungszeit von 20 s.

4.3.1 Vitalität

Abbildung 23 zeigt die Morphologie der L929-Zellen an den Tagen 1 und 7 in GelAGE G1MM Hydrogelen. In dem vergrößerten 6 % (m/v) G1MM Bildausschnitt erkennt man die abgerundete Zellmorphologie an Tag 1. Im Gegensatz zu den Alg-Gel Proben (siehe 4.2.1) waren an Tag 1 keine hantelförmigen Zellpaare zu erkennen. Die kugelige Zellmorphologie zeigte sich in allen Gruppen und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 7 bestehen. Es zeigten sich keine gespreizten Zellen. In den 15 % (m/v) G1MM Proben waren an Tag 1 mehr tote Zellen und an Tag 7 tendenziell weniger und kleinere Zellen zu beobachten. Weiterhin erschienen an Tag 7 die Zellen in den 6 % (m/v) G1MM Gelen ohne HPL und mit 50 % HPL deutlich größer.

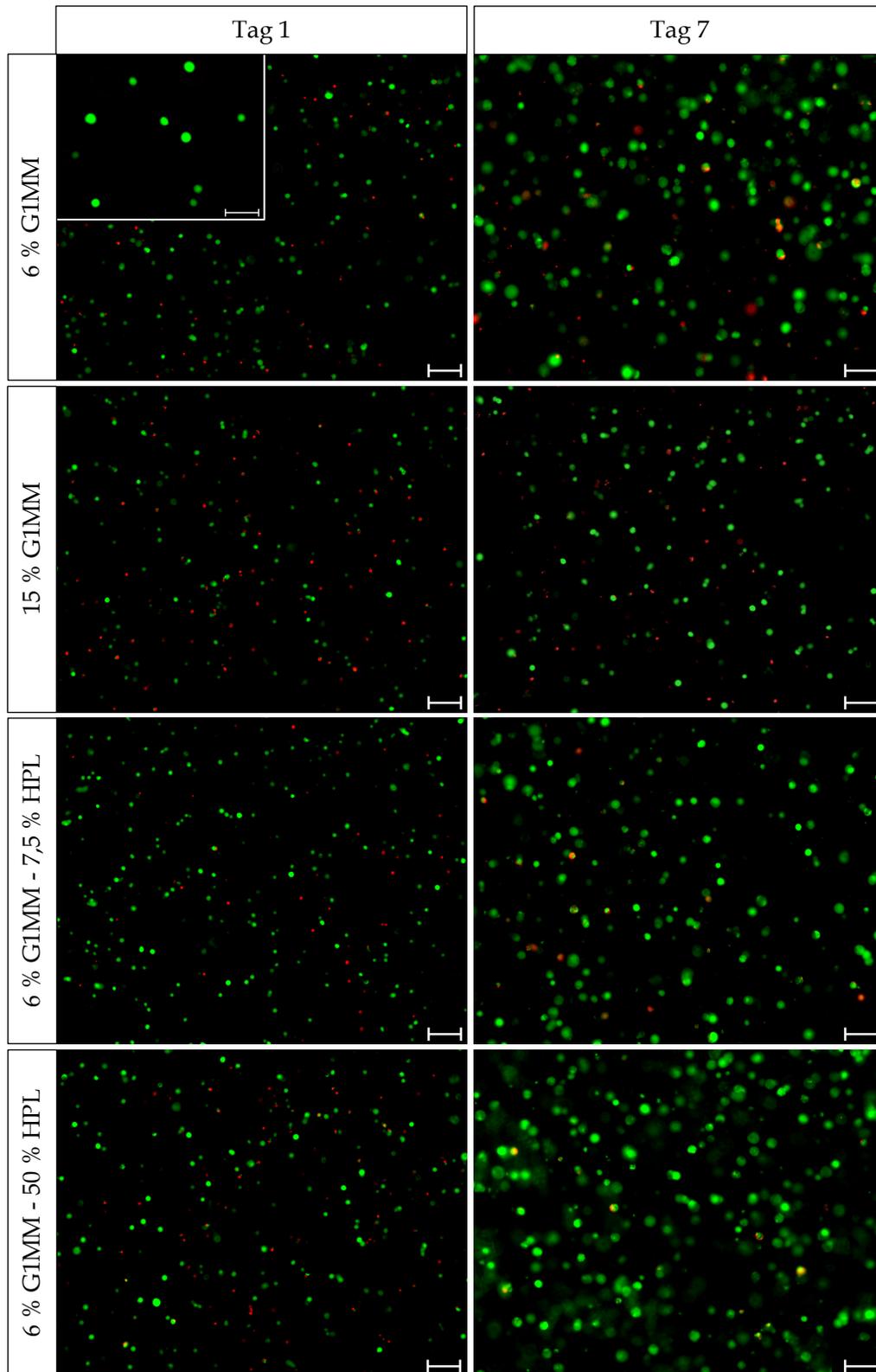


Abbildung 23: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in GelAGE G1MM Hydrogelen. Repräsentative Aufnahmen des Live/Dead Assays nach 1 bzw. 7 Tagen. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Zur besseren Beurteilung der Zellmorphologie an Tag 1 ist der reinen GelAGE Variante ein vergrößerter Ausschnitt beigelegt. Der Maßstabsbalken hierfür entspricht 50 µm.

In Abbildung 24 ist der Verlauf der Vitalität dargestellt: Die Auswertung der Live/Dead Aufnahmen ergab Vitalitätswerte mit teilweise überlappender Standardabweichung, weshalb der Vergleich der 4 verschiedenen Gruppen vor allem Tendenzen ablesen ließ. So lag an Tag 1 die Vitalität aller 6 % (m/v) G1MM Gruppen um 80 %, wohingegen die der höher konzentrierten 15 % (m/v) G1MM Proben nur bei 67 ± 6 % lagen. In den drei 6 % (m/v) Gruppen nahm an Tag 4 der Anteil der lebenden Zellen mit der Konzentration an HPL zu. So ergaben sich für die 6 % (m/v) G1MM Hydrogele mit 50 % HPL an Tag 7 mit 88 ± 8 % die höchsten Vitalitätswerte. Die 15 % (m/v) G1MM Proben verzeichneten über die gesamte siebentägige Kultivierungsdauer die niedrigsten Werte. So wurden an Tag 7 schließlich 66 ± 8 % erreicht. Diese Unterschiede entsprachen dem optischen Eindruck der Live/Dead Aufnahmen aus Abbildung 23.

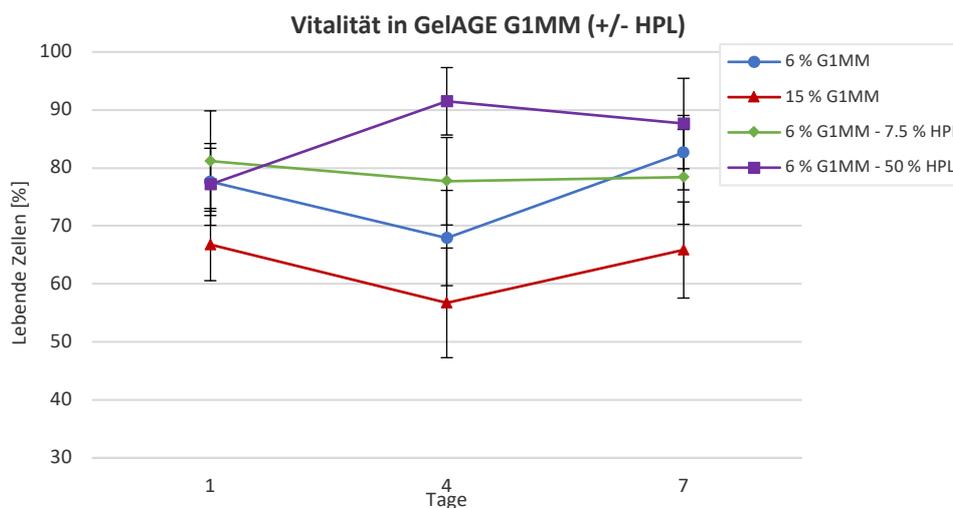


Abbildung 24: Vitalität von L929-Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen. Die Zellvitalität wurde an Tag 1, 4 und 7 anhand der automatischen Auswertung des Live/Dead Assays in Fiji ermittelt und als das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl definiert.

4.3.2 DNA-Gehalt

Die Hydrogele wurden für 7 Tage *in vitro* Kultur genommen und der absolute DNA-Gehalt in der gesamten Probe zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In Abbildung 25 ist der Verlauf dieser Messungen dargestellt: Der DNA-Gehalt nahm in allen Gruppen zu. Schon an Tag 1 war mit steigender Konzentration an HPL auch steigende Messwerte für den DNA-Gehalt zu beobachten. So zeigten

sich die niedrigsten Messwerte bei den 6 % (m/v) G1MM Proben ohne HPL (867 ± 41 ng) und den höher konzentrierten 15 % (m/v) Hydrogelen (927 ± 4 ng). Demgegenüber lagen an Tag 1 die Proben mit 50 % HPL bei 1194 ± 33 ng. In den 15 % (m/v) G1MM Proben fiel die Zunahme des DNA-Gehalts am geringsten aus, so dass an Tag 7 mit 1139 ± 16 ng ein deutlich geringerer Wert festzustellen war. Am Ende der Versuchsperiode waren in den drei 6 % (m/v) G1MM Gruppen ebenfalls relevante Unterschiede zu erkennen. So zeigten sich erneut mit steigender Konzentration an HPL auch steigende Messwerte für den DNA-Gehalt. Der höchste Wert war dabei in den 50 % HPL Proben mit 1649 ± 31 ng zu beobachten. Die großen Unterschiede zwischen den 6 % (m/v) G1MM Proben mit 50 % HPL und den 15 % (m/v) Hydrogelen gleichen den Ergebnissen der Vitalität (siehe 4.3.1).

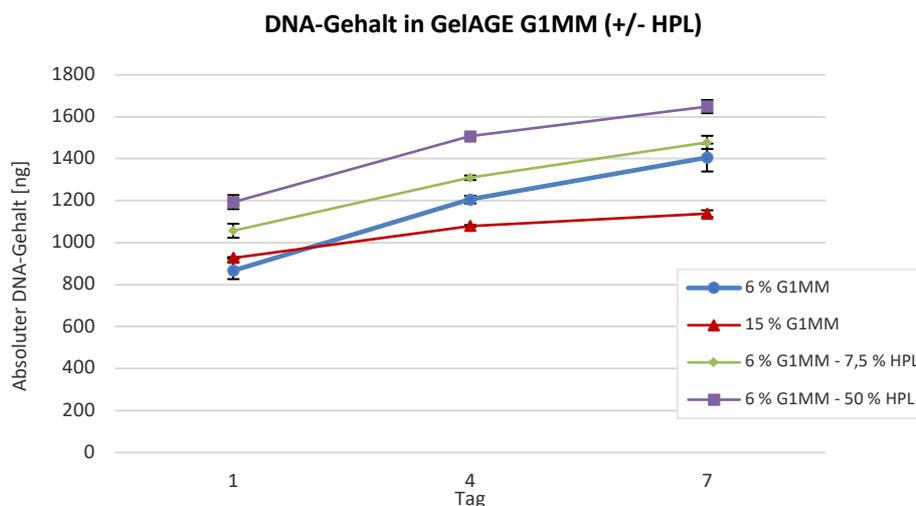


Abbildung 25: DNA-Gehalt von L929 Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur.

4.3.3 Metabolische Aktivität

Abbildung 26 zeigt die Messwerte für die metabolische Aktivität der L929-Zellen in GelAGE G1MM Hydrogelen an den Tagen 1, 4 und 7. Die Werte sind nicht absolut, sondern relativ und müssen daher in Bezug auf die Ergebnisse weiterer Zeitpunkte oder Gruppen betrachtet werden.

Auffällig war, dass die 15 % (m/v) G1MM Proben an Tag 1 bei $0,10 \pm 0,02$ lagen und somit mit einem tendenziell höheren Messwert starteten. Dieser nahm jedoch über den Beobachtungszeitraum ab und lag an Tag 7 mit $0,05 \pm 0,01$ deutlich unter den Messwerten der drei anderen Gruppen. Die metabolische Aktivität in den drei 6 % (m/v) G1MM Gruppen startete an Tag 1 bei $0,05 - 0,08$ und nahm zu Tag 7 hin in allen Gruppen zu. Dabei zeigten die Proben mit HPL-Zusatz an Tag 7 eine höhere metabolische Aktivität, so dass der höchste Wert in den 50 % HPL Proben mit $0,22 \pm 0,01$ zu beobachten war.

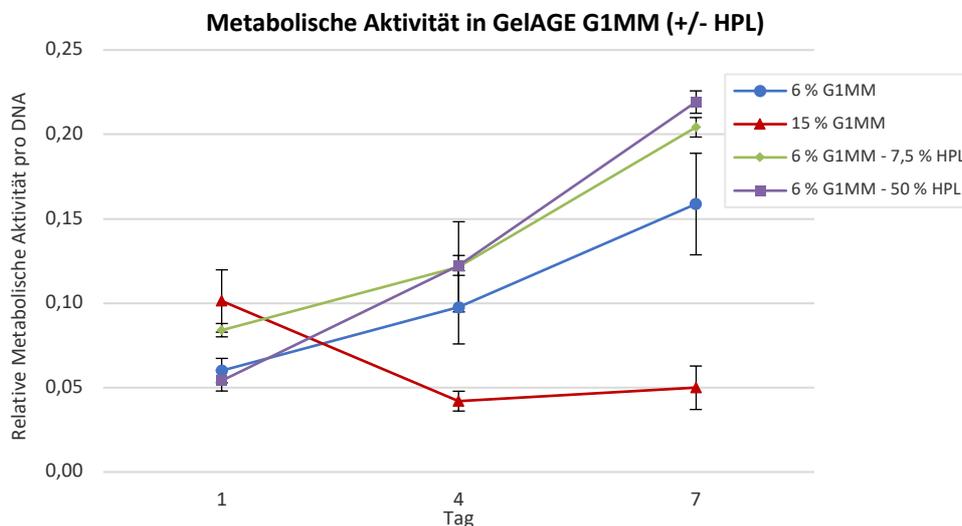


Abbildung 26: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen. Gemessen mit dem Cell Counting Kit-8 an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur. Die Werte sind relativ und müssen in Bezug auf die vorherige Zeitpunktmessung betrachtet werden. Die Normierung erfolgte auf den Gesamt-DNA-Gehalt.

4.3.4 Zellmorphologie

In der Übersichtsaufnahme der Phalloidin-Färbung zeigten sich die L929-Zellen gleichmäßig über die Hydrogeloberfläche und 100 μm tiefer im Probeninneren verteilt (Abbildung 27). Die Oberflächenaufnahme zeigte im Zentrum ein dunkles Feld, da sich die Probenoberfläche nicht ganzheitlich in einer Ebene abbilden ließ. Die ortsabhängigen Unterschiede in der Zellmorphologie und der Zelldichte lassen sich auch in den Detailaufnahmen (Abbildung 28) gut beobachten: Auf der Probenoberfläche und dem Hydrogelrand bildeten die L929-Zellen nestartige Strukturen aus vielen kleinen Zellen. Die einzelnen Zellen

zeigten dabei eine abgerundete Zellmorphologie und keine besondere Zell-Material-Interaktion. Zu erwarten wäre ein sich spreizend ausbreitendes Zytoskelett. Im Gegensatz dazu waren im Probeninneren kugelförmige Strukturen mit multiplen Zellkernen zu beobachten.

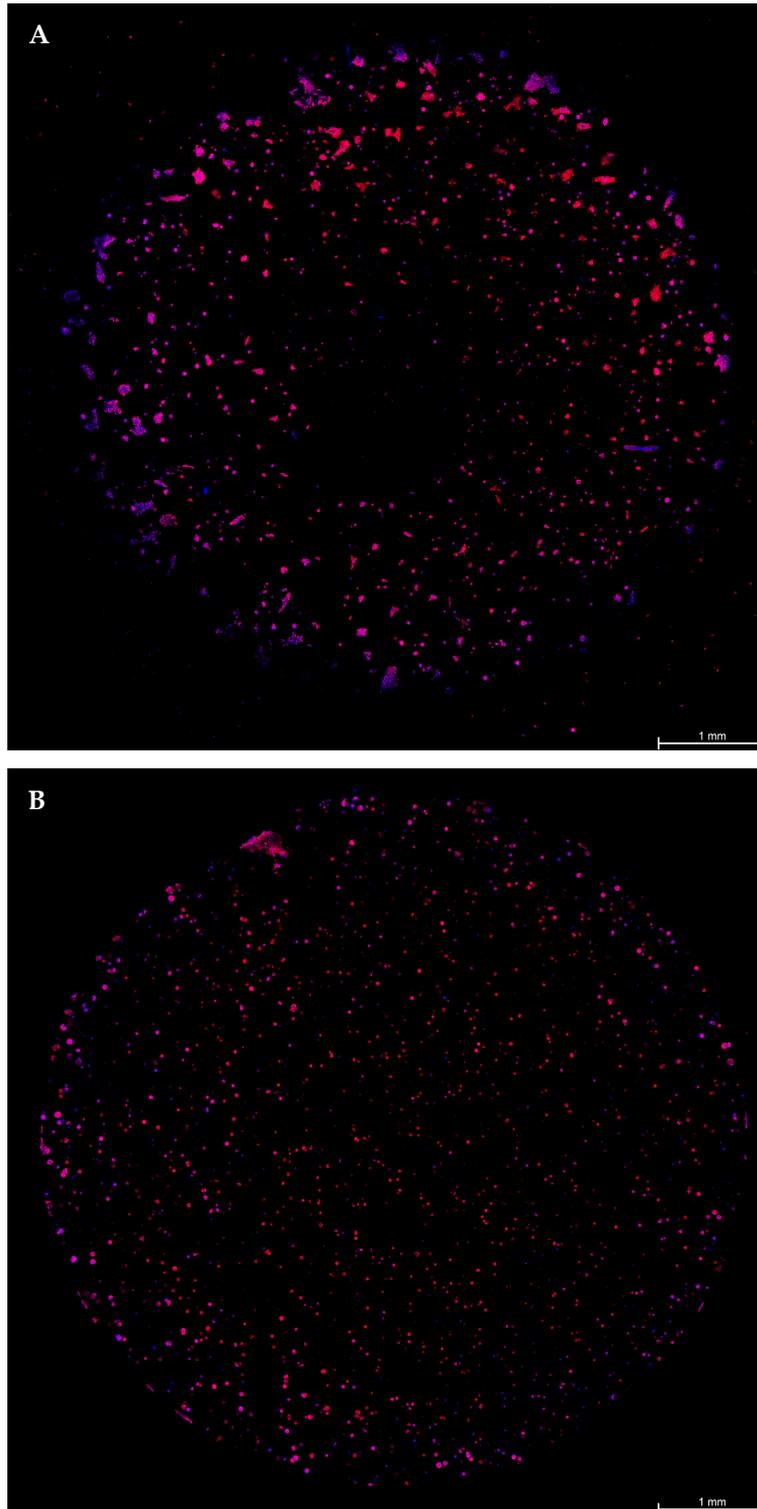


Abbildung 27: Übersichtsaufnahme eines 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 100 μm tiefer in der Probe liegende Schicht (B). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

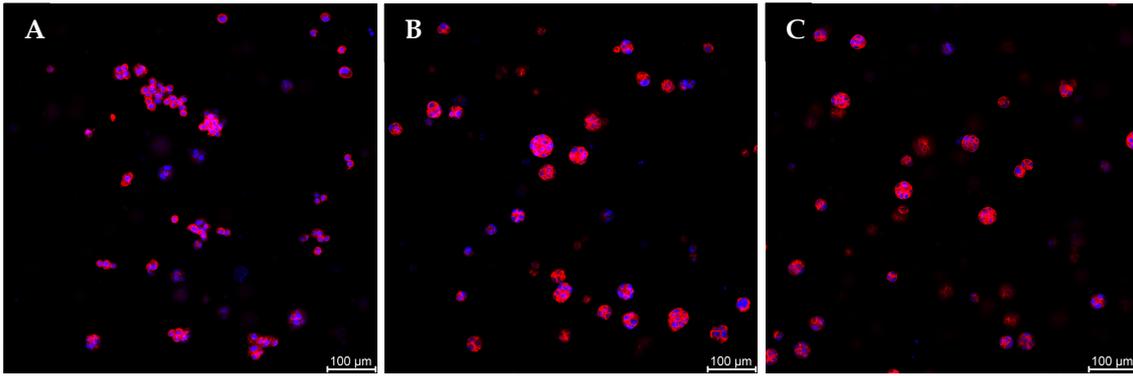


Abbildung 28: Detailaufnahmen eines 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 25 μm (B) bzw. 50 μm (C) tiefer in der Probe liegende Schicht. Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

4.4 GelAGE G2LH Hydrogele

Die Hydrogele der thermoresponsiven GelAGE Variante G2LH wurden unter Verwendung des Vernetzers PEG-4-SH als Thiol-Komponente und dem Photoinitiatorsystem Ru/SPS hergestellt. Die Vernetzung erfolgte dabei mit einem Abstand von 10 cm zur Lichtquelle und einer Belichtungszeit von 20 s.

4.4.1 Vitalität

Abbildungen 29 gibt einen Eindruck über die Morphologie der L929-Zellen in den GelAGE G2LH Hydrogelen. In allen Gruppen war über den gesamten Versuchszeitraum eine abgerundete Zellmorphologie zu beobachten. Es zeigten sich keine Zell-Material-Interaktionen, wie bspw. gespreizte Zellen. Allerdings muss dabei in Betracht gezogen werden, dass bei der Live/Dead Mikroskopie mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops (siehe 3.1.1) das Signal der nicht im Fokus liegenden Ebenen eine starke Signalüberlagerung verursacht. Informationen über eine abweichende Zellverteilung, bspw. auf der Probenoberfläche (siehe 4.4.4), können somit nur schwer dargestellt werden. An Tag 1 waren in den Proben ohne HPL deutlich mehr tote Zellen zu beobachten. Die Zellgröße war in den verschiedenen Gruppen von vergleichbarer Größe.

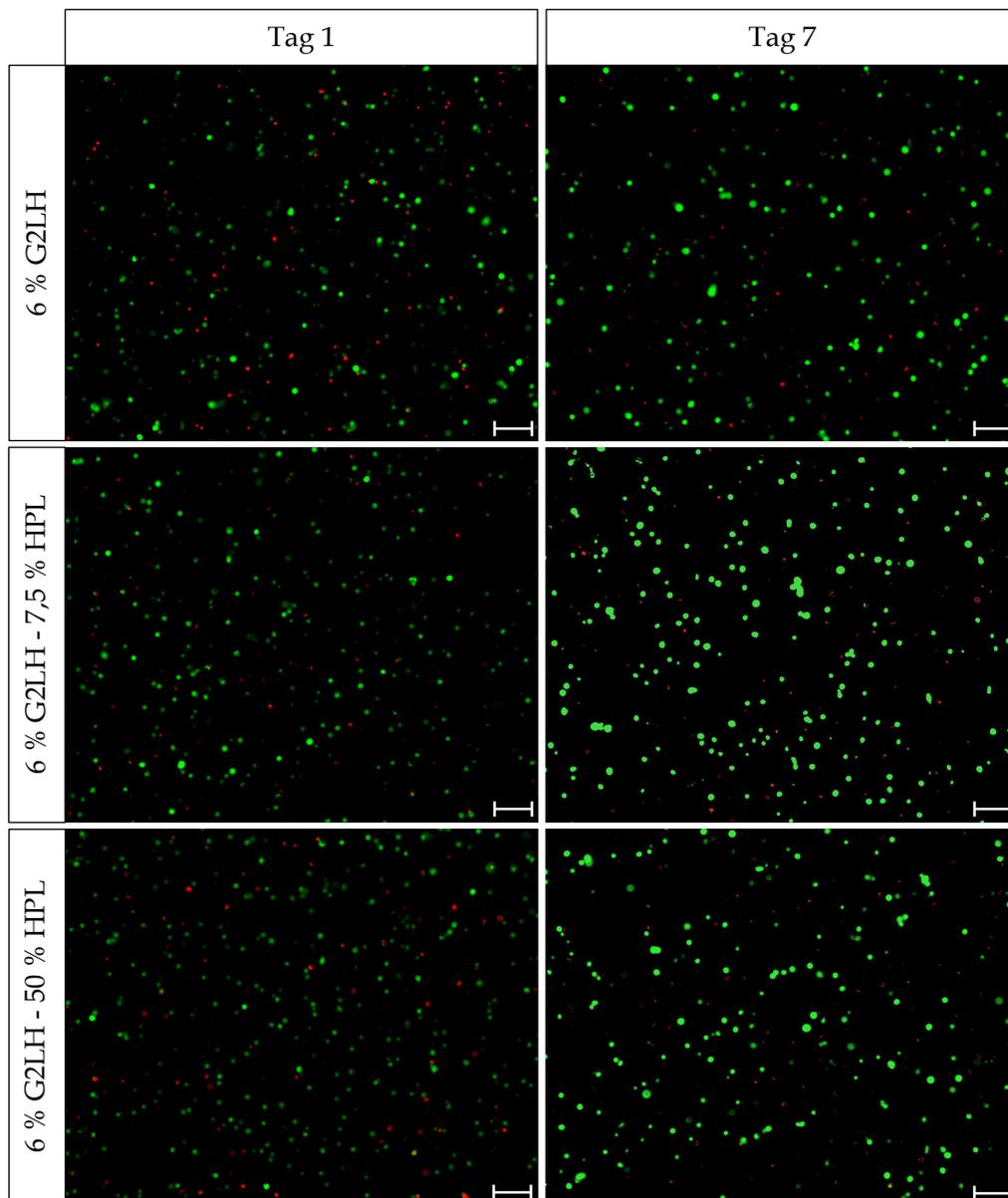


Abbildung 29: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in GelAGE G2LH Hydrogelen. Repräsentative Aufnahmen des Live/Dead Assays nach 1 bzw. 7 Tagen. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit EthD-1 rot. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

In Abbildung 30 ist der Verlauf der Vitalität dargestellt: Von Tag 1 zu Tag 4 zeigten die beiden Gruppen mit HPL eine tendenziell höhere Vitalität als die reinen G2LH Proben. Dabei war an Tag 1 mit $84 \pm 6 \%$ die höchste Vitalität in den Proben mit 50 % HPL zu beobachten. Die Hydrogele ohne HPL-Zusatz verzeichneten über die gesamte siebentägige Kultivierungsdauer die niedrigsten Werte. So wurden an Tag 1 $73 \pm 9 \%$ und an Tag 7 $67 \pm 8 \%$ erreicht. An Tag 4 war

ein deutlicher Unterschied zwischen 50 % und 7,5 % HPL-Zusatz zu erkennen. Von Tag 4 zu Tag 7 nahm die Vitalität in den Proben mit 50 % HPL jedoch sichtbar ab und lag dann wieder in einem ähnlichen Bereich der reinen G2LH Proben um 70 %. Im Gegensatz dazu stieg die Vitalität der 7,5 % HPL Hydrogele zum Ende des Beobachtungszeitraums deutlich auf 85 ± 5 % an.

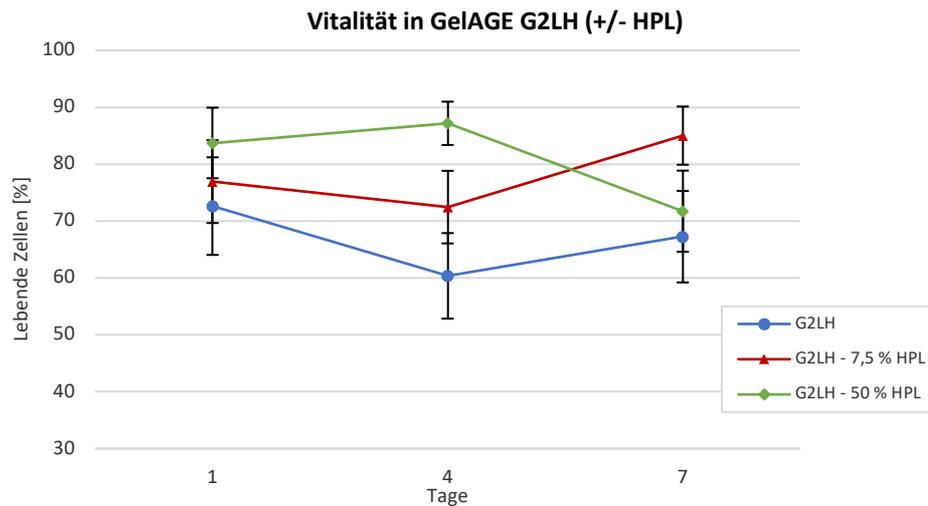


Abbildung 30: Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen. Die Zellvitalität wurde an Tag 1, 4 und 7 anhand der automatischen Auswertung des Live/Dead Assays in Fiji ermittelt und als das Verhältnis der lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl definiert.

4.4.2 DNA-Gehalt

Die Hydrogele wurden für 7 Tage *in vitro* Kultur genommen und der absolute DNA-Gehalt in der gesamten Probe zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. In Abbildung 31 ist der Verlauf dieser Messungen dargestellt: Der DNA-Gehalt nahm in allen Gruppen zu. Die Proben mit HPL zeigten an Tag 1 mit 1203 ± 38 ng (7,5 % HPL) bzw. 1172 ± 39 ng (50 % HPL) einen deutlich höheren DNA-Gehalt als die reinen G2LH Proben (627 ± 71 ng). Allerdings erfolgte in den Gruppen mit HPL-Zusatz während des Beobachtungszeitraums eine relativ geringe Zunahme an DNA. Obwohl die G2LH Proben ohne HPL mit etwa 50 % weniger DNA-Gehalt an Tag 1 starteten, zeigten somit alle drei Gruppen an Tag 7 Messwerte im Bereich von 1450 ng.

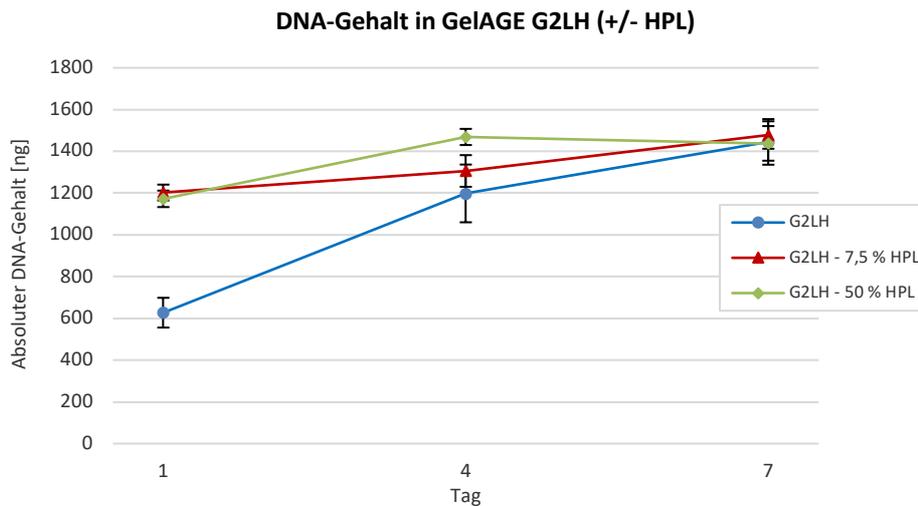


Abbildung 31: DNA-Gehalt von L929-Zellen in GelAGE G2LH Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur.

4.4.3 Metabolische Aktivität

Abbildung 32 zeigt die Messwerte für die metabolische Aktivität der L929-Zellen in GelAGE G2LH Hydrogelen an den Tagen 1, 4 und 7. Die Werte sind nicht absolut, sondern relativ und müssen daher in Bezug auf die Ergebnisse weiterer Zeitpunkte oder Gruppen betrachtet werden.

An Tag 1 waren mit steigender Konzentration an HPL auch höhere Messwerte zu beobachten, so dass die metabolische Aktivität bei $0,03 \pm 0,01$ (ohne HPL), $0,05 \pm 0,01$ (7,5 % HPL) bzw. $0,08 \pm 0,01$ (50 % HPL) lag. Von Tag 1 zu Tag 7 war in den Gruppen mit HPL-Zusatz eine kontinuierliche Zunahme der Messwerte zu beobachten. Dabei fiel auf, dass an Tag 4 alle Gruppen ähnliche Messwerte aufwiesen. Aufgrund der weiteren Zunahme zeigten die Proben mit HPL-Zusatz an Tag 7 die höchste metabolische Aktivität mit einem Wert um 0,1. Nur bei den reinen G2LH Proben war zwischen Tag 4 und Tag 7 eine Abnahme der Aktivität zu beobachten, welche an Tag 7 schließlich bei $0,07 \pm 0,01$ lag.

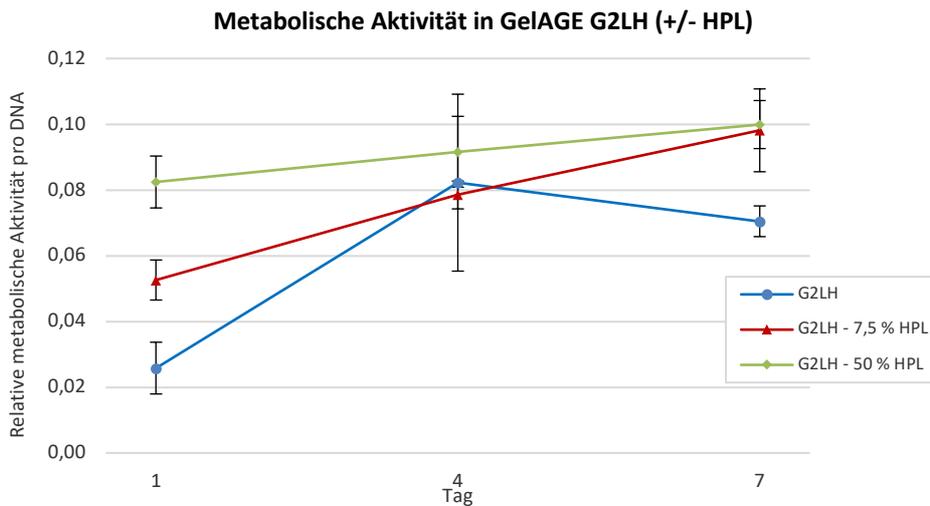


Abbildung 32: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen. Gemessen mit dem Cell Counting Kit-8 an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur. Die Werte sind relativ und müssen in Bezug auf die vorherige Zeitpunktmessung betrachtet werden. Die Normierung erfolgte auf den Gesamt-DNA-Gehalt.

4.4.4 Zellmorphologie

Die Übersichtsaufnahmen der Phalloidin-Färbung in Abbildung 33 und die Detailaufnahmen in Abbildung 34 zeigen die Morphologie und die Zellverteilung der L929-Zellen in den Hydrogelen, welche sich von den Beobachtungen der anderen Materialien erheblich unterscheiden. So zeigten sich auf der Hydrogeloberfläche große Felder netzartig zusammenhängender Zellen. Bei der detaillierten Betrachtung einzelner Zellen konnte man eine gespreizte Morphologie des Aktinzytoskeletts erkennen. Besonders auffällig war dieses Erscheinungsbild am Rand der Übersichtsaufnahme des Probeninneren zu erkennen (Abbildung 33 B). 100 µm tiefer im Inneren der Hydrogele zeigten die Zellen eine sichtbar geringere Zelldichte. Dabei wies die deutlich geringere Zellzahl eine rundliche Morphologie auf. Multiple Zellkerne, wie sie zuvor in den Alg-Gel und G1MM Proben vorzufinden waren, konnten nicht beobachtet werden.

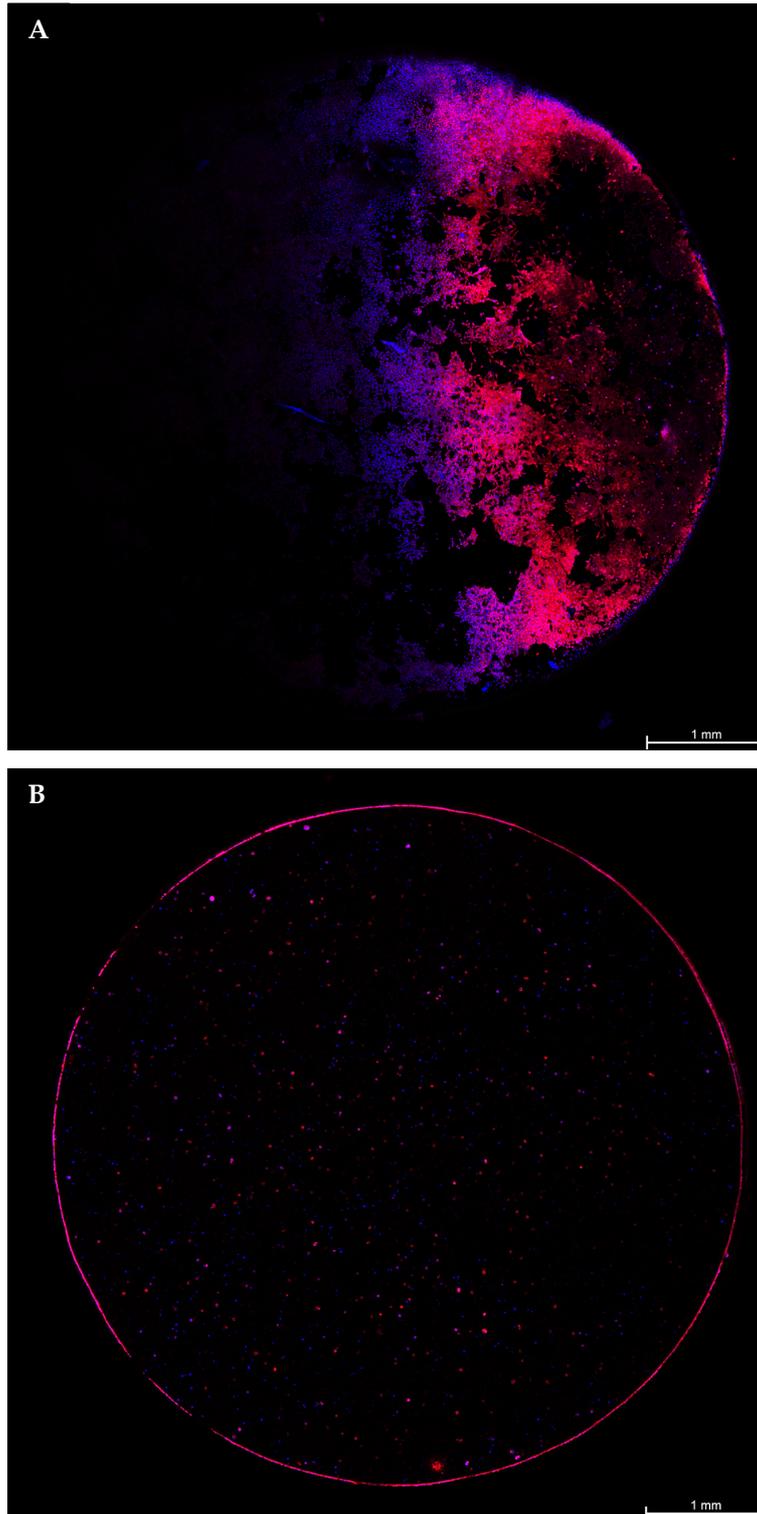


Abbildung 33: Übersichtsaufnahme eines 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 100 μm tiefer in der Probe liegende Schicht (B). Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 1 mm.

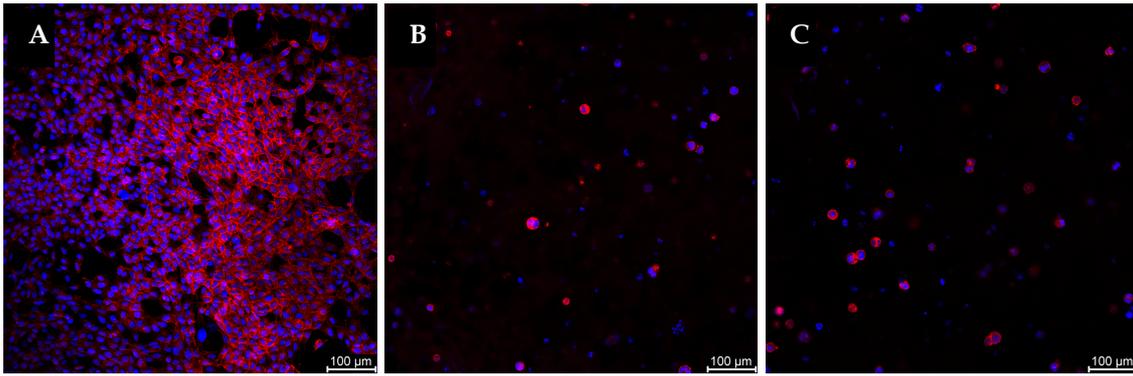


Abbildung 34: Detailaufnahmen eines 6 % (m/v) GelAGE G2LH (A-C) Hydrogels nach 7 Tagen *in vitro* Kultur. Die Fokussierung erfolgte zunächst auf die Probenoberfläche (A) und anschließend auf eine 25 µm (B) bzw. 50 µm (C) tiefer in der Probe liegende Schicht. Die Aktinfilamente des Zytoskeletts der L929-Zellen wurden mit Phalloidin (rot) angefärbt und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

5 Diskussion

Gegenstand dieser experimentellen Arbeit waren zwei Gelatine-basierte Hydrogelsysteme, welche unter anderem aufgrund zelladhäsiver Bindungssequenzen und einer der natürlichen extrazellulären Matrix ähnelnden 3D-Umgebung als vielversprechende Materialien für biomedizinische Anwendungen, wie den Biodruck, angesehen werden. Für die weitere Erforschung dieser Materialien sind Erkenntnisse aus *in vitro* Versuchen wichtig, die Rückschlüsse auf die Zytokompatibilität der untersuchten Materialien geben. So war das Ziel dieser Arbeit die biologische Evaluation des am Lehrstuhl synthetisierten und noch nicht vollständig charakterisierten Hydrogelsystems GelAGE und der Vergleich zu den im Feld der Biofabrikation sehr gut erforschten Alginat-Gelatine Biotinten.

5.1 Diskussion der Methodik

Obwohl heute viele verschiedene Biomaterialien als Biotinten verwendet werden, gibt es nach wie vor keine definierten Protokolle bzw. keine allgemein akzeptierte Vorgehensweise zur vergleichenden Bewertung ihrer Zytokompatibilität [119]. So wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden verwendet, um ein umfassendes Urteil über die allgemeine Zytokompatibilität eines Materials geben zu können.

Für die Qualitätskontrolle neuer Biomaterialien ist die Bestimmung der Zellvitalität ein zentraler Aspekt [108, 109]. Allerdings ist die Auswertung von Live/Dead Aufnahmen bei einem hohen Versuchsdurchlauf mit einem großen Zeitaufwand verbunden. Zudem ist eine standardisierte Vorgehensweise wichtig, um objektive und damit vergleichbare Ergebnisse zu generieren. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die zeitsparende automatische Auswertung eine berechtigte Alternative zur rein manuellen Auswertung von Live/Dead Aufnahmen darstellt (siehe 4.1.2). Für eine möglichst genaue Zellzählung war dabei die individuelle Anpassung von Helligkeit, Kontrast und Pixelgröße anhand manuell ausgezählter Beispielaufnahmen entscheidend. Darüber hinaus musste sichergestellt werden, dass repräsentative Aufnahmen

der Hydrogele angefertigt werden, da die Zellen in Konstrukten der 3D-Zellkultur teilweise eine inhomogene Verteilung aufweisen können und je nach Position unterschiedlich durch zelltoxische Faktoren beeinflusst werden. Die Auswahl repräsentativer Regionen in einer Probe ist allerdings der Subjektivität eines bestimmten Bedieners unterworfen. Detailliertere Informationen können durch die Aufnahme und Auswertung verschiedener optischer Schnitte (Z-Stacks) einer Probe gewonnen werden [108]. Allerdings stellt dies einen deutlich höheren Zeitaufwand dar und muss durch eine Bildgebung mittels Konfokalmikroskopie erfolgen (siehe 4.2.4, 4.3.4 und 4.4.4). Abschließend kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit die automatische Bestimmung der Vitalität als valide Methode etabliert und somit eine effiziente Auswertung ermöglicht wurde. Wünschenswert wäre, dass in ähnlichen Ansätzen der biologischen Evaluation von Biomaterialien klar offengelegt wird, unter welchen Bedingungen die Auswertung der Vitalität erfolgte, um entsprechende Ergebnisse nachvollziehbar miteinander vergleichen zu können. Die Bestimmung des DNA-Gehalts und der CCK-8-Assay zur Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität zeigten sich als sinnvolle Methoden, um weitere Rückschlüsse auf die zelluläre Gesundheit zu ziehen. Dabei waren beide Untersuchungsmethoden in der Lage, die Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen zu quantifizieren und eine rein objektive Bewertung für die gesamte Probe zu liefern, weshalb eine Kombination mit der Live/Dead Färbung als sinnvoll erschien. Allerdings könnten Fehler durch den Anwender schnell zu falschen Ergebnissen führen: So mussten bspw. die Proben nach dem Papainaseverdau stets auf einen vollständigen Verdau der Hydrogelkonstrukte kontrolliert werden.

Neben der Live/Dead Färbung wurde zur direkten Visualisierung der Zellen ein Protokoll zur Darstellung des Aktinzytoskeletts von Zellen in Hydrogelen etabliert (siehe 3.2.6). Das bitykliche Peptid Phalloidin wurde dabei für die Darstellung der Aktinfilamente der Zellen eingesetzt, um anhand der Zellmorphologie Rückschlüsse auf unterschiedliche Zell-Material-Interaktionen ziehen zu können. Durch die Kombination dieser Färbung mit der

Konfokalbildgebung war es zudem möglich eine regional unterschiedliche Zellmorphologie und Zellverteilung abzubilden.

5.2 Etablierung des Hydrogelsystems GelAGE für weitere Versuche

Thiol-En vernetzende Gelatine bietet aufgrund vielfältiger Vorteile, wie der hohen Reaktionsgeschwindigkeit oder der homogenen Vernetzung, ein großes Potenzial für Anwendungen in den Polymerwissenschaften [94]. Allerdings gibt es über das Hydrogelsystem GelAGE noch zu wenig Vorwissen über die Handhabung und Durchführung biologischer Experimente mit eingekapselten Zellen. So musste zu Beginn der vorliegenden Arbeit ein Versuchsaufbau etabliert werden, welcher das sterile Arbeiten mit dem Material GelAGE ermöglicht und ein initiales Überleben von Zellen über die Probenherstellung hinaus gewährleistet. Ein Abstand von 10 cm zur Lichtquelle und eine Belichtungsdauer von 20 s zeigten sich als adäquate Einstellungen für die Vernetzungsreaktion. Weiterhin mussten die hergestellten Proben eine ausreichende Formstabilität über die gesamte Versuchsdauer von 7 Tagen aufweisen, um die Durchführbarkeit der verschiedenen Analysemethoden zu gewährleisten. Gerade auch im Hinblick auf eine spätere Verwendung im Biodruck ist eine gewisse mechanische Stabilität nicht zu vernachlässigen. So wurde für GelAGE eine Polymerkonzentration von 6 % (m/v) ermittelt, welche den Anforderungen an mechanischer Stabilität gerecht werden konnte (siehe 4.1.1). Um die in der Literatur aufgestellte These, dass niedrige Polymerkonzentrationen mit einer höheren Zytokompatibilität einhergehen [10, 58, 79, 122] zu bestätigen, wurde weiterhin eine Materialgruppe mit 15 % (m/v) Polymergehalt untersucht.

Aufgrund der Beobachtungen am FMZ mit dem Material GelAGE wurde das Auswandern von Zellen aus den Hydrogelen genauer untersucht (siehe 4.1.3). Dabei wurde festgestellt, dass nur am ersten Tag in Kultur eine nennenswerte Zellzahl außerhalb der Proben festzustellen war. Da diese Zellen jedoch sofort nach Kultivierung der Proben im Medium schwimmend vorzufinden waren, kann man davon ausgehen, dass die Zellen nicht aus den Konstrukten

abwanderten, sondern von der Probenoberfläche abgewaschen wurden bzw. direkt nach Kontakt mit dem Zellmedium abfielen. Der Vergleich des Gesamt-DNA-Gehalts der aus den GelAGE Hydrogelen abgewanderten Zellen mit dem DNA-Gehalt in den Proben zeigte, dass nur ein sehr geringer Anteil der Gesamtzellzahl außerhalb der Hydrogele aufzufinden war (Abbildung 14). Somit konnte nachgewiesen werden, dass ein Auswandern von L929-Fibroblasten aus GelAGE Hydrogelen kein grundlegendes Problem darstellt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Herstellungsprotokoll für das Material GelAGE erfolgreich etabliert werden konnte, welches eine Grundlage für die Durchführung weiterer biologischer Experimente bietet.

5.3 Vergleich der verschiedenen Hydrogelmateriale

5.3.1 Vergleich Alginate-Gelatine und GelAGE

Um die Zytokompatibilität der verschiedenen Materialien zu untersuchen, wurden L929-Zellen für 7 Tage *in vitro* kultiviert und mittels Live/Dead Färbung, DNA-Assay, CCK-8-Assay zur Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität und Phalloidin-Färbung für die Darstellung des Aktinzytoskeletts analysiert. Die Diskussion der Ergebnisse zur Modifikation mit Humanem Plättchenlysat (HPL) findet sich unter 5.3.2.

Zellvitalität

Wie in den Abbildungen 17, 24, und 30 dargestellt und in der Tabelle 11 zusammengefasst, variierte die Zellvitalität nicht nur über die Zeit, sondern auch in Abhängigkeit von dem verwendeten Hydrogelmateriale. Allgemeine Vitalitätsverluste können bspw. durch die Wärmeentwicklung der Lampe, toxische Substanzen in der Hydrogelzusammensetzung, einer limitierten Nährstoffzufuhr oder mechanische Belastung, während der Probenherstellung, bedingt sein [4, 79]. Bei einer anhaltend hohen Vitalität beeinflussen diese Faktoren nur in einem geringen Maße die Lebensfähigkeit der Zellen. Dabei ist

die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit ein zentraler Parameter für den erfolgreichen Einsatz von Hydrogelen als Zelltransportmedium [123].

Besonders auffällig war, dass die beiden Alginate-Gelatine Gruppen sowohl zu Beginn als auch am Ende des Beobachtungszeitraums die höchsten Vitalitätswerte verzeichneten. Nur die 6 % (m/v) G1MM Proben (nicht-thermoresponsives GelAGE) konnten durch eine Zunahme der Vitalität an Tag 7 Werte in einem ähnlichen Bereich erreichen. Die höher konzentrierten 15 % (m/v) G1MM Proben zeigten, ähnlich wie die G2LH Proben (thermoresponsives GelAGE), sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 das niedrigste Verhältnis an lebenden Zellen. Diese Beobachtungen sind auch rein optisch in den mikroskopischen Aufnahmen der Live/Dead Färbung zu erkennen (siehe Abbildungen 15, 16, 23 und 29). Diese Aufnahmen zeigen zudem eine rundliche Zellmorphologie in allen Gruppen und über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Tabelle 11: Übersicht der gemittelten Vitalitätswerte. Tag 1 und Tag 7 Werte für Alginate-Gelatine (mit und ohne TG Nachvernetzung), 6 % (m/v) GelAGE G1MM, 15 % (m/v) GelAGE G1MM und 6 % (m/v) GelAGE G2LH.

	Alg-Gel	Alg-Gel TG	6 % G1MM	15 % G1MM	6 % G2LH
Tag 1	90 ± 4 %	91 ± 4 %	78 ± 6 %	67 ± 6 %	73 ± 9 %
Tag 7	88 ± 5 %	86 ± 5 %	83 ± 6 %	66 ± 8 %	67 ± 8 %

Ein Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit bekannten Daten aus der Literatur wird durch die hohe Abweichung der verschiedenen Chargen und den Einsatz unterschiedlicher Zellarten erschwert. Darüber hinaus lassen die verschiedenen Parameter der GelAGE Synthese (Reaktionsdauer, NaOH-Konzentration, AGE-Konzentration; siehe Tabelle 1) eine große Variation von Materialien unter dem Namen GelAGE zu. Am besten lassen sich die hier vorliegenden 6 % (m/v) G1MM Daten (1/10 mM Ru/SPS, PEG-4-SH) mit der Arbeit von Bertlein *et al.* 2017 [18] vergleichen: Dabei wurde eine Vitalität von HACs (Humane Chondrozyten aus dem Gelenk) von über 90 % an Tag 1 und knapp unter 90 % an Tag 7 beobachtet. Die dabei verwendeten Hydrogele bestanden aus

20 Gew.-% G1MM, 1/10 mM Ru/SPS und DTT als Vernetzer (Allyl-Thiol Verhältnis 1:1,5). In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Vitalitäten mit L929-Fibroblasten erreicht werden.

DNA-Gehalt

Wie in den Abbildungen 18, 25 und 31 dargestellt und in der Tabelle 12 zusammengefasst, nahm in allen Testgruppen der absolute DNA-Gehalt von Tag 1 auf Tag 7 zu. Besonders auffällig waren dabei die schon an Tag 1 stark unterschiedlichen Werte in den verschiedenen Gruppen. Durch die Messung des absoluten DNA-Gehalts direkt nach Probenherstellung (siehe Abbildung 12) konnte die Vergleichbarkeit der zwei verschiedenen Hydrogelsysteme nachgewiesen werden. Die Proben wurden demnach trotz unterschiedlicher Pipettiereigenschaften mit einer nahezu identischen Zellkonzentration versehen. Die deutlichen Differenzen im DNA-Gehalt an Tag 1 könnten durch eine initial höhere Zellteilungsrate in den Alginate-Gelatine Hydrogelen begründet werden, worauf auch das Vorliegen von hantelförmigen Zellpaaren (siehe Abbildung 15: Alg-Gel, Tag 1) hindeutet. Auch innerhalb der verschiedenen GelAGE-Materialien waren deutliche Unterschiede an Tag 1 zu beobachten: So zeigten die G2LH Proben den niedrigsten DNA-Gehalt aller Testgruppen. Von Tag 1 zu Tag 7 näherten sich die Messwerte der verschiedenen Gruppen allmählich an, wobei die größte relative Zunahme am DNA-Gehalt in der G2LH Gruppe zu beobachten war. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu der sinkenden Vitalität in den G2LH Proben von Tag 1 zu Tag 7. Obwohl in den Alginate-Gelatine Gruppen nur eine geringe Zunahme des DNA-Gehalts zu verzeichnen war, wiesen die beiden Gruppen auch an Tag 7 die Höchstwerte auf. Demzufolge bot das Material Alginate-Gelatine den L929-Zellen die besten Voraussetzungen zur Zellproliferation. Der niedrige DNA-Gehalt in den 15 % (m/v) G1MM Hydrogelen bestätigte die in den Live/Dead Aufnahmen erkennbare niedrige Vitalität.

Tabelle 12: Übersicht der gemittelten absoluten DNA-Gehalte. DNA-Gehalt von L929-Zellen in Alginate-Gelatine (mit und ohne TG Nachvernetzung), 6 % (m/v) GelAGE G1MM, 15 % (m/v) GelAGE G1MM und 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur.

	Alg-Gel	Alg-Gel TG	6 % G1MM	15 % G1MM	6 % G2LH
Tag 1	1373 ± 39 ng	1323 ± 85 ng	867 ± 41 ng	927 ± 4 ng	627 ± 71 ng
Tag 7	1651 ± 81 ng	1632 ± 28 ng	1406 ± 67 ng	1139 ± 16 ng	1445 ± 109 ng

Bertlein *et al.* 2017 [18] und Soliman *et al.* 2020 [19] beschränkten sich bei ihrer biologischen Evaluation auf die Analyse der Zellvitalität, der metabolischen Aktivität und der Zellmorphologie. Daher fehlen vergleichbare Daten zum DNA-Gehalt von in GelAGE eingebrachten Zellen.

Metabolische Aktivität

Die Bestimmung der zellulären Stoffwechselaktivität mittels CCK-8-Assay ermöglichte weitere Rückschlüsse auf die Gesundheit der Zellen. In fast allen Gruppen war über den Versuchszeitraum eine Zunahme der metabolischen Aktivität zu beobachten (siehe Abbildung 19, 26 und 32). In der Gruppe der 6 % (m/v) G1MM Hydrogele betrug diese Erhöhung von Tag 1 auf Tag 7 etwa 160 %. Nur die 15 % (m/v) G1MM Proben zeigten einen Rückgang von Tag 1 auf Tag 7. Dies deutete darauf hin, dass die Zellen in der Umgebung dieser höheren Polymerkonzentration nicht so vital waren, wie in den anderen Materialien. Dadurch konnten die vorangegangenen Beobachtungen aus Live/Dead und DNA-Assay zu den 15 % (m/v) Hydrogelen bestätigt werden. Die relative Zunahme der metabolischen Aktivität in den Alginate-Gelatine (ohne Transglutaminase-Nachvernetzung), 6 % (m/v) G1MM und G2LH Proben erfolgte in einer vergleichbaren Größenordnung, allerdings mit einem individuell unterschiedlichen Verlauf über Tag 4. Die Alginate-Gelatine Proben mit Transglutaminase-Nachvernetzung zeigten zwar eine zunehmende Stoffwechselaktivität, welche sich jedoch nur in einem geringeren Ausmaß steigerte.

Bertlein *et al.* 2017 [18] und Soliman *et al.* 2020 [19] verwendeten in ihren GelAGE Studien den Resazurin basierten alamarBlue Assay zur Bestimmung der

metabolischen Aktivität von HACs. Bertlein *et al.* berichteten eine Zunahme der metabolischen Aktivität in 20 Gew.-% G1MM Hydrogelen von etwa 35 % von Tag 1 zu Tag 7. Im Gegensatz dazu beobachteten Soliman *et al.* einen stabilen Verlauf der metabolischen Aktivität in ihren 10 Gew.-% GelAGE Konstrukten. Bei den L929-Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit war demnach eine höhere relative Zunahme zu beobachten, wobei unklar ist, inwiefern eine unterschiedliche Normierung der Messwerte den Vergleich der Ergebnisse dieser verschiedenen Arbeiten beeinflusst.

Zellmorphologie

Die mikroskopischen Aufnahmen der Live/Dead Färbung geben einen ersten Anhaltspunkt über die Morphologie der Zellen in den Hydrogelen. Die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Umgebung über Zelladhäsionsmoleküle, wie bspw. Integrine, beeinflusst jedoch vor allem die individuelle Ausbildung des Zytoskeletts [124], welches durch die Phalloidin-Färbung dargestellt werden konnte.

Im Inneren der Proben zeigten die Zellen stets eine rundliche Morphologie. Auffällig war dabei, dass in den Alginate-Gelatine und G1MM Proben clusterartige Zellaggregate und multiple Zellkerne zu beobachten waren. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Kontaktbeziehungen zwischen den Zellen der vermeintlich schwachen Zell-Material-Interaktion überwiegen. Grundsätzlich besitzt Gelatine jedoch zelladhäsive Bindungsstellen, welche ein spreizendes Wachstum der Zellen ermöglichen [68].

Besonders auffällig war die unterschiedliche Zellverteilung und das multiforme Erscheinungsbild auf den Oberflächen der Hydrogele: So zeigte sich auf den mit Transglutaminase nachvernetzten Alg-Gel Proben eine gespreizte Morphologie, während sich auf den G1MM Proben nestartige Strukturen aus vielen kleinen rundlichen Zellen bildeten. Auf den G2LH Hydrogelen zeigten sich hingegen besonders auffällig große Felder von netzartig zusammenhängenden Zellen, welche im Einzelnen eine gespreizte Morphologie aufwiesen. Dies legt die Vermutung nahe, dass den Zellen sowohl auf der Oberfläche der nachvernetzten Alg-Gel als auch der

G2LH Hydrogele vermehrt Bindungssequenzen zur Verfügung stehen und die Gelatine somit in beiden Materialien länger im Hydrogel gebunden bleibt.

Diese auf die Probenoberfläche konzentrierte erhöhte Proliferation wurde auch von Bedell *et al.* 2020 [119] über MSCs (Mesenchymale Stammzellen) in GelMA berichtet. Soliman *et al.* 2020 [19] zeigten sowohl rundlich geformte MSCs in 3 Gew.-% GelAGE Konstrukten als auch eine gespreizte Zellmorphologie in 5 Gew.-% GelAGE Proben. Die Beobachtung über MSCs aus diesen beiden Arbeiten konnte demnach teilweise auch mit L929-Fibroblasten bestätigt werden.

5.3.2 Einfluss von HPL auf das Zellverhalten von Fibroblasten

Die Hydrogeleigenschaften eines bestimmten Polymers können durch die Ergänzung mit weiteren Zusatzstoffen optimiert werden. Humanes Plättchenlysat (HPL) enthält viele bioaktive Substanzen wie verschiedene Wachstumsfaktoren und biochemische Signalstoffe, welche das Zellwachstum in der 2D- und 3D-Kultur unterstützen [64]. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Zugabe von HPL einen materialabhängigen Einfluss auf das Zellverhalten der L929-Zellen.

Alginate-Gelatine

In der Live-dead Färbung der Alginate-Gelatine Hydrogele erschienen die Zellen in den Proben mit HPL deutlich vergrößert (siehe Abbildung 15 und 16). Allerdings konnten keine positiven Veränderungen der Werte für Vitalität oder DNA-Gehalt verzeichnet werden. Nur im CCK-8-Assay der Proben mit Transglutaminase-Nachvernetzung konnten an Tag 1 und Tag 7 eine höhere metabolische Aktivität im Vergleich zu den Proben ohne HPL festgestellt werden (Abbildung 19).

GelAGE G1MM

In den G1MM Proben stieg durch den HPL-Zusatz die Vitalität an Tag 4, so dass das Verhältnis der lebenden Zellen von Tag 1 auf Tag 4 zunahm, statt sich zu verringern (Abbildung 24). Am auffälligsten war jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum die Erhöhung des DNA-Gehalts mit steigender HPL-

Konzentration (Abbildung 25). So konnten in den 6 % (m/v) G1MM Hydrogelen mit 50 % HPL-Zusatz zu allen drei Messzeitpunkten deutlich höhere Werte für den DNA-Gehalt erreicht werden als ohne HPL-Zusatz. Diese betragen 1194 ± 33 ng an Tag 1, 1507 ± 11 ng an Tag 4 und 1649 ± 31 ng an Tag 7. An Tag 7 lag der absolute DNA-Gehalt somit auf demselben Niveau wie in den Alginate-Gelatine Proben (1651 ± 81 ng an Tag 7). Diese positive Einflussnahme zeigte sich zu dem an Tag 4 und Tag 7 in einer gesteigerten metabolischen Aktivität (Abbildung 26).

GelAGE G2LH

In den G2LH Proben mit HPL zeigten sich an Tag 1 und Tag 4 ähnlich gesteigerte Vitalitätswerte wie in den G1MM Hydrogelen (Abbildung 30). Allerdings war in der G2LH Gruppe mit 50 % HPL-Zusatz ein stärkeres Absinken der Vitalität (87 ± 4 % an Tag 4 auf 72 ± 7 % an Tag 7) als in den G1MM Proben mit 50 % HPL-Zusatz zu beobachten.

Am auffälligsten war der an Tag 1 deutlich gesteigerte DNA-Gehalt in den beiden HPL Gruppen (siehe Abbildung 31 und Tabelle 13). Dieser lag bei der 7,5 % HPL Gruppe mit 1203 ± 38 ng über dem Wert der G1MM 7,5 % HPL Proben und konnte sich damit ebenfalls an die hohen Tag 1 DNA-Werte der Alginate-Gelatine Hydrogele nähern (siehe Tabelle 13). Allerdings erfolgte in den G2LH Proben von Tag 1 zu Tag 7 nur eine geringe Zunahme des DNA-Gehalts, so dass sich die Werte an Tag 7 im Vergleich zu den G2LH Proben ohne HPL nur noch geringfügig unterschieden. Im CCK-8-Assay zeigten sich an Tag 1 und Tag 7 in den G2LH Gruppen mit HPL gegenüber den Proben ohne HPL-Zusatz eine gesteigerte metabolische Aktivität (siehe Abbildung 32).

Tabelle 13: Übersicht der gemittelten absoluten DNA-Gehalte bei HPL-Zusatz. DNA-Gehalt von L929-Zellen in Alginat-Gelatine, 6 % (m/v) GelAGE G1MM und 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen. Gemessen mit dem PicoGreen-DNA-Assay an Tag 1, 4 und 7 *in vitro* Kultur.

	6 % G1MM	6 % G1MM (7,5 % HPL)	6 % G1MM (50 % HPL)	Alg-Gel
Tag 1	867 ± 41 ng	1057 ± 46 ng	1193 ± 33 ng	1373 ± 39 ng
Tag 7	1406 ± 67 ng	1478 ± 67 ng	1649 ± 31 ng	1651 ± 81 ng

	6 % G2LH	6 % G2LH (7,5 % HPL)	6 % G2LH (50 % HPL)
Tag 1	627 ± 71 ng	1203 ± 38 ng	1172 ± 40 ng
Tag 7	1445 ± 109 ng	1478 ± 66 ng	1438 ± 83 ng

Schon in verschiedenen Studien konnte ein positiver Effekt von HPL auf das Zellverhalten in Hydrogelen nachgewiesen werden [60-65]. So berichteten Kirsch *et al.* 2019 [60] eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Proliferation und osteogenen Differenzierung von MSCs in GelMA Hydrogelen. Weiterhin zeigten Babo *et al.* 2017 [62] eine proportional steigende Vitalität und metabolische Aktivität von hPDLFs (Humane Fibroblasten des Zahnhalteapparates) in mit HPL modifizierten Methacrylat-Hyaluronsäure Hydrogelen.

Die Erkenntnisse aus der Literatur, dass HPL in Hydrogelen einen positiven Effekt auf das Zellverhalten besitzt, konnten demnach nur teilweise bestätigt werden. Dennoch liefern vor allem die Ergebnisse der G1MM Proben interessante Anhaltspunkte zur Modifikation und Optimierung von Hydrogelmateriale durch weitere Zusatzstoffe.

5.3.3 Fazit und Ausblick

Auf Basis der durchgeführten Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass das Polymer GelAGE zwar als zytokompatibel bewertet werden kann, es jedoch nicht die Qualität des Alginat-Gelatine Hydrogelsystems aufweist. Allerdings lassen sich die Eigenschaften der GelAGE Proben teilweise durch eine Modifikation mit Humanem Plättchenlysat (HPL) verbessern. Innerhalb des Materials GelAGE stellten die 6 % (m/v) G1MM Proben die zellfreundlichste Variante dar und waren damit sowohl dem thermoresponsiven G2LH als auch den höheren Polymerkonzentrationen überlegen. Wie jedoch in der Einleitung erwähnt (Kapitel 2.4.4.2) benötigt der Extrusions-basierte Biodruck, als

Biodruckverfahren mit der größten klinischen Relevanz, Biotinten mit einer ausreichend hohen Viskosität oder thermoresponsiven Eigenschaften. Daher wäre eine hohe Zytokompatibilität vor allem für das G2LH wünschenswert.

Auffällig war, dass die L929-Zellen nur in den zwei Materialien Alginat-Gelatine mit Transglutaminase-Nachvernetzung und GelAGE G2LH, also bei einer erhöhten Netzwerkdicke, eine optisch bemerkbare Interaktion mit dem Hydrogelmaterial eingingen. Diese durch eine Abweichung von der sonst abgerundeten Zellmorphologie gekennzeichnete Beobachtung beschränkte sich zudem auf die Oberfläche der Proben. Dadurch könnte GelAGE G2LH ein interessanter Kandidat für die Anwendung in Form von Mikrogelen sein. Dabei handelt es sich um Partikel mit einer Größe von einigen Nanometern bis Mikrometern, welche bspw. für die Krebstherapie verwendet werden sollen [125]. Aufgrund der mathematischen Beziehung zwischen Oberfläche und Volumen würde bei einer sehr hohen Zahl von Konstrukten mit einer geringen Größe das Zellverhalten auf der Probenoberfläche stärker ins Gewicht fallen.

Da es sich bei den verwendeten L929-Zellen um eine Zelllinie handelt, könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit einem klinisch relevanteren Zelltyp, wie bspw. mesenchymalen Stammzellen (MSCs) oder Chondrozyten (HACs), bestätigt werden. Dabei wäre, auch im Hinblick auf eine mögliche Untersuchung der Differenzierung von MSCs, eine Kultivierungsdauer von 21 statt 7 Tagen interessant. Darüber hinaus wäre die weiterführende Optimierung des hier untersuchten GelAGEs sowohl durch einen Austausch der verwendeten Photoinitiatoren oder Vernetzern als auch durch eine Reduktion deren Konzentrationen denkbar. Potentielle Kandidaten hierfür wären LAP als Photoinitiator oder Thiolierte Hyaluronsäure (HA-SH) als alternatives Vernetzungsmittel. Die Erkenntnisse über den Einfluss von HPL auf das Zellverhalten legen zudem eine Untersuchung anderer bioaktiver Zusatzstoffe wie bspw. Fibronectin nahe.

6 Zusammenfassung

Hydrogele stehen als Material für den 3D-Biodruck zunehmend im Fokus aktueller Forschung, da sie aufgrund ihrer wasserhaltigen Struktur optimale Voraussetzungen für Anwendungen der Zellkultur aufweisen. Durch die Verarbeitung solcher Biotinten mittels additiver Fertigungstechniken der Biofabrikation erhofft man sich in Zukunft beschädigtes oder krankes Gewebe zu heilen oder zu ersetzen. Allerdings wird der Fortschritt in diesem Bereich immer noch durch einen Mangel an geeigneten Materialien gebremst, weshalb die Entwicklung und die Evaluation neuer Biotinten von zentraler Bedeutung sind. Das Polymer GelAGE ist ein am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg synthetisiertes Gelatine-basiertes Hydrogelsystem. Zu diesem über eine Thiol-En Reaktion vernetzenden Material stehen systematische Untersuchungen der für die *in vitro* Zellkultur relevanten Eigenschaften noch aus. Das Ziel dieser Arbeit war daher die biologische Evaluation von GelAGE und der Vergleich mit den im Feld der Biofabrikation sehr gut erforschten Alginate-Gelatine Biotinten. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Modifikation der Hydrogelzusammensetzung mit Humanem Plättchenlysat (HPL) zu einer Optimierung der biologischen Eigenschaften führt.

Zu diesem Zweck wurden L929-Zellen, eine aus dem subkutanen Bindegewebe von Mäusen isolierte Fibroblasten-Zelllinie, für 7 Tage in verschiedenen Hydrogelzusammensetzungen *in vitro* kultiviert. Um die zytokompatiblen Eigenschaften in den verschiedenen Versuchsgruppen zu untersuchen, wurden die Proben mittels der *in vitro* Testverfahren Live/Dead Färbung, DNA-Assay, CCK-8-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und Phalloidin-Färbung zur Darstellung des Aktinzytoskeletts und der Zellverteilung analysiert.

In den Vorversuchen dieser Arbeit konnte mit einem Makro in Fiji die automatische Bestimmung der Vitalität anhand mikroskopischer Aufnahmen als valide Methode bestätigt und eine effiziente Auswertung in den anschließenden Versuchen ermöglicht werden. Des Weiteren konnte ein Herstellungsprotokoll für das Material GelAGE etabliert werden, welches eine Grundlage für die Durchführung weiterer biologischer Experimente bietet. Das Resultat der biologischen Untersuchungen war, dass das Polymer GelAGE zwar als zytokompatibel bewertet werden kann, es jedoch nicht die Qualität des Alginate-Gelatine Hydrogelsystems aufweist. Allerdings konnten die Eigenschaften der GelAGE Proben teilweise durch eine Modifikation mit Humanem Plättchenlysat (HPL) verbessert werden. Die in der Literatur aufgestellte These, dass niedrige Polymerkonzentrationen mit einer höheren Zytokompatibilität einhergehen, wurde bestätigt. Außerdem konnten deutliche Unterschiede in der Zell-Material-Interaktion zwischen der thermoresponsiven (G2LH) und der nicht-thermoresponsiven (G1MM) GelAGE Variante nachgewiesen werden. Eine optisch bemerkbare Interaktion mit dem Hydrogelmateriale beschränkte sich auf die Oberfläche der G2LH Proben, wodurch eine Anwendung in Form von Mikrogelen denkbar wäre.

7 Literaturverzeichnis

1. Vijayavenkataraman, S., W.C. Yan, W.F. Lu, C.H. Wang, and J.Y.H. Fuh, *3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018. **132**: p. 296-332.
2. Eurotransplant International Foundation, *Annual Report 2019*. 2020.
3. Nguyen, D., D.A. Hagg, A. Forsman, J. Ekholm, P. Nimkingratana, C. Brantsing, T. Kalogeropoulos, S. Zaunz, S. Concaro, M. Brittberg, A. Lindahl, P. Gatenholm, A. Enejder, and S. Simonsson, *Cartilage Tissue Engineering by the 3D Bioprinting of iPS Cells in a Nanocellulose/Alginate Bioink*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 658.
4. Lee, C., C.D. O'Connell, C. Onofrillo, P.F.M. Choong, C. Di Bella, and S. Duchi, *Human articular cartilage repair: Sources and detection of cytotoxicity and genotoxicity in photo-crosslinkable hydrogel bioscaffolds*. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2019. **9**(3): p. 302-315.
5. Slaughter, B.V., S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, and N.A. Peppas, *Hydrogels in regenerative medicine*. *Adv Mater*, 2009. **21**(32-33): p. 3307-3329.
6. Melchels, F.P.W., M.A.N. Domingos, T.J. Klein, J. Malda, P.J. Bartolo, and D.W. Hutmacher, *Additive manufacturing of tissues and organs*. *Progress in Polymer Science*, 2012. **37**(8): p. 1079-1104.
7. Malda, J., J. Visser, F.P. Melchels, T. Jungst, W.E. Hennink, W.J. Dhert, J. Groll, and D.W. Hutmacher, *25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication*. *Adv Mater*, 2013. **25**(36): p. 5011-5028.
8. Jungst, T., W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, and J. Groll, *Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels*. *Chemical Reviews*, 2015. **116**(3): p. 1496-1539.
9. Groll, J., T. Boland, T. Blunk, J.A. Burdick, D.W. Cho, P.D. Dalton, B. Derby, G. Forgacs, Q. Li, V.A. Mironov, L. Moroni, M. Nakamura, W. Shu, S. Takeuchi, G. Vozzi, T.B. Woodfield, T. Xu, J.J. Yoo, and J. Malda, *Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field*. *Biofabrication*, 2016. **8**(1): p. 013001.
10. Hospodiuk, M., M. Dey, D. Sosnoski, and I.T. Ozbolat, *The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials*. *Biotechnol Adv*, 2017. **35**(2): p. 217-239.
11. Buenger, D., F. Topuz, and J. Groll, *Hydrogels in sensing applications*. *Progress in Polymer Science*, 2012. **37**(12): p. 1678-1719.
12. Lim, K.S., B.S. Schon, N.V. Mekhileri, G.C.J. Brown, C.M. Chia, S. Prabakar, G.J. Hooper, and T.B.F. Woodfield, *New Visible-Light Photoinitiating System for Improved Print Fidelity in Gelatin-Based Bioinks*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016. **2**(10): p. 1752-1762.
13. Murphy, S.V. and A. Atala, *3D bioprinting of tissues and organs*. *Nat Biotechnol*, 2014. **32**(8): p. 773-785.
14. Li, Z., S. Huang, Y. Liu, B. Yao, T. Hu, H. Shi, J. Xie, and X. Fu, *Tuning Alginate-Gelatin Bioink Properties by Varying Solvent and Their Impact on Stem Cell Behavior*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1-8.

15. Chimene, D., K.K. Lennox, R.R. Kaunas, and A.K. Gaharwar, *Advanced Bioinks for 3D Printing: A Materials Science Perspective*. *Ann Biomed Eng*, 2016. **44**(6): p. 2090-2102.
16. Hoelzl, K., S. Lin, L. Tytgat, S. Van Vlierberghe, L. Gu, and A. Ovsianikov, *Bioink properties before, during and after 3D bioprinting*. *Biofabrication*, 2016. **8**(3): p. 032002.
17. Gungor-Ozkerim, P.S., I. Inci, Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, and M.R. Dokmeci, *Bioinks for 3D bioprinting: an overview*. *Biomater Sci*, 2018. **6**(5): p. 915-946.
18. Bertlein, S., G. Brown, K.S. Lim, T. Jungst, T. Boeck, T. Blunk, J. Tessmar, G.J. Hooper, T.B.F. Woodfield, and J. Groll, *Thiol-Ene Clickable Gelatin: A Platform Bioink for Multiple 3D Biofabrication Technologies*. *Adv Mater*, 2017. **29**(44).
19. Soliman, B.G., G.C.J. Lindberg, T. Jungst, G.J. Hooper, J. Groll, T.B.F. Woodfield, and K.S. Lim, *Stepwise Control of Crosslinking in a One-Pot System for Bioprinting of Low-Density Bioinks*. *Adv Healthc Mater*, 2020. **9**(15): p. 1901544 (1-13).
20. Moroni, L., T. Boland, J.A. Burdick, C. De Maria, B. Derby, G. Forgacs, J. Groll, Q. Li, J. Malda, V.A. Mironov, C. Mota, M. Nakamura, W. Shu, S. Takeuchi, T.B.F. Woodfield, T. Xu, J.J. Yoo, and G. Vozzi, *Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology*. *Trends Biotechnol*, 2018. **36**(4): p. 384-402.
21. Dawood, A., B. Marti Marti, V. Sauret-Jackson, and A. Darwood, *3D printing in dentistry*. *Br Dent J*, 2015. **219**(11): p. 521-529.
22. Guillemot, F., V. Mironov, and M. Nakamura, *Bioprinting is coming of age: Report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B'09)*. *Biofabrication*, 2010. **2**(1): p. 010201.
23. Dababneh, A.B. and I.T. Ozbolat, *Bioprinting Technology: A Current State-of-the-Art Review*. *Journal of Manufacturing Science and Engineering*, 2014. **136**(6).
24. Zheng, Z., D. Eglin, M. Alini, G.R. Richards, L. Qin, and Y. Lai, *Visible Light-Induced 3D Bioprinting Technologies and Corresponding Bioink Materials for Tissue Engineering: A Review*. *Engineering*, 2020.
25. Mandrycky, C., Z. Wang, K. Kim, and D.H. Kim, *3D bioprinting for engineering complex tissues*. *Biotechnol Adv*, 2016. **34**(4): p. 422-434.
26. Lee, H., Y. Koo, M. Yeo, S. Kim, and G.H. Kim, *Recent Cell Printing Systems for Tissue Engineering*. *International Journal of Bioprinting*, 2017. **3**(1).
27. Ning, L. and X. Chen, *A brief review of extrusion-based tissue scaffold bioprinting*. *Biotechnol J*, 2017. **12**(8).
28. Moroni, L., J.A. Burdick, C. Highley, S.J. Lee, Y. Morimoto, S. Takeuchi, and J.J. Yoo, *Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine*. *Nat Rev Mater*, 2018. **3**(5): p. 21-37.
29. Huang, Y., X.F. Zhang, G. Gao, T. Yonezawa, and X. Cui, *3D bioprinting and the current applications in tissue engineering*. *Biotechnol J*, 2017. **12**(8).
30. Groll, J., J.A. Burdick, D.W. Cho, B. Derby, M. Gelinsky, S.C. Heilshorn, T. Jungst, J. Malda, V.A. Mironov, K. Nakayama, A. Ovsianikov, W. Sun, S.

- Takeuchi, J.J. Yoo, and T.B.F. Woodfield, *A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks*. *Biofabrication*, 2018. **11**(1): p. 013001.
31. Schwab, A., R. Levato, M. D'Este, S. Piluso, D. Eglin, and J. Malda, *Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting*. *Chem Rev*, 2020. **120**(19): p. 11028-11055.
 32. Gopinathan, J. and I. Noh, *Recent trends in bioinks for 3D printing*. *Biomater Res*, 2018. **22**: p. 11.
 33. Ahmed, E.M., *Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review*. *J Adv Res*, 2015. **6**(2): p. 105-121.
 34. Fedorovich, N.E., J. Alblas, J.R. de Wijn, W.E. Hennink, A.J. Verbout, and W.J. Dhert, *Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(8): p. 1905-1925.
 35. Skardal, A. and A. Atala, *Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2014. **43**(3): p. 730-746.
 36. Hennink, W.E. and C.F. van Nostrum, *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012. **64**: p. 223-236.
 37. Ullah, F., M.B.H. Othman, F. Javed, Z. Ahmad, and H.M. Akil, *Classification, processing and application of hydrogels: A review*. *Materials Science and Engineering: C*, 2015. **57**: p. 414-433.
 38. Graulus, G.-J., A. Mignon, S. Van Vlierberghe, H. Declercq, K. Fehér, M. Cornelissen, J. Martins, and P. Dubruel, *Cross-linkable alginate-graft-gelatin copolymers for tissue engineering applications*. *European Polymer Journal*, 2015. **72**: p. 494-506.
 39. Seiffert, S. and J. Sprakel, *Physical chemistry of supramolecular polymer networks*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(2): p. 909-930.
 40. Van Vlierberghe, S., E. Schacht, and P. Dubruel, *Reversible gelatin-based hydrogels: finetuning of material properties*. *European polymer journal*, 2011. **47**(5): p. 1039-1047.
 41. Fu, Y. and W.J. Kao, *In situ forming poly (ethylene glycol)-based hydrogels via thiol-maleimide Michael-type addition*. *Journal of biomedical materials research Part A*, 2011. **98**(2): p. 201-211.
 42. Sivashanmugam, A., R.A. Kumar, M.V. Priya, S.V. Nair, and R. Jayakumar, *An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering*. *European Polymer Journal*, 2015. **72**: p. 543-565.
 43. Teixeira, L.S.M., J. Feijen, C.A. van Blitterswijk, P.J. Dijkstra, and M. Karperien, *Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2012. **33**(5): p. 1281-1290.
 44. Ovsianikov, A., A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, M. Pflaum, M. Wilhelmi, P. Dubruel, and B. Chichkov, *Laser fabrication of 3D gelatin scaffolds for the generation of bioartificial tissues*. *Materials*, 2011. **4**(1): p. 288-299.
 45. Fedorovich, N.E., M.H. Oudshoorn, D. van Geemen, W.E. Hennink, J. Alblas, and W.J. Dhert, *The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels*. *Biomaterials*, 2009. **30**(3): p. 344-353.
 46. Mouser, V.H., F.P. Melchels, J. Visser, W.J. Dhert, D. Gawlitta, and J. Malda, *Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-*

- methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting*. *Biofabrication*, 2016. **8**(3): p. 035003.
47. Klotz, B.J., D. Gawlitta, A. Rosenberg, J. Malda, and F.P.W. Melchels, *Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair*. *Trends Biotechnol*, 2016. **34**(5): p. 394-407.
 48. Billiet, T., E. Gevaert, T. De Schryver, M. Cornelissen, and P. Dubruel, *The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability*. *Biomaterials*, 2014. **35**(1): p. 49-62.
 49. Schuurman, W., P.A. Levett, M.W. Pot, P.R. van Weeren, W.J. Dhert, D.W. Hutmacher, F.P. Melchels, T.J. Klein, and J. Malda, *Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs*. *Macromol Biosci*, 2013. **13**(5): p. 551-561.
 50. Yue, K., G. Trujillo-de Santiago, M.M. Alvarez, A. Tamayol, N. Annabi, and A. Khademhosseini, *Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels*. *Biomaterials*, 2015. **73**: p. 254-271.
 51. Ouyang, L., C.B. Highley, W. Sun, and J.A. Burdick, *A generalizable strategy for the 3D bioprinting of hydrogels from nonviscous photo-crosslinkable inks*. *Advanced materials*, 2017. **29**(8): p. 1604983.
 52. Hunt, N.C. and L.M. Grover, *Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine*. *Biotechnology letters*, 2010. **32**(6): p. 733-742.
 53. Spiller, K.L., S.A. Maher, and A.M. Lowman, *Hydrogels for the repair of articular cartilage defects*. *Tissue engineering part B: reviews*, 2011. **17**(4): p. 281-299.
 54. Pescosolido, L., W. Schuurman, J. Malda, P. Matricardi, F. Alhaique, T. Coviello, P.R. van Weeren, W.J. Dhert, W.E. Hennink, and T. Vermonden, *Hyaluronic acid and dextran-based semi-IPN hydrogels as biomaterials for bioprinting*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(5): p. 1831-1838.
 55. Davidenko, N., C.F. Schuster, D.V. Bax, R.W. Farndale, S. Hamaia, S.M. Best, and R.E. Cameron, *Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016. **27**(10): p. 148.
 56. Wang, K., K. Nune, and R. Misra, *The functional response of alginate-gelatin-nanocrystalline cellulose injectable hydrogels toward delivery of cells and bioactive molecules*. *Acta biomaterialia*, 2016. **36**: p. 143-151.
 57. Zhu, J. and R.E. Marchant, *Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds*. *Expert review of medical devices*, 2011. **8**(5): p. 607-626.
 58. Ng, W.L., C.K. Chua, and Y.-F. Shen, *Print Me An Organ! Why We Are Not There Yet*. *Progress in Polymer Science*, 2019. **97**.
 59. Levato, R., T. Jungst, R.G. Scheuring, T. Blunk, J. Groll, and J. Malda, *From Shape to Function: The Next Step in Bioprinting*. *Advanced Materials*, 2020. **32**(12).
 60. Kirsch, M., L. Birnstein, I. Pepelanova, W. Handke, J. Rach, A. Seltsam, T. Scheper, and A. Lavrentieva, *Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties*. *Bioengineering*, 2019. **6**(3).

61. Jooybar, E., M.J. Abdekhodaie, M. Alvi, A. Mousavi, M. Karperien, and P.J. Dijkstra, *An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells*. *Acta Biomaterialia*, 2019. **83**: p. 233-244.
62. Babo, P.S., R.L. Pires, L. Santos, A. Franco, F. Rodrigues, I. Leonor, R.L. Reis, and M.E. Gomes, *Platelet lysate-loaded photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels for periodontal endogenous regenerative technology*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017. **3**(7): p. 1359-1369.
63. Re, F., L. Sartore, V. Moulisova, M. Cantini, C. Almici, A. Bianchetti, C. Chinello, K. Dey, S. Agnelli, and C. Manferdini, *3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation*. *Journal of Tissue Engineering*, 2019. **10**: p. 2041731419845852.
64. Kirsch, M., J. Rach, W. Handke, A. Seltsam, I. Pepelanova, S. Strauß, P. Vogt, T. Scheper, and A. Lavrentieva, *Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cell Cultivation in Fetal Calf Serum, Human Serum, and Platelet Lysate in 2D and 3D Systems*. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 2020. **8**.
65. Teixeira, L.S.M., J.C. Leijten, J.W. Wennink, A.G. Chatterjea, J. Feijen, C.A. van Blitterswijk, P.J. Dijkstra, and M. Karperien, *The effect of platelet lysate supplementation of a dextran-based hydrogel on cartilage formation*. *Biomaterials*, 2012. **33**(14): p. 3651-3661.
66. Lee, K.Y. and D.J. Mooney, *Alginate: properties and biomedical applications*. *Prog Polym Sci*, 2012. **37**(1): p. 106-126.
67. Panwar, A. and L.P. Tan, *Current status of biopinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting*. *Molecules*, 2016. **21**(6): p. 685.
68. Van Vlierberghe, S., P. Dubruel, and E. Schacht, *Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(5): p. 1387-1408.
69. Pereira, R.F. and P.J. Bártolo, *3D bioprinting of photocrosslinkable hydrogel constructs*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015. **132**(48).
70. Huang, S., B. Yao, J. Xie, and X. Fu, *3D bioprinted extracellular matrix mimics facilitate directed differentiation of epithelial progenitors for sweat gland regeneration*. *Acta Biomaterialia*, 2016. **32**: p. 170-177.
71. Yao, R., R. Zhang, J. Luan, and F. Lin, *Alginate and alginate/gelatin microspheres for human adipose-derived stem cell encapsulation and differentiation*. *Biofabrication*, 2012. **4**(2): p. 025007.
72. Jiang, T., J.G. Munguia-Lopez, S. Flores-Torres, J. Grant, S. Vijayakumar, A. De Leon-Rodriguez, and J.M. Kinsella, *Directing the self-assembly of tumour spheroids by bioprinting cellular heterogeneous models within alginate/gelatin hydrogels*. *Scientific reports*, 2017. **7**(1): p. 1-9.
73. Li, S., Z. Xiong, X. Wang, Y. Yan, H. Liu, and R. Zhang, *Direct fabrication of a hybrid cell/hydrogel construct by a double-nozzle assembling technology*. *Journal of bioactive and compatible polymers*, 2009. **24**(3): p. 249-265.

74. Giuseppe, M.D., N. Law, B. Webb, A.M. R, L.J. Liew, T.B. Sercombe, R.J. Dilley, and B.J. Doyle, *Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting*. J Mech Behav Biomed Mater, 2018. **79**: p. 150-157.
75. Duan, B., L.A. Hockaday, K.H. Kang, and J.T. Butcher, *3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2013. **101A**(5): p. 1255-1264.
76. Wüst, S., M.E. Godla, R. Müller, and S. Hofmann, *Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(2): p. 630-640.
77. Zhang, T., K.C. Yan, L. Ouyang, and W. Sun, *Mechanical characterization of bioprinted in vitro soft tissue models*. Biofabrication, 2013. **5**(4): p. 045010.
78. Neufurth, M., X. Wang, H.C. Schröder, Q. Feng, B. Diehl-Seifert, T. Ziebart, R. Steffen, S. Wang, and W.E.G. Müller, *Engineering a morphogenetically active hydrogel for bioprinting of bioartificial tissue derived from human osteoblast-like SaOS-2 cells*. Biomaterials, 2014. **35**(31): p. 8810-8819.
79. Nichol, J.W., S.T. Koshy, H. Bae, C.M. Hwang, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. Biomaterials, 2010. **31**(21): p. 5536-5544.
80. Van Hoorick, J., H. Declercq, A. De Muynck, A. Houben, L. Van Hoorebeke, R. Cornelissen, J. Van Erps, H. Thienpont, P. Dubruel, and S. Van Vlierberghe, *Indirect additive manufacturing as an elegant tool for the production of self-supporting low density gelatin scaffolds*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015. **26**(10): p. 247.
81. Van Hoorick, J., P. Gruber, M. Markovic, M. Tromayer, J.r. Van Erps, H. Thienpont, R. Liska, A. Ovsianikov, P. Dubruel, and S. Van Vlierberghe, *Cross-linkable gelatins with superior mechanical properties through carboxylic acid modification: increasing the two-photon polymerization potential*. Biomacromolecules, 2017. **18**(10): p. 3260-3272.
82. Benton, J.A., C.A. DeForest, V. Vivekanandan, and K.S. Anseth, *Photocrosslinking of gelatin macromers to synthesize porous hydrogels that promote valvular interstitial cell function*. Tissue Engineering Part A, 2009. **15**(11): p. 3221-3230.
83. Bae, H., A.F. Ahari, H. Shin, J.W. Nichol, C.B. Hutson, M. Masaeli, S.-H. Kim, H. Aubin, S. Yamanlar, and A. Khademhosseini, *Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation*. Soft Matter, 2011. **7**(5): p. 1903-1911.
84. Bartnikowski, M., N. Bartnikowski, M. Woodruff, K. Schrobback, and T. Klein, *Protective effects of reactive functional groups on chondrocytes in photocrosslinkable hydrogel systems*. Acta biomaterialia, 2015. **27**: p. 66-76.
85. Van Hoorick, J., L. Tytgat, A. Dobos, H. Ottevaere, J. Van Erps, H. Thienpont, A. Ovsianikov, P. Dubruel, and S. Van Vlierberghe, *(Photo-)crosslinkable gelatin derivatives for biofabrication applications*. Acta Biomater, 2019. **97**: p. 46-73.

86. Kloxin, A.M., C.J. Kloxin, C.N. Bowman, and K.S. Anseth, *Mechanical properties of cellularly responsive hydrogels and their experimental determination*. *Advanced materials*, 2010. **22**(31): p. 3484-3494.
87. Muñoz, Z., H. Shih, and C.-C. Lin, *Gelatin hydrogels formed by orthogonal thiol–norbornene photochemistry for cell encapsulation*. *Biomaterials Science*, 2014. **2**(8): p. 1063-1072.
88. Bertassoni, L.E., J.C. Cardoso, V. Manoharan, A.L. Cristino, N.S. Bhise, W.A. Araujo, P. Zorlutuna, N.E. Vrana, A.M. Ghaemmaghami, and M.R. Dokmeci, *Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels*. *Biofabrication*, 2014. **6**(2): p. 024105.
89. Visser, J., F.P. Melchels, J.E. Jeon, E.M. Van Bussel, L.S. Kimpton, H.M. Byrne, W.J. Dhert, P.D. Dalton, D.W. Hutmacher, and J. Malda, *Reinforcement of hydrogels using three-dimensionally printed microfibrils*. *Nature communications*, 2015. **6**(1): p. 1-10.
90. Pahoff, S., C. Meinert, O. Bas, L. Nguyen, T.J. Klein, and D.W. Hutmacher, *Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019. **7**(10): p. 1761-1772.
91. Bhise, N.S., V. Manoharan, S. Massa, A. Tamayol, M. Ghaderi, M. Miscuglio, Q. Lang, Y.S. Zhang, S.R. Shin, and G. Calzone, *A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids*. *Biofabrication*, 2016. **8**(1): p. 014101.
92. McBeth, C., J. Lauer, M. Ottersbach, J. Campbell, A. Sharon, and A.F. Sauer-Budge, *3D bioprinting of GelMA scaffolds triggers mineral deposition by primary human osteoblasts*. *Biofabrication*, 2017. **9**(1): p. 015009.
93. Du, M., B. Chen, Q. Meng, S. Liu, X. Zheng, C. Zhang, H. Wang, H. Li, N. Wang, and J. Dai, *3D bioprinting of BMSC-laden methacrylamide gelatin scaffolds with CBD-BMP2-collagen microfibrils*. *Biofabrication*, 2015. **7**(4): p. 044104.
94. Hoyle, C.E. and C.N. Bowman, *Thiol-ene click chemistry*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010. **49**(9): p. 1540-1573.
95. Greene, T. and C.-C. Lin, *Modular Cross-Linking of Gelatin-Based Thiol–Norbornene Hydrogels for in Vitro 3D Culture of Hepatocellular Carcinoma Cells*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2015. **1**(12): p. 1314-1323.
96. Stichler, S., T. Jungst, M. Schamel, I. Zilkowski, M. Kuhlmann, T. Böck, T. Blunk, J. Teßmar, and J. Groll, *Thiol-ene clickable poly (glycidol) hydrogels for biofabrication*. *Annals of biomedical engineering*, 2017. **45**(1): p. 273-285.
97. Dahle, J., E. Kvam, and T. Stokke, *Bystander effects in UV-induced genomic instability: antioxidants inhibit delayed mutagenesis induced by ultraviolet A and B radiation*. *Journal of carcinogenesis*, 2005. **4**: p. 11.
98. Shih, H. and C.C. Lin, *Visible-light-mediated thiol-Ene hydrogelation using eosin-Y as the only photoinitiator*. *Macromolecular rapid communications*, 2013. **34**(3): p. 269-273.
99. Lim, K.S., B.J. Klotz, G.C. Lindberg, F.P. Melchels, G.J. Hooper, J. Malda, D. Gawlitta, and T.B. Woodfield, *Visible light cross-linking of gelatin*

- hydrogels offers an enhanced cell microenvironment with improved light penetration depth.* *Macromolecular bioscience*, 2019. **19**(6): p. 1900098.
100. Zuo, Y., H. Lu, L. Xue, X. Wang, L. Ning, and S. Feng, *Preparation and characterization of luminescent silicone elastomer by thiol-ene "click" chemistry.* *J. Mater. Chem.*, 2014. **2**(15): p. 2724-2734.
 101. Williams, D.F., *On the mechanisms of biocompatibility.* *Biomaterials*, 2008. **29**(20): p. 2941-2953.
 102. Skardal, A., *Bioprinting essentials of cell and protein viability*, in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. 2015, Elsevier. p. 1-17.
 103. Kaur, G. and J.M. Dufour, *Cell lines: Valuable tools or useless artifacts.* *Spermatogenesis*, 2012. **2**:1: p. 1-5.
 104. Dobos, A., J. Van Hoorick, W. Steiger, P. Gruber, M. Markovic, O.G. Andriotis, A. Rohatschek, P. Dubruel, P.J. Thurner, S. Van Vlierberghe, S. Baudis, and A. Ovsianikov, *Thiol-Gelatin-Norbornene Bioink for Laser-Based High-Definition Bioprinting.* *Adv Healthc Mater*, 2020. **9**(15): p. 1900752.
 105. Li, Y., Y. Zhang, F. Shi, L. Tao, Y. Wei, and X. Wang, *Modulus-regulated 3D-cell proliferation in an injectable self-healing hydrogel.* *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017. **149**: p. 168-173.
 106. Roberts, J.J., P. Naudiyal, K.S. Lim, L.A. Poole-Warren, and P.J. Martens, *A comparative study of enzyme initiators for crosslinking phenol-functionalized hydrogels for cell encapsulation.* *Biomater Res*, 2016. **20**: p. 30.
 107. Xu, Q., C. He, Z. Zhang, K. Ren, and X. Chen, *Injectable, Biomolecule-Responsive Polypeptide Hydrogels for Cell Encapsulation and Facile Cell Recovery through Triggered Degradation.* *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016. **8**(45): p. 30692-30702.
 108. Gantenbein, B., A.S. Croft, and M.A.D. Larraillet, *Mammalian Cell Viability Methods in 3D Scaffolds for Tissue Engineering*. 2020.
 109. Xiao, J., Y. Zhang, J. Wang, W. Yu, W. Wang, and X. Ma, *Monitoring of cell viability and proliferation in hydrogel-encapsulated system by resazurin assay.* *Applied biochemistry and biotechnology*, 2010. **162**(7): p. 1996-2007.
 110. Gantenbein, B., E. Potier, S. Zeiter, M. van der Werf, C.M. Sprecher, and K. Ito, *Accuracy of three techniques to determine cell viability in 3D tissues or scaffolds.* *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2008. **14**(4): p. 353-358.
 111. Präbst, K., H. Engelhardt, S. Ringgeler, and H. Hübner, *Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin*, in *Cell viability assays*. 2017, Springer. p. 1-17.
 112. Sigma-Aldrich. *Datasheet 96992 Cell Counting Kit - 8*. 2018 [17.11.2020]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/96992dat.pdf>.
 113. Quent, V.M.C., D. Loessner, T. Friis, J.C. Reichert, and D.W. Huttmacher, *Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research.* *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2010. **14**(4): p. 1003-1013.
 114. Dragan, A., J. Casas-Finet, E. Bishop, R. Strouse, M. Schenerman, and C. Geddes, *Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin*

- of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophysical journal*, 2010. **99**(9): p. 3010-3019.
115. Sedlackova, T., G. Repiska, P. Celec, T. Szemes, and G. Minarik, *Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods*. *Biological Procedures Online*, 2013. **15**(1): p. 5.
 116. Blaheta, R.A., B. Kronenberger, D. Woitaschek, S. Weber, M. Scholz, H. Schuldes, A. Encke, and B.H. Markus, *Development of an ultrasensitive in vitro assay to monitor growth of primary cell cultures with reduced mitotic activity*. *Journal of immunological methods*, 1998. **211**(1-2): p. 159-169.
 117. Wieland, T., *The Chemistry of the Amatoxins, Phallotoxins and Virotoxins, in Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms*. 1986, Springer. p. 47-100.
 118. Goody, M.F. and C.A. Henry, *Phalloidin Staining and Immunohistochemistry of Zebrafish Embryos*. *Bio-protocol*, 2013. **3**(11).
 119. Bedell, M.L., A.J. Melchiorri, J. Aleman, A. Skardal, and A.G. Mikos, *A high-throughput approach to compare the biocompatibility of candidate bioink formulations*. *Bioprinting*, 2020. **17**.
 120. Epple, M., *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*. 2003: Springer-Verlag.
 121. Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, and B. Schmid, *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nature methods*, 2012. **9**(7): p. 676-682.
 122. Yin, J., M. Yan, Y. Wang, J. Fu, and H. Suo, *3D Bioprinting of Low-Concentration Cell-Laden Gelatin Methacrylate (GelMA) Bioinks with a Two-Step Cross-linking Strategy*. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018. **10**(8): p. 6849-6857.
 123. Kong, H.J., M.K. Smith, and D.J. Mooney, *Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells*. *Biomaterials*, 2003. **24**(22): p. 4023-4029.
 124. Tsimbouri, P.M., L.E. McNamara, E.V. Alakpa, M.J. Dalby, and L.-A. Turner, *Cell-material interactions*, in *Tissue Engineering*. 2014, Elsevier. p. 217-251.
 125. Wang, Y., L. Guo, S. Dong, J. Cui, and J. Hao, *Microgels in biomaterials and nanomedicines*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2019. **266**: p. 1-20.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

Alg-Gel	<i>Alginat-Gelatine</i>
Calcein-AM.....	<i>Calcein Acetoxymethylester</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
GelAGE	<i>Gelatine modifiziert mit Allylglycidylether</i>
GelMA	<i>Gelatinemethacrylat</i>
Gew.-%	<i>Gewichtsprozent</i>
HACs	<i>Human articular chondrocytes</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
hPDLFs	<i>Human periodontal ligament fibroblasts</i>
HPL	<i>Humanes Plättchenlysat</i>
LAP	<i>Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat</i>
m/v	<i>Masse/Volumen</i>
MSCs.....	<i>Mesenchymal stem cells</i>
PBS	<i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>
Ru	<i>Ruthenium</i>
SPS.....	<i>Sodium persulfate</i>
TG.....	<i>Transglutaminase</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die am weitesten verbreiteten Biodruck Verfahren.....	6
Abbildung 2: Biotinten und ihre Abgrenzung zu Biomaterial-Tinten.	9
Abbildung 3: Vernetzungsreaktion von Hydrogelvorstufen.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Synthese und Vernetzung von GelMA. ..	17
Abbildung 5: Schematische Darstellung der GelAGE-Synthese und des Mechanismus der Thiol-En Reaktion.	19
Abbildung 6: Vernetzung GelAGE Proben	35
Abbildung 7: GelAGE Vernetzungs Tests.	43
Abbildung 8: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen bei unterschiedlichen Abständen zur Lichtquelle.	44
Abbildung 9: Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen bei unterschiedlichen Abständen zur Lichtquelle.	45
Abbildung 10: Automatische vs. manuelle Auswertung (n = 3).	46
Abbildung 11: Automatische vs. manuelle Auswertung (n = 9 bzw. 18).	46
Abbildung 12: Tag 0 DNA-Gehalt von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G1MM und Alg-Gel Hydrogelen.	47
Abbildung 13: Aufnahmen in Medium kultivierter Alg-Gel und 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogele.....	48
Abbildung 14: DNA-Gehalt im gesamten Hydrogel und auf dem Plattenboden.	49
Abbildung 15: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen.....	51
Abbildung 16: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen mit 2 h Transglutaminase (TG) Nachvernetzung.....	52
Abbildung 17: Vitalität von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen.	53
Abbildung 18: DNA-Gehalt von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen.....	55
Abbildung 19: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in Alg-Gel Hydrogelen.	56
Abbildung 20: Übersichtsaufnahme eines Alginat-Gelatine Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.....	58
Abbildung 21: Übersichtsaufnahme eines Alginat-Gelatine Hydrogels mit 2 h Transglutaminase-Nachvernetzung nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.	59
Abbildung 22: Detailaufnahmen eines Alginat-Gelatine (A-C) Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur, D-F mit 2 h Transglutaminase (TG) Nachvernetzung...	60

Abbildung 23: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in GelAGE G1MM Hydrogelen.	62
Abbildung 24: Vitalität von L929-Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen.....	63
Abbildung 25: DNA-Gehalt von L929 Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen.....	64
Abbildung 26: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in 6 bzw. 15 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogelen.....	65
Abbildung 27: Übersichtsaufnahme eines 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.	67
Abbildung 28: Detailaufnahmen eines 6 % (m/v) GelAGE G1MM Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.	68
Abbildung 29: Live/Dead Färbung von L929-Zellen in GelAGE G2LH Hydrogelen. ..	70
Abbildung 30: Vitalität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen.	71
Abbildung 31: DNA-Gehalt von L929-Zellen in GelAGE G2LH Hydrogelen.	72
Abbildung 32: Relative metabolische Aktivität von L929-Zellen in 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogelen.	73
Abbildung 33: Übersichtsaufnahme eines 6 % (m/v) GelAGE G2LH Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.	74
Abbildung 34: Detailaufnahmen eines 6 % (m/v) GelAGE G2LH (A-C) Hydrogels nach 7 Tagen <i>in vitro</i> Kultur.	75

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsprodukte der Synthese von GelAGE	18
Tabelle 2: Übersicht verwendeter Arbeitsgeräte und sonstiger Hilfsmittel	24
Tabelle 3: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 4: Übersicht verwendeter Chemikalien	27
Tabelle 5: Übersicht verwendeter Farbstoffe und Kits.....	29
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Hydrogelkomponenten.....	29
Tabelle 7: Zusammensetzung der Alginat-Gelatine Hydrogele.....	32
Tabelle 8: Zusammensetzung der GelAGE Hydrogele.....	34
Tabelle 9: Pipettierschema der High-Range DNA-Standardkurve.....	38
Tabelle 10: Pipettierschema der Low-Range DNA-Standardkurve.....	40
Tabelle 11: Übersicht der gemittelten Vitalitätswerte.	80
Tabelle 12: Übersicht der gemittelten absoluten DNA-Gehalte.	82
Tabelle 13: Übersicht der gemittelten absoluten DNA-Gehalte bei HPL-Zusatz.	86

IV Lizenzen

Abbildung 1:

Lizenznummer	4999260163172
Datum der Lizenz	31.01.2021
Verleger	John Wiley and Sons
Veröffentlichung	Advanced Materials
Titel	25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication
Autor	Jos Malda, Jetze Visser, Ferry P. Melchels, et al.
Datum	23.08.2013
Band	25
Ausgabe	36

Abbildung 3:

Lizenznummer	4999260279985
Datum der Lizenz	31.01.2021
Verleger	John Wiley and Sons
Veröffentlichung	Advanced Materials
Titel	A Generalizable Strategy for the 3D Bioprinting of Hydrogels from Nonviscous Photo-crosslinkable Inks
Autor	Jason A. Burdick, Wei Sun, Christopher B. Highley, et al.
Datum	16.12.2016
Band	29
Ausgabe	8

Abbildung 5:

Lizenznummer	1094278-1
Datum der Lizenz	31.01.2021
Verleger	Royal Society of Chemistry
Veröffentlichung	Journal of Materials Chemistry C
Titel	Preparation and characterization of luminescent silicone elastomer by thiol-ene “click” chemistry
Autor	Yujing Zuo, Haifeng Lu, Lei Xue, Xianming Wang, Liang Ningb, Shengyu Feng
Datum	28.01.2014
Band	2
Ausgabe	15

V Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation sowohl fachlich als auch persönlich unterstützt haben.

Bei Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll bedanke ich mich für die Möglichkeit der Promotion am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde. Von Anfang an wurde ich von allen Mitarbeitern am FMZ sehr herzlich aufgenommen und stets hilfsbereit umsorgt.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck danke ich für die Übernahme des Referats und Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler für die Übernahme des Korreferats.

Vor allem aber möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern Dr. rer. nat. Tomasz Jüngst und Dr. rer. nat. Thomas Böck bedanken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die große Hilfestellung im Labor, das geduldige Beantworten meiner vielen Fragen und die gründliche und konstruktive Korrektur meiner Arbeit. Die vielen Stunden, die ihr meiner Dissertation gewidmet habt und eure exzellente Betreuung weiß ich sehr zu schätzen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur während meiner Promotion unterstützt haben, sondern mir auch sonst immer im Leben zur Seite stehen.