

**Untersuchungen zu
Zell-Matrix Kontakten humaner Zellen
an Stimulus-responsiven Polymeren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

André Schulz, M. Sc.

Saarbrücken

2020

Tag des Kolloquiums:

26.11.2020

Dekan:

Prof. Dr. rer. nar. Jörn Walter

Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Heiko Zimmermann

Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Wenz

Vorsitz:

Prof. Dr. rer. nat. Marc Schneider

Akademische Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Josef Zapp

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen und Stand der Technik	5
2.1 Polymer-basierte Materialsysteme.....	5
2.2 Rolle der Proteine im Kontext von Zell-Matrix-Kontakten.....	14
2.3 Humane Zellsysteme.....	18
3 Material und Methoden	21
3.1 Herstellung von Alginate-Substraten.....	21
3.2 Methoden zur chemischen Funktionalisierung von Alginate.....	28
3.3 Methoden zur Charakterisierung von Materialeigenschaften.....	29
3.4 Techniken der Zellkultur und Analyse des Zellstatus.....	35
3.5 Statistik.....	41
4 Ergebnisse	42
4.1 Validierung von Alginate als Stimulus-responsive Polymermatrix zur Untersuchung von Zell-Matrix Kontakten.....	42
4.2 Entwicklung hochvolumiger Alginategele im Kontext von Zell-Matrix Kontakten.....	48
4.3 Initiierung von Zell-Matrix Adhäsionen an Alginate-basierten Hydrogelen.....	54
4.4 Untersuchungen zum Einfluss der Ladung von Polymeroberflächen auf das Verhalten humaner Zellsysteme.....	66
4.5 Entwicklung einer Zell-responsiven Matrix als Biosensor und Freisetzungssystem.....	81
5 Diskussion	86
Inwieweit ist der Gelierungsprozess von Alginate auf hochvolumige Systeme übertragbar?.....	86
Welchen Effekt hat die Oberflächenchemie auf Zell-Matrix Kontakte? Carboxyl- vs. Phenolgruppe.....	93
Welchen Einfluss haben Ladungseffekte auf Zell-Matrix Kontakte?.....	97
Welchen Einfluss haben Zellsekrete auf Zell-Matrix Kontakte?.....	103
Abschließendes Fazit und Ausblick.....	108
6 Literatur	111
7 Anhang	124

Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	124
Publikationen.....	126

Abkürzungsverzeichnis

ALG	Alginatgel
ALGTYR	Tyramin-funktionalisiertes Alginatgel
AMG	Matrigel-modifiziertes Alginatgel
APS	Ammoniumpersulfat
ANS	8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSE	Rückstreuelektronen
BSS	<i>Balance Salt Solution</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (Ellmans Reagenz)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenpektroskopie
E-Modul	Elastizitätsmodul
et al.	et alii (Lateinisch für „und andere“)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
G	α -L-Guluronsäure
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
HA	Hyaluronsäure
hiPSCs	Human induziert-pluripotente Stammzellen
HMDS	Hexamethyldisilazan
LC	Letale Konzentration
LN	<i>Lessonia nigrescens</i> (Braunalge)
LOX	Lysyloxidase
LT	<i>Lessonia trabeculata</i> (Braunalge)

Abkürzungsverzeichnis

M	β -D-Mannuronsäure
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NACL	Isotonische, 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
n.s.	Nicht signifikant
<i>p</i>	Signifikanz
PAMAM	Poly(amidoamine)
PBS	Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung
PC	Polystyrol-basierte Zellkulturplastik
pLL	poly-L-Lysin
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
TYR	Tyramin
UV	Ultraviolett
WFI	Wasser für Injektionszwecke
z.B.	Zum Beispiel

Zusammenfassung

Wissenschaftliches Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen zwischen humanen Zellen und Stimulus-responsiven Polymeren zu untersuchen, neue Erkenntnisse über den Einfluss der Chemie und Ladung von Materialoberflächen sowie den Einfluss von Zellsekreten auf Zell-Matrix Kontakte zu gewinnen und durch Implementierung optimierte Systeme und Methoden zu ermöglichen. Anhand des pH-responsiven Biopolymers Alginat wurden verschiedenste Hydrogel-basierte Plattformen im Kontext von Zell-Matrix Kontakten entwickelt und untersucht. Die zelladhäsionsfördernde Wirkung von Phenol-Gruppen konnte dargelegt und durch Modifikation mit Tyramin die Kultivierung humaner, verankerungsabhängiger Stammzellen auf dreidimensionalen Alginatstrukturen umgesetzt werden. Durch Modifikation mit Poly(amidoaminen) gelang es, den Effekt der Oberflächenladung einer Matrix auf die Adsorption von Proteinen sowie auf die Adhäsion, den Phänotyp und die Differenzierungsprozesse humaner Stammzellen aufzuzeigen. Insbesondere wird die medierende Rolle von Proteinen im Kontext von Zell-Matrix Kontakten offenbart. Die Responsivität von Kupfer-stabilisierten Alginatgelen auf das enzymatische Zellsekret Lysyloxidase konnte durch eine Matrixdestabilisierung und Substanzfreisetzung demonstriert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse fördern das Verständnis und die gezielte Nutzung von Zell-Matrix Kontakten und eröffnen neue Wege hinzu modernen Zellkulturverfahren, Implantaten und Analysemethoden.

Abstract

The scientific aim of the present thesis was to investigate the interactions between human cells and stimulus-responsive polymers, to gain new insights into the influence of the chemistry and charge of material surfaces as well as the influence of cell secretions on cell-matrix contacts, and to enable optimized systems and methods through implementation. Using the pH-responsive biopolymer alginate, various hydrogel-based platforms in the context of cell-matrix contacts were developed and studied. The cell adhesive effect of phenol groups was demonstrated and the cultivation of human anchorage-dependent stem cells on three-dimensional alginate structures was implemented by modification with tyramine. By modification with poly(amidoamines) the effect of the surface charge of a matrix on the adsorption of proteins as well as on the adhesion, phenotype and differentiation processes of human stem cells could be revealed. In particular, the mediating role of proteins in the context of cell-matrix contacts is highlighted. The responsiveness of copper-stabilized alginate gels to the enzymatic cell secretion lysyl oxidase could be demonstrated by matrix destabilization and substance release. The knowledge gained promotes the understanding and the targeted use of cell-matrix contacts and opens new ways to modern cell culture procedures, implants and analytical methods.

1 Einleitung und Zielsetzung

Interaktionen zwischen biologischen Systemen und Materialien sind allgegenwärtig. So besitzt jede menschliche Zelle eine sogenannte Zellumgebung, deren Eigenschaften das Verhalten der Zelle maßgeblich bestimmt (1, 2). Das Einbringen von Biomaterialien in diese Zellumgebung birgt die Chance biologische Prozesse verstehen und gezielt steuern zu können und dadurch moderne Zellkulturverfahren, Implantate und Analysemethoden zu ermöglichen. Nach der Entdeckung und Namensgebung der Zelle im Jahre 1665 durch Robert Hooke sollten zunächst Jahrhunderte vergehen bis die erste fortlaufende, menschliche Zelllinie im Jahre 1952 für die Zellkultur zur Verfügung stand (3, 4). Die zellbiologische Forschung expandierte zunehmend und gewann wertvolle Erkenntnisse zum Erhalt, Wachstum und zur Manipulation der Zellen. Eng verbunden mit dem molekularbiologischen Fortschritt sind die Erkenntnisse über die biochemischen Wechselwirkungen der Zelle mit ihrer Umgebung. So wurden im Laufe der Zeit die Eigenschaften der angebotenen Stoffe mit der Änderung der Zellfunktion attribuiert. Der Einfluss der mechanischen Stabilität sowie der Charakteristika von Materialoberflächen wie Benetzbarkeit, Topographie, Chemie und Ladung wurden zunehmend als kritische Parameter identifiziert (1, 2, 5, 6). Um die hoch komplexe und dynamische Biogrenzfläche noch besser abbilden und verstehen zu können, fanden mit Beginn der 1990er Jahre schaltbare Materialien große Aufmerksamkeit (7). Diese sogenannten Stimuli-responsiven Materialien besitzen die Fähigkeit sensitiv auf definierte Reize mit einer Änderung ihrer strukturellen Beschaffenheit und folglich ihrer Funktionalität zu reagieren. In Verbindung mit Zellen entstehen so interaktive Systeme, bei denen beide, das Material und die Zellen, in der Lage sind dynamisch auf den Reiz des respektive anderen Systems zu antworten. In der Hoffnung, die fortschreitenden Erkenntnisse über Zell-Matrix-Interaktionen für innovative Lösungsansätze in der Diagnostik und Therapie nutzen zu können, wurde die Biogrenzfläche in den fächerübergreifenden Fokus von Medizin, Biologie, Biotechnologie, Chemie und Materialwissenschaften gerückt.

In der Forschung häufig vernachlässigt wird jedoch die entscheidende Rolle der Proteine für die Kontakte zwischen Zellen und Materialien. Zellen interagieren nicht direkt mit den Materialien, sondern über medierende Proteine, die in kürzester Zeit auf der Materialoberfläche adsorbiert Rezeptoren für die Zellbindung zur Verfügung stellen (8). Die Eigenschaften der Matrixoberfläche beeinflussen hierbei initial die Adsorption spezifischer Proteine in entsprechender Quantität und Konformation und weiterführend das Zellverhalten,

wie beispielsweise die Adhäsion und Differenzierung. Insbesondere adulte Stammzellen wie mesenchymale Stammzellen (MSCs), die das Potential besitzen in mesodermale Zellen (Knochen-, Knorpel-, Fett- und Muskelzellen) zu differenzieren (9), sind von therapeutischer Relevanz und zeigten unter anderem in der Transplantation von Knochenmark und in Knochenheilungsprozessen klinische Erfolge (10). Von besonderem Interesse sind dabei die Interaktionen dieser hochfunktionalen Stammzellen mit ihrer Umgebung, um ihr gänzlich, vielversprechendes Potential für die gesellschaftliche Wertschöpfung nutzen zu können.

Um die Zell-Matrix Kontakte humaner Zellen verschiedener Potenz an Stimulus-responsiven Polymeren untersuchen zu können, bedarf es zunächst der Bereitstellung eines geeigneten, standardisierten Basismaterials. Als biokompatibles Polysaccharid natürlichen Ursprungs, das unter physiologischen Temperaturen und pH mit divalenten Kationen Hydrogele mit einstellbaren porösen und mechanischen Eigenschaften bilden kann (11, 12), bietet sich Alginat als polymeres Grundgerüst an. Eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Alginate liegt jedoch aufgrund unzureichender Prozessführung und -dokumentation als Gemisch verschiedenster Algenextrakte mit undefiniertem Ursprung vor. Zudem erfüllen nur die wenigsten der käuflich erwerblichen Alginate die für medizinische Anwendung notwendige Reinheit (13, 14). Da die strukturellen Eigenschaften und die Reinheit des Biopolymers jedoch letztlich die Funktionalität des Biomaterials bestimmen, wird auf eine Standardisierung und Validierung des gesamten Herstellungsprozesses von der Materialgewinnung bis zur finalen Applikation des Alginats abgezielt.

Entsprechend aufgereinigt liegt Alginat als biokompatibles Basismaterial vor, das aufgrund seiner Carboxylgruppen von Natur aus pH-responsive Eigenschaften besitzt, die es bei einem pH-Wechsel mit der Änderung seines Gel-Volumens (Schrumpfen/Expansion) reagieren lässt (11). Der in den vergangenen Jahren fortschreitende Paradigmenwechsel von steifen Zellkultursubstraten hin zu flexiblen Gelen, die die Zellumgebung verstärkt als eine physiologischere Nische nachahmen sollen, begünstigt den biomedizinischen Einsatz von Alginat. Die Alginat-basierten Gerüststrukturen finden dabei in unterschiedlichsten Formen z.B. als sphärische Mikropartikel in gerührten Bioreaktoren (15) oder als planare Gelschichten in Zellkulturen (16) und Wundauflagen (17) Anwendung. Um das hohe Potenzial von Alginatgelen ausschöpfen zu können, sind neben den niedrigvolumigen Gelmatrizen jedoch Systeme erforderlich, die in ihrem Volumen skalierbar sind. So bedarf es beispielsweise in der Gewebezüchtung an hochvolumigen Matrizen unterschiedlichsten Designs. In dem *ersten Teil* dieser Arbeit soll deshalb der Gelierprozess von niedrig- und hochvolumigen Systemen

auf Basis hochmolekularer Alginat verglichen und die Geleigenschaften im Kontext von Zell-Matrix Kontakten untersucht werden.

Als hydrophiles, bioinertes Material, das mit seiner negativ geladenen Oberfläche adhäsive Wechselwirkungen mit Zellen unterbindet, wurde Alginat in den letzten Jahren intensiv im Kontext der Immunisolation therapeutisch relevanter Zellen für die Entwicklung neuer Behandlungskonzepte von Diabetes mellitus untersucht (18, 19). Im weiteren Verlauf der Arbeit soll die Anti-Adhäsivität des Alginats überwunden werden und infolgedessen Zell-Matrix Kontakte ermöglicht und anschließend mit Hilfe von optischen, mikrobiologischen und immunochemischen Methoden analysiert werden. In diesem Kontext soll in dem *zweiten Teil* dieser Arbeit der Einfluss der Oberflächenchemie auf die Interaktion von Stimulus-responsivem Alginat mit humanen Zellen untersucht werden. Dazu bedarf es zunächst einer umfangreichen Charakterisierung der Oberflächenmodifizierung und der synthetisierten Materialeigenschaften. Mit Blick auf die medierende Bedeutung von Proteinen zwischen Material und Zelle sollen die Adsorption und die Stabilität der Proteine auf Materialien unterschiedlicher Oberflächenchemie vergleichend untersucht und anschließend das Verhalten der Zellen nach Applikation geprüft werden.

In direkter Beziehung zu der Chemie einer Oberfläche steht dessen Ladung. So können die funktionalisierten Oberflächen je nach Typ der funktionalen Gruppen unterschiedliche Ladungszustände aufweisen. Unter physiologischen Bedingungen besitzen beispielsweise Carboxylgruppen negative ($-\text{COO}^-$) und Aminogruppen positive ($-\text{NH}_3^+$) Ladungen. In dem *dritten Teil* dieser Arbeit soll daher der Einfluss der Oberflächenladung von Materialien am Beispiel vom pH-responsiven Alginat auf die Steuerung des Zellverhaltens, insbesondere bezüglich der Adhäsion und Differenzierung von MSCs auf verschieden geladenen Materialoberflächen untersucht werden.

Es sind jedoch nicht nur die Eigenschaften von Materialien, die die Grenzfläche zwischen Zelle und Matrix bestimmen. So können auch Zellen Reize aussenden, auf die das Material mit einer Struktur- und letztlich einer Eigenschaftsänderung reagieren kann. Je nach Zelltyp können diese biologischen Stimuli beispielsweise Hormone, Enzyme oder andere metabolische Produkte sein (20). In dem *vierten Teil* dieser Arbeit soll daher untersucht werden, welchen Einfluss Zellsekrete auf Zell-Matrix Kontakte haben.

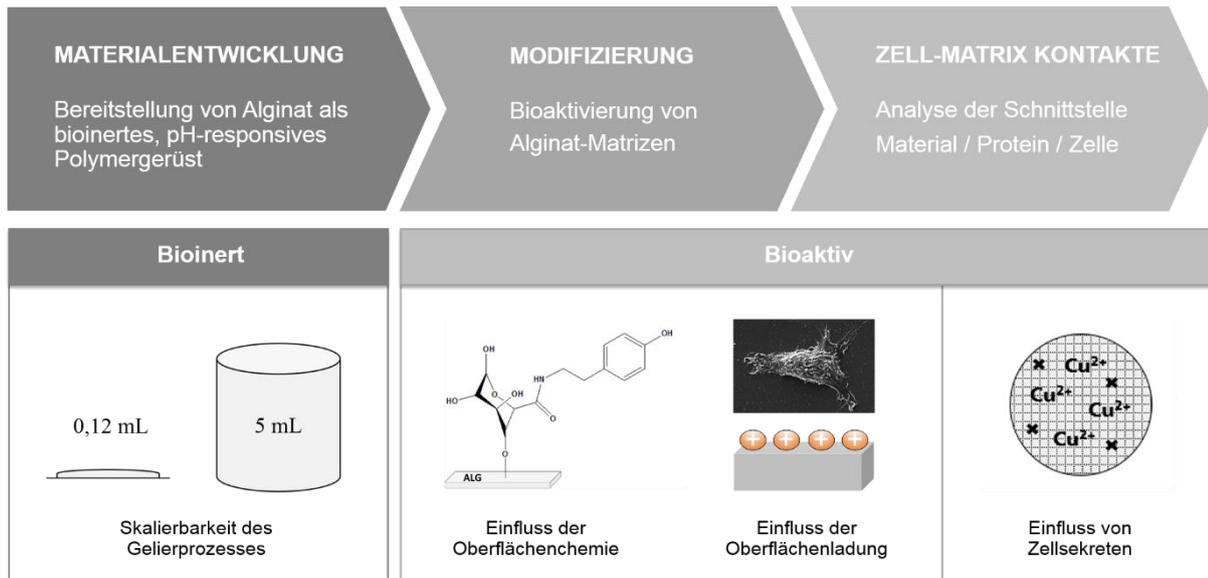


Abbildung 1: Übersicht der in dieser Arbeit zu untersuchenden Themengebiete.

Die vorliegende Arbeit zielt im Ganzen darauf ab (Abbildung 1), das in vielerlei Hinsicht limitierte grundlegende Verständnis von Zell-Matrix Kontakten im Kontext Biopolymer-basierter Materialien zur gezielten Steuerung und Nutzung zellulären Verhaltens zu steigern und dadurch anwendungsbezogene Substrate für moderne Zellkulturverfahren, Implantate und Analyseverfahren zu ermöglichen. Als entsprechende Profiteure der in dieser Arbeit entwickelten Konzepte und Systeme ist die Vielzahl an Forschungs- und Industriezweigen adressiert, die wie beispielsweise die Medizin, Pharmazie, Biotechnologie und Materialwissenschaften von den Grenzflächen zwischen Zellen und Materialien abhängig sind.

2 Grundlagen und Stand der Technik

2.1 Polymer-basierte Materialsysteme

2.1.1 Gerüststrukturen für Zellanwendungen

Biomaterialien

Als Biomaterialien werden gemäß der Definition des *American National Institute of Health* Substanzen natürlichen oder synthetischen Ursprungs bezeichnet, die für einen beliebigen Zeitraum Gewebe, Organe oder Funktionen des Körpers ergänzen oder ersetzen, um die Lebensqualität des Einzelnen zu erhalten oder zu verbessern (21). Darüber hinausgehend können Biomaterialien auch Freisetzungssysteme darstellen (22). Als generelle Anforderungen an Biomaterialien werden die Biokompatibilität, mechanische Integrität und kontrollierte Stabilität gestellt. Neben Metallen, Keramiken, Kompositen und biologischen Matrizen wie beispielsweise Knochen oder Zellen, stehen insbesondere Polymere im Fokus der Forschung. Dabei wird in Abhängigkeit von deren Ursprung grob in natürliche und synthetische Polymere unterschieden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Auswahl und Klassifikation von natürlichen und synthetischen Polymeren.

Ursprung	Vorteile	Nachteile
Natürlich		
Kollagen	Biokompatibel, Selbstassemblierung, biodegradierbar, Zellbindungsstellen	Geringe strukturelle Integrität bei niedrigen Konzentrationen
Hyaluronsäure	Biokompatibel, biodegradierbar, Zellbindungsstellen	Schnelle Degradierung, chemische Modifikation für Vernetzung notwendig
Alginat	Biokompatibel, ionotrope Gelierung	Keine Zellbindungsstellen
Agarose	Physikalische Vernetzung, Temperatur-responsiv	Löslichkeit
Gelatine	Biokompatibel, biodegradierbar	Thermische Vernetzung unter zellschädigenden Bedingungen
Chitosan	Biokompatibel, biodegradierbar, Komplexierung mit Polyanionen	Löslichkeit
Synthetisch		
Polyethylenglycol	Biokompatibel, verschiedene Molekulargewichte und Geometrien	Nicht biodegradierbar, Keine Zellbindungsstellen
Polyacrylsäure	Stabilität, Vielzahl an Derivaten verfügbar	Nicht biodegradierbar, Keine Zellbindungsstellen

Eine besondere Klasse polymerischer Biomaterialien stellen sogenannte Hydrogele dar. Per Definition sind Hydrogele hydrophile Polymernetzwerke mit einer dreidimensionalen Konfiguration, die eine Menge an Wasser oder biologischem Fluid von bis 90% oder mehr aufnehmen können (23).

Stimulus-responsive Systeme

Systeme, die eine oder mehrere Eigenschaften aufgrund eines definierten Reizes ändern, werden als „Stimulus-responsiv“ bezeichnet. An der Zell-Matrix Grenzfläche entstehen dabei interaktive Kontakte, bei denen beide, das Material und die Zellen, in der Lage sind dynamisch auf den Reiz des respektive anderen Systems zu antworten. Potentielle Stimuli lassen sich in physikalische, chemische und biologische Reize klassifizieren (Abbildung 2).

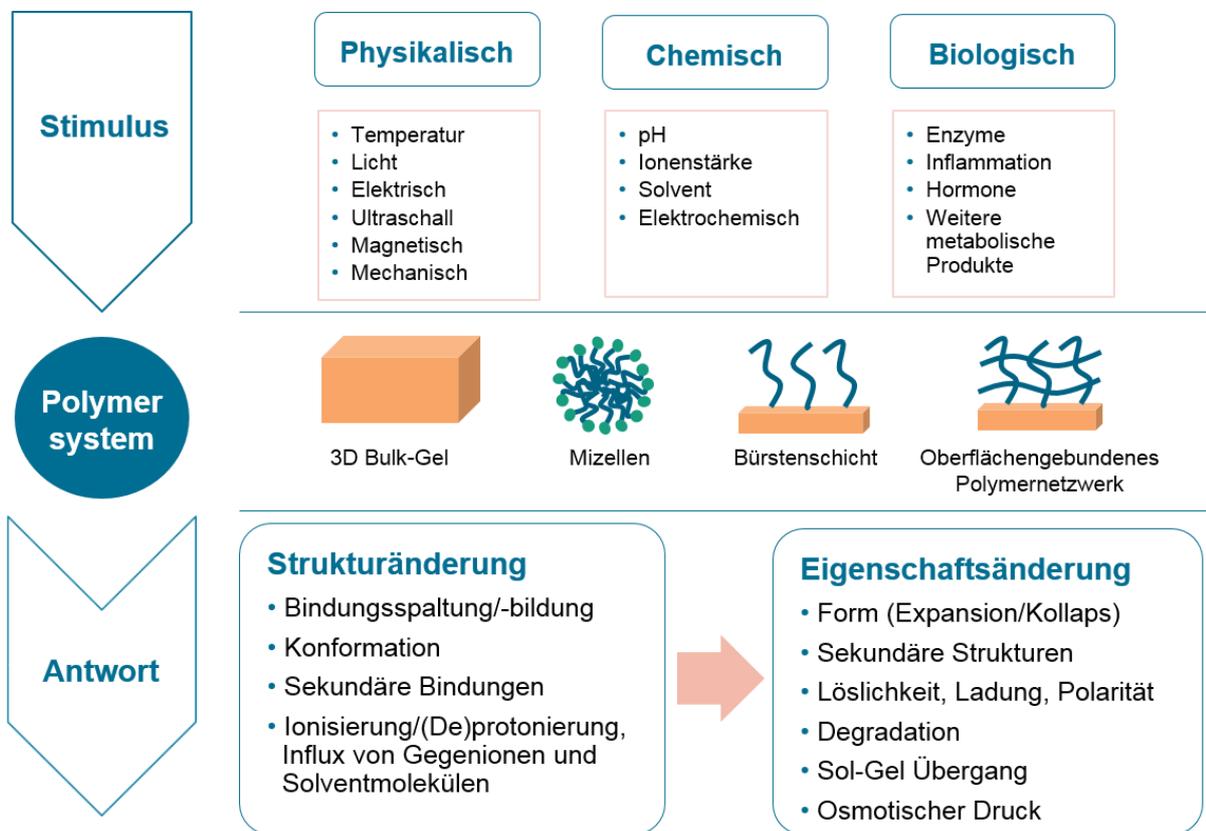


Abbildung 2: Klassifikation stimulus-responsiver Polymersysteme mit potentiellen Reizen und Reaktionen.

Stimulus-responsive Zell-Matrix Grenzflächen sind entweder extern reguliert oder autonom. In diesem Kontext werden externe Stimuli als Reize definiert, die ihren Ursprung außerhalb der Grenzflächenumgebung besitzen und vom biologischen System entkoppelt sind. Im Gegensatz dazu sind autonome Grenzflächen in der Lage ihre Funktion selbsterhaltend und unabhängig von externen Faktoren auszuführen. Der Stimulus beeinflusst entweder das

Material oder das Zellsystem und soll von dem jeweils anderen toleriert werden. Die Reiz-induzierte Antwort des Materials stellt den Reiz für das Zellsystem und umgekehrt dar. In biologischen Systemen sind insbesondere Licht, elektrische Potentiale, mechanische Beanspruchungen und kleine Änderungen in pH oder Temperatur attraktive und sanfte Reize. Die Stimuli können dabei global (z.B. pH und Temperatur) oder lokal (z.B. Licht) wirken und gezielt Eigenschaften ändern, die die Zell-Matrix Grenzfläche bestimmen.

2.1.2 Einfluss von Matriceigenschaften auf zelluläres Verhalten

Zell-Matrix Kontakte werden überwiegend von den Eigenschaften der Matrix bestimmt, die sich in physikalische (Oberflächentopographie, Elastizität/Steifigkeit), chemische (Ladung, Benetzbarkeit) und biologische (Biokompatibilität, bioaktive Rezeptoren) Einflüsse unterteilen lassen. Die verschiedenen Matriceigenschaften können maßgeblich auf das Verhalten von Zellen wie Vitalität, Adhäsion, Proliferation, Migration, Differentiation, Apoptose und Agglomeration einwirken und stellen somit nützliche Parameter zur gezielten Steuerung zellulären Verhaltens dar.

Biokompatibilität

Materialien, die keinen negativen Einfluss auf ihre biologische Umgebung ausüben, sind per Definition biokompatibel. In Abhängigkeit der biologischen Reaktion werden dabei bioinerte, bioaktive und bioresorbierbare Materialien unterschieden. Eine bioinerte Matrix verursacht keine oder eine minimale Interaktion mit der biologischen Umgebung. Hingegen führen bioaktive Materialien zu kontrollierten Wechselwirkungen wie z.B. der Integration und Akzeptanz von Implantaten oder zu bestimmten Zellreaktionen wie Proliferation oder Differenzierung. Bioresorbierbare Materialien degradieren mit der Zeit und werden vom umgebenden Gewebe aufgenommen und verarbeitet. Im Umkehrschluss besitzen nicht-biokompatible Materialien einen negativen Einfluss auf die biologische Umgebung. Unverträglichkeiten äußern sich beispielsweise in dem Absterben von Zellen, Fibrose- oder Entzündungsreaktionen und werden unter anderem durch die Anwesenheit zytotoxischer Substanzen/Bedingungen oder von Verunreinigungen wie Bakterien-Endotoxine verursacht. Die Bioverträglichkeit von Materialien stellt somit eine Grundvoraussetzung für geeignete Zell-Matrix Kontakte dar.

Mechanische Stabilität

Der Einfluss der Elastizität bzw. Steifigkeit eines Materials auf das Verhalten verankerungsabhängiger Zellen ist in der Literatur bereits gut dargelegt (5, 24). Neben der Zellverankerung dient die Ausbildung von Fokalkontakten auch der Signalübertragung zwischen der Zelle und ihrer Zellumgebung bis zu 5 μm tief in die Matrix hinein (25). An die Substratsteifigkeit, die im Wesentlichen über das Elastizitätsmodul (E-Modul) beschrieben wird, werden in Abhängigkeit des Zelltyps unterschiedliche Anforderungen gestellt. Die Unterschiede reichen von Zellen menschlichen Weichgewebes wie Neuronen oder Adipozyten mit elastischen Umgebungen bis hin zu Knochen-harten Substraten für Osteoblasten. Die Wahrnehmung und Verarbeitung mechanischer Reize wurde insbesondere hinsichtlich der Zellanhaftung, Proliferation, Migration, Genexpression und Differenzierung demonstriert (5, 26–28). Nichtsdestotrotz beinhalten Standardkulturtechniken bis heute steife Zellkulturplastiken. Um den unterschiedlichen Anforderungen humaner Zellen gerecht zu werden, bedarf es Materialien mit einstellbarer, mechanischer Stabilität. In diesem Kontext werden vor allem Silikon-basierte Elastomere und biopolymere Gele, deren Steifigkeit über die Beschaffenheit ihrer Netzwerke reguliert werden kann, erforscht (29, 30).

Rauigkeit

Die Oberflächenrauigkeit (oder Topografie) einer Materialoberfläche, die von glatten zu rauen Profilen reicht, hat einen direkten Einfluss auf das Zellverhalten wie Adhäsion, Morphologie, Migration, Proliferation, Genexpression und Differenzierung (31, 32). Der Einsatz von Schleifmitteln, Plasmaverfahren und Säureätzungen sind gängige Methoden um verschieden raue Oberflächen zu generieren. Nano-, Mikro- und Makrorauigkeiten können dabei von Zellen unterschiedlich wahrgenommen und verarbeitet werden (33). Beispielsweise adhären Fibroblasten vermehrt auf glatten und Osteoblasten bevorzugt auf rauen Oberflächen (34). Die Rauigkeit von Materialoberflächen kann daher auch die Zellelektion begünstigen.

Benetzbarkeit

Einer der Schlüsselfaktoren für die Regulation zellulären Verhaltens stellt die Benetzbarkeit (Hydrophilität/Hydrophobität) der Materialoberfläche dar. Der Winkel, der nach dem Kontakt eines Flüssigkeitstropfens mit der Oberfläche entsteht, gibt Aufschluss über den hydrophilen/hydrophoben Charakter der Materialoberfläche. Im Falle eines Wassertropfens zeigen kleine

Kontaktwinkel ($\Theta < 90^\circ$) die Hydrophilität der Matrix an. Hydrophobe Materialoberflächen besitzen hingegen Kontaktwinkel von $\Theta \geq 90^\circ$ und werden ab 160° als superhydrophob bezeichnet. Insbesondere bei wasserbindenden Materialien wie Hydrogelen wird die sogenannte „*captive bubble*“-Methode angewendet, bei der eine Luftblase die mit Flüssigkeit umspülten Materialoberfläche kontaktiert und der sich gebildete Kontaktwinkel ausgewertet wird (35). Für die Adhäsion und Ausbreitung von Zellen haben sich hydrophile Materialien als günstig erwiesen. Je nach Zelltyp variiert der Bereich der Adhäsions-fördernden Benetzbarkeit. Für eine Vielzahl von verankerungsabhängigen Zellen führen Kontaktwinkel von 20° - 70° zur stabilen Zelladhäsion (34, 36).

Ladung

Verbunden mit der chemischen Komposition einer Matrix ist deren Ladung. Je nach Art der funktionalen Einheiten und der Beschaffenheit der Umgebung (z.B. pH-Wert) können unterschiedliche Ladungszustände vorliegen. Unter physiologischen Bedingungen besitzen beispielsweise Carboxylgruppen negative ($-\text{COO}^-$) und Aminogruppen positive ($-\text{NH}_3^+$) Ladungen. Es wurde festgestellt, dass Zellen auf Oberflächen mit höheren Ladungsdichten zunehmend adhärten (37). Generell gilt jedoch, dass gleiche Ladungen einander abstoßen und unterschiedliche Ladungen einander anziehen. Da die Membran einer Zelle unter anderem aus Proteinen, Polysacchariden und Phospholipiden besteht, ist die Nettoladung der Zellperipherie negativ (8). Matrixoberflächen mit negativen Ladungen sind infolgedessen abstoßend für Zellen sowie für die Mehrheit von Adhäsionsvermittelnden Proteinen. Im Umkehrschluss sind geeignete Oberflächen für die Zelladhäsion positiv geladen. Bisherige Studien zeigten, dass zunehmend positive Oberflächenladungen die Haftung von Zellen wie Fibroblasten (38, 39) und Osteoblasten steigerten (40, 41). Darüber hinaus besitzen positiv geladene Substrate einen Osteogenese-induzierenden Effekt auf MSCs (42–45).

2.1.3 Alginate als Beispiel für ein Stimulus-responsives Biomaterial

Gewinnung

Alginate ist ein saures Polysaccharid, das aus den Zellwänden von Braunalgen gewonnen wird und etwa 20-40% des Trockengewichts der Algen ausmacht (46). Für die Anwendung des Polymers als Verdickungsmittel in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie in technischer Qualität wird neben der komplett maschinellen Ernte auch angespültes, verunreinigtes Algenrohmaterial unbekanntem Ursprungs verwendet. Den Kontaminationen entgegenwirkend

werden Formaldehyd, UV-Strahlung und/oder hohe Temperaturen eingesetzt und damit gleichzeitig die strukturelle Beschaffenheit des Rohmaterials hin zu niedermolekularen Polymeren beeinflusst. Für die Gewinnung von ultra-hoch viskosem Alginat in medizinischer Qualität wurde von Zimmermann *et al.* ein Prozess entwickelt, der von der Ernte bis zur Anwendung darauf ausgelegt ist, die nativen, strukturellen Eigenschaften mit größtmöglicher Kettenlänge zu konservieren sowie die medizinische Reinheit und Sterilität zu gewährleisten (12, 47, 48). Darüber hinaus können Alginat im kleinen Maßstab in Bakterien mit spezifischen Monomeranteilen hergestellt werden (46, 49).

Eigenschaften

Das Polysaccharid Alginat besteht aus langen, linearen Ketten, die sich aus β -D-Mannuronsäure (M) und α -L-Guluronsäure (G) zusammensetzen und 1,4-glykodisch gebunden zu konsekutiven (MMM, GGG) und alternierenden Blöcken (MGM) arrangieren (Abbildung 3A). In Abhängigkeit der Algenspezies, des prozessierten Pflanzenteils und der Wachstumsbedingungen (Habitat, saisonale Einflüsse) variiert die Sequenz von M- und G-Monomeren (46). Im Wässrigen erfolgt in Anwesenheit von multivalenten Kationen wie z.B. Ca^{2+} , Ba^{2+} und Fe^{3+} -Ionen eine ionotrope Gelierung, bei der das Kation als Zentralatom von den umliegenden Sauerstoffatomen der homopolymeren GG-Blöcke koordinativ gebunden wird und sich eine ionische Vernetzung als sogenanntes „egg-box“-Modell ausbildet (Abbildung 3B).

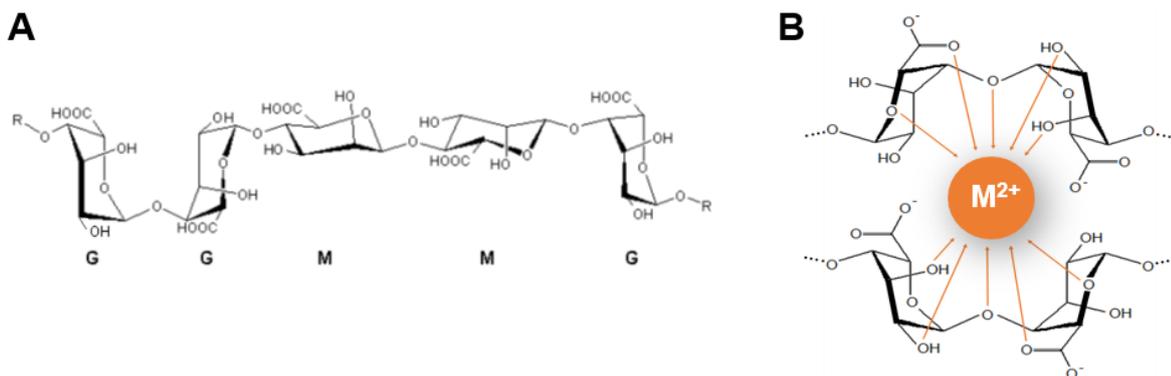


Abbildung 3: A Exemplarische Kettenformation von Alginat aus homogenen und heterogenen Blöcken bestehend aus Guluronsäure (G) und Mannuronsäure (M). B Modell der Komplexierung von Alginat mit divalenten Kationen zur Ausbildung eines Hydrogels.

Unter milden, physiologischen Bedingungen können derart elastische Hydrogele mit sehr hohen Wasseranteilen ($\geq 99\%$) (12) gebildet werden, deren mechanische und poröse Eigenschaften über das M/G-Verhältnis, die Kettenlänge, die Polymerkonzentration sowie die Art und Konzentration des Quervernetzter eingestellt werden können (11). Die Affinität der

divalenten Kationen nimmt gemäß der Reihenfolge $Mn^{2+} < Zn^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$ zu (50). Das Herauslösen der netzwerkstabilisierenden, divalenten Kationen und die damit einhergehende Gelverflüssigung lässt sich unter Zugabe von Komplexbildnern wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bewerkstelligen. Ebenso führen hohe, nicht-physiologische Konzentrationen an monovalenten Kationen wie Na^+ zur Verflüssigung der Alginatgele (11).

In Abhängigkeit vom pH-Wert liegen die freien Carboxylgruppen deprotoniert als $-COO^-$ (basisches Milieu) oder protoniert als $-COOH$ (saurer Milieu) vor. Der Ladungswechsel führt innerhalb des Polymernetzwerks zur Änderung des Gelvolumens. Im Säuren schrumpfen Alginatgele, während sich im Basischen die negativen Carboxylgruppen einander abstoßen und infolgedessen die Gele expandieren. Dieses pH-responsive Verhalten der Alginatgele wurde in der Vergangenheit insbesondere für die Substanzfreisetzung im sauren Milieu verwendet. Die pH-Gradienten zwischen normalen und einigen pathologischen Geweben (z.B. Tumore) sowie im gastrointestinalen Raum wurden ausgenutzt, um die in pH-responsiven Materialien immobilisierten Wirkstoffe freizusetzen (51).

Aufgereinigtes Alginat ist biokompatibel. Die bioinerten Eigenschaften der Alginatmatrizen beruhen auf deren negativen Nettoladungen und hohen Hydrophilie, die eine günstige Adsorption von zelladhäsionsvermittelnden Proteinen verhindern (29). Die adhäsionshemmenden Eigenschaften des Alginats sind insbesondere für die Immunisolation von Zellen von Interesse (18). Hingegen verlangt die Kultivierung von Adhäsionsabhängigen Zellen auf zwei- oder dreidimensionalen Alginatkonstrukten eine geeignete Matrixmodifikation, um die anti-adhäsiven Eigenschaften des Alginats zu überwinden.

Modifizierungsstrategien

Für die Funktionalisierung von Alginat liegen mit der Hydroxylgruppe ($-OH$), der Carboxylgruppe ($-COOH$) und der α -1,4-glykosidischen Bindung drei verschiedene Angriffspunkte vor, um die Struktur und infolgedessen die Eigenschaften des Polymers zu verändern (Abbildung 4).

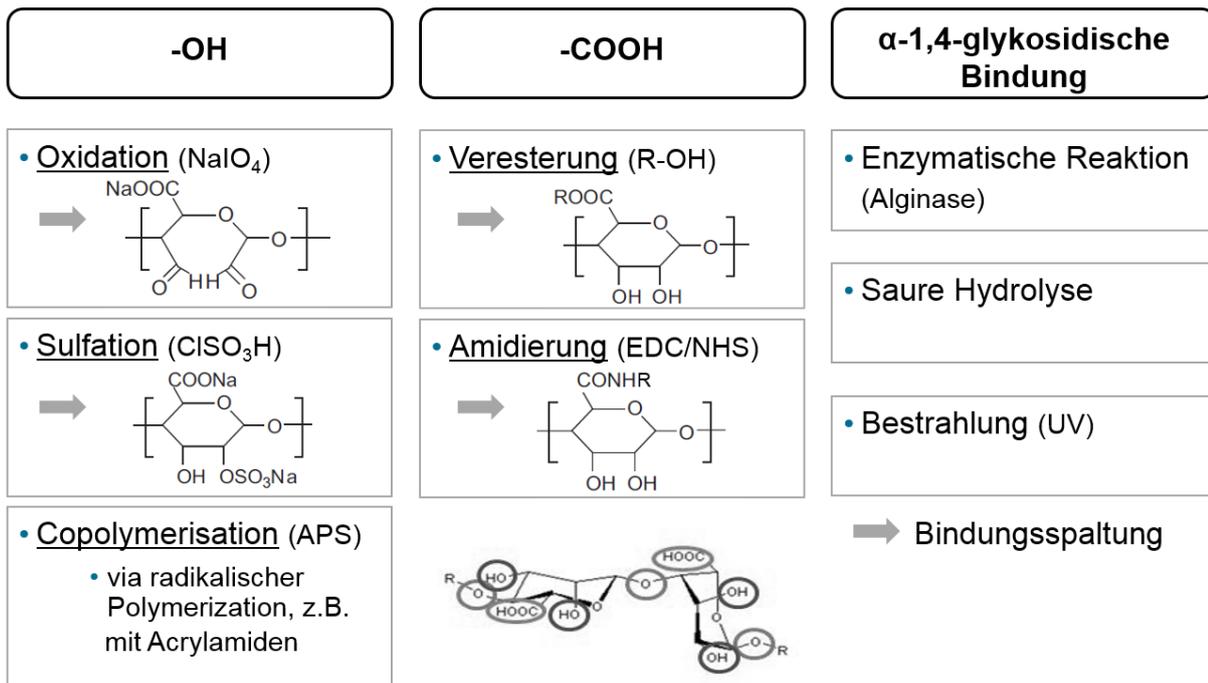


Abbildung 4: Funktionelle Gruppen des Alginats mit potentiellen Reaktionen zur Modifikation des Alginatgerüsts.

Im Falle der Hydroxylgruppen wurden in den letzten Jahren die Alginatstruktur über Oxidation (52, 53), Sulfation (54, 55) und Copolymerisierung (56) modifiziert. Mit Hilfe von Natriumperodat reagieren die OH-Gruppen an der C-2 und C-3 Position unter Spaltung der C-C-Bindung zu Aldehyden (-CHO). Die damit einhergehende Ringöffnung führt zu einer größeren Rotationsfreiheit, reduzierten Steifigkeit und schnelleren Degradation (52). Der Einsatz von Chlorsulfonsäure in Formamid resultiert in die Sulfatierung des Alginats, das durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Heparin gute Blutverträglichkeit und eine antikoagulierende Wirkung aufweist (57). Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung ist die Copolymerisation des Alginatrückgrats über die Generierung von Radikalen mittels Initiatoren wie beispielsweise Ammoniumpersulfat (APS) hin zur radikalischen Polymerisation mit Vinylmonomeren (58). Das Einführen neuer Polymerketten ist ein beliebtes Mittel um das native, hydrophile Alginat zu hydrophobisieren und sterisch sperriger zu gestalten.

Die Carboxylgruppe des Alginatmonomers kann in Anwesenheit eines Katalysators (z.B. konzentrierte Schwefelsäure) mit verschiedensten Alkoholen verestert und mit den eingebrachten Alkylgruppen die hydrophoben Eigenschaften des Polymers gesteigert werden (59). In der Praxis bedeutend häufiger angewandt wird jedoch die Amidierung der Carboxylgruppe mit Hilfe der Carbodiimide-Chemie. Die Reaktion mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) führt im Wässrigen zur

Aktivierung der Carboxylgruppe unter Bildung eines labilen Intermediats, das mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) stabilisiert werden kann. An den entstandenen Alginatester können infolgedessen Moleküle mit einer terminalen Aminogruppe unter Bildung einer Amidbindung konjugiert werden (29).

Die Modifizierung der α -1,4-glykosidischen Bindung geht mit der Spaltung der Bindung und damit der Polymerkette einher. Die Behandlung von Alginat im sauren Milieu (60), mit UV-Strahlung (61) oder dem Polymer-spezifischen Enzym Alginase (62) führt zu niedermolekularen Alginaten. Bereits bei der Aufreinigung des Algenmaterials wird in der kommerziellen Großproduktion UV-Bestrahlung zur Desinfektion eingesetzt und folglich die Kettenlängen von Anfang an klein gehalten. Die Konservierung der nativen, hohen Kettenlängen ist jedoch insbesondere im Hinblick auf die zelluläre und klinische Anwendung von großer Bedeutung, da kleine Molekülmassen an Alginat mit vermehrter Gewebefibrose assoziiert wurden (63). Insofern keine gezielte Alginatdegradation gewünscht ist, ist auf den Einsatz von Säuren, UV-Strahlung und des Enzyms Alginase weitestgehend zu verzichten.

Bei der Funktionalisierung von unvernetztem Alginat ist zu berücksichtigen, dass bei zu hohen Modifizierungsgraden die Gelbildung ausbleiben kann, da für den Gelierungsprozess des Alginats mit divalenten Kationen die Sauerstoffatome der Hydroxyl- und Carboxylgruppen rekrutiert werden. Die Herausforderung besteht darin, das Alginat in dem Maße zu modifizieren, dass die gewünschte Eigenschaftsänderung eintritt, jedoch noch ausreichend freie funktionelle Gruppen für die Stabilisierung der divalenten Kationen vorliegen. Um dies zu umgehen, stellt die Funktionalisierung bereits gelierter Alginatgele eine alternative Modifizierungsstrategie dar.

Anwendung

Alginat finden vor allem in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie als Zusatzstoffe (E401-E405) zur Viskositätserhöhung und als Geliermittel Anwendung (50). Zum Einsatz kommen dabei Alginat unterschiedlicher Reinheit und Molekülmassen. Die Anforderungen an das Material für pharmazeutische und medizinische Anwendungen sind jedoch bedeutend höher. Neben der Sterilität des Materials ist es erforderlich den Grad an Verunreinigungen wie beispielsweise durch Proteinen, Polyphenolen, Schwermetallen und Bakterien-Endotoxinen so gering wie möglich zu halten, um die Verträglichkeit zu gewährleisten. Hochmolekulare Substrate zeigten darüber hinaus reduzierte Gewebefibrosen nach Implantation (63). Insbesondere für die Immobilisierung von Makromolekülen, Partikeln und Zellen finden

Alginate höherer Qualität Anwendung. Sie dienen z.B. als Depot für die kontrollierte Abgabe von Wirkstoffen (64) oder als immunprotektive Hülle von Faktor-produzierenden Zellen (19). Neben der Verwendung als Wundauflage (65, 66) werden Alginat zudem in der Gewebetechnik als Gerüststrukturen eingesetzt (67, 68).

2.2 Rolle der Proteine im Kontext von Zell-Matrix-Kontakten

Tritt ein Biomaterial mit einer biologischen Flüssigkeit wie z.B. Blut oder Zellkulturmedien in Kontakt, beginnen (Serum-)Proteine binnen Millisekunden auf der Matrixoberfläche zu adsorbieren. Dieser als Proteinadsorption bezeichnete Prozess hat zur Folge, dass die Biomaterialoberfläche von einer dynamischen Proteinschicht bedeckt wird, die als Mediator zwischen Zellen und Matrix agiert (Abbildung 5). Ist eine Matrix nicht mit Proteinen oder entsprechenden Rezeptoren ausgestattet, finden Zellen keine Bindungsstellen vor und können auf der Oberfläche nicht adhären. Folglich ist eine geeignete Proteinadsorption auf der Matrixoberfläche essentiell für die Zelladhäsion (8). In den folgenden Kapiteln werden daher die jeweiligen Protein-Matrix und Zell-Protein Interaktionen näher beleuchtet.

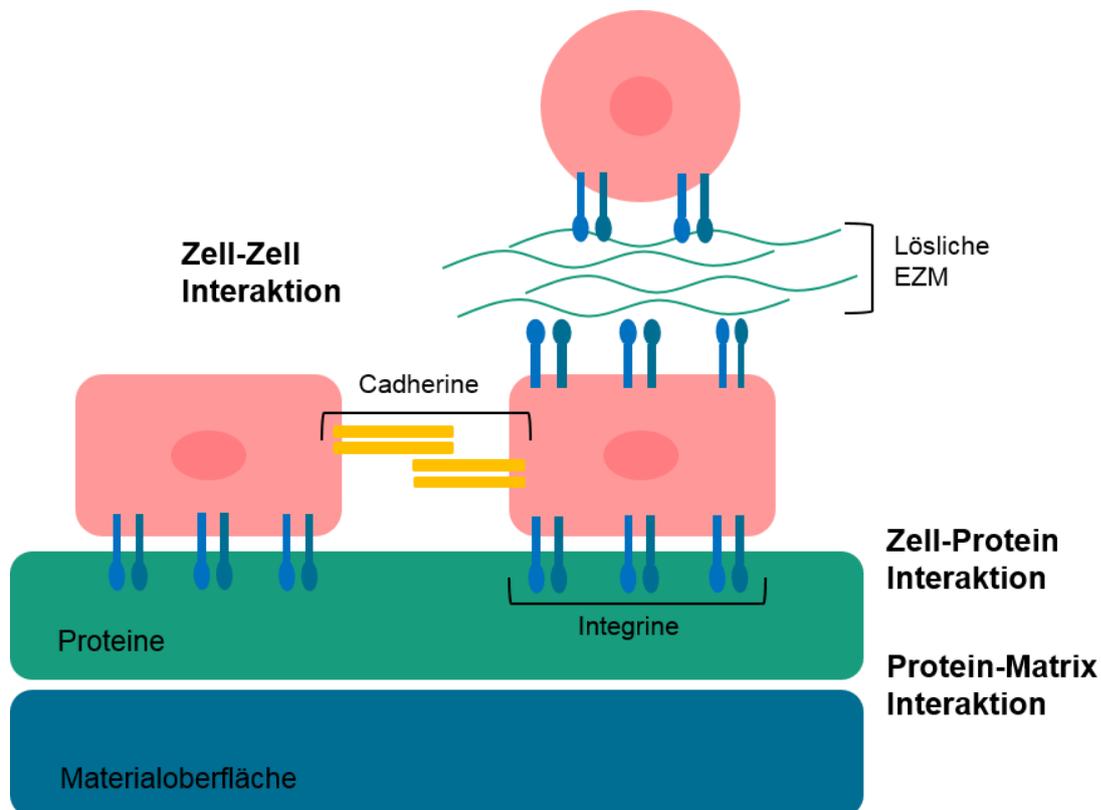


Abbildung 5: Schematische Abbildung Protein-medierter Zell-Matrix und Zell-Zell Kontakte. An Matrix-adsorbierten Proteinen adhären Zellen über Integrine. Cadherine und gelöste extrazelluläre Matrix (EZM) ermöglichen Zell-Zell Wechselwirkungen. Abbildung abgeändert aus (69).

2.2.1 Protein-Matrix Interaktionen

Die Adsorption von Proteinen auf der Matrixoberfläche ist ein Wechselspiel, das von mehreren Parametern beeinflusst wird. Zunächst bestimmt die Konzentration an gelösten Proteinen die Menge an adsorbierten Proteinen. Hier gilt: Je mehr Proteine zur Verfügung stehen, desto mehr Proteine binden an der Materialoberfläche. Proteine mit geringerer Molekülgröße erreichen dabei die Matrix schneller als größere, diffusionsgehinderte Proteine und binden zuerst. Gemäß dem Vroman-Effekt können im weiteren Verlauf Proteine mit einer höheren Affinität zur Oberfläche die bereits gebundenen Proteine ersetzen und stärkere Bindungen zur Matrix aufbauen (70). Neben den Proteinen selbst sind die Protein-Matrix Interaktionen stark von der Materialoberfläche beeinflusst. In Abhängigkeit der Matrixeigenschaften adsorbieren spezifische Proteine in unterschiedlicher Quantität und Bioaktivität (Abbildung 6).

Eigenschaft der Matrixoberfläche	Proteinadsorption	
	Hoch	Gering
Benetzbarkeit	Hydrophob	Hydrophil
Ladung	Positiv	Negativ
Topographie	Rau	Glatt
Chemie	-CH ₃ , -NH ₂	-OH, -COOH

Abbildung 6: Einfluss der Beschaffenheit einer Matrixoberfläche auf die Adsorption von Proteinen.

Im Wässrigen richten sich die hydrophoben Einheiten der Proteine zum Inneren der 3D-Struktur und die hydrophilen Domänen zur Grenzfläche aus. Im Falle einer hydrophoben Matrixoberfläche werden die verborgenen hydrophoben Proteineinheiten durch Faltungsprozesse freigelegt und interagieren anschließend mit der Matrix über hydrophobische Interaktionen. Entscheidend für die Entfaltung sind die Proteinstruktur und dessen Stabilität. Thermodynamisch labilere Systeme neigen dazu sich leichter zu entfalten als thermodynamisch stabilere. Mit der Änderung der Konformation kann jedoch ein Verlust der Proteinaktivität einhergehen, sodass Quantität nicht mit Aktivität gleichzusetzen ist (8, 71). Besitzt die Matrixoberfläche einen hydrophilen Charakter, so wechselwirken die

hydrophilen Aminosäuren in der Peripherie über ionische Bindungen mit dem Material. Positiv geladene Regionen interagieren dabei bevorzugt mit negativeren Domänen und umgekehrt. Infolgedessen kann über einen Ladungstransfer eine stabilisierende Ladung zwischen den unterschiedlich geladenen Partnern übertragen werden und zur Protein-Matrix Interaktion führen (72). (Serum-)Proteine besitzen zum größten Teil negative Nettoladungen und adhäreren vermehrt an positiv geladenen Matrixoberflächen. Die aus Aminosäuren bestehenden Proteine können mit den vorliegenden Aminogruppen ($-\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$) jedoch auch positive Ladungen aufweisen und an negativ geladene Oberflächen adhäreren. Die beschriebene Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Benetzbarkeit und Ladung der Matrix lässt sich gezielt über die Chemie der Materialoberfläche steuern. So führen neutrale, hydrophobe funktionelle Gruppen wie Methylgruppen ($-\text{CH}_3$) sowie positiv geladene Aminogruppen ($-\text{NH}_3^+$) zu einem hohen Gehalt Matrix-adsorbierter Proteine und neutrale, hydrophobe Hydroxylgruppen ($-\text{OH}$) sowie negativ geladene Carboxylgruppen ($-\text{COO}^-$) zu geringen Proteinadsorptionen auf der Matrixoberfläche (73, 74). Damit einhergehend werden besonders hydrophile Materialien als „*non-fouling*“ bzw. „*anti-fouling*“-Oberflächen bezeichnet. Neben der Hydrophilie und Ladung der Matrix kann die Quantität der adsorbierten Proteine auch über die Topografie der Materialoberfläche beeinflusst werden. Raue, unebene Materialoberflächen bieten im Vergleich zu glatten Matrizen eine größere Fläche zur Proteinadsorption an (75). Über gezielte Strukturierungen lassen sich infolgedessen die Interaktionen zwischen der Matrix und den Proteinen erhöhen und somit größere Proteinmengen für die Wechselwirkungen mit Zellen generieren.

2.2.2 Zell-Protein Interaktionen

Die in unterschiedlicher Quantität und Konformation/Aktivität vorliegenden, Matrix-adsorbierten Proteine stellen die direkten Bindungsstellen für die Adhäsion von Zellen dar. Eine entscheidende Rolle für Zell-Protein-Interaktionen kommt der Klasse der Integrine als Adhäsionsrezeptoren zu. Integrine sind Transmembranproteine der Zellen und bilden ein Bindeglied zwischen dem Zytoskelett und adhäsiven Glykoproteinen wie beispielsweise Fibronectin, Laminin und Kollagen (76, 77). Die Adhärenz-Verbindungen von Zellen mit der Matrix-adsorbierten Proteinschicht werden als Fokalkontakte bezeichnet, die über die Zellverankerung hinaus auch zur Übertragung von Signalen zwischen der Zelle und ihrer Zellumgebung dienen (Abbildung 7). Informationen zur zellulären Umgebung wie beispielsweise Topografie und mechanische Stabilität werden über die Fokalkontakte direkt

ins Zellinnere gesendet und zum Beispiel in der Beschaffenheit des Zytoskeletts verarbeitet (78).

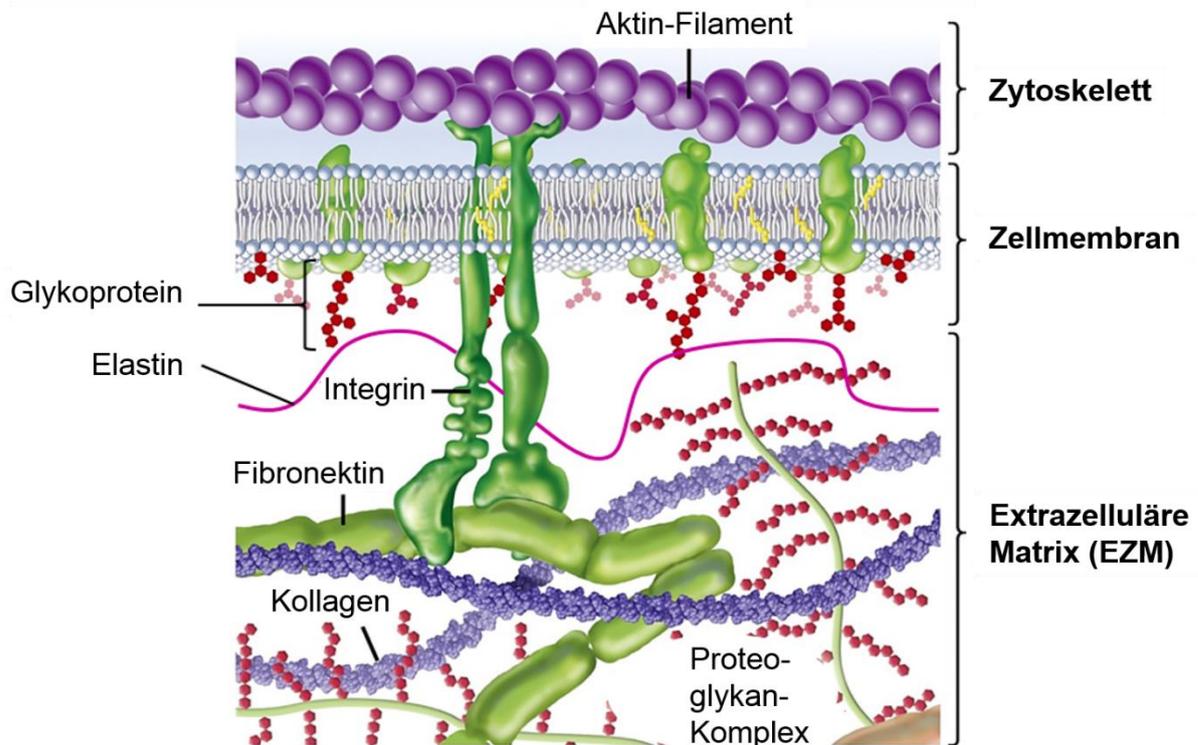


Abbildung 7: Schematische Komposition der extrazellulären Matrix und Abbildung eines Fokalkontakts. Abbildung abgeändert aus (79).

Die Ausbildung von Fokalkontakten ist ein mehrstufiger Prozess, der das initiale Erkennen der Oberfläche und die ersten, wenigen Bindungen zwischen den Integrinen und den Adhäsionsmolekülen sowie die Ausbildung weiterer Kontakte mit zunehmender Zellausbreitung umfasst (80). Die Abwesenheit von adhäsiven Glykoproteinen unterbindet die Ausbildung von Fokalkontakten und resultiert in Cadherin-vermittelten Zell-Zell Kontakten in Suspension hin zur Bildung von Zellagglomeraten. Nicht alle Zellen sind fähig frei oder als Agglomerate in Suspension zu existieren. So gibt es verankerungsabhängige Zellen deren Viabilität und Funktionalität stark von der Ausbildung von Fokalkontakten bedingt ist (81). Zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung werden von den vorherrschenden Zell-Protein Interaktionen bestimmt. Adhärenz Zellen sekretieren darüber hinaus Makromoleküle wie Proteine, die eine sogenannte extrazelluläre Matrix (EZM) ausbilden. Neben Kollagen, Elastin und Proteoglykanen finden sich auch Wachstumsfaktoren in der EZM wieder, die es gemeinsam mit frei diffundierenden Kohlenhydraten und weiteren löslichen Molekülen zu einer dynamischen und komplexen Zellumgebung machen (81–83).

2.3 Humane Zellsysteme

Der menschliche Körper besteht aus über 200 verschiedenen Zelltypen, die in unterschiedlichsten Umgebungen mit spezifischen Funktionen ausgestattet sind. Die ersten, humanen Zellen, die gezielt außerhalb des menschlichen Körpers kultiviert worden sind, waren 1952 die von der Patientin Henrietta Lacks isolierten Tumorzelllinie HeLa (4). Seither entwickelten sich rasant Zell-spezifische Kultivierungsprotokolle für verschiedenste, humane Zelltypen. Mit der Kultivierung humaner Zellen wurden bereits und werden zukünftig Zell-basierte Krankheitsmodelle, Therapien und Analyseverfahren ermöglicht.

2.3.1 Mesenchymale Stammzellen

Im Jahr 1966 beschrieb Friedenstein als Erster humane mesenchymale Stammzellen (MSCs) (84), die im undifferenzierten Zustand im Gewebe vorliegen und das Potential besitzen in mesodermale Zelltypen (Knochen, Knorpel, Fett und Muskel) zu differenzieren (9). Die Existenz humaner MSCs wurde bereits in adulten Geweben wie beispielsweise im Knochenmark, Fettgewebe und Blut als auch in neonatalen Geweben wie der Plazenta und im Nabelschnurblut und -gewebe (Wharton'sche Sulze) bestätigt (85, 86). Zunächst kritisch beäugt, zeigte sich binnen der letzten 50 Jahre das vielversprechende Potential der MSCs. Neben der Multipotenz konnten zudem die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (87), Immunmodulation (88) und Unterstützung zur Regeneration geschädigter Zellen/Gewebe durch gezielte Migration (89), Hemmung der Ausschüttung von Cytokinen (88) und Sekretion regenerationsfördernder Faktoren (86, 90) den MSCs zugeschrieben werden. Im menschlichen Organismus sind die MSCs daher unter anderem für die Gewebe-Homöostase zuständig. Dem zu Grunde liegend besitzen MSCs unter anderem ein großes Potential für regenerative, therapeutische Anwendungen. Im Rahmen von Knochenmarktransplantationen und Knochenheilungsprozessen zeigten MSCs bereits klinische Erfolge (10) und wurden weitergehend zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, Herzinfarkten und Nierenversagen untersucht. Durch die immunsuppressiven Eigenschaften der MSCs besteht zudem das Potential allogener Transplantationen.

Um die therapeutischen Möglichkeiten der MSCs ausschöpfen zu können, bedarf es geeigneter und kontrollierter Kultivierungsbedingungen. Die verankerungsabhängigen Zellen zeigen in der Zellkultur eine heterogene Morphologie. Darüber hinaus können MSCs in Abhängigkeit des biologischen Ursprungs und der Isolierungsmethode unterschiedliche Genexpressionen aufweisen (91). Infolgedessen wurden 2006 von der *International Society of*

Cellular Therapy Mindestkriterien für die Definition von MSCs vorgeschlagen (92). Dem folgend müssen MSCs in der Lage sein unter Standardzellkultur-bedingungen auf Plastik zu adhären, *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren und die MSC-spezifischen Marker Endoglin (ENG), 5'-Nukleotidase (NT5E) und THY1 zu exprimieren.

2.3.2 Induziert-pluripotente Stammzellen

Ein noch höheres Entwicklungspotential als die multipotenten mesenchymalen Stammzellen besitzen pluripotente Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen in die Zelltypen des mesodermen, endodermen und ectodermen Keimblatts zu differenzieren. Seit der Pionierarbeit von Takahashi und Kollegen im Jahr 2006 ist es möglich, durch Umprogrammierung von adulten Zellen sogenannte induziert-pluripotente Stammzellen zu generieren (93). Das Einführen von Pluripotenzfaktoren in adulte Zellen, z.B. durch retrovirale Transduktion, ist im Gegensatz zur Bereitstellung pluripotenter embryonaler Stammzellen ethisch unbedenklich. Mit der Generierung humaner induziert-pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) eröffnete sich ein enormes Potential unter anderem für die personalisierte Medizin durch die Herstellung Patienten-spezifischer Zellen und Krankheits-spezifischer Modellsysteme. Der klinische Einsatz von hiPSC-basierten Systemen birgt nach Transplantation jedoch die Herausforderung möglicher Teratombildung (94). Somit wird vor der klinischen Anwendung ein Nachweis abgeschlossener bzw. gerichteter Differenzierung notwendig. Die Eigenschaft zur nahezu unbegrenzten Selbsterneuerung ermöglicht die Expansion der Zellen *in vitro*. Die adhärenzte Kultivierung erfolgt im Allgemeinen auf Protein-beschichteter Zellkulturplastik als mehrzellige Kolonien oder als Einzelzellen.

2.3.3 Zellen des retinalen Pigmentepithels

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist eine zelluläre Monoschicht der Netzhaut im Auge, die sich zwischen der Aderhaut und den Photorezeptoren befindet und essentielle Funktionen für den Sehprozess übernimmt. Im Gegensatz zu den Stammzellen sind RPE-Zellen spezialisierte Zellen, die im menschlichen Organismus die Blut-Retina-Barriere formen (95). Die durch Melanin schwarz pigmentierten Zellen absorbieren überschüssiges Licht und verhindern derart störende Lichtreflexionen im Auge (96). Darüber hinaus versorgen die hexagonal geformten RPE-Zellen die Photorezeptoren mit Nährstoffen und sind bei der Erneuerung und beim Abbau von Photorezeptoraußensegmenten beteiligt (97). Die altersbedingte Abnahme der Funktionsfähigkeit von RPE-Zellen beeinflusst daher nicht nur die RPE-Zellen selbst

sondern auch die umliegenden Strukturen und steht im direkten Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern, insbesondere der altersbedingten Makuladegeneration (98). Die Degeneration des RPE in der Makula, dem Bereich des schärfsten Sehens, kann zu starken Sehbehinderungen (z.B. Schwierigkeiten beim Lesen, Erkennen von Gesichtern und Autofahren) bis hin zur Erblindung führen. Ein Therapieansatz gegen die Makuladegeneration stellt die Bereitstellung neuer, *in vitro* kultivierter RPE-Zellschichten dar (99, 100).

ARPE-19 ist eine RPE-Zelllinie, die 1986 durch Aotaki-Keen von den gesunden Augen eines 19-jährigen, männlichen Spenders isoliert wurde, der nach einem Motorradunfall durch ein Schädeltrauma ums Leben kam (101). Nach mehreren selektiven Trypsinierungen entstanden uniforme Epithelzellen mit hohem Wachstumspotential, die eine pigmentierte Monozellschicht mit dichten Verbindungen (*tight junctions* von 50-100 Ohm/cm²) ausbilden und die RPE-spezifischen Marker CRALBP und RPE65 exprimieren. Bereits seit Jahrzehnten werden ARPE-19 Zellen, die strukturelle und funktionelle Eigenschaften von RPE-Zellen besitzen, als Zellmodell für *in-vitro*-Studien genutzt (101–103).

3 Material und Methoden

Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil von eigenen, bereits veröffentlichten Originalarbeiten (15, 16, 104–106).

3.1 Herstellung von Alginat-Substraten

3.1.1 Gewinnung, Prozessierung und Reinigung von Alginat

Algernernte

Hinweis: Teile dieses Unterkapitels sind Bestandteil eines zur Publikation vorbereiteten Manuskripts (107).

Die Ernte der in Chile heimischen Braunalgen *Lessonia trabeculata* (LT) und *Lessonia nigrescens* (LN) erfolgte im September 2014 sowie im März und Oktober 2015 (Abbildung 8).

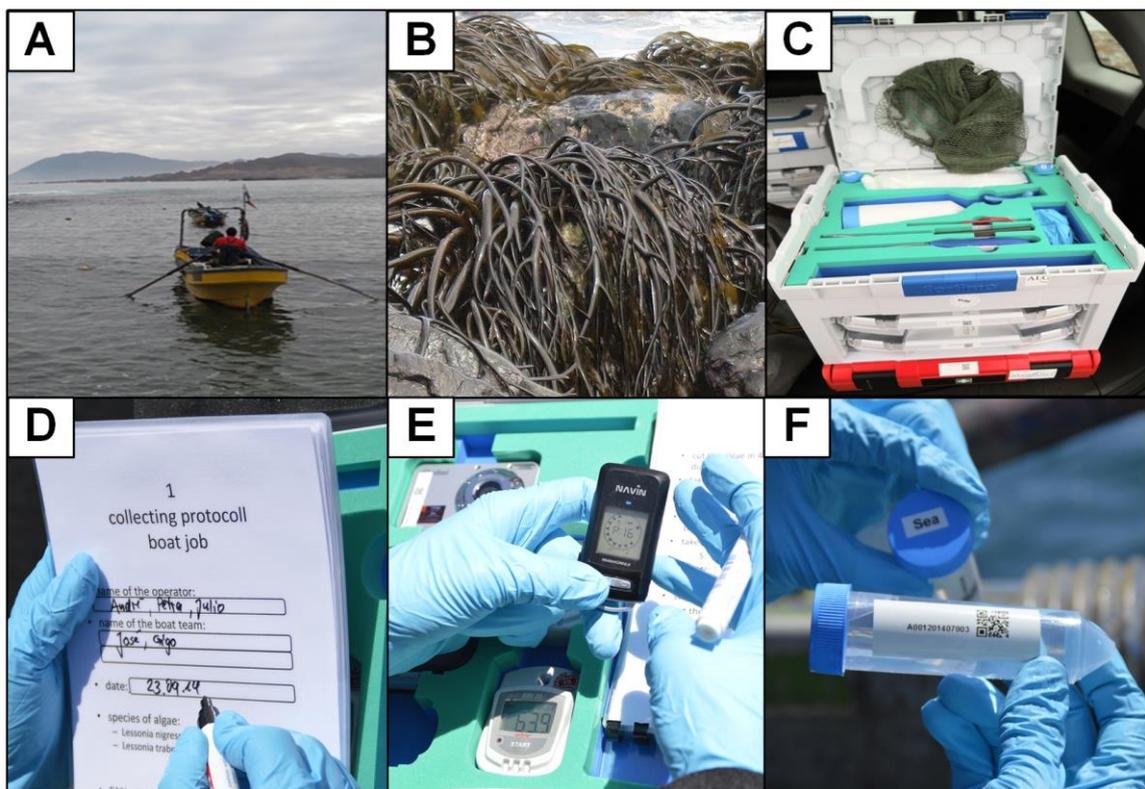


Abbildung 8: Standardisierung und Evaluation des Ernteprozesses der Algen *Lessonia trabeculata* (subtidal (A)) und *Lessonia nigrescens* (tidal, (B)) mit Hilfe eines GMP-konformen Algensammel-Kits (C) inklusive eines Protokolls mit Handlungsanweisungen und Möglichkeit der Daten-Dokumentation (D), eines GPS-gestützten Ortungsgeräts zur geografischen Positionsbestimmung und Datenlogger hinsichtlich der Temperatur und Luftfeuchte (E) sowie Aufbewahrungsbehälter für Wasserproben (F).

Die LT-Ernte erfolgte ortsaufgelöst (GPS-gestütztes Ortungsgerät; miniHomer, Navin, València, Spanien) in der Subtidalzone von Punta de Lobos ($28^{\circ} 35''$ S, $71^{\circ} 02''$ W ± 5 km, Abbildung 8 A). LN-Proben wurden in der intertidalen Zone von Mineral de Talca ($30^{\circ} 5''$ S, $71^{\circ} 40''$ W ± 5 km) gesammelt (Abbildung 8 B). Für eine standardisierte Durchführung und Evaluation des Ernteprozesses wurden GMP-konforme Algensammel-Kits (Alginattec, Riedenheim, Deutschland) eingesetzt (Abbildung 8 C). Es wurde ein 21-seitiges Protokoll mit Arbeitsanweisungen und Möglichkeiten der Datendokumentation erstellt und genutzt, das die Prozessschritte für die verschiedenen Algenspezies erfasste (Abbildung 8 D). Das Habitat der Algen und der Verlauf der Ernte wurde zum einen zeitlich und mit Hilfe eines GPS-gestützten Ortungsgerät örtlich charakterisiert. Zum anderen wurden die Umgebungstemperatur und Luftfeuchte als saisonale Konditionen mit Dataloggern (EBI 20-TH1, Ebro, Ingolstadt Deutschland) dokumentiert (Abbildung 8 E). Eine Probenahme von 2×50 mL Wasser direkt vom Wachstumsort der Alge erfolgten für die potentiellen Analysen des Wassers auf u.A. Salze und Mikroorganismen (Abbildung 8 F). Es wurden ausschließlich Stiele optisch einwandfreier Algen mit einem Durchmesser von 2-4 cm als 40-80 cm lange Proben von der Pflanze getrennt und je 10 ± 2 kg Material pro UV-protektivem Beutel zusammengefasst. Mit einem Strichcode-gekennzeichneten Kabelbinder wurde das Ortungsgerät an den Probenbehälter angebracht und die Algen-beladenen Beutel verschlossen.

Algentransport

Der Transport gesammelter Algen erfolgte in UV-protektiven Beuteln, in denen Datalogger (EBI 20-TH1, Ebro, Ingolstadt Deutschland) die Temperatur und Feuchte protokollierten und die mit einem Strichcode-gekennzeichneten Kabelbinder verschlossen waren (Abbildung 9 A). Ein GPS-gestütztes Ortungsgerät (miniHomer, Navin, València, Spanien) zeichnete den zurückgelegten Transportweg auf (Abbildung 9 B). Nach Ankunft der Algenproben im chilenischen Prozesslabor erfolgte die Kontrolle des Transportes durch die Auswertung der Temperatur- und Feuchtekurven der Datalogger. Es wurden ausschließlich Algen aus Probenbehältern weiterprozessiert, die über die gesamte Dauer des Transports verschlossen waren (kontinuierliches Luftfeuchte-Plateau bei $rH = 100\%$) und eine Temperatur ≤ 50 °C zeigten (Abbildung 9 C).

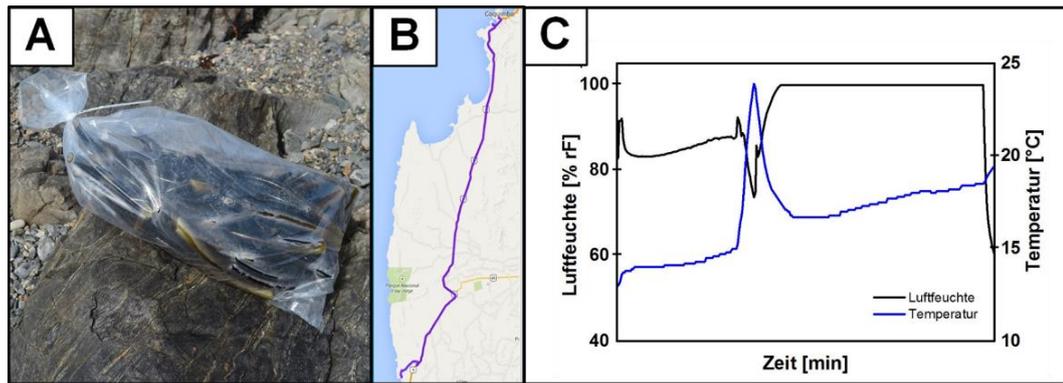


Abbildung 9: Standardisierung und Evaluation des Transports standardisiert geernteter Algenstiele in UV-protectiven, per Strichcode-zugeordneten Beuteln (A) ausgestattet mit einem GPS-gestützten Ortungsgerät zur Verfolgung von Ort und Zeit des Transportvorgangs (B) sowie einem Datenlogger für die Dokumentation der Temperatur und Feuchte innerhalb des Probenbehälters (C).

Veredelungsprozess gesammelter Algen

Nach der Ernte und dem Transport der Algen wurde ein Veredelungsprozess durchgeführt (Abbildung 10, Tabelle 2).

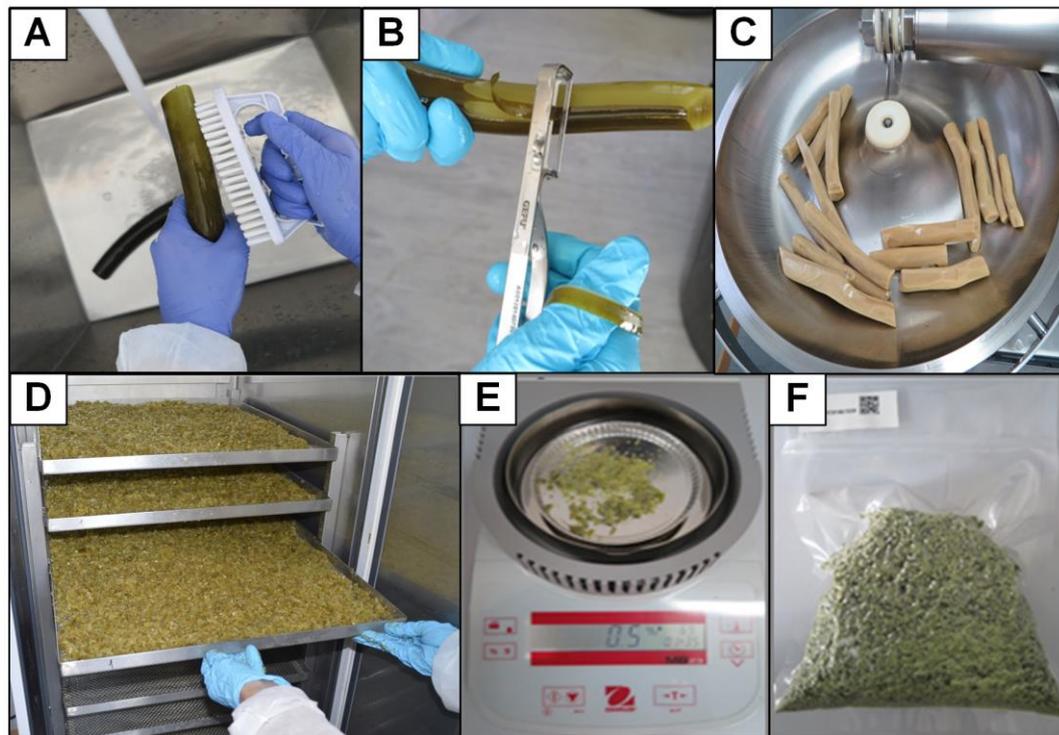


Abbildung 10: Standardisierung und Evaluation der Prozessierung von Algenstielen. (A) Waschen und Bürsten; (B) Entfernen von Verunreinigungen in der Schale; (C) Zerkleinern der unterschiedlich großen Stiele zu ≤ 1 cm großen Granulaten; (D) Temperatur- und Feuchtekontrollierte Trocknung bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$; (E) Bestimmung der Restfeuchte des getrockneten Algengranulats (Bedingung: $rH \leq 0,5\%$); (F) Transport und Lagerung in Vakuum-verpackten, QR-gekennzeichneten Beuteln je 250 g prozessiertem Algengranulat.

Tabelle 2: Standardisierte Prozessschritte zur Veredelung gesammelter Makroalgen.

Prozessschritt	Kriterium
Reinigung von Oberflächen und Instrumenten mit ATP-basiertem Hygienestandard	≤ 3000 RLU
Waschen, Bürsten, Schälen	Oberflächliche Verunreinigungen sind entfernt
Zerkleinerungsprozess	≤ 1 cm große Granulate
Trocknung bei 50 °C	$rH \leq 0,5\%$
Verpacken in QR-Code gekennzeichneten, UV-protektiven Beuteln	250 ± 5 g
Anlegen von Vakuum	Vakuum

Die Algenstiele wurden einer oberflächlichen Reinigungsprozedur unterzogen und anschließend durch Schälen von den Mikroorganismen in der Algenschale befreit (Abbildung 10 A/B). Ein ATP-basierter Hygienestandard kontrollierte die Verunreinigung aller verwendeten Oberflächen und Instrumente, um das Einbringen zusätzlicher Mikroorganismen zu vermeiden. Ausschließlich Oberflächen mit ATP-Werten ≤ 3000 RLU wurden für die Prozessierung der Algen verwendet. Im Falle höherer ATP-Werte erfolgte eine Reinigung mit Wasser und Ethanol bis der ATP-Grenzwert unterschritten wurde. Ein einheitlicher Größenstandard des Algenmaterials wurde durch das Zerkleinern der 2-4 cm dicken und 40-80 cm langen Algenstiele zu ≤ 1 cm großen Granulaten etabliert (Abbildung 10 C/D). Die Trocknung der Algengranulate wurde von einem offenen System im chilenischen Hochgebirge mit einem Risiko von Temperatur- und Feuchteschwankungen sowie dem potentieller Verunreinigungen hin zu kontrollierten Laborbedingungen im Trockenschrank bei 50 °C mit Temperatur- und Feuchtedokumentation optimiert (Abbildung 10 D). Zudem wurde ein Abbruchkriterium der Algentrocknung bei einer Restfeuchte des Algengranulats von $rH \leq 0,5\%$ eingeführt (Abbildung 10 E). Durch Zugabe eines Silberion-haltigen Präparats und Anlegen eines Vakuums wurden Arbeitsabläufe hinsichtlich der Unterdrückung mikrobiellen Wachstums während des Transports und der Lagerung des Algenmaterials dem Prozess hinzugefügt. Derart entstanden Vakuum-verpackte Chargen je 250 g getrockneten Algengranulats, die anschließend mit einem entsprechenden QR-Code gekennzeichnet zur weiteren Verarbeitung nach Deutschland verschickt wurden

(Abbildung 10 F). Das angelegte Vakuum diente darüber hinaus auch als Kontrolle über den Verschluss der Probenbehälter. Es wurden ausschließlich Probenbehälter für die Extraktion von Alginat aus den getrockneten Algengranulaten verwendet, bei denen nach dem Transport und der Lagerung das Vakuum fortbestand.

Extraktion von Alginat aus Braunalgen

Der Extraktionsprozess von Alginaten klinischen Grades wurde gemäß der publizierten Methodik von Zimmermann *et al.* (47, 108) unter Reinraumbedingungen durchgeführt und umfasste sowohl die Rehydratisierung und Aufreinigung der Algen als auch die Extraktion von Alginat aus den Algen mit Hilfe von Komplexbildnern sowie die sich anschließende Alginataufreinigung über Vor- und Sterilfiltration und mehrfacher, ethanolischer Fällung. Verwendet wurden ausschließlich Materialien besonderer Reinheit wie beispielsweise Wasser für Injektionszwecke (WFI; Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) und Ethanol zur Analyse (Emsure[®], VWR, Darmstadt, Deutschland). Im Falle von LN erfolgte die Alginatextraktion aus der Alge mit Hilfe von Iminodisuccinat (Baypure[®]; Lanxess, Leverkusen, Deutschland) und bei LT nach einem Säureaufschluss mit 5%iger Salzsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) durch die Komplexbildner Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Natriumgluconat (Merck, Darmstadt, Deutschland). Das Alginat wurde als Kaliumalginat gefällt und entwässert bei 4 °C gelagert.

Zur Dokumentation und Evaluation dieser Prozessschritte wurde eine photometrische Überwachung der Prozesslösungen mittels UV/VIS-Spektroskopie (Photometer: DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, USA) etabliert (Abbildung 11). Durch mehrfaches Waschen der Algengranulate mit Wasser und Ethanol wurden sowohl wässrige als auch organische Verunreinigungen wie beispielsweise der Farbstoff Chlorophyll ($\lambda = 400-500$ nm und $\lambda = 600-700$ nm) aus den tidal wachsenden LN herausgewaschen. Alginat, das aus der Alge extrahiert wurde, wurde bei einer Absorptionswellenlänge um 210 nm nachgewiesen. Neben dem Alginat wurde zudem die Anwesenheit weiterer organischer Substanzen wie z.B. Proteine ($\lambda = 220-280$ nm), Fucoidan ($\lambda \sim 250$ nm) und die eingesetzte Zellulose ($\lambda = 250-400$ nm) untersucht.

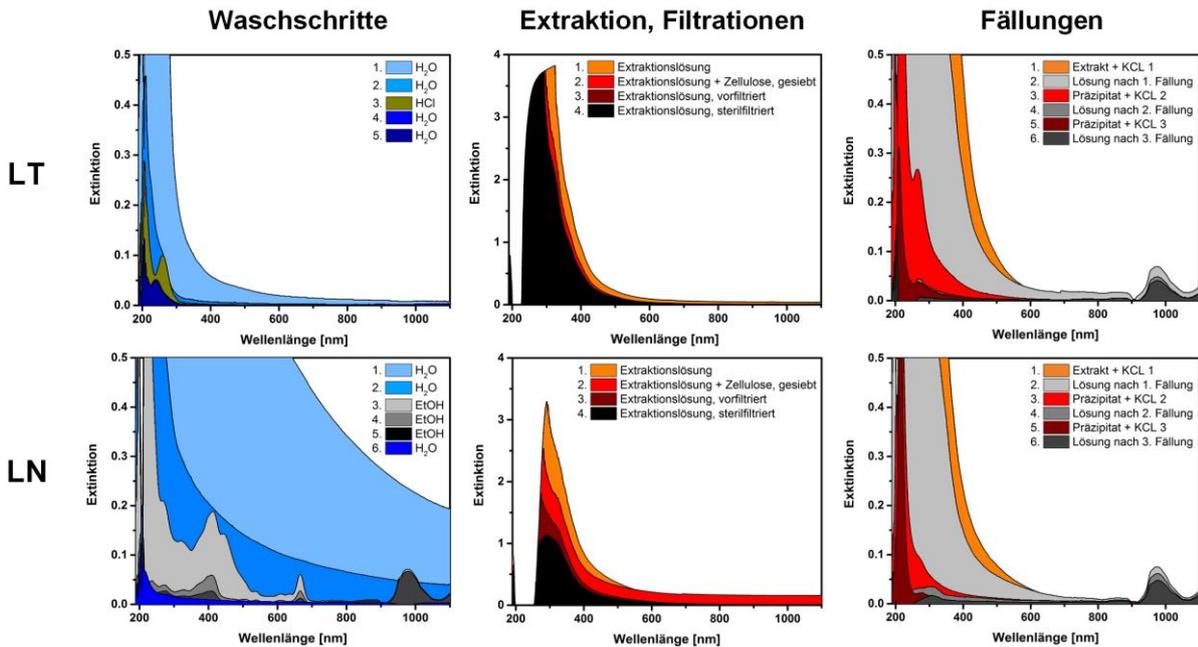


Abbildung 11: Photometrische Dokumentation und Kontrolle verschiedener Lösungen des Extraktions- und Aufreinigungsprozesses von Alginate aus getrockneten Granulaten der Algen *Lessonia trabeculata* (LT) und *Lessonia nigrescens* (LN). Dargestellt sind repräsentative UV/VIS-Absorptionsspektren.

3.1.2 Herstellung verschiedener Gelstrukturen

Alginategelschichten

Die aus LN und LT extrahierten, hochmolekularen Alginat wurden zunächst separat in isotonischer, 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (NACL; B. Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst und anschließend zu gleichen Teilen gemischt. Polystyrol-basierte Deckgläser (PC; Thermanox™, Ø 13 mm, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) dienten zur Fixierung der Alginat und wurden hierzu für 30 min bei 37 °C mit einer 1:5 verdünnten Lösung [% v/v] an poly-L-Lysin (pLL; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS; Gibco, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. 120 µL an 0.65%iger [% w/v] Alginate-Lösung (LN/LT 1:1) wurde danach auf die Luftgetrockneten, behandelten PC pipettiert und verteilt. Unter Zugabe von 800 µL Vernetzerlösung (20 mM Bariumchlorid bzw. 20 mM Kupfersulfat-Pentahydrat, 115 mM Natriumchlorid und 5 mM L-Histidin; alle Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gelierte das Alginate für 20 min bei Raumtemperatur (RT). Die Alginate-schichten (Höhe: 1.4 mm, Durchmesser: 13 mm) wurden letztendlich dreimal mit NACL (je 2 mL) gewaschen und bei 4 °C gelagert.

Sphärische Alginatgele

Zur Herstellung von sphärischen Gelen wurde die Alginatlösung (LN/LT 1:1, 0.65% w/v) mit Hilfe eines coaxialen Luftstroms dispergiert und anschließend in einem Vernetzungsbad (20 mM Bariumchlorid bzw. 20 mM Kupfersulfat-Pentahydrat, 115 mM Natriumchlorid und 5 mM L-Histidin, 290-300 mOsmol) für 20 min bei RT geliert. In Abhängigkeit des eingestellten Luftstroms entstanden derart sphärische Alginatgele in einstellbarer Größe (z.B. < 50 μm oder 400 μm), die nach dreimaligem Waschen in NaCl bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert wurden.

Zylindrische Gelstrukturen

Für hochvolumige, zylindrische Alginatgele wurden 5 mL Alginatlösung (LN/LT 1:1, 0.5% bzw. 1.0% w/v) in eine Dialysemembran (8 kDa, \varnothing 11.5 mm, VWR, Darmstadt, Deutschland) gefüllt und für 1 h, 2 h, 3 h bzw. 4 h in einem wässrigen 11,6 mM Calciumsulfat-Dihydrat-Bad (290-300 mOsmol, pH = 7,4; Alfa Aesar, Kandel, Deutschland) bei RT vernetzt, anschließend gründlich mit NaCl gewaschen und bei 4 °C gelagert.

UV-vernetzte Hyaluronsäure-Gele

Die Herstellung von photopolymerisierbarer Hyaluronsäure erfolgte gemäß der beschriebenen Vorgehensweise nach Schramm *et al.* (109). 150 mg Hyaluronsäure (HA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden zu einer 1%igen HA-Lösung in 15 mL doppelt destillierten Wasser ($\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$) gelöst und unter Rühren bei RT mit einem Gemisch von 330 μL Triethylamin (Merck, Darmstadt, Deutschland), 330 μL Glycidylmethacrylat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 330 mg Tetrabutylammoniumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Nach 24-stündigem Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch für 1 h auf 60 °C erhitzt und anschließend durch tröpfchenweise Zugabe von Aceton (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefällt. Das Präzipitat wurde danach unter Rühren für 12 h bei RT in 15 mL $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Gelierung von 5 mL Glycidylmethacrylat-konjugierter Hyaluronsäure erfolgte letztendlich nach der Zugabe von 0,25 mL N-Vinylpyrrolidinon und 100 mg Irgacure 2959 (beides von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und UV-Exposition (365 nm, 100 mW/cm²) für 5 bzw. 20 min. Vor der Nutzung der UV-vernetzten Hyaluronsäure-Gele wurde eine 48-stündige Dialyse gegen PBS durchgeführt.

3.2 Methoden zur chemischen Funktionalisierung von Alginat

Aktivierung mittels Carbodiimide-Chemie

Moleküle mit einer terminalen Aminogruppe lassen sich mit Hilfe der wässrigen Carbodiimide-Chemie an das Alginatrückgrat konjugieren (29, 16, 104). Dazu wurden zunächst die Carboxylgruppen des Alginats für 30 min und bei RT mit einer wässrigen 200 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC)-Lösung aktiviert und dann das labile Intermediat mit 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS) stabilisiert (beide Chemikalien von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Der resultierende Alginatester stand infolgedessen für die sich anschließende Amidierung mit dem NH₂-Molekül zur Verfügung.

Tyramin-Konjugation

Für die Kopplung von Tyramin an Alginatstrukturen wurden EDC/NHS-behandelte Alginat mit Tyramin-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen (2,5, 7,5 and 12,5 mg Tyramin/cm² Oberfläche des Gels) für 24 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Darauf folgte das Herauswaschen überschüssiger Kopplungsreagenzien mit NaCl (104).

Amidierung mit Poly(amidoamine) (PAMAM)

PAMAM-Dendrimere der 3. Generation bestehend aus einem Ethylendiamin-Kern (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden in verschiedensten Konzentrationen (1,6, 3,2, 32, 324 und 3245 nmol PAMAM/cm²) in NaCl für 24 h bei RT an EDC/NHS-aktivierte Alginatgele gekoppelt und anschließend mit NaCl gewaschen (16).

Alginatfunktionalisierungen mit Zelladhäsionsproteinen

Zur Bioaktivierung von Alginaten wurden Carbodiimid-modifizierte Alginatstrukturen mit verschiedensten Proteinen konjugiert. Dies erfolgte sowohl durch direkte chemische Konjugation der Proteine an das Alginatgerüst als auch physikalisch durch Adsorptionsprozesse an Tyramin- bzw. PAMAM-modifizierten Alginaten. Matrigel-beschichtete Oberflächen entstanden nach Inkubation der aktivierten Gele für 24 h bei RT in einer Kopplungslösung bestehend aus 10 µg Matrigel/cm² (Corning, New York, USA) gelöst in DMEM/F-12. Für Vitronectin-funktionalisierte Alginatgele wurden die EDC/NHS-aktivierten Gele für 24 h bei RT mit 1 µg Vitronectin/cm² (Stemcell Technologies, Grenoble,

Frankreich) in DMEM/F-12 kontaktiert. Für Laminin-beschichtete Oberflächen (Laminin-521: Biolamina, Sundbyberg, Schweden; Laminin-111: VWR, Darmstadt, Deutschland) wurden Tyramin-Alginat (12,5 mg Tyramin/cm²) in verschiedensten Konzentrationen an Laminin (0,5, 1,0, 1,5 und 2,5 µg Laminin/cm²) in DMEM/F-12 für 24 h bei RT inkubiert. Zudem erfolgten Protein-unspezifische Abscheidungen nach Inkubation in Zellmedium angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (FKS; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Alle Protein-modifizierten Oberflächen wurden schließlich gründlich mit NaCl gewaschen.

3.3 Methoden zur Charakterisierung von Materialeigenschaften

3.3.1 Untersuchungen chemischer Eigenschaften

Strukturaufklärung mittels Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Zur strukturellen Aufklärung von (modifizierten) Alginaten wurde die NMR-Spektroskopie eingesetzt. Nach einer partiellen Hydrolyse im Ultraschallbad (4 h, 65 °C, 80W, 45 kHz; VWR, Darmstadt, Deutschland) und einer Gefriertrocknung wurde die Alginatprobe in deuteriertem Wasser gelöst (7.5 mg/mL), mit Natriumtrimethylsilylpropionat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) als interne Referenz versetzt und anschließend via quantitativer ¹H-NMR mit 128 Scans und Wasserunterdrückung bei 80 °C vermessen. Die entsprechenden ¹H-NMR Spektren wurden mit dem Bruker DRX 500 (Bruker, Massachusetts, USA) aufgenommen und mit Hilfe der Software TopSpin ausgewertet (Integrale, Dekonvolutionen).

Spektrophotometrischer Substanznachweis über UV/VIS-Absorptionen

Ungesättigte Substanzen wurden durch Anregung der Elektronen mit ultraviolettem und sichtbarem Licht (UV/VIS) nachgewiesen. Mit einem Photometer (DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, USA) wurden die Proben in einem Wellenlängenbereich von 190-1100 nm angeregt, die respektiven Absorptionen detektiert und mit Literaturwerten verglichen.

Die Konzentration an Proteinen in einer Probe wurde über die Absorption bei 280 nm und der Korrektur nach Warburg und Christian bei 260 nm bestimmt:

$$c(\text{Protein}) \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = 1,55 * \text{Absorption}(280 \text{ nm}) - 0,76 * \text{Absorption}(260 \text{ nm})$$

Bestimmung der Sterilität

Die Keimfreiheit von Alginaten wurde extern von einem zertifizierten Analyselabor (Eurofins, München, Deutschland) untersucht. Unter Reinraumbedingungen und Richtlinien guter Laborpraxis (GLP) wurde jede Probe in zwei Nährmedien (CASO-/Thioglyolat-Bouillon) direkt inokuliert und für 14 Tage inkubiert. Das Wachstum von Keimen wurde in definierten Intervallen kontrolliert.

Bestimmung von Bakterien-Endotoxine

Mit Hilfe des Limulus Amoebocyten-Lysat (LAL)-Tests wurde der Gehalt einer Probe an Bakterien-Endotoxinen von einem externen, zertifizierten Analyselabor (Eurofins, München, Deutschland) turbidimetrisch-kinetisch geprüft. Die quantitative Analyse erfolgte nach der Bestimmung der maximal gültigen Verdünnung mit einem Detektionslimit von 0,005 EU/mL.

Nachweis der Amidierung via Raman-Spektroskopie

Unter Verwendung der konfokalen Raman-Spektroskopie wurden die Bindungssituationen der nativen und modifizierten Alginatstrukturen miteinander verglichen. Der Versuchsaufbau bestand aus einem Laser (532 nm; Compass 315M, Coherent Inc. Kalifornien, USA), einer Lichtquelle und einem Mikroskop (Eclipse LV100; Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) verbunden durch eine Multimode-Faser (AFS50/125Y; Thorlabs, New Jersey, USA) an ein Spektrometer (Shamrock 303; Andor, Belfast, Nordirland). (Modifizierte) Alginatschichten wurden auf ein Deckglas platziert und für 24 h bei RT Luft-getrocknet. Die Raman-Spektren wurden anschließend mit einem 40x Luftobjektiv (S Fluor; Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) und einer Laserleistung von 50 mW vermessen.

Nachweis von Atomen mittels energiedispersiver Röntgenpektroskopie (EDX)

Zur Untersuchung des Gehalts spezifischer Atome auf einer Probenoberfläche wurden im Rahmen der REM-Messungen (siehe 3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie) EDX-Mikroanalysen durchgeführt. Mit Hilfe der gekoppelten FESEM-Software EDX Multi-Element Mapping (Version 3.35; EDAX, New Jersey, USA) erfolgte die Messung für 120 s mit bis zu 20 Zyklen pro Kondition.

3.3.2 Untersuchung physikalischer/physikochemischer Eigenschaften

Bestimmung der dynamischen Viskosität

Die dynamischen Viskositäten verschiedener Lösungen wurden unter Einsatz des Rotationsrheometers Physica MCR 101 (Anton Paar, Graz, Österreich) mit einem Parallelplatten-Aufbau und Peltier-Element bei 20 °C untersucht. Dazu wurden zunächst 0,3 mL Probe auf dem Peltier-Element pipettiert und für eine Dauer von 3 min temperiert. Anschließend wurde ein Plattenabstand von 3 mm eingestellt, die Probe für 2 min bei einer Scherrate von 1 s^{-1} gesichert und dabei jede 2 s ein Wert für die dynamische Viskosität gemessen (= 60 Messwerte pro Messungszyklus). Aufgrund von Trägheitseffekten wurden die ersten 10 Messwerte von der Auswertung ausgeschlossen. Pro Messung ergab sich derart die dynamische Viskosität einer Probe als Mittelwert aus 50 Werten ($n \geq 3$).

Bestimmung der Viskoelastizität (Speicher- und Verlustmodule)

Mit Hilfe von Scherversuchen wurden die dynamischen Module von Materialien untersucht. In einem Frequenzbereich von 0,1-100 s^{-1} erfolgten die dynamisch-mechanischen Analysen unter Verwendung des Rotationsrheometers Physica MCR 101 (Anton Paar, Graz, Österreich) mit einem Parallelplatten-Aufbau und Peltier-Element bei 20 °C. Derart wurden die unterschiedlichen Polymerlösungen und -gele hinsichtlich ihrer Speicher- und Verlustmodule analysiert.

Bestimmung des Elastizitätsmoduls

Zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften nativer und modifizierter Alginatgele (Ø 13 mm, Höhe: 1,4 mm) wurden die Proben in NACL mit dem TA.XTplus (Stable Micro Systems, Godalming, England) um eine 35%ige Verformung der Probenhöhe mit einer Deformationsrate von 0,5 mm/s komprimiert. Der Anstieg der Spannungs-Dehnungs-Kurve im Bereich von 10-30%iger Kompression entsprach dem Elastizitätsmodul der Probe.

Bestimmung des Schwellverhalten und der pH-Responsivität

Das Schwellverhalten von 0,65%igen, Barium-vernetzten Gelen wurde sowohl an Alginatschichten als auch an sphärischen Alginatgelen untersucht. Für einen Zeitraum von insgesamt 4 Wochen wurden die Alginatgele in Lösungen unterschiedlicher Osmolarität inkubiert und nach 1 d, 7 d, 14 d, 21 d, und 28 d sowohl die Elastizitätsmodule der Alginatschichten (gemäß bereits beschriebener Vorgehensweise) als auch die Durchmesser

der sphärischen Alginatgele mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie-Bilder bestimmt. Verwendet wurden NaCl, PBS und das serum-freie Medium Panserin 401 als isoosmolare und doppelt deionisiertes Wasser (d_2H_2O) als hypoosmolare Kondition.

Zudem wurde die pH-Responsivität der Alginatgele über die Formstabilität von sphärischen Gelstrukturen untersucht. Dafür inkubierten die Alginatgele in NaCl unterschiedlichen pH-Werts (pH = 3, 5, 7, 9 bzw. 11) für 24 h bei RT und wurden anschließend hinsichtlich des Durchmessers mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie-Bilder analysiert.

Bestimmung von Degradations- und von Freisetzungsprofilen

Die Stabilität von Calcium-vernetzten Alginatgelen wurde in verschiedenen Umgebungslösungen über einen Zeitraum von 9 Tagen mit täglichen Flüssigkeitswechsel (Verhältnis Gel-zu-Flüssigkeit 1:5) und Inkubation bei 37 °C untersucht. Die isotonische Lösung *Balanced Salt Solution* (BSS; Serumwerk, Bernburg, Deutschland) diente mit dem Vorliegen essentieller Salze in physiologischer Konzentrationen als Simulationslösung physiologischer Bedingungen. Ionische und enzymatische Abbauprozesse wurden unter Verwendung von NaCl bzw. 1%iger Alginase (% m/V in BSS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) untersucht. Ein photometrischer Uronsäure-Assay wurde verwendet, um die Menge an Alginat zu bestimmen, das gegebenenfalls aus dem Gelnetzwerk herausgelöst worden ist. 1 mL Probe wurde mit 3 mL einer auf 4 °C gekühlten 25 mmol/L Lösung von Natriumtetraborat-Decahydrat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in konzentrierter Schwefelsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemischt, für 10 min in einem siedenden Wasserbad inkubiert und anschließend auf RT abgekühlt. Danach wurden 0,5 mL einer 0,125% m/V ethanolischen Carbazol-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) hinzugegeben und für 15 min im siedenden Wasserbad inkubiert. Nachdem das Reaktionsgemisch für 2 h bei RT auskühlte, wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 525 nm mit Hilfe eines Photometers (DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, USA) bestimmt. Die Menge an gelösten Alginat wurde über eine zuvor erstellte Kalibrierkurve verschiedener Alginatkonzentrationen entsprechend der resultierten Absorption ermittelt.

Darüber hinaus wurde das Degradationsverhalten von Alginatgelen über die Freisetzung von Reportersubstanzen am Beispiel von hochmolekularen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Dextranen unterschiedlicher Molekülmasse (150 kDa und 500 kDa; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) untersucht. 0,65%ige Alginatlösungen (LN/LT 1:1) wurden dafür mit 1 mg/mL FITC-Dextran versetzt und zu sphärischen Gelen mit 20 mM $CuSO_4$ -Lösung für

20 min bei RT vernetzt. Die mit FITC-Dextran-beladenen Cu-Alginatgele lagerten anschließend für 330 min bei 37 °C in NaCl, das alle 15 min mit einem Photometer (DU 730, Beckman Coulter, Fullerton, USA) hinsichtlich der Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 190-1100 nm untersucht wurde. Im Gegensatz zur Kontrolle wurde nach 150 min Lysyloxidase (LOX; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration von 0,31 µM hinzugegeben. UV/VIS-Signale bei einer Wellenlänge von 480 nm korrelierten mit etwaig freigesetzten FITC-Dextranen.

Bestimmung der Oberflächenladung

Zur Beurteilung der Ladung einer Probenoberfläche wurden mit einem Zetasizer (Nano-ZS PN3702; Malvern Instruments, Worcestershire, England) die Zetapotentiale bestimmt. Dazu wurden spherische Alginatgele (Ø 50 µm, Gesamtoberfläche: 10 cm²/Ansatz) im nativen und modifizierten Zustand als Suspension in PBS bei 25 °C in einer Kapillarzelle (Malvern Instruments, Worcestershire, England) vermessen.

Bestimmung der Benetzbarkeit von Oberflächen

Untersuchungen hinsichtlich der Hydrophilie von Oberflächen wurden mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen („*captive bubble*“-Methode) durchgeführt. Die Versuchsanordnung bestand aus einem Goniometer mit zusätzlichen Klammern für flache Proben (SHC 20), einer Glasküvette (GC 40), einer nach oben gebogenen Dispersionsnadel (SNC 052/026), einer Kameraeinheit und einer Auswertesoftware (SCA 20, alle Teile von DataPhysics Instruments, Filterstadt, Deutschland). Eine 3 µL Luftblase wurde bei RT mit der NaCl-umspülten Probenoberfläche kontaktiert und anschließend der resultierende Kontaktwinkel zwischen Luftblase und Oberfläche vermessen.

Untersuchung von Strukturen mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die zu untersuchenden Proben wurden in PBS gewaschen, bei RT im 0,3 M Natriumcacodylat-Puffer mit 0,1 mM Glutaraldehyd (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und bei 4 °C gelagert. Danach wurden die Proben mit 1% Tanninsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1% Uranylacetat (Ted Pella, Kalifornien, USA) und 2% Osmiumtetroxid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt, in Lösungen mit ansteigendem Ethanol-Gehalt (von 10% zu 100%) entwässert und in Hexamethyldisilazan (HMDS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) getrocknet. Schließlich wurden die Proben mit Kohlenstoff beschichtet und im Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop

(Phillips FESEM XL30; FEI, Eindhoven, Niederlande) bei 5 kV im Sekundärelektronenmodus sowie bei 10 kV Beschleunigungsspannung (10 mm Arbeitsabstand) im Rückstrahlelektronenmodus untersucht.

Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

Die Rückstrahlelektronenbilder von den REM-Analysen wurden zur Beurteilung der Oberflächenrauigkeit hinzugezogen. Hierzu wurden die Grauwerte der Bilder mit der Textur der Oberfläche gemäß der Entropie nach Haralick (110) attribuiert. Hohe Entropiewerte korrelierten mit rauen, heterogenen Oberflächen, wohingegen niedrige Entropiewerte glatten, homogenen Oberflächen zugeordnet wurden.

3.3.3 Untersuchungen zur Proteinadsorption

Bestimmung des Gehalts adsorbierter Proteine

Unter Verwendung von Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure), DTNB; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde durch den Nachweis der Sulfhydryl-Gruppen der Gehalt der adsorbierten Proteine bestimmt. Dazu inkubierten die verschiedenen Alginatschichten und Kontrollen für 24 h bei 37 °C in DMEM/F-12 ergänzt mit 10% FKS und wurden anschließend mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 0,1 mM DTNB-Lösung und 2-minütiger Inkubation bei RT wurden die Proben mit dem Mikroplatten-Leser Infinite® F200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 412 nm vermessen.

Analyse der Faltungsprozesse von Proteinen zur Beurteilung der Bioaktivität

Die Adsorption der Proteine an Oberflächen kann zu Proteinfaltungsprozessen (z.B. zur Denaturierung) führen, die dessen Bioaktivität maßgeblich beeinflussen können. Mit Hilfe von 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), die an die durch Faltungsprozesse freigelegten hydrophoben Proteinregionen bindet, wurden Konformationsänderungen adsorbierter Proteine untersucht. Nach 24-stündiger Inkubation der Proben in DMEM/F-12 versetzt mit 10% FKS bei 37 °C und anschließendem Waschen mit PBS wurde die 0,1 mM ANS-Lösung bei RT für 15 min zu den Proben gegeben. Schließlich wurde die Fluoreszenz der Probenkörper mit dem Mikroplatten-Leser Infinite® F200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 470 nm untersucht.

Bestimmung der Stabilität von Proteinbeschichtungen

Sphärische, Tyramin-funktionalisierte Alginatgele (12,5 mg Tyramin/cm²) wurden für 4 h bei RT in DMEM/F-12 mit Laminin (1,0 µg/cm², L2020; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Es folgte eine Immunfärbung der beschichteten Proben mit einem primären Antikörper gegen Laminin (Kaninchen, polyklonal; Abcam, Cambridge, England) und dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG H+L; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland). Die entsprechenden Antikörper wurden jeweils für 1 h bei RT inkubiert und gründlich mit PBS gewaschen. Die Immunfärbung der Proben wurde sowohl umgehend als auch nach 7 und 14 Tagen Probenlagerung bei 4 °C mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon Eclipse TS300; Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) festgehalten.

Untersuchung zum Einfluss der Proteinadsorption auf Materialeigenschaften

Nach 24-stündiger Inkubation der zu untersuchenden Proben bei 37 °C in DMEM/F-12 und 10% FKS und anschließendem Waschen mit NaCl wurden die Materialeigenschaften (Oberflächenladung, Benetzbarkeit, Rauigkeit und mechanische Stabilität) gemäß der bereits beschriebenen Vorgehensweisen bestimmt und so der Einfluss der Proteinadsorption auf die Materialien untersucht.

3.4 Techniken der Zellkultur und Analyse des Zellstatus

3.4.1 Zellen und Zellkultur

Kultivierung humaner Fibroblasten

Humane Fibroblasten (BJ; ATCC, Virginia, USA) wurden in einem Medium von *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM), 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin (alle Medienkomponenten von Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) auf Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Corning, New York, USA) bei 37 °C kultiviert. Die Passage von MSCs erfolgte mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02%; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) einmal die Woche bzw. bei einer Konfluenz von ca. 80% mit einer Zelldichte von mindestens 1000 Zellen/cm² zur Inokulation.

Kultivierung humaner retinaler Pigmentepithelzellen (RPE)

Verwendet wurden die humane RPE-Zelllinie ARPE-19 von ATCC (Virginia, USA), die analog der humanen Fibroblasten kultiviert worden sind.

Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen (MSC)

Die Zellkultur von MSCs (Wharton'sche Sulze, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde in Standard-Zellkultur-Flaschen (75 cm² Wachstumsfläche; Corning, New York, USA) durchgeführt. Das Zellkulturmedium bestand aus DMEM/F-12 versetzt mit 10% FKS, 100 Einheiten/mL Penicillin/Streptomycin und 1 ng/mL Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (bFgf; alle Zusätze von Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland). Die Passage von MSCs erfolgte mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02%; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) einmal die Woche bzw. bei einer Konfluenz von ca. 80% mit einer Zelldichte von mindestens 1000 Zellen/cm² zur Inokulation.

Kultivierung humaner induziert-pluripotenter Stammzellen (hiPSC)

Verwendet wurden die hiPSC-Linien ER 19-18 (bereitgestellt von Prof. Dr. Jürgen Winkler, Universität Erlangen) und UKBi005 (bereitgestellt von Prof. Dr. Oliver Brüstle, Universitätsklinikum Bonn). Für die Kultur von hiPSCs wurden zunächst Petrischalen für 2 h mit 0,01 mg/cm² Matrigel (Corning, New York, USA) gelöst in DMEM/F-12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland) beschichtet. Auf der Matrigel-beschichteten Zellkulturplastik erfolgte anschließend die Kultivierung der hiPSC mit dem mTeSR-1 Medium (Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) bei 37 °C. Die Passage der Zellen wurde mit Hilfe von TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) bzw. mit einer Dispase-Lösung (1 U/mL; Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) durchgeführt.

Kultivierung humaner Stammzellen in hängenden Tropfen

MSCs und hiPSCs wurden in hängenden Tropfen mit unterschiedlichen, sphärischen Alginategelen kultiviert. Dazu wurden manuell die mit den Alginategelen angereicherten Zellsuspensionen (30×10^4 Zellen/cm²) als 20 µL Tropfen auf die Innenseite des Petrischalendeckels pipettiert, anschließend der Deckel vorsichtig invertiert und auf den mit 10 mL PBS befüllten Petrischalenboden gesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation der hängenden Tropfen bei 37 °C erfolgte die Bildgebung hinsichtlich der Zell-Matrix Kontakte mit einem inversen Mikroskop (Nikon Eclipse TE300; Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande).

Kultivierung von hiPSC in Suspensionsbioreaktoren

Unter Einsatz des Bioreaktors Cero (OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) wurden 30×10^4 hiPSCs/cm² mit 40 cm² unterschiedlichen, sphärischen Alginatgelen kontaktiert und für 24 h bei 37 °C kultiviert. Alternierende Rotationsperioden (3 min, 40 rpm, Richtungswechsel alle 4 s) und Pausen (8 min) sorgten dabei für schonende Vermischungen und Kontakte der Zellen mit den Alginatgelen, die nach der Kultivierung im Durchlicht mit dem Mikroskop (Nikon Eclipse TE300; Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) abgebildet wurden.

Herstellung von Tumorsphäroiden

Die Dickdarmtumorzelllinie HT29-MTX-E12 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde für die Generierung von Tumorgewebe verwendet. In 96-Well-Platten mit U-förmigem Boden (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden 4.500 Zellen/Well ausgesät und in DMEM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) für 14 Tage bei 37 °C und 2-tägigem Mediumwechsel zu Sphäroiden kultiviert.

3.4.2 Vitalitätstests und Funktionsnachweise

Nachweis der metabolischen Aktivität

Über die Quantifizierung von Adenosintriphosphat (ATP) erfolgte unter Einsatz des CellTiter-Glo[®]-Assays (Promega Corporation, Wisconsin, USA) die Beurteilung der metabolischen Aktivität behandelter Zellen. In 96 Well-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden 1×10^4 Zellen/Well ausgesät, für 24 h bei 37 °C kultiviert und anschließend mit der Testsubstanz für 24 h konfrontiert. Das Luciferase-haltige CellTiter-Glo[®]-Reagenz wurde äquivalent zum Volumen des Zellmediums hinzugegeben, für 2 min gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die emittierte Lumineszenz wurde mit Hilfe des Mikroplatten-Leser Infinite[®] F200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt und ins Verhältnis zu unbehandelten MSCs gesetzt.

Durch Zugabe einer 0,16% Fluoreszeindiacetat-Lösung (FDA, 5 mg/mL in Aceton; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde die metabolische Aktivität der Zellen untersucht. Metabolisch aktive Zellen spalteten innerhalb der Zellen über Esterasen das FDA zu Fluoreszein und emittierten infolgedessen eine grüne Fluoreszenz, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Eclipse TE300 in Verbindung mit der Software NIS-Elements (beides von Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) abgebildet und mit der

Bildauswertesoftware ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA, (111)) ausgewertet werden konnten.

Nachweis der Membranintegrität

Mit Hilfe eines Ethidiumbromid-Assays wurde die Membranintegrität der Zellen untersucht. Ausgenutzt wurde dabei der Effekt, dass der DNA-Farbstoff Ethidiumbromid (1%, 1 mg/mL; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ausschließlich in Zellen mit defekten Membranen eindringen. Nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 543 nm emittierten beschädigte und tote Zellen rote Fluoreszenzsignale, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Eclipse TE300 in Verbindung mit der Software NIS-Elements (beides von Nikon Instruments, Amsterdam, Niederlande) abgebildet und mit der Bildauswertesoftware ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA, (111)) ausgewertet werden konnten.

Bestimmung der Anwachsrate humaner Zellen

Die Anzahl an Zellen, die an den Polymeroberflächen adhärten, wurde mit dem NucleoCounter[®] (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) automatisiert bestimmt. Zunächst wurden die adhären Zellen mit Hilfe von TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) in Suspension gebracht. Die Zugabe von 100 µL Reagenz A100 (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) zu 100 µL der Zellsuspension induzierte die Lyse der Zellen, die durch Hinzufügen von 100 µL Reagenz B (ChemoMetec, Allerød, Dänemark) stabilisiert wurden. Entsprechend behandelte Zellen wurden in die Vial-Cassette[™], die im Kassetteninneren mit 0,15 µg 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Nukleusfärbung) und 0,23 µg Acridinorange (grüne Fluoreszenz: vital, rote Fluoreszenz: tot) beschichtet waren, aufgesogen und die entstandenen Fluoreszenzsignale vom integrierten Fluoreszenzmikroskop detektiert sowie mit der Software NucleoView[™] ausgewertet. In einem zweiten Schritt wurden 200 µL der Zellsuspension ohne Zugabe der Reagenzien vom System hinsichtlich der Zellkonzentration (Zellen/mL) vermessen. Unter Berücksichtigung des Suspensionsvolumens ergab sich schließlich die Anwachsrate als Anzahl adhären Zellen.

Bestimmung der Zellausbreitungsfläche

Die Analyse der Fläche, mit der sich die adhären Zellen auf den verschiedenen Polymeroberflächen ausbreiteten, erfolgte unter Verwendung der über REM aufgenommenen Bilder zurückgestreuter Elektronen (*backscattered electrons*: BSE) und nach bereits veröffentlichten Protokollen (112–114). Aufgrund von überlappenden Zellen und/oder

geringen Zell-Matrix Kontrasten wurden die Zellflächen mit der Bildanalyse-Software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, USA, (111)) freihand ermittelt. Für jede Kondition wurden 3 biologische und technische Triplikate für die Analyse der Zellfläche herangezogen und derart mehr als 450 Zellen pro Kondition untersucht. Die Bestimmung der Zellausbreitungsfläche erfolgte dabei unter Berücksichtigung des Schrumpfprozesses, der durch die Präparation der Proben mit HMDS entstand.

Nachweis von Genexpressionen über immunzytochemische Färbungen

Für 24 h wurden $2,5 \times 10^5$ MSCs/Polymeroberfläche auf den verschiedenen funktionalisierten PAMAM-Alginatgelschichten kultiviert und anschließend für 20 min bei RT im Fixationspuffer Cytifix™ (BD Bioscience, Kalifornien, USA) fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 0,2% TritonX (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in PBS permeabilisiert. Nach einem PBS-Waschschritt folgte das Blocken mit 1% bovinem Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 0,2% TritonX/PBS-Lösung für 30 min bei RT. Nachdem die Proben für 24 h bei 4 °C mit Bodipy® Fl Phalloidin (gegen F-Aktin; Molecular Probes, Oregon, USA) und Anti-Vinkulin-Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigte Königreich) inkubierten, wurden 20 min vor der Bildgebung 40 µL NucBlue® (Molecular Probes, Oregon, USA) für die Färbung des Zellkerns hinzugegeben. Die Aufnahme der Immunfluoreszenzsignale erfolgte mit Hilfe des konfokalen Lasermikroskops Leica TCS SP8, das mit einem UV-Laser und der Mikroskopsoftwareplattform Leica Application Suite X ausgestattet war (alle Komponenten von Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland).

Nachweis von Genexpressionen mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Nachdem $2,5 \times 10^5$ MSCs für 24 h auf den unterschiedlichen PAMAM-Alginatgelschichten im Vergleich zur Standardkulturplastik (Thermanox™, Ø 13 mm; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) und Matrigel-funktionalisierten Alginatgelschichten kultiviert wurden, wurden die adhären-ten Zellen mit Hilfe von TrypLE (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) in Suspension gebracht. Mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden anschließend die RNA gemäß der Anweisungen des Herstellers extrahiert und die Konzentration an RNA mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) quantifiziert. Aus der RNA wurden mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. In einem Probenvolumen

von 10 µL fanden sich 2,5 ng cDNA (4,5 µL), Mastermix (5 µL; Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) und Assay mit dem entsprechenden Marker (0,5 µL). Als Phänotyp-spezifische Marker für MSCs wurden gemäß der Empfehlung der *International Society for Cellular Therapy* von 2006 (92) die Marker CD105/ENG, CD90/THY1 und CD73/NT5E verwendet. Als frühe Differenzierungsmarker dienten RUNX2 (Ostegenese), SOX9 (Chondrogenese) und PPARG (Adipogenese). Mit Blick auf das Adhäsionsverhalten der MSCs wurden VCL (Vinculin), ITGA5 (Integrin alpha5) und TNS1 (Tensin 1) untersucht. Letztendlich erfolgte die qPCR mit Hilfe des QuantStudio 7 Flex und der QuantStudio Real-Time PCR Software v1.1 (beides von Applied Biosystems, Kalifornien, USA). Nach der Normierung auf GAPDH wurden die Genexpressionen mit der Schwellenwertzyklus (Ct)-Methode berechnet: $\text{Relative Genexpression} = 2^{-(\Delta\text{Ct}(\text{Probe})-\Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle}))}$. Als Kontrolle dienten MSCs, die 24 h in Standardzellkulturflaschen (Cellstar®; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) adhärent kultiviert wurden.

Nachweis der Sekretion von Lysyloxidase (LOX) aus Tumorsphäroiden

Die zuvor generierten Tumorsphäroide aus der Dickdarmtumorzelllinie HT29-MTX-E12 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) (siehe 3.4.2) wurden für 24 h in DMEM, PBS oder NACL bei 37 °C kultiviert und anschließend mit Hilfe des Lysyl Oxidase Activity Assay Kits (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) gemäß der Herstellerangaben die Konzentration aktiver LOX in den verschiedenen Kulturmedien mit dem Mikroplatten-Leser Infinite® F200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) fluorimetrisch untersucht (Ex/Em = 540/590 nm) und mit einer Kalibriergeraden errechnet.

3.4.3 Extraktion von humanen und tierischen Glaskörpern

Jeglicher Umgang mit den Spenderaugen wurde im Einklang der Erklärung von Helsinki für den Gebrauch von menschlichem Gewebe und der Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere durchgeführt und von der örtlichen Ethikkommission (Saarbrücken, Antragsnummer: 97/17) geprüft.

Humane Forschungsaugen wurden von der Deutschen Gesellschaft für Gewebe-transplantation (DGFG, Hannover, Deutschland) mit der schriftlichen Einwilligung des nächsten Spenderangehörigen zur Verfügung gestellt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Augenspenden für 5 min mit 10% Povidon-Jod-Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg an der Lahn, Deutschland) behandelt und zweimal mit PBS gewaschen. Mit einem Skalpell (B. Braun, Melsungen, Deutschland) wurde eine erste Öffnung in die Sklera 3,5 mm hinter dem

Limbus erzeugt. Von diesem Einschnitt fortführend wurde mit Hilfe einer chirurgischen Schere und Pinzette (Geuder AG, Heidelberg, Deutschland) der vordere Teil des Auges entfernt. Durch leichtes Kippen des Augapfels konnte mit einer Pinzette der Glaskörper freigelegt und in eine 6-Well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt werden. Die frisch extrahierten Glaskörper wurden unmittelbar vermessen.

3.5 Statistik

Statistische Analysen wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics (Version 19.0.0; IBM, New York, USA) durchgeführt. Dazu zählten t-Tests und einfaktorielle Varianzanalysen mit einfachen Kontrasten. Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit $p < 0,05$ als signifikant erachtet. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung von Alginat als Stimulus-responsive Polymermatrix zur Untersuchung von Zell-Matrix Kontakten

Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil von zur Publikation vorbereiteten und akzeptierten Manuskripten (107, 115, 116).

Die Grundlage repräsentativer und zuverlässiger Untersuchungen sind standardisierte Materialien und Methoden. Das Biopolymer Alginat unterliegt aufgrund seines biologischen Ursprungs einer natürlichen Variation, der es mit einer Standardisierung des Herstellungsprozesses und einer umfassenden Charakterisierung des Materials entgegenzuwirken gilt. Mit der vorliegenden Arbeit wurden zusätzliche Prozessschritte und Dokumentationssysteme untersucht, die auf die Standardisierung und Evaluation des Herstellungsprozesses des Biopolymers Alginat hin zu einem umfassend charakterisierten Basismaterial gleichbleibender Qualität abzielen. Zur Beurteilung dieser Maßnahmen wurde die Qualität und Reproduzierbarkeit des hergestellten Alginats in Form von Granulaten, Lösungen und Gelen hinsichtlich einer Vielzahl an chemischen, physikalischen/physikochemischen und physiologischen Eigenschaften charakterisiert (Abbildung 12).

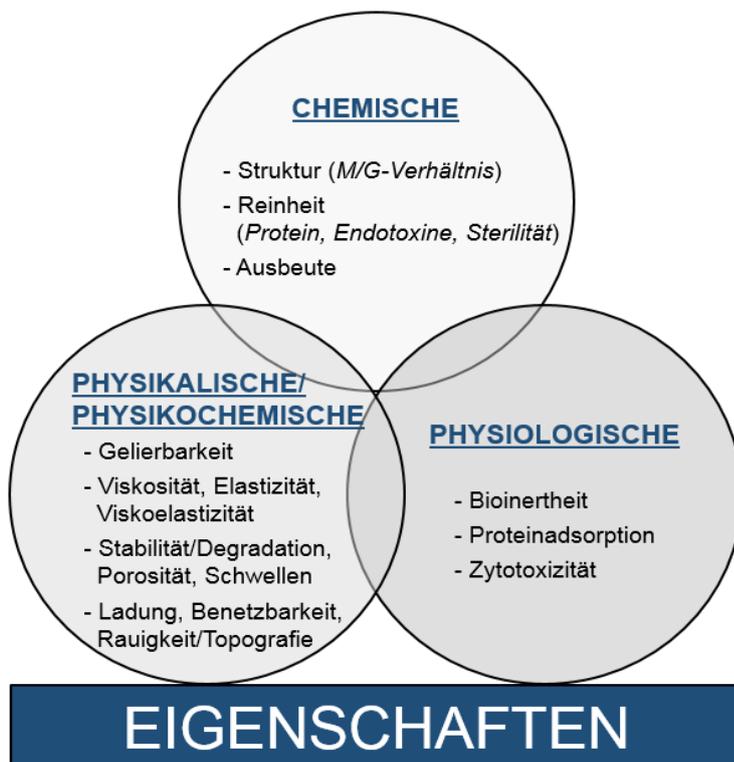


Abbildung 12: Übersicht der in dieser Arbeit erfolgten Charakterisierung an chemischen, physikalischen/physikochemischen und physiologischen Eigenschaften des Biopolymers Alginat.

Aus den verfeinerten Algengranulaten konnten durchschnittlich $19,7 \pm 6,8\%$ LT-Alginate und $22,8 \pm 4,7\%$ LN-Alginate gewonnen werden. Da die chemische Struktur, d.h. die polymere Komposition und Sequenzverteilung von Mannuron- (M) und Guluronsäure (G), in Abhängigkeit der Algenspezies, des verarbeiteten Pflanzenteils und der Wachstumsbedingungen variieren kann, bedarf es einer verlässlichen Methode zur Strukturaufklärung beider Uronat-Reste in den Algenproben. Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden die LT- und LN-Alginate hinsichtlich ihrer sequentiellen Polymerstruktur untersucht (Abbildung 13). Charakteristisch für das Biopolymer Alginat ist die Signalaufspaltung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in die homo- und heterogenen Polymerblöcke GG (4,46-4,47 ppm), MM (4,67-4,68 ppm), MG (4,70-4,71 ppm) MGM (4,72-4,73 ppm), GGM (4,75-4,76 ppm) und G (5,06-5,07 ppm) mit steigender chemischer Verschiebung. Dabei besaßen LT-Alginate einen hohen G-Anteil und LN-Alginate einen dominanteren M-Anteil.

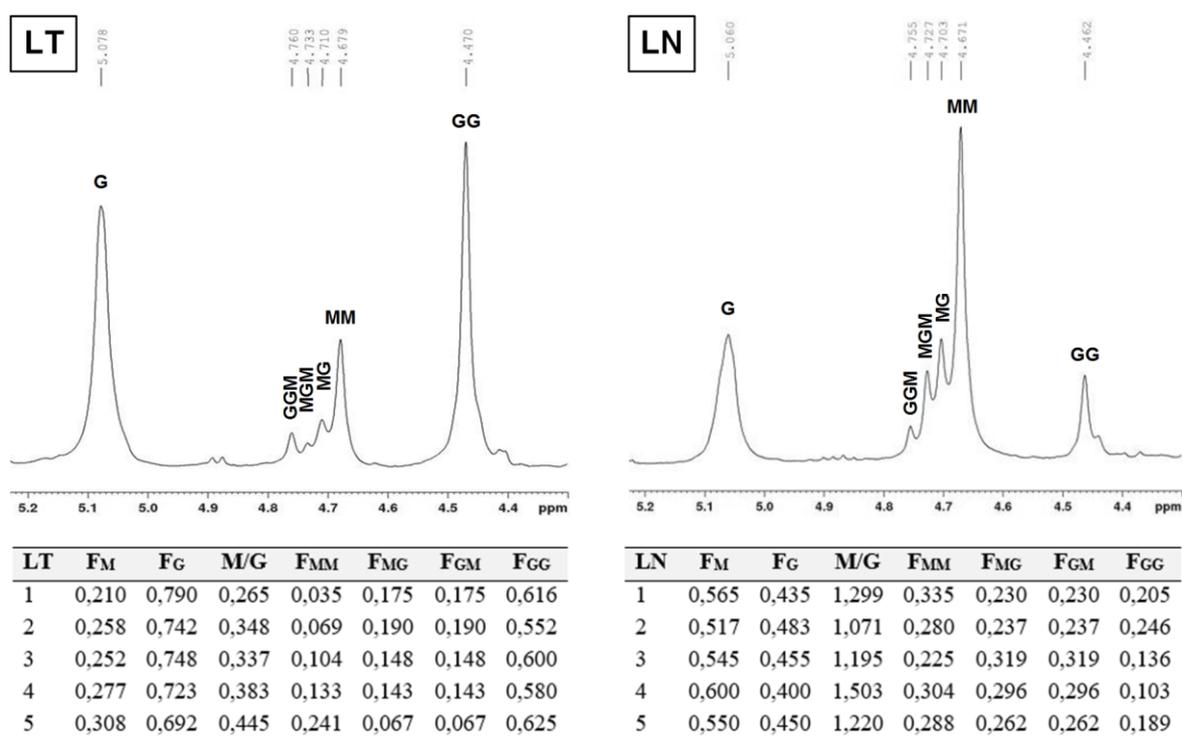


Abbildung 13: Repräsentative $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zur Strukturaufklärung der extrahierten *Lessonia trabeculata* (LT)- und *Lessonia nigrescens* (LN)-Alginate mit den typischen Signalen und Fraktionen (F) der homo- und heterogenen Polymerblöcke der Mannuron- (M) und Guluronsäure (G).

Um die Reproduzierbarkeit der Alginatstruktur und somit des Herstellungsprozesses zu beurteilen, wurden exemplarisch die Fraktionen von 5 Alginaten jeder Algensorte verglichen. Da ausschließlich die Algenstile als Pflanzenteile verwendet wurden, zeigten die Proben innerhalb der Algensorten vergleichbare chemische Beschaffenheiten mit M/G-Verhältnissen

Ergebnisse

von 0,27-0,45 für LT-Alginat und 1,07-1,3 für LN-Alginat. Durch Mischen beider Alginate (1:1) konnte das Verhältnis von M zu G auf 0,77 zu einem reproduzierbaren, chemisch kontrollierten Polymergerüst eingestellt werden.

Neben der chemischen Struktur wurden die extrahierten Alginatproben darüber hinaus auf ihre Reinheit bezüglich Proteingehalt, Bakterien-Endotoxinen und vermehrungsfähiger Keime (Sterilität) geprüft und ausschließlich Alginatproben für weiterführende Untersuchungen freigegeben, die die Grenzwerte von ≤ 40 mg/L Protein und ≤ 100 EU/g Endotoxine nicht überschritten sowie Sterilität aufwiesen. Durch die eingeführten Prozessschritte ließ sich die Protein-bedingte Verunreinigung reduzieren (Abbildung 14 A), sodass vermehrt Proteingehalte ≤ 40 mg/L resultierten. Zuvor erfüllten 27,6% der LT- und 72,2% der LN-Alginatproben den Grenzwert. Durch die etablierten Prozessschritte besaßen nun 85,0% der LT- und 100% der LN-Alginatproben Proteingehalte von ≤ 40 mg/L.

Nachdem sowohl die chemische Struktur der Alginatproben charakterisiert und standardisiert wurde als auch eine medizinisch relevante Reinheit gewährleistet werden konnte, erfolgte die Bestimmung der physikalischen/physikochemischen Eigenschaften von Alginate-Lösung und -Gel. Mit der Analyse der dynamischen Viskositäten 0,65%iger Alginate-Lösungen wurde zum einen die rheologischen Eigenschaften der Polymerlösung bestimmt und zum anderen ein Hinweis auf die Kettenlängen der Alginate-Moleküle erbracht. So nimmt die dynamische Viskosität der Lösung mit steigender Kettenlänge durch größere Anziehungskräfte der Moleküle zu und gibt Aufschluss über den Erfolg des Herstellungsprozesses die nativen Alginateketten zu konservieren. Durch die Etablierung zusätzlicher Arbeitsläufe zur Standardisierung und Evaluation des Herstellungsprozesses konnten bis zu 4-fach höhere, dynamische Viskositäten der 0,65%igen LN-Alginatproben generiert werden (Abbildung 14 B). Im Gegensatz dazu blieben die Viskositäten der LT-Alginatproben, die während des Herstellungsprozesses einer Salzsäure-Behandlung und infolgedessen vermutlich einer sauren Hydrolyse der Polymerketten unterzogen worden sind, nahezu unverändert.

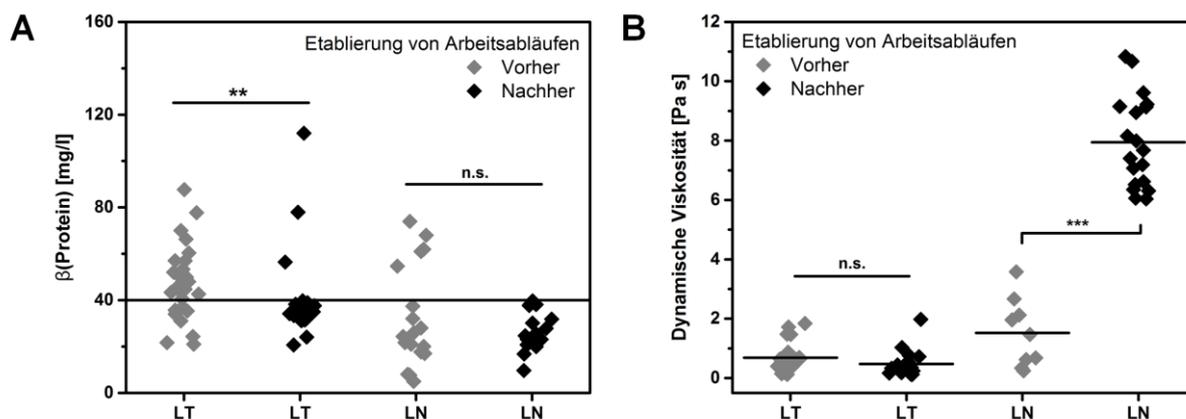


Abbildung 14: Proteingehalte (A, $n \geq 15$) und dynamische Viskositäten (B, $n \geq 9$) von LT- und LN-Alginaten vor und nach der Etablierung zusätzlicher Arbeitsabläufe zur Standardisierung und Evaluation des Herstellungsprozesses.

Hinweis: Alle folgenden Eigenschaftsbestimmungen erfolgten unter Verwendung der standardisierten 1:1-Mischung von LT- und LN-Alginaten.

Zusätzlich zu den dynamischen Viskositäten wurden sowohl die Viskoelastizität von Solen und Gelen durch die Analyse der entsprechenden dynamischen Module G' (Speichermodul) und G'' (Verlustmodul) als auch die Elastizität von Alginatgelen in Abhängigkeit der Alginatkonzentration untersucht (Abbildung 15).

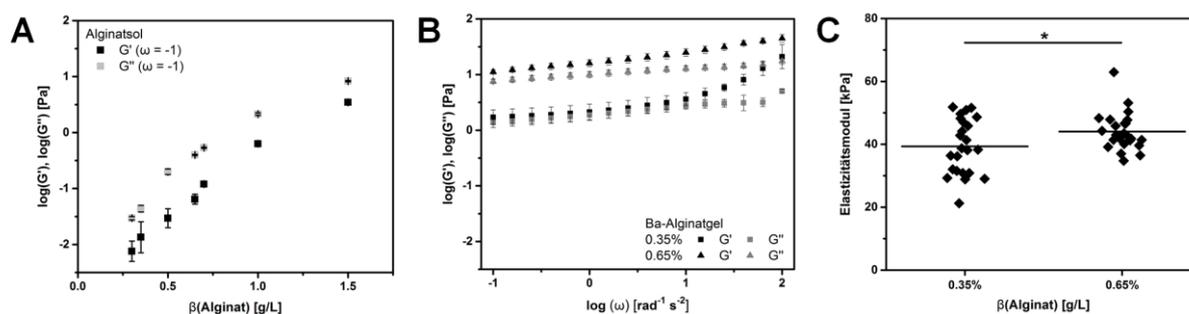


Abbildung 15: Rheologisch/mechanische Analysen hinsichtlich der Viskoelastizität (Speichermodul G' und Verlustmodul G'') von Alginatsolen (A, $n = 5$, $N = 3$) und Ba-Alginatgelen (B, $n = 5$, $N = 3$) sowie der Elastizität der Gele (C, $n = 24$) in Abhängigkeit zur Alginatkonzentration. Abbildungen B und C abgeändert aus (115).

Die Alginatlösungen zeigten mit $G'' > G'$ ein dominant viskoses und damit typisches Verhalten für Flüssigkeiten. Als Nachweis der Gelierbarkeit diente der Verhaltenswechsel hin zu Gel-artigen, dominant elastischen Eigenschaften mit $G' > G''$. Mit steigender Alginatkonzentration resultierte ein Anstieg der viskoelastischen Eigenschaften der Sole (Abbildung 15 A) und Gele (Abbildung 15 B). Für die Sole konnte eine Zunahme der Viskosität mit steigendem Alginatgehalt verzeichnet werden. Im Falle der Gele konnte mit den dynamisch, mechanischen Analysen auch der Vernetzungsgrad untersucht werden.

Ergebnisse

0,65%ige Alginatgele besaßen im Vergleich zu 0,35%igen Alginatgelen höhere Viskoelastizitäten und folglich dichtere Polymernetzwerke. Die Kompressionsversuche der Gele wiesen zudem auf höhere und reproduzierbarere Gel-Steifigkeiten mit steigender Alginatkonzentration hin (Abbildung 15 C).

Außerdem wurde auch die Gelstabilität und das Schwellverhalten von Alginatgelen (0.65%ig, Ba-vernetzt) in Lösungen unterschiedlichen Salzgehalts/Osmolarität und pH-Werts untersucht (Abbildung 16). Die Alginatgele zeigten in isoosmolarer Umgebung (~300 mOsmol) über einen Zeitraum von 4 Wochen keine signifikante Änderung ihrer mechanischen Stabilität. Hingegen nahm die Steifigkeit der Gele, die in hypoosmolaren, doppelt deionisierten Wasser (d_2H_2O) lagerten, zunächst ab und normalisierte sich wieder innerhalb des Prüfzeitraums (Abbildung 16 A). Die gemessenen Stabilitäten lassen sich mit Hilfe der Analysen des Schwellverhaltens in den Prüflösungen erklären. In isoosmolaren Lösungen wie NACL, PBS oder dem Serum-freien Medium Panserin 401 blieben die Gele formstabil. Im hypoosmotischen d_2H_2O schollen die Gele um etwa 75% innerhalb eines Tages an und verblieben in dem expandierten Zustand (Abbildung 16 B). Darüber hinaus zeigten die Alginatgele pH-responsive Eigenschaften (Abbildung 16 C). Im Vergleich zum neutralen Milieu schrumpften die Alginatgele unter sauren Bedingungen und expandierten im basischen Bereich um etwa 25% binnen 24 h.

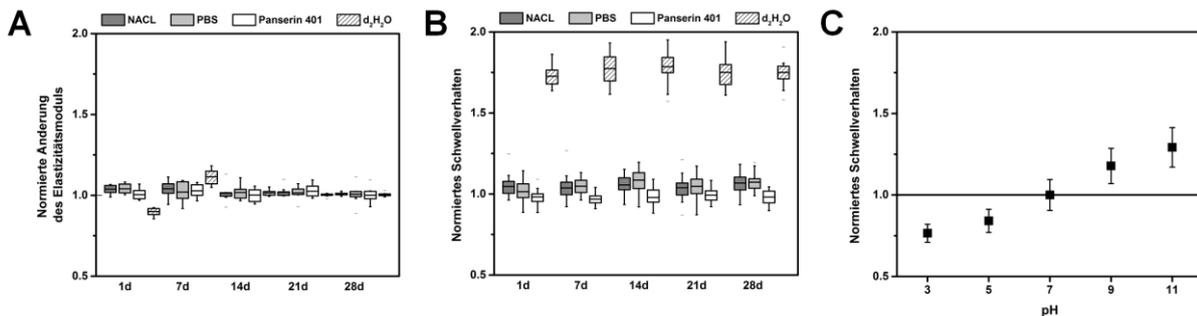


Abbildung 16: Untersuchungen zur Gelstabilität (A, n = 8) und zum Schwellverhalten von Barium-vernetzten Alginatgelen in Abhängigkeit der Osmolarität (B, n = 3, N = 20) und des pH-Werts (C, n = 3, N = 20) der liquiden Gelumgebung. Abbildungen A und B abgeändert aus (116).

Zur Analyse der zelladhäsiven Eigenschaften von Alginat wurden native Alginatgele in Kontakt mit mesenchymalen Zellen gesetzt und mit Standardzellkulturplastik PC verglichen (Abbildung 17). Nach 24 h Kultivierung zeigten Zellen auf dem Alginat im Gegensatz zum bioaktiven PC kein adhäsives Verhalten und lagen abgekugelt als Zellsuspension vor, die durch Flüssigkeitswechsel (Mediumwechsel, Waschschriffe) entfernt wurde. Natives Alginat ist nachweislich ein Zell-antiadhäsives, bioinertes Material.

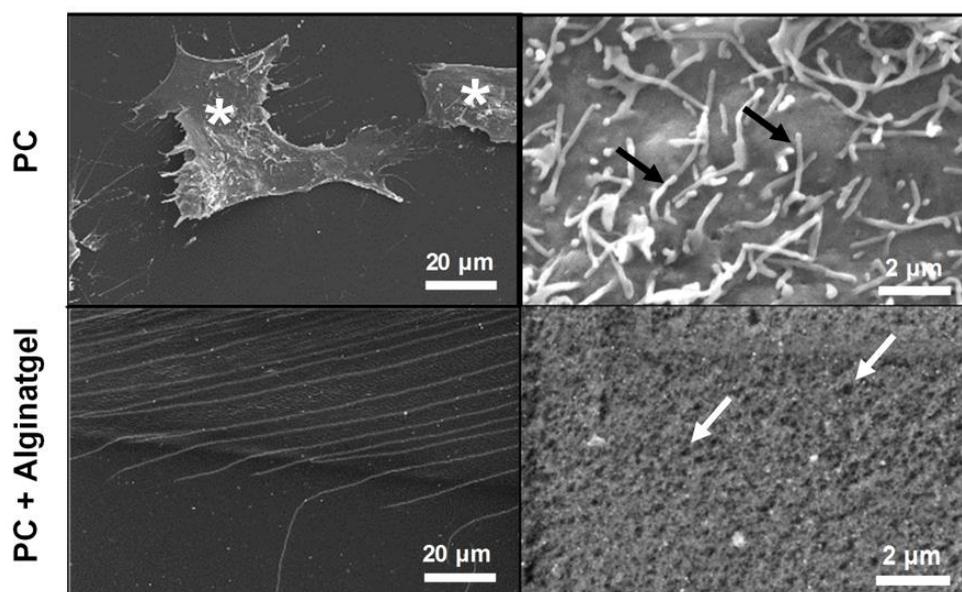


Abbildung 17: Repräsentative REM-Aufnahmen zur Untersuchung der zelladhäsiven Eigenschaften von Barium-Alginatgelen im Vergleich zur Standardzellkulturplastik (PC) nach Inkubation mit humanen, mesenchymalen Stammzellen (MSCs) für 24 h. Repräsentative Markierungen von adhärenzmarkierten MSCs (weißer Stern), Mikrovilli (schwarzer Pfeil) und Alginatporen (weißer Pfeil).

Die hohe Auflösung der REM-Bilder ließ zudem die Untersuchung der Porosität von Alginatgelen zu: 0,65%ige, Barium-vernetzte Alginatgele besaßen homogene, 70 nm große Poren (Abbildung 17).

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit das hergestellte, native Alginat hinsichtlich seiner chemischen, physikalisch/physikochemischen und physiologischen Eigenschaften umfassend charakterisiert. Für die weiterführenden Untersuchungen lag somit ein definiertes Basismaterial reproduzierbarer Qualität vor, das unter anderem eine für Zellkontakte relevante Reinheit und pH-responsive Eigenschaften besaß.

Darüber hinaus wurden weitere Eigenschaften nativer Alginatgele im Verlauf der Arbeit im Zusammenhang mit verschiedensten Alginat-Derivaten untersucht und an den entsprechenden Stellen ausgewertet. Dies betrifft insbesondere die Oberflächeneigenschaften (Ladung, Benetzbarkeit, Rauigkeit/Topografie) sowie die Interaktionen mit Proteinen und humanen Zellen.

4.2 Entwicklung hochvolumiger Alginatgele im Kontext von Zell-Matrix Kontakten

Nachdem Alginat als pH-responsive Polymermatrix standardisiert bereitgestellt und charakterisiert werden konnte, soll in diesem Kapitel der Arbeit untersucht werden, inwieweit der Gelierungsprozess hochmolekularer Alginatate auf hochvolumigere Systeme übertragbar ist. Als kritische Entscheidungsparameter wurden hierzu die Gelierbarkeit, die optischen und mechanischen Eigenschaften, das Degradationsverhalten und die Biokompatibilität der Gelstrukturen identifiziert und untersucht.

Untersuchungen zum Gelierprozess hochvolumiger Alginatgele

Die hochviskosen, 0,5% und 1%igen Alginatlösungen (Abbildung 18 A) zeigten keine makroskopisch sichtbare Diffusion durch Dialyseschläuche mit einer Molekulargewichtsgrenze von 8 kDa (Abbildung 18 B). Gut wasserlösliche Calcium-Salze wie Calciumchlorid resultierten unter Einsatz von 5 mL Alginatlösung in eine schnelle, unkontrollierte Gelierung hinzu heterogenen, weißlich, trüben Strukturen. Durch den Einsatz von schwer wasserlöslichem Calciumsulfat (2 g/L) konnten die Gelierungszeiten verlängert und infolgedessen stabile, zylindrische und transparente Gele ($V = 5 \text{ mL}$, $\varnothing 11,5 \text{ mm}$) hergestellt werden (Abbildung 18 B/C). Die zylindrischen Alginatgele ließen sich passgenau in 5 mL Spritzen überführen und passierten 23G Kanülen als zusammenhängenden Gel-Faden mit unregelmäßiger Variation des Durchmessers (Abbildung 18 D/E), der durch Anlegen von leichtem Druck mit Hilfe eines Deckglases Transparenz zeigte (Abbildung 18 F).

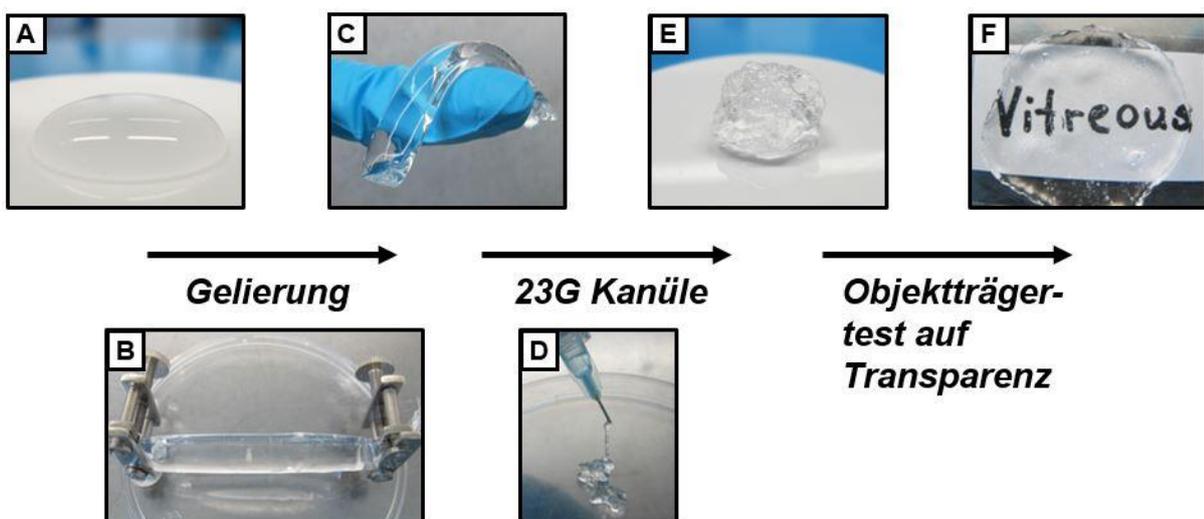


Abbildung 18: Hochviskose Alginatlösungen (A) gelierten im Dialyseschlauch mit Hilfe eines Calciumsulfat-Vernetzungsbad allseitig (B) zu stabilen, transparenten Hydrogelen (C). Nach Passierung einer 23G-Kanüle (D) lagen die Gele als zusammenhängenden Alginatfaden vor (E), der durch leichtes Andrücken eines Objektträgers transparent war (F).

Vergleichende Untersuchungen zur mechanischen Stabilität hochvolumiger Alginatgele

Der Gelierungsprozess wurde anschließend unter Berücksichtigung der mechanischen Eigenschaften der resultierenden Alginatgele untersucht. Dabei dienten die Konzentration an Alginat (0,5% und 1% m/V) sowie die Gelierungsdauern im Vernetzungsbad (1, 2, 3 und 4 h) als Parameter zur vergleichenden Analyse. Die unterschiedlich gelierten Alginatstrukturen wurden mit dynamisch, mechanischen Analysen hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften untersucht und die Speichermodule G' und Verlustmodule G'' sowohl mit kovalent vernetzten Hyaluronäure-Gelen als auch mit Silikonölen verglichen (Abbildung 19). Der Vergleich der dynamischen Module der Polymerlösungen zeigt das typische Verhalten flüssiger, viskoser Proben mit $G'' > G'$ bei niedrigen Frequenzen. Mit steigender Polymerkonzentration nahmen auch die viskoelastischen Eigenschaften der Sole zu. Hierbei waren sowohl 1%ige als auch 0,5%ige Alginatlösungen nachweislich viskoser als 1%ige, modifizierte Hyaluronsäure.

Der Gelierungsprozess wurde unter Berücksichtigung der Speicher- und Verlustmodule überprüft. Vernetzte Gele besaßen mit $G' > G''$ und Entstehung eines Plateaus einen nachweislich festen, elastischen Charakter. Die viskoelastischen Eigenschaften der Alginatgele stiegen bis zu einer Gelierungsdauer von 3 h. Danach (4 h) blieben die dynamischen Module unverändert. Das Ausgelieren der Alginat-basierten Hydrogele konnte auch unterstützend durch Analysen der Elastizitätsmodule mittels Kompressionsversuche nachgewiesen werden. Die E-Module nahmen bis zu einer Gelierungsdauer von 3 h zu und blieben dann unverändert (Abbildung 20). Weiterhin zeigten die mechanischen Eigenschaften der Alginate eine Abhängigkeit von der Polymerkonzentration. Sowohl die Elastizitätsmodule (Abbildung 20) als auch die Viskoelastizitäten (Abbildung 19) nahmen gemäß $1\% > 0,5\%$ Alginat zu. Im Vergleich zu den Ionen-stabilisierten Alginatgelen besaßen kovalent vernetzte Hyaluronsäuregele höhere dynamische Module.

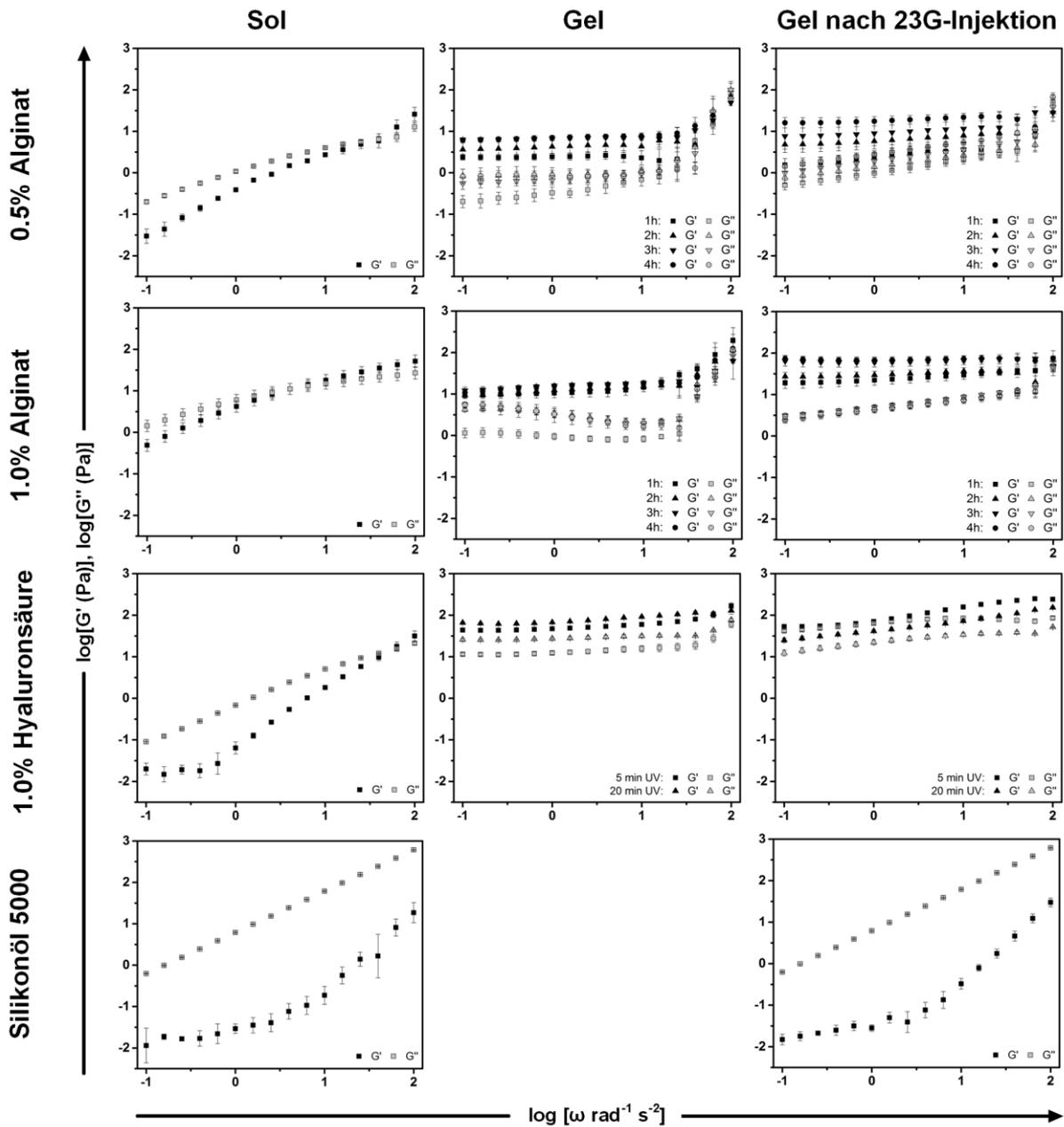


Abbildung 19: Vergleichende Untersuchungen zu den viskoelastischen Eigenschaften von Lösungen und Gelen auf Basis von Alginat und Hyaluronsäure verschiedener Konzentration und Gelierungsdauer sowie von Silikonöl. Der Wechsel vom flüssigen, viskosen Zustand (Sol: $G'' > G'$) zum festen, elastischen Zustand (Gel: $G' > G''$) bestätigte den Gelierungsprozess; $n = 5$.

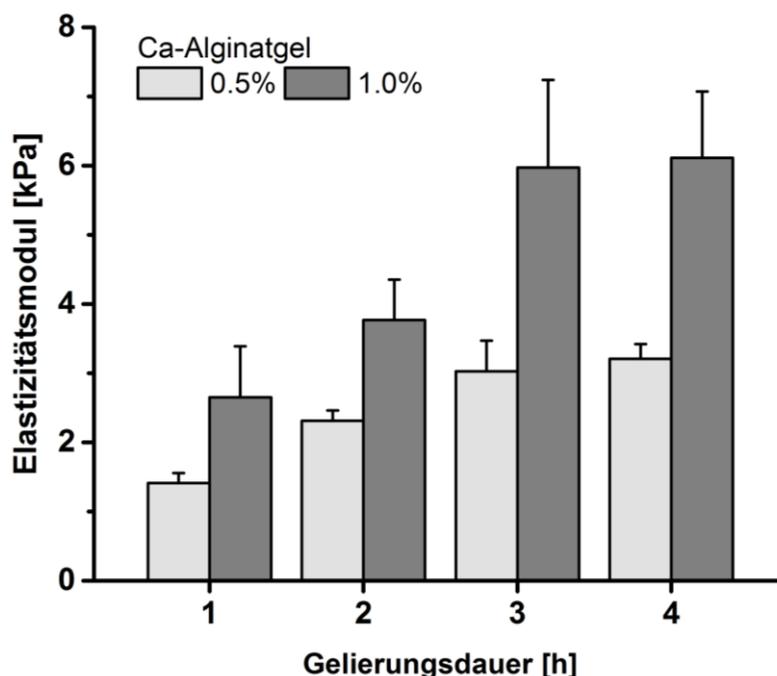


Abbildung 20: Elastizitätsmodule unterschiedlich gelierter Ca-Alginatgele ($n \geq 3$). Die Erhöhung der Polymerkonzentration und der Gelierungsdauern resultierte in größere E-Module. Die Gelierung der Alginatlösungen mit schwerlöslichen Calciumsalzen war nach 3 h mit dem Erreichen einer Plateauphase abgeschlossen.

Um die Stabilität der Gele im Hinblick auf Dosier- bzw. Applikationsvorgänge zu beurteilen, wurden die Speicher- und Verlustmodule der resultierenden Strukturen nach der Dosierung mit einer 23G Kanüle untersucht (Abbildung 19). Nachdem die Gele 23G Kanülen passierten, lagen sowohl die Alginat- als auch die Hyaluronsäure-basierten Polymersysteme als Gele mit $G' > G''$ vor. Die UV-vernetzten Hyaluronsäure-Gele zeigten im Vergleich zu den Alginatgelen jedoch kleinere G'/G'' -Verhältnisse und keine Ausbildung eines gleichmäßigen Niveaus (Plateaus). Darüber hinaus verlieren die kovalent vernetzten Gele auf Hyaluronsäure-Basis mit dem Drücken durch eine 23G Kanüle an Viskoelastizität. Längere Vernetzungsdauern der Hyaluronsäure-Gele (20 min) resultierten hierbei in niedrigere dynamische Module als kürzer UV-exponierte Gele (5 min). Im Gegensatz dazu weisen die ladungsstabilisierten Alginatgele als Alginatfäden nach der Applikation durch die Kanüle höhere viskoelastische Eigenschaften auf als die zylindrischen Alginatgele vor der Applikation. Im Vergleich zu den Biopolymer-basierten Gelen besaß das Silikonöl mit $G' < G''$ dominant viskose Eigenschaften.

Im Folgenden werden 1%ige Alginatgele, die 3 h im CaSO_4 -Vernetzungsbad vernetzten, als hochvolumige Alginat-basierte Materialsysteme weitergehend untersucht.

Untersuchungen zum Degradationsverhalten hochvolumiger Alginatgele

Neben den mechanischen Eigenschaften wurde auch das Degradationsverhalten als Beurteilungsvariable für die Stabilität der Hydrogele herangezogen. Im Folgenden wurde daher das Abbauverhalten von gelierten Alginaten in verschiedenen Medien vergleichend untersucht (Abbildung 21). Die isotonische Spüllösung *Balanced Salt Solution* (BSS), die essentielle Salze in physiologischen Konzentrationen enthält, wurde als Simulationsflüssigkeit physiologischer Bedingungen genutzt. Als Negativkontrollen wurden physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) und die körperfremde Alginatlyase (1% m/V in BSS) verwendet. Über einen Zeitraum von 9 Tagen wurden täglich die Testlösung im 5fachen Überschuss gewechselt und hinsichtlich der Menge gelösten Alginats mit Hilfe des Uronsäure-Assays untersucht. Mit der Menge gelösten Alginats konnte anschließend der restliche Alginatgehalt des Gels berechnet werden. Es zeigte sich, dass binnen einen Tages die Alginatgele durch die Alginatlyase enzymatisch vollständig abgebaut und verflüssigt wurden. Die tägliche Gabe monovalenter Natrium-Ionen führte zu einem schrittweisen, nahezu linearen Abbau der Gele. Innerhalb von 9 Tagen haben sich die Calcium-vernetzten Alginatgele in 0,9% NaCl vollständig verflüssigt. Im Gegensatz dazu waren die Alginatgele in physiologischer BSS über den Versuchszeitraum von 9 Tagen stabil und keine Mengen an gelöstem Alginat in BSS detektierbar.

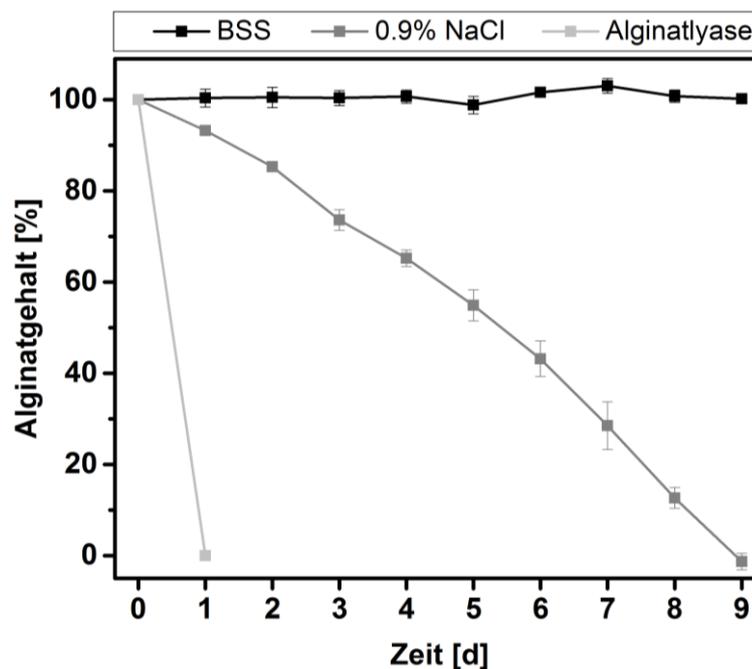


Abbildung 21: Degradationsverhalten von Alginatgelen in *Balanced Salt Solution* (BSS) als Simulationsflüssigkeit physiologischer Bedingungen, isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) und einer 1%igen Enzymlösung körperfremder Alginatlyase in BSS; n = 5.

Untersuchungen zu den refraktiven Eigenschaften hochvolumiger Alginatgele

Die Brechungsindizes der 1,0%igen Alginatmatrizen wurden mit Hilfe des Handrefraktometers HRB18-T (A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg, Deutschland) im Vergleich zu den Hyaluronsäure-basierten Matrizen und Silikonöl untersucht (Tabelle 4). Der gelartige, humane Glaskörper besaß einen Brechungsindex von 1,3360, der durch die progressive Verflüssigung einen Wert von 1,3356 annahm. 1,0%ige Alginat- und Hyaluronsäure-Gele besaßen mit dem Glaskörper vergleichbare refraktive Eigenschaften. Die Gelierung der Biopolymer-Sole führte dabei zu einer geringen Erhöhung der Brechungsindizes, die sich durch die Injektion der Gele durch eine 23G-Kanüle wieder reduzierte. Im Gegensatz dazu besaß das Silikonöl 5000 mit einen Brechungsindex von 1,4034 deutlich erhöhte refraktive Eigenschaften.

Tabelle 3: Repräsentative refraktive Indizes von Alginatmatrizen im Vergleich zu Hyaluronsäure-Matrizen, Silikonöl und humanen Glaskörpern als Referenz menschlichen Gewebes.

	Fluid	Gel	Gel nach 23G-Injektion
Humaner Glaskörper	1,3356	1,3360	-
1,0% Alginat	1,3359	1,3363	1,3359
1,0% Hyaluronsäure	1,3353	1,3356	1,3353
Silikonöl 5000	1,4034	-	-

Untersuchungen zur Biokompatibilität hochvolumiger Alginatgele

Nachdem hochvolumige Alginatgele hinsichtlich ihrer mechanischen und optischen Eigenschaften charakterisiert vorlagen, galt es die Biokompatibilität der Polymersysteme zu überprüfen. Neben den Calcium-vernetzten Alginatgelen wurden die Einzelkomponenten, d.h. die Alginatlösungen (0,5% bzw. 1%) und der Calciumgehalt, auf ihre Zytotoxizität untersucht. Getestet wurde die übliche Menge an Calcium in Zellmedien (1,05 mM), im Vernetzungsbad (15 mM) und ein dazwischenliegenden Wert (7,5 mM). Die einzelnen Substanzen wurden für 24 h bei 37 °C mit humanen, adulten, retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19) und humanen Fibroblasten inkubiert und anschließend die metabolische Aktivität der Zellen untersucht und mit den Kontrollgruppen (keine Substanz-Exposition) verglichen (Abbildung 22). Mit > 90% Viabilität beider Zellsysteme zeigten sowohl 0,5% als auch 1%ige Ca-Alginatgele hohe Biokompatibilität. Die Hinzugabe von unvernetztem Alginat und freien Calcium-Ionen höherer Konzentration führte zur Reduktion der metabolischen Zellaktivität. Humane RPE-Zellen und Fibroblasten, die mit hochviskoser, unvernetzter

Ergebnisse

1%iger Alginate-Lösung in Kontakt gesetzt wurden, besaßen eine reduzierte Viabilität von 80%. Erhöhte Konzentrationen an Ca^{2+} (7,5 mM) werden von den ARPE-19 und humanen Fibroblasten mit >90% metabolischer Aktivität gut vertragen. Hingegen waren 15 mM Calcium-Lösungen nachweislich zytotoxisch (<5% Zellviabilität). Aufgrund gründlicher Waschschrte mit BSS werden jedoch ungebundenes Alginate und Calcium aus den Alginategelen entfernt und somit ein zellschädigender Kontakt ausgeschlossen.

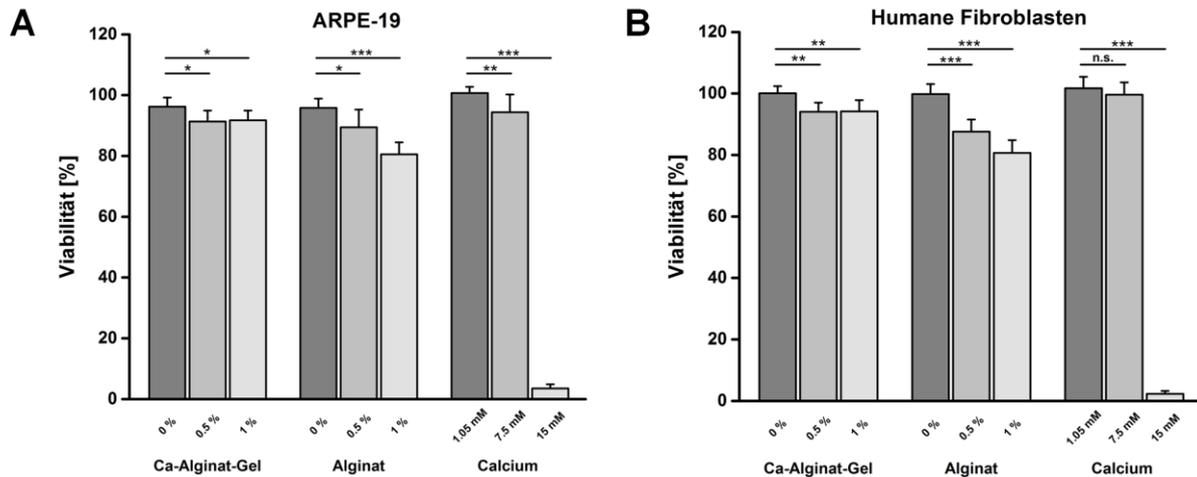


Abbildung 22: Vergleichende Untersuchungen zur metabolischen Aktivität humaner ARPE-19 (A) und Fibroblasten (B) zeigen gute Biokompatibilitäten der Ca-Alginat-Gelen mit >90% metabolischen Zellaktivität. Hingegen führten die unvernetzten Einzelkomponenten zur zytotoxischen Interaktion mit reduzierten Zellviabilitäten. Unterschiede zwischen Gruppen waren mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ () und $p < 0,001$ (***) signifikant; $n = 8$.**

Zusammenfassend konnten in diesem Teil der Arbeit hochvolumige, Calcium-vernetzte Alginategele hergestellt werden, die transparent, viskoelastisch, injizierbar, unter physiologischen Salzkonzentrationen stabil und biokompatibel waren.

4.3 Initiierung von Zell-Matrix Adhäsionen an Alginate-basierten Hydrogelen

Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines bereits veröffentlichten Artikels (104).

Für eine Vielzahl von humanen Zellen ist die Verankerung an einem Substrat über Fokalkontakte (Adhäsion) entscheidend für die Vitalität und Funktionalität. Die Nutzung der biokompatiblen, flexiblen Alginatematrizen für die Kultivierung verankerungsabhängiger Zellen erfordert daher das Überwinden der anti-adhäsiven Eigenschaften des Alginategerüsts durch geeignete Modifikationsstrategien. Folglich soll in diesem Teil der Arbeit der Einfluss der Oberflächenchemie von Matrizen auf die Adhäsion humaner Zellen am Beispiel von Carboxyl- und Phenolgruppen vergleichend untersucht werden.

4.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Tyramin-konjugierten Alginaten

Im folgenden Kapitel dieser Arbeit soll die Konjugation von Tyramin, das eine Phenoleinheit im Molekülgerüst trägt, an Alginat-basierte Gele vergleichend untersucht sowie die generierten, unterschiedlichen Matriceigenschaften charakterisiert werden.

Funktionalisierungsnachweis und Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der Carbodiimid-Chemie (EDC/NHS) konnte Tyramin erfolgreich und reproduzierbar an Alginat-basierte Gerüststrukturen konjugiert werden (Abbildung 23). Zunächst wurden die freien Carboxyl-Gruppen der Alginategele durch EDC aktiviert und mit NHS zu einem semi-stabilen Intermediat verestert. Die resultierten NHS-Alginat-Ester konnten anschließend mit Tyramin unter Bildung einer Amid-Bindung zwischen Alginat und Tyramin reagieren.

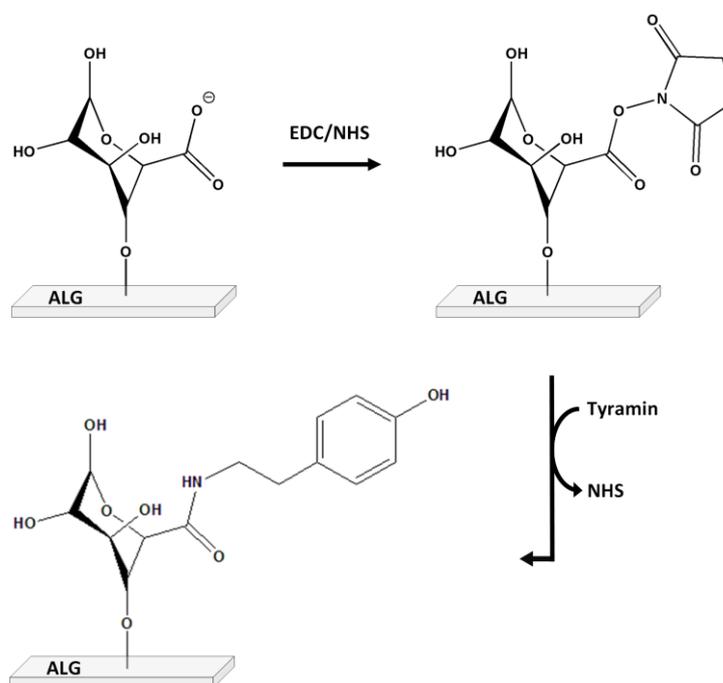


Abbildung 23: Schematischer Reaktionsverlauf der Carbodiimide-Chemie (EDC/NHS)-vermittelten Funktionalisierung von Alginat mit Tyramin. Abbildung abgeändert aus (104).

Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ließen sich die Strukturen der Ausgangsstoffe und der Reaktionsprodukte aufklären und derart ein Kopplungsnachweis von Tyramin an Alginat erbracht werden (Abbildung 24). Die ^1H -NMR-Spektren der Alginate (ALG) zeigten die typischen Signale der homo- und heterogenen Polymerblöcke bei 5,06 ppm (G), 4,77 ppm (GGM), 4,72 ppm (MGM), 4,70 ppm (MG), 4,66 ppm (MM) und 4,46 ppm (GG). Durch die Tyramin-Funktionalisierung der Alginate (ALGTYR) waren zusätzliche Signale im ^1H -Spektrum nachweisbar. Insbesondere bei einer chemischen Verschiebung von 6,88-7,23 ppm

Ergebnisse

konnten die aromatischen Protonen der mit Tyramin eingeführten Phenolgruppe neben den Signalen des Alginats und restlicher Carbodiimide-Chemie abgebildet werden. Tyramin-korrespondierende Signale blieben ohne den Einsatz der Carbodiimide Chemie im ^1H -Spektrum (ALG+TYR (-EDC/NHS)) aus. Durch die Verwendung unterschiedlicher Mengen an Tyramin wurden verschiedenen Tyramin-funktionalisierte Alginatstrukturen hergestellt, die fortan für weitergehende, vergleichende Untersuchungen zur Verfügung standen.

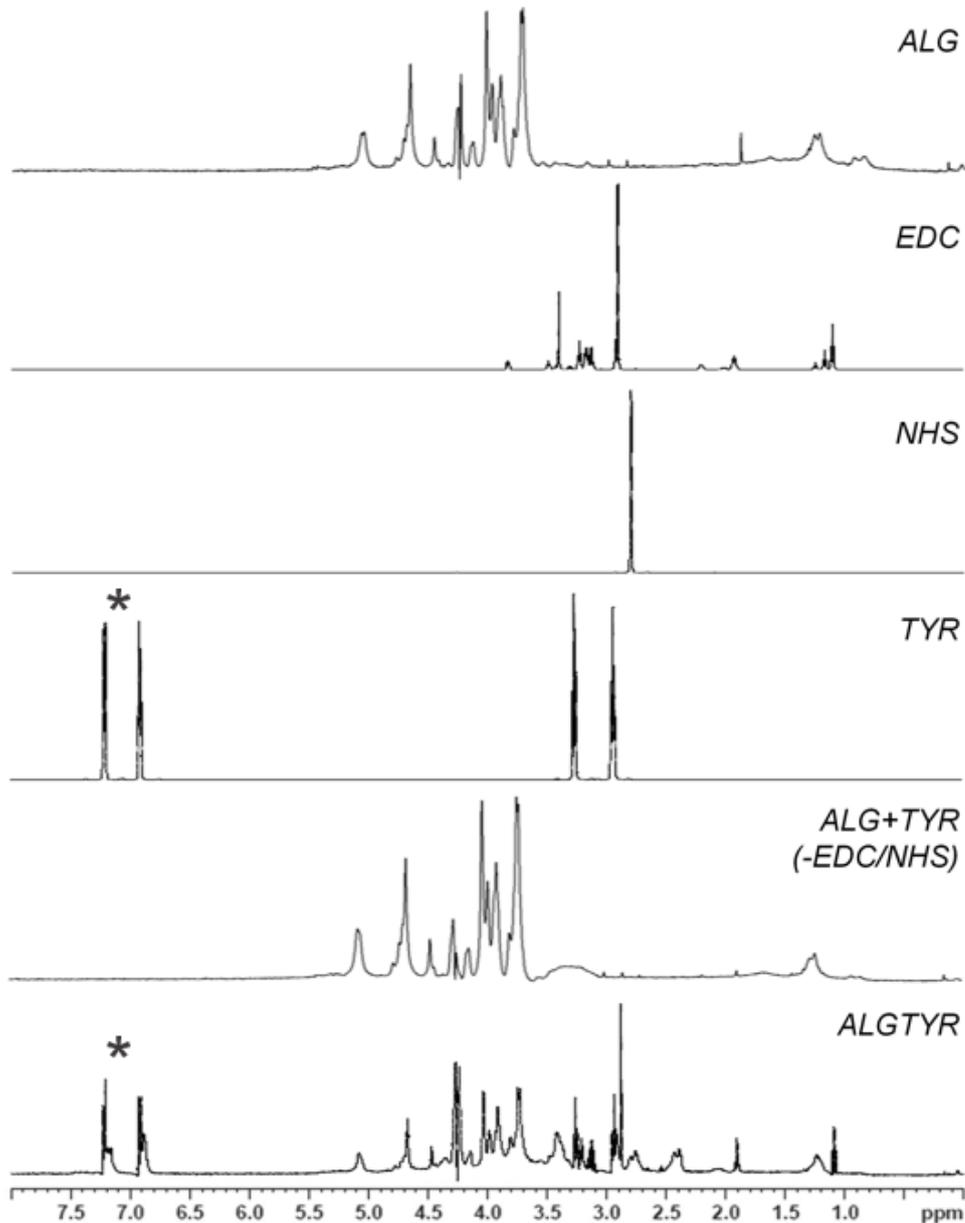


Abbildung 24: Exemplarische ^1H -NMR-Spektren zur Strukturaufklärung und Reaktionsverfolgung Tyramin-funktionalisierter Alginate. Durch die Funktionalisierung von Alginatgelen (ALG) mit Tyramin (TYR) mittels Carbodiimide-Chemie (EDC/NHS) konnten neben der Alginat-typischen Signalaufspaltung homogener und heterogener Polymerblöcke die aromatischen Protonen der mit Tyramin eingeführten Phenolgruppen (*) nachgewiesen werden (ALGTYR). Abbildung abgeändert aus (104).

Benetzbarkeit

Die Kontaktwinkel von nativen und modifizierten Alginatgelen konnten im Vergleich zur Standardzellkulturplastik über die *“captive bubble“*-Methode bestimmt und infolgedessen Aussagen über die Benetzbarkeit der Oberflächen getroffen werden (Abbildung 25). Die Oberfläche von Polystyrol-basierter Zellkulturplastik (PC) besaß mit Kontaktwinkeln von $39,8 \pm 0,9^\circ$ einen hydrophilen Charakter. Eine Beschichtung der Zellkulturplastik mit Alginatgelen (ALG) resultierte in leicht erhöhte Kontaktwinkel von $46,7 \pm 0,5^\circ$, die nach der Modifikation mittels Carbodiimide-Chemie (NHS) auf $56,2 \pm 0,5^\circ$ anwuchsen. Die anschließende Reaktion mit Tyramin ergab hingegen eine Abnahme der Kontaktwinkel, die mit steigendem Tyramin-Gehalt auf $51,1 \pm 0,5^\circ$ ($2,5 \text{ mg/cm}^2$), $43,9 \pm 2,2^\circ$ ($7,5 \text{ mg/cm}^2$) und $38,8 \pm 1,3^\circ$ ($12,5 \text{ mg/cm}^2$) sanken. Somit konnte durch die Funktionalisierung der Alginate mit $12,5 \text{ mg Tyramin/cm}^2$ eine Benetzbarkeit der Oberfläche vergleichbar mit der von Standardzellkulturplastik hergestellt werden.

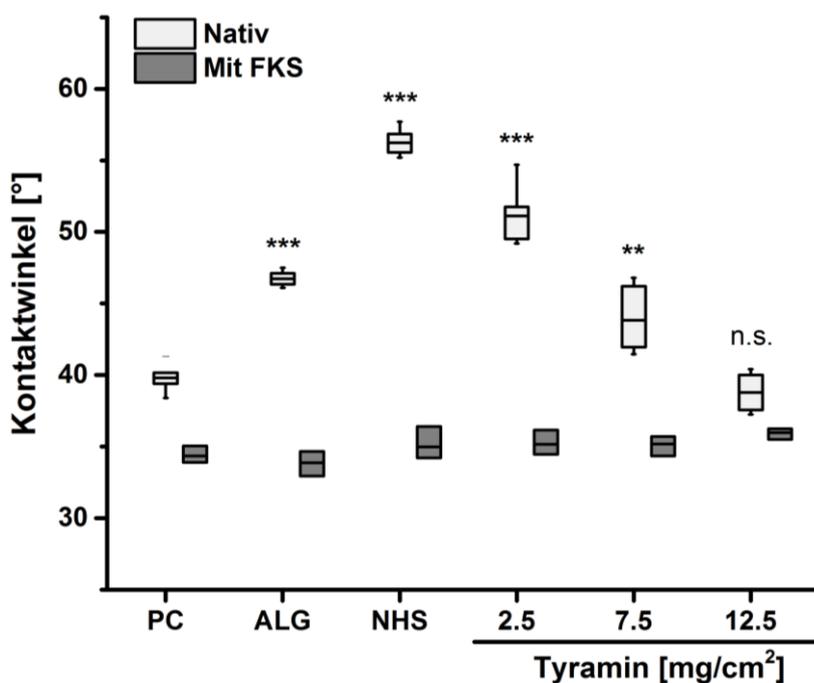


Abbildung 25: Kontaktwinkelmessungen von nativen Alginatgelen (ALG) und deren Derivaten nach Carbodiimide-Chemie (NHS), Modifikation mit verschiedenen Mengen an Tyramin im Vergleich zur Polystyrol-basierten Zellkulturplastik (PC) und Inkubation mit fetalem Kälberserum (FKS). Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu PC waren mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) signifikant (n.s. = nicht signifikant); $n \geq 3$. Abbildung abgeändert aus (104).

Oberflächenladung

Mit Hilfe von Zetapotential-Messungen konnten die Ladungen verschiedenster Oberflächen untersucht werden (Abbildung 26). Stark negative Zetapotentiale wurden für Polystyrol (PC) mit $-33,4 \pm 2,5$ mV und unmodifizierte Alginatgele (ALG) mit $-23,5 \pm 2,9$ mV gemessen. Die Funktionalisierung von ALG mittels Carbodiimide-Chemie (NHS) ergab weniger negativ geladenen Oberflächen ($-6,80 \pm 1,76$ mV), die durch die Kopplung von Tyramin zunehmend negativer wurden ($2,5 \text{ mg/cm}^2$: $-4,79 \pm 1,83$ mV; $7,5 \text{ mg/cm}^2$: $-8,75 \pm 3,56$ mV; $12,5 \text{ mg/cm}^2$: $-13,4 \pm 2,0$ mV). Alginatgele, die mit $12,5 \text{ mg}$ Tyramin/ cm^2 modifiziert wurden, besaßen letztendlich Oberflächenladungen vergleichbar mit Serum-inkubierten Oberflächen (Mit FKS).

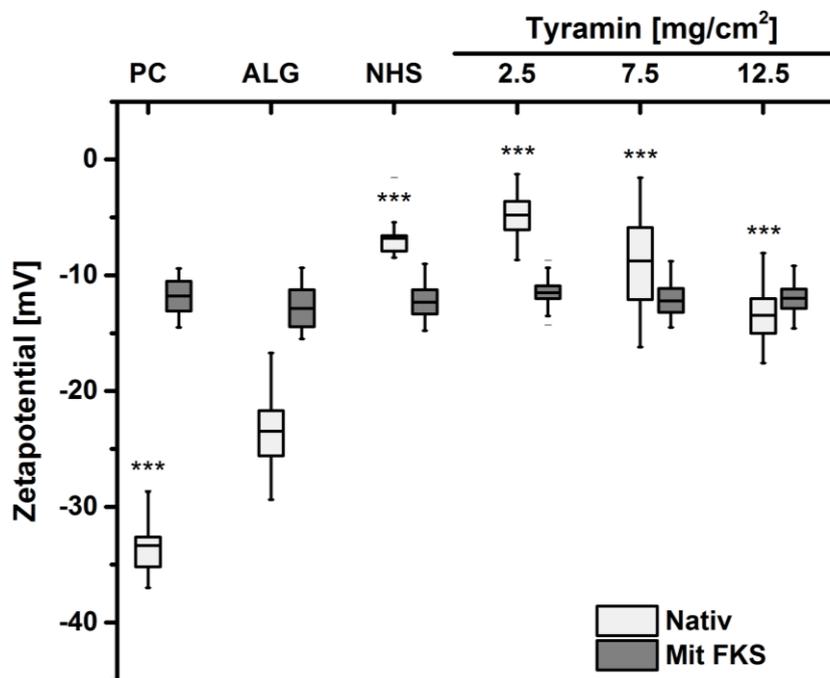


Abbildung 26: Oberflächenladungen von Polystyrol-basierten Zellkulturplastik (PC), nativen Alginatgelen (ALG) und deren Derivate nach Carbodiimide-Chemie (NHS) sowie Modifikation mit verschiedenen Mengen an Tyramin und Inkubation mit fetalem Kälberserum (FKS). Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit $p < 0,001$ (***) als signifikant erachtet; $n = 3$, $N \geq 5$. Abbildung abgeändert aus (104).

Mechanische Stabilität

Die mechanischen Eigenschaften der nativen Alginatgele sowie der Einfluss der Tyramin-Funktionalisierung auf die mechanische Stabilität der Gele wurden mit Hilfe von Deformationsversuchen (Kompression der Gele) bestimmt (Abbildung 27). Native Alginatgele (ALG) zeigten mit Elastizitätsmodulen von $40,4 \pm 4,7$ kPa geringe Steifigkeiten. Der Einsatz der Carbodiimide-Chemie resultierte in vergleichsweise steifere Geleigenschaften größerer Streuung (NHS: $78,8 \pm 29,2$ kPa). Mit zunehmender Funktionalisierung der NHS-

modifizierten Alginatgele mit Tyramin (2,5, 7,5 und 12,5 mg Tyramin/cm²) nahm die Steifigkeit der Gele mit $81,7 \pm 5,8$ kPa, $71,0 \pm 14,4$ kPa bzw. $60,1 \pm 14,9$ kPa ab.

Zusammenfassend gelang es geliertes Alginat unter Einsatz der Carbodiimide-Chemie mit Tyramin bei Raumtemperatur und physiologischen pH erfolgreich und im unterschiedlichen Maße zu modifizieren. Zur Strukturaufklärung und als Nachweis der Funktionalisierung hat sich die ¹H-NMR-Spektroskopie als effektiv erwiesen. Für die weiterführenden Versuche zur Etablierung von Zell-Matrix Adhäsionen konnte fortan auf unterschiedlich hergestellte Tyramin-funktionalisierte Alginatgele zurückgegriffen werden, die hinsichtlich der Eigenschaften ihrer Oberfläche (Benetzbarkeit und Ladung) und mechanischen Stabilität (Steifigkeit) charakterisiert vorlagen.

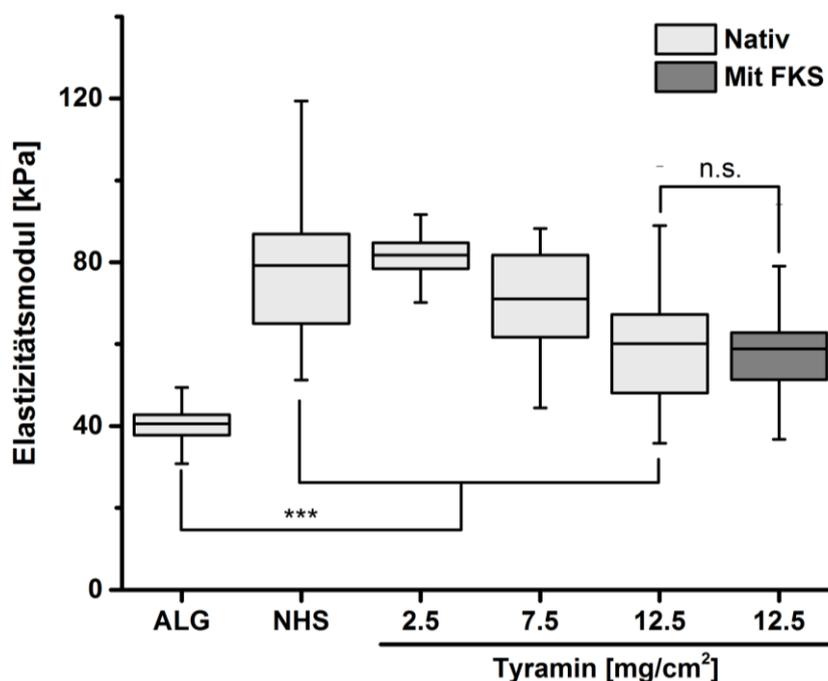


Abbildung 27: Mechanische Stabilität von nativen Alginatgelen (ALG) und deren Derivate nach Carbodiimide-Chemie (NHS), Modifikation mit verschiedenen Mengen an Tyramin und Inkubation mit fetalem Kälberserum (FKS). Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu PC waren mit $p < 0,001$ (***) signifikant (n.s. = nicht signifikant); $n = 3$, $N \geq 3$. Abbildung abgeändert aus (104).

4.3.2 Untersuchungen zur Proteinadsorption an Tyramin-funktionalisierten Alginaten

In diesem Kapitel der Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss die generierten Oberflächen unterschiedlicher Chemie (/Eigenschaft) auf das Adsorptionsverhalten von Zell-Matrix mediierenden Proteinen hat.

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Tyramin-Funktionalisierung von Alginatgelen auf den Gehalt adsorbierter Proteine

Zum quantitativen Nachweis Oberflächen-adsorbierter Proteine wurden zwei verschiedene Assays untersucht. Der Pierce™ BCA Protein Assay nutzt die Reduktionsreaktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine aus, um mit Hilfe des farbigen Produkts ($\lambda_{\text{Absorption}} = 562 \text{ nm}$) der hochsensitiven Reaktion der Bicinchoninsäure mit Cu^+ die totale Proteinkonzentration im Vergleich zu einem Proteinstandard zu bestimmen. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Ellmans Reagenz die Sulfhydryl-Gruppen der adsorbierten Proteine bestimmt, die durch die Freisetzung des farbigen Produkts ($\lambda_{\text{Absorption}} = 412 \text{ nm}$) der Reaktion von DTNB mit den Thiolen in einer Probe angezeigt werden. Beide Proteinadsorptionsstudien ergaben mit zunehmender Tyramin-Konjugation erhöhte Mengen an adsorbierten Proteinen auf der Hydrogel-Oberfläche (Abbildung 28 A/B). Im Vergleich zur Zellkulturplastik PC konnten sowohl auf den nativen als auch auf den modifizierten Hydrogel-Oberflächen größere Mengen an adsorbierten Proteinen nachgewiesen werden (Abbildung 28 B).

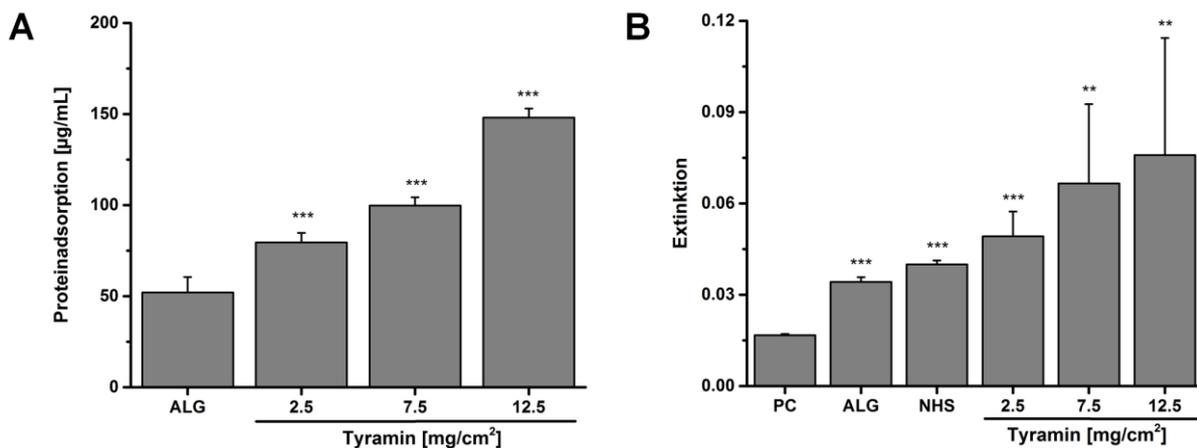


Abbildung 28: Studien zur Adsorption von Proteinen auf Oberflächen nativer Alginatgele (ALG) und modifizierter Alginatgele mit der Carbodiimide-Chemie (NHS) und verschiedenen Konzentrationen an Tyramin im Vergleich zur Standardzellkulturplastik (PC) unter Verwendung des BCA Protein Assays (A) und Ellmans Reagenz (B); n = 5. Abbildung abgeändert aus (104).

Untersuchungen zur Stabilität von Proteinen auf Tyramin-funktionalisierten Alginaten

Die Stabilität von Proteinen, die auf Tyramin-modifizierten Oberflächen adsorbierten, wurde am Beispiel von Laminin bei einer Lagerungstemperatur von $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und verschiedenen Lagerzeiten (0, 7 und 14 d) mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen gegen Laminin untersucht (Abbildung 29). Tyramin-funktionalisierte Alginatgele ohne Laminin-Beschichtung zeigten keine Immunfluoreszenz (Abbildung 33: nativ, Negativkontrolle). Hingegen ließ sich nach Inkubation der Tyramin-Alginatgele mit Laminin und entsprechender

Antikörperfärbung gegen Laminin Fluoreszenzsignale und somit die Anwesenheit von Protein nachweisen (Abbildung 33: mit Protein (0d), Positiv-Kontrolle). Auch nach einer statischen Lagerung der Laminin-beschichteten Tyramin-Alginatgele bei 4 °C für 7 Tage als auch für 14 Tage war Laminin auf der Geloberfläche via Immunfärbungen detektierbar (Abbildung 33: mit Protein (7 d), mit Protein (14 d)).

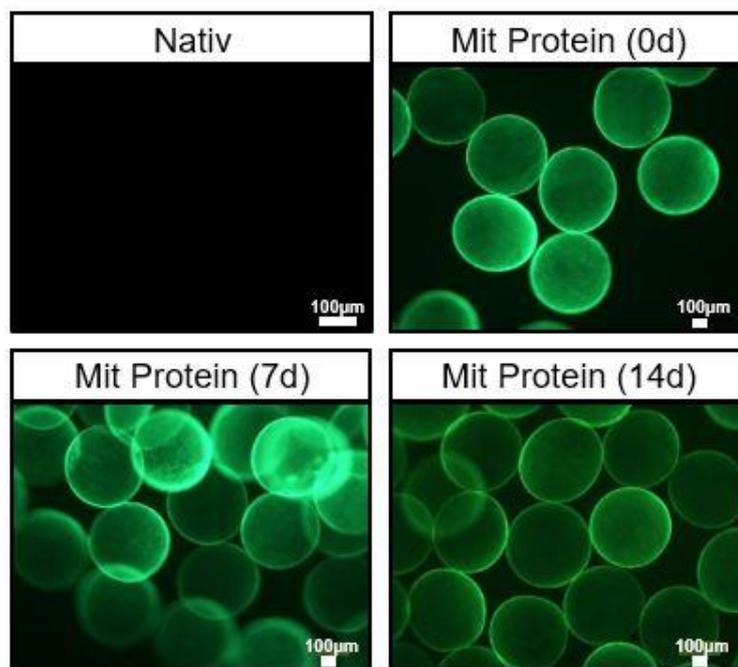


Abbildung 29: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder von Tyramin-funktionalisierten Alginatgelen ohne (nativ, Negativkontrolle) und mit Laminin-Beschichtung (mit Protein (0d), Positivkontrolle). Die adsorbierten Proteine lagen mindestens für einen Zeitraum von 14 Tagen stabil auf der Geloberfläche vor. Abbildung abgeändert aus (104).

Untersuchungen zum Einfluss der Proteinadsorption auf die Materialeigenschaften

Nachdem die Adsorption und Stabilität von Proteinen auf Tyramin-Alginatgelen nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, inwieweit die Proteinadsorption die Materialeigenschaften beeinflusst. Dazu wurden nach Inkubation der Materialien mit fetalem Kälberserum die Kontaktwinkel (Abbildung 29, mit FKS) und Ladung (Abbildung 30, mit FKS) der verschiedenen Oberflächen als auch die mechanischen Eigenschaften (Abbildung 31, mit FKS) analysiert. In Folge der Proteinadsorption hat sich die Benetzbarkeit aller untersuchten Oberflächen an Kontaktwinkeln von $34,9 \pm 0,9^\circ$ angeglichen. Auch die Zetapotentiale der initial unterschiedlich geladenen Oberflächen lagen nach der Adsorption von Proteinen vergleichbar bei $-12,1 \pm 1,5$ mV vor. Im Gegensatz dazu zeigten sich die mechanischen Stabilitäten unbeeinflusst von den adsorbierten Proteinen.

Zusammenfassend konnte zunächst der Nachweis von Proteinen auf nativen und modifizierten Alginatgelen unterschiedlicher Chemie erbracht werden und anschließend der Gehalt und die Stabilität Oberflächen-adsorbierter Proteine vergleichend untersucht werden. Darüber hinaus war es möglich, die Eigenschaftsänderung der Geloberflächen durch die Adsorption von Proteinen zu bestimmen. Infolgedessen standen für die weiterführenden Untersuchungen der Zell-Matrix Kontakte humaner Zellen mit nativen und modifizierten Alginatgelen verschiedenste Oberflächen zur Verfügung, die mit Zelladhäsions-mediierenden Proteinen ausgestattet waren.

4.3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Adhäsion humaner Zellen an Tyramin-modifizierten Alginaten

In diesem Kapitel der Arbeit soll untersucht werden, inwieweit durch die Funktionalisierung der Alginatgele mit Tyramin die bioinerten Eigenschaften nativer Alginatgerüste überwunden werden und folglich bioaktive Oberflächen geschaffen werden können, die die Adhäsion humaner Zellen begünstigen.

Adhäsionsverhalten humaner, mesenchymaler Stammzellen auf Tyramin-funktionalisierten Alginatgelen

Zur Beurteilung der zelladhäsiven Eigenschaften nativer und verschieden modifizierter Alginatgerüste wurden humane mesenchymale Stammzellen auf sphärischen Alginatgelen ohne und nach unterschiedlicher Modifizierung in hängenden Tropfen kultiviert (Abbildung 30). MSCs, die mit nativen Alginatgelen (-EDC/NHS, -TYR) in Kontakt gesetzt worden sind, zeigten keine zelluläre Adhäsion und Ausbreitung auf der Geloberfläche, blieben abgerundet in Suspension und bildeten durch Zell-Zell-Kontakte Agglomerate aus.

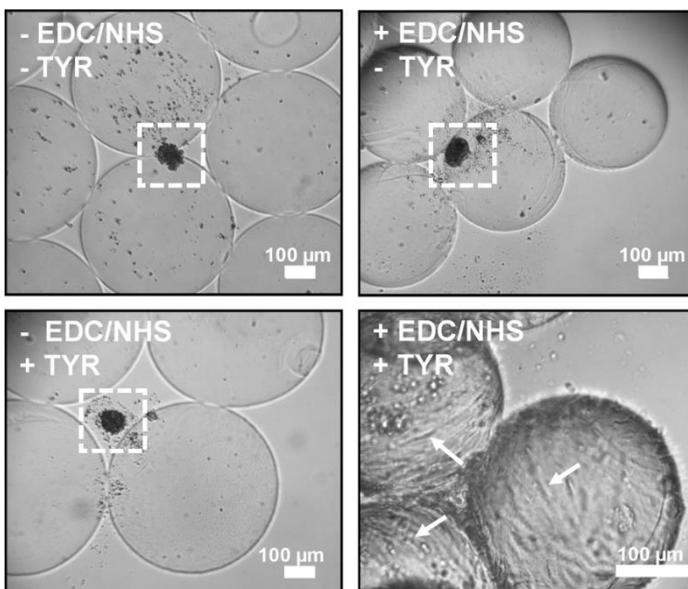


Abbildung 30: Repräsentative Durchlichtbilder humaner, mesenchymaler Stammzellen (MSCs), die in hängenden Tropfen auf sphärischen Alginatgelen ohne (-EDC/NHS, -TYR) oder nach Modifikation mit der Carbodiimide-Chemie (+EDC/NHS, -TYR), Tyramin (-EDC/NHS, +TYR) oder der Carbodiimide-Chemie und Tyramin (+EDC/NHS, +TYR) kultiviert wurden. Repräsentative Markierungen von adhären MSCs (weißer Pfeil) und Zellsphäroiden (weiß gestricheltes Viereck). Abbildung abgeändert aus (104).

Darüber hinaus waren Zelltrümmer zu beobachten. Vergleichbares Zellverhalten konnte auf Alginoberflächen beobachtet werden, die mit der Carbodiimide-Chemie (+EDC/NHS, -TYR) oder nur mit Tyramin (-EDC/NHS, +TYR) funktionalisiert worden waren. Erst nach einer Funktionalisierung der Alginategele mit der Carbodiimide-Chemie und Tyramin (+EDC/NHS, +TYR) adhärten mesenchymale Stammzellen auf den sphärischen Gelstrukturen, breiteten sich auf der Oberfläche aus und bildeten einen konfluenten Zellrasen.

Adhäsionsverhalten humaner, induziert-pluripotenter Stammzellen (hiPSCs) auf Tyramin-funktionalisierten Alginategelen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Modifikation von Alginategelen mit Tyramin eine adhärente Kultivierung von MSCs erlaubt, wurden weitergehend die Zell-Matrix Kontakte humaner, induziert-pluripotenter Stammzellen, hiPSCs, die eine komplexere Mikroumgebung als MSCs benötigen, in initialen Versuchen untersucht. Dazu wurde das Adhäsionsverhalten von hiPSCs auf nativen und unterschiedlich funktionalisierten Alginategelen nach der Kultivierung in hängenden Tropfen mit einer Zellzahl von 30×10^4 hiPSCs/cm² Alginoberfläche an verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (2 h, 5 h und 24 h) dokumentiert (Abbildung 31). Als Negativkontrolle dienten native Alginategele, auf denen hiPSCs nicht adhärten und abgerundet als Einzelzellen oder als Zellagglomerate in Suspension vorlagen. Aufgrund der hohen Zahl an Einzelzellen erfolgte nach 5 h ein Waschschriff, um die Zelladhäsion besser beurteilen zu können. HiPSCs, die mit EDC/NHS-modifizierten Alginategelen in Kontakt gesetzt wurden, lagen vergleichbar zur Negativkontrolle als nicht-adhärente Einzelzellen in Suspension vor, die nach dem Waschschriff entfernt wurden und blanke Alginategele zurückließen. Eine Modifikation der Gele mit EDC/NHS, Tyramin und dem Protein Laminin-521 ergab, dass hiPSCs bereits nach einer Inkubationszeit von 2 h an die funktionalisierten Gelstrukturen anhefteten und sich binnen 5 h ausbreiteten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h waren die Laminin-beschichteten Tyramin-Alginategele konfluent mit hiPSCs bewachsen, die aufgrund fehlender Expansionsoberfläche zu Zell-Zell Kontakten neigten und dadurch Cluster an dichtbewachsenden Gelstrukturen ausbildeten. Da eine direkte Modifikation von Laminin-521 an Alginategele via Carbodiimide keine Zelladhäsion hervorbrachte, wurde das dokumentierte Adhäsionsverhalten von hiPSCs auf Laminin-beschichteten Tyramin-Alginategelen mit dem auf Alginategelen verglichen, die mittels Carbodiimide mit Vitronektin funktionalisiert in vergangenen Arbeiten bereits eine Zelladhäsion von hiPSCs zeigten (Positivkontrolle). Im Vergleich zur Positivkontrolle zeigten hiPSC auf Laminin-beschichteten Tyramin-Alginategelen nach 5 h Inkubation eine gleichmäßige Adhäsion über die gesamte

Wachstumsoberfläche mit geringerer Tendenz zur Ausbildung von Agglomeraten nicht-adhärterer Zellen.

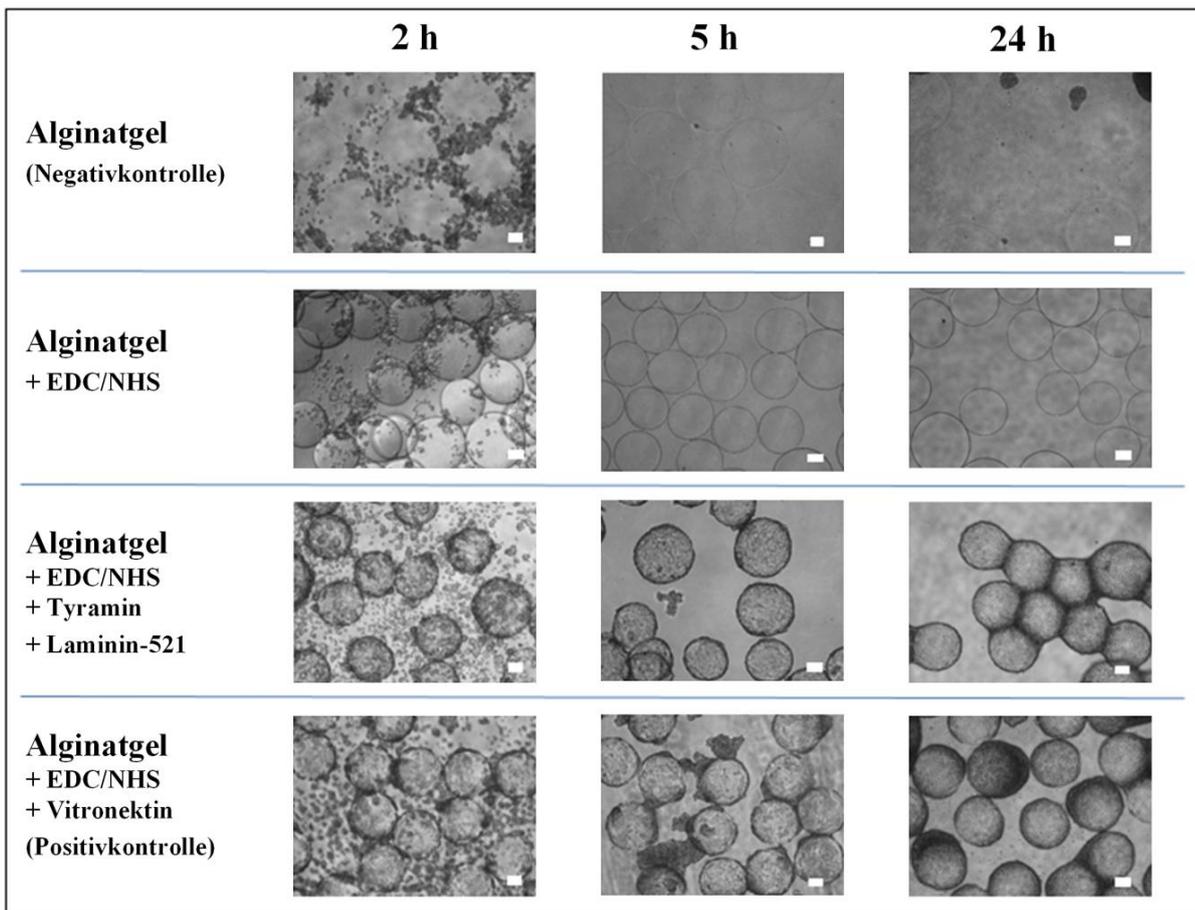


Abbildung 31: Repräsentative Durchlichtbilder humaner, induziert-pluripotenter Stammzellen, die in hängenden Tropfen auf sphärischen Alginategelen ohne und nach unterschiedlicher Modifizierung verschieden lang kultiviert worden sind. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Nachdem der Nachweis der Adhäsion von hiPSCs auf Laminin-beschichteten Tyramin-Alginategelen erbracht werden konnte, wurden das Adhäsionsverhalten hinsichtlich des Tyramin- und Proteingehalts der funktionalisierten Gelstrukturen analysiert.

Untersuchungen zum Einfluss des Funktionalisierungsgrads an Tyramin auf das Adhäsionsverhalten von hiPSC

Die Zell-Matrix Kontakte von hiPSCs an Laminin-beschichteten Alginategelen wurden an zwei verschiedenen Zelllinien (ER 19-18 und UKBi005) und unterschiedlichen Quantitäten an Tyramin pro Wachstumsoberfläche hinsichtlich der Zelladhäsion beurteilt. Nach 24-stündiger Kultivierung der hiPSCs auf den verschieden modifizierten Tyramin-Alginaten gleicher Proteinbeschichtung ($1 \mu\text{g Laminin-521}/\text{cm}^2$) zeichnete sich ein leichter Trend erhöhter Zelladhäsion mit zunehmender Tyramin-Konzentration ab (Abbildung 32). Auf den Durchlichtbildern der hängenden Tropfen (Abbildung 32 A) lagen bei einer Tyramin-

Konzentration von 2,5 mg/cm² modifizierte Alginatgele vor, auf denen beide hiPSC-Linien in gleicher Weise adhärten, jedoch teils Zellagglomerate und keine konfluenten Zellrasen vorwiesen. Die Erhöhung der Tyramin-Konzentration auf 7,5 mg/cm² bzw. 12,5 mg/cm² resultierte in höheren Zellzahlen, weniger Zellagglomerate und mehr konfluent bewachsenen Gerüststrukturen (Abbildung 32 A/B). Infolgedessen wurden für die weiterführenden Experimente Alginatgelstrukturen, die mit 12,5 mg Tyramin/cm² funktionalisiert wurden, herangezogen.

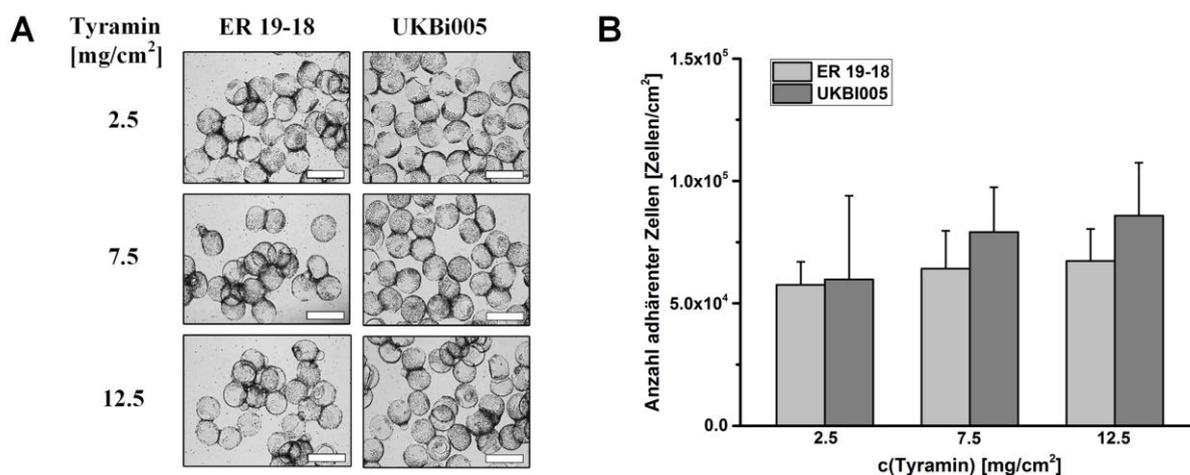


Abbildung 32: Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten von den hiPSC-Linien ER 19-18 und UKBi005 auf verschiedenen modifizierten Tyramin-Alginaten gleicher Proteinbeschichtung mit entsprechenden Durchlichtbildern (A) und der Anzahl adhärenter Zellen (B); n = 3. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Untersuchungen zum Einfluss des Proteingehalts auf das Adhäsionsverhalten von hiPSC

Zur Beurteilung des Adhäsionsverhalten von hiPSC auf Laminin-beschichteten Tyramin-Alginatgelen unterschiedlicher Proteinkonzentration bei gleicher Tyramin-Funktionalisierung (12,5 mg Tyramin/cm²) wurden die Zelllinien ER 19-18 und UKBi005 in hängenden Tropfen zusammen mit den unterschiedlich modifizierten, sphärischen Alginatgelen für einen Zeitraum von 24 h bei 37 °C kultiviert (Abbildung 33). Ein Proteingehalt von 0,5 µg Laminin pro cm² Wachstumsfläche ergab ein Adhäsionsverhalten beider hiPSC-Linien, welches von stellenweiser Zelladhäsion und Agglomeraten gekennzeichnet war (Abbildung 33 A). Zu beachten ist, dass die Zellagglomerate in der Auswertung der Anzahl adhärenter Zellzahlen einbezogen wurden und es deshalb zu vermeintlich erhöhten Werten kommen konnte (Abbildung 33 B). Die Anwendung größerer Proteinmengen (1,0 µg/cm²) führte zu einer vergleichsweise gleichmäßigeren Zelladhäsion und -ausbreitung hin zu konfluent bewachsenen Alginatgelen, die sich durch eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration (1,5 µg/cm² bzw. 2,5 µg/cm²) nicht maßgeblich veränderte (Abbildung 33 A/B).

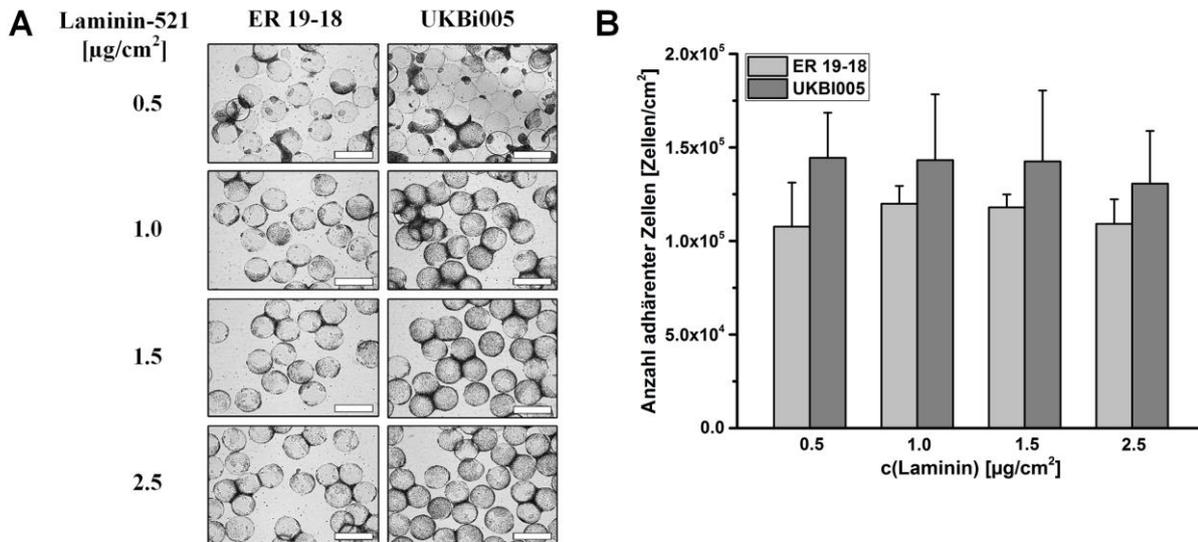


Abbildung 33: Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten von den hiPSC-Linien ER 19-18 und UKBi005 auf Laminin-beschichteten Tyramin-Alginatgelen unterschiedlicher Proteinkonzentration bei gleicher Tyramin-Funktionalisierung mit entsprechenden Durchlichtbildern (A) und der Anzahl adhärenter Zellen (B); n = 3. Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

Zusammenfassend konnten in diesem Teil der Arbeit die Alginatgele, die mit verschiedenen Gehalten an Tyramin funktionalisiert und hinsichtlich ihrer Materialeigenschaften und Proteinadsorption charakterisiert wurden, in Kontakt mit humanen, mesenchymalen und induziert-pluripotenten Stammzellen gesetzt und dadurch eine Zelladhäsion sowohl initiiert als auch optimiert werden.

4.4 Untersuchungen zum Einfluss der Ladung von Polymeroberflächen auf das Verhalten humaner Zellsysteme

Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines bereits veröffentlichten Artikels (16).

In direkter Beziehung zur Chemie einer Materialoberfläche steht dessen Ladung, die einen entscheidenden Parameter für das Wechselspiel von humanen Zellen mit einem Material darstellt. In diesem Teil der Arbeit soll daher der Einfluss der Oberflächenladung einer Matrix am Beispiel vom pH-responsiven Alginat auf das Verhalten humaner Zellen insbesondere mit Blick auf die Adhäsion und Differenzierung von MSCs untersucht werden.

4.4.1 Herstellung und Charakterisierung von PAMAM-konjugierten Alginaten

Im folgenden Kapitel dieser Arbeit soll die Konjugation von stark positiv geladenen Poly(amidoaminen) (PAMAM) an Alginat-basierte Gelgerüste vergleichend untersucht sowie die generierten, unterschiedlichen Matriceigenschaften charakterisiert werden. Dadurch sollen Materialoberflächen unterschiedlicher Ladungszustände für die Untersuchungen von Zell-Matrix Kontakte bereitgestellt werden.

Funktionalisierungsnachweis

Um Gelmatrizen verschiedener Ladung herzustellen, gelang es mittels Carbodiimide-Chemie die Alginatgele mit unterschiedlichen Mengen an positiv geladenen PAMAM auszustatten (Abbildung 34). Analog zur Tyramin-Funktionalisierung wurden zunächst die freien Carboxyl-Gruppen der Alginatgele durch EDC aktiviert und mit NHS verestert. Anschließend reagierten die NHS-Alginat-Ester mit verschiedenen Mengen an PAMAM (1,6, 3,2, 32, 324 und 3234 nmol PAMAM/cm²) unter Ausbildung einer Amid-Bindung zwischen Alginat und PAMAM.

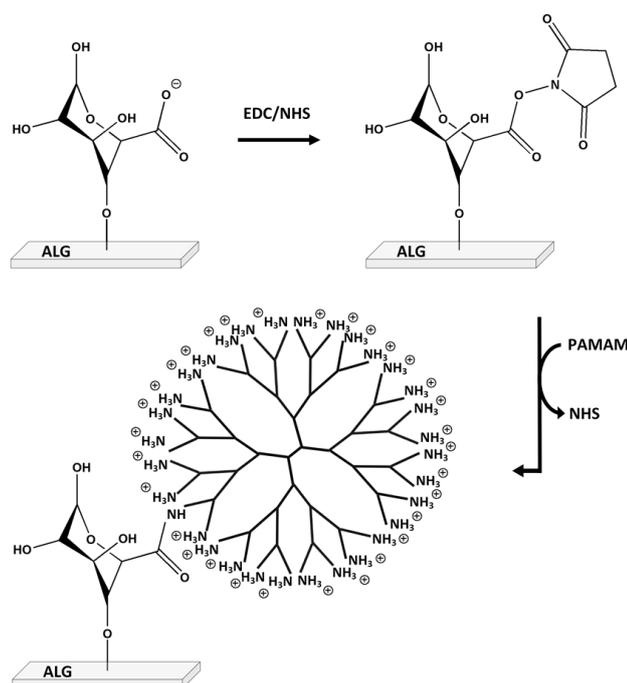


Abbildung 34: Schematischer Reaktionsverlauf der Carbodiimide-Chemie (EDC/NHS)-vermittelten Funktionalisierung von Alginat mit PAMAM. Abbildung abgeändert aus (16).

Die Kopplung von PAMAM an Alginatgelen wurde mit der energiedispersiven Röntgen- (EDX) und Raman-Spektroskopie untersucht (Abbildung 35). Die quantitative Analyse der EDX-Spektren ergab im Vergleich zum nativen Alginat steigende Anteile des Elements Stickstoff mit zunehmender PAMAM-Funktionalisierung. Eine Sättigung des Stickstoffgehalts trat mit hohen Konzentrationen an PAMAM (324 und 3245 nmol/cm²) bei 7,6 wt% ein. Einen vergleichbaren Trend ergaben die Untersuchungen der nativen und PAMAM-modifizierten Alginatgele mittels Raman-Spektroskopie. Die Raman-Signale im Bereich einer Verschiebung von 1555-1742 cm⁻¹ entsprachen der C=O Streckschwingung der Amid-Bande I. Die Integration dieser Bande resultierte in der Menge an gekoppeltem PAMAM.

Probe	EDX	Raman
	Stickstoffgehalt [wt%]	Peakfläche (Amid-Band I) [a.u.]
ALG	1,82 ± 0,55	1,49 ± 0,15
PAMAM [nmol/cm ²]	1,6	2,19 ± 0,78**
	3,2	2,32 ± 0,93**
	32	3,42 ± 1,34
	324	7,57 ± 1,24***
	3245	7,63 ± 1,16***

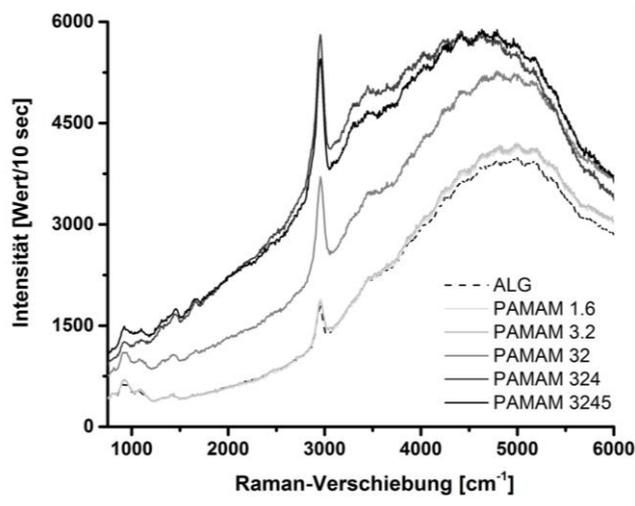


Abbildung 35: Charakterisierung der EDC/NHS-vermittelten Funktionalisierung von Alginatgelen (ALG) mit unterschiedlichen Mengen an PAMAM via energiedispersiver Röntgen- (EDX, n = 3) und Raman-Spektroskopie (n = 3, N = 3). Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit p < 0,01 () und p < 0,001 (***) als signifikant erachtet. Abbildung abgeändert aus (16).**

Neben der Ausbildung kovalenter Amid-Bindungen zwischen Alginat und PAMAM wurde außerdem auch das Adsorptionsverhalten von PAMAM untersucht und hierfür native Alginatgele für 24 h mit verschiedenen konzentrierten PAMAM-Lösungen (100, 200, 324, 648 und 1296 nmol/cm²) in Abwesenheit der vermittelnden Carbodiimide-Chemie inkubiert. Unter Verwendung der UV/VIS-Spektroskopie wurde mit der Menge nicht-adsorbierter PAMAM-Moleküle die Menge adsorbierter PAMAM kalkuliert. Die Auftragung entsprechender Ergebnisse resultierte in eine Adsorptionsisotherme, deren Verlauf gemäß der Brunauer, Emmett & Teller (BET)-Therorie charakteristisch für die Ausbildung von multiplen Adsorptionslagen war (Abbildung 36). PAMAM adsorbierte zunehmend bis zur Sättigung der Alginatgeloberfläche (Monolage; schwarze Datenpunkte) und darüber hinaus unter Bildung von Mehrlagen (graue Datenpunkte).

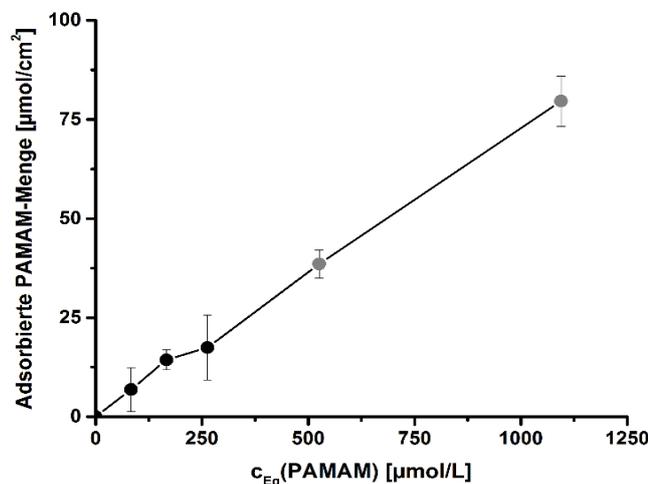


Abbildung 36: Adsorptionsverhalten von PAMAM hinsichtlich nativer Alginatgele (ohne Carbodiimide-Chemie). Die Adsorptionsisotherme deutet auf die Ausbildung mehrerer Lagen bei hohen PAMAM-Konzentrationen hin; n = 3. Abbildung abgeändert aus (16).

Zusätzlich stellten die vergleichenden Untersuchungen der Oberflächeneigenschaften von nicht- und verschiedenen PAMAM-modifizierten Alginatgelen weitere Charakterisierungen der PAMAM-Kopplung an Alginat dar.

Oberflächenladung

Die Ladung der verschiedenen Hydrogel-Oberflächen wurden unter Berücksichtigung der Zetapotential untersucht (Abbildung 37). Alginatgele mit nicht-modifizierten Carboxylgruppen (ALG) besaßen negativ geladene Oberflächen mit Zetapotentialen von $-22,5 \pm 2,7$ mV. Die Funktionalisierung der Alginatstrukturen mit PAMAM führte zu zunehmend positiv geladenen Geloberflächen mit Zetapotentialen bis zu $12,2 \pm 3,0$ mV. Matrigel-modifizierte Alginatgele (AMG) wiesen negative Zetapotentiale von $-4,66 \pm 1,42$ mV auf, die eher vergleichbar mit denen vom fetalen Kälberserum (FKS, $-7,09 \pm 0,61$ mV) waren.

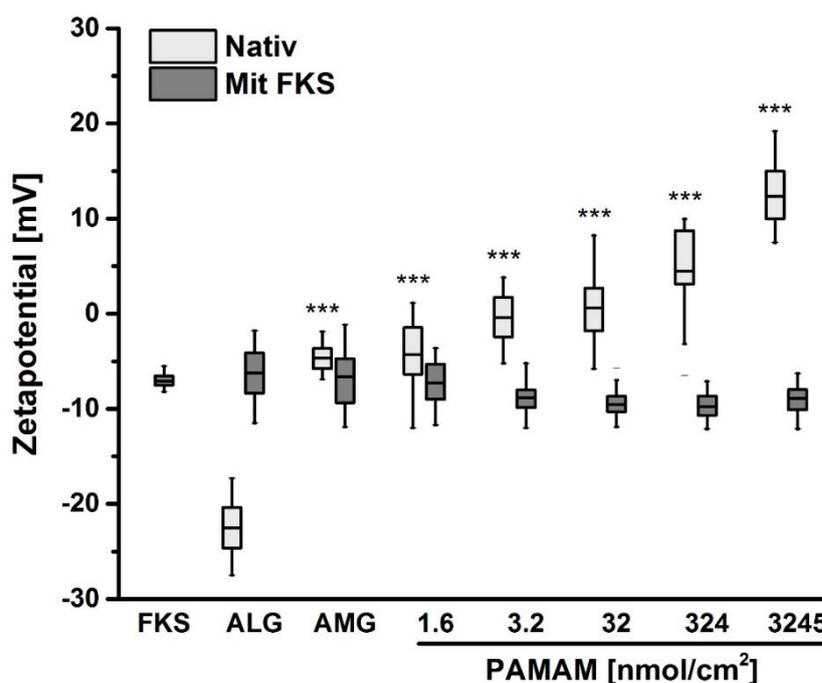


Abbildung 37: Zetapotential-Analysen von Alginatgelen (ALG) und deren Derivaten nach der Funktionalisierung mit Matrigel (AMG) oder verschiedenen Konzentrationen an PAMAM vor (nativ) und nach Inkubation mit fetalem Kälberserum (mit FKS). Unterschiede zwischen nativen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit $p < 0,001$ (***) als signifikant erachtet, $n = 3$, $N = 9$. Abbildung abgeändert aus (16).

Benetzbarkeit

Mit Hilfe der „captive bubble“-Methode gelang es die Kontaktwinkel sowohl der Standardzellkulturplastik (PC) als auch der verschiedenen Geloberflächen zu bestimmen (Abbildung 38). Die Oberflächen der Zellkulturplastik und nicht-modifizierten Alginatgele

Ergebnisse

zeigten hydrophile Kontaktwinkel. Die Funktionalisierung der Alginatgele mit Matrigel oder PAMAM resultierte in vergleichsweise hydrophilere Oberflächen. Dabei zeigten die verschiedenen PAMAM-modifizierten Alginatgele vergleichbare Kontaktwinkel unabhängig von der PAMAM-Konzentration.

Probe	Kontaktwinkel	
	Nativ [°]	Mit FKS [°]
PC	39.80 ± 0.95**	34.35 ± 0.50
ALG	45.77 ± 2.28	35.26 ± 4.59
AMG	39.90 ± 5.72	33.21 ± 3.11
PAMAM [nmol/cm ²]	1.6	34.19 ± 2.06***
	3.2	33.20 ± 3.02***
	32	34.46 ± 3.78***
	324	36.25 ± 3.53**
	3245	38.15 ± 7.51

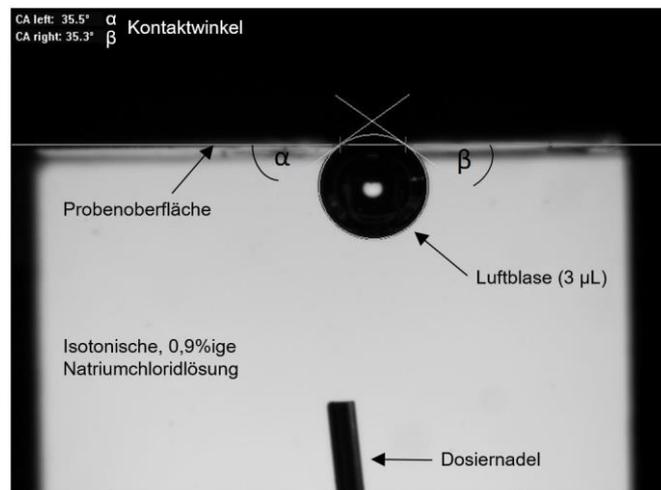


Abbildung 38: Kontaktwinkelmessungen („captive bubble“-Methode) zur Analyse der Benetzbarkeit von Alginatgelen (ALG) und deren Derivaten nach der Funktionalisierung mit Matrigel (AMG) oder verschiedenen Konzentrationen an PAMAM vor (nativ) und nach Inkubation mit fetalem Kälberserum (mit FKS) im Vergleich zur Standardzellkulturplastik (PC). Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit $p < 0,01$ () und $p < 0,001$ (***) als signifikant erachtet; $n \geq 12$. Abbildung abgeändert aus (16).**

Oberflächenrauigkeit

Die verschiedenen (Gel-)Oberflächen wurden mit Hilfe der BSE-Bilder, die im Rahmen der Rasterelektronenmikroskopie aufgenommen wurden, hinsichtlich der Rauigkeit analysiert. Die bildbasierte Quantifizierung der Oberflächeneigenschaften diente zur Klassifizierung der Rauigkeit über die Berechnung des Haralick-Texturmerkmals „Entropie“, der Zufälligkeit der Pixelverteilung. Hohe Entropiewerte korrelierten mit rauen, heterogenen Oberflächen, während niedrige Entropiewerte glatten, homogenen Oberflächen entsprachen (Abbildung 39). Die Oberflächen der Standardzellkulturplastik (PC) besaßen glatte Oberflächen, die durch die Beschichtung mit Alginatgelen an Rauigkeit zunahm. Zu erkennen waren die im Durchschnitt 70 nm großen Poren der Gele. Die Funktionalisierung der Alginatgelstrukturen mit geringen Konzentrationen an PAMAM (1,6 und 3,2 nmol/cm²) ergab raue Oberflächen. Mit zunehmender PAMAM-Kopplung sank jedoch die Oberflächenrauigkeit hin zu glatten Oberflächen bei 3245 nmol PAMAM/cm², die den Eigenschaften der Standardkulturplastik und Matrigel-beschichteten Alginatgelen ähnelten.

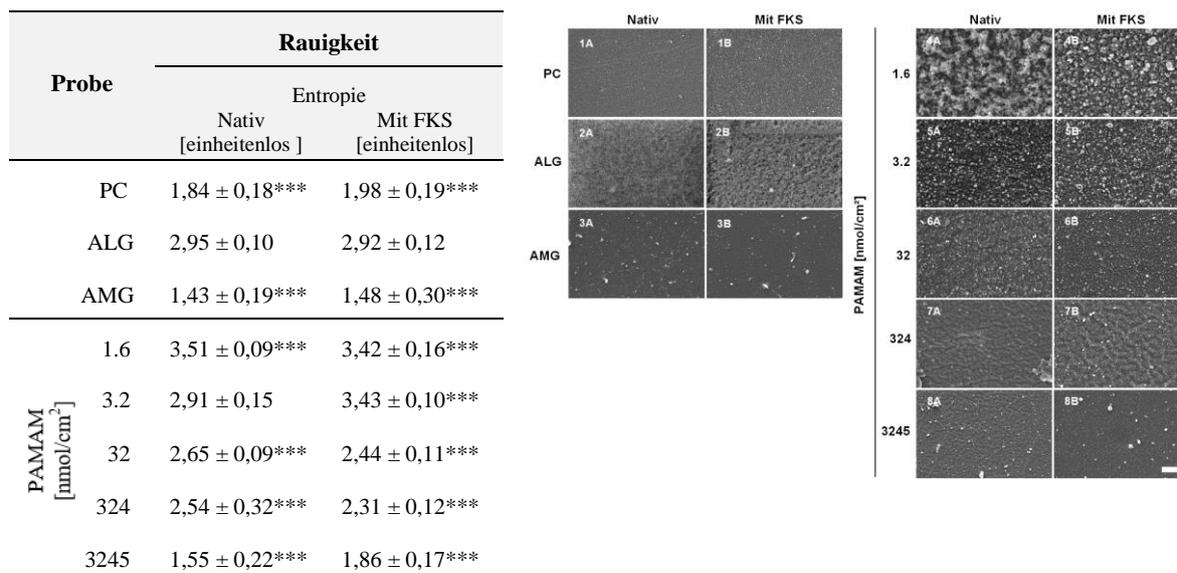


Abbildung 39: Untersuchungen zur Oberflächenrauigkeit von Alginatgelen (ALG) und deren Derivaten nach der Funktionalisierung mit Matrigel (AMG) oder verschiedenen Konzentrationen an PAMAM vor (nativ) und nach Inkubation mit fetalem Kälberserum (mit FKS) im Vergleich zur Standardzellkulturplastik (PC) mit Hilfe repräsentativer BSE-Bilder. Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit $p < 0,001$ (***) als signifikant erachtet; $n = 3$, $N = 6$. Der Maßstabsbalken entspricht $2 \mu\text{m}$. Abbildung abgeändert aus (16).

Zusammenfassend konnten in diesem Teil der Arbeit positiv geladene Poly(amidoamine) kontrolliert und reproduzierbar an Alginatgele gekoppelt werden. Für die Untersuchungen des Einflusses der Ladung von Polymeroberflächen auf das Verhalten humaner Zellen standen infolgedessen verschieden geladene Geloberflächen mit Zetapotentialen von -25 mV bis 15 mV zur Verfügung.

4.4.2 Untersuchungen zur Proteinadsorption an PAMAM-funktionalisierten Alginaten

Im Folgenden wurden die hergestellten Gele unterschiedlicher Ladungszustände hinsichtlich ihrer Interaktion mit Zell-Matrix-mediierenden Proteinen untersucht.

Untersuchungen zur Quantität und Faltungsprozessen adsorbierter Proteine

Nach Inkubation der verschieden PAMAM-modifizierten Alginatgele im FKS-angereicherten Medium konnten unter Verwendung von Ellmans Reagenz die Sulfhydryl-Gruppen adsorbierter Proteine im Vergleich zur Standardkulturplastik und nicht-modifizierten Alginatgelen quantifiziert werden (Abbildung 40 A).

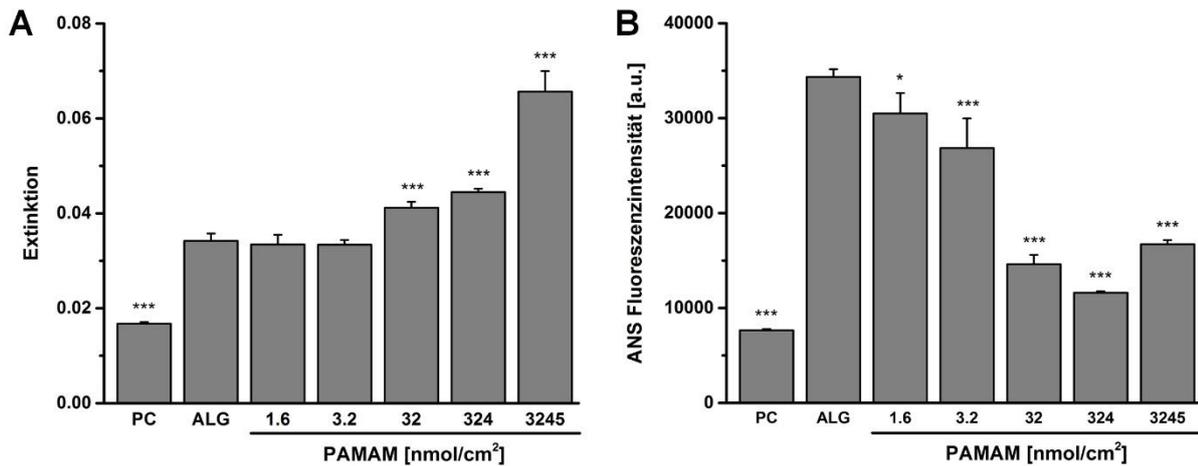


Abbildung 40: Studien zur Adsorption von Proteinen auf Polymeroberflächen unterschiedlicher Ladung hinsichtlich des Gehalts an Sulfhydryl-Gruppen (A) und der Konformation (B) der Oberflächen-adsorbierten Proteine. Hohe ANS-Fluoreszenzen zeigten dabei einen durch Faltungsprozessen-verknüpften Verlust der bioaktiven Funktionalität an. Unterschiede zwischen Gruppen im Vergleich zu ALG wurden mit $p < 0,05$ (*) und $p < 0,001$ (*) als signifikant erachtet; $n = 5$. Abbildung abgeändert aus (16).**

Proteine adsorbierten auf allen untersuchten Polymeroberflächen. Auf der Standardkulturplastik konnten vergleichsweise wenig adsorbierte Proteine nachgewiesen werden. Hingegen ergab das Auftragen von nativen Alginatgelen erhöhte Proteinadsorptionen, die sich durch Kopplung geringer Mengen an PAMAM (1,6 und 3,2 nmol/cm²) nicht veränderten. Die zunehmende PAMAM-Funktionalisierung (32, 324 und 3245 nmol/cm²) der Alginatgele resultierte in gesteigerten Mengen an Oberflächen-adsorbierten Proteinen.

Die Konformation adsorbierter Proteine wurde mit Hilfe der Fluoreszenz von 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS) untersucht, die durch die Bindung an hydrophobe Regionen der Proteine zunimmt und Faltungsprozesse (Denaturierungen) anzeigt (Abbildung 40 B). Vergleichsweise wenig hydrophobe/gefaltete Abschnitte waren im Falle der Proteine zu verzeichnen, die auf der Standardzellkulturplastik adsorbierten. Im Gegensatz dazu führte die Adsorption von Proteinen an nativen Alginatgelen zu hohen Konformationsänderungen. Durch die zunehmende Funktionalisierung der Alginatgele mit PAMAM konnte eine Reduktion der Faltungsprozesse erreicht werden. Jedoch stieg bei hohen PAMAM-Konzentrationen (3245 nmol/cm²) die Zahl hydrophober Proteinabschnitte erneut.

Untersuchungen zum Einfluss der Proteinadsorption auf die Materialeigenschaften

Nachdem Proteine in unterschiedlicher Quantität und Konformation an den Polymeroberflächen adsorbierten, wurden die Materialien erneut hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften untersucht. Die Zetapotentiale der verschiedenen Alginatgele, die vor der Proteinadsorption noch von -25 mV bis 15 mV variierten, befanden sich nach der Adsorption der Proteine in einem Bereich von $-8,01 \pm 2,38$ mV (Abbildung 37, mit FKS), der dem von FKS ($-7,09 \pm 0,61$ mV) entsprach. Ebenso glichen sich die Kontaktwinkel der Polymeroberfläche nach Proteinadsorption einem Wert von $35,60 \pm 2,85$ ° an, sodass die Protein-beschichtete Oberflächen vergleichbare Benetzbarkeiten mit Aminogruppen-haltigen PAMAM-Oberflächen besaßen (Abbildung 38, mit FKS). Hingegen hatten die adsorbierten Proteine keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenrauigkeit.

Zusammenfassend gelang es in diesem Teil der Arbeit Proteine auf nativen und PAMAM-modifizierten Alginatgelen nachzuweisen und anschließend den Gehalt und die Konformation der Oberflächen-adsorbierten Proteine im Vergleich zur Standardzellkulturplastik zu untersuchen. Zudem konnte der Einfluss der Proteinadsorption auf die Oberflächeneigenschaften Ladung, Benetzbarkeit und Rauigkeit bestimmt werden. Als Folge der Proteinadsorption standen für die weiterführenden Untersuchungen zu Zell-Matrix Kontakten fortan keine Polymeroberflächen unterschiedlicher Ladung sondern Oberflächen mit unterschiedlichen, ladungsbedingten Proteinsituationen vor.

4.4.3 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Ladung von Polymeroberflächen auf Zell-Matrix Kontakte

In diesem Teil der Arbeit soll mit Hilfe von optischen, immunochemischen und mikrobiologischen Methoden Zell-Matrix Kontakte von MSCs auf Materialoberflächen unterschiedlicher Ladungs- bzw. Proteinzustände vergleichend untersucht werden.

Untersuchungen zum Adhäsionsverhalten mesenchymaler Stammzellen auf Polymeroberflächen unterschiedlicher Ladung

In Zellkulturversuchen wurden die Zell-Kontakte humaner MSCs an den verschiedenen Alginatoberflächen im Vergleich zur Standardzellkulturplastik untersucht. Keine Zelladhäsion erfolgte auf nativen, nicht-modifizierten Alginatgelen (Abbildung 41 1A). Die Funktionalisierung der Alginatgele mit der Carbodiimide-Chemie führte zu einem Anheften weniger MSCs, die eine Oberfläche mit Mikrovilli, Falten und Vesikeln besaßen (Abbildung 41 2A/B).

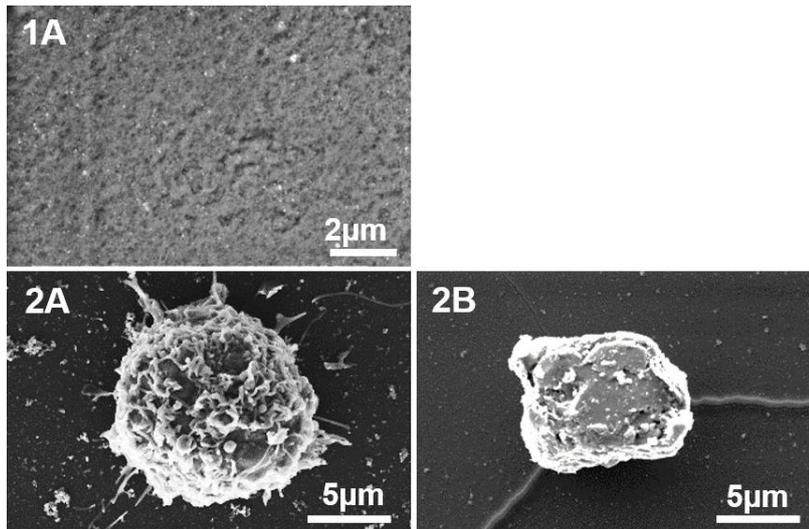


Abbildung 41: Repräsentative Rasterelektronenmikroskopie-Bilder von MSCs nach eintägiger Kultivierung auf nativen Alginatgelen (1A) und EDC/NHS-modifizierten Alginatengelen (2A/B). Abbildung abgeändert aus (16).

Die Kultivierung von MSCs auf den verschiedenen PAMAM-funktionalisierten Alginatgelen ergab unterschiedliche Adhäsionsprofile, die zunächst hinsichtlich der Ausbreitung, Morphologie, Oberflächenmerkmalen und Zellspuren der MSCs im Vergleich zur Standardkulturplastik (PC) und Matrigel-modifizierten Alginatgelen (AMG) untersucht wurden (Abbildung 42). MSCs, die auf PC und AMG adhärten, lagen ausgebreitet und mit einer glatten Zelloberfläche mit einzelnen, kurzen Mikrovilli vor (Abbildung 42 1A-C/2A-C). Weiterhin konnten lange, dünne Zellspuren mit einem Durchmesser von 50-150 nm und zahlreichen Verzweigungen beobachtet werden (Abbildung 42 1D/2D). Im Falle der PAMAM-modifizierten Alginatgelen zeigte sich diverses Zellverhalten in Abhängigkeit zur PAMAM-Konzentration. Auf Gelstrukturen mit $1.6 \text{ nmol PAMAM/cm}^2$ adhärten nur wenige MSCs, die mit vielen Mikrovilli, Bläschen und Falten bedeckt waren, über sehr dichte Zell-Matrix Kontakte und ohne Zellspuren (Abbildung 42 3A-3D). Eine Erhöhung der PAMAM-Quantität auf bis zu 32 nmol/cm^2 resultierte in vermehrt sternförmig ausgebreiteten Zellen mit zunehmend längeren und verzweigten Zellspuren (Abbildung 42 4A-4D/5A-5D). Vergleichbare Zellspuren konnten auf Alginatgelstrukturen mit $324 \text{ nmol PAMAM/cm}^2$ beobachtet werden (Abbildung 42 6D), jedoch zeigten die adhärten MSCs zunehmend spindelförmige Adhäsionsmustern und geglättete Oberflächenreliefs (Abbildung 42 6A-C). Eine weitere Zunahme des PAMAM-Gehalts auf 3245 nmol/cm^2 führte vermehrt zur Adhäsion abgerundeter MSCs, die eine glatte und löchrige Zellmembran mit verkürzten Mikrovilli und Vesikeln (Abbildung 42 7A-7C) und weniger Zellspuren aufwiesen (Abbildung 42 7D).

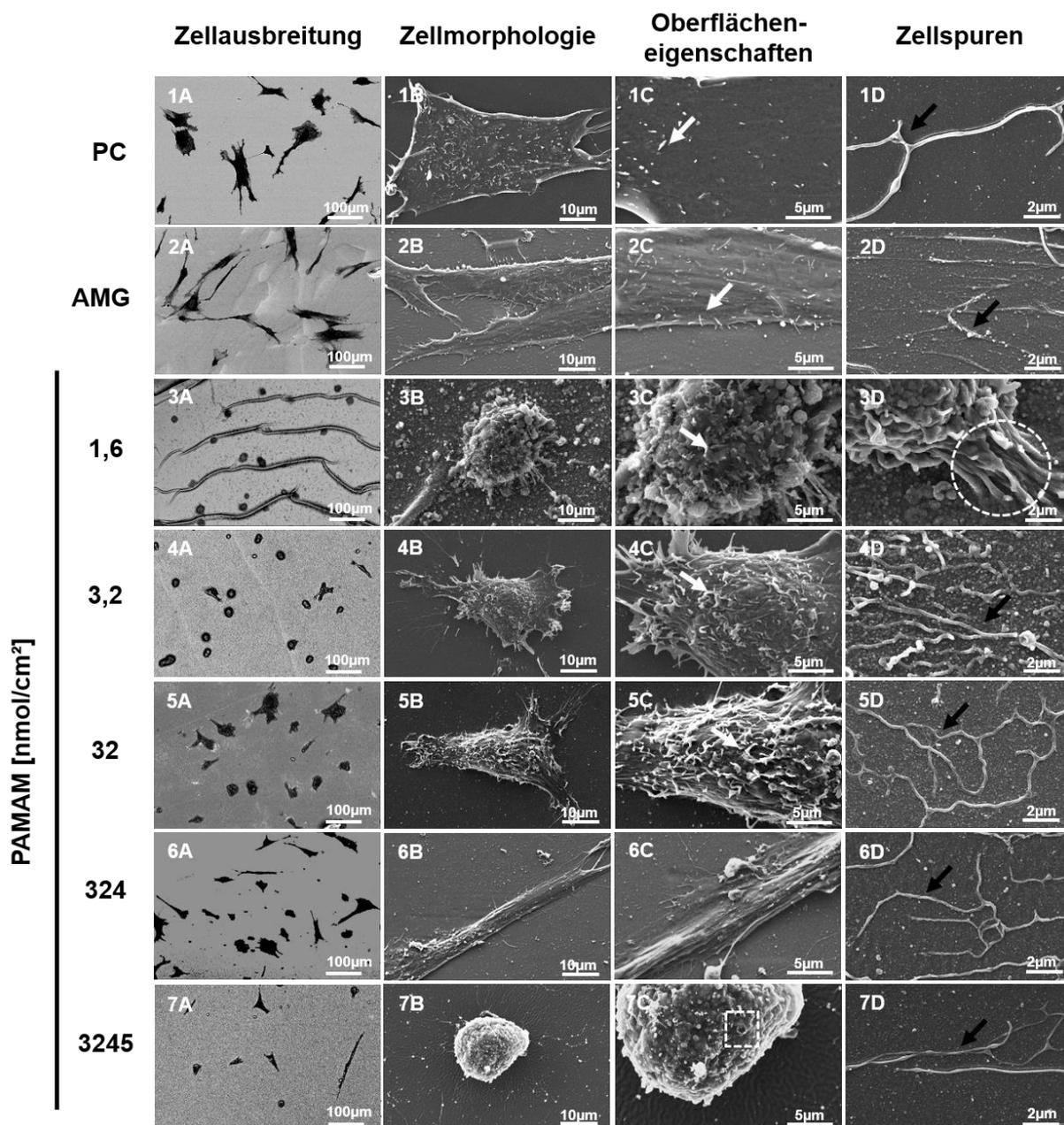


Abbildung 42: Repräsentative Rasterelektronenmikroskopie-Bilder zum Adhäsionsverhalten von MSCs nach eintägiger Kultivierung auf verschiedenen PAMAM-modifizierten Alginatgelen im Vergleich zur Standardkulturplastik (PC) und Matrigel-funktionalisierten Alginatgelen (AMG). Repräsentative Markierungen von Mikrovilli (weißer Pfeil), Zell-Matrix Kontakten (gestrichelter Kreis), Zellspuren (schwarzer Pfeil) und Membranlöchern (gestricheltes Viereck). Abbildung abgeändert aus (16).

Die Analyse der Zellfläche, mit der sich die MSCs auf den verschiedenen PAMAM-funktionalisierten Alginatgelen ausbreiteten, bestätigte die bisherigen Beobachtungen und ergab einen glockenförmigen Trend (Abbildung 43). Die ausgebreiteten Zellflächen der MSCs nahmen auf Strukturen mit steigendem PAMAM-Gehalt bis zu einem Bereich der höchsten Zellflächen zwischen 32-324 nmol PAMAM/cm² zu, die sich den Zellflächen von MSCs auf PC und AMG annäherten.

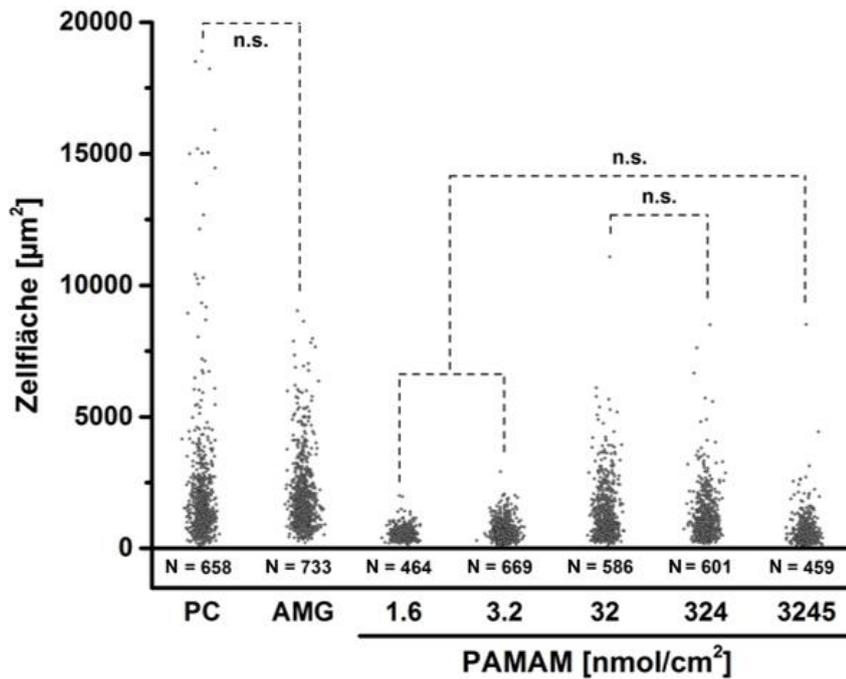


Abbildung 43: Untersuchungen zur Zellfläche, mit der sich die MSCs auf den Alginatgelen unterschiedlicher PAMAM-Konzentration im Vergleich zur Standardkulturplastik (PC) und Matrigel-funktionalisierten Alginatgelen (AMG) ausbreiteten. Unterschiede zwischen Gruppen wurden mit $p > 0,05$ als nicht signifikant (n.s.) erachtet. Abbildung abgeändert aus (16).

Die Betrachtung des Zytoskeletts adhärerter MSCs mit Hilfe von Immunfärbungen gegen F-Aktin unterstützte den beschriebenen glockenförmigen Trend (Abbildung 44). In abgerundeten Zellen lagen die F-Aktine als kurze Filamente vor. Hingegen zeigten sich mit größeren Zellflächen lange, parallele Aktinfilamente. Neben dem Zytoskelett korrelierte auch das Volumen der Zellnuklei mit den Zellflächen ausgebreiteter MSCs. So waren die Zellkerne innerhalb der abgerundeten Zellen (1,6 und 3245 nmol PAMAM/cm²) kleiner als die Nuklei weit ausgebreiteter MSCs (32 nmol PAMAM/cm², PC, AMG). Die Expression des fokalen Adhäsionsproteins Vinculin hingegen schien unabhängig von der PAMAM-Beladung der Alginatgele zu sein.

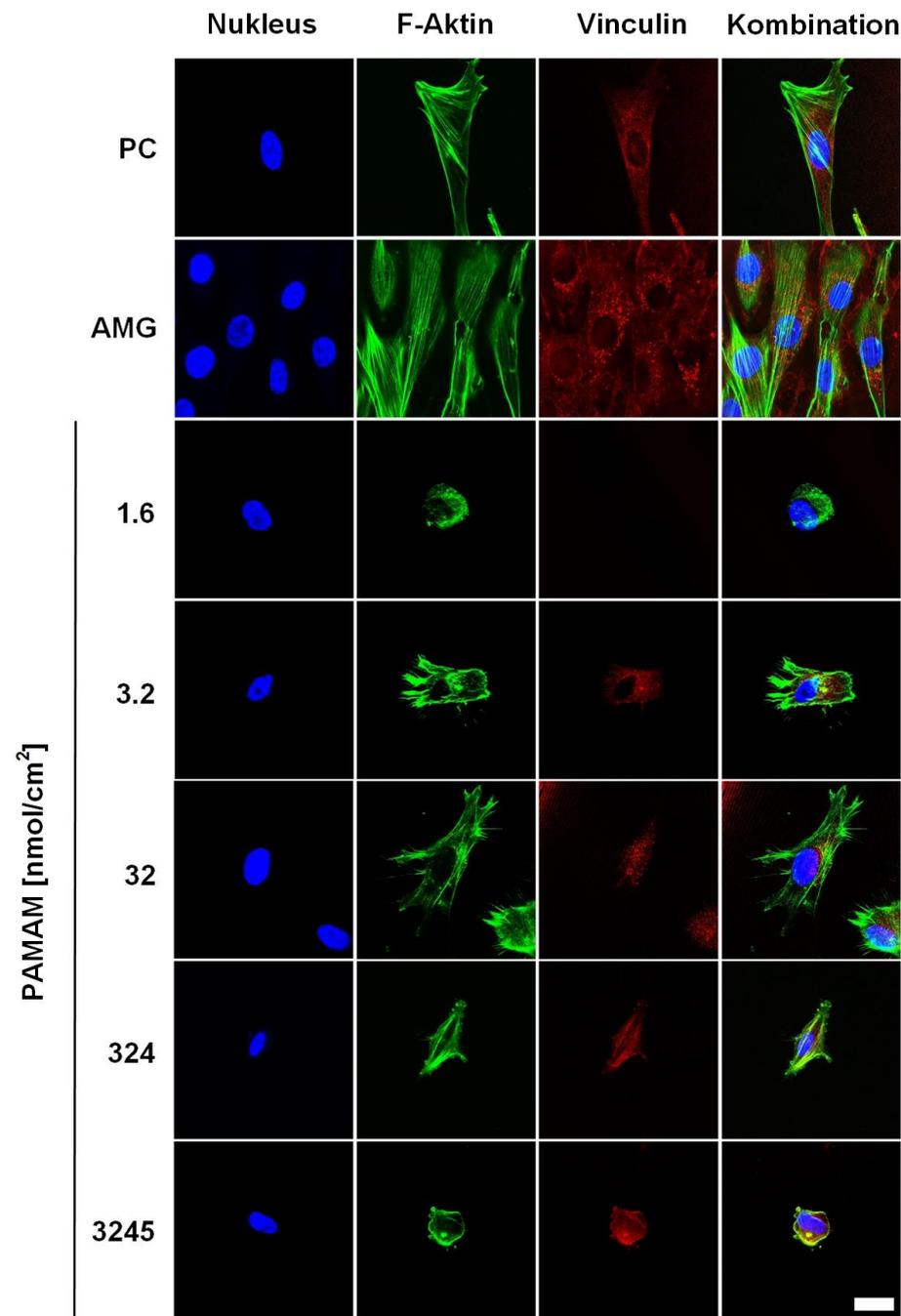


Abbildung 44: Repräsentative Immunfluoreszenz-Bilder von MSCs auf den unterschiedlichen PAMAM-Alginatgelen im Vergleich zur Standardkulturplastik (PC) und Matrigel-funktionalisierten Alginatgelen (AMG) hinsichtlich dem Zellkern, Zytoskelett (F-Aktin) und fokaler Adhäsion (Vinculin). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . Abbildung abgeändert aus (16).

Zur Beurteilung des Adhäsionsverhaltens von MSCs auf den verschiedenen Polymeroberflächen wurden zudem noch Zytotoxizitätstests von freiem und Oberflächenfixiertem PAMAM durchgeführt (Abbildung 45).

Ergebnisse

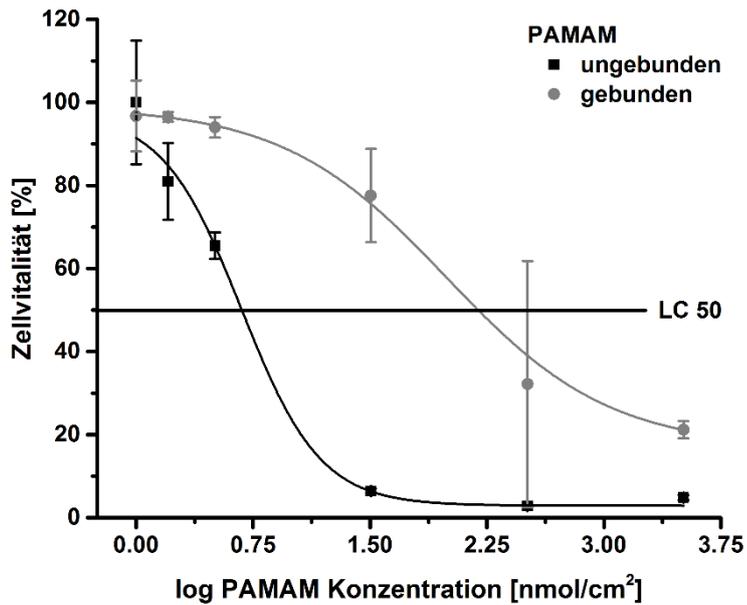


Abbildung 45: Analyse der Zytotoxizität unterschiedlicher Mengen an PAMAM in ungebundener Form und nach Kopplung an Alginatgele hinsichtlich adhärenter MSCs. LC 50: Letale Konzentration, die für 50% der Zellen tödlich war; n = 3, N ≥ 3. Abbildung abgeändert aus (16).

Die Exposition der MSCs mit PAMAM legte einen zunehmenden Verlust der Zellvitalität mit steigender PAMAM-Konzentration offen. Die Hinzugabe von freien PAMAM-Molekülen führte bereits bei geringen Mengen zum Zelltod (LC50: 4,77 nmol/cm²). Hingegen wurde die zytotoxische Wirkung durch die Kopplung von PAMAM an Alginatgele substantiell reduziert (LC50: 156 nmol/cm²). Nichtsdestotrotz besaßen Alginatgele mit hohen PAMAM-Gehalten einen erheblich zytotoxischen Effekt auf MSCs.

Untersuchungen zum Einfluss der Ladung von Polymeroberflächen auf die Genexpression mesenchymaler Stammzellen

Mit Hilfe von qPCR-gestützten Genexpressionsstudien soll im weiteren Verlauf zum einem das beschriebene Adhäsionsverhalten als auch der Zellstatus hinsichtlich des Phänotyps sowie Differenzierungsprozessen von MSCs untersucht werden, die auf den verschiedenen Polymeroberflächen im Vergleich zur Polystyren-basierten Zellkulturflaschen kultiviert wurden (Abbildung 46).

Der Phänotyp der MSCs wurde dabei gemäß der Empfehlung der *International Society for Cellular Therapy* von 2006 (92) über die Expression der Gene ENG, THY1 und NT5E analysiert. Eine vergleichbare Expression von ENG wurde ohne signifikante Unterschiede für alle Konditionen verzeichnet. Hingegen wiesen MSCs auf PAMAM-funktionalisierten Alginatgelen verringerte Expressionen der Gene THY1 und NT5E auf. Insbesondere die Reduktion von NT5E wurde mit zunehmenden PAMAM-Gehalt verstärkt und verwies auf eine potentielle Änderung des Zellstatus.

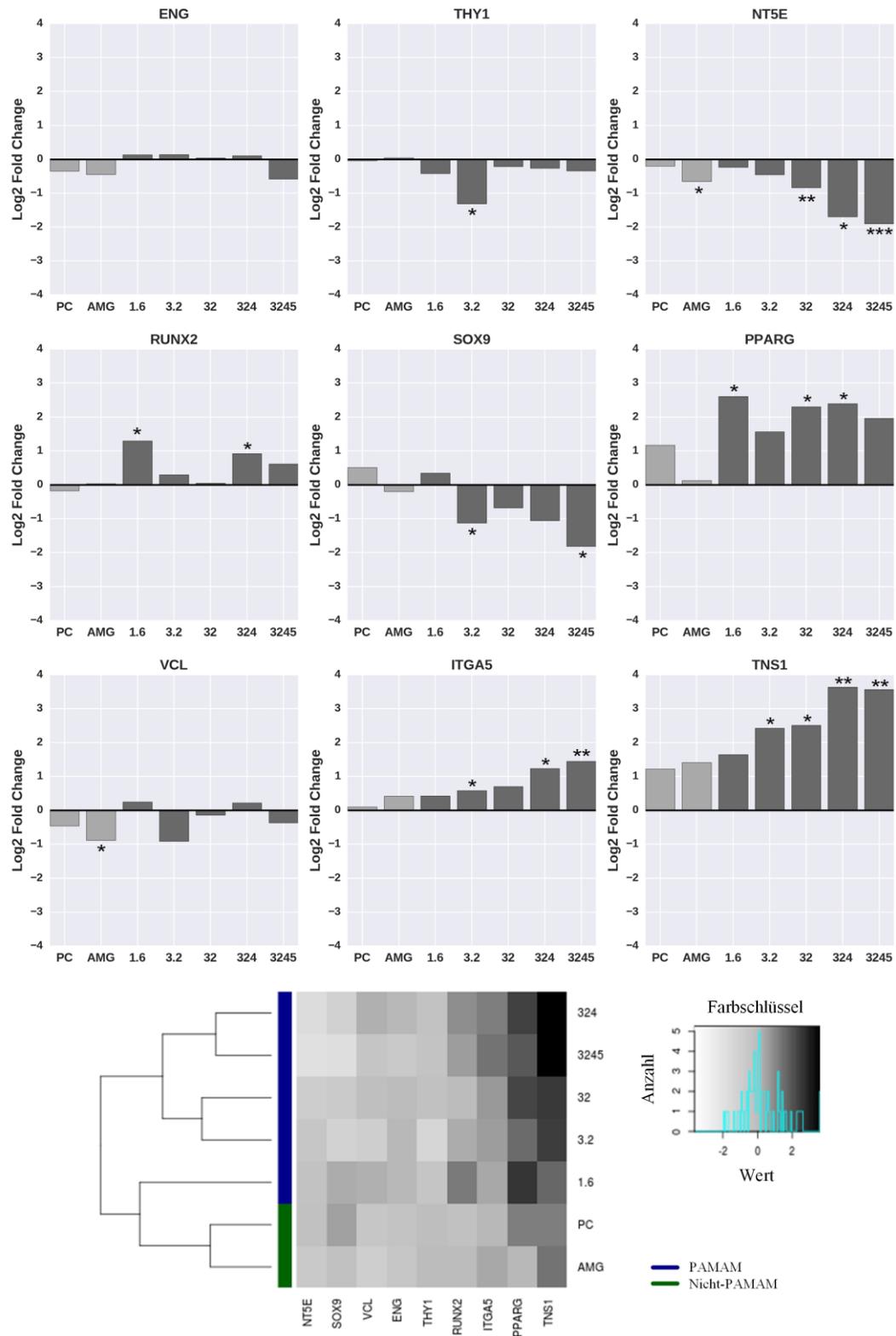


Abbildung 46: qPCR-gestützte Untersuchungen zur Genexpression von MSCs nach 24-stündiger Kultivierung auf verschiedenen PAMAM-modifizierten Alginatgelen im Vergleich zur Standardkulturplastik (PC) und Matrigel-funktionalisierten Alginatgelen (AMG) hinsichtlich des Phänotyps (ENG, THY1, NT5E), frühen Differenzierungsmarkern (RUNX2, SOX9, PPARG) und der Adhäsion (VCL, ITGA5, TNS1). Differenzen zwischen Gruppen zur Kontrolle wurden mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,01$ (***) als signifikant erachtet; $n = 4$. Abbildung abgeändert aus (16).

Ergebnisse

Dem folgend wurden die MSCs bezüglich der Expression von frühen Differenzierungsmarkern untersucht. Das Gen RUNX2, das in frühen Stadien der osteogenen Induktion exprimiert wird, war auf PAMAM-funktionalisierten Alginatgelen hochreguliert. Ebenso führte die Kultivierung der MSCs auf den PAMAM-Alginaten zu einer erhöhten Expression des Adipogenese-zugehörigen Gens PPARG. Im Gegensatz dazu wurde die mit der Expression von SOX9 analysierte, frühe chondrogene Differenzierung mit zunehmenden PAMAM-Gehalt unterdrückt. Darüber hinaus ergab die Untersuchungen zur Expression des Adhäsionsbezogenen Vinculins keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSCs, die auf den verschiedenen PAMAM-Alginaten kultiviert worden waren, und bestätigten damit die Ergebnisse der Immunfärbungen. Hingegen nahm die Expression von Integrin $\alpha 5$ und Tensin 1 mit steigendem PAMAM-Gehalt zu.

Zur Visualisierung der Genexpressionsdaten und Interpretation, inwiefern die experimentellen Konditionen die Genexpressionen beeinflussten, wurden die qPCR-Resultate in einer entsprechenden Heatmap geclustert (Abbildung 46). Das Clustern der Daten ergab eine Einteilung in zwei Gruppen: PAMAM- und nicht-PAMAM-Konditionen. Alginatgele mit geringem PAMAM-Gehalt ($1,6 \text{ nmol/cm}^2$) gruppieren sich dabei zu den nicht-PAMAM-Bedingungen ein. Jedoch zeigten PC und AMG als Kontrollen in einer eigenen Untergruppe ein Expressionsverhalten, das einander ähnlicher war als zu $1,6 \text{ nmol/cm}^2$ PAMAM-Alginatengelen. Als Untergruppen der PAMAM-Sektion clusterten zum einen $3,2 \text{ nmol/cm}^2$ und 32 nmol/cm^2 und zum anderen 324 nmol/cm^2 und 3245 nmol/cm^2 miteinander.

Zusammenfassend gelang in diesem Teil der Arbeit zunächst Alginatgele verschiedener Ladungen herzustellen sowie umfassend zu charakterisieren und infolgedessen den Einfluss der Oberflächenladung von Polymeren auf die Interaktionen mit Proteinen und humanen Zellen am Beispiel der mesenchymalen Stammzellen zu bestimmen.

4.5 Entwicklung einer Zell-responsiven Matrix als Biosensor und Freisetzungssystem

Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines zur Anmeldung vorgelegten Patents (117).

In dem gegenseitigen Wechselspiel von Zell-Matrix Kontakten sind es nicht allein die Materialien, die Reize aussenden und infolgedessen die Biogrenzfläche beeinflussen können. So können Zellen biologische Stimuli wie zum Beispiel Hormone, Enzyme oder andere metabolische Produkte freisetzen und auf die Matrix einwirken. In diesem Teil der Arbeit soll daher untersucht werden, inwieweit Zellsekrete am Beispiel von Enzymen Einfluss auf Zell-Matrix Kontakte haben.

Untersuchungen zur Enzym-Sekretion von Tumorgewebe

Als biologischer Reiz wurden Enzyme in den Fokus der Untersuchungen gesetzt, die von Tumorgewebe sekretiert werden. Im Speziellen wurde die Sekretion von Lysyloxidasen (LOX) durch Darmtumorzellen untersucht. Dazu wurden HT29-MTX-E12-Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten mit U-förmigem Boden für 14 d zu Sphäroiden (mit und ohne Mukus) kultiviert und für 24 h verschiedene Umgebungsflüssigkeiten (DMEM, PBS, NACL) ausgesetzt. Anschließend wurde mit Hilfe des fluorimetrischen LOX-Aktivitätsassay die Menge an sekretierter, aktiver LOX bestimmt (Abbildung 47).

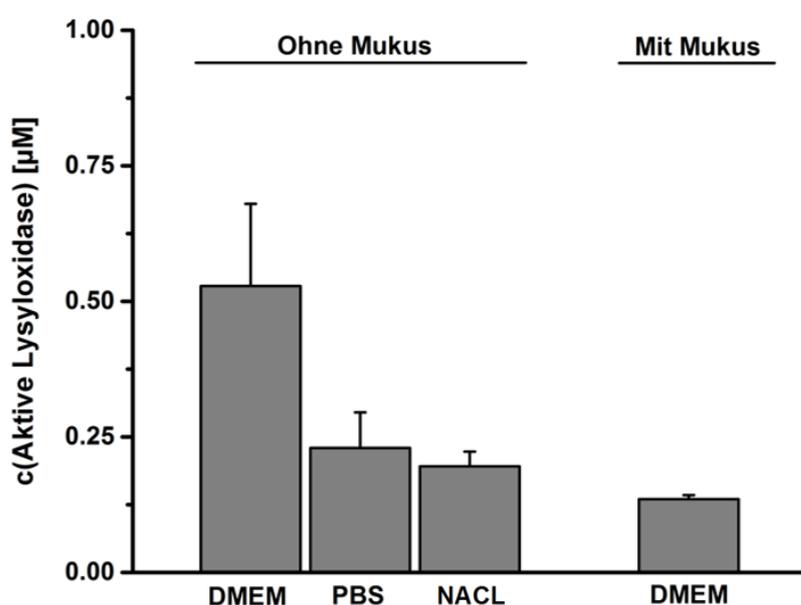


Abbildung 47: Quantitativer Nachweis der Sekretion aktiver Lysyloxidase aus Tumorsphäroiden mit oder ohne Mukusschicht, die für 24 h im Zellkultur-Medium (DMEM), in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder isotonischer Natriumchlorid-Lösung (NACL) kultiviert wurden; n = 3, N = 8; (117).

Die Analyse der Mikroumgebung von Darmtumorgewebe ergab, dass in den verschiedenen Kultivierungsmedien aktive Lysyloxidase nachweisbar war. Im Vergleich zu Tumorsphäroiden ohne äußerer Mukusschicht war die LOX-Sekretion bei Mukusbeschichteten Tumorgewebe reduziert. Im Zellkulturmedium (DMEM) wurde binnen 24-stündiger Kultivierung bei 37 °C $1,69 \pm 0,48 \mu\text{M}$ LOX freigesetzt. Besteht die Mikroumgebung der Darmtumorsphäroide ausschließlich aus Salzlösungen, so war vergleichsweise weniger aktive LOX nachweisbar (PBS: $0,73 \pm 0,21 \mu\text{M}$ und NaCl: $0,63 \pm 0,09 \mu\text{M}$). Mit LOX stand somit ein potentieller, biologischer Stimulus für einen Zell-responsiven Reaktionsmechanismus zur Verfügung.

Herstellung einer Kupfer-stabilisierten Alginatmatrix mit inkorporiertem Therapeutikum und Reportersubstanz

Zur Untersuchung einer Zell-responsiven Matrix, die sensitiv auf einen zellulären Reiz mit einer Struktur- und folglich einer Eigenschaftsänderung reagiert, wurde die Kupfer-abhängige Reaktivität von LOX genutzt und der Ansatz verfolgt, Kupfer-Ionen als stabilisierende Einheit in Alginatstrukturen einzubauen. Hierfür konnten Alginatsole durch das Kontaktieren mit Cu^{2+} -haltigen, isoosmolaren Lösungen zur Gelierung gebracht werden. Vernetzungsbäder, die aus gut wasserlöslichem Kupfersulfat (20 mM) bestanden, führten zu einer unverzüglich einsetzenden Gelierung, die vergleichbar mit der mit BaCl_2 oder CaCl_2 ablief.

Reportersubstanzen konnten durch Lösen bzw. Suspendieren in Alginatlösungen und anschließender Gelierung im Cu^{2+} -Vernetzungsbad in den Gelstrukturen inkorporiert werden (Abbildung 48). Damit die verkapselten Substanzen nicht durch Diffusion die porösen Gelstrukturen verlassen, müssen diese entweder selbst hohe Molekulargewichte besitzen oder ggf. in größere Partikelsysteme verpackt werden, die die Poren nicht passieren können. Im Falle der Reportersubstanz konnten hochmolekulare FITC-Dextrane (150 kDa und 500 kDa) inkorporiert und via Fluoreszenzmikroskopie ($\lambda_A = 492 \text{ nm}$, $\lambda_E = 518 \text{ nm}$) nachgewiesen werden (Abbildung 48 B). Hingegen besitzen Therapeutika wie z.B. Irinotecan ($M_w = 613,14 \text{ g/mol}$) in der Regel kleine Molekulargewichte und erfordern eine zusätzliche Verkapselungsstrategie. Als Transportvehikel potentieller, niedermolekularer Therapeutika wurden Poly(lactid-co-glycolid)-Systeme (PLGA) verwendet und darin Lumogen Rot als fluoreszierender Farbstoff inkorporiert. Die erfolgreiche Immobilisierung von Lumogen Rot-beladenen PLGA-Partikel in der Kupfer-Alginatgelstruktur wurde durch die emittierte Fluoreszenz von Lumogen Rot bei $\lambda_E = 613 \text{ nm}$ nachgewiesen (Abbildung 48 C).

Um die Verweildauern der Kupfer-Alginatsysteme im potentiellen Wirkungsbereich des menschlichen Darms zu erhöhen, wurde in einem nächsten Schritt angestrebt die Kupfer-Alginatgele derart zu modifizieren, dass sie mit der Darmschleimhaut interagieren. Mit Hilfe der Carbodiimide-Chemie wurden dementsprechend die Kupfer-Alginatgele mit Chitosan als mukoadhäsive Komponente funktionalisiert. Der Nachweis der Kopplung mit Chitosan erfolgte durch die Bestimmung der Zetapotentiale (Abbildung 48 D). Die negativ geladenen Oberflächen der Kupfer-Alginatgele ($-19,3 \pm 1,4$ mV) konnten schrittweise durch die Modifikation mit der Carbodiimide-Chemie ($-7,26 \pm 2,16$ mV) und anschließender Chitosan-Funktionalisierung zu positiv geladenen Geloberflächen ($22,9 \pm 7,3$ mV) modifiziert werden, die vergleichbare Zetapotentiale zu ungekoppeltem Chitosan ($22,8 \pm 0,4$ mV) aufweisen.

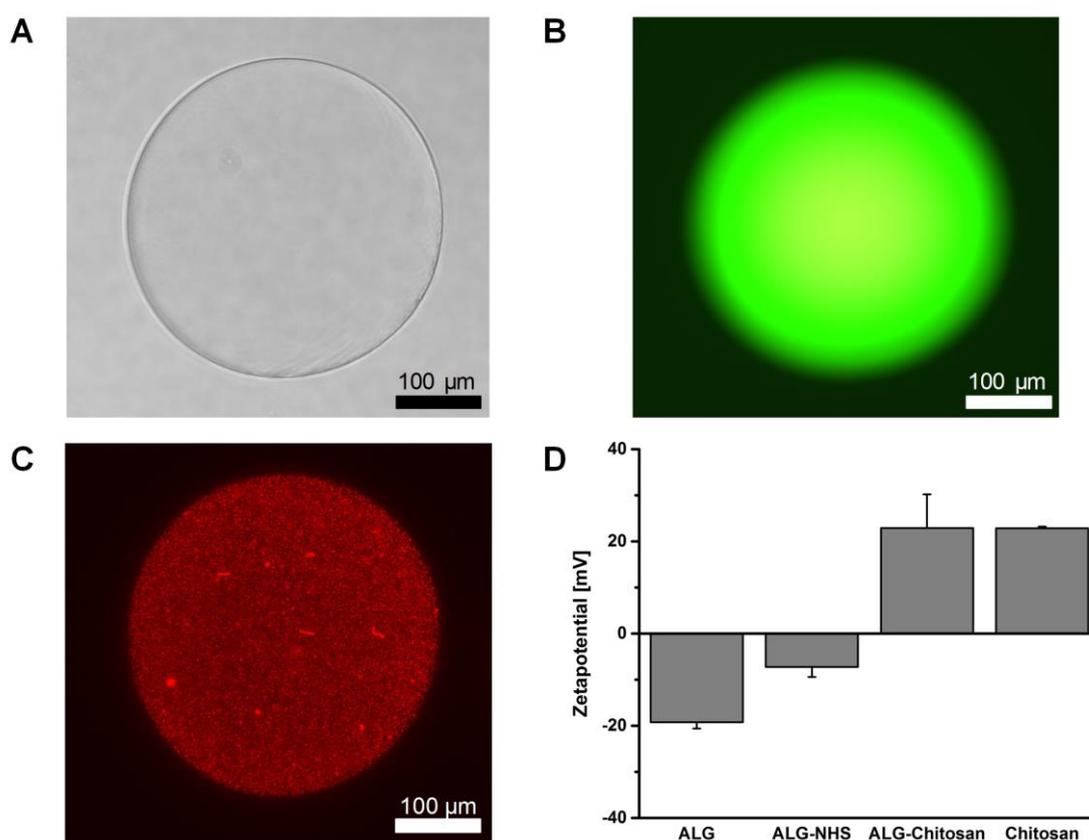


Abbildung 48: Repräsentative Mikroskopieaufnahmen von sphärischen Kupfer-Alginatgelen (A, Durchlicht), in denen hochmolekulare FITC-Dextrane (150 kDa) als fluoreszierende Reportersubstanz (B) und/oder niedermolekulare Substanzen wie Lumogen Rot in PLGA-Partikel verpackt (C) immobilisiert vorliegen. Die Oberflächen von Kupfer-Alginat-basierten Systemen ließen sich mit Hilfe der Carbodiimide-Chemie mit Chitosan mukoadhäsiv funktionalisieren (D, n =3, N ≥ 5).

Zusammenfassend gelang es Alginat mit divalenten Kupfer-Ionen zu gelieren und in den Kupfer-Alginatgelen sowohl hochmolekulare Reportersubstanzen am Beispiel von FITC-Dextranen zu immobilisieren als auch niedermolekulare Substanzen in PLGA-Partikel zu

Ergebnisse

verpacken und anschließend in den Kupfer-Alginat-Matrizen zu immobilisieren. Infolgedessen stand für die weiterführenden Untersuchungen eines Zell-responsiven Materialsystems eine Substanz-beladene, Kupfer-stabilisierte Alginatmatrix zur Verfügung.

Untersuchungen zur Enzym-induzierten Matrix-Destabilisierung und Freisetzung einer Reportersubstanz

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit das Enzym LOX als biologischer Stimulus in Bezug auf die Kupfer-stabilisierten Alginatgele wirkt. Hierfür wurden die Stabilitäten der Gele vor und nach der Gabe von LOX im Vergleich zu unbehandelten Gelen bestimmt. Kupfer-Alginatgele, die aus 0,7%igen Alginatsolen (LN/LT 1:1) mit 20 mM Kupfersulfat-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur geliert worden sind, besaßen Elastizitätsmodule von $73,7 \pm 5,9$ kPa, die in NaCl bei 37°C über einen Zeitraum von 60 min stabile, mechanische Eigenschaften aufwiesen. Vor der LOX-Gabe wurde zunächst die Stabilität der Kupfer-Alginatgele über einen Zeitraum von 30 min bei 37°C nachgewiesen, die im Vergleich zur Referenz vergleichbare Elastizitätsmodule besaßen. Als Folge der LOX-Zugabe reduzierte sich die Stabilität der Kupfer-Alginatgele von $67,6 \pm 8,9$ kPa auf $49,2 \pm 7,5$ kPa binnen 15 min. Weitere 15 min Inkubation in LOX-haltiger Umgebung resultierte in einer fortlaufende Reduktion der Elastizitätsmodule auf $19,6 \pm 7,9$ kPa bis die Kupfer-Alginatgele nach weiteren 15 min Inkubationszeit derart destabilisiert waren, dass eine Analyse der Elastizitätsmodule nicht mehr möglich war (Abbildung 49 A).

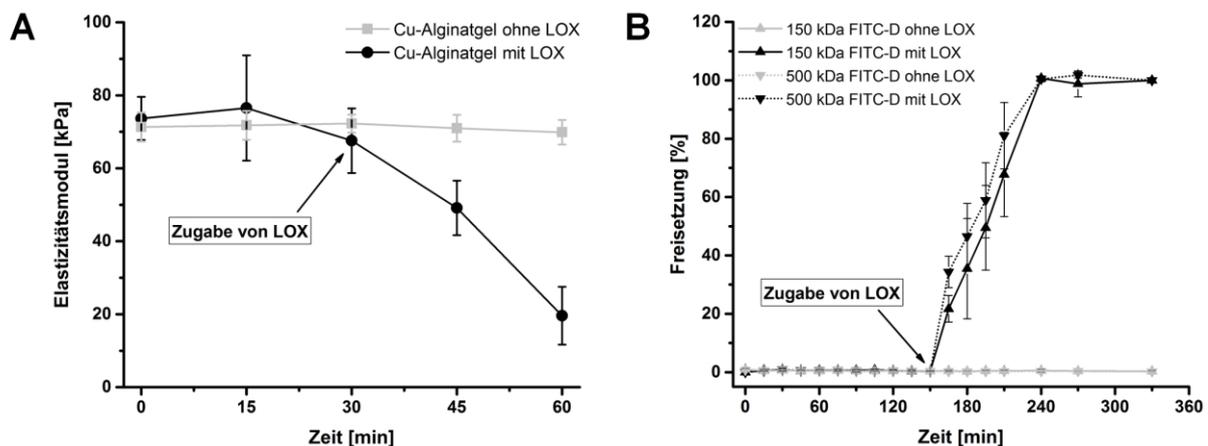


Abbildung 49: Lysyloxidase (LOX)-induzierte Destabilisierung von Cu-Alginatgelen (A, n = 8) und Freisetzung von Reportersubstanzen am Beispiel inkorporierter FITC-Dextrane unterschiedlichen Molekulargewichts (B, n = 3) (117).

Nachdem die LOX-induzierte Destabilisierung von Kupfer-Alginatgelen offengelegt wurde, galt es daraufhin die Freisetzung von verschiedenen FITC-Dextranen (150 kDa und 500 kDa) als Reportersubstanzen aus den Kupfer-stabilisierten Alginatgelen nach LOX-Gabe zu

untersuchen. Als Referenz dienten hierzu sphärische, FITC-Dextran-beladene Alginatgele (1 mg FITC-Dextran/mL Alginatsol), die in NaCl für einen Zeitraum von 330 min bei 37 °C gelagert worden sind und in 15-minütigen Intervallen die NaCl-Lösung mittels UV/VIS-Spektroskopie in einem Wellenlängenbereich von 190-1100 nm nach potentiell freigesetzter Reportersubstanz untersucht wurde. Ohne LOX-Zugabe war weder einer Freisetzung von 150 kDa noch von 500 kDa FITC-Dextranen über einen Zeitraum von 330 min nachweisbar. Hingegen waren nach der Zugabe von LOX zunehmend UV/VIS-Signale bei einer Wellenlänge von 480 nm zu beobachten, die mit den jeweiligen FITC-Dextranen korrespondierten. Die Freisetzungen der 150 kDa und 500 kDa FITC-Dextranen aus den Kupfer-Alginatgelen folgten einem vergleichbaren Trend und waren binnen 90 min beendet (Abbildung 49 B).

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass das von Tumorgewebe-sekretierte Enzym LOX Kupfer-Alginatgele destabilisieren und infolgedessen Freisetzungen von immobilisierten Substanzen verursachen kann.

5 Diskussion

Inwieweit ist der Gelierungsprozess von Alginat auf hochvolumige Systeme übertragbar?

Im Wässrigen erfolgt in Anwesenheit von multivalenten Kationen wie z.B. Ca^{2+} , Ba^{2+} und Fe^{3+} -Ionen eine ionotrope Gelierung, bei der das Kation als Zentralatom von den umliegenden Sauerstoffatomen der homopolymeren GG-Blöcke koordinativ gebunden wird und sich eine ionische Vernetzung („egg-box“-Modell, siehe Abbildung 3B) ausbildet. Generell verläuft die Gelierung von Alginat diffusionsgesteuert in Abhängigkeit von der Löslichkeit des Vernetzer-Salzes. Gut wasserlösliche Salze wie z.B. Barium- und Calciumchlorid gelieren Alginat durch rasche Dissoziation/Verfügbarkeit der Kationen in Form des sogenannten externen Gelierens, die an der Peripherie beginnt und zum Zentrum hin fortschreitet (118, 119). Um eine homogene Bildung transparenter Gele zu garantieren, bedarf es dabei einer Fixierung des Alginats z.B. durch positive Ladungen/pLL an Plastikoberflächen (15). Bei größeren Volumina an Alginat gelangt die diffusionsbasierte, externe Gelierung mit gut löslichen Salzen an seine Grenzen. Es kommt zur Ausbildung weißlich getrübert, heterogener Alginatstrukturen. Diese Problematik konnte mit der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz schwer wasserlöslicher Salze (Calciumsulfat, 2 g/L) überwunden werden. Die wenigen, bereits dissoziiert vorliegenden Calcium-Ionen beginnen das Alginat zunächst extern anzugelieren. Durch die Komplexbildung der Kationen mit dem Alginat werden weitere Kationen sukzessive aus den schwerlöslichen Salzen gelöst, die anschließend neben der externen auch zur internen Gelierung zur Verfügung stehen (Abbildung 50).

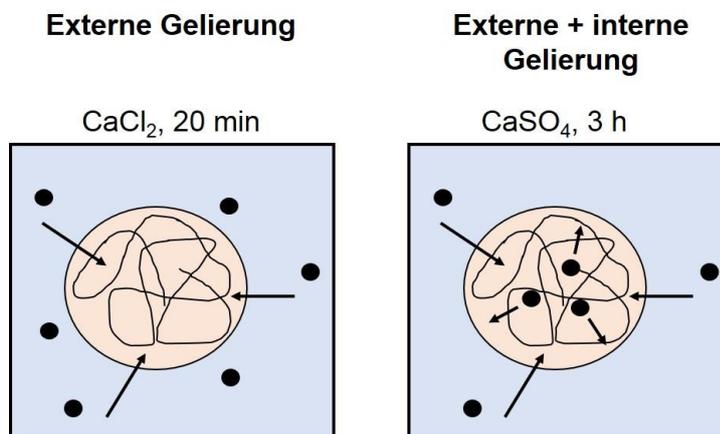


Abbildung 50: Schematische Darstellung verschiedener Gelierungsprozesse von Alginat mit gut wasserlöslichen Calciumchlorid (CaCl_2) und schwer wasserlöslichen Calciumsulfat (CaSO_4). Die sukzessive Bereitstellung von Ca^{2+} -Ionen durch den Einsatz schwerlöslicher Calciumsalze ermöglicht das kontrollierte Gelieren von Alginat zu hochvolumigen, transparenten Gelen.

Der Einsatz von Dialyseschläuchen unterstütze darüber hinaus die Prozesskontrolle. Die Porengröße des Dialyseschlauchs wurde mit 8 kDa derart klein gewählt, dass die hochmolekularen Alginatmoleküle nicht aus dem Schlauch entweichen und das sich sukzessiv lösende Calciumsalz von allen Seiten eindringen konnte. Letztendlich führte die Kombination aus einem Gelierbad mit schwer wasserlöslichem Calciumsulfat und feinporigen Schläuchen dazu, dass transparente Alginatgele mit einem Volumen von 5 mL erfolgreich hergestellt werden konnten. Der entwickelte Gelierungsprozess besitzt zudem durch Variation des Schlauchdurchmessers und der Schlauchlänge das Potential zur Hochskalierung. Dabei ist der Gelierprozess nicht auf zylindrische Formen limitiert, sondern kann prinzipiell verschiedenste Formen annehmen. Anforderung an die Geliermatrix ist lediglich eine gewisse Porösität, die das Eindringen von Ionen ermöglicht und zugleich das Ausdringen der Alginatmoleküle verhindert. Die hohe Transparenz und der mit Wasser vergleichbare Brechungsindex der Gele lässt sich neben dem langsamen, kontrollierten Gelierprozess auch darauf zurückführen, dass große Mengen an Wasser (99-99,5%) durch geringe Polymerkonzentrationen (0,5-1%) an reinen, hochmolekularen Alginaten gebunden werden konnten. Diese optischen Eigenschaften sind für die Abbildung von Zell-Matrix Kontakten durch hohe Mikroskopierbarkeit ideal.

Der Übergang vom Alginatsol zum -gel beinhaltet die Ausbildung eines Polymernetzwerks, dessen Netzwerkdicke sich mit zunehmender Gelierung erhöht. Da der Vernetzungsgrad die mechanischen Eigenschaften der Gele bestimmt, konnte der Gelierungsprozess über die Analyse der dynamischen Module und des Elastizitätsmoduls verfolgt werden. Das Modell der Viskoelastizität stützt sich auf das Verhalten von Materialien, auf Verformungen teilweise elastisch/reversibel (eingeführte Energie steht nach der Verformung zur Verfügung; Speichermodul G') und teilweise viskos/irreversibel (Energie geht verloren, Verlustmodul G'') zu reagieren. Sole zeigen dabei dominant viskoses Verhalten ($G' < G''$) und Gele ein dominant elastisches Verhalten ($G' > G''$). Neben dem Wechsel von dominant viskosem zu dominant elastischem Verhalten, konnte die fortschreitende Vernetzung über zunehmende Speichermodule nachgewiesen werden. Im Falle einer abgeschlossenen Gelierung änderten sich die mechanischen Eigenschaften trotz Anwesenheit überschüssiger Kationen nicht, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass die Alginatgelierung mit schwer löslichem Calciumsulfat nach einer Dauer von 3 h abgeschlossen war. Im Vergleich zur Gelierung kleinerer Volumina mit gut wasserlöslichen Barium- oder Calciumchloriden (20 min) ergaben sich verhältnismäßig lange Gelierzeiten. Nichtsdestotrotz konnte durch den Einsatz von Calciumsulfat eine kontrollierte, sukzessive Vernetzung hochvolumiger, transparenter Alginatgele realisiert werden. Die Analyse der Elastizitätsmodule verschieden lang gelierter

Gele bestätigte die vollständige Gelierung nach 3 h. Mit E-Modulen von 3 kPa für 0,5%ige Calcium-Alginatgele und 6 kPa für 1,0%ige Calcium-Alginatgele sind die Strukturen flexibel und im Einklang mit den bestehenden Literaturwerten (120). Schnelle Gelierungsprozesse mit Bariumchlorid führen zu vergleichsweise steiferen Alginatgelen (40 kPa, (16, 106)). Die Ursache dafür sind die verschiedenen Affinitäten der Kationen zum Alginat. Barium-Ionen besitzen im Vergleich zu Calcium-Ionen einen größeren Ionenradius und können die negativen Ladungen der Sauerstoffatome vom Alginat stärker und somit stabiler an sich binden.

Die Injizierbarkeit ist im Kontext von Zell-Matrix Kontakten mit Blick auf die *in-vivo*-Applikation ein kritischer Parameter. Um dem Trend hin zu minimalinvasiven Behandlungsmethoden gerecht werden zu können, muss die bereitgestellte Gelmatrix durch Kanülen mit einem geringen Außendurchmesser injizierbar sein ohne dabei die mechanische Stabilität zu verlieren. Die hergestellten, zylindrischen Ca-Alginatgele konnten zerstörungsfrei mit einem Durchmesser von 11,5 mm passgenau in 5 mL Einwegspritzen überführt werden. Nach dem Passieren der 0,5 und 1,0%igen Ca-Alginatgele durch eine 23G Kanüle werden durch den Scherstress beim Dosieren Teile des Gelnetzwerks gebrochen, sodass die Gelmatrizen nach der Injektion als ein zur Kugel aufgewickelter Alginatfaden vorliegen. Durch das Aufbrechen des makroskopischen Netzwerks in kleinere Gelkomponenten wurde der Freiheitsgrad des Gelnetzwerks vergrößert. Es zeigte sich dabei, dass die Art der Vernetzung einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Gele hat. Alginatgele bildeten sich physikalisch durch Aufbau von ladungsstabilisierten Komplexen nach unterschiedlich langer Inkubation (1, 2, 3 und 4 h) im Ca^{2+} -Vernetzungsbad. Hingegen wurde die Hyaluronsäure mit Licht-sensitiven Einheiten konjugiert und mittels UV-Exposition (5 bzw. 20 min) unter Ausbildung von kovalenten Bindungen vernetzt. Aufgrund der unterschiedlichen Vernetzungsarten traten nach dem Durchtritt durch eine Kanüle unterschiedliche viskoelastische Eigenschaften auf. Während das ladungsstabilisierte Alginatgel durch die Frakturierung einen höheren Freiheitsgrad erhielt und eine erhöhte Viskoelastizität zeigte, führten die Frakturen bei kovalent vernetzten 1,0%ige Hyaluronsäure-Gelen zu verminderten viskoelastischen Eigenschaften. Die kovalent gebundenen Gelnetzwerke sind vermutlich starrer und anfälliger für mechanisch induzierte Netzwerkbrüche, die irreversibel in reduzierten mechanischen Stabilitäten resultierten.

Je nach Anwendungsszenario wird an das Materialsystem zudem die Forderung nach Langzeit- bzw. Kurzzeitstabilität/Degradierbarkeit gestellt. Die Degradation von Alginaten

erfolgt in der Regel über die Spaltung der α -1,4-glykosidische Bindung durch Enzyme (Alginasen), saurer Hydrolyse oder Bestrahlung (UV). In Säugetieren ist kein Enzym bekannt, das Alginatketten degradieren könnte (11). Zwar sind Alginasen vorhanden, die nachweislich im Stande waren die hochvolumigen Ca-Alginatgele binnen 24 h zu degradieren, doch handelt es sich dabei um körperfremde Enzyme, sodass eine Langzeitstabilität *in-vivo* zu erwarten ist. Versuche mit Alginatgelen in Ratten bestätigen diese Annahme, die von dem Erhalt der Gelstabilität über einen Zeitraum von 7 Monaten berichteten (18). Zusätzlich zur enzymatischen Degradation des Alginatgerüsts können Alginatgele durch Entzug der stabilisierenden multivalenten Kationen degradiert werden. Die Calcium-stabilisierten Alginatgele zeigten eine vollständige Degradierung in NaCl innerhalb von 9 Tagen. Ursache dafür sind überschüssige Natrium-Ionen, die mit den Alginat gebundenen Calcium-Ionen konkurrieren und zur Netzwerk-Auflösung führen (11). Im Gegensatz dazu waren Alginatgele, die durch Bariumionen stärker gebunden wurden, in NaCl über Monate stabil. Physiologische Kochsalzlösungen bilden zwar die körpergerechten, osmotischen Bedingungen jedoch nicht die Vielzahl verschiedener Salze im menschlichen Körper ab. Um sich *in-vivo*-Bedingungen anzunähern, eignete sich der Einsatz der sogenannten *Balanced Salt Solution* (BSS); einer isoosmolaren, pH-gepufferten Lösung, die essentielle Salze in physiologischen Konzentrationen enthält und z.B. in der operativen Augenheilkunde als Spüllösung angewendet wird. Im Gegensatz zur Inkubation in physiologischer Kochsalzlösung konnten in BSS keine aus dem Gelnetzwerk herausgelösten Alginatmoleküle nachgewiesen werden. Die Stabilität von Ca-Alginatgelen in BSS lässt sich dadurch erklären, dass stabilisierende, divalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} parallel zu potentiell destabilisierenden Na^+ - und K^+ -Ionen vorliegen und eine Degradation verhindern. Infolgedessen bleibt die Degradation des Gelsystems in kleinere Abbauprodukte aus, die sich *in-vivo* vor Ort oder in anderen Geweben abtransportiert akkumulieren könnten. Insbesondere Lösungsansätze mit synthetischen Polymeren (z.B. Polyacrylamide) scheiterten entweder an der Unverträglichkeit des Gels als Ganzem oder an der Toxizität der degradierten Abbauprodukte (121).

Als nachweislich bioinerte Matrix verursacht Alginat in der Theorie keine bis minimale Interaktionen mit der biologischen Umgebung. Die Biokompatibilitäten der Ca-Alginatgele und deren Einzelkomponenten (Sol, Quervernetzer) konnten an humanen, retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19) und an humanen Fibroblasten getestet und bestätigt werden. Weder die Gele noch die Sole zeigten zytotoxische Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen. Gemäß der DIN-Norm EN ISO 10993-5 liegt eine zellschädigende Wirkung ab einer

Abweichung größer 30% vor. Die Behandlung humaner, retinaler Pigmentepithelzellen und humaner Fibroblasten mit 0,5 und 1,0%igen Ca-Alginatgelen offenbarte mit Zellviabilitäten > 90% die Biokompatibilität der Gelsysteme und bestätigt die allgemein bekannte Verträglichkeit Alginat-basierter Systeme. Eine *in situ*-Polymerisierung der Gele kann nebst technischer Herausforderungen aufgrund der zellschädigenden Wirkung des Vernetzerbades mit hohen Calciumchlorid-Mengen in nicht-physiologischer Konzentration ausgeschlossen werden. Die sehr gute Verträglichkeit der Gele bestätigt zugleich das erfolgreiche Entfernen überschüssiger Calcium-Ionen durch intensive Waschschrte. Selbst im Falle, dass die Alginatgele *in vivo* degradiert werden könnten, würden herausgelöste Calcium-Konzentrationen nicht zytotoxisch wirken. Auch ungebundene Alginat zeigen in Form von 0,5 und 1,0%igen Solen gute Biokompatibilitäten und wären nach einer Degradation der Gele unbedenklich. Zu beachten ist jedoch, dass sich mit zunehmender Alginatkonzentration die Viskosität der Zellumgebung erhöht und infolgedessen die metabolische Zellaktivität durch den verzögerten, diffusionsgesteuerten Stoffaustausch gemindert wird. Der Einsatz höherer Mengen ungebundenen Alginats (> 1% m/V) ist daher im Kontext zellulärer Anwendungen mit Blick auf die Biokompatibilität zu vermeiden.

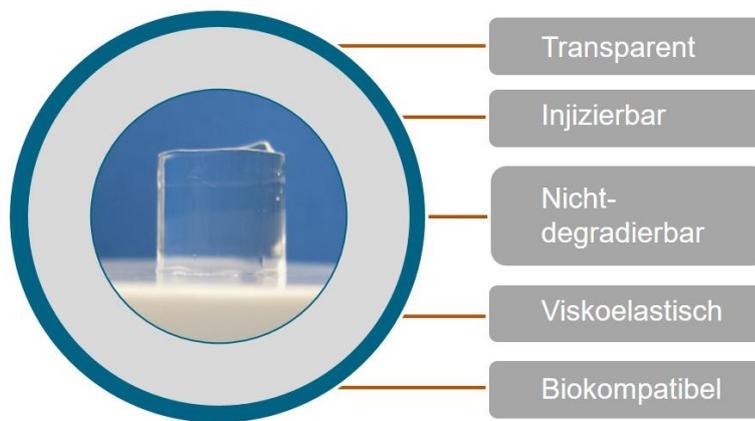


Abbildung 51: Übersicht der dargelegten Eigenschaften hochvolumiger Alginatgele.

Die Kombination aus einem Gelierbad mit schwer wasserlöslichen Calciumsulfat und feinporigen Schläuchen ermöglichte somit einen Gelierprozess von hochvolumigen Alginatgelen, die transparent, injizierbar, unter physiologischen Bedingungen nicht-degradierbar, viskoelastisch und biokompatibel sind (Abbildung 51). Das bisherige Spektrum kleinvolumiger Alginatmatrizen konnte mit der vorliegenden Arbeit um Alginatgele erweitert werden, die in ihrem Volumen hochskalierbar sind. Neben neuartigen Zellkultur- und

Barrieremodellen, profitiert insbesondere die Entwicklung künstlicher Gewebe von der Bereitstellung hochvolumiger Gelsysteme.

Ein potientes Anwendungsbeispiel für hochvolumige Alginatgele stellt der Ersatz des menschlichen Glaskörpers dar. Der humane Glaskörper ist ein transparentes Hydrogel mit einem Wassergehalt von 99%, das mit einem Volumen von etwa 4,5-5 mL 80% des gesamten Augenvolumens einnimmt (122). Mit zunehmendem Alter wächst das Risiko, dass sich im menschlichen Auge der Gel-artige Glaskörper durch progressive Verflüssigung von der Netzhaut abhebt und dadurch Risse im retinalen Pigmentepithel verursacht, die letztlich zu starken Sehbehinderungen bis hin zur Erblindung führen können (123, 124). Im Rahmen komplizierter Netzhaut- und Glaskörperbehandlungen muss nach dem Entfernen des (erkrankten) Glaskörpers der Glaskörperraum vollständig mit einer Tamponade ausgefüllt und so die Netzhaut stabilisiert werden. Traditionell eingesetzte Tamponaden wie Gase und (schwere) Silikonöle tamponieren mit spezifischen Auf- bzw. Abtriebsvektoren die Netzhaut nur partiell (125). Hingegen kann ein vollständiges Andrücken aller Netzhautareale über den Quelldruck von Hydrogelen erreicht werden (Abbildung 52).

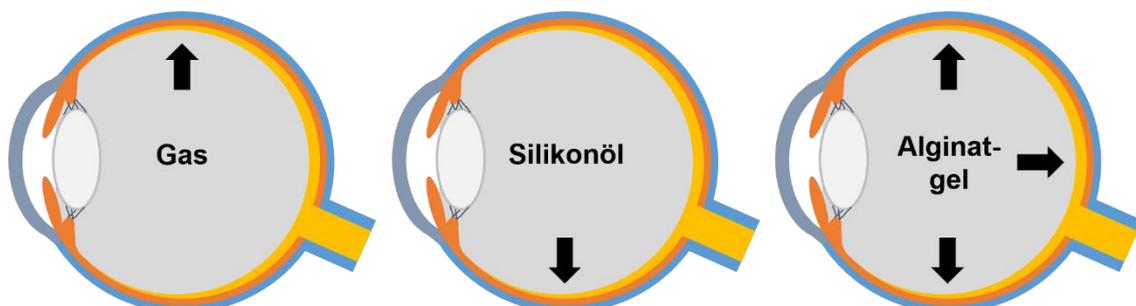


Abbildung 52: Vergleich der Tamponadenwirkung von Gas (Auftriebsvektor), Silikonöl (Abtriebsvektor) und Alginatgel (allseitig).

Alle im klinischen Einsatz befindlichen Tamponaden-Materialien sind hydrophob, sodass der hydrophile Glaskörperraum nicht vollständig ausgefüllt werden kann und infolgedessen ein schmaler Flüssigkeitsspiegel entsteht, in dem sich Wachstumsfaktoren ankonzentrieren und proinflammatorische Prozesse im Sinne einer proliferativen Vitreoretinopathie fördern (126). Neuere Tamponadestrategien zielen daher auf hydrophile, Hydrogel-basierte Systeme ab (127). Die bisherigen Konzepte scheiterten jedoch daran die vielseitigen Ansprüche einer Netzhaut-Tamponade zu erfüllen. Insbesondere Intransparenz, abweichende Brechungsindizes und schnelle Degradation waren limitierende Faktoren. Nicht zuletzt war es die unzulängliche Biokompatibilität bisheriger Ansätze *in vitro* oder im Tier, die vor allem bedingt durch unzureichende Substanzreinheit und toxische Vernetzungsmittel einer gegenwärtigen Verfügbarkeit von Hydrogel-basierten Netzhaut-Tamponaden entgegen-

stand (128, 129). Jiang *et al.* stellten einen Glaskörperersatz auf Basis von modifiziertem Alginat und Chitosan her, berichteten jedoch von mangelnder Transparenz und Sehkraftbedrohender Netzhauttoxizität der entwickelten Tamponade (130). Im Gegensatz dazu erfüllt das in dieser Arbeit hergestellte hochvolumige Gel auf Basis unmodifizierter, hochmolekularer Alginatgels die Anforderungen an einen Glaskörperersatz zur Behandlung vitreoretinaler Krankheitsbilder. Sowohl der Brechungsindex als auch die Transparenz des hochvolumigen Alginatgels spiegeln die optischen Eigenschaften des gesunden, menschlichen Glaskörpers wider, die zum einen für das Sehvermögen des Patienten und zum anderen für diagnostische und therapeutische Zwecke wie die Darstellung von Fundusdetails oder die Laserphotokoagulation unerlässlich sind. Damit sind die Alginatgele den bisherigen Tamponaden überlegen, die mit erheblich unterschiedlichen Brechungsindizes (z.B. Silikonöl: 1,4034) dazu führen, dass die Patienten während der Anwendungsdauer in ihrem Sehprozess durch unscharfes Sehen stark eingeschränkt werden (Änderung um -6 Dioptrien bei Ölen bis zu -50 Dioptrien bei Gasen). Auch der Forderung nach viskoelastischen Eigenschaften, die für die Stabilisierung der umliegenden Gewebestrukturen, den Erhalt des Sehwegs und den Schutz des Auges vor mechanischen Belastungen essentiell sind (122, 131, 132), kommen die hochvolumigen Alginatgele im Gegensatz zum Silikonöl nach. Hier besaßen 1,0%ige Ca-Alginatgele nach dreistündiger Gelierung eine Viskoelastizität, die mit dem gesunden Glaskörper junger Menschen vergleichbar war (106) und durch Injektion nicht reduziert wurde. Alginatgele könnten als Langzeittamponade langfristig im Auge verweilen und stellen damit eine vielversprechende Alternative zu den durch Degradation limitierten Ansätze auf Hyaluronsäure-Basis (109) sowie zur Kurzzeittamponade Silikonöl, das aufgrund von Emulsifikation und Kataraktbildung nach einer Verweildauer von maximal 6 Monaten in einer Folgeoperation entfernt werden muss, dar. Nicht zuletzt bekräftigt die Biokompatibilität der Alginatgele, insbesondere gegenüber der RPE-Zellen, das Potential der hochvolumigen Gelsysteme als Netzhaut-tamponierenden Glaskörperersatz. In der sich theoretisch anschließenden *in-vivo*-Evaluation sind neben der allgemeinen Akzeptanz und Wirksamkeit des Systems insbesondere die Stabilität und der Erhalt des intraokularen Augendrucks wichtige Parameter für den zukünftigen klinischen Erfolg. Die Nutzung der entwickelten hochvolumigen Alginatgele als Glaskörperersatz stellt einen potentiellen Anwendungsfall dar, in dem die bioinerten, anti-adhäsiven Eigenschaften des Alginatgels von Vorteil sind um vitreoretinale Krankheitsbilder wie die proliferative Vitreoretinopathie zu verhindern. Im Gegensatz dazu bedarf der Einsatz der Gele beispielsweise als Wachstumsfläche in der Zellkultur oder Gewebezüchtung eine Modifikation hinzu adhäsiven Eigenschaften.

Welchen Effekt hat die Oberflächenchemie auf Zell-Matrix Kontakte? Carboxyl- vs. Phenolgruppe

Für eine Vielzahl verschiedener Zellen ist die Adhäsion an eine Matrix die Grundlage für die Vitalität und Ausübung spezifischer Funktionen. Mediiert wird die Zellverankerung durch Proteine, die auf der Matrix adsorbiert vorliegen und Bindungsstellen für Zellen bereitstellen. Die Präsenz, Quantität und Bioaktivität Matrix-adsorbierter Proteine wird dabei vor allem durch die chemische Beschaffenheit der Matrixoberfläche bestimmt. Am Beispiel von Alginatstrukturen führten die Carboxylgruppen zu negativen Nettoladungen und infolgedessen zu keiner günstigen Adsorption von zelladhäsionsvermittelnden Proteinen (15). Alginat stellte nachweislich eine bioinerte, adhäsionshemmende Matrix dar. Um biokompatible, flexible Alginatgele für die Kultivierung Adhäsions-abhängiger Zellen auf zwei- oder dreidimensionalen Alginatstrukturen nutzbar zu machen, ist es erforderlich die anti-adhäsiven Eigenschaften des Alginats durch geeignete Modifizierungen zu überwinden. In diesem Teil der Arbeit wurde daher untersucht, inwieweit die Kopplung von Phenolgruppen an das Alginatgerüst eine adhäsionsfördernde Wirkung besitzt.

Als geeignetes Vermittler-Molekül konnte Tyramin identifiziert werden, das neben der Phenol-Komponente eine endständige Aminogruppe besitzt. Unter Einsatz der Carbodiimide-Chemie gelang es Tyramin über Amidierung reproduzierbar an das Alginatgerüst zu konjugieren. Die eingeführten Phenolgruppen ließen sich mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie anhand der aromatischen Protonen bei einer Verschiebung von etwa 7 ppm erfolgreich nachweisen. Dabei besaß die Kopplung an gelierten Matrizen den Vorteil, dass keine zur Netzbildung notwendigen Carboxylgruppen beansprucht wurden. Die mit der Tyramin-Kopplung einhergehende Änderung der mechanischen Stabilität lässt die Vermutung zu, dass das Alginatgel nicht nur oberflächlich, sondern auch im Inneren des Polymernetzwerks modifiziert wurde. Auf chemischer Ebene betrachtet, besaßen die Alginatstrukturen nach der Tyramin-Konjugation sowohl Hydroxyl-, Carboxyl- als auch Phenolgruppen und ähnelten somit der Oberflächenchemie zellkulturbehandelter Plastik, die seit Jahrzehnten als universelle Wachstumsfläche für die Kultur adhärenter Zellen dient (133).

Im direkten Vergleich der verschiedenen Oberflächen hinsichtlich der Benetzbarkeit und Ladung (Abbildung 53) wird deutlich, dass die mit Phenol-Einheiten konjugierten Alginatgele der Oberflächenbeschaffenheit von Proteinen ähneln.

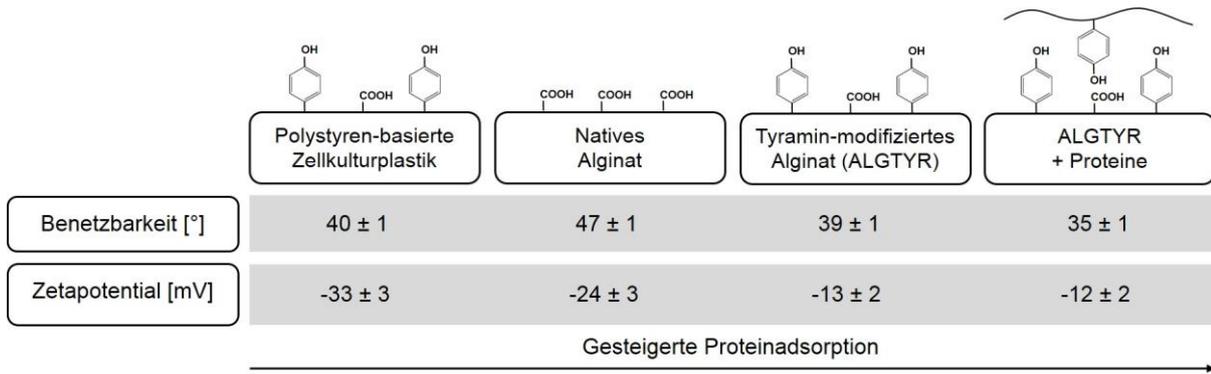


Abbildung 53: Vergleichende Darstellung der Chemie, Benetzbarkeit und Ladung von nativen und modifizierten Alginatgelen gegenüber Polystyren-basierter Zellkulturplastik. Tyramin-modifiziertes Alginat weist zur Proteinschicht vergleichbare Benetzbarkeiten und Zetapotentiale auf und ermöglicht mit den bereitgestellten Phenol-Gruppen, die potentiell mit den Tyrosin-Einheiten der Proteine wechselwirken, eine stabile Proteinadsorption auf Alginat-basierten Hydrogelen.

Die vergleichbaren Oberflächeneigenschaften von Tyramin-Alginaten und Proteinen könnten einen Grund für die erhöhte Proteinadsorption auf Tyramin-konjugierten Alginatstrukturen darstellen. Da sich im Wässrigen die hydrophilen Einheiten (z.B. Aminosäuren) in der Peripherie des Proteins befinden, können jene direkt und ohne Faltungsprozesse über ionische Bindungen mit hydrophilen Matrixoberflächen interagieren. Die Form und Funktion der Proteine würden dabei erhalten bleiben. Trotz übereinstimmender Benetzbarkeiten ließen sich jedoch bis zu fünfmal mehr Proteine auf Tyramin-Alginatgelen als auf der Polystyren-basierten Zellkulturplastik nachweisen. Als Ursache dafür können die unterschiedlichen Ladungen der verschiedenen Matrixoberflächen herangezogen werden. Je positiver die Oberfläche geladen war, desto mehr negativ geladene Proteine adsorbierten. Dieser Zusammenhang deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Versuchsaufbauten (8, 73). Im Fall vom Alginat wurden die Carboxylgruppen, die im wässrigen Milieu deprotoniert und negativ geladen ($-\text{COO}^-$) vorliegen, amidiert und Phenolgruppen eingebaut, die als sehr schwache Säuren nicht/kaum zur Deprotonierung neigten und dadurch erhöhte Zetapotentiale aufwiesen. Die Ladung der Matrixoberfläche hatte folglich einen dominanteren Einfluss auf die Proteinadsorption als die Benetzbarkeit und wird deswegen in einem sich anschließenden, eigenständigen Teil der Arbeit näher untersucht. Nichtsdestotrotz müssen die Ladung und Benetzbarkeit einer Oberfläche stets getrennt voneinander betrachtet und als wichtige Einflüsse des multifaktoriellen Wechselspiels zwischen Matrix und Proteinen verstanden werden. Nicht zuletzt wird der Tyrosin-Interaktion eine stabilisierende Wirkung auf Proteinstrukturen zugeschrieben (134). Die Hypothese liegt daher nahe, dass die in das

Alginatgerüst eingeführten Phenolgruppen mit den Tyrosin-Einheiten der Proteine interagierten (Abbildung 53) und infolgedessen die stabile Proteinadsorption begünstigten.

Im Gegensatz zu den gegenwärtigen Strategien zur Bioaktivierung von Alginat durch die Konjugation von spezifischen RGD- (135, 136) oder YIGSR-Motiven (137), erlauben Tyramin-funktionalisierte Alginatstrukturen eine nicht-kovalente, universelle Beschichtung mit Adhäsionsmolekülen unterschiedlichen Ursprungs (z.B. Serumproteine, Matrigel, Laminin, etc.), die in Bezug auf Proteintyp und -menge eingestellt werden kann. Vergleichbar mit dem Einsatz von zellkulturbehandelter Plastikware lässt sich durch direkte Inkubation verschiedenster Proteine eine Matrix-gebundene Proteinschicht für die Kultivierung verankerungsabhängiger Zellen herstellen. Im Gegensatz zur steifen Zellkulturplastik (E-Modul = 3×10^9 Pa (138)), besitzen Alginat-basierte Gelstrukturen jedoch poröse Netzwerke, die in ihrer Flexibilität eingestellt und somit den individuellen Bedingungen verschiedenster Zellsysteme angepasst werden können. Durch den Einsatz flexibler Gerüststrukturen kann somit der Fähigkeit von Zellen die mechanischen Eigenschaften ihrer Zellumgebung wahrzunehmen (5) Rechnung getragen werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Tyramin-funktionalisierten Alginatgele besaßen mit E-Modulen von $60-80 \times 10^3$ Pa vergleichbare mechanische Stabilitäten menschlicher Gewebe wie beispielsweise der Leber ($20-60 \times 10^3$ Pa (139)) oder des Herzens ($10-150 \times 10^3$ Pa (140)).

Die Bioaktivität der proteinbeschichteten Alginatgele wurde mit Hilfe von Zelladhäsionsstudien an humanen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und induziert-pluripotenten Stammzellen beurteilt. Eine Abscheidung von Proteinen auf den nativen und modifizierten Alginatgeloberflächen erfolgte bereits durch den Kontakt mit den entsprechenden Zellmedien, die mit fötalem Kälberserum angereichert Serumproteine beinhalteten. Zwar adsorbierten Proteine auf unmodifizierten Alginatgelen, besaßen jedoch keine zelladhäsionsvermittelnde Eigenschaften. Ladungsinduzierte Faltungsprozesse könnten dabei für den Aktivitätsverlust der Proteine verantwortlich sein. Hingegen adhärten MSCs auf Proteinschichten, die auf Phenol-konjugierten Alginatgerüsten adsorbierten. Die erhöhte Benetzbarkeit, Oberflächenladung und Tyrosin-Interaktion der Tyramin-Alginatgele ließen dabei eine günstige Proteinadsorption zu, die im Gegensatz zu unmodifizierten Alginaten aktive Bindungsstellen für die Zelladhäsion bereitstellte. Daraus folgt, dass Phenolgruppen im Vergleich zu Carboxylgruppen eine zelladhäsionsfördernde Wirkung besaßen und ergo ein wichtiges Werkzeug darstellen, um gezielt Zell-Matrix Kontakte zu induzieren (Abbildung 54). In der Literatur beschrieben ist die adhäsionsfördernde Wirkung von

Dopamin (141, 142), das über mehrere Reaktionsschritte aus Tyramin hergestellt werden kann. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits die Kopplung von Tyraminen die Proteinadsorption und Zelladhäsion begünstigen. Darüber hinaus birgt der Einsatz von Tyraminen den Vorteil, dass potentielle biologische Nebenreaktionen des Dopamins als Neurotransmitter ausgeschlossen werden könnten.

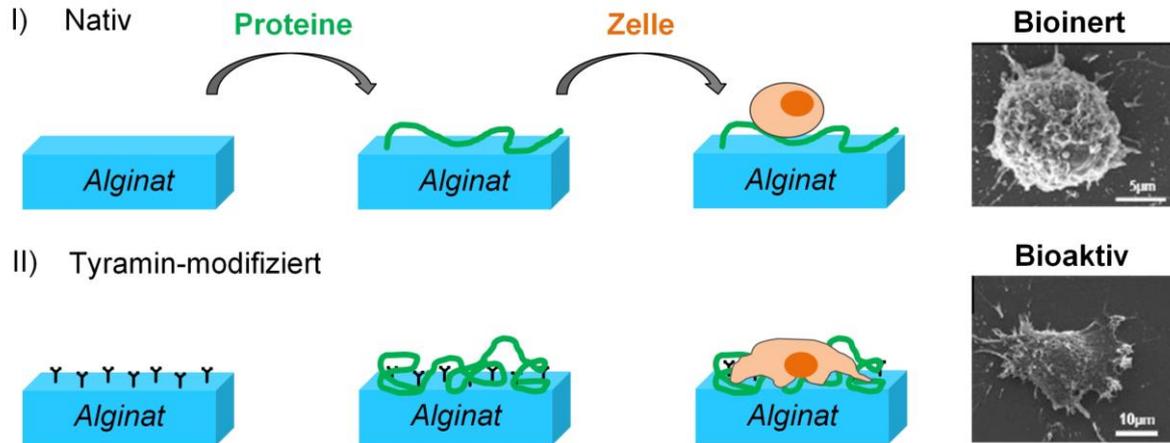


Abbildung 54: Vergleichende Darstellung der Interaktionen von Proteinen und Zellen mit nativen und Tyramin-modifizierten Alginatgelen hinzu Zelladhäsionshemmenden beziehungsweise -fördernden Zellkultursubstraten.

Im Gegensatz zu den MSCs genügte die Abscheidung von Serumproteinen nicht für die Adhäsion von hiPSCs, die eine komplexere Mikroumgebung verlangten. Mit Blick auf definierte und reduzierbare Zellkulturbedingungen wurde vom Einsatz von Proteingemischen variierender Zusammensetzung (wie z.B. Matrigel) abgesehen und stattdessen gezielt Zelladhäsionsproteine wie Laminin oder Vitronektin angeboten. Im Gegensatz zu Vitronektin ließen sich Laminine vermutlich aufgrund sterisch gehinderter Bindungsstellen nicht kovalent unter Einsatz der Carbodiimide-Chemie konjugieren. Hingegen konnten Laminine über die nicht-kovalente Adsorption auf Tyramin-Alginatgelen für die Zellkultur verfügbar gemacht werden. Der Einsatz Laminin-beschichteter Tyramin-Alginatgele resultierte in geeignete Zell-Matrix Kontakte, die die Adhäsion und Proliferation von hiPSC zuließen. Dabei adhärten hiPSCs vermehrt auf modifizierten Gelstrukturen mit erhöhten Tyramingehalt. Die Abnahme von Zellagglomeraten spricht darüber hinaus dafür, dass zunehmend attraktive Wachstumsoberflächen generiert worden waren. Alginatgele, die mit 12,5 mg Tyramin/cm² modifiziert und mit 1,0 µg Laminin/cm² beschichtet worden waren, wurden für die Kultivierung von hiPSCs als geeignete Wachstumsoberflächen identifiziert.

Durch die Kopplung von Tyramin an Alginatgele konnte eine geeignete Plattform bereitgestellt werden, auf der stabile Adsorptionen bioaktiver Proteine und infolgedessen Zell-

Matrix Kontakte auf weichen Alginatestrukturen ermöglicht wurden und die ein vielversprechendes Potential für die (Stamm-)Zellkultivierung und Gewebezüchtung besitzt. Für ein weiterführendes Verständnis der etablierten Zell-Matrix Kontakte sind mit Blick auf das Differenzierungspotential und metabolische Profil adhärerter Stammzellen zukünftig insbesondere Genexpressionsanalysen wünschenswert.

Welchen Einfluss haben Ladungseffekte auf Zell-Matrix Kontakte?

Ausgehend von der chemischen Beschaffenheit einer Matrixoberfläche können verschiedene Ladungszustände vorliegen, die die Zell-Matrix Interaktionen maßgeblich bestimmen und somit ein vielversprechendes Werkzeug zur gezielten Steuerung zellulären Verhaltens darstellen. Gegenwärtige Konzepte stützen sich auf der Grundlage, dass sowohl die Mehrheit zelladhäsionsvermittelnder Proteine als auch die Zellmembran aufgrund der Anwesenheit von Proteinen, Polysacchariden und Phospholipiden eine negative Nettoladung besitzen. Da gegensätzliche Ladungen einander anziehen, besitzen ideale Wachstumsoberflächen für die Zellkultur positive Ladungen. Bisherige Untersuchungen zur Beziehung zwischen der Ladung von Materialoberflächen und dem Zellverhalten beschränken sich lediglich auf den Effekt zunehmend positiver Ladung auf die Anhaftung von Zellen wie Fibroblasten (38, 39) und Osteoblasten (40, 41) sowie die Osteogenese-induzierende Wirkung positiver Ladung auf MSCs (42–45). Zwar stellt der Nachweis der Zelladhärenz eine wichtige Basis dar, doch ist ein tiefergehendes Verständnis der Zell-Matrix Kontakte insbesondere in Bezug auf die Zellausbreitung (Zellfläche oder -morphologie) und ladungsinduzierten Genexpressionen erforderlich, um das Potential positiver Ladungen zur Steuerung zellulären Verhaltens beurteilen und gezielt nutzen zu können. Darüber hinaus ist der Einfluss der Ladung auf weitere Differenzierungskapazitäten von MSCs in Richtung Knorpelzellen (Chondrogenese) oder Fettzellen (Adipogenese) von Relevanz. Am Beispiel von MSCs wurde daher auf ein tiefergehendes Verständnis abgezielt, inwieweit die Ladung einer Matrixoberfläche das Zellverhalten in Bezug auf Adhäsion und Differenzierung beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im Vergleich zu den hauptsächlich genutzten Acryl-basierten Substraten (38, 40–42) und den binären, selbstassemblierenden Monoschichten auf Metallsubstraten (39) eine Hydrogel-basierte Plattform unterschiedlicher Ladungsniveaus hergestellt werden. Für die Studien zu Zell-Matrix Kontakten standen infolgedessen einstellbare, flexible Wachstumsoberflächen zur Verfügung, die mit Zetapotentialen von -25 mV bis +15 mV das Spektrum der bisher untersuchten Ladungen erweiterten (39, 41, 42, 44). Dabei dienten native Alginategele mit einer negativen Oberflächenladung von -25 mV als

Gerüststruktur, an der unter Einsatz der Carbodiimide-Chemie unterschiedliche Mengen an positiv geladenen Molekülen gekoppelt werden konnten. Als Träger positiver Ladungen eigneten sich Poly(amidoamine), die allgemein als Vehikel für die Abgabe von Wirkstoffen (143) oder Genen (144) bekannt sind und in der 3. Generation je Dendrimer 32 endständige Aminogruppen aufweisen, die im Wässrigen zu positiven Domänen protonieren ($-\text{NH}_3^+$). Über mindestens 1 der 32 Aminogruppen konnte mit dem Alginatgerüst durch Amidierung eine kovalente Bindung hergestellt werden. Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie gelang es über die Analyse der Amide-Bande I die zunehmende Konjugation der PAMAM-Moleküle an das Alginatgel nachzuweisen. Der hohe Wassergehalt der Alginatgele von über 99% verursachte dabei im Raman-Spektrum ein dominantes Hintergrundsignal, das durch das Trocknen der Gele an der Luft reduziert werden konnte. Da das Polymernetzwerk beim Trocknungsprozess substantiell schrumpft und hohen Spannungen ausgesetzt ist, sind partielle Bindungsbrüche denkbar. Nichtsdestotrotz konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Kopplungskonzentration an PAMAM und der Amide-Bande I erbracht werden. Mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenspektroskopie offenbarte sich der Eintrag von PAMAM-Molekülen zudem in dem erhöhten Stickstoffgehalt im Alginatgerüst. Unmodifizierte Alginatgele weisen idealerweise keine stickstoffhaltigen Domänen im Polymernetzwerk auf. Der beobachtete Stickstoffgehalt von etwa 1,8% in nativen Alginatgelen könnte auf eine etwaige Präsenz von Proteinen zurückzuführen sein, die nach dem Extraktionsprozess im Alginatgranulat vorliegen. Somit stünde mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie zukünftig ein weiteres Nachweisverfahren von Proteinen für das Qualitätsmanagement der Alginatsubstrate zur Verfügung. Der zunehmende Stickstoffanteil in PAMAM-modifizierten Alginatgelen fundiert auf dem Umstand, dass Stickstoff-basierte Amid- und Amin-Einheiten des PAMAM-Dendrimers in das Alginatgerüst eingebaut wurden. Die Kopplung der PAMAM-Moleküle erlaubte somit das reproduzierbare Einbringen von Aminogruppen, deren Gehalt sich über die Konzentration an PAMAM-Dendrimern steuern ließ. Unter physiologischen Bedingungen (wässrig, $\text{pH} = 7,4$) protonierten die Aminogruppen zu positiv geladenen Domänen, sodass in Abhängigkeit der konjugierten PAMAM-Menge verschieden geladene Gerüststrukturen vorlagen, deren Oberflächenladung über die Analyse der Zetapotentiale charakterisiert werden konnte. Ein weiterer Vorteil des etablierten Modellsystems ist, dass die Benetzbarkeit der Oberfläche konstant und unabhängig von den PAMAM-induzierten Ladungszuständen war. Das ermöglichte, den Einfluss der Oberflächenladung auf Zell-Matrix Kontakte isoliert von der Benetzbarkeit zu betrachten.

Die Studien zur Adsorption von Proteinen auf Polymeroberflächen unterschiedlicher Ladung zeigten deutlich, dass Proteine in Abhängigkeit der Oberflächenladung in unterschiedlicher Quantität und Faltung adsorbierten. Zum einen wurde aufgezeigt, dass an Materialien zunehmender Oberflächenladung vermehrt Proteine haften. Mit Hilfe der Ladung einer Materialoberfläche lässt sich derart die Menge an Proteinen steuern, die für die Interaktion mit Zellen bereitstehen sollen. Die Ergebnisse bestätigen die bisherigen Diskussionen (8, 73) bezüglich der Protein-Matrix Kontakte mit zunehmender Materialladung. In der Theorie führen erhöht positiv geladene Materialien zu stärkeren Bindungen mit den vorwiegend negativ geladenen Proteinen und infolgedessen zu potentiell geringeren Desorptionen von der Materialoberfläche. Die Untersuchung der Annahme zunehmender Bindungskräfte zwischen Proteinen und positiven Materialoberflächen ließe sich zukünftig mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops untersuchen (8, 71). Zum anderen wurde aufgezeigt, dass die Faltungsprozesse von Proteinen, die potentiell zur Denaturierung und damit zum Verlust der Bioaktivität von Proteinen führen können, bei gleichbleibender Benetzbarkeit und zunehmender Oberflächenladung des Materials abnehmen. Das Bereitstellen positiv geladener Materialoberflächen begünstigt somit den Erhalt der Bioaktivität der Proteine nach Adsorption und ist folglich ein wichtiges Werkzeug zur Steuerung von Zell-Matrix Kontakten. Im Detail bedeutet dies, dass native, unmodifizierte Alginategele aufgrund ihrer Carboxylgruppen negativ geladene Oberflächen aufweisen und mit den wenigen, positiven Domänen der Proteinstrukturen wechselwirken. Dadurch entstehen vergleichsweise schwache Wechselwirkungen, die zur leichteren Desorption der Proteine von der Materialoberfläche neigen könnten. Die nachgewiesenen Faltungsprozesse der Proteine auf negativen Alginateoberflächen können potentiell durch das Freilegen positiver Proteindomänen bedingt sein. Da die Vielzahl der Proteine aus negativ geladenen Domänen bestehen, sind die Wechselwirkungen an zunehmend positiver geladenen Materialoberflächen begünstigt und entsprechende Faltungsprozesse reduziert. Die Zunahme von Proteinfaltungen bei Zetapotentialen > 10 mV geben Grund zur Annahme, dass stark attraktive (positive) Ladungen die Struktur und infolgedessen die Bioaktivität der Proteine verringern. Das hätte zur Folge, dass die für die Zelladhäsion vorteilhaften Proteinadsorptionen in einem gewissen Ladungsspektrum erfolgen. Gemäß der vorliegenden Proteinfaltungsstudie werden Zetapotentiale von 5-10 mV als günstige Oberflächenladungen für die Adsorption Zelladhäsions-vermittelnder Proteine angesehen.

Ogleich Proteine nachweislich in unterschiedlicher Quantität und Faltung adsorbierten, erfolgte auf der Materialoberfläche in jedem Falle die Ausbildung einer Proteinschicht, die

eine Ladung von $-8,01 \pm 2,38$ mV und einen Kontaktwinkel von $35,60 \pm 2,85$ ° besitzt. Unter Berücksichtigung der Proteinstudien an Tyramin-Alginaten lässt sich insgesamt feststellen, dass durch die Adsorption der Proteine die Ladung und Benetzbarkeit jedoch nicht die Rauigkeit und Elastizität des Materials verändert werden. Demzufolge liegen nach der Proteinadsorption keine Materialoberflächen unterschiedlicher Benetzbarkeiten und Ladungen sondern eine Schicht an Proteinen unterschiedlicher Quantität und Aktivität vor, mit denen die Zellen interagieren können. Der Einfluss der Oberflächeneigenschaften Benetzbarkeit und Ladung auf das Verhalten von Zellen lässt sich somit generell nur indirekt über die Beschaffenheit der adsorbierten Proteinschicht ermitteln.

Das etablierte, Hydrogel-basierte Modellsystem ermöglichte es Ladungs-induziertes Verhalten humaner, mesenchymaler Stammzellen hinsichtlich der Adhäsion und Proliferation zu untersuchen und offenbarte eine transitive Abhängigkeit des Zellverhaltens von der Oberflächenladung einer Matrix (Ladung → Proteinschicht → Zellverhalten). Über Membran-gängige Integrine sind MSCs in der Lage mit den Oberflächen-adsorbierten Proteinen zu interagieren. Die anti-adhäsiven Eigenschaften nativer Alginatgele begründen sich auf deren negativ geladenen Oberfläche. Die zu $-\text{COO}^-$ dissoziierten Carboxylgruppen ließen zwar die Interaktionen mit den wenigen, positiv geladenen Proteindomänen zu, führten jedoch zu immensen Faltungsprozessen der Proteinstruktur und infolgedessen zum Verlust potentieller Zellbindungsstellen durch z.B. sterische Hinderung. Für die Adhäsions-abhängigen MSCs kann natives Alginat keine geeignete Wachstumsoberfläche darstellen, sodass die Zellen zur Bildungen von Zellaggregaten (Sphäroiden) neigen, in denen die Zellen via Cadherin-vermittelte Zell-Zell Kontakte interagieren. Mit Hilfe des Alginat-basierten Modellsystems gelang es die Besiedelung und Ausbreitung von MSCs in Beziehung mit dem Ladungs- und Proteinzustand der Materialoberfläche zu stellen. Die Konjugation von PAMAM an natives Alginat löste eine Kaskade an Folgereaktionen aus. Das eingebrachte PAMAM veranlasste den Ladungsanstieg der Matrixoberfläche, der die Adsorption erhöhter Proteinmengen, die geringeren Faltungsprozessen unterlagen, und letztlich eine zunehmende Adhäsion und Ausbreitung von MSCs zur Folge hatte. Diese Ergebnisse unterstützen den in der Literatur veröffentlichten Trend zunehmender Zelladhärenz auf positiven Oberflächen (38–41) und erweitern den Stand der Technik zum einen um die Berücksichtigung der Proteinfaltung als Ursache des respektiven Zellverhaltens und zum anderen um die detaillierte Betrachtung der Zellfläche, -morphologie und -spuren. Zudem gelang es in dieser Arbeit die zunehmenden Zell-Matrix-Interaktionen auf positiven Oberflächen erstmalig durch die erhöhte Expression der fokalen Adhäsionsproteine Integrin

alpha 5 und Tensin 1 zu beschreiben. Im Einklang mit den beschriebenen ladungsinduzierten Proteinadsorptionen erwiesen sich Wachstumsoberflächen mit Zetapotentialen von 0-10 mV als günstig und 5-10 mV als besonders günstig. Mit diesen Ladungsintervallen sind Zell-Matrix Kontakte verknüpft, die zur Adhäsion von MSCs mit hohen Zellausbreitungsflächen, langen, parallelen Aktinfilamenten und vitalen Oberflächenrelief führen sowie lebhaftes, migratives Verhalten zulassen. Hingegen waren sowohl negativere als auch positivere Ladungen Ursache für erhöhte Faltungsprozesse von adsorbierenden Proteinen, auf denen Zellen weniger, abgerundet, mit kleinerer Fläche adhärten und eine glattere, perforierte Zellmembran mit verkürzten Mikrovilli und Vesikeln besaßen. Zellspuren, die infolge der Zellmigration auf Oberflächen hinterlassen werden und generell mit der physiologischen und funktionellen Aktivität der Zellen verknüpft sind (145), kommen auf solchen Oberflächen weniger vor. Die sphärischen Aktingerüste und verkleinerten Nuklei (146) unterstützen die Schlussfolgerung, dass ausgeprägt negative und stark positive Ladungen ungünstigere Zell-Matrix Kontakte für MSCs bewirken (Abbildung 55).

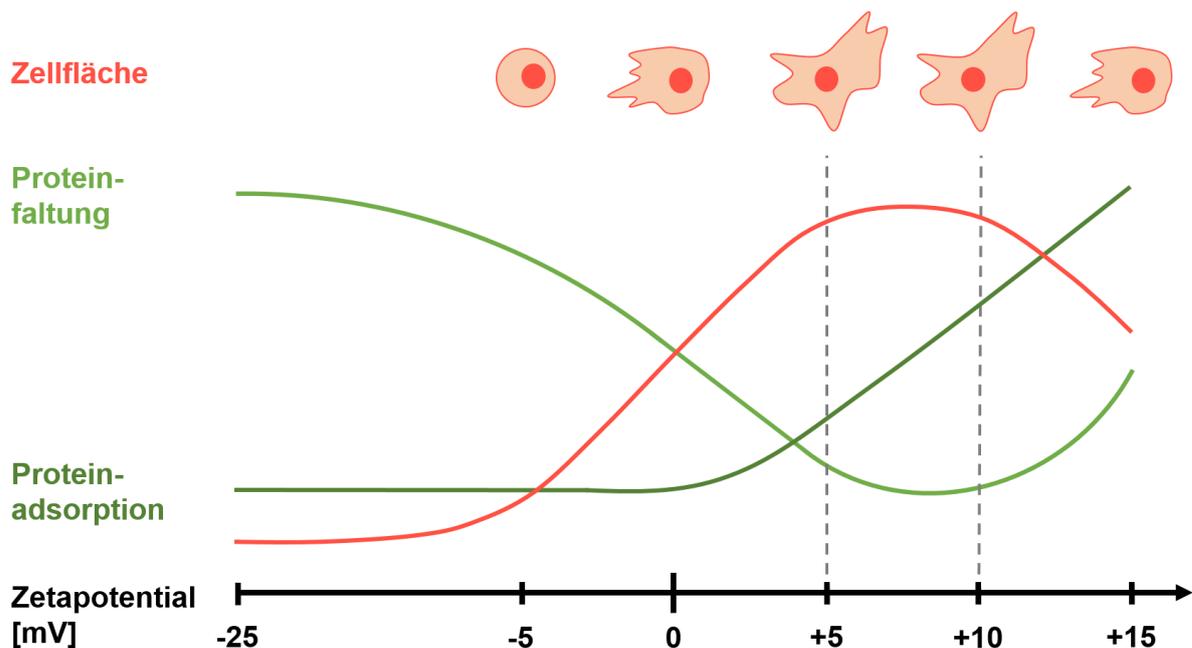


Abbildung 55: Postuliertes Modell zum Einfluss der Ladung einer Matrixoberfläche auf die Interaktionen mit Proteinen und Zellen. Ladungsintervalle von 0-10 mV wurden für die Kultur mesenchymaler Stammzellen als günstig und von 5-10 mV als besonders günstig identifiziert.

Als Folge der ladungsinduzierten Zell-Matrix Kontakte kann das veränderte zelluläre Verhalten von MSCs hinsichtlich ihres Phänotyps gedeutet werden. Die Gene THY1 und NT5E stellen gemäß der Erklärung der *International Society for Cellular Therapy* von 2006 (92) MSC-spezifische Marker dar und zeigen bei verringerter Expression eine potentielle Änderung des Zellstatus an. Insbesondere NT5E erwies sich als ein geeigneter Marker, um die

Effekte der Matrixoberflächenladung auf MSCs zu beschreiben. Die Unterdrückung von NT5E deutet sowohl auf den Verlust des MSC-Phänotyps als auch das Einleiten von Differenzierungsprozessen mit zunehmendem Zetapotential der Matrix hin. Aufgrund des multipotenten Differenzierungspotentials von MSCs wurde der Einfluss initial verschieden geladener Oberflächen hinsichtlich der Osteogenese (Knochenzellen), Chondrogenese (Knorpelzellen) und Adipogenese (Fettzellen) untersucht. Die Analyse des frühen Differenzierungsmarkers RUNX2 bestätigte den in der Literatur beschriebenen, Osteogenese-induzierenden Effekt positiver Ladungen (41–43, 45) und verknüpft die Hochregulierung von RUNX2 mit der des Adhäsionsproteins Integrin alpha 5, dessen Beteiligung bei der Differenzierung von MSCs in Osteoblasten zur Diskussion stand (147). Darüber hinausgehend ergaben die Expressionsprofile von PPAR γ als adipogenen Marker erste Anzeichen dafür, dass positiv geladene Matrixoberflächen Differenzierungsprozesse von MSCs in Richtung Fettzellen einleiten könnten. Neben der Hochregulierung von PPAR γ deutet auch die Unterdrückung des chondrogenen Markers SOX9 auf Adipogenese-induzierende Effekte von positiven Matrixoberflächen hin, da die Abwesenheit von SOX9 für die Adipogenese erforderlich ist (148). Um diese Ergebnisse zu unterstützen sind in Zukunft Analysen zur Expression weiterer Differenzierungs-spezifischer Gene wünschenswert sowie zusätzliche funktionelle Assays wie die Alizarin-Rot-Färbung (Osteogenese), Safranin-o-Färbung (Chondrogenese) und Oil Red-O Färbung (Adipogenese). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Marker untersucht, die innerhalb von Differenzierungsprozessen in einem frühen Stadium hoch- bzw. runterreguliert werden. Für zukünftige Untersuchungen sind somit späte Differenzierungsmarker bei längerer Kulturivierungsdauer von besonderem Interesse.

Die statistische Gruppierung aller untersuchten Genexpressionen verdeutlichte den zunehmenden Einfluss der Oberflächenladung einer Matrix auf die Adhäsion, den Phänotyp und Differenzierungsprozessen von MSCs. Die Benetzbarkeit einer Oberfläche konnte dabei als Kovariate ausgeschlossen werden, da innerhalb der unterschiedlichen Zustände des Modellsystems die Hydrophilie konstant blieb. Im Gegensatz dazu nahm die Oberflächenrauigkeit mit zunehmenden PAMAM-Gehalt ab und wurde als Einflussfaktor auf die Kultivierung von MSCs berücksichtigt. Eine Abnahme der Oberflächenrauigkeit ist allgemein sowohl mit geringeren Proteinadsorptionen und Zelladhäsionen (31) als auch eine Unterdrückung von RUNX2 und der Hochregulierung von SOX9 (149) verbunden. Die präsentierte Datenlage legt hingegen ein dazu konträres Verhalten von Proteinen und Zellen auf verschiedenen rauen Oberflächen offen, sodass angenommen werden kann, dass die

Ladung einen dominanteren Einfluss auf die Adsorption von Proteinen und das Verhalten von MSCs besitzt als die Rauigkeit einer Matrix.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adsorption von (Serum-)Proteinen aus fetalem Kälberserum auf Materialoberflächen verschiedener Ladungszustände untersucht. Das Serum beinhaltet von Natur aus eine Vielzahl verschiedener Proteine variierender Zusammensetzung, wobei bovines Serumalbumin ein Hauptbestandteil darstellt. In den letzten Jahren wurde der Einfluss einzelner Proteine auf verschiedenste Differenzierungsprozesse dargelegt (150–152), sodass es sich zukünftig in einem weiteren Schritt anbietet, die Adsorption gezielter Proteine wie beispielsweise Fibronectin und Vitronectin auf Geloberflächen unterschiedlicher Ladungsniveaus zu untersuchen.

Die Erkenntnisse der vorgelegten Untersuchungen haben aufgrund des offenbaren Einflusses der Ladung eines Materialsystems als kritischen Parameter für Zell-Matrix Kontakte eine direkte Relevanz für das Verständnis und die Entwicklung moderner Zellkulturmodelle, Implantate und Analyseverfahren. So lässt sich zukünftig mit den in dieser Arbeit entwickelten Ansätzen gezielt das Verhalten humaner Zellen über definierte Ladungszustände des Materialsystems steuern.

Welchen Einfluss haben Zellsekrete auf Zell-Matrix Kontakte?

Neben den Material-induzierten Stimuli sind insbesondere Reize interessant, die von der Zelle ausgehen. In der Vergangenheit wurden vor allem Enzyme (153) und Antigene (154) sowie die Nutzung inflammatorischer Reaktionen (153) als zelluläre Stimuli untersucht. Der Einsatz von Enzymen, die von Zellen sekretiert werden, birgt den Vorteil hoher Selektivität, milder Reaktionsbedingungen und den günstigen Umstand, dass Enzyme in zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt sind. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl an Enzymen, die polymerische Bindungen knüpfen oder spalten (z.B. Lyasen) und derart eine Matrix-Antwort in Form einer Strukturänderung herbeiführen können. In diesem Kontext sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss Zellsekrete am Beispiel von Enzymen auf Zell-Matrix Kontakte, insbesondere auf Alginate-basierte Materialsysteme, haben. Dabei war die Analyse einer interaktiven Biogrenzfläche zwischen einem Alginate-basierten Materialsystem und humanen Zellen angestrebt, die von dem Status der Zelle abhängig ist.

Als biologischer Reiz konnte das Enzym Lysyloxidase (LOX) identifiziert werden, das von Tumoren sekretiert wird (155, 156). Bei LOX handelt es sich um eine Kupfer-abhängige

Aminoxidase, die die kovalente Vernetzung von Kollagenen und Elastinen im extrazellulären Raum katalysiert und daher sowohl bei der Bildung und Reparatur von Bindegewebe beteiligt ist als auch das Wachstum von Tumorgewebe fördert (157–159). Die Sekretion von LOX wird zum einen durch hypoxische Bedingungen induziert und zum anderen von mehreren Zytokinen wie beispielsweise TGF- β angeregt, welches in der Vergangenheit mit bösartigen Tumoren in Verbindung gebracht wurde (160, 161). Hypoxische Konditionen sind charakteristisch für Tumorgewebe, die aufgrund mangelnder Versorgung an Nährstoffen und Sauerstoff im Gewebeerinneren einen nekrotischen Kern ausbilden und letztlich in eine hochregulierte Expression an LOX in der Tumorumgebung resultiert.

In *in-vitro*-Untersuchungen gelang es mit Hilfe der Darmtumorzelllinie HT29-MTX die Sekretion von LOX zu quantifizieren. Innerhalb von 14 Tagen bildeten die Darmtumorzellen Zell-Zell-Interaktionen hin zu standardisierten Sphäroiden aus, in deren extrazellulären Umgebung aktive LOX im μM -Bereich detektierbar war. Die ermittelte Konzentration an LOX in der Darmtumor Umgebung diente fortan als Referenzmenge für einen biologischen Stimulus, mit dem eine systemische Veränderung einer responsiven Alginatmatrix untersucht werden sollte. Dem Prinzip der Stimulus-Responsivität folgend, dass eine Matrix durch einen definierten Reiz eine strukturelle Veränderung widerfährt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Abhängigkeit der LOX von Cu^{2+} -Ionen ausgenutzt. Im Detail bestimmt Kupfer die enzymatische Aktivität von LOX, in dem es durch drei spezifische Histidine koordiniert wird und dort die Bildung des Kofaktors Tyrosylchinon unterstützt (162). Aufgrund der Erkenntnis, dass sowohl LOX als auch Alginat in der Lage sind Cu^{2+} -Ionen zu chelatisieren, wurde Kupfer als entscheidender Faktor im Wechselspiel zwischen dem biologischen Stimulus LOX und der Alginatmatrix identifiziert. Das gemeinsame Vorliegen von Cu-stabilisierten Alginatgelen und LOX-Molekülen resultierte in der Destabilisierung der Alginatgele. Es besteht daher Grund zur Annahme, dass LOX eine höhere Affinität zum Kupfer als Alginat besitzt, dem Alginatnetzwerk das Kupfer entzieht und stabilere Komplexe mit Kupfer eingeht. Durch das Herauslösen der stabilisierenden Kupfer-Ionen aus dem Gelnetzwerk widerfährt dem Gel ein Übergang vom Gel- zum Sol-Zustand. Dieser LOX-induzierte Destabilisierungsprozess konnte experimentell sowohl durch die Reduktion mechanischer Stabilitäten anhand des Elastizitätsmoduls als auch durch das Freisetzen von Reportersubstanzen bestätigt werden. Als Reportersubstanzen wurden hochmolekulare FITC-Dextrane (150 kDa und 500 kDa) gewählt, die aufgrund ihrer Größe in dem porösen Gelnetzwerk immobilisiert vorlagen und nach Anregung ($\lambda_A = 492 \text{ nm}$) eine grüne Fluoreszenz emittierten. Eine vollständige Freisetzung der eingeschlossenen

Reportersubstanzen erfolgte bei Körpertemperatur (37 °C) binnen 90 min, mit einer Freisetzung von 20-40% an Substanz innerhalb der ersten 15 min. Experimentell konnte somit die Responsivität von Cu-Alginatmatrix auf das Zellsekret LOX nachgewiesen und damit einhergehend eine neuartige autonome Biogrenzfläche identifiziert werden, in der die Zelle einen Reiz aussendete, auf den das Material in Form einer Struktur- und Eigenschaftsänderung reagierte.

Als Folge dieser systemischen Wechselwirkung ließe sich potentiell der Status bzw. die Statusänderung einer Zelle anhand der Matrix-Antwort abbilden. Insbesondere in der Tumordiagnostik ist eine Anwendung denkbar. Bereits verfügbare Detektionsmethoden von Tumoren stellen sowohl bildgebende Verfahren wie Computertomografie, Positronen-Emissionen-Tomografie, Szintigrafie, Sonografie und Endoskopie als auch Laboruntersuchungen von Tumormarkern in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin dar. Mit Gewissheit kann bisher jedoch nur anhand Zell- und Gewebeproben bestimmt werden, ob ein verdächtiges Objekt Krebszellen enthält. Dies ist mit einer operativen Entnahme der Proben (Biopsie, Punktion) verbunden. Hingegen könnte der Einsatz von Kupfer-stabilisierten Alginatgelen potentiell eine lokale Detektion von Tumoren vor Ort anhand der direkten Tumorumgebung ermöglichen und als eine Alternative zu bestehenden, invasiven Diagnostikmethoden von Tumoren dienen. Der Nachweis von freigesetzter Reportersubstanz in physiologischen Proben wie Blut, Urin oder Stuhl mit Hilfe von spektroskopischen oder spektrometrischen Verfahren könnte dabei die Anwesenheit und Menge tumorspezifischer Produkte bzw. von Tumoren anzeigen. Insbesondere für das untersuchte Modellsystem des Darmkrebses, dessen Diagnose aufgrund spät auftretender Symptome oft erst in einem sehr späten Stadium erfolgt, birgt die Nutzung des Tumorsekrets LOX die Hoffnung Darmkrebs in einem früheren Stadium diagnostizieren und den Therapieerfolg steigern zu können. In zukünftigen Versuchen sollte neben der Wirksamkeit des Systems auch die Verträglichkeit untersucht werden. Zwar wird der Übergang der Kupfer-Ionen von der Alginatmatrix zu einem Chelat mit LOX angenommen, doch könnte der Kontakt von potentiell ungebundenem Kupfer mit Zellen möglicherweise nicht unkritisch sein (163).

Zusätzlich zum diagnostischen Einsatz der entwickelten Matrix ließe sich die LOX-induzierte Freisetzung von Substanzen zudem zur zielgerichteten Tumorthherapie nutzen. Die in Cu-Alginatgelen inkorporierten Tumorthapeutika würden durch die Anwesenheit von LOX lokal, d.h. innerhalb der Tumorumgebung, freigesetzt werden. Pharmazeutische Tumorthapeutika wie beispielweise Irinotecan ($M_w = 613 \text{ g/mol}$) würden aufgrund geringer

Molekülgrößen nicht im Alginatgelnetzwerk immobilisiert werden und daher die Matrix unspezifisch verlassen. Um die unkontrollierte Freisetzung niedermolekularer Therapeutika zu unterbinden, wurde ein zweistufiges Immobilisierungsverfahren entwickelt. Niedermolekulare Substanzen wie zum Beispiel Lumogen Rot ($M_w = 964 \text{ g/mol}$) wurden zunächst in PLGA-basierte Partikelsysteme verpackt und anschließend im Alginatgelnetzwerk immobilisiert. Ein entsprechender Nachweis/Erfolg dieser Immobilisierungsstrategie konnte über die rot emittierte Fluoreszenz von Lumogen Rot erbracht werden. Infolgedessen können Kupfer-Alginatgelstrukturen sowohl als Sensor für Tumorgewebe als auch als ein lokales Freisetzungssystem von Tumorthapeutika und -diagnostika dienen und somit ein Potential zur Diagnostik und Therapie von Tumoren innehaben (Abbildung 56).

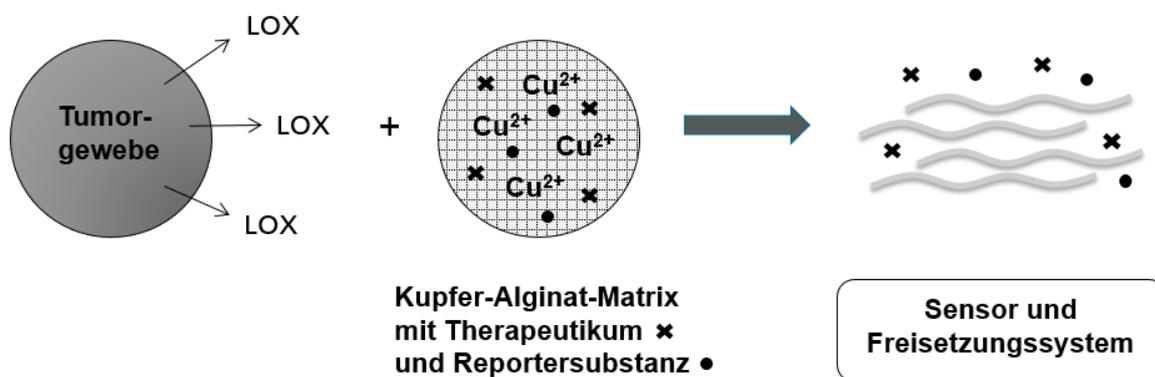


Abbildung 56: Schematische Darstellung des postulierten, Zell-responsiven Mechanismus einer Alginat-basierten Gelstruktur. Das von Tumoren sekretierte Enzym Lysyloxidase (LOX) destabilisiert Kupfer-vernetzte Alginatgelstrukturen und setzt infolgedessen die im Gel inkorporierten Tumor-Therapeutika und Reportersubstanz frei (117).

Am Modellsystem Darmkrebs wäre eine orale Gabe beladener Kupfer-Alginatgelstrukturen denkbar. Damit die Strukturen die sauren Bedingungen des Magens unbeschadet überstehen – Alginat kann durch saure Hydrolyse degradiert werden – bedarf es einer zusätzlichen/dritten Verkapselung in einer kommerziell etablierten, magenresistenten Hülle. Aufgrund dynamischer Bedingungen im Darmtrakt wurde darauf abgezielt die Verweildauer der Cu-Alginatgelstrukturen in der potentiellen Tumorregion zu erhöhen. In diesem Kontext gelang es die Alginatgele mit Chitosan zu beschichten, welches als ein mukoadhäsives Biopolymer bekannt ist und das nachweislich die Anheftung an der Darmschleimhaut fördern und damit das Verbleiben im Darmtrakt verlängern kann (164, 165). Durch körpereigene Lysozyme würde die Chitosan-Schicht degradiert und die LOX-responsive Alginatmatrix freigelegt werden. Um die gegebenenfalls freigesetzten Reportersubstanzen nachzuweisen, bieten sich

Blut, Urin und Stuhl als physiologische Proben an. Eine reduzierte Freisetzung der Reportersubstanz würde in der Theorie einen entsprechenden Therapieerfolg anzeigen.

Bisherige Freisetzungsstrategien verwendeten insbesondere Enzyme dazu die polymerischen Transportvehikel zu degradieren. Ein Patent von William M. Strauss von 2014 (166) beschreibt beispielsweise Stimulus-sensitive, Polyester-basierte Mikropartikel, die durch den Kontakt mit Enzymen durch die Spaltung der Polymerstruktur degradiert werden und zur Freisetzung führen. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht die Polymerstruktur abgebaut, sondern die quervernetzenden Kationen entzogen und derart eine System-Destabilisierung herbeigeführt, die die Freisetzung therapeutischer Substanzen zur Folge hat. Andere Freisetzungssysteme nutzen die Permeabilität/Porosität quervernetzter Polymersysteme zur Substanzfreisetzung aus. So wurde der Einsatz von Barium- oder Calcium- stabilisierten Alginaten zur Verabreichung von z.B. monoklonalen Antikörpern bei der Behandlung von Tumoren beschrieben (167). Zwar verursacht die diffusionsbasierte Freisetzung keine Matrixstabilisierung, jedoch wäre eine solche Freisetzung unspezifisch und mit relativ kurzen Freisetzungsdauern verbunden. Hingegen löst sich das in dieser Arbeit vorgelegte System spezifisch aufgrund des Tumorgewebeprodukts LOX lokal in der Tumorumgebung auf und setzt dort potentiell diagnostische Reportersubstanzen und therapeutische Agentien frei.

Auf den Ergebnissen aufbauend können zukünftig *in-vitro*-Untersuchungen sowohl im Modellsystem des mikrofluidischen Mukuschips als auch im Strömungskanal des Darmtumor-Modells stattfinden. Derart kann der Transfer der Analysen von statischen hin zu dynamischen Konditionen erfolgen. Aufgrund der Komplexität physiologischer Umgebungen bedarf es in einem weiteren Schritt erste Studien im Tiermodell, um zum einen die Wirksamkeit *in vivo* nachzuweisen und zum anderen Nebenreaktionen und somit falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Zwar liegen im Körper keine Enzyme vor, die Alginatmoleküle degradieren könnten (z.B. Alginasen), doch wären körpereigene Agentien zumindest denkbar, die konkurrierend zu LOX dem Alginatnetzwerk das Kupfer entziehen könnten.

Zusammenfassend war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, das Zell-Sekret LOX als neuartigen Stimulus im Kontext von Zell-Matrix Kontakten zu identifizieren und die Responsivität von Cu-Alginatmatrix auf das Zellsekret LOX nachzuweisen. Sowohl die Sekretion von LOX aus Tumorgewebe als auch die Destabilisierung der Alginatmatrix in Anwesenheit von LOX wurde demonstriert. Durch die strukturelle Änderung der

Alginate in Anwesenheit von LOX ließe sich der Status einer Zelle als Tumorzelle anzeigen und gleichzeitig therapeutische Agentien lokal freisetzen. Neben der Tumordiagnostik und -therapie liegen mit der Entwicklung von Krankheitsmodellen und Wirkstoff-Screenings weitere potentielle Anwendungsgebiete von LOX-responsiven Alginategelstrukturen vor, die in ihrer Gesamtheit vor allem die Forschungs- und Industriezweige des medizinischen und pharmazeutischen Sektors adressieren.

Abschließendes Fazit und Ausblick

Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen biologischen Systemen und Materialien birgt die Chance, biologische Prozesse gezielt zu steuern und moderne Zellkulturverfahren, Implantate und Analysemethoden zu ermöglichen. Die komplexe Biogrenzfläche wird dabei sowohl vom biologischen System, wie Zellen und Proteinen, als auch von der Beschaffenheit des Biomaterials beeinflusst. Wissenschaftliches Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionen zwischen humanen Zellen und Stimulus-responsiven Polymeren zu untersuchen, neue Erkenntnisse über den Einfluss der Chemie und Ladung von Materialoberflächen sowie den Einfluss von Zellsekreten auf Zell-Matrix Kontakte zu gewinnen und durch Implementierung optimierte Systeme und Methoden zu ermöglichen.

Mit Blick auf die vielseitigen Anforderungen an ein Materialsystem innerhalb der Zellumgebung konnten Alginatgelsysteme als geeignetes Biomaterial identifiziert, durch vergleichende Untersuchungen des Herstellungs- und Verarbeitungsprozesses standardisiert hergestellt und hinsichtlich einer Vielzahl an chemischen, physikalischen/physikochemischen und physiologischen Eigenschaften umfassend charakterisiert werden. Zusätzlich wurde der Gelierprozess von Alginaten auf Skalierbarkeit untersucht und eine Methodik zur Herstellung hochvolumiger Gele auf Basis von hochmolekularen Alginaten entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz einer porösen Gelmatrix und schwerlöslichen Calciumsulfats durch sukzessive Dissoziation in hochvolumige Alginategele resultiert, die transparent, viskoelastisch, unter physiologischen Bedingungen nicht-degradierbar, injizierbar und biokompatibel sind. Als potentielle Anwendung hochvolumiger Alginategele wurde neben der Gewebezüchtung insbesondere die Nutzung als Glaskörperersatz in der Augenheilkunde identifiziert und diskutiert.

Weiterführend wurden Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenchemie eines Materials auf die Wechselwirkungen mit Proteinen und humanen Zellen vergleichend an Carboxyl- und Phenol-Einheiten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Carboxyl-Gruppen der

nativen Alginatgeloberfläche aufgrund der negativen Ladung die Adhäsion humaner Zellen hemmen. Im Gegensatz dazu resultierte das Einführen endständiger Phenol-Einheiten in eine erhöhte Adsorption von Proteinen und Zelladhäsionsfördernde Wirkung. Die Bereitstellung von Phenolgruppen gelang über die Modifikation der Alginatgeloberfläche mit Tyramin unter Einsatz der Carbodiimid-Chemie. Aufgrund der erhöhten Benetzbarkeit, Oberflächenladung und Tyrosin-Interaktion wurde an Tyramin-Alginatgelen im Vergleich zu nativen Alginatgelen eine Adsorption von Proteinen erzielt, die die Adhäsionen humaner Stammzellen (MSCs und hiPSCs) erlaubte. Infolgedessen konnte durch die Kopplung von Phenol-Einheiten die zelladhäsionshemmenden Eigenschaften nativer Alginate überwunden und biokompatible, flexible Alginatmatrizen für die Kultivierung verankerungsabhängiger Zellen ermöglicht werden. Bemerkenswert ist zudem, dass Tyramin-funktionalisierte Alginatgelstrukturen eine nicht-kovalente, universelle Beschichtung mit Proteinen erlaubt, die in Bezug auf Proteintyp und -menge eingestellt werden kann. Vergleichbar mit dem Einsatz von zellkulturbehandelter Plastikware lässt sich durch direkte Inkubation verschiedenster Proteine eine Matrix-gebundene Proteinschicht für die Kultivierung verankerungsabhängiger Zellen herstellen.

Durch die Modifikation mit PAMAM konnten Untersuchungen zum Einfluss der Ladung einer Materialoberfläche auf Zell-Matrix Kontakte an einer Alginat-basierten Hydrogel-Plattform mit Zetapotentialen von -25 mV bis 15 mV durchgeführt werden. Der Effekt der Oberflächenladung einer Matrix auf die Adsorption von Proteinen sowie auf die Adhäsion, den Phänotyp und die Differenzierungsprozesse humaner Stammzellen wurde demonstriert. So gelang es in Abhängigkeit der Ladung einer Materialoberfläche zunächst die Quantität und Faltung von Matrix-adsorbierten Proteinen und infolgedessen die Besiedelung und Ausbreitung von MSCs zu beeinflussen. Dabei wurden Ladungsintervalle von 5-10 mV als besonders günstig für die Zelladhäsion identifiziert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass mit zunehmend positiv geladenen Materialoberflächen der Verlust des MSC-Phänotyps und die Induktion von Differenzierungsprozessen in Richtung Osteogenese und Adipogenese einhergeht. Die Erkenntnisse der vorgelegten Untersuchungen haben eine direkte Relevanz für das Verständnis und die Entwicklung moderner Zellkulturmodelle, Implantate und Analyseverfahren. So lässt sich zukünftig mit den in dieser Arbeit entwickelten Ansätzen gezielt das Verhalten humaner Zellen über definierte Ladungszustände des Materialsystems steuern. Neben humanen Stammzellen sind zukünftig auch weitergehende Untersuchungen zur Interaktion der etablierten Materialsysteme mit spezialisierten Zelltypen wie

Diskussion

beispielsweise Kardiomyozyten oder neuronalen Zellen hin zu neuartigen Zellkulturmodellen und deren Kryokonservierung vorstellbar.

Über den Ansatz des Material-induzierten Zellverhaltens hinausgehend wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem Untersuchungen zum Einfluss von Zellsekreten auf Zell-Matrix Kontakte durchgeführt. Es gelang LOX als Sekret von Tumorgewebe zu quantifizieren und als neuartigen Stimulus im Kontext von Zell-Matrix Kontakten zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass Kupfer-Alginatgele responsiv auf das Zellsekret LOX mit einer strukturellen Änderung des Gelnetzwerks in Form einer Destabilisierung durch Entzug der Kupferionen reagiert. Durch die Immobilisierung und LOX-induzierten Freisetzung von Therapeutika und Reportersubstanzen konnte das Potential von Kupfer-Alginatgelen als Biosensor und lokales Freisetzungssystem demonstriert werden. Mit Hilfe dieser offenbaren Zell-Matrix Kontakte ließe sich potentiell der Status bzw. die Statusänderung einer Zelle abbilden. Darauf aufbauend ist zukünftig ein neuartiger, Alginat-basierter Ansatz zur Diagnostik und Behandlung von Tumoren sowie die Entwicklung von Krankheitsmodellen und Wirkstoff-Screenings denkbar.

Nicht zuletzt offenbaren die vorliegenden Untersuchungen die Komplexität von Zell-Matrix Kontakten, zu dessen Verständnis und Nutzung diese Arbeit beiträgt.

6 Literatur

1. MURPHY, W.L., T.C. MCDEVITT und A.J. ENGLER. Materials as stem cell regulators. *Nature Materials*, 2014, **13**(6), 547. ISSN 1476-4660.
2. SCHAAP-OZIEMLAK, A.M., P.T. KÜHN, T.G. VAN KOOTEN und P. VAN RIJN. Biomaterial–stem cell interactions and their impact on stem cell response. *RSC Advances*, 2014, **4**(95), 53307-53320.
3. HOOKE, R. *Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses, with observations and inquiries thereupon*: Royal Society, 1665.
4. GEY, G.O., W.D. COFFMAN, M.T. KUBICEK. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*, 1952, **12**, 264-265. ISSN 0008-5472.
5. DISCHER, D.E., P. JANMEY und Y.-I. WANG. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 2005, **310**(5751), 1139-1143. ISSN 0036-8075.
6. DING, S. und P.G. SCHULTZ. A role for chemistry in stem cell biology. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(7), 833. ISSN 1546-1696.
7. URBAN, M.W. *Stimuli-Responsive Materials: From Molecules to Nature Mimicking Materials Design*: Royal Society of Chemistry, 2016. ISBN 9781849736565.
8. PULEO, D.A. und R. BIZIOS. *Biological interactions on materials surfaces: understanding and controlling protein, cell, and tissue responses*: Springer Science & Business Media, 2009. ISBN 0387981616.
9. PITTENGER, M.F., A.M. MACKAY, S.C. BECK, R.K. JAISWAL, R. DOUGLAS, J.D. MOSCA, M.A. MOORMAN, D.W. SIMONETTI, S. CRAIG und D.R. MARSHAK. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, **284**(5411), 143-147. ISSN 0036-8075.
10. LE BLANC, K., F. FRASSONI, L. BALL, F. LOCATELLI, H. ROELOFS, I. LEWIS, E. LANINO, B. SUNDBERG, M.E. BERNARDO und M. REMBERGER. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet*, 2008, **371**(9624), 1579-1586. ISSN 0140-6736.
11. LEE, K.Y. und D.J. MOONEY. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 2012, **37**(1), 106-126. ISSN 0079-6700.
12. ZIMMERMANN, H., F. WÄHLISCH, C. BAIER, M. WESTHOFF, R. REUSS, D. ZIMMERMANN, M. BEHRINGER, F. EHRHART, A. KATSEN-GLOBA und C. GIESE. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, 2007, **28**(7), 1327-1345. ISSN 0142-9612.
13. DUSSEAULT, J., S.K. TAM, M. MÉNARD, S. POLIZU, G. JOURDAN, L.'H. YAHIA und J.-P. HALLÉ. Evaluation of alginate purification methods: effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, **76**(2), 243-251.

Literatur

14. TAM, S.K., J. DUSSEAULT, S. POLIZU, M. MÉNARD und J.-P. HALLÉ. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials*, 2006, **27**(8), 1296-1305. ISSN 0142-9612.
15. GEPP, M.M., B. FISCHER, A. SCHULZ, J. DOBRINGER, L. GENTILE, J.A. VÁSQUEZ, J.C. NEUBAUER und H. ZIMMERMANN. Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells. *Journal of Applied Phycology*, 2017, **29**(5), 2451-2461. ISSN 0921-8971.
16. SCHULZ, A., A. KATSEN-GLOBA, E.J. HUBER, S.C. MUELLER, A. KREINER, N. PÜTZ, M.M. GEPP, B. FISCHER, F. STRACKE und H. von BRIESEN. Poly(amidoamine)-alginate hydrogels: directing the behavior of mesenchymal stem cells with charged hydrogel surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018, **29**(7), 105. ISSN 0957-4530.
17. ADERIBIGBE, B.A. und B. BUYANA. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*, 2018, **10**(2), 42.
18. SCHNEIDER, S., P.J. FEILEN, F. BRUNNENMEIER, T. MINNEMANN, H. ZIMMERMANN, U. ZIMMERMANN und M.M. WEBER. Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice. *Diabetes*, 2005, **54**(3), 687-693. ISSN 0012-1797.
19. ZIMMERMANN, H., S.G. SHIRLEY und U. ZIMMERMANN. Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. *Current Diabetes Reports*, 2007, **7**(4), 314-320. ISSN 1534-4827.
20. CABANE, E., X. ZHANG, K. LANGOWSKA, C.G. PALIVAN und W. MEIER. Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. *Biointerphases*, 2012, **7**(1), 9. ISSN 1934-8630.
21. GALLETTI, P.M. und J.W. BORETOS. Report on the Consensus Development Conference on "Clinical Applications of Biomaterials," 1–3 November 1983. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1983, **17**(3), 539-555. ISSN 0021-9304.
22. LANGER, R.S. und N.A. PEPPAS. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 1981, **2**(4), 201-214. ISSN 0142-9612.
23. LANGER, R. und N.A. PEPPAS. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal*, 2003, **49**(12), 2990-3006. ISSN 1547-5905.
24. WEN, J.H., L.G. VINCENT, A. FUHRMANN, Y.S. CHOI, K.C. HRIBAR, H. TAYLOR-WEINER, S. CHEN und A.J. ENGLER. Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nature Materials*, 2014, **13**(10), 979. ISSN 1476-4660.
25. BUXBOIM, A., K. RAJAGOPAL, B. ANDRE'EX und D.E. DISCHER. How deeply cells feel: methods for thin gels. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2010, **22**(19), 194116. ISSN 0953-8984.
26. PELHAM, R.J. und Y.-I. WANG. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, **94**(25), 13661-13665. ISSN 0027-8424.
27. FORTE, G., S. PAGLIARI, M. EBARA, K. UTO, J.K. VAN TAM, S. ROMANAZZO, C. ESCOBEDO-LUCEA, E. ROMANO, P. DI NARDO und E. TRAVERSA. Substrate stiffness

- modulates gene expression and phenotype in neonatal cardiomyocytes in vitro. *Tissue Engineering Part A*, 2012, **18**(17-18), 1837-1848. ISSN 1937-3341.
28. ENGLER, A.J., M.A. GRIFFIN, S. SEN, C.G. BÖNNEMANN, H.L. SWEENEY und D.E. DISCHER. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *Journal of Cell Biology*, 2004, **166**(6), 877-887.
 29. ROWLEY, J.A., G. MADLAMBAYAN und D.J. MOONEY. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 1999, **20**(1), 45-53. ISSN 0142-9612.
 30. BROWN, X.Q., K. OOKAWA und J.Y. WONG. Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response. *Biomaterials*, 2005, **26**(16), 3123-3129. ISSN 0142-9612.
 31. DELIGIANNI, D.D., N.D. KATSALA, P.G. KOUTSOUKOS und Y.F. MISSIRLIS. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 2000, **22**(1), 87-96. ISSN 0142-9612.
 32. HU, X., S.-H. PARK, E.S. GIL, X.-X. XIA, A.S. WEISS und D.L. KAPLAN. The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials*, 2011, **32**(34), 8979-8989. ISSN 0142-9612.
 33. VAGASKÁ, B., L. BAČÁKOVÁ, E. FILOVAÁ und K. BALÍK. Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological Research*, 2010, **59**(3). ISSN 0862-8408.
 34. LAMPIN, M., R. WAROCQUIER-CLÉROUT, C. LEGRIS, M. DEGRANGE und M.F. SIGOT-LUIZARD. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, **36**(1), 99-108. ISSN 0021-9304.
 35. MALDONADO-CODINA, C. und P.B. MORGAN. In vitro water wettability of silicone hydrogel contact lenses determined using the sessile drop and captive bubble techniques. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, **83**(2), 496-502.
 36. HAO, L., H. YANG, C. DU, X. FU, N. ZHAO, S. XU, F. CUI, C. MAO und Y. WANG. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl–methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, **2**(30), 4794-4801.
 37. JUNG, H., B. KWAK, H.S. YANG, G. TAE, J.-S. KIM und K. SHIN. Attachment of cells to poly (styrene-co-acrylic acid) thin films with various charge densities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008, **313**, 562-566. ISSN 0927-7757.
 38. ROSA, M. de, M. CARTENI, O. PETILLO, A. CALARCO, S. MARGARUCCI, F. ROSSO, A. de ROSA, E. FARINA, P. GRIPPO und G. PELUSO. Cationic polyelectrolyte hydrogel fosters fibroblast spreading, proliferation, and extracellular matrix production: Implications for tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 2004, **198**(1), 133-143. ISSN 0021-9541.
 39. CHANG, H.-Y., W.-L. KAO, Y.-W. YOU, Y.-H. CHU, K.-J. CHU, P.-J. CHEN, C.-Y. WU, Y.-H. LEE und J.-J. SHYUE. Effect of surface potential on epithelial cell adhesion, proliferation and morphology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, **141**, 179-186. ISSN 0927-7765.

Literatur

40. SCHNEIDER, G.B., A. ENGLISH, M. ABRAHAM, R. ZAHARIAS, C. STANFORD und J. KELLER. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials*, 2004, **25**(15), 3023-3028. ISSN 0142-9612.
41. TAN, F., J. LIU, M. LIU und J. WANG. Charge density is more important than charge polarity in enhancing osteoblast-like cell attachment on poly (ethylene glycol)-diacrylate hydrogel. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, **76**, 330-339. ISSN 0928-4931.
42. LUCA, I. de, A. DI SALLE, N. ALESSIO, S. MARGARUCCI, M. SIMEONE, U. GALDERISI, A. CALARCO und G. PELUSO. Positively charged polymers modulate the fate of human mesenchymal stromal cells via ephrinB2/EphB4 signaling. *Stem Cell Research*, 2016, **17**(2), 248-255. ISSN 1873-5061.
43. LIU, Z.-M., Q. GU, Z.-K. XU und T. GROTH. Synergistic effect of polyelectrolyte multilayers and osteogenic growth medium on differentiation of human mesenchymal stem cells. *Macromolecular Bioscience*, 2010, **10**(9), 1043-1054. ISSN 1616-5187.
44. TAN, F., X. XU, T. DENG, M. YIN, X. ZHANG und J. WANG. Fabrication of positively charged poly (ethylene glycol)-diacrylate hydrogel as a bone tissue engineering scaffold. *Biomedical Materials*, 2012, **7**(5), 55009. ISSN 1748-605X.
45. ZHANG, W., N. LIU, H. SHI, J. LIU, L. SHI, B. ZHANG, H. WANG, J. JI und P.K. CHU. Upregulation of BMSCs osteogenesis by positively-charged tertiary amines on polymeric implants via charge/iNOS signaling pathway. *Scientific reports*, 2015, **5**, 9369. ISSN 2045-2322.
46. DRAGET, K.I., O. SMIDSRØD und G. SKJÅK-BRÆK. Alginates from algae. *Biopolymers Online: Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*, 2005, **6**.
47. ZIMMERMANN, U. und M. BEHRINGER. Verfahren Zur Gewinnung Hochgereinigter Alginate. *EP1109837*, 1999.
48. ZIMMERMANN, H. Sample collection kit and method for collecting plant samples, in particular algae samples, 2019.
49. REHM, B.H.A. und S. VALLA. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, **48**(3), 281-288. ISSN 0175-7598.
50. REHM, B.H.A. *Alginates: Biology and Applications*: Springer, 2009. ISBN 3540926798.
51. KANAMALA, M., W.R. WILSON, M. YANG, B.D. PALMER und Z. WU. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: a review. *Biomaterials*, 2016, **85**, 152-167. ISSN 0142-9612.
52. GOMEZ, C.G., M. RINAUDO und M.A. VILLAR. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 2007, **67**(3), 296-304. ISSN 0144-8617.
53. HE, S., M. ZHANG, Z. GENG, Y. YIN und K. YAO. Preparation and characterization of partially oxidized sodium alginate. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2005, **22**(9), 1007. ISSN 1000-0518.

54. RONGHUA, H., DU YUMIN und Y. JIANHONG. Preparation and in vitro anticoagulant activities of alginate sulfate and its quaterized derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 2003, **52**(1), 19-24. ISSN 0144-8617.
55. FREEMAN, I., A. KEDEM und S. COHEN. The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins. *Biomaterials*, 2008, **29**(22), 3260-3268. ISSN 0142-9612.
56. SEN, G., R.P. SINGH und S. PAL. Microwave-initiated synthesis of polyacrylamide grafted sodium alginate: Synthesis and characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, **115**(1), 63-71. ISSN 0021-8995.
57. ARLOV, Ø., F.L. AACHMANN, A. SUNDAN, T. ESPEVIK und G. SKJÅK-BRÆK. Heparin-like properties of sulfated alginates with defined sequences and sulfation degrees. *Biomacromolecules*, 2014, **15**(7), 2744-2750. ISSN 1525-7797.
58. SALISU, A., A.A. NAIM und M.M. SANAGI. Chemical Modification of Marine Polysaccharide (Alginate) By Free-Radical Graft Copolymerization—a Short Review. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 2013, **4**(3), 39-44.
59. LEONARD, M., M.R. de BOISSESON, P. HUBERT, F. DALENCON und E. DELLACHERIE. Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties. *Journal of Controlled Release*, 2004, **98**(3), 395-405. ISSN 0168-3659.
60. TJI, N. The degradation of alginates at different pH values. *Acta Chem. Scand*, 1963, **17**(5), 538.
61. WASIKIEWICZ, J.M., F. YOSHII, N. NAGASAWA, R.A. WACH und H. MITOMO. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiation Physics and Chemistry*, 2005, **73**(5), 287-295. ISSN 0969-806X.
62. KIM, H.S., C.-G. LEE und E.Y. LEE. Alginate lyase: structure, property, and application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2011, **16**(5), 843. ISSN 1226-8372.
63. SCHNEIDER, S., P.J. FEILEN, O. KRAUS, T. HAASE, T.A. SAGBAN, H.-A. LEHR, J. BEYER, R. POMMERSHEIM und M.M. WEBER. Biocompatibility of alginates for grafting: impact of alginate molecular weight. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2003, **31**(4), 383-394. ISSN 1073-1199.
64. TØNNESEN, H.H. und J. KARLSEN. Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2002, **28**(6), 621-630. ISSN 0363-9045.
65. BALAKRISHNAN, B., M. MOHANTY, P.R. UMASHANKAR und A. JAYAKRISHNAN. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials*, 2005, **26**(32), 6335-6342. ISSN 0142-9612.
66. PAUL, W. und C.P. SHARMA. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 2004, **18**(1), 18-23.
67. VAN VLIERBERGHE, S., P. DUBRUEL und E. SCHACHT. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*, 2011, **12**(5), 1387-1408. ISSN 1525-7797.

Literatur

68. SUN, J. und H. TAN. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*, 2013, **6**(4), 1285-1309.
69. BARTIS, D. und J. PONGRÁČZ. *Three dimensional tissue cultures and tissue engineering*: University of Pécs, 2011. 15.
70. HIRSH, S.L., D.R. MCKENZIE, N.J. NOSWORTHY, J.A. DENMAN, O.U. SEZERMAN und M.M.M. BILEK. The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013, **103**, 395-404. ISSN 0927-7765.
71. WEI, Q., T. BECHERER, S. ANGIOLETTI-UBERTI, J. DZUBIELLA, C. WISCHKE, A.T. NEFFE, A. LENDLEIN, M. BALLAUFF und R. HAAG. Protein interactions with polymer coatings and biomaterials. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53**(31), 8004-8031. ISSN 1433-7851.
72. DEE, K.C., D.A. PULEO und R. BIZIOS. Protein-surface interactions. *An introduction to tissue-biomaterial interactions*. John Wiley, 2002, 37-52.
73. ARIMA, Y. und H. IWATA. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials*, 2007, **28**(20), 3074-3082. ISSN 0142-9612.
74. TANG, L., P. THEVENOT und W. HU. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, **8**(4), 270-280. ISSN 1568-0266.
75. RECHENDORFF, K., M.B. HOVGAARD, M. FOSS, V.P. ZHDANOV und F. BESENBACHER. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*, 2006, **22**(26), 10885-10888. ISSN 0743-7463.
76. PIERSCHBACHER, M.D. und E. RUOSLAHTI. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 1984, **309**(5963), 30. ISSN 1476-4687.
77. BELLIS, S.L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 2011, **32**(18), 4205-4210. ISSN 0142-9612.
78. GEIGER, B., J.P. SPATZ und A.D. BERSHADSKY. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, **10**(1), 21. ISSN 1471-0080.
79. FREEMAN, S., J.C. SHARP und M. HARRINGTON. *Biological science*: Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2002. ISBN 0130093386.
80. VENTRE, M., F. CAUSA und P.A. NETTI. Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *Journal of the Royal Society Interface*, 2012, **9**(74), 2017-2032. ISSN 1742-5689.
81. DHOWRE, H.S., S. RAJPUT, N.A. RUSSELL und M. ZELZER. Responsive cell-material interfaces. *Nanomedicine*, 2015, **10**(5), 849-871. ISSN 1743-5889.
82. KIM, S.-H., J. TURNBULL und S. GUIMOND. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *The Journal of Endocrinology*, 2011, **209**(2), 139-151. ISSN 0022-0795.

83. KIELTY, C.M., M.J. SHERRATT und C.A. SHUTTLEWORTH. Elastic fibres. *Journal of Cell Science*, 2002, **115**(14), 2817-2828. ISSN 0021-9533.
84. FRIEDENSTEIN, A.J., PIATETZKY-SHAPIRO, II und K.V. PETRAKOVA. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*, 1966, **16**(3), 381-390. ISSN 0950-1991.
85. WEI, X., X. YANG, Z.-p. HAN, F.-f. QU, L. SHAO und Y.-f. SHI. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013, **34**(6), 747-754. ISSN 1745-7254.
86. UCCELLI, A., L. MORETTA und V. PISTOIA. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 2008, **8**(9), 726. ISSN 1474-1741.
87. KOLF, C.M., E. CHO und R.S. TUAN. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research and Therapy*, 2007, **9**(1), 204. ISSN 1478-6354.
88. AGGARWAL, S. und M.F. PITTENGER. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, **105**(4), 1815-1822. ISSN 0006-4971.
89. SOHNI, A. und C.M. VERFAILLIE. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells International*, 2013, **2013**. ISSN 1687-966X.
90. BIANCO, P., X. CAO, P.S. FRENETTE, J.J. MAO, P.G. ROBEY, P.J. SIMMONS und C.-Y. WANG. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nature Medicine*, 2013, **19**(1), 35. ISSN 1546-170X.
91. PEVSNER-FISCHER, M., S. LEVIN und D. ZIPORI. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2011, **7**(3), 560-568. ISSN 1550-8943.
92. DOMINICI, M., K. LE BLANC, I. MUELLER, I. SLAPER-CORTENBACH, F.C. MARINI, D.S. KRAUSE, R.J. DEANS, A. KEATING, D.J. PROCKOP und E.M. HORWITZ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, **8**(4), 315-317. ISSN 1465-3249.
93. TAKAHASHI, K. und S. YAMANAKA. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, **126**(4), 663-676. ISSN 0092-8674.
94. BAKER, D.E.C., N.J. HARRISON, E. MALTBY, K. SMITH, H.D. MOORE, P.J. SHAW, P.R. HEATH, H. HOLDEN und P.W. ANDREWS. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nature Biotechnology*, 2007, **25**(2), 207. ISSN 1546-1696.
95. CUNHA-VAZ, J., R. BERNARDES und C. LOBO. Blood-retinal barrier. *European Journal of Ophthalmology*, 2011, **21**(6), 3-9. ISSN 1120-6721.
96. SEAGLE, B.-L.L., K.A. REZAI, Y. KOBORI, E.M. GASZYNA, K.A. REZAEI und J.R. NORRIS. Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, **102**(25), 8978-8983. ISSN 0027-8424.
97. SPARRROW, J., D. HICKS und C. P HAMEL. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current Molecular Medicine*, 2010, **10**(9), 802-823. ISSN 1566-5240.

Literatur

98. JAGER, R.D., W.F. MIELER und J.W. MILLER. Age-related macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, 2008, **358**(24), 2606-2617. ISSN 0028-4793.
99. BINDER, S., B.V. STANZEL, I. KREBS und C. GLITTENBERG. Transplantation of the RPE in AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2007, **26**(5), 516-554. ISSN 1350-9462.
100. SHARMA, R., V. KHRISTOV, A. RISING, B.S. JHA, R. DEJENE, N. HOTALING, Y. LI, J. STODDARD, C. STANKEWICZ und Q. WAN. Clinical-grade stem cell–derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Science Translational Medicine*, 2019, **11**(475). ISSN 1946-6234.
101. DUNN, K.C., A.E. AOTAKI-KEEN, F.R. PUTKEY und L.M. HJELMELAND. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*, 1996, **62**(2), 155-170. ISSN 0014-4835.
102. ZHU, W., Y. WU, Y.-F. MENG, J.-Y. WANG, M. XU, J.-J. TAO und J. LU. Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015, **9**, 5337.
103. SANTHANAM, S., J. LIANG, J. STRUCKHOFF, P.D. HAMILTON und N. RAVI. Biomimetic hydrogel with tunable mechanical properties for vitreous substitutes. *Acta Biomaterialia*, 2016, **43**, 327-337. ISSN 1742-7061.
104. SCHULZ, A., M.M. GEPP, F. STRACKE, H. von BRIESEN, J.C. NEUBAUER und H. ZIMMERMANN. Tyramine-conjugated alginate hydrogels as a platform for bioactive scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2019, **107**(1), 114-121.
105. SCHEPER, V., A. HOFFMANN, M. GEPP, A. SCHULZ, A. HAMM, C. PANNIER, P. HUBKA, T. LENARZ und J. SCHWIEGER. Stem Cell Based Drug Delivery for Protection of Auditory Neurons in a Guinea Pig Model of Cochlear Implantation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2019, **13**, 177. ISSN 1662-5102.
106. SCHULZ, A., S. WAHL, A. RICKMANN, J. LUDWIG, B.V. STANZEL, H. von BRIESEN und P. SZURMAN. Age-Related Loss of Human Vitreal Viscoelasticity. *Translational Vision Science & Technology*, 2019, **8**(3), 56. ISSN 2164-2591.
107. DOBRINGER, J. , P. GESSNER, A. SCHULZ, M.M. GEPP, S.C. MUELLER, R. GESSNER, J.C. NEUBAUER, J.A. VASQUEZ , H. ZIMMERMANN. Improved harvesting and processing of brown seaweeds for the extraction of biomedical grade alginates: high defined biopolymer production ‚from beach to bench‘, 2019, In Vorbereitung.
108. ZIMMERMANN, H., D. ZIMMERMANN, R. REUSS, P.J. FEILEN, B. MANZ, A. KATSEN, M. WEBER, F.R. IHMIG, F. EHRHART und P. GESSNER. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, **16**(6), 491-501. ISSN 0957-4530.
109. SCHRAMM, C., M.S. SPITZER, S. HENKE-FAHLE, G. STEINMETZ, K. JANUSCHOWSKI, P. HEIDUSCHKA, J. GEIS-GERSTORFER, T. BIEDERMANN, K.U. BARTZ-SCHMIDT und P. SZURMAN. The cross-linked biopolymer hyaluronic acid as an artificial vitreous substitute. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2012, **53**(2), 613-621. ISSN 1552-5783.
110. HARALICK, R.M. und K. SHANMUGAM. Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 1973, (6), 610-621. ISSN 0018-9472.

111. ABRÀMOFF, M.D., P.J. MAGALHÃES und S.J. RAM. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 2004, **11**(7), 36-42. ISSN 1081-8693.
112. KATSEN-GLOBA, A., L. PETER, S. ZÖLLNER, T. DÖRGE, M. DAFFERTSHOFER, H. PRECKEL, D. SCHMITT und H. ZIMMERMANN. A novel approach for automated analysis of cell attachment and spreading based on backscattered electron imaging by scanning electron microscopy. *Materials*, 2009, **2**(3), 1402-1416.
113. KATSEN-GLOBA, A., I. MEISER, Y.A. PETRENKO, R.V. IVANOV, V.I. LOZINSKY, H. ZIMMERMANN und A.Y. PETRENKO. Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate–gelatin cryogel scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2014, **25**(3), 857-871. ISSN 0957-4530.
114. KATSEN-GLOBA, A., N. PUETZ, M.M. GEPP, J.C. NEUBAUER und H. ZIMMERMANN. Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying. *Scanning*, 2016, **38**(6), 625-633. ISSN 0161-0457.
115. MEISER, I., J. MAJER, A. KATSEN-GLOBA, A. SCHULZ, J.C. NEUBAUER und H. ZIMMERMANN. Droplet-based vitrification of adherent human induced pluripotent stem cells and the influence of microcarrier elasticity, 2019, In Vorbereitung.
116. SCHWIEGER, J., A. HAMM, M.M. GEPP, A. SCHULZ, J.C. NEUBAUER, A. HOFFMANN, T. LENARZ, V. SCHEPER. BDNF-overexpressing mesenchymal stem cells encapsulated in UHV-alginate protect auditory neurons from degeneration in co-culture and are not affected by electrical stimulation mimicking the cochlea implant. *Journal of Tissue Engineering*, 2020, Zur Publikation akzeptiert.
117. Selektives Freisetzungssystem für Tumortherapeutika und Tumordiagnostika sowie Biosensor für Tumorgewebe. Erfinder: Zimmermann, H., H. von Briesen, A. Schulz, L. Elberskirch, S. Wagner, B. Fischer. WO/2018/141555.
118. CHAN, L.W., H.Y. LEE und P.W.S. HENG. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 2006, **63**(2), 176-187. ISSN 0144-8617.
119. QUONG, D., R.J. NEUFELD, G. SKJÅK-BRÆK und D. PONCELET. External versus internal source of calcium during the gelation of alginate beads for DNA encapsulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **57**(4), 438-446. ISSN 0006-3592.
120. KAKLAMANI, G., D. CHENELER, L.M. GROVER, M.J. ADAMS und J. BOWEN. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014, **36**, 135-142. ISSN 1751-6161.
121. MARUOKA, S., T. MATSUURA, K. KAWASAKI, M. OKAMOTO, H. YOSHIKI, M. KODAMA, M. SUGIYAMA und M. ANNAKA. Biocompatibility of polyvinylalcohol gel as a vitreous substitute. *Current Eye Research*, 2006, **31**(7-8), 599-606. ISSN 0271-3683.
122. SEBAG, J. *Vitreous: in Health and Disease*: Springer, 2014. ISBN 1493910868.
123. SEBAG, J. Age-related changes in human vitreous structure. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 1987, **225**(2), 89-93. ISSN 0721-832X.

Literatur

124. SEBAG, J. Ageing of the vitreous. *Eye*, 1987, **1**(2), 254. ISSN 1476-5454.
125. SZURMAN, P. Vitreous Substitute in Retinal Detachment Surgery-Why We Need a New Tamponade Strategy. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 2017, **234**(9), 1094-1102. ISSN 0023-2165.
126. SCHOLDA, C., S. EGGER, A. LAKITS, K. WALCH, E. von ECKARDSTEIN und R. BIEWSKI. Retinal detachment after silicone oil removal. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 2000, **78**(2), 182-186. ISSN 1395-3907.
127. SU, X., M.J. TAN, Z. LI, M. WONG, L. RAJAMANI, G. LINGAM und X.J. LOH. Recent progress in using biomaterials as vitreous substitutes. *Biomacromolecules*, 2015, **16**(10), 3093-3102. ISSN 1525-7797.
128. SWINDLE, K.E. und N. RAVI. Recent advances in polymeric vitreous substitutes. *Expert Review of Ophthalmology*, 2007, **2**(2), 255-265. ISSN 1746-9899.
129. ANNAKA, M., K. MORTENSEN, M.E. VIGILD, T. MATSUURA, S. TSUJI, T. UEDA und H. TSUJINAKA. Design of an injectable in situ gelation biomaterials for vitreous substitute. *Biomacromolecules*, 2011, **12**(11), 4011-4021. ISSN 1525-7797.
130. JIANG, X., Y. PENG, C. YANG, W. LIU und B. HAN. The feasibility study of an in situ marine polysaccharide-based hydrogel as the vitreous substitute. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2018, **106**(7), 1997-2006.
131. DI HUANG, Y.-S. CHEN, Q. XU, J. HANES und I.D. RUPENTHAL. Effects of enzymatic degradation on dynamic mechanical properties of the vitreous and intravitreal nanoparticle mobility. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, **118**, 124-133. ISSN 0928-0987.
132. KLEINBERG, T.T., R.T. TZEKOV, L. STEIN, N. RAVI und S. KAUSHAL. Vitreous substitutes: a comprehensive review. *Survey of Ophthalmology*, 2011, **56**(4), 300-323. ISSN 0039-6257.
133. RYAN, J.A. Evolution of cell culture surfaces. *BioFiles*, 2008, **3**(8), 21.
134. VASHI, A.V., J. AM RAMSHAW, V. GLATTAUER, C.M. ELVIN, R.E. LYONS und J.A. WERKMEISTER. Controlled surface modification of tissue culture polystyrene for selective cell binding using resilin-inspired polypeptides. *Biofabrication*, 2013, **5**(3), 35005. ISSN 1758-5090.
135. ALSBERG, E., K.W. ANDERSON, A. ALBEIRUTI, R.T. FRANCESCHI und D.J. MOONEY. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *Journal of Dental Research*, 2001, **80**(11), 2025-2029. ISSN 0022-0345.
136. GRIGORE, A., B. SARKER, B. FABRY, A.R. BOCCACCINI und R. DETSCH. Behavior of encapsulated MG-63 cells in RGD and gelatine-modified alginate hydrogels. *Tissue Engineering Part A*, 2014, **20**(15-16), 2140-2150. ISSN 1937-3341.
137. DHOOT, N.O., C.A. TOBIAS, I. FISCHER und M.A. WHEATLEY. Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, **71**(2), 191-200.

138. ORAL, I., H. GUZEL und G. AHMETLI. Measuring the Young's modulus of polystyrene-based composites by tensile test and pulse-echo method. *Polymer Bulletin*, 2011, **67**(9), 1893-1906. ISSN 0170-0839.
139. NAVA, A., E. MAZZA, M. FURRER, P. VILLIGER und W.H. REINHART. In vivo mechanical characterization of human liver. *Medical Image Analysis*, 2008, **12**(2), 203-216. ISSN 1361-8415.
140. GROVER, C.N., R.E. CAMERON und S.M. BEST. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012, **10**, 62-74. ISSN 1751-6161.
141. LEE, H., S.M. DELLATORE, W.M. MILLER und P.B. MESSERSMITH. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science*, 2007, **318**(5849), 426-430. ISSN 0036-8075.
142. KU, S.H. und C.B. PARK. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 2010, **31**(36), 9431-9437. ISSN 0142-9612.
143. SINGH, P., U. GUPTA, A. ASTHANA und N.K. JAIN. Folate and folate- PEG- PAMAM Dendrimers: synthesis, characterization, and targeted anticancer drug delivery potential in tumor bearing mice. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, **19**(11), 2239-2252. ISSN 1043-1802.
144. LUO, D., K. HAVERSTICK, N. BELCHEVA, E. HAN und W.M. SALTZMAN. Poly (ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. *Macromolecules*, 2002, **35**(9), 3456-3462. ISSN 0024-9297.
145. LAUFFENBURGER, D.A. und A.F. HORWITZ. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 1996, **84**(3), 359-369. ISSN 0092-8674.
146. TONÉ, S., K. SUGIMOTO, K. TANDA, T. SUDA, K. UEHIRA, H. KANOUCI, K. SAMEJIMA, Y. MINATOGAWA und W.C. EARNSHAW. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Experimental Cell Research*, 2007, **313**(16), 3635-3644. ISSN 0014-4827.
147. HAMIDOUCHE, Z., O. FROMIGUÉ, J. RINGE, T. HÄUPL, P. VAUDIN, J.-C. PAGÈS, S. SROUJI, E. LIVNE und P.J. MARIE. Priming integrin $\alpha 5$ promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, **106**(44), 18587-18591. ISSN 0027-8424.
148. WANG, Y. und H.S. SUL. Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metabolism*, 2009, **9**(3), 287-302. ISSN 1550-4131.
149. CHEN, H., X. HUANG, M. ZHANG, F. DAMANIK, M.B. BAKER, A. LEFERINK, H. YUAN, R. TRUCKENMÜLLER, C. VAN BLITTERSWIJK und L. MORONI. Tailoring surface nanoroughness of electrospun scaffolds for skeletal tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2017, **59**, 82-93. ISSN 1742-7061.
150. LIN, H.-Y., C.-C. TSAI, L.-L. CHEN, S.-H. CHIOU, Y.-J. WANG und S.-C. HUNG. Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin

Literatur

- producing cells through activating Akt and ERK. *Journal of Biomedical Science*, 2010, **17**(1), 56. ISSN 1423-0127.
151. SINGH, P. und J.E. SCHWARZBAUER. Fibronectin and stem cell differentiation—lessons from chondrogenesis. *Journal of Cell Science*, 2012, **125**(16), 3703-3712. ISSN 0021-9533.
152. SALASZNYK, R.M., W.A. WILLIAMS, A. BOSKEY, A. BATORSKY und G.E. PLOPPER. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *BioMed Research International*, 2004, **2004**(1), 24-34. ISSN 2314-6133.
153. BAWA, P., V. PILLAY, Y.E. CHOONARA und L.C. DU TOIT. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomedical Materials*, 2009, **4**(2), 22001. ISSN 1748-605X.
154. MIYATA, T., N. ASAMI und T. URAGAMI. A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature*, 1999, **399**(6738), 766. ISSN 1476-4687.
155. COX, T.R., A. GARTLAND und J.T. ERLER. Lysyl oxidase, a targetable secreted molecule involved in cancer metastasis. *Cancer Research*, 2016, **76**(2), 188-192. ISSN 0008-5472.
156. FINGER, E.C. und A.J. GIACCIA. Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2010, **29**(2), 285-293. ISSN 0167-7659.
157. NISHIOKA, T., A. EUSTACE und C. WEST. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Structure and Function*, 2012, **37**(1), 75-80. ISSN 0386-7196.
158. PEINADO, H., D. OLMEDA, K. CSISZAR, K.S.K. FONG, S. VEGA, M.A. NIETO, A. CANO und F. PORTILLO. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *The EMBO journal*, 2005, **24**(19), 3446-3458. ISSN 1460-2075.
159. AKIRI, G., E. SABO, H. DAFNI, Z. VADASZ, Y. KARTVELISHVILY, N. GAN, O. KESSLER, T. COHEN, M. RESNICK und M. NEEMAN. Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Research*, 2003, **63**(7), 1657-1666. ISSN 0008-5472.
160. ERLER, J.T., K.L. BENNEWITH, M. NICOLAU, N. DORNHÖFER, C. KONG, Q.-T. LE, J.-T.A. CHI, S.S. JEFFREY und A.J. GIACCIA. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006, **440**(7088), 1222. ISSN 1476-4687.
161. SHANLEY, C.J., M. GHARAEE-KERMANI, R. SARKAR, T.H. WELLING, A. KRIEGEL, J.W. FORD, J.C. STANLEY und S.H. PHAN. Transforming growth factor- β 1 increases lysyl oxidase enzyme activity and mRNA in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery*, 1997, **25**(3), 446-452. ISSN 0741-5214.
162. LOPEZ, K.M. und F.T. GREENAWAY. Identification of the copper-binding ligands of lysyl oxidase. *Journal of Neural Transmission*, 2011, **118**(7), 1101-1109. ISSN 0300-9564.
163. INGLE, A.P., N. DURAN und M. RAI. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, **98**(3), 1001-1009. ISSN 0175-7598.

164. SOGIAS, I.A., A.C. WILLIAMS und V.V. KHUTORYANSKIY. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 2008, **9**(7), 1837-1842. ISSN 1525-7797.
165. WAYS, M., T. MOHAMMED, W.M. LAU und V.V. KHUTORYANSKIY. Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymers*, 2018, **10**(3), 267.
166. Stimulus-sensitive microparticles and methods of use. Erfinder: W. M. STRAUSS. Anmeldung: 27. September 2013. US9988686B2.
167. Vorrichtung und Verfahren zur Herstellung von Mikrokapseln sowie verbesserte Mikrokapsel. Erfinder: Zimmermann U. und H. Zimmermann. Anmeldung: 13. Dezember 2002. WO2003064514A1.

7 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann, geschäftsführender Institutsleiter des Fraunhofer IBMT, für die Überlassung des interessanten Themas und seine fortwährende Unterstützung. Seine stetige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, seine konstruktive Kritik und Ideen sowie seine didaktische Kompetenz haben die vorliegende Arbeit maßgeblich bereichert und für das Gelingen beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Gerhard Wenz, Lehrstuhlinhaber für Organische Makromolekulare Chemie an der Universität des Saarlandes, bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Hagen von Briesen, Frau Dr. Julia Neubauer und Herrn Dr. Frank Stracke für die fachliche Unterstützung und die zahlreichen, anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Julio Vasquez und Johanne Dobringer von der Universidad Católica del Norte (Chile) sowie Petra und Roland Gessner von der Firma Alginatec danke ich für die Unterstützung bei der Gewinnung und Prozessierung von Alginat in Chile.

Herrn Dr. Josef Zapp vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität des Saarlandes danke ich für die Vermessung und Interpretation von Alginatproben mittels NMR-Spektroskopie.

Herrn Prof. Dr. Peter Szurman, Frau Dr. Annekathrin Rickmann und Frau Dr. Silke Wahl von der Augenklinik Sulzbach des Knappschaftsklinikums Saar danke ich für die anregenden Diskussionen ophthalmologischer Fragestellungen und die Bereitstellung primärer Glaskörpergewebe.

Herrn Dr. Michael M. Gepp danke ich für die zielführenden, wissenschaftlichen Diskussionen zur Funktionalisierung von Alginat mit Tyramin und für die Beurteilung der Oberflächenrauigkeiten von REM-Proben.

Frau Dr. Alisa Katsen-Globa danke ich für die Präparation, Aufnahme und Diskussion der REM-Proben.

Frau M.Sc. Esther Jaqueline Huber danke ich für die Zuarbeit zur Untersuchung von PAMAM-Alginaten im Rahmen ihrer Masterarbeit.

Frau Dr. Sabine C. Müller danke ich für die statistische Aufarbeitung der qPCR-Daten. Herrn M.Sc. Asger Kreiner danke ich für die Aufnahme und Interpretation der Raman-Proben. Frau M.Sc. Anna Martina Gebler danke ich für die Untersuchung der Kultivierungsbedingungen induziert pluripotenter Stammzellen auf Tyramin-modifizierten Alginat-Mikroträgern. Frau M.Sc. Linda Elberskirch danke ich für die Kultivierung von Tumorsphäroiden. Herrn Dr. Markus Langer und Frau M.Sc. Wencke Lubojanski danke ich für die Unterstützung statistischer Sachverhalte.

Der gesamten Abteilung Kryo- & Stammzelltechnologie sowie den Kollegen weiterer Abteilungen des Fraunhofer IBMT danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft.

Ich danke meiner Familie, sowie Wencke und Rasmus Lubojanski für die andauernde, liebevolle Unterstützung während der letzten Jahre.

Publikationen

Wissenschaftliche Originalarbeiten in referierten Fachzeitschriften (peer-reviewed)

1. Fischer B, **Schulz A**, Gepp MM, Neubauer JC, Gentile Luca, Zimmermann H (2016): 3D printing of hydrogels in a temperature controlled environment with high spatial resolution. *Current Directions in Biomedical Engineering*, 2(1): 109-112.
DOI: 10.1515/cdbme-2016-0027
2. Gepp MM, Fischer B, **Schulz A**, Dobringer J, Vásquez JA, Gentile L, Neubauer JC, Zimmermann H (2017): Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells. *J. Appl. Phycol.*, 29(5): 2451-2461.
DOI: 10.1007/s10811-017-1130-6
3. **Schulz A**, Katsen-Globa A, Huber EJ, Mueller SC, Kreiner A, Pütz N, Gepp MM, Fischer B, Stracke F, von Briesen H, Neubauer JC, Zimmermann H (2018): Poly(amidoamine)-alginate hydrogels: Directing the behavior of mesenchymal stem cells with charged hydrogel surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 29: 105. (**Titelseite**)
DOI: 10.1007/s10856-018-6113-x
4. **Schulz A***, Gepp MM*, Stracke F, von Briesen H, Neubauer JC, Zimmermann H (2019): Tyramine-conjugated alginate surfaces as a platform for bioactive scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 107(1): 114-121.
DOI: 10.1002/jbm.a.36538
*: gleichberechtigte Autorenschaft
5. Scheper V, Hoffmann A, Gepp MM, **Schulz A**, Hamm A, Pannier C, Hubka P, Lenarz T, Schwieger J (2019): Stem Cell Based Drug Delivery for Protection of Auditory Neurons in a Guinea Pig Model of Cochlear Implantation. *Front. Cell. Neurosci.*, 13: 177.
DOI: 10.3389/fncel.2019.00177
6. **Schulz A**, Wahl S, Rickmann A, Ludwig J, Stanzel BV, von Briesen H, Szurman P (2019): Age-related loss of human vitreal viscoelasticity. *Transl. Vis. Sci. Technol.*, 8(3): 56.
DOI: 10.1167/tvst.8.3.56
7. Shariatzadeh M, Chandra A, Wilson SL, McCall MJ, Morizur L, Lesueur L, Chose O, Gepp MM, **Schulz A**, Neubauer JC, Zimmermann H, Abranches E, Man J, O'Shea O, Stacey G, Hewitt Z, Williams DJ (2020): Distributed automated manufacturing of pluripotent stem cell products. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, 106(3-4): 1085-1103.
DOI: 10.1007/s00170-019-04516-1

8. Schwieger J, Hamm A, Gepp MM, **Schulz A**, Neubauer JC, Hoffmann A, Lenarz T, Scheper V (2019): Alginate encapsulated BDNF-overexpressing mesenchymal stem cells are a promising drug delivery system for protection of auditory neuros. *J. Tissue Eng.*

Zur Publikation akzeptiert.

9. Dobringer J, Gessner P, **Schulz A**, Gepp MM, Mueller SC, Gessner R, Neubauer JC, Vasquez JA, Zimmermann H (2019): Improved harvesting and processing of brown seaweeds for the extraction of biomedical grade alginates: high defined biopolymer production ‚from beach to bench‘.

(Manuskript in Vorbereitung)

10. Meiser I, Majer J, Katsen-Globa A, **Schulz A**, Neubauer JC, Zimmermann H (2019): Droplet-based vitrification of adherent human induced pluripotent stem cells and the influence of microcarrier elasticity.

(Manuskript in Vorbereitung)

Konferenzbeiträge

Vorträge

1. **Schulz A**, Dobringer J, Gentile L, Vásquez JA, Zimmermann H (2015): Control of ultra-high viscosity as a powerful parameter for alginate capsules. *23th International Conference on Bioencapsulation*, Delft, Niederlande.

Preis: Best Student Contribution

2. **Schulz A**, Dobringer J, Gentile L, Zimmermann H, Vásquez JA (2016): From Seaweeds to Smart Biomaterials. *22nd International Seaweed Symposium*, Kopenhagen, Dänemark.
3. **Schulz A**, Gepp MM, Dobringer J, Vásquez JA, Gentile L, Neubauer JC, Zimmermann H (2016): Bioactive surfaces for the cultivation of human stem cells on seaweed-derived alginates. *22nd International Seaweed Symposium*, Kopenhagen, Dänemark.

Poster

1. Buhr S, Schmidt K, **Schulz A**, Gentile L, Neubauer JC, Zimmermann H (2016): Innovative culture of hiPSCs in suspension on alginate-microcarrier. *Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research*, San Francisco, USA.
2. Fischer B, Gepp MM, **Schulz A**, Dobringer J, Vásquez JA, Gentile L, Zimmermann H (2016): Towards a novel ultra-high viscosity alginate scaffold for cardiac tissue engineering. *22nd International Seaweed Symposium*, Kopenhagen, Dänemark.
3. Fischer B, **Schulz A**, Gepp MM, Neubauer JC, Gentile Luca, Zimmermann H (2016): 3D printing of hydrogels in a temperature controlled environment with high spatial resolution. *Dreiländertagung der Biomedizinischen Technik*, Basel, Schweiz.
4. Fischer B, **Schulz A**, Gepp MM, Neubauer JC, Gentile L, Zimmermann H (2017): The heartpatch, a versatile cell-alginate based scaffold for cardiac tissue engineering. *Translational Opportunities in Stem Cell Research*, Basel, Schweiz.
5. Gepp MM, **Schulz A**, Fischer B, Neubauer JC, Zimmermann H (2017): Alginate hydrogels as versatile biomaterials for engineering hiPSC-derived cardiac cell models. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien*, Würzburg, Deutschland.
6. Fischer B., Weber LW, Gepp MM, **Schulz A**, Meier A, Neubauer JC, Gentile L, Zimmermann H (2017): Scaffolds for off-the-shelf regenerative medicine. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien*, Würzburg, Deutschland.
7. Rickmann A, Schmidt K, Wahl S, **Schulz A**, Neubauer JC, Meiser I, Zimmermann H, Szurman P (2017): Tissue engineered corneal stroma based on alginate. *Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Berlin, Deutschland.
8. Stanzel BV, **Schulz A**, Riemann I, Rickmann A, Gepp MM, Xiong Y, Meiser I, Neubauer J, Szurman P, von Briesen H, Zimmermann H, Stracke F (2017): Improved cryopreservation of cultured RPE with addition of a silver iodide/alginate mixture. *Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology*, Hawaii, USA.
9. Rickmann A, Al-Nawaiseh S, Willekens K, Sermeus L, von Briesen H, **Schulz A**, Szurman P, Stanzel BV (2018): Multimodale retinale Bildgebung in einem Kaninchen-Modell mit RPE-bedingter Netzhautatrophie, *Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Bonn, Deutschland.
10. Al-Nawaiseh S, Rickmann A, Willekens K, Sermeus L, von Briesen H, **Schulz A**, Szurman P, Stanzel BV (2018): SD-OCT Befunde in einen neuen Kaninchen-Modell mit RPE-bedingter Netzhautatrophie, *Kongress der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, Bonn, Deutschland.

Patentanmeldungen

1. Selektives Freisetzungssystem für Tumorthapeutika und Tumordiagnostika sowie Biosensor für Tumorgewebe. Internationales Patent. WO/2018/141555. 2018 Aug 9.

