

**Design eines proteinfreisetzenden 3D-Trägermaterials
für den Einsatz in der kardiovaskulären regenerativen
Medizin**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Schesny, Marianne Katharina**

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Schenke-Layland

2. Berichterstatter: Juniorprofessor Dr. H. Langer

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	9
1.1 Tissue Engineering.....	9
1.2 Biomaterialien.....	11
1.2.1 Die extrazelluläre Matrix als Biomaterial	11
1.2.1.1 Polymere zur Trägermaterialherstellung	12
1.2.1.2 Biofunktionalisierung	15
1.2.2 Herstellung poröser Materialien	15
1.2.2.1 Elektrospinnen	17
1.2.3 Fotopolymerisation.....	20
1.3 Strategien in der kardiovaskulären regenerativen Medizin	21
1.3.1 Injektion regenerationsfördernder Substanzen und Zellen	21
1.3.2 Azelluläre und zelltragende Biomaterialien	22
1.3.3 Biomaterialien als substanzfreisetzende Depotsysteme.....	23
1.3.3.1 Elektrogenesponnene Polymerfasern	23
1.3.3.2 Hydrogele basierend auf dem Polymer PEG	24
1.4 Ziel der Studie	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Verbrauchsmaterialien & Geräte	27
2.2 Zellkultur.....	29
2.3 Biomaterialherstellung.....	31
2.3.1 Generierung eines elektrogenesponnenen Trägermaterials.....	31
2.3.2 Hydrogelherstellung und Stabilitätsmessung	32
2.3.3 Hybrid-Biomaterial-Herstellung	33

2.3.4	Zytotoxizitätsversuche.....	33
2.4	Messung der Proteinfreisetzung.....	34
2.4.1	Freisetzung des Proteins BSA aus ETM.....	34
2.4.2	BSA-Freisetzung aus UV-vernetzten Hydrogelen.....	36
2.4.2.1	Variation der verkapselten BSA-Konzentration.....	36
2.4.2.2	Variation der I 2959-Konzentration	37
2.4.3	Freisetzung der Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI aus den Hydrogelen.....	37
2.5	Überprüfung der Bindungsfähigkeit der GPVI-Domäne	38
2.5.1	Immunfluoreszenzfärbung einer humanen Arterienwand	38
2.5.2	Messung der durch Bindung der GPVI-Domäne an Col I erzeugten Signalintensität.....	39
2.6	Testung der Bindungskapazität der SDF1-Domäne an hECFCs	40
2.6.1	Darstellung des CXCR4-Rezeptors auf hECFCs.....	40
2.6.2	Bindung von SDF1-GPVI an CXCR4 auf hECFCs	41
2.7	Statistik, Analyse und Darstellung der Ergebnisse.....	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Herstellung eines strukturstabilisierenden ETM	43
3.2	Generierung eines hydrolytisch beständigen und nicht zytotoxischen Hydrogels	47
3.3	ETM und Hydrogele zur definierten Freisetzung von Proteinen.....	49
3.3.1	BSA-Freisetzung aus ETM.....	49
3.3.2	Design von Hydrogelen zur steuerbaren Proteinfreisetzung.....	56
3.3.2.1	Variation des Freisetzungspfilms durch unterschiedlich dichte Vernetzung des Polymernetzwerks	56
3.3.2.2	Einfluss der verkapselten BSA-Konzentration auf das Freisetzungspfilm	58

3.3.3	Das Hydrogel als Reservoir und Freisetzungsmaterial für bifunktionale Proteine.....	60
3.4	Bifunktionalität von SDF1-GPVI nach dem Freisetzungsprozess	64
3.4.1	Aufrechterhaltene spezifische Bindungskapazität der GPVI-Domäne an Col I.....	64
3.4.2	Bestehende spezifische SDF1-GPVI-Bindungskapazität an CXCR4 auf der Oberfläche von hECFCs.....	67
4	Diskussion.....	72
4.1	Vielseitigkeit elektrogenespinnener Substrate	72
4.2	Hydrogele sind effektive proteinfreisetzende Depotsysteme	76
4.2.1	Das bifunktionale Protein SDF1-GPVI zur Anziehung autologer Stammzellen	76
4.2.2	Verlängerte und steuerbare Freisetzung unterschiedlicher Proteine durch Hydrogele.....	79
4.3	Der Herstellungsprozess zeigt keinen Einfluss auf die Biokompatibilität	83
4.3.1	Wirkung auf die Zellvitalität	83
4.3.2	Einfluss auf die Funktionalität und Struktur von Proteinen.....	86
4.4	Vorteile eines Hybrid-Biomaterials	90
4.5	Zusammenfassende Bewertung und Ausblick	92
5	Zusammenfassung.....	93
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Tabellenverzeichnis	106
8	Abbildungsverzeichnis	107
9	Veröffentlichungen	109
10	Erklärung zum Eigenanteil	110
	Danksagung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
BMPC	Bone marrow derived progenitor cell
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col I	Kollagen Typ I
CXCR4	Chemokinrezeptor 4 des CXCR-Motives
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
ETM	Elektrogesponnenes Trägermaterial
ETOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G	Gauge
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HFP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
hECFC	Human endothelial colony-forming cells
I 2959	Irgacure 2959 (Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone)
Ig	Immunglobulin
J	Joule
kV	Kilovolt
kDa	Kilodalton
M	Molar
mEPC	Murine endothelial progenitor cells
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mW	Milliwatt
M _w	Molekulargewicht

M_n	Zahlenmittel der Molmasse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PEG	Polyethylenglycol
PEGda	Polyethyleneglycol diacrylate
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDF1	Stromal Cell-Derived Factor 1
TBS	Tris(hydroxyethyl)aminomethan-Buffered Saline
TE	Tissue Engineering
Tris	Tris(hydroxyethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Tissue Engineering

Im Endstadium einer Organinsuffizienz besteht die einzige kurative Therapie im Austausch des geschädigten Organs durch ein funktionsfähiges Implantat oder Transplantat [1]. Die Implantation xenogener Organe (beispielsweise dezellularisierte Herzklappen des Schweins) bietet eine Therapieoption, allerdings sind die Patienten durch immunologische Abstoßung des Materials oder eine entzündliche Immunreaktion der Implantationsumgebung gefährdet [2, 3]. Auch die allogene Organtransplantation durch menschliche Spenderorgane führt trotz des Einsatzes immunsuppressiver Medikamente häufig zu einer chronischen Abstoßungsreaktion und verhindert somit den Therapieerfolg [4]. In Europa zählen Organe wie die Niere, die Leber und das Herz zu den am dringendsten benötigten transplantierbaren Organen. Im Jahr 2013 warteten deshalb 11.120 Menschen auf eine Niere, 2.111 auf eine Leber und 1.283 auf ein Herz [5]. Diesem Mangel an geeigneten Spenderorganen wirkt die Forschung im Bereich der regenerativen Medizin entgegen, deren Ziel es ist einen funktionellen Organersatz zu gewährleisten [1]. Der Bereich des *Tissue Engineerings* (TE) besteht im Wesentlichen seit Mitte der 1980er Jahre und stellt deshalb eine vergleichsweise neuartige Disziplin der Biomedizin dar [4]. TE kann definiert werden als Therapieoption in der regenerativen Medizin zur Neubildung menschlichen Gewebes durch Stimulation ausgesuchter Zellen mittels einer Kombination aus molekularen und mechanischen Signalen [6] und beinhaltet somit die Neubildung von Gewebe *ex vivo*, um es *in vivo* implantieren zu können [7]. Dabei erfolgt die Generierung von Gewebekonstrukten in enger Zusammenarbeit von Medizinern, Zellbiologen, Materialforschern und Ingenieuren [4]. Das Prinzip des TE (Abbildung 1) beruht auf der Entnahme von autologem Gewebe aus dem

Patientenorganismus und nachfolgender Isolation der gewünschten Zellen. Diese werden zunächst in einer zweidimensionalen (2D-) Zellkultur expandiert und anschließend auf einem dreidimensionalen (3D-) Trägersubstrat kultiviert. Dieses Trägersubstrat bietet die Möglichkeit die Proliferation und Differenzierung der Zellen beispielsweise durch Wachstumsfaktoren anzuregen [8, 9].

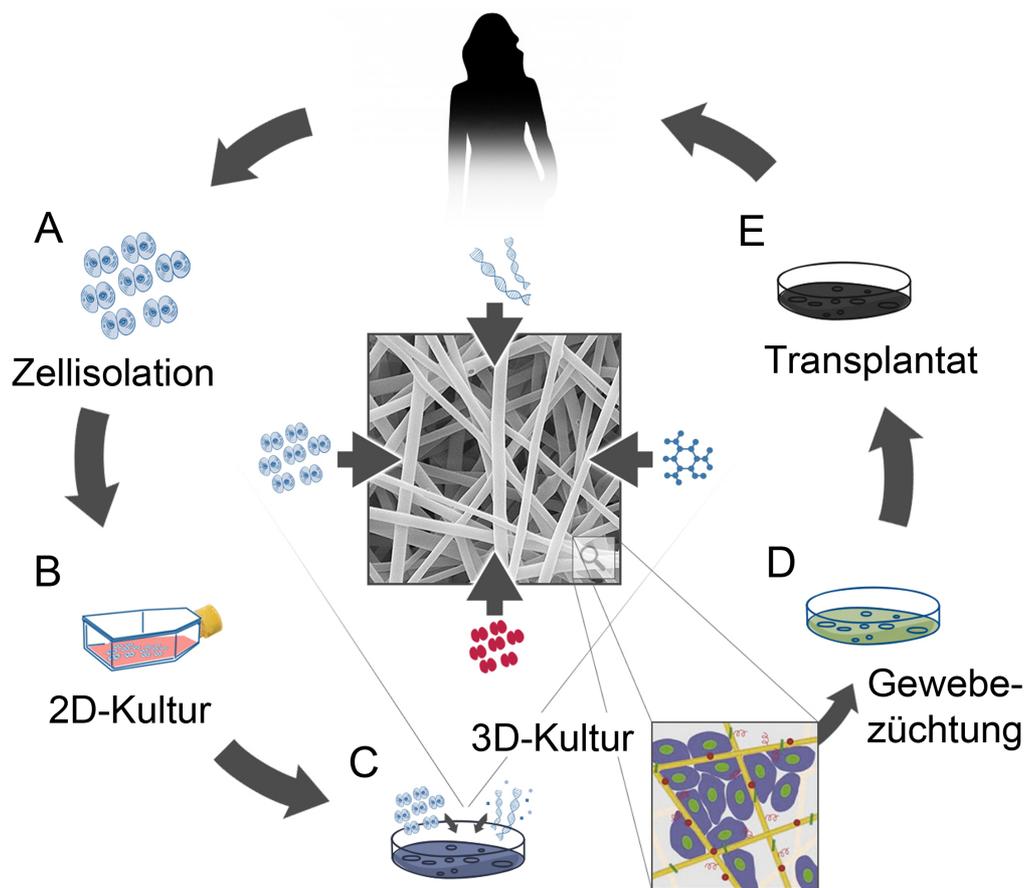


Abbildung 1: Prinzip des TE. Zunächst erfolgt die Zellisolation aus autologem Gewebe (A). Die Zellen werden in einer 2D-Zellkultur expandiert (B). Anschließend erfolgt die Aussaat und Kultivierung auf einem 3D-Trägermaterial (C), welches mithilfe von bioaktiven Faktoren funktionalisiert werden kann. Dies führt zur Organisation einer Gewebeeinheit (D). Anschließend erfolgt die Reimplantation des neugebildeten Implantates (E) in den Patientenorganismus. Modifiziert und angepasst von A. Grimme und M. Schesny nach [12].

Zusätzlich kann dies durch die dynamische Kultivierung der Zellen in einem Bioreaktor unterstützt werden. Das auf diese Weise hergestellte Gewebekonstrukt wird anschließend in den Körper des Patienten implantiert [10, 11]. Klinische Studien demonstrierten bereits den erfolgreichen Einsatz mittels TE hergestellter Organe wie der Harnblase [13] oder Blutgefäße [14]. Organe als Verband unterschiedlicher Zellarten zu generieren, stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung an die Forschung in der regenerativen Medizin dar.

1.2 Biomaterialien

Biomaterialien interagieren mit dem Organismus und ersetzen oder verbessern hierbei die Funktion des Zielgewebes. Hierdurch können sie den Verlauf einer Therapie oder Diagnostik im menschlichen oder tierischen System regeln [6]. Metalle, Keramiken und Polymere repräsentieren die am häufigsten verwendeten Biomaterialien im Bereich des TE [15]. Biokompatibilität stellt hierbei eine entscheidende Eigenschaft implantierbarer Biomaterialien dar. Sie ist dann gewährleistet, wenn ein Biomaterial nach Implantation keine schädigenden Effekte auf den Organismus ausübt; ein Beispiel hierfür wäre das Auslösen einer Immunreaktion oder die Ausübung eines zytotoxischen Effektes [16]. Weitere an die Funktion des Biomaterials im Körper angepasste Eigenschaften sind die Degradation ohne toxische Nebenprodukte, das Vorhandensein geeigneter biomechanischer Eigenschaften und zelladhäsionsfördernder Oberflächen, oder die Kapazität eine Substanz zu verkapseln und freizusetzen [16, 17].

1.2.1 Die extrazelluläre Matrix als Biomaterial

Die extrazelluläre Matrix (EZM) bildet das Stützgerüst eines Gewebes. Sie besitzt durch ihre Struktur und die enthaltenen bioaktiven Faktoren von Natur aus ein hohes Maß an Bioaktivität. Dabei ist ihre Zusammensetzung maßgeblich durch die Funktion des Organs bestimmt [18]. Am Aufbau

beteiligen sich fibrilläre Proteine (beispielsweise Kollagen, Laminin), matrizelluläre Proteine (beispielsweise Osteopontin, Thrombospondin), Glykosaminoglykane (beispielsweise Hyaluron, Heparansulfat) sowie Proteoglykane (beispielsweise Decorin, Versican) [3]. Die Aufgaben der EZM sind vielfältig. Sie sorgt für den Erhalt der Gewebestabilität und unterstützt die Adhäsion, Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben von Zellen, indem sie mit zellulären Oberflächenrezeptoren interagiert [3]. Durch Zellen in vitro-produzierte EZM wurde bereits mehrfach als biologisches Trägermaterial, beispielsweise als Ersatz für gerissene Bänder oder verletzte Haut eingesetzt [19]. Studien zufolge löst dezellularisierte EZM keine wesentliche Immunreaktion im Empfängerorganismus aus und begünstigt die Neubildung von Gefäßen [20]. Tatsächlich wurde dezellularisierte EZM als Biomaterial bereits in präklinischen Studien und klinischen Therapien als Ersatzmaterial für Haut, Sehnen, Harnblase, Blutgefäße und Herzklappen erfolgreich verwendet [3]. Einen weiteren Schritt bildet die Dezellularisierung ganzer Organe, die nach Neubesiedlung mit Zellen ebenfalls in präklinischen Studien auf ihr Potential als Organersatz untersucht werden [3].

1.2.1.1 Polymere zur Trägermaterialherstellung

Polymere bestehen aus Ketten sich wiederholender Einheiten, die als Monomere bezeichnet werden [21]. Natürliche Polymere besitzen zumeist ein hohes Maß an Biokompatibilität und sind in der Lage die EZM natürlicher Gewebe zu imitieren [15]. Diese Eigenschaften ermöglichen ihren vielfältigen Einsatz in der regenerativen Medizin (Tabelle 1). Durch die häufig bereits vorhandenen bioaktiven Faktoren innerhalb des natürlichen Polymers, ist keine Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen notwendig [22]. Nachteile sind ihre häufig unzureichenden biomechanischen Eigenschaften sowie die unterschiedliche strukturelle Beschaffenheit innerhalb der selben Polymersorte aufgrund ihrer individuellen Zusammensetzung [16].

Tabelle 1: Charakteristika einiger in der Biomaterialherstellung verwandter natürlicher Polymere sowie zugehörige Anwendungsbeispiele. Modifiziert nach [16].

Polymer	Einige Charakteristika	Anwendungsbeispiele
Kollagen	Hauptbestandteil der EZM, vermittelt unter anderem Zelladhäsion, -proliferation, -differenzierung	Wundverbände, Hauttransplantate [23]
Gelatine	Denaturiertes Kollagen, kann zu einem Hydrogel verarbeitet werden	Steriler Schwamm (Wundverband) [24]
Seide	Exzellente mechanische Eigenschaften	Chirurgisches Nahtmaterial [25]
Alginat	Derivat aus Seetang, exzellente Quelleigenschaften, Eignung als Hydrogel	Verkapselungsmaterial in der zellbasierten Diabetes-therapie [26]
Chitosan	pH-sensitives Verhalten aufgrund des Vorhandenseins vieler Aminogruppen	Wundverband [27]
Hyaluronsäure	Wichtiger Bestandteil der EZM in Knorpel sowie Glaskörper des Auges	Wundverband [27]

Natürliche Polymere können unterteilt werden in Polymere, deren Herkunft im Proteinbereich (beispielsweise Kollagen, Gelatine, Seide) oder im Polysaccharidbereich (Alginat, Chitosan, Hyaluronsäure) liegen [16].

Synthetische Polymere können in degradierbare Polymere, beispielsweise Polylactid (PLA), Polyethylenglycol (PEG), Polylactid-co-Glycolid (PLGA) sowie Poly- ϵ -Caprolacton (PCL), und nicht-degradierbare Polymere, beispielsweise Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polytetrafluorethylen (PTFE) unterteilt werden [16]. Vorteile synthetischer Polymere sind die Kontrollierbarkeit der mechanischen Eigenschaften des generierten Materials sowie die Variabilität in der Herstellung und die Verfügbarkeit der Substanzen in hohen Mengen, weswegen sie bereits vielfältig in der regenerativen Medizin eingesetzt werden (Tabelle 2) [16, 28].

Nachteile einiger synthetischer Polymere wie PLA und Polyglycolsäure, die zur Gruppe der Polyester gehören, bilden ihre sauren Degradationsprodukte. Diese können zu einer Senkung des pH-Wertes im Umgebungsgewebe führen und damit potenziell eine Entzündungsreaktion und Schädigung der Zellen hervorrufen [29]. Um die Bioaktivität von Biomaterialien zu erhöhen, die aus synthetischen Polymeren wie beispielsweise PEG bestehen, können Oberflächenmodifikationen vorgenommen werden. Hierdurch kann die Zelladhäsion und Gewebeneubildung gefördert werden [30].

Tabelle 2: Auswahl einiger zur Herstellung von Biomaterialien verwendeter synthetischer Polymere, zugehörige Charakteristika und klinische Anwendungsbeispiele. Modifiziert nach [16].

Polymer	Einige Charakteristika	Anwendungsbeispiele
PEG	Hohe Biokompatibilität und nicht toxisch, hydrophil	Substanzfreisetzende Systeme, Beschichtung von Implantaten [31]
PLA/PLGA	Häufigstes synthetisch genutztes Material für resorbierbare Implantate, gute Biokompatibilität, hydrophob	Substanzfreisetzende Systeme, Nahtmaterial [32]
PCL	Gute Biokompatibilität, seit 30 Jahren im klinischen Einsatz	Knochenregeneration nach Zahnextraktion [33], Füllmaterial für kraniofaziale Knochen [34]
PMMA	Temperaturanstieg während Polymerisation auf bis zu 124 °C, exzellente Stabilität	Knochenzement zur Verankerung von Prothesen [35]
PTFE	Widerstandsfähigkeit gegenüber hohen Temperaturen	Gefäßimplantate [36]

1.2.1.2 Biofunktionalisierung

Zur verbesserten Interaktion zwischen synthetischem Material und Organismus können bioaktive Faktoren in die Biomaterialien eingebaut werden, die somit eine Funktionalität als Gewebeersatz erhöhen [37]. Eine Methode stellt die Kombination mit natürlichen Polymeren wie Kollagen dar [38]. In einer unserer eigenen Studien wurde die Biofunktionalisierung von elektrogewebtem PCL und Gelatine mit dem Proteoglykan Decorin untersucht [39]. Dabei konnte die Funktionalität des Proteins im Trägersubstrat nachgewiesen und die Biokompatibilität durch Wachstum von Trachealzellen auf dem Trägermaterial bestätigt werden [39]. Neben der Verkapselung der Substanz bildet die Immobilisation therapeutischer Substanzen auf der Oberfläche von Trägermaterialien eine weitere Möglichkeit der nachträglichen Biofunktionalisierung. Hierzu wird die therapeutische Substanz beispielsweise durch Konjugation an das Trägermaterial gebunden [40, 41]. Durch den Einbau spaltbarer Peptide kann die proteolytische Degradation eines Biomaterials erhöht werden [42]. Ebenso kann die Oberflächenfunktionalisierung mit zelladhäsionsfördernden Liganden wie der Peptidsequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) zur verbesserten Anhaftung der Zellen an das Biomaterial eingesetzt werden [43]. Schließlich besteht die Möglichkeit durch Beschichtung synthetischer Materialien mit dezellularisierter Gewebematrix die Vorteile natürlicher EZM und synthetischer Materialien zu kombinieren [3, 44].

1.2.2 Herstellung poröser Materialien

Die Porosität eines Biomaterials entscheidet über dessen Eignung für den Einsatz in der 3D-Zellkultur [45]. Zusätzlich ist das Vorhandensein von Poren essentiell, um die Gefäßversorgung des Trägermaterials sowie den Transport von Metaboliten, Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten [16, 45, 46]. Zur Herstellung poröser Biomaterialien werden unterschiedliche Methoden

angewandt (Tabelle 3). Besondere Beachtung findet hierbei die Methode des Elektrosinnens, die in einem separaten Abschnitt beschrieben wird.

Tabelle 3: Übersicht über häufig eingesetzte Techniken zur Herstellung poröser Träger-substrate.

<i>Emulsification/freeze-drying</i>	Basiert auf dem Prinzip der Sublimation, wobei Polymere oder Keramiken zunächst in einer wässrigen Phase oder einem organischen Lösungsmittel gelöst werden, welches durch Gefriertrocknen entweicht, und eine poröse Trägerstruktur hinterlässt [47].
<i>Particulate leaching</i>	Bsp. <i>Solvent casting-particulate leaching</i> : Das in einem Lösungsmittel gelöste Polymer wird mit Salzpartikeln vermischt, die nach Verflüchtigung des Lösungsmittels mit Wasser ausgewaschen werden [48].
<i>Gas Foaming</i>	Ein aufschäumendes Salz (beispielsweise Ammoniumbikarbonat) wird mit einem Polymer zu einer Art Paste vermischt und in heißem Wasser getränkt, wobei es zur Entwicklung von Ammonium- und Kohlenstoffdioxid kommt. Zusätzlich kommt es zum Auswaschen von Partikeln aus Ammoniumbikarbonat. Beide Mechanismen bedingen die Porosität [49].
<i>Supercritical Fluid Technology</i>	Kohlenstoffdioxid wird in einen Zustand überkritischen Drucks gebracht und mit dem Polymer vermischt. Der Druck wird anschließend abgelassen. Durch Zunahme der thermodynamischen Instabilität des Gases kommt es zur Ausbildung von Poren in der Polymermasse. Diese Methode wirkt sich vorteilhaft auf den Erhalt der Funktionalität verkapselter Proteine aus [50].
<i>Melt-Molding Technique</i>	Polymere/Keramiken werden in der Anwesenheit von porogenen Substanzen wie Natriumchlorid oder Zuckerkristallen verschmolzen. Nach dem Abkühlen werden diese durch Wasser herausgelöst und die porösen Trägersubstrate gefriergetrocknet [51].
<i>Powder Compaction</i>	Basiert auf der Kompression eines bereits hergestellten Trägersubstrates mit einem Projektil oder einer Stanze in geeigneter Geschwindigkeit, wodurch das festwerdende Pulver die gewünschte Porosität annimmt [52].

<i>Thermically-Induced Phase Separation</i>	Beruhrt auf dem Prinzip einer thermisch-induzierten Trennung zweier Phasen, bestehend aus fest-flüssigen sowie ausschließlich flüssigen Anteilen. Ein Polymer wird hierfür aufgelöst und durch schnelles Abkühlen auf eine Temperatur unterhalb des Schmelzpunktes abgeschreckt. Nach Herauslösen des Lösungsmittels verbleibt das entstandene poröse Trägersubstrat [53].
<i>Fiber Bonding / Fiber Mesh</i>	Polymere in Fadenform werden übereinandergelegt und an den Kreuzpunkten miteinander verbunden. Dies kann beispielsweise durch vorsichtiges Erhitzen über den Schmelzpunkt des Polymers und erneutes Abkühlen erfolgen [54].
<i>Rapid Prototyping = Solid Free Form Fabrication</i>	Anhand eines im Computer angefertigten Modells wird ein aus mehreren Lagen bestehendes Konstrukt angefertigt. Hierfür notwendige Techniken sind beispielsweise die Stereolithographie oder das 3D-Drucken. Mehrere Lagen aus Pulver oder Flüssigkeiten werden nach und nach verfestigt, was den Aufbau einer 3D-Struktur ermöglicht [16].
Elektrospinnen	siehe nachfolgendes Kapitel

1.2.2.1 Elektrospinnen

Elektrospinnen wurde in mehreren Studien als geeignete Methode zur Herstellung dreidimensionaler Trägermaterialien identifiziert und eignet sich hervorragend zur Herstellung von porösen Oberflächenstrukturen aus Polymerfasern [39, 45, 55]. Vorteile des Elektrospinnens sind u. a. der schlichte Versuchsaufbau und die große Variabilität der Polymere und Lösungsmittel, die sich zur Herstellung einer spinnbaren Polymerlösung eignen [55, 56]. Eine besondere Charakteristik elektrogenespinnener Trägermaterialien (ETM) ist deren hohes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, welches sich aus dem geringen Faserdurchmesser im Bereich von wenigen Mikro- bis Nanometern sowie einer anisotropen Verteilung der Fasern ergibt [56]. Das Prinzip des Elektrospinnens beruht auf der Generation eines soliden Fasernetzwerks aus einer flüssigen Polymerlösung nach einem

typischen Versuchsaufbau (Abbildung 2 A). Zu Beginn des Herstellungsprozesses wird die Polymerlösung in eine Spritze gefüllt, an deren Ende sich eine Nadel befindet. In dem in Abbildung 2 A verwendeten vertikalen Aufbau bildet sich der Schwerkraft folgend am Ende der Nadel ein Tropfen. Durch Anbringen einer Hochspannung, die vorsichtig erhöht wird, nimmt der Tropfen eine Kegelform an, was als *Taylor cone* bezeichnet wird (Abbildung 2 B). Bei weiterer Erhöhung der Spannung wird der Punkt erreicht, an dem die elektrostatische Kraft die Oberflächenspannung der Polymerlösung übersteigt. Ab diesem Punkt kommt es zur Ablösung eines Faserstrahls in Richtung des geerdeten Kollektors. Die Ladung der Polymerlösung bewirkt durch abstoßende Kräfte eine kegelförmige Anordnung der Faser auf dem Weg zum geerdeten Kollektor, die neben dem gleichzeitigen Verdampfen des Lösungsmittels zu einer Ausdünnung der nun soliden Faser führt. Die auf diese Weise hergestellten Polymerfasern werden auf dem Kollektor gesammelt und formen ein poröses Netzwerk [55]. Zu den Faktoren, die den Elektrospleinprozess beeinflussen, zählen die Zusammensetzung der Polymerlösung, Prozessparameter und Umgebungsfaktoren (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht der regulierbaren Parameter vor und während des Elektrospleinens. Modifiziert nach [55].

Eigenschaften der Polymerlösung	Polymerart, Molekulargewicht (M_w)/ Ladung/Konzentration des Polymers, Oberflächenspannung der Polymerlösung, rheologische Massen- und Grenzflächeneigenschaften (beispielsweise Viskosität), Leitfähigkeit, Dielektrizitätskonstante
Prozessparameter	Höhe der Spannung, Abstand zwischen Nadel und Sammelelektrode, Flussrate, Nadelform, Aufbau der Sammelelektrode
Umgebungsfaktoren	Luftfeuchtigkeit, Temperatur

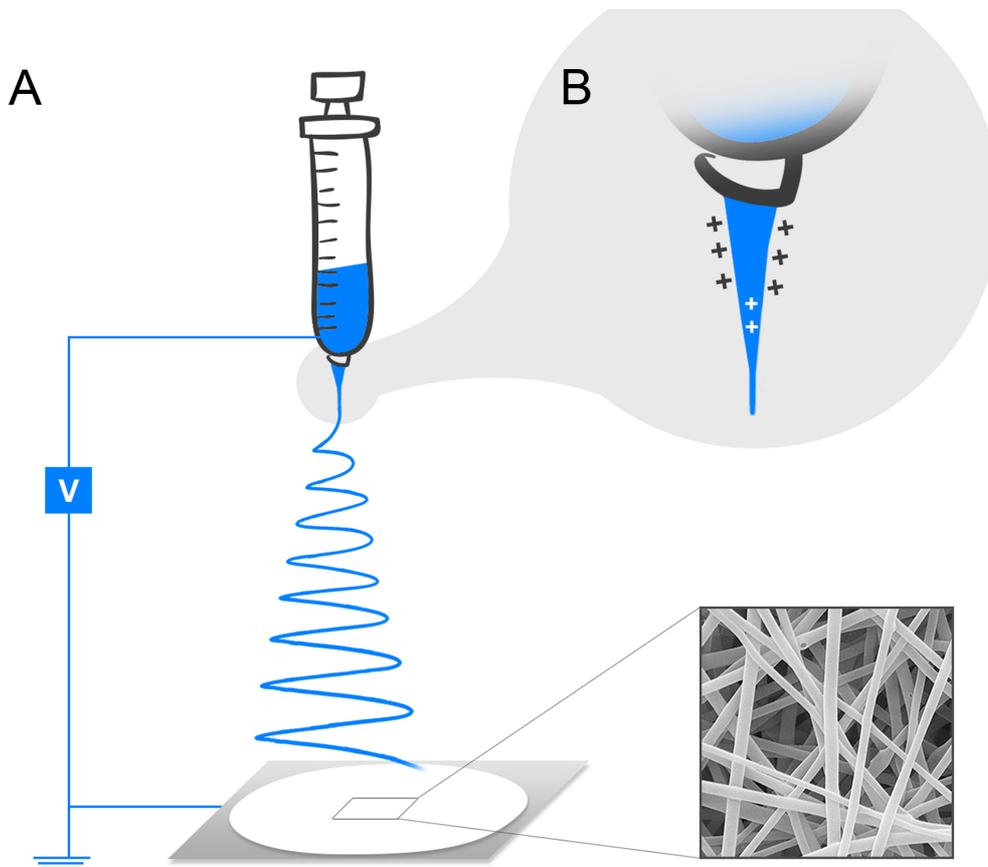


Abbildung 2: Aufbau eines Elektrospinnapparats und Schema des Elektrospinnens. Eine Polymerlösung wird durch eine Spritze gepumpt. Es kommt zur Ausbildung eines Tropfens aus Polymerlösung an der Nadelspitze. Sowohl die Nadelspitze als auch der Kollektor dienen als Elektrode. Durch Erhöhung der Spannung wird eine Faser generiert, die auf ihrem Weg in Richtung des Kollektors durch elektrostatische Abstoßungskräfte eine Art Spirale bildet und durch Verdampfung des Lösungsmittels erhärtet. Die soliden Fasern sammeln sich auf der Oberfläche des Kollektors an und bilden ein ETM (A). Nach konsekutiver Erhöhung der Spannung und kurz vor Bildung des Faserstrahls entsteht der sogenannte *Taylor cone* als konusförmiger Tropfen am Ende der Nadelspitze. Überschreitet die angelegte elektrische Spannung einen bestimmten Wert, so übersteigen die angreifenden Kräfte die Oberflächenspannung der Polymerlösung und es entsteht eine Faser (B). Modifiziert und angepasst von A. Grimme und M. Schesny nach [57].

1.2.3 Fotopolymerisation

Die Fotopolymerisation dient der Verknüpfung von Polymerketten. Anteile eines hierfür benötigten Fotoinitiators zerfallen nach Kontakt mit UV-Licht und bilden freie Radikale. Diese greifen beispielsweise an Kohlenstoff-Doppelbindungen, wie einer Vinylgruppe, der Polymerkette an und führen hierbei zur kovalenten Verknüpfung der Polymerketten untereinander; aus einer Polymerlösung entsteht somit ein festes Material [58-60]. Der Prozess der Fotopolymerisation kann unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden und ermöglicht hiermit die Herstellung eines Hydrogels in situ durch UV-Bestrahlung nach subkutaner Implantation. Im TE werden fotopolymerisierte Hydrogele bereits als Wundverbände zur Vorbeugung einer postoperativen Adhäsionsbildung verwendet [61], oder dienen als Zelllieferant beispielsweise in der Regeneration von Knorpelgewebe [62]. Des Weiteren finden sie insbesondere im Bereich der Substanzfreisetzung Anwendung [58], worauf im Kapitel 1.3.3.2 anhand von Hydrogelen basierend auf dem Polymer PEG detailliert eingegangen wird. Das Prinzip der Fotopolymerisation kann ebenfalls verwendet werden, um die mechanische Stabilität elektrogesponnener Biomaterialien zu erhöhen [63]. Anwendung findet die Fotopolymerisation auch in der *rapid prototyping*-Technik, wobei anhand eines im Computer programmierten Musters durch gezielte UV-Bestrahlung mehrerer Lagen nacheinander ein 3D-Konstrukt erstellt wird [64].

1.3 Strategien in der kardiovaskulären regenerativen Medizin

Nach ischämischer Schädigung ist das Myokard nur unzureichend dazu in der Lage neues funktionelles Gewebe zu bilden [65]. Dies kann in einer Herzinsuffizienz mit infauster Prognose münden [65]. Einige der bisher angewandten Therapiestrategien zur Förderung der endogenen Myokardregeneration werden in den nachfolgenden Abschnitten behandelt.

1.3.1 Injektion regenerationsfördernder Substanzen und Zellen

Ziel der Injektion therapeutischer Substanzen kann die Förderung der Differenzierung kardialer Stammzellen in Kardiomyozyten sein, was beispielsweise durch Injektion von Prostaglandin E2 bereits gezeigt werden konnte [66]. Begünstigende Wirkung auf die Gefäßneubildung kann durch Injektion modifizierter RNA, die für Wachstumsfaktoren kodiert [67], die Injektion der Wachstumsfaktoren selbst [68], oder angiogenesefördernder Proteine [69] erreicht werden. Eine weitere Strategie bildet die Applikation von Zellen, welche unterstützend auf die Myokardregeneration wirken sollen. Zu den hierfür verwendeten Zelltypen zählen unter anderem Myoblasten der Skelettmuskulatur, mesenchymale Stammzellen (aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe), embryonale Stammzellen und kardiale Stammzellen [8, 70, 71]. Am Beispiel der Injektion aus dem Knochenmark gewonnener mesenchymaler Stammzellen (*Bone marrow-derived progenitor cells*, BMPCs) wird deutlich, dass die Effektivität der simplen Stammzellinjektion jedoch noch nicht vollständig erwiesen ist. Anhand eines Mausmodells konnte ein positiver Effekt auf die kardiale Kontraktilität sowie die Neubildung von Myokard nach intramyokardialer BMPC-Injektion detektiert werden [70]. Auch die klinische Studie TOPCARE-AMI zeigte eine Erhöhung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach BMPC-Applikation [72], jedoch konnten weitere klinische Studien wie die ASTAMI-Studie diesen positiven Effekt auf die Herzfunktion

nicht nachweisen [73]. Es wird angenommen, dass die niedrige Überlebens- und Integrationsrate der injizierten Zellen hierfür verantwortlich ist [8, 74]. Entgegen der Theorie, dass injizierte Stammzellen hauptsächlich durch Differenzierung zu Kardiomyozyten zur Neubildung des Myokards beitragen [8] findet die Theorie der regenerationsfördernden parakrinen Effekte durch injizierte Stammzellen wachsenden Zuspruch [75].

1.3.2 Azelluläre und zelltragende Biomaterialien

Zelltragende Biomaterialien umgehen das Problem der Zerstreung und Verlust von Stammzellen nach deren Injektion und ermöglichen demnach eine effektivere Methode der Stammzellapplikation [8]. Als Zelllieferanten können beispielsweise injizierbare Hydrogele oder mit Zellen besiedelte präformierte Trägermaterialien dienen, die eine verbesserte Integration der Zellen ermöglichen und die Zellen vor schädigenden Noxen schützen [8, 9, 76, 77]. Mit dem Einsatz azellulärer Materialien wird vorwiegend eine mechanische Verstärkung vorgeschädigten Gewebes erzielt, wodurch ebenfalls ein Funktionserhalt des Organs erreicht werden kann. Deutlich wird dies am Beispiel des Herzens. Die Spannung auf die Wände des Herzmuskels kann durch das *La Place*-Gesetz berechnet werden. Es besagt, dass die Spannung auf die Ventrikelwand umgekehrt proportional zur Ventrikelwanddicke ist. Allein die Verdickung des Myokards durch das Aufbringen eines hierfür geeigneten Biomaterials kann sich somit positiv auf die Herzbelastung auswirken [78]. Insbesondere im Falle eines vorangegangenen Myokardinfarkts ist dies vorteilhaft. Hierdurch kann sowohl eine Dilatation als auch eine reaktive Hypertrophie der Ventrikelwand verhindert und die Narbenbildung reduziert werden [79, 80]. Durch Imitierung der biomechanischen Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes kann der Funktionserhalt zusätzlich positiv beeinflusst werden [79]. Eine bedeutende Herausforderung bleibt die Vaskularisierung der Trägermaterialien, um deren Integration mit geschädigten Gewebe zu

verbessern [81]. Ekaputra et al. zeigten, dass nach Freisetzung von Substraten, welche die Angiogenese fördern aus dem Trägermaterial selbst dessen Potential als funktioneller Gewebeersatz erhöht werden konnte [45].

1.3.3 Biomaterialien als substanzfreisetzende Depotsysteme

Der therapeutische Nutzen vieler Substanzen entsteht nach Erreichen eines bestimmten Wirkspiegels, wobei häufig eine einmalige Administration nicht ausreicht [66]. Lösungsansätze hierfür sind die mehrmalige Administration oder die verlängerte Verabreichung durch ein Depotsystem. Die lokale Applikation therapeutisch wirksamer Substanzen kann eine Reduktion der zur Therapie notwendigen Dosis und damit eine Erniedrigung der systemischen Nebenwirkungen ermöglichen [40, 45]. Zu den allgemein gewünschten Eigenschaften eines substanzfreisetzenden Depotsystems zählt die homogene Verteilung der Substanz innerhalb des Trägermaterials [31]. Darüber hinaus ist eine niedrige Substanzaffinität essentiell für die Gewährleistung der Freisetzung der verkapselten Substanz über einen gewünschten Zeitraum in geeigneter Konzentration. Hierbei wird ein diffusionsabhängiger und ein degradationsgesteuerter Freisetzungsmechanismus unterschieden [31]. Daneben sollte das Trägermaterial eine gute Handhabbarkeit aufweisen [16].

1.3.3.1 Elektrogenespinnene Polymerfasern

Elektrospinnen ermöglicht die Verkapselung von Substanzen wie Antibiotika, Zytostatika, Proteine und *small interfering RNA* in Polymerfasern [55, 82, 83]. Neben dem Einbau in die Faser selbst, können diese Substanzen auch physikalisch durch Adsorption oder durch chemische Bindung an die Fasern gekoppelt werden [55, 82]. Dabei entstehen durch die Wechselbeziehung von Substanz und Polymer unterschiedliche Freisetzungsprofile [55, 84]. Die Herstellung coaxial gesponnener Polymerfasern ermöglicht eine weitere Herausögerung der Freisetzung und kann den Schutz der verkapselten Substanz während des Herstellungsprozesses gewährleisten. Hierbei befindet

sich die freizusetzende Substanz im Faserkern, der vom Polymer in Form eines Rohrs umhüllt wird [85, 86]. Die Bildung mehrerer Lagen der auf diese Weise hergestellten Fasern ermöglicht zusätzlich die Erstellung komplexer Freisetzungsprofile [55]. Die Freisetzung der Substanz aus elektrogenesponnenen Fasern ist sowohl durch Diffusion als auch durch Degradation möglich [40]. Insbesondere das hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis des Fasernetzwerks qualifiziert ein ETM hierbei als substanzfreisetzendes System [40]. Zusätzlich ermöglicht die Porosität eines ETM, eine Verteilung der Degradationsprodukte und vermindert hiermit ihre Akkumulation am Implantationsort [87]. Therapeutisch eingesetzt wurden substanzfreisetzende ETM bereits zur Gewährleistung einer postoperativen antibiotischen [88] oder chemotherapeutischen [84] Therapie, sowie als Verbandsmaterial [89].

1.3.3.2 Hydrogele basierend auf dem Polymer PEG

Hydrogele entstehen durch Vernetzung hydrophiler Polymerketten. Der Wasseranteil am Gesamtvolumen nach Aufquellen in wässrigem Medium kann bis zu 95% betragen, wodurch sie dem Weichteilgewebe ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen [58, 90]. Ein häufig verwendetes und von der amerikanischen Lebensmittelüberwachungs- und Zulassungsbehörde *Food and Drug Administration* zugelassenes Polymer ist das nichtionische hydrophile PEG [31]. Auf PEG basierende Hydrogele zeigen sehr niedrige entzündungs- und thrombosefördernde Eigenschaften [91], sowie eine hohe Durchlässigkeit für Sauerstoff, Nährstoffe und andere wasserlösliche Metabolite, wodurch sich ihre Diversität in der medizinischen Anwendung als Kontaktlinsen, Biosensoren, Auskleidung künstlicher Implantate sowie substanzfreisetzender Systeme erklärt [90, 92]. Das Funktionalisieren einer Substanz durch Verbindung mit PEG führt zudem zu einer verlängerten Zirkulation der Substanz im Blut [31]. Verantwortlich hierfür ist eine Erhöhung der molaren Masse und die hieraus resultierende Verminderung der renalen Ausscheidung [31]. Ein Beispiel ist das

pegylierte Interferon- α -2a, welches seit dem Jahr 2000 in der europäischen Union als Medikament zur Therapie der chronischen Hepatitis C eingesetzt wird [31]. PEG-Moleküle verhindern die Ausbildung unspezifischer biomolekularer Interaktionen [58] und vermindern die Proteinaggregation indem sie beispielsweise deren Ladungen maskieren [31]. Dies ermöglicht eine effektive Proteinfreisetzung [58].

1.4 Ziel der Studie

Im Fokus der kardiovaskulären regenerativen Medizin steht die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien, um die Problematik des Mangels transplantierbarer Organe zu begegnen. Bereits erfolgreich angewandte Strategien bestehen in der Applikation von Stammzellen, Biomaterialien oder bioaktiver Faktoren, die zu einer verbesserten Regeneration des geschädigten Organs beitragen. Das Ziel dieser in vitro Studie war es, durch Methoden des Elektrosinnens und der Fotopolymerisation ein Hybrid-Biomaterial herzustellen, welches das Potential zur Kombination dieser drei Strategien besitzt. Zunächst wurden hierzu ETM auf ihre Eignung als stabilisierende 3D-Trägermaterialien untersucht, die das Anwachsen von Zellen ermöglichen. Wir nehmen an, dass die mittels Elektrosinnen hergestellten Trägermaterialien durch Stabilisierung und Bereitstellung von Zellen zur Regeneration geschädigten Gewebes beitragen können. In einem weiteren Schritt testeten wir das Potential sowohl der ETM als auch der Hydrogele als substanzfreisetzende Systeme. Wir vermuten, dass sich insbesondere das Hydrogel für die effektive Proteinfreisetzung eignet. Deshalb wurde detailliert auf die anpassbaren Freisetzungsprofile der Hydrogele eingegangen und der Funktionalitätserhalt eines bifunktionalen Proteins nach der Freisetzung aus dem Hydrogel analysiert. Der Großteil bisheriger Studien konzentrierte sich auf die getrennten Charakteristiken eines ETM oder Hydrogels. Die unzureichende Vaskularisierung von Biomaterialien vor der klinischen Translation stellt

allerdings eine Herausforderung dar. Durch Zusatz von bioaktiven Faktoren, welche die Angiogenese fördern, kann die Vaskularisierung des Materials möglicherweise erhöht werden. Wir nehmen daher an, dass die Kombination eines stabilisierenden ETM mit einem substanzfreisetzenden Hydrogel durch Erreichen einer verbesserten Vaskularisierung die Integration des Biomaterials in den Organismus verbessern kann. Dadurch eröffnet sich möglicherweise die Option des zukünftigen Einsatzes des Hybrid-Biomaterials als epikardiales Flicker-Implantat in der kardiovaskulären regenerativen Medizin.

2 Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien & Geräte

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bestellnummer	Firma
Cellstar® Polypropylen Röhrchen 15 ml	188271	Greiner Bio-One, Fricken- hausen, D
Cellstar® Polypropylen Röhrchen 50ml	227261	Greiner Bio-One, Fricken- hausen, D
Ep Dualfilter Tips® 50-1000 µl	022491253	Eppendorf, Hamburg, D
Ep Dualfilter Tips® 0,5-10 µl	022491229	Eppendorf, Hamburg, D
Falcon® Zellkulturflaschen 75cm ²	353136	Corning®, New York, NY US
Zellkulturflaschen 75cm ² , Ultra Low-Attachment	3814	Corning®, New York, NY US
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System	177402	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten	12565210	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
Nunc™ Zellkultur- Multiwellplatten 24-well	142475	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
Nunc™ Zellkultur- Multiwellplatten 12-well	150628	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
Reaktionsgefäße 1,5 ml	616201	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
BD Falcon®, Kunststoffpipetten 5 ml	356543	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US

BD Falcon [®] , Kunststoffpipetten 10 ml	356551	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
BD Falcon [®] , Kunststoffpipetten 25 ml	356525	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, US
Millipore Steriflip [™] Sterile Filtereinheit, Steriflip, 0,22µm, PES-Membran)	SCGP00525	Fisher Scientific, Hong Kong, CN

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Absaugpumpe	N811KH.18	KNF, Freiburg, D
Brutschrank	BBD 6220	Thermo Fisher Scientific [™] , Waltham, MA, US
Belly Button Shaker	BBUAAUV1S	Stovall Life Science, Greensboro, NC US
Elektrospinn-Aufbau	-	Eigenbau
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Infinite [®] M200 Pro	TECAN, Männedorf, CH
Feinwaage	CPA225D-0CE	Sartorius, Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop	Observer.Z1	Zeiss, Jena, D
Gefrierschrank (-20°C)	Comfort	Liebherr, Bulle, CH
Hochspannungsnetzgerät	13671-93	Phywe Systeme, Göttingen, D
Kolbenhubpipetten	Serological Pipets	Eppendorf, Hamburg, D
Laser-Scanning-Mikroskop	Observer Z1, LSM 710	Zeiss, Jena, D
Invers-Mikroskop	Primovert	Zeiss, Jena, D
Pipettierhilfe	Stripettor [™]	Corning, New York, NY US
PH-/Leitfähigkeitsmessgerät	ProLab 4000	Schott, Mainz, D
Rasterelektronenmikroskop (REM)	LEO 1450 VP	SEMTECH Solutions, North Billerica, MA US

Sputteranlage	SCD 005/CEA 035	BAL-TEC, Witten, D
Stanze	832100 3-30	Hoffmann Group, München, D
Stereomikroskop	Pump 11 Elite	Harvard Apparatus, Holliston, MA US
Sterilbank Zellkultur	Safe 2020 1.2	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
UV-Crosslinker	BLX-365	Peqlab, Erlangen, D
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, NY US
Wasserbad	ED	Julabo, Seelbach, D
Zählkammer	Neubauer, Tiefe 0,1 mm, 0640110	Marienfeld Superior, Lauda Königshofen, D
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA US

2.2 Zellkultur

In der vorliegenden Studie wurden murine endotheliale Progenitorzellen (*murine endothelial progenitor cells*, mEPCs) der Zelllinie t17b zur Testung zytotoxischer Effekte der Biomaterialien und zur Besiedlung elektrogenespinnener Substrate verwendet. Die Bereitstellung der Zellen erfolgte durch Herrn Dr. A.K. Hatzopoulos (Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie, Vanderbilt University, USA). mEPCs wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium high glucose-Medium (41965-039, Lot: 1221768, Life Technologies™, Darmstadt, D) mit Zusatz von 20% Gibco® Fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS; 10270-106, Lot: 41F1615K, Life Technologies™, Darmstadt, D), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (15140-122, Life

Technologies™, Darmstadt, D), nicht-essentiellen Aminosäuren 1% (Gibco® Minimum Essential Medium Non-essential Amino Acids; 11140-035, Life Technologies™, Darmstadt, D) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol (28625, Serva, Heidelberg, D) kultiviert. Des Weiteren verwendeten wir käuflich erworbene humane endotheliale kolonie-formende Zellen (*human endothelial colony-forming cells*; hECFCs, 00189423, Lonza, Basel, CH), welche in Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium, ECGM; C-22010, PromoCell, Heidelberg, D) mit Zusatz eines ECGM Supplement Mix (C-39215, PromoCell, Heidelberg, D), FCS 10%, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und Glutamin 1% kultiviert wurden. Beide Zelltypen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Ein Medienwechsel wurde regelmäßig alle 2 bis 3 Tage durchgeführt, bis die Zellen eine Konfluenz von 70-80% erreichten. Dabei wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x, DPBS; 14190, Life Technologies™, Carlsbad, CA US) gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 3 ml Trypsin-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0,05% für 2 min und hierauf folgendes leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche, wodurch sich die adhärennten Zellen lösten. Der Trypsinverdau wurde durch die Zugabe von 12 ml FCS-haltigem mEPC bzw. hECFC-Medium abgestoppt. Die nun abgelösten Zellen wurden in einem Polypropylen-Röhrchen bei 188 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe unten) erfolgte die erneute Aussaat der mEPCs in einer Dichte von 1,5-2 x 10⁵ Zellen/cm², sowie der hECFCs in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/cm². Die hECFCs wurden bis zur Passage 9 für die Versuchsdurchführung verwendet. Das Zählen der Zellen erfolgte mithilfe einer Neubauer Zählkammer durch Färbung der toten Zellen mit Trypanblau (4%; T8154, Sigma Aldrich, Steinheim, D). Hierfür wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau gemischt und 10 µl hiervon

in eine Zählkammer mit einem Volumen von 0,1 µl pipettiert. Es ergibt sich hierdurch ein Kammerfaktor von $10^4/\text{ml}$. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden vier Quadranten (bestehend aus jeweils 4 x 4 Kleinquadraten) ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Vitale Zellen mit einer intakten Zellmembran nehmen im Gegensatz zu toten Zellen den Farbstoff nicht ins Zellinnere auf. Es ist daher möglich gleichzeitig vitale und tote Zellen zu unterscheiden und deren Zellzahl zu bestimmen. Die Gesamtzahl der vitalen Zellen pro ml ergibt sich aus Multiplikation der ausgezählten vitalen Zellen, des Verdünnungsfaktors und des Kammerfaktors (Berechnung: $n \times 2 \times 10^4 = N$; n = Mittelwert der ausgezählten Zellen; N = Zellen pro ml).

2.3 Biomaterialherstellung

2.3.1 Generierung eines elektrogesponnenen Trägermaterials

Der in dieser Studie verwendete Elektrosponner-System Aufbau bestand aus drei Hauptkomponenten: einem Hochspannungsnetzgerät, einer Spindüse und einer Kupferplatte, welche als geerdeter Kollektor diente. Zum Herstellen einer spinnbaren Lösung wurde der Polymerfeststoff aus Polylactid (PLA; 93578, Sigma Aldrich, Steinheim, D) oder Polylactid-co-Glycolid (PLGA; 430471, Sigma Aldrich) in der gewünschten Konzentration unter einem Abzug in dem organischen Lösungsmittel 1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol (HFP; 8045150100, Lot: S6525715246, Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur (RT) gelöst. Die so entstandene Lösung wurde in eine Spritze gefüllt, an deren Ende sich eine Nadel des Durchmessers 18 Gauge (G) befand. Der Abstand der Nadelspitze zum geerdeten Kollektor betrug 17 ± 1 cm. Die Generierung von Polymerfasern erfolgte nach dem oben beschriebenen und bereits etablierten Prinzip [93], wobei abhängig von Umgebungsparametern wie beispielsweise der Luftfeuchtigkeit eine Spannung von 20 ± 2 kV verwendet wurde. Nach dem Trocknen bei RT wurde das ETM bei -20°C gelagert. Zur Vorbereitung auf das

Anfertigen von Aufnahmen mithilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) wurde das ETM mit Gold bedampft. Anschließend erfolgte das Erstellen der REM-Aufnahmen. Zur Bestimmung des Faserdurchmessers ($n = 50$) und der Porengröße ($n = 25$) wurde das ETM in einer 2000-fachen Vergrößerung ausgemessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet. Mithilfe einer Kontaktwinkelmessung konnte die Hydrophobie der ETM aus PLA bestimmt werden. Hierzu wurde ein Wassertropfen mit einem Volumen von 2 μl auf dem ETM platziert. Der entstehende Winkel zwischen der Tropfenoberfläche und ETM wurde mit einer Kamera aufgenommen und mithilfe der SCA20 Software (DataPhysics Instruments, Filderstadt, D) analysiert.

2.3.2 Hydrogelherstellung und Stabilitätsmessung

Die Hydrogelherstellung erfolgt durch UV-vermitteltes Vernetzen der Polymerketten aus Polyethylenglycol diacrylate (PEGda; M_n 6000, 701963, Sigma Aldrich, Steinheim, D). Zunächst erfolgte das Lösen von 150 mg PEGda in 1 ml DPBS unter mehrmaligem Mischen bei RT. Durch Zugabe von 10 mg des Fotoinitiators Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone Irgacure 2959 (I 2959; 410896, Lot: 20196LJV, Sigma Aldrich, Steinheim, D) in 1 ml Ethanol (ETOH) 70% (1009832511, Merck, Darmstadt, D) entstand eine Stammlösung mit der Konzentration von 10 mg/ml. Der gesamte Herstellungsprozess erfolgte unter Vermeidung von UV-Einstrahlung. Kurz vor dem Vernetzungsprozess wurden 75 μl der I 2959-Stammlösung zur PEGda-DPBS-Lösung zugegeben, vorsichtig vermischt und die Lösung in eine dem Experiment entsprechende Multiwellplatte pipettiert. Das Vernetzen der Polymerketten erfolgte mit einem Energieeintrag von 3 Joule bei einer Wellenlänge von 365 nm und einer UV-Lichtintensität von 5 mW/cm^2 . Die hergestellten soliden Hydrogele wurden vorsichtig aus den Multiwellplatten herausgelöst und auf einer Feinwaage vermessen. Anschließend wurden sie in eine größere Multiwellplatte transferiert, um das Aufquellen zu ermöglichen, mit

DPBS bedeckt und bei 37°C und 5% CO₂ für einen Zeitraum von 4 Wochen inkubiert. Zur Überprüfung der Stabilität unter diesen Konditionen wurden die Hydrogele nach 2, 4, 16, 24, 168 und 816 Stunden (h) aus dem DPBS entnommen und ebenfalls auf der Feinwaage vermessen.

2.3.3 Hybrid-Biomaterial-Herstellung

Zur Herstellung des Hybrid-Biomaterials bestehend aus einem Hydrogel und einem ETM wurde eine kreisförmig ausgestanzte ETM-Fläche vor dem Schritt der UV-vermittelten Vernetzung auf der flüssigen Hydrogellösung platziert. Anschließend erfolgte durch UV-Bestrahlung wie bereits beschrieben die Herstellung des soliden Hydrogels, dessen Oberfläche der Oberseite nun von einem ETM gebildet wird.

2.3.4 Zytotoxizitätsversuche

Zur Vorbereitung auf die Zytotoxizitätsversuche wurden mEPCs wie oben beschrieben gezählt und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Pro ETM, welches aus PLA hergestellt wurde, Hydrogel und Hybrid-Biomaterial wurden 3 Tropfen á 20 µl, die jeweils 5×10^4 Zellen enthielten, vorsichtig auf die Oberfläche des jeweiligen Biomaterials aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 30 min hafteten die Zellen an dem Biomaterial. Danach konnten 2 ml mEPC-Medium hinzugegeben werden, ohne die Zellen abzuwaschen. Sowohl die Kultivierung der Zellen auf dem ETM allein als auch auf dem Hybrid-Biomaterial erfolgte für einen Zeitraum von 3 Tagen. Die Kultivierung der Zellen auf dem Hydrogel allein wurde für 4 Tage durchgeführt um eine verbesserte Anhaftung der Zellen zu erreichen. Anschließend wurde das Medium aus den Multiwellplatten entfernt und die Zellen vorsichtig mit DPBS gewaschen. Zur Untersuchung der Zellen auf dem ETM wurden REM-Bilder des besiedelten ETM aufgenommen. Die Fixierung der Zellen zur Vorbereitung auf die REM-Aufnahmen erfolgte durch Inkubation

mit 0,5 ml Glutaraldehyd 25% (G5882, Sigma Aldrich) für 30 min bei RT. Die weitere Durchführung der Akquisition der REM-Bilder erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Bestimmung der Zellvitalität auf dem Hybrid-Biomaterial und dem Hydrogel wurde ein Test basierend auf 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Reduktion von MTT (20395, Serva, Heidelberg, D), einem gelblichen Farbstoff, welcher durch intrazelluläre Enzyme zu dem bläulich-violetten Formazan reduziert wird und hiermit das Vorhandensein eines funktionierenden Zellstoffwechsels beweist [94]. Die Konzentration der MTT-Arbeitslösung betrug 3 mg/ml in mEPC-Medium und wurde abgedunkelt bei RT hergestellt. Nach Absaugen des mEPC Mediums in den Multiwellplatten wurden je 2 ml der MTT-Arbeitslösung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Hybrid-Biomaterialien und Hydrogele aus den Multiwellplatten entnommen, fotografiert und die Färbung der Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

2.4 Messung der Proteinfreisetzung

Vorversuche zur Eignungstestung des ETM und des Hydrogels als proteinfreisetzende Depotsysteme wurden mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Testprotein durchgeführt. Anschließend wurden ebenfalls ein Protein mit einer *stromal cell-derived factor-1* (SDF1)-Domäne und einer Glykoprotein (GP)-VI-Domäne (SDF1-GPVI) sowie ein weiteres bifunktionales Protein (CD133-GPVI) in die Hydrogele eingearbeitet und ihre Freisetzung analysiert.

2.4.1 Freisetzung des Proteins BSA aus ETM

Um die Eignung der ETM als proteinfreisetzendes Material zu testen, wurden vier unterschiedlich zusammengesetzte Polymerlösungen hergestellt, die jeweils 10% des Modelproteins bovines Serumalbumin (BSA; A9576, Sigma Aldrich, Steinheim, D) enthielten (Tabelle 7). Die soliden Polymeranteile aus

PLA, PLGA und PEG (202398, Sigma Aldrich, Steinheim, D) wurden abgewogen und in 1,8 ml HFP gelöst, um die gewünschte Zusammensetzung der spinnbaren Polymerlösung zu erhalten.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Polymerlösungen, die mit BSA und mithilfe der hier dargestellten Parameter versponnen wurden.

Zusammensetzung der Polymerlösung	Nadelgröße [G]	Spannung [kV]
20% PLA	18	20-22
20% PLGA	18	18-22
12,5% PLA, 12,5% PEG	15	20-25
12,5% PLGA, 12,5% PEG	15	20-25

Das Lösen von 0,02 g BSA erfolgte in 200 µl Corning™ Cellgro™ Zellkulturwasser (MT-25-055-LG, Corning, Corning US). Die hierdurch entstandene Proteinlösung wurde kurz vor dem Befüllen der Spritze des Elektrosplinnapparates zur Polymerlösung zugegeben. Es folgte das Verspinnen der Polymer-Protein-Lösung. Die ausgestanzten ETM wurden in eine 24-well Platte überführt, mit 1,5 ml DPBS bedeckt und über einen Zeitraum von 22 Tagen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Sofort nach Versuchsbeginn, sowie an Tag 1, 8, 15 und 22 des Versuchs wurden 70 µl des Zellkulturwassers entfernt und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde mittels eines Bradford-Tests durchgeführt. Das Prinzip des Bradford-Tests beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm (rot-braun) zu 595 nm (blau) durch dessen Anlagerung an das Protein [95]. Hierbei nimmt die Absorption bei 595 nm proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung zu. Die Durchführung des Bradford-Tests erfolgte nach Anleitung des Herstellers, wobei Proben des Überstands der ETM für 5 min mit einer Roti® Nanoquant Bradford Lösung (K880.2, Carl Roth, Karlsruhe, D) inkubiert wurden.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Absorption mittels des Mikrotiterplatten-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.4.2 BSA-Freisetzung aus UV-vernetzten Hydrogelen

2.4.2.1 Variation der verkapselten BSA-Konzentration

Für diesen Versuch wurden Hydrogele mit einem Volumen von 500 μl wie oben beschrieben hergestellt. Die Zugabe der des Modelproteins BSA erfolgte hierbei vor dem Vernetzungsschritt. Zu Anfang wurde eine I 2959-Stammlösung mit einer Konzentration von 100 mg/ml in ETOH 70% hergestellt. Die PEGda-BSA-Lösung sollte mithilfe einer I 2959-Konzentration von 1 mg/ml vernetzt werden, weshalb pro Hydrogel 5 μl der I 2959-Stammlösung zur PEGda-Protein-Lösung zugegeben wurden. Die Konzentration der BSA-Stammlösung betrug 100 mg/ml. Um Hydrogele mit unterschiedlichem BSA-Konzentrationen (1000, 5000 und 10000 $\mu\text{g/ml}$) herzustellen, wurde das passende Volumen der BSA-Stammlösung zur PEGda-Lösung zugegeben (Tabelle 8). Auch hier erfolgte die UV-vermittelte Vernetzung durch UV-Bestrahlung der Lösung mit 3 J und 5 mW/cm^2 . Anschließend wurden die Hydrogele aus den Multiwellplatten entnommen und mit 3 ml DPBS bedeckt. Sofort sowie 2, 4, 8, 24, 48 und 168 h nach Einbringen der Hydrogele in DPBS wurden 75 μl des Überstands entnommen und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand erfolgte ebenfalls mithilfe eines Bradford-Tests.

Tabelle 8: Zusammensetzung der PEGda Lösungen unterschiedlicher BSA-Konzentrationen

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	μl aus BSA-Verdünnung	μl aus I 2959-Lösung	μl DPBS
10000	50 aus 100 mg/ml	5	445
5000	25 aus 100 mg/ml	5	470
1000	5 aus 100 mg/ml	5	490

2.4.2.2 Variation der I 2959-Konzentration

Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuchsaufbau enthielten alle Hydrogele in diesem Versuch die willkürlich gewählte gleichbleibende BSA Konzentration von 3200 µg/ml. Das Ziel war die Herstellung von Hydrogelen unterschiedlicher Netzwerkdichte durch die Verwendung unterschiedlicher I 2959-Konzentrationen (750, 1000 und 5000 µg/ml). Diese konnten durch Zugabe angepasster Volumina der I 2959 Stammlösung erhalten werden (Tabelle 9). Die Zeitpunkte der Probenentnahme und der weitere Versuchsaufbau zur Proteinbestimmung entsprachen dem vorigen Versuch.

Tabelle 9: Zusammensetzung der PEGda-Lösungen unterschiedlicher I 2959-Konzentrationen

I 2959 (µg/ml)	µl aus I 2959 Lösung	µl BSA-Lösung	µl DPBS
750	7,5 aus 100 mg/ml	32	460,5
1000	10 aus 100 mg/ml	32	458
5000	50 aus 100 mg/ml	32	418

2.4.3 Freisetzung der Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI aus den Hydrogelen

Hydrogele mit einem Volumen von 75 µl dienten zur Überprüfung der Freisetzung der bifunktionalen Proteine. Hierfür wurden Hydrogele mit Konzentrationen von 50 bzw. 100 µg/ml des jeweiligen Proteins generiert. Beide Proteine wurden uns freundlicherweise bereitgestellt von Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz (Abteilung für Kardiologie und Kreislauferkrankungen, Eberhard Karls Universität Tübingen, D). Die Herstellung der Hydrogele erfolgte analog der obigen Versuche. Nach einmaligem Waschen mit DPBS wurden sie für 7 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ in 1,5 ml DPBS inkubiert. Proben bestehend aus 200 µl Überstand wurden nach 48, 96 und 168 h entnommen und bei -80 °C

gelagert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration konnte ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Kit (0801182, Immunotek™, Buffalo, NY US) verwendet werden, der auf dem spezifischen Nachweis humaner Immunglobulin (IgG)-Domänen beruht. Sowohl SDF1-GPVI als auch CD133-GPVI enthalten eine IgG₂-Domäne. Die Durchführung des ELISA-Tests erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die Absorption zur Proteinquantifizierung wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes detektiert.

2.5 Überprüfung der Bindungsfähigkeit der GPVI-Domäne

2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung einer humanen Arterienwand

Um die Lamininexpression in den Arterienwänden nachzuweisen, verwendeten wir Gewebeschnitte der Arteria carotis von Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterzogen hatten. Hierfür erhielten wir die Erlaubnis der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und der Landesärztekammer Baden-Württemberg (*Institutional Review Board* # 694/2012BO1 und F-2011-068). Die Aufarbeitung der humanen Arterien erfolgte wie bereits in früheren Publikationen beschrieben [96]. Nach Entfernen des Paraffins wurden die Gewebeproben in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Um die Antigenbindungsstellen für Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung erneut zugänglich zu machen, wurden die Proben für 8 min in 10 mM Tris(hydroxyethyl)aminomethan (Tris), 1 mM EDTA, Tween 20 0,05% (pH 9,0) und 10 mM Citrat-Lösung in DPBS (pH 6,0) gekocht. Unspezifische Bindungsstellen wurden mithilfe eines Blockierungspuffers aus BSA 1%, Triton-X-100 0,1% (1%, T8787, Sigma Aldrich, Steinheim, D), Gelatine 0,1% aus Kaltwasserfischen (G7765, Sigma-Aldrich, Steinheim, D), Tween 20 0,05% (P1379, Sigma Aldrich, Steinheim, D) und Ziegenserum 2%

(S-1000, Vector Labs, Burlingame, CA US) für 30 min bei RT blockiert. Die weitere Aufarbeitung der Gewebeschnitte erfolgte wie in früheren Publikationen beschrieben [97]. Die Lamininfärbung wurde mithilfe eines 1:50 verdünnten Pan-Laminin-Antikörpers (ab11575, abcam®, Cambridge, UK) über Nacht bei 4°C durchgeführt. In einem darauffolgenden Inkubationsschritt wurde der sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 594-konjugierten goat anti-rabbit IgG (1:250, A-11037, Life Technologies, Paisley, UK) bei RT für 30 min hinzugegeben. Anschließend konnten die Zellkerne durch Inkubation mit 4,6-Diamin-2-phenylindol (DAPI; 124653, Merck, Darmstadt, D) für 30 min bei RT angefärbt werden. Die Schnitte wurden zum Erhalt der Fluoreszenzintensität in ProLong® Gold antifade Reagenz (P36394, Life Technologies, Paisley, UK) eingebettet. Nachfolgend wurden Aufnahmen mithilfe eines Axio Observer Fluoreszenzmikroskops angefertigt.

2.5.2 Messung der durch Bindung der GPVI-Domäne an Col I erzeugten Signalintensität

Zunächst untersuchten wir mittels eines ELISA-Tests die GPVI-Domäne des Proteins SDF1-GPVI auf die Fähigkeit spezifisch an Kollagen Typ I (Col I) zu binden. Hierfür wurde SDF1-GPVI in DPBS gelöst und nach Zugabe von 0,5 M EZ Link Sulfo NHS LC Biotin (21335, Pierce, Rockford, US) für 1 h bei 27,5 °C inkubiert. Die Biotinylierung wurde durch Zugabe von Trizma® Base (pH 9,5; T1503, Sigma Aldrich, D) unterbrochen. Das in dieser Studie verwendete Col I wurde aus boviner Haut gewonnen und wie bereits in früheren Publikationen beschrieben verarbeitet [98]. Laminin-111 (354232, BD Biosciences, Bedford, US) oder BSA (Fraction V BSA; A13910500, Applichem, Darmstadt, D) dienen als Kontrollproteine und wurden analog zu Col I in einer Konzentration von 10 µg/ml zur Beschichtung der Multiwellplatten eingesetzt. Diese erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einem Waschschrift mit Tris-Buffered Saline (TBS) wurden die Multiwellplatten für 90 min mit BSA 1% inkubiert, um

unspezifische Bindungsstellen der Beschichtungsproteine zu blockieren. Nun wurde die gewünschte Konzentration des Proteins SDF1-GPVI in TBS und BSA 5% zu den mit Col I, Laminin-111 oder BSA beschichteten Multiwellplatten zugegeben und bei RT für 90 min inkubiert. Dies ermöglichte die Proteinbindung. Es folgte ein Waschschrift mit 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer, 150 mM Natriumchlorid, 2 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Manganchlorid, pH 7,4). Anschließend wurde die Bindung des Proteins an die beschichteten well-Kammern durch Inkubation mit Glutaraldehyd 2,5% (ZC881439041, Merck, Darmstadt, D) für 10 min fixiert. Nach Waschen der well-Platten mit TBS folgte die Inkubation mit dem Antikörper ExtrAvidin® (1:1000; E2636, Sigma Aldrich, Steinheim, D) für 90 min bei RT. Das Zugeben des Substrats 4-Nitrophenylphosphat disodium salt hexahydrate (N9389, Sigma Aldrich, Steinheim, D) führte zur Beendigung der Reaktion und Darstellung der Proteinbindung. Die zugehörige Inkubationszeit war hierbei abhängig von der Entwicklung eines erkennbaren Bindungssignals und belief sich auf 5 bis 25 min. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mithilfe von 1,5 M NaOH (A1551, AppliChem, Darmstadt, D). Mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes wurde anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt.

2.6 Testung der Bindungskapazität der SDF1-Domäne an hECFCs

Die SDF1-Domäne bindet an den Chemokinrezeptor 4 des CXCR-Motives (CXCR4) auf Zellen, um mit ihnen zu interagieren.

2.6.1 Darstellung des CXCR4-Rezeptors auf hECFCs

Um den Zellen die Adhärenz an die Oberfläche des Objektträgersystems (Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide System) zu ermöglichen, wurden diese zunächst mit Gelatine 0,1% aus Schweinehaut (G1890, Sigma Aldrich,

Steinheim, D) beschichtet. Die Aussaat der hECFCs erfolgte in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro well-Kammer. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurden die adhärennten Zellen mit DPBS gewaschen und danach durch 10-minütige Inkubation mit Paraformaldehyd 4% (11762.01000, Morphisto, Frankfurt, D) bei RT fixiert. Nach dem Waschen mit DPBS folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit einer Ziegenserum enthaltenden Blockierlösung für 30 min. Über Nacht folgte die Inkubation des spezifisch gegen den Oberflächenrezeptor CXCR4 gerichteten Antikörpers (1:100, ab2074, abcam®, Cambridge, UK). Danach wurde der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper Alexa Fluor® 488 goat rabbit IgG (A-11034, Invitrogen, Life Technologies™, Carlsbad, CA US) zugegeben und für 25 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS wurden die Zellkerne mit DAPI-Lösung angefärbt. Es folgte die Einbettung in ProLong® Gold antifade reagent. Die Lagerung der Schnitte erfolgte abgedunkelt bei -20 °C bis zur Aufnahme fluoreszenzmikroskopischer Bilder.

2.6.2 Bindung von SDF1-GPVI an CXCR4 auf hECFCs

HECFCs wurden mit einer Zelldichte von $1,7 \times 10^5$ Zellen pro ml auf einem mit Gelatine 0,1% beschichteten Objektträgersystem ausgesät und für 16 h kultiviert. Nach einem Waschschrift mit DPBS folgte die Inkubation mit einer Ziegenserum enthaltenden Blockierlösung für 30 min. Um zwischen frischem und freigesetztem SDF1-GPVI unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit Überstand der Hydrogele inkubiert, welche 240 ng aus dem Hydrogel freigesetztes SDF1-GPVI enthielten ($n = 9$). Dieselbe Menge an frischem SDF1-GPVI in DPBS wurde als Positivkontrolle, und DPBS ohne Zusätze als Negativkontrolle verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Zellen einmalig mit DPBS gewaschen. Die Fixierung der Proteinbindung von SDF1-GPVI an den CXCR4-Rezeptor konnte durch Zugabe von Paraformaldehyd 4% für 10 min erreicht werden. In diesem Versuch agiert das

Protein SDF1-GPVI ähnlich wie ein primärer Antikörper, indem es spezifisch an den CXCR4-Rezeptor der hECFCs bindet. Um die Proteinbindung detektieren zu können, folgte die Inkubation mit einem Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-konjugierten humanen IgG-Antikörper (1:50, 109-095-098, Jackson Immuno Research, West Grove, PA US) für 90 min im Dunkeln. Nach Waschen mit DPBS wurden die Zellkerne durch Inkubation mit DAPI-Lösung für 15 min angefärbt. Anschließend konnten fluoreszenzmikroskopische Bilder mithilfe des Axio Observer Mikroskops erstellt werden. Die Software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD US) wurde verwendet um die Fluoreszenzintensität des freigesetzten sowie des frischen SDF1-GPVI als Grauwert (*gray value intensity*, GVI) zu ermitteln, und mit der GVI der Negativkontrolle zu vergleichen. Hierdurch gelang eine Semiquantifizierung der an die Zellen gebundenen Proteinmenge.

2.7 Statistik, Analyse und Darstellung der Ergebnisse

Alle *in vitro* Experimente wurden mindestens 3 Mal durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Datenauswertung erfolgte mittels einer Varianzanalyse (*one-way Analyse of variance*, ANOVA) unter Verwendung des Computerprogramms OriginPro 8G (OriginLab Corporation, Northhampton, MA US). Des Weiteren wurden die statistische Auswertung (ANOVA) sowie das Erstellen von Diagrammen durch Einsatz der Software GraphpadPrism (Software Mackiev™, La Jolla, CA US) vorgenommen. Ab einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde das Ergebnis als statistisch signifikant betrachtet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Photoshop CS5 (Adobe Systems, San José, CA US).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung eines strukturstabilisierenden ETM

Zu Beginn der Arbeit wurden mithilfe des Elektrospinnens Fasernetzwerke aus unterschiedlichen Polymeren hergestellt. Ihre Morphologie und ihre Handhabbarkeit erinnerten dabei an eine Art Taschentuch. Die nachfolgend angefertigten REM-Aufnahmen erbrachten Erkenntnisse über die Anordnung der Fasern und die Faserstruktur. Das Ausmessen der Fasern ermöglichte die Berechnung des Faserdurchmessers und der Porengröße eines PLA-ETM (Tabelle 10). Der Kontaktwinkel der ETM-Oberfläche betrug hierbei $> 90^\circ$. Weiterhin zeigten die angefertigten REM-Bilder des PLA-ETM in einer 500- und 2000-fachen Vergrößerung eine homogene Faserstruktur, sowie eine willkürliche Anordnung der Fasern (Abbildung 3 A, B).

Tabelle 10: Maße eines ETM, hergestellt aus PLA 20% in HFP.

Eigenschaft	Maße
Faserdurchmesser	$3,46 \pm 0,54 \mu\text{m}$
Porengröße	$595,61 \pm 459,80 \mu\text{m}$
Dicke der Faserlagen	$\sim 100 \mu\text{m}$
Kontaktwinkel	$131,83 \pm 2,77^\circ$

Neben PLA verwendeten wir das Polymer PLGA zur Herstellung des ETM. Die hiervon angefertigten REM-Aufnahmen zeigten analog zum PLA-ETM eine homogene Faserstruktur in beiden Vergrößerungen und eine willkürliche Anordnung der Polymerfasern (Abbildung 3 C, D).

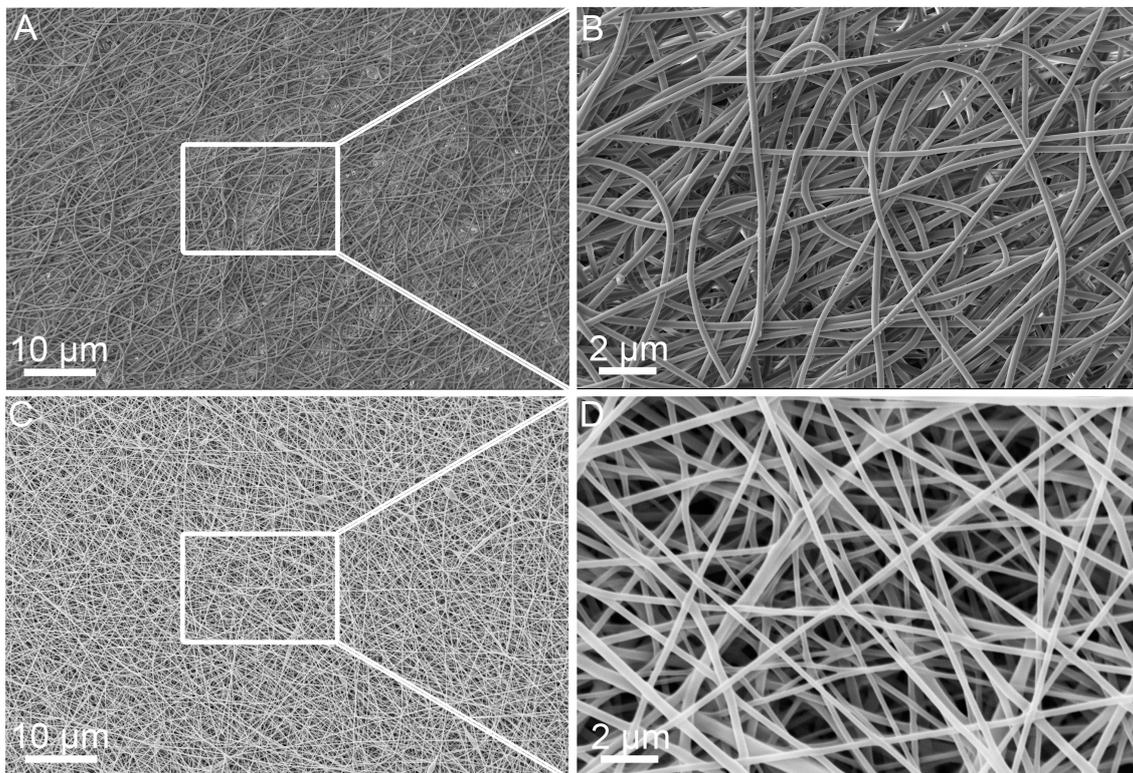


Abbildung 3: REM-Aufnahmen eines elektrogewebenen Fasernetzwerks, hergestellt mithilfe von unterschiedlichen Polymerlösungen. (A, B) PLA 20% in HFP, (C, D) PLGA 15% in HFP. (B, D) zeigen eine höhere Vergrößerung von (A, C), veranschaulicht durch die weiße Box.

Zur Herstellung eines Hybrid-Biomaterials als Kombination aus ETM und Hydrogel wurde das Fasernetzwerk auf die Hydrogeloberfläche aufgebracht, welches somit das Anhaften der beiden Materialien aneinander ermöglichte. Eine andere Methode die beiden Materialien miteinander zu verbinden, bildete das Einbringen des ETM in die PEGda Lösung vor der Fotopolymerisation. Hierbei wurde das ETM während der UV-Belichtung in das solide Hydrogel integriert (Abbildung 4 A). Wir konnten somit zeigen, dass eine solide Verbindung der beiden Materialien möglich ist. Das hierdurch entstandene Hybrid-Biomaterial konnte problemlos mithilfe einer Pinzette transferiert werden und wies daher eine gute Handhabbarkeit auf.

Zur Untersuchung der Eignung des ETM als Matrix für die 3D-Zellkultivierung wurden mEPCs für 3 Tage auf dem ETM und zusätzlich auf dem Hybrid-Biomaterial kultiviert. Die Vitalität der Zellen konnte mithilfe eines MTT-Tests veranschaulicht werden (Abbildung 4 B). Dabei weist die Blaufärbung der Zellen auf eine vorhandene Stoffwechselaktivität hin. Hierdurch wird verdeutlicht, dass weder die ETM noch das Hybrid-Biomaterial während des beobachteten Zeitraums, und den hier angewandten Versuchsbedingungen, einen zytotoxischen Effekt besitzen. Die Zelladhärenz auf dem ETM konnte nach 3-tägiger Kultivierung mithilfe von REM-Aufnahmen in einer 500-fachen (Abbildung 4 C) und einer 2000-fachen (Abbildung 4 D) Vergrößerung nachgewiesen werden. Dabei war ein dichter Zellrasen an der Oberfläche des ETM erkennbar. Weiterhin konnten einzelne Zellen identifiziert werden, die tiefer in das Fasernetzwerk vorgedrungen waren. Auffallend ist hierbei, dass sich die Zellen auf dem Hybrid-Biomaterial aus ETM und Hydrogel bevorzugt im Bereich des ETM ansiedeln. Dies wird durch die MTT-bedingte Blaufärbung der Bereiche in denen das ETM als Oberfläche dient veranschaulicht. Das ETM ist demnach ein geeignetes Hilfsmittel zur Ermöglichung einer 3D-Zellkultur.

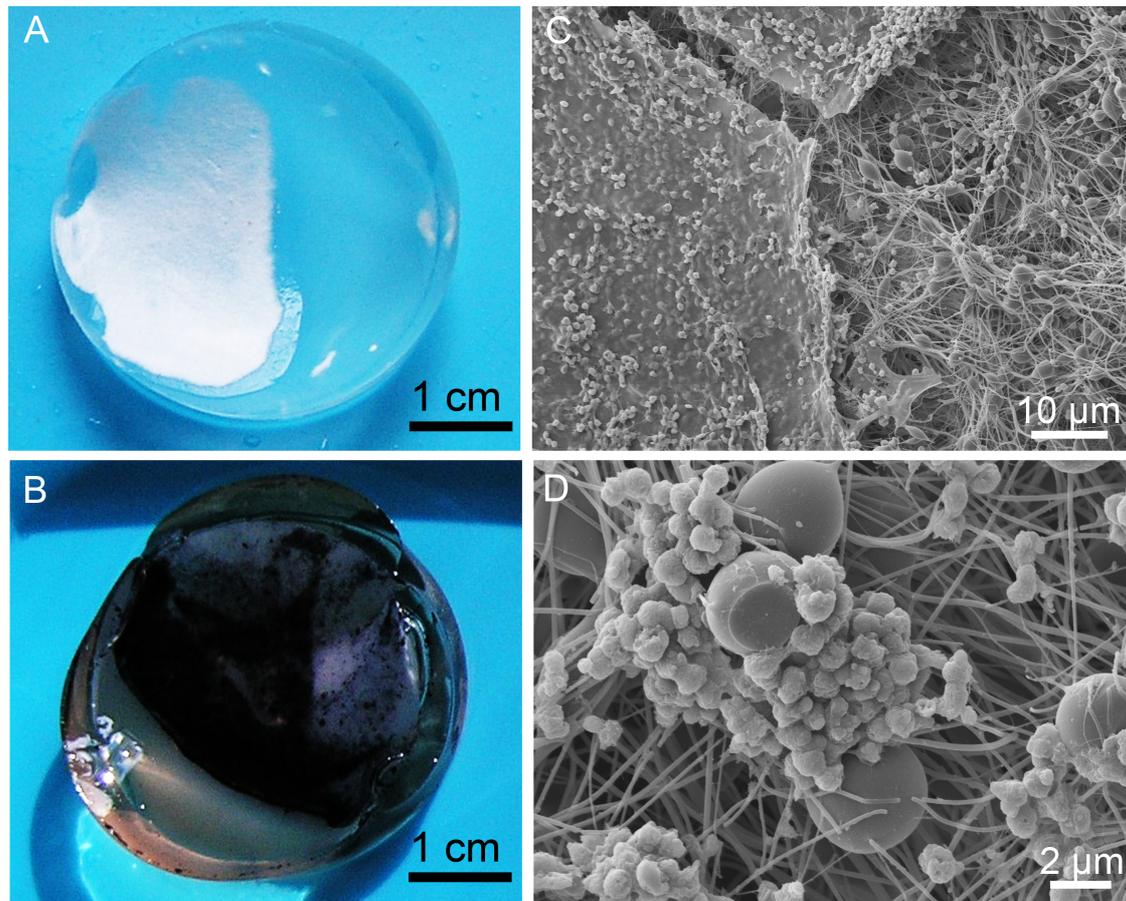


Abbildung 4: Aufnahmen des Hybrid Biomaterials. (A, B) Kombination aus Hydrogel und ETM. Fotografie vor (A) und nach (B) Besiedlung mit Zellen sowie durchgeführtem MTT-Test. Die blau-violette Färbung weist auf stoffwechselaktive Zellen hin. (C, D) REM-Aufnahmen eines elektrogesponnenen PLA-ETM, welches mit mEPCs bewachsen ist; (C) zeigt eine 500-fache, (D) eine 2000-fache Vergrößerung.

3.2 Generierung eines hydrolytisch beständigen und nicht zytotoxischen Hydrogels

Durch Zugabe des Fotoinitiators I 2959 zur PEGda Polymerlösung und konsekutiver UV-Bestrahlung konnte durch Verknüpfung der sich in der flüssigen Polymerlösung befindlichen PEGda Polymerketten ein solides Hydrogel hergestellt werden (Abbildung 5 A, B). Das Hydrogel ähnelte dabei in seiner Morphologie einer Kontaktlinse und wies eine gute Handhabbarkeit auf (Abbildung 5 C). Zur Stabilitätsbestimmung des Hydrogels in wässrigem Medium wurde das Gewicht des Hydrogels zu definierten Zeitpunkten gemessen. Hierbei wurde ein Gesamtzeitraum von 816 h (entspricht 34 Tagen) gewählt. Ein signifikanter Gewichtsanstieg wurde zwischen 0 und 2 h nach Einbringen des Hydrogels in DPBS beobachtet ($p = 0,0009$; 0 h: 454 ± 24 mg versus 2 h: 557 ± 28 mg) (Abbildung 5 D). Dies deutet auf das hohe Quellpotential des Biomaterials hin. Nachfolgend blieb das Gewicht für die gesamte Beobachtungszeit der 816 h stabil. Es kommt während der genannten Zeit demnach nicht zu einem Abbau des Materials in wässrigem Medium. Dies veranschaulicht die hydrolytische Stabilität des Hydrogels.

Analog zu den ETM wurde nach 4-tägiger Kultur der mEPCs auf Hydrogelen die Vitalität der mEPCs mittels eines MTT-Tests untersucht (Abbildung 5 E, F). Die Zellen bildeten hierbei Aggregate und waren leicht vom Hydrogel ablösbar. Die Adhäsion der mEPCs war demnach nicht stark ausgeprägt. Die Hydrogele eigneten sich daher nicht für die adhärente Zellkultivierung der mEPCs. Allerdings waren die auf dem Hydrogel kultivierten Zellen nach einem Zeitraum von 4 Tagen in der Lage, einen Farbumschlag zu blau-violett auszulösen. Dies deutet auf die Vitalität der Zellen hin. Die Hydrogele zeigen demnach unter den angewandten Versuchsbedingungen keine zytotoxischen Auswirkungen auf die mEPCs.

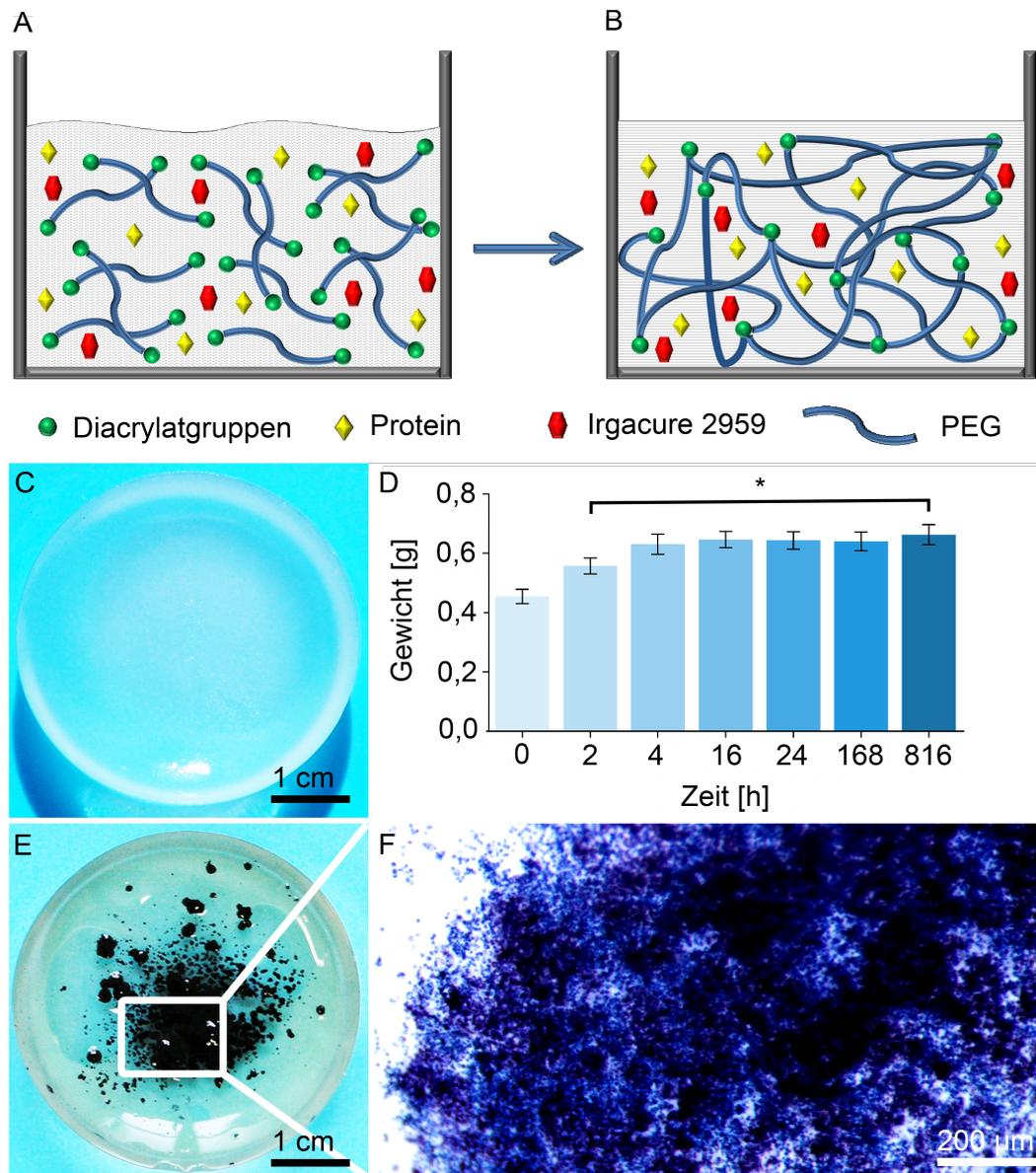


Abbildung 5: Generation eines hydrolytisch stabilen und nicht zytotoxischen Hydrogels. (A, B) Schema der Fotopolymerisation. Aus einer flüssigen Mischung aus Polymer und I 2959 (A) entsteht nach UV-Bestrahlung ein solides Hydrogel (B). (C) Fotografie des soliden Hydrogels (D) Quelleigenschaften des Hydrogels, *p < 0,05 2, 4, 16, 24, 168 und 816 h versus 0 h nach dem Herstellungsprozess. (E, F) MTT-Test der auf den Hydrogelen kultivierten mEPCs. Die blaue Färbung weist auf lebende Zellen mit einer erhaltenen Stoffwechselaktivität hin. (D) Eine höhere Vergrößerung der eingerahmten Bildfläche von (E). Abbildung entnommen aus [99].

3.3 ETM und Hydrogele zur definierten Freisetzung von Proteinen

3.3.1 BSA-Freisetzung aus ETM

Zur Evaluation des Potentials der ETM als substanzfreisetzende Depotsysteme untersuchten wir die Verkapselung und Freisetzung des Proteins BSA aus den Polymerfasern. Zur Fabrikation der ETM wurden vier unterschiedlich zusammengesetzte Polymerlösungen hergestellt (PLA 20%, PLA 12,5% und PEG 12,5%, PLGA 20%, PLGA 12,5% und PEG 12,5%, jeweils gelöst in HFP) und mit BSA in wässrigem Medium emulgiert. Jede der unterschiedlichen Lösungen konnte mithilfe des Elektrosplinnens verarbeitet werden. Die REM-Bilder der reinen PLA- und PLGA-ETM zeigten trotz BSA-Zugabe eine glatte Fasermorphologie mit einer homogenen Faser- und Porenstruktur (Abbildung 6 A, C). Im Vergleich hierzu war die Fasermorphologie der PLA/PEG- und PLGA/PEG-ETM weniger glatt und sehr unregelmäßig (Abbildung 6 B, D).

Die besponnene Gesamtfläche eines ETM betrug $93,31 \text{ cm}^2$ und enthielt eine Gesamtmenge von $0,02 \text{ g}$ BSA. Die ausgestanzten ETM hatten einen Durchmesser von $1,8 \text{ cm}$. Demnach belief sich die ausgestanzte Fläche auf $2,54 \text{ cm}^2$ und ein ausgestanzter Anteil des ETM enthielt im Durchschnitt $544 \text{ }\mu\text{g}$ BSA. Die Polymermischung aus PLA/PEG bzw. PLGA/PEG zeigte nach dem Elektrosplinnen eine schwierige Handhabbarkeit. Dadurch wurde die weitere Verarbeitung wie beispielsweise das Ausstanzen und Transferieren in die Multiwellplatten im Vergleich zu reinen PLA- sowie PLGA-ETM erschwert.

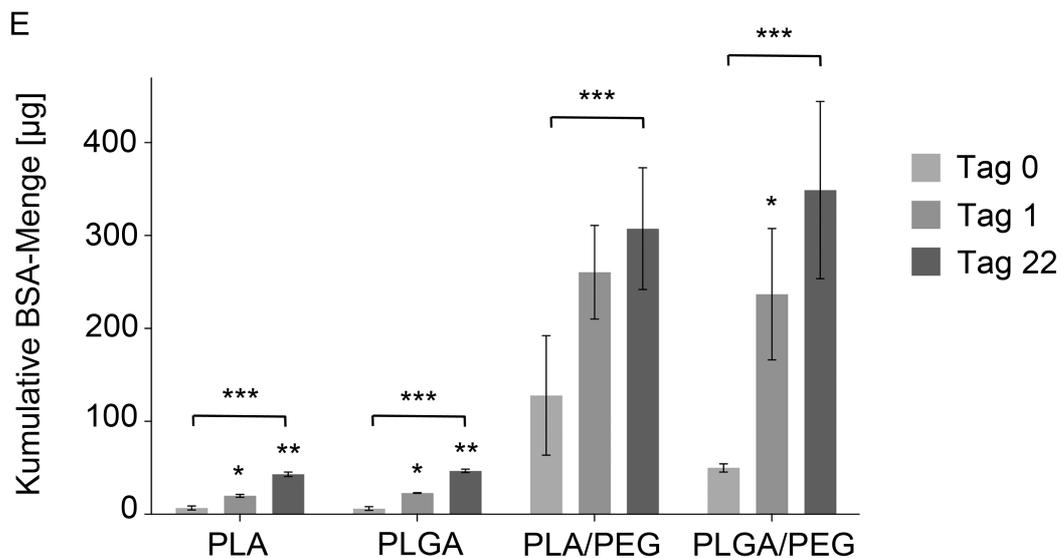
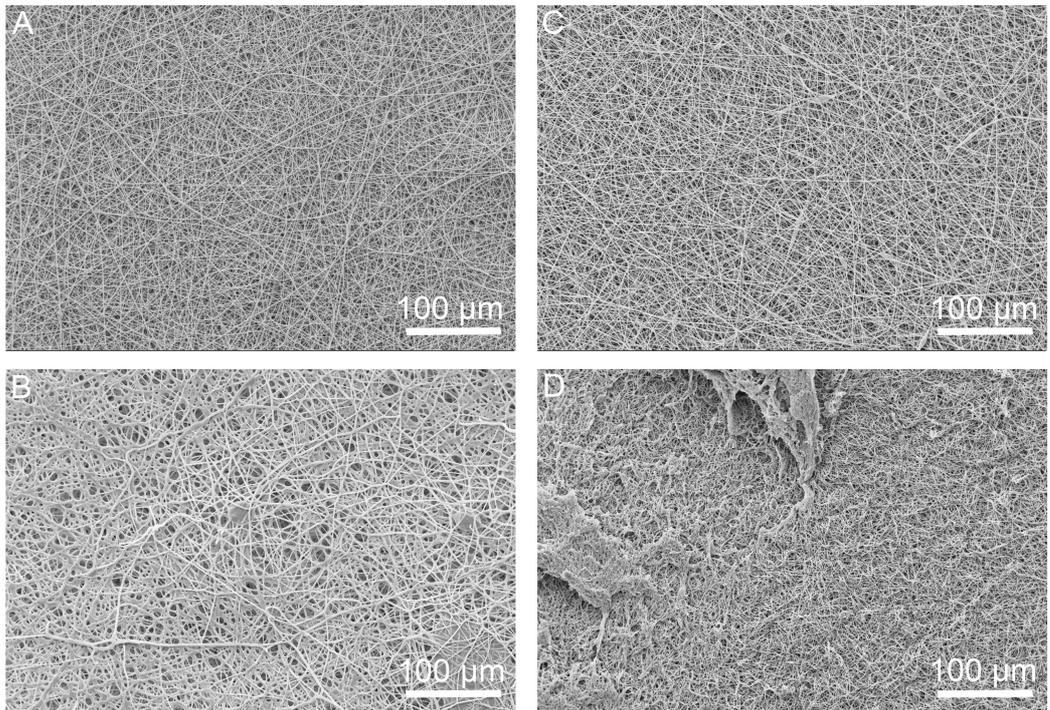


Abbildung 6: Einarbeitung des Proteins BSA in unterschiedlich zusammengesetzte ETM: (A) PLA 20%, (B) PLGA 20%, (C) PLA 12,5%, PEG 12,5%, (D) PLGA 12,5 %, PEG 12,5 %, jeweils mit BSA 1%. (A-D) REM-Aufnahmen der ETM. (E) Vergleich der kumulativ freigesetzte BSA-Menge an Tag 1, 8 und 22, die im Überstand der ETM mithilfe eines Bradford-Tests detektiert wurde. * $p < 0,05$ Tag 1 versus Tag 0. ** $p < 0,05$ Tag 22 versus Tag 1. *** $p < 0,05$ Tag 22 versus Tag 0.

Um das Freisetzungsprofil der einzelnen ETM zu charakterisieren, wurde das Ausmaß der anfänglichen Freisetzung von Tag 0 zu Tag 1 analysiert. Der Vergleich zwischen der kumulativen BSA-Menge im Überstand der ETM an Tag 1 und Tag 22 diente zur Darstellung der langfristigen BSA-Freisetzung (Abbildung 6 E).

Von Tag 0 zu Tag 1 stieg die gemessene BSA-Menge im Überstand der PLA-PLGA- und PLGA/PEG-Fasern signifikant an ($p < 0,05$; kumulativ freigesetzte BSA Menge aus PLA-, PLGA- und PLGA/PEG-Fasern an Tag 1 versus Tag 0). Weder die PLA/PEG- noch PLGA/PEG-Fasern zeigten einen signifikanten Anstieg der kumulativen BSA-Freisetzung von Tag 1 zu Tag 22. Dies wird veranschaulicht durch die nur gering ansteigende kumulativ freigesetzte BSA-Menge in diesem Zeitraum (Tabelle 11).

Dagegen war ein signifikanter Anstieg der BSA-Konzentration im Überstand der PLA- und PLGA-Fasern zwischen Tag 1 und Tag 22 messbar ($p < 0,05$; kumulativ freigesetzte BSA Menge aus PLA- und PLGA-Fasern an Tag 22 versus Tag 1). Dies deutet auf eine konstant steigende Freisetzung des Proteins aus PLA- sowie PLGA-Fasern hin.

Alle vier unterschiedlich zusammengesetzten Fasern zeigten einen signifikanten Anstieg der kumulativ freigesetzten BSA-Menge zwischen Tag 0 und Tag 22 ($p < 0,05$; kumulativ freigesetzte BSA-Menge aus PLA-, PLGA-, PLA/PEG- und PLGA/PEG-Fasern Tag 22 versus Tag 0).

Tabelle 11: Vergleich der kumulativ freigesetzten BSA-Menge durch unterschiedlich zusammengesetzte ETM an Tag 1 und Tag 22. * < 0.05 Tag 22 versus Tag 1.

Polymer	Kumulativ freigesetzte BSA-Menge [μg]		
	Tag 0	Tag 1	Tag 22
PLA	6,85 \pm 2,19	19,89 \pm 1,58	43,06 \pm 2,44 *
PLA/PEG	127,91 \pm 64,30	260,46 \pm 50,35	307,43 \pm 65,45
PLGA	6,14 \pm 2,06	22,89 \pm 0,32	46,67 \pm 1,80 *
PLGA/PEG	49,95 \pm 4,40	237,00 \pm 70,63	348,94 \pm 95,29

Der Vergleich der kumulativ freigesetzten BSA-Menge an Tag 1 und Tag 22 veranschaulicht zusätzlich die hohe anfängliche Freisetzung aus den ETM. An Tag 1 befand sich etwa die Hälfte der nach 22 Tagen kumulativ freigesetzten BSA-Menge im Überstand der PLA- sowie der PLGA-Fasern. Noch höher fiel der Anteil der im Überstand messbaren BSA-Menge durch die PLA/PEG- und PLGA/PEG-Fasern aus. Die PLGA/PEG-Fasern hatten an Tag 1 bereits 68% und die PLA/PEG-Fasern 85% der freigesetzten Gesamtmenge in den Überstand abgegeben. Dieser Umstand wird ebenfalls im Freisetzungsprofil der PLA/PEG-Fasern verdeutlicht, wobei die Freisetzungskinetik nach Tag 1 einem Plateau ähnelt (Abbildung 7 A). Bereits an Tag 1 war die freigesetzte BSA-Konzentration aus den PLA/PEG-Fasern signifikant höher als aus reinen PLA-Fasern ($p < 0,05$; PLA/PEG versus PLA). Dies galt ebenso für den Vergleich der freigesetzten BSA-Konzentration aus PLGA/PEG- und PLGA-Fasern ($p < 0,05$; PLGA/PEG versus PLGA) (Abbildung 7 B). Auch zu den nachfolgenden Zeitpunkten (Tag 8, 15 und 22) blieb die freigesetzte Menge durch die PEG-enthaltenden Fasern im Vergleich zu reinen PLA- und PLGA-Fasern erhöht.

Der Anteil des freigesetzten Proteins an der verkapselten Gesamt-BSA-Menge an Tag 22 betrug für die PLA-ETM 7,9% und für die PLA/PEG-ETM 56,5%.

Analog waren an Tag 22 im Überstand der PLGA-ETM 8,6% und im Überstand der PLGA/PEG-ETM 64,1% der verkapselten Gesamt-BSA-Menge detektierbar (Tabelle 12). Wurde PLA mit PEG kombiniert resultierte dies demnach in einer um den Faktor 7 gesteigerten freigesetzten BSA-Menge nach 22 Tagen. Ebenso war die gemessene BSA-Menge im Überstand der PLGA/PEG-Fasern im Vergleich zu puren PLGA-Fasern um den Faktor 7 erhöht.

Tabelle 12: Darstellung der freigesetzten BSA-Konzentration an Tag 22 aus puren PLA bzw. PLGA-Fasern und PLA/PEG bzw. PLGA/PEG-Fasern

Polymer	BSA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Anteil an verkapseltem BSA [%]
PLA	32,14 \pm 1,82	7,9
PLA/PEG	229,32 \pm 48,84	56,5
PLGA	34,83 \pm 1,34	8,6
PLGA/PEG	260,40 \pm 71,11	64,1

ETM, bestehend aus purem PLA oder PLGA zeigten während des beobachteten Zeitraums von 22 Tagen eine langsamere und geringere BSA-Freisetzung im Vergleich zu PLA/PEG- bzw. PLGA/PEG-ETM (Abbildung 7 A, B). Der Vergleich der kumulativen Freisetzung aus PLA- und PLGA-Fasern ergab keinen signifikanten Unterschied. Ebenso wich die kumulative Freisetzung aus PLA/PEG- im Vergleich zu PLGA/PEG-Fasern nicht signifikant voneinander ab. Beide hydrophoben Polymere ähneln sich demnach in ihrem Potential als Depot- und Freisetzungssysteme. Für beide Polymere gilt zudem, dass die Freisetzungsgeschwindigkeit durch Zugabe von PEG gleichermaßen erhöht werden kann.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass die mit PLGA/PEG-Fasern neben einer betonten anfänglichen Freisetzung jedoch nur in geringem Maße eine nachhaltig ansteigende Freisetzung gewährleisten. Dagegen setzen die reinen PLA- und PLGA-Fasern zwar insgesamt weniger Protein frei, gewährleisten jedoch eine dauerhaft ansteigende Proteinkonzentration während des beobachteten Zeitraums.

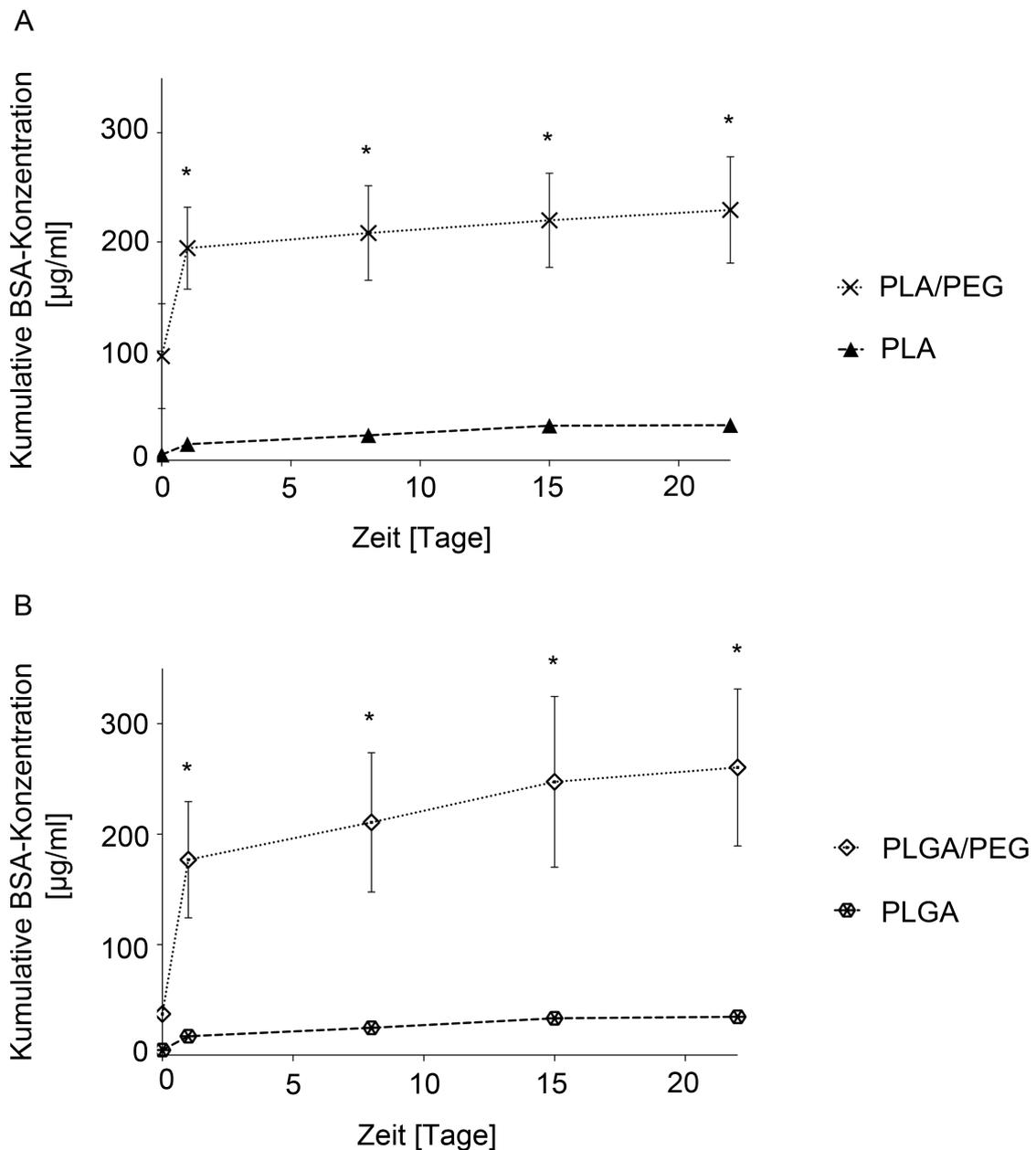


Abbildung 7: BSA-Freisetzungsprofile unterschiedlich zusammengesetzter ETM. (A, B) Darstellung der freigesetzten kumulativen BSA-Konzentration im Laufe von 22 Tagen nach Quantifizierung mittels eines Bradford-Tests aus PLA- und PLA/PEG-Fasern (A) sowie aus PLGA- und PLGA/PEG-Fasern (B). * $p < 0,05$; kumulativ freigesetzte BSA-Konzentration aus PLA/PEG- bzw. PLGA/PEG-Fasern versus reinen PLA- bzw. PLGA-Fasern.

3.3.2 Design von Hydrogelen zur steuerbaren Proteinfreisetzung

3.3.2.1 Variation des Freisetzungsprofils durch unterschiedlich dichte Vernetzung des Polymernetzwerks

Um die Hydrogele in Bezug auf ihre Eigenschaften als proteinfreisetzendes Material zu untersuchen, diente zunächst BSA als Testprotein. Zur Untersuchung der Auswirkung einer dichteren Polymervernetzung auf die BSA-Freisetzung wurde die Konzentration des Fotoinitiators I 2959 variiert (750, 1000, 5000 $\mu\text{g/ml}$). Die eingearbeitete BSA-Konzentration blieb konstant bei 3200 $\mu\text{g/ml}$ BSA. Die Oberfläche des Hydrogels betrug hierbei $947 \pm 25 \text{ cm}^2$. Die kumulative BSA-Freisetzung wurde über einen Zeitraum von 168 h beobachtet. Hierzu erfolgte an mehreren Zeitpunkten (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 168 h) die Entnahme von Proben aus dem Überstand. Der Proteingehalt wurde mithilfe eines Bradford-Tests quantifiziert. Durch Variation der I 2959-Konzentration konnten unterschiedliche BSA-Freisetzungsprofile generiert werden (Abbildung 8 A). Alle Freisetzungsprofile zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der BSA-Konzentration, wobei ein schneller anfänglicher Anstieg zu verzeichnen war.

Die langsamste Freisetzung erfolgte durch Hydrogele, die mit der höchsten I 2959-Konzentration von 5000 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt wurden und somit das dichteste Netzwerk aus Polymerketten boten. Hydrogele, die eine sehr niedrige I 2959-Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ enthielten, zeigten eine sehr schlechte Handhabbarkeit. Daher wurde diese Konzentration als zu niedrig für die Generation eines stabilen Hydrogels eingestuft. Hingegen identifizierten wir 750 $\mu\text{g/ml}$ I 2959 als niedrigste Konzentration, die eine effektive Generation eines soliden Hydrogels ermöglicht. Dabei war die kumulativ freigesetzte BSA-Konzentration der 750 $\mu\text{g/ml}$ Hydrogele 2, 48 und 168 h nach Einbringen der Hydrogele in wässriges Medium im Vergleich zu den Hydrogelen mit

gesteigerter I 2959-Konzentration signifikant höher ($p < 0,05$; 750 $\mu\text{g/ml}$ I 2959 versus 1000 und 5000 $\mu\text{g/ml}$ I 2959). Analog hierzu lieferten die 750 $\mu\text{g/ml}$ I 2959-Hydrogele nach 168 h die höchste kumulativ freigesetzte BSA-Menge von $309,16 \pm 17,55 \mu\text{g}$. Dies entspricht einem Anteil von 19,3% des insgesamt verkapselten 1600 μg BSA. Die freigesetzte BSA-Menge aus 1000 $\mu\text{g/ml}$ I 2959-Hydrogelen betrug $230,80 \pm 17,59 \mu\text{g}$ (14,4%). Die niedrigste BSA-Menge nach 168 h wurde aus den 5000 $\mu\text{g/ml}$ I 2959-Hydrogelen freigesetzt und belief sich auf $30,48 \pm 20,43 \mu\text{g}$ (1,9%).

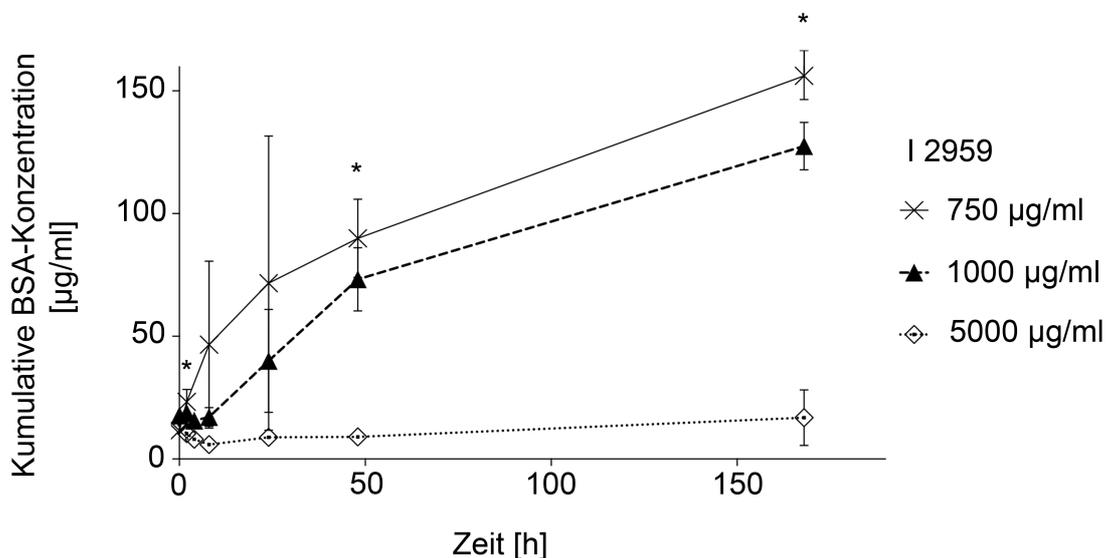


Abbildung 8: BSA-Freisetzungprofile aus Hydrogelen unterschiedlicher Netzwerkdicke, die durch den Einsatz variierender (750, 1000 und 5000 $\mu\text{g/ml}$) I 2959-Konzentrationen hergestellt wurden. Die BSA-Konzentration betrug konstant 3200 $\mu\text{g/ml}$. Die Proteinkonzentration wurde aus dem Überstand mithilfe eines Bradford-Tests ermittelt. Hydrogele, die mit 750 $\mu\text{g/ml}$ I 2959 hergestellt wurden zeigen eine höhere kumulativ freigesetzte BSA-Konzentration zu den Zeitpunkten 2, 48 und 168 h (* $p < 0,05$; 750 $\mu\text{g/ml}$ I 2959 Hydrogele versus 1000 und 5000 $\mu\text{g/ml}$ I 2959 Hydrogele). Modifiziert nach [99].

3.3.2.2 Einfluss der verkapselten BSA-Konzentration auf das Freisetzungsprofil

Der Einfluss einer Erhöhung der verkapselten BSA-Konzentration auf die Freisetzungsprofile wurde mithilfe eines Bradford-Tests untersucht. Hierfür erfolgte die Hydrogelherstellung mit einer konstanten I 2959-Konzentration von 1000 µg/ml. Hingegen wurde die verkapselte BSA-Konzentration variiert (1000, 5000 und 10000 µg/ml). Die Entnahme des Überstands zur Proteinquantifizierung erfolgte analog des vorherigen Versuches zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 und 168 h nach Einbringen des Hydrogels in DPBS. Es konnte eine signifikante Zunahme des freigesetzten BSA nach Erhöhung der verkapselten BSA-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 9). Die kumulativ freigesetzte BSA-Konzentration aus 10000 µg/ml Hydrogelen an den Zeitpunkten 2, 4 und 168 h nach Einbringen der Hydrogele in wässriges Medium war signifikant höher als die freigesetzte BSA-Konzentration aus den beiden Hydrogelen mit geringerer verkapselter BSA-Konzentration ($p < 0,05$; 10000 µg/ml versus 5000 µg/ml bzw. 1000 µg/ml BSA-Hydrogele).

Genauer betrug die kumulativ freigesetzte BSA-Menge nach 168 h durch die 10000 µg/ml BSA-Hydrogele $2894,97 \pm 259,08$ µg BSA. Dies gleicht einem prozentualen Anteil von 57,9% an der verkapselten Gesamtmenge. Im Überstand der 5000 µg/ml BSA-Hydrogele befanden sich nach 168 h $455,54 \pm 0,80$ µg BSA (18,2%). Die niedrigste kumulativ freigesetzte BSA-Menge war im Überstand der 1000 µg/ml BSA-Hydrogele mit $25,09 \pm 3,62$ µg BSA (5,0%) messbar.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass durch Erhöhung der BSA-Konzentration um den Faktor 10 eine Steigerung der freigesetzten Gesamtmenge an BSA um mehr als das Zehnfache (Faktor 11,5) resultierte. Dies veranschaulicht den steigenden Grad an Effektivität der Proteinfreisetzung aus den Hydrogelen durch Erhöhung der verkapselten Proteinmenge.

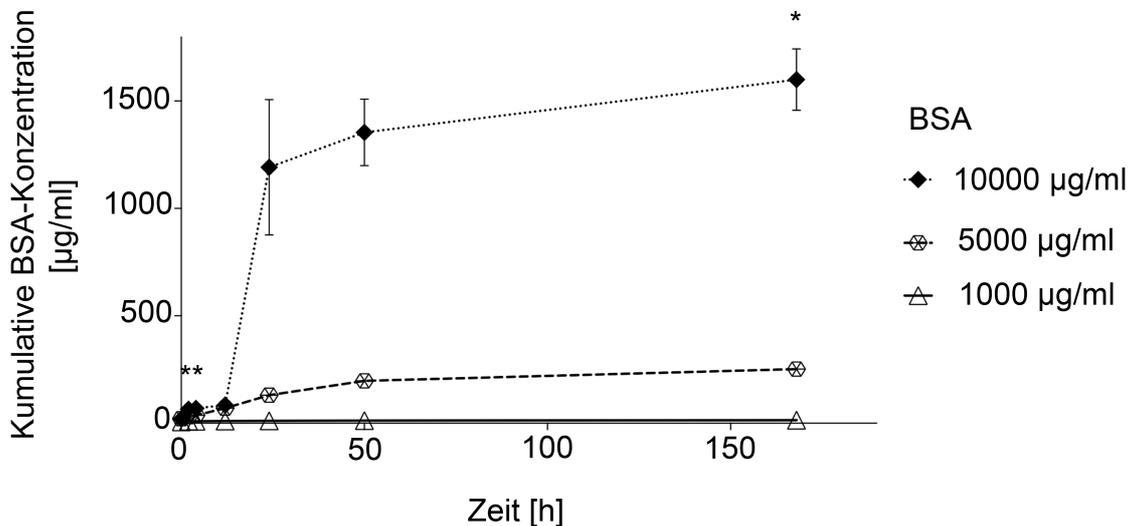


Abbildung 9: BSA-Freisetzungprofile aus Hydrogelen nach Verkapselung variierender Konzentrationen an verkapseltem BSA (1000, 5000 und 10000 µg/ml). Die eingesetzte I 2959-Konzentration betrug 1000 µg/ml. Hydrogele die eine BSA-Konzentration von 10000 µg/ml BSA enthielten zeigten höhere Konzentrationen an freigesetztem Protein zu den Zeitpunkten 2, 4, und 168 h (* $p < 0,05$; 10000 µg/ml BSA-Hydrogele versus 5000 µg/ml bzw. 1000 µg/ml BSA-Hydrogele).

Im Vergleich zu den ETM war die BSA-Freisetzung während der beobachteten 168 h aus den Hydrogelen effektiver. Wir entschieden uns daher für die Nutzung des Hydrogels als proteinfreisetzendes Material in den weiteren Versuchen der Studie und für den Einsatz des elektrogenesponnenen Substrates als stabilisierende Komponente unseres Hybrid-Biomaterials.

3.3.3 Das Hydrogel als Reservoir und Freisetzungsmaterial für bifunktionale Proteine

Für die Versuche der Freisetzung der bifunktionalen Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI verwendeten wir Hydrogele mit einem Volumen von 75 μl ($n = 3$), deren Oberfläche wir vorangehend bestimmten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Maße der Hydrogele, die zur Freisetzung der bifunktionalen Proteine verwendet wurden.

Eigenschaft	Maße
Durchmesser [cm]	$0,75 \pm 0,01$
Dicke [cm]	$0,25 \pm 0,03$
Gewicht [g]	$0,12 \pm 0,01$
Oberfläche [cm^2]	$1,49 \pm 0,11$

Zur Messung der kumulativen Freisetzung der beiden rekombinanten Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI wurde ein ELISA auf der Basis des Nachweises von humanem IgG durchgeführt. Dazu wurde der nach 48, 96 und 168 h entnommene Überstand der in DPBS inkubierten Hydrogele mit 3,75 oder 7,5 μg inkorporiertem SDF1-GPVI bzw. CD133-GPVI untersucht. Die hierzu verwendeten Hydrogele besaßen eine Oberfläche von $1,49 \pm 0,11 \text{ cm}^2$. Die Freisetzungsprofile des Proteins SDF1-GPVI zeigten zunächst einen langsamen Anstieg bis zu einem Maximum von $0,14 \pm 0,04 \mu\text{g}$ nach 168 h (3,5% des verkapselten SDF1-GPVI) aus Hydrogelen, die eine Gesamtmenge von 3,75 μg SDF1-GPVI enthielten, sowie $0,34 \pm 0,04 \mu\text{g}$ (4,5%) aus 7,5 μg SDF1-GPVI Hydrogelen (Abbildung 10 A). Dabei wird aus dem Diagramm ersichtlich, dass die freigesetzte SDF1-GPVI-Menge aus Hydrogelen, die 3,75 μg SDF1-GPVI enthalten, nur anfänglich steigt. Gefolgt wird dies von einer geringen Konzentrationsabnahme von 0,001 $\mu\text{g/ml}$ zwischen 96 und 168 h.

Hydrogele, die 7,5 µg SDF1-GPVI enthielten, zeigten jedoch eine konstante Zunahme der freigesetzten Proteinmenge mit signifikant höheren Konzentrationen an den nachfolgenden Zeitpunkten ($p < 0,05$; 7,5 µg versus 3,75 µg SDF1-GPVI). Nach Inkorporation des zweiten bifunktionalen Proteins CD133-GPVI wurde dessen Freisetzung analog zu SDF1-GPVI an den Zeitpunkten 48, 96 und 168 h gemessen (Abbildung 10 B). Hierbei lag die freigesetzte Menge an CD133-GPVI nach 168 h bei einer verkapselten Gesamtmenge von 3,75 µg CD133-GPVI bei $0,12 \pm 0,00$ µg (3,2% der eingearbeiteten CD133-GPVI-Menge) sowie bei $0,46 \pm 0,13$ µg (6,1%) im Falle der Verkapselung von 7,5 µg CD133-GPVI. Ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge war im Überstand der 3,75 µg CD133-GPVI Hydrogele im Zeitraum von 48 bis 168 h messbar ($p < 0,05$; 48 h $0,06 \pm 0,01$ µg versus 168 h $0,12 \pm 0,00$ µg). Ebenso galt dies für die 7,5 µg CD133-GPVI-Gele ($p < 0,05$; 48 h $0,22 \pm 0,04$ µg versus 168 h $0,46 \pm 0,13$ µg). Dies beweist die effektive Freisetzung des zweiten bifunktionalen Proteins aus den Hydrogelen. Die Gesamtmenge an freigesetztem SDF1-GPVI war im Vergleich zu CD133-GPVI nach Verkapselung von 3,75 µg Protein höher. Dieses Verhältnis kehrte sich nach Verkapselung einer Gesamtmenge von 7,5 µg der beiden Proteine um, sodass eine höhere kumulative Freisetzung des Proteins CD133-GPVI gemessen wurde. Der Unterschied zwischen der kumulativen Gesamtmenge an freigesetztem SDF1-GPVI im Vergleich zu CD133-GPVI war allerdings nicht signifikant. Die unterschiedlichen Proteine wurden demnach mit der gleichen Geschwindigkeit aus dem Hydrogel freigesetzt.

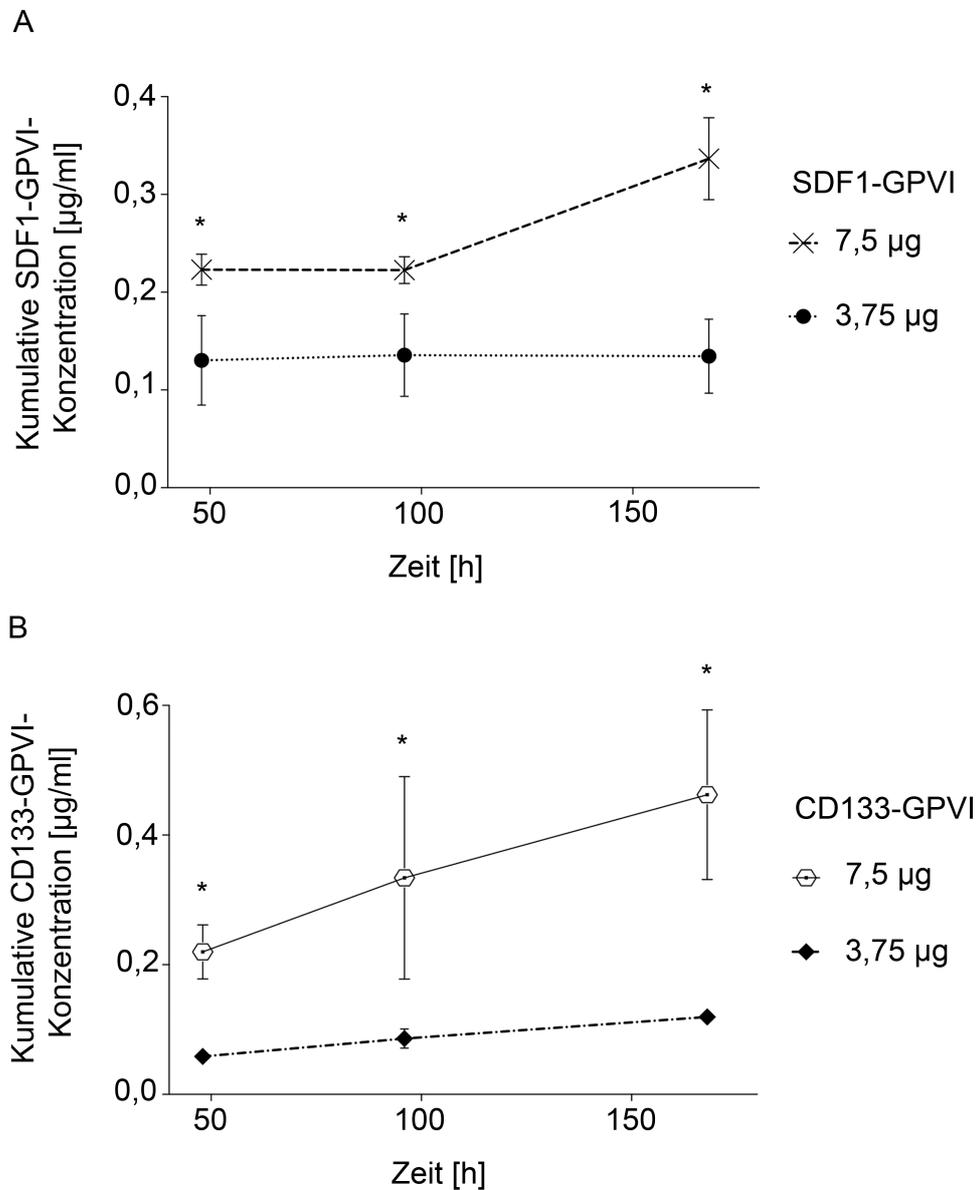


Abbildung 10: Freisetzungsprofile der bifunktionalen Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI. Ein auf humanem IgG basierender ELISA wurde verwendet um die Menge an freigesetztem SDF1-GPVI sowie CD133-GPVI zu bestimmen. Die Abbildung zeigt die Freisetzungsprofile nach Verkapselung einer Gesamtmenge von 3,75 μg sowie 7,5 μg der Proteine SDF1-GPVI (A) (Modifiziert nach [99]) und CD133-GPVI (B). 7,5 μg Hydrogele zeigen im Vergleich zu 3,75 μg Hydrogelen eine konstant höhere Konzentration zu den Zeitpunkten 48, 96 und 168 h. * $p < 0,05$; 7,5 μg versus 3,75 μg SDF1-GPVI (A) bzw. CD133-GPVI (B).

Für die nachfolgenden Funktionalitätsmessungen verwendeten wir den Überstand nach 48 h von Hydrogelen, welche mit einer Gesamtmenge von 15 µg SDF1-GPVI hergestellt wurden. Hierbei bestand die Frage nach einer Beschädigung oder Beeinträchtigung der spezifischen Funktionalität der Proteine während des Herstellungs- oder des Freisetzungprozesses. Die Konzentration an SDF1-GPVI in den untersuchten Überständen betrug $0,82 \pm 0,05$ µg/ml nach 48 h und $0,78 \pm 0,01$ µg/ml nach 168 h (Abbildung 11). Somit konnte über die Zeit ein Abfall der SDF1-GPVI-Konzentration beobachtet werden.

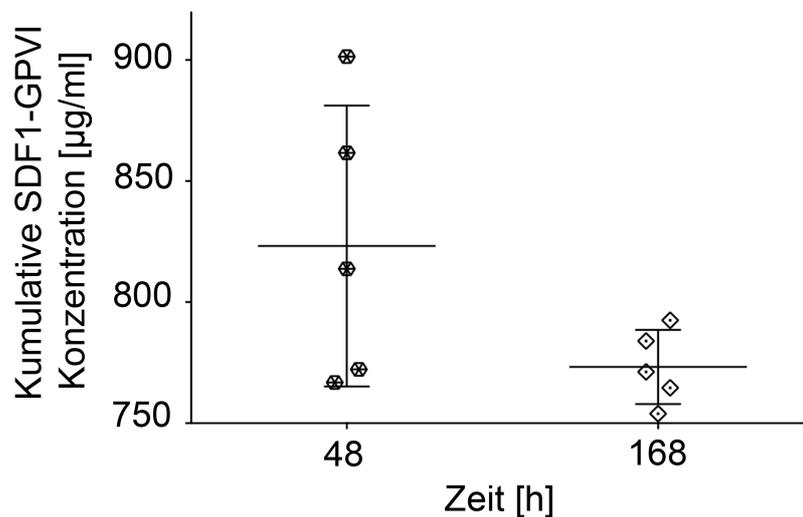


Abbildung 11: Kumulative SDF1-GPVI Konzentration im Überstand von Hydrogelen die 15 µg SDF1-GPVI enthielten. Der Abfall der Proteinkonzentration zwischen 48 und 168 h ist hierbei statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$).

3.4 Bifunktionalität von SDF1-GPVI nach dem Freisetzungsprozess

3.4.1 Aufrechterhaltene spezifische Bindungskapazität der GPVI-Domäne an Col I

Zunächst überprüften wir die spezifische Bindungsfähigkeit von frischem SDF1-GPVI an Col I. Der Vergleich der Bindungssignale von SDF1-GPVI an Col I, BSA und Laminin-111 ermöglichte die Identifikation einer geeigneten Negativkontrolle. Laminine bilden einen wichtigen Bestandteil der EZM in menschlichen Arterienwänden [100] (Abbildung 12 A, B).

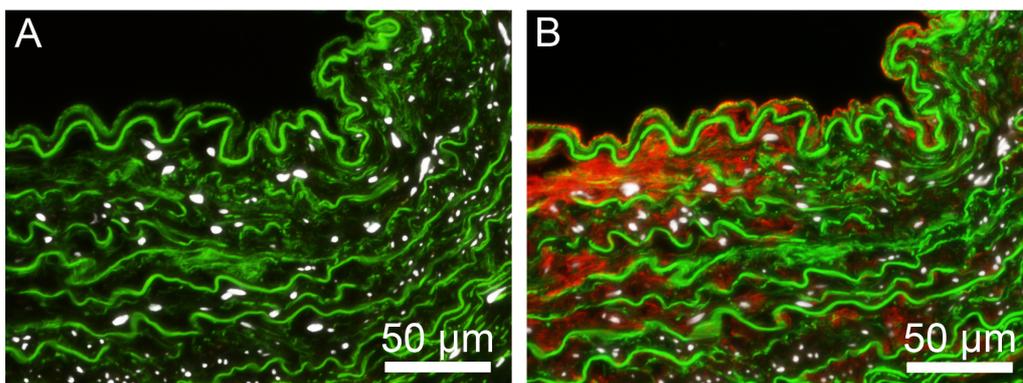


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen adulten Arterienwand. (A) Negativkontrolle; (B) Laminine sind rot angefärbt, die Autofluoreszenz von Elastin ist grün, die Zellkerne sind nach Färbung mithilfe von DAPI weiß dargestellt. Abbildung entnommen aus [99].

Durch Titrierung des Proteins SDF1-GPVI konnte die Konzentration ermittelt werden, bei der das Bindungssignal von SDF1-GPVI auf Col I signifikant höhere Werte erreichte als auf BSA bzw. Laminin-111. Ab einer Konzentration von 1,25 µg/ml SDF1-GPVI konnte ein signifikant höheres Bindungssignal von SDF1-GPVI auf Col I im Vergleich zu BSA detektiert werden ($p = 0,006$; SDF1-

GPVI Bindung an Col I versus BSA) (Abbildung 13 A). Die Konzentration von biotinyliertem SDF1-GPVI ab der ein signifikant höheres Bindungssignal auf Col I im Vergleich zu Laminin-111 gemessen werden konnte, betrug 0,625 µg/ml ($p = 0,019$; Col I versus Laminin-111). Dies deutet auf ein geringeres Hintergrundsignal von Laminin-111 im Vergleich zu BSA hin. Diese Ergebnisse ermöglichten die Identifikation von Laminin-111 als sensitive Negativkontrolle zur Überprüfung der spezifischen Bindungskapazität der GPVI-Domäne an Col I in Folgeversuchen.

Der gleiche Versuchsaufbau mit Laminin-111 als Negativkontrolle diente der Funktionalitätsüberprüfung der GPVI-Domäne nach Freisetzung von SDF1-GPVI aus dem Hydrogel (Abbildung 13 B). Hierfür wurde das freigesetzte SDF1-GPVI, welches sich nach zwei und sechs Tagen im Überstand der 15 µg Hydrogele befand, nach Biotinylierung eingesetzt. Freigesetztes SDF1-GPVI aus dem Überstand nach 2 Tagen zeigte eine signifikant höhere Bindung an Col I verglichen zu Laminin-111 ($p = 2,5 \times E^{-17}$; Col I $1,55 \pm 0,07$ versus Laminin-111 $1,07 \pm 0,05$). Analog hierzu konnte nach 6 Tagen eine signifikant höhere Bindung von SDF1-GPVI an Col I im Vergleich zu Laminin-111 gemessen werden ($p = 0,000001$; Col I $1,20 \pm 0,09$ versus Laminin-111 $0,92 \pm 0,07$). Allerdings waren die Bindungssignalintensitäten an Tag 2 im Vergleich zu Tag 6 höher. Damit konnte ein GPVI-Bindungsverlust an Col I über den genannten Zeitraum beobachtet werden. Dies ist mit dem oben erwähnten Proteinkonzentrationsverlust der 200 µg/ml SDF1-GPVI Hydrogele an Tag 7 im Vergleich zur Konzentration des Überstands an Tag 2 vereinbar.

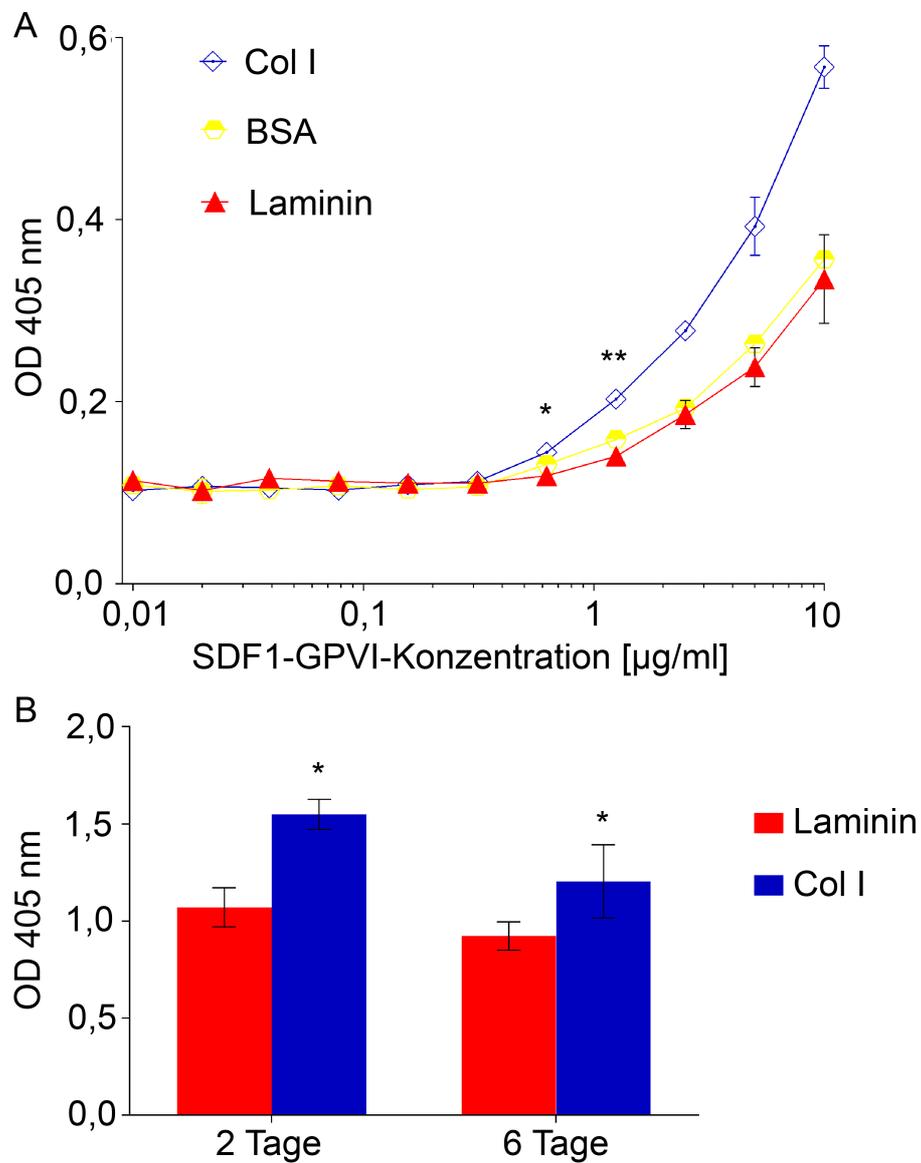


Abbildung 13: Spezifische Bindungsaffinität der GPVI-Domäne von SDF1-GPVI an Col I. (A) Ein ExtrAvidin®-gekoppelten ELISA zeigt anhand von biotinyliertem SDF1-GPVI die unterschiedliche Bindungsaffinität der GPVI-Domäne an Col I, BSA und Laminin-111. * $p < 0,05$; Col I versus Laminin-111, ** $p < 0,05$; Col I versus BSA. (B) Bindungssignalintensität des freigesetzten SDF1-GPVI an Col I. Laminin-111 dient als Negativkontrolle. * $p < 0,05$; Col I versus Laminin-111. Abbildung entnommen aus [99].

3.4.2 Bestehende spezifische SDF1-GPVI-Bindungskapazität an CXCR4 auf der Oberfläche von hECFCs

hECFCs exprimieren den Oberflächenrezeptor CXCR4 (Abbildung 14 A, B), welcher die Bindung des Chemokins SDF1 ermöglicht. Die Immunfluoreszenz-Färbung veranschaulicht die Fähigkeit des Proteins spezifisch mit seiner SDF1-Domäne an CXCR4 auf der Oberfläche der hECFCs zu binden. SDF1-GPVI fungiert hierbei ähnlich wie ein primärer Antikörper, wobei die SDF1-Domäne an den CXCR4 der hECFCs bindet. Anschließend erfolgt die Zugabe eines FITC-gekoppelten Antikörpers, der die humane IgG-Domäne des Proteins erkennt und damit äquivalent die Proteinbindung an den hECFCs darstellt. Um nachzuweisen, dass freigesetztes SDF1-GPVI ebenso dazu in der Lage ist den CXCR4 zu erkennen, wurden hECFCs sowohl mit frischem als auch mit freigesetztem SDF1-GPVI inkubiert. Durch Zugabe des sekundären FITC-gekoppelten Antikörpers wurde die Proteinbindung an den hECFCs sichtbar (Abbildung 14 C-E).

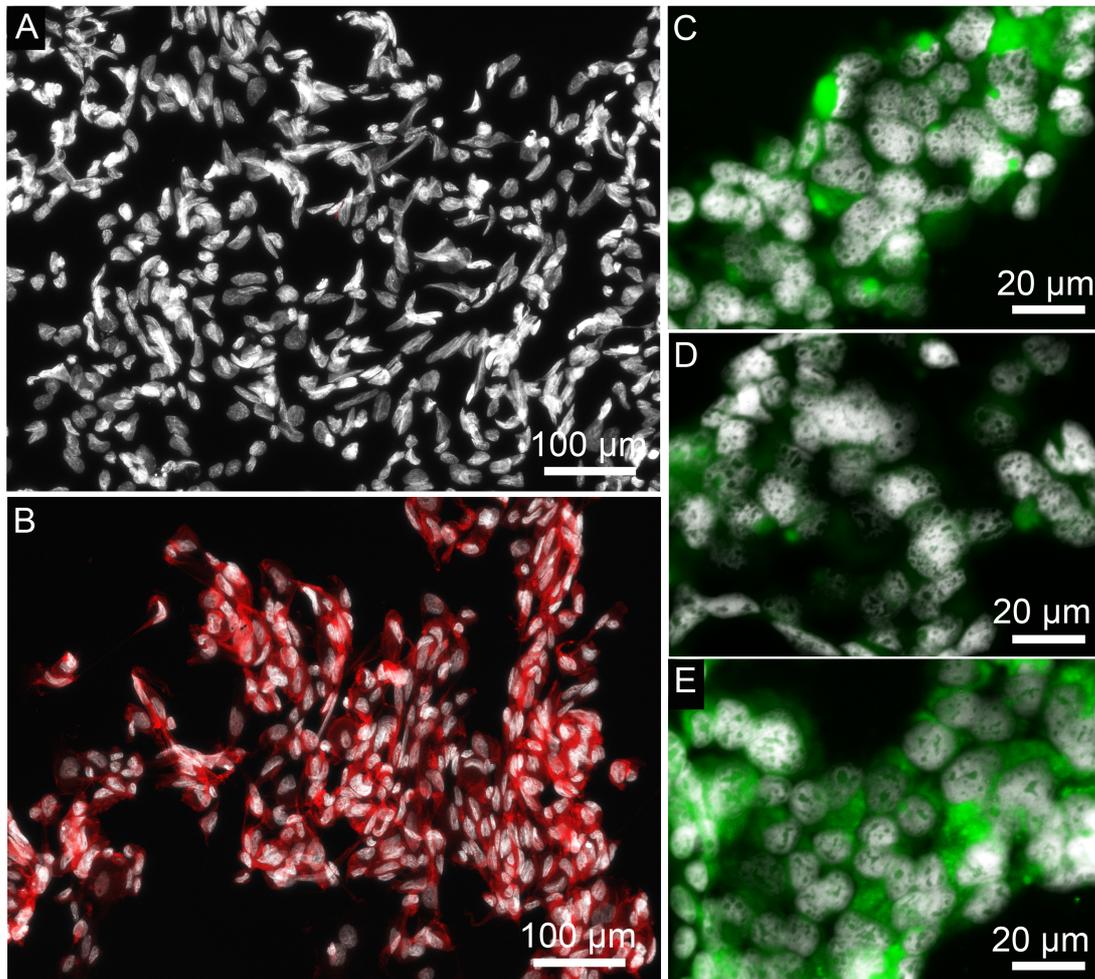


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von CXCR4-präsentierenden hECFCs. (A,B) Nachweis der CXCR4-Expression auf hECFCs. (A) IgG Kontrolle, (B) hohe Expression des CXCR4 (rot). Die Zellkerne sind nach Inkubation mit DAPI-Lösung weiß angefärbt. (C-E) Zeigt die Affinität der SDF1-Domäne für den CXCR4 der hECFCs (grün): (C) Positivkontrolle mithilfe von frischem SDF1-GPVI, (D) Negativkontrolle durch Inkubation mit DPBS und (E) Darstellung der Probe mithilfe von aus dem Hydrogel freigesetztem SDF1-GPVI. Die Zellkerne sind ebenfalls weiß angefärbt. Abbildung entnommen aus [99].

Die Stärke des Fluoreszenzsignals wurde mithilfe des Programms ImageJ gemessen und als GVI pro Zelle semiquantifiziert. Das Bindungssignal von freigesetztem SDF1-GPVI im Vergleich zur Negativkontrolle war hierbei signifikant höher ($p = 0,0003$; freigesetztes SDF1-GPVI $0,12 \pm 0,01$ versus Negativkontrolle $0,09 \pm 0,02$). Kein statistisch signifikanter Unterschied wurde zwischen den Bindungssignalen des freigesetzten SDF1-GPVI und des frischen SDF1-GPVI detektiert. Das Resultat war zudem in hohem Maße reproduzierbar (Abbildung 15). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die spezifische Bindungsfähigkeit der SDF1-Domäne trotz des Herstellungsprozesses und der Diffusion durch das Polymernetz des Hydrogels erhalten blieb.

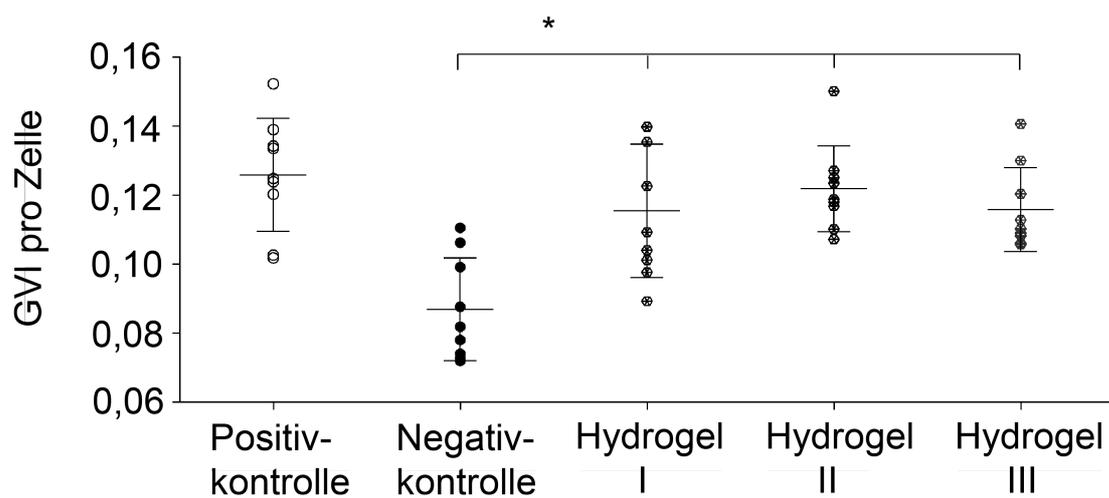


Abbildung 15: Semi-Quantifizierung der Bindungsaffinität der SDF1-Domäne an CXCR4 auf den Oberflächen von hECFCs dargestellt als GVI pro Zelle. Die Fluoreszenzintensität des freigesetzten Proteins aus drei unterschiedlichen Hydrogelen zeigte signifikant höhere Werte als die Negativkontrolle. Hierdurch wird die hohe Reproduzierbarkeit des Ergebnisses veranschaulicht (* $p < 0,05$ freigesetztes SDF1-GPVI versus Negativkontrolle). Abbildung entnommen aus [99].

Anhand des bifunktionalen Proteins SDF1-GPVI konnten wir in zweifachem Maße zeigen, dass sich das Hydrogel hervorragend dazu eignet, Proteine zu inkorporieren und freizusetzen, ohne deren Funktionalität negativ zu beeinflussen. Damit eröffnet sich der Weg, dieses Biomaterial als Reservoir für weitere Proteine zu nutzen, welche über einen Zeitraum von 7 Tagen kontrolliert in die Umgebung freigesetzt werden sollen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen freigesetztem Protein und frischem Protein nicht signifikant war. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die spezifische Funktionalität des freigesetzten Proteins gegenüber dem frischen Protein äquivalent blieb.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass ETM und Hydrogele unterschiedliche Vorzüge im Hinblick auf den Einsatz im kardiovaskulären Tissue Engineering zeigen. Im Einzelnen wies das ETM eine gute Handhabbarkeit auf und ermöglichte das Wachstum von Zellen innerhalb einer 3D-Struktur sowie die Stabilisierung des Hydrogels. Trotz der hohen verkapselten BSA-Konzentration von 10000 µg/ml demonstrierten die ETM in den Vorversuchen als Depotsysteme im Vergleich zu den Hydrogelen eine weniger effektive und langsamere BSA-Freisetzung. Zwar war eine hohe anfängliche BSA-Freisetzung aus den PLA/PEG- sowie den PLGA/PEG-Fasern zu verzeichnen, diese ETM zeigten jedoch eine unzureichende Handhabbarkeit. Die Hydrogele hingegen wiesen eine hydrolytische Stabilität während eines Zeitraums von 34 Tagen auf. Sie zeigten keinen zytotoxischen Effekt auf mEPCs, die über einen Zeitraum von 4 Tagen auf ihrer Oberfläche kultiviert wurden. Nach Verkapselung des Modelproteins BSA zeigten sie durch Variation der BSA-Konzentration und der I 2959-Konzentration anpassbare Freisetzungsprofile. Zusätzlich konnten die beiden bifunktionalen Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI von den Hydrogelen freigesetzt werden. Eine Erhaltung der Funktionalität der GPVI-Domäne des freigesetzten SDF1-GPVI

konnte durch Nachweis eines erhöhten Bindungssignals an Col I nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die SDF1-Domäne nach Freisetzung weiterhin in der Lage an den CXCR4 der hECFCs zu binden. Dies veranschaulicht ebenfalls den Funktionserhalt nach Diffusion des Proteins aus dem mittels Fotopolymerisation hergestellten Hydrogel. Die Kombination beider Biomaterialien als Hybrid-Biomaterial war durch Einbau des ETM während der Fotopolymerisation des Hydrogels möglich.

4 Diskussion

4.1 Vielseitigkeit elektrogespinnener Substrate

Nach einer Stammzellinjektion gehen 90% der Zellen durch den Blutfluss verloren [101]. Von den erfolgreich injizierten Zellen wiederum überlebt nur ein Zehntel die erste Woche und steht hiermit für die Integration ins Myokard zur Verfügung [74, 101]. Im Bereich der kardiovaskulären regenerativen Medizin wurde der Einsatz zellbesiedelter sowie azellulärer Trägermaterialien zur Stabilisierung des Myokards nach vorangegangener Schädigung untersucht [102]. Dabei konnte in Tierstudien nachgewiesen werden, dass die Bereitstellung von Zellen auf einem Trägermaterial im Vergleich zur einfachen Zellinjektion eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion erbrachte [9]. In der vorliegenden Studie stellten wir Trägersubstrate aus Polymerfasern her, die aus den Polymeren PLA und PLGA bestanden. Beide ETM, PLA- und PLGA-ETM, zeigten auch nach Inkubation in wässrigem Medium eine glatte und homogene Faserstruktur, was für ihre hydrolytische Stabilität spricht. Die glatte und homogene Faserstruktur weist zudem auf die Wahl geeigneter Herstellungsparameter hin. Unerwünschte Unterbrechungen durch diffuse tropfenförmige Verdickungen entstehen durch die Verwendung eines Polymers mit zu niedrigem M_w , einer zu niedrigen Polymerkonzentration oder sind Ausdruck einer zu hohen Oberflächenspannung der Polymerlösung [55, 103]. Es ist bekannt, dass sich Polymere mit hohem M_w besser für den Einsatz als verspinnbare Material eignen [55]. Sie weisen eine höhere Polymerisationsdichte und demnach einen geringeren c^* -Wert auf, der die Konzentration angibt, ab der Polymerketten sich überlagern [55]. Wir untersuchten ETM auf die Eignung als 3D-Zellkultursystem für mEPCs und konnten ein Anwachsen eines Zellrasens, sowie das Einwachsen einzelner Zellen rasterelektronenmikroskopisch nachweisen.

Die Faserstruktur, die Porengröße und der Faserdurchmesser des ETM beeinflussen die Adhärenz und Proliferation der Zellen [45, 104]. Auf der anderen Seite spielt die Hydrophobie eines Materials eine wichtige Rolle in Bezug auf die Eignung als zelltragendes Biomaterial, da hydrophobe Oberflächeneigenschaften die Zelladhäsion erschweren können [105]. Vor der Besiedlung mit Zellen wurden deshalb in einigen früheren Studien Oberflächenmodifikationen zur Erhöhung der Hydrophilie vorgenommen [105, 106]. Um insbesondere die Parameter Faserstruktur, Porengröße und Faserdurchmesser des Trägermaterials im Hinblick auf die Adhärenz und Proliferation von mEPCs zu testen, verwendeten wir PLA-ETM, dessen Oberfläche wir durch Messung des Kontaktwinkels von $131,83 \pm 2,77^\circ$ als hydrophob charakterisierten. PLGA weist mit einem Kontaktwinkel von $62,3 \pm 1,35^\circ$ [107] im Vergleich zu unserem gemessenen Kontaktwinkel des PLA-ETM eine höhere Hydrophilie auf. Deswegen entschieden wir uns für den Einsatz von PLA. Auf den PLA-ETM konnten wir ein Anwachsen von Zellen trotz der Hydrophobie des Materials rasterelektronenmikroskopisch nachweisen. Je kleiner der Faserdurchmesser ist, desto häufiger kommt es zu Kontakten der Fasern untereinander und dies resultiert in einer Verminderung der Porengröße [108]. Im Umkehrschluss führt eine Erhöhung des Faserdurchmessers zu einer Erhöhung der Porengröße. Dies begünstigt das Einwachsen von Zellen in das 3D-Trägermaterial und erleichtert deren Proliferation [45, 109]. Ein Faserdurchmesser von 0,35 bis 1,10 μm wurde als geeignet für Fibroblasten beschrieben [109], für Endothelzellen eignete sich ein Faserdurchmesser von 1,61 μm [45]. Der Durchmesser der hier hergestellten PLA-Fasern betrug $3,46 \pm 0,54 \mu\text{m}$. Hierdurch wurde ein Einwachsen der Zellen in das Trägermaterial ermöglicht.

Des Weiteren konnten ETM bereits in früheren Studien als Depotsysteme zur Freisetzung therapeutischer Substanzen identifiziert werden [84, 88, 89]. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien beobachteten wir eine anfänglich

hohe Freisetzung aus den hier hergestellten ETM aus PLA bzw. PLGA jeweils pur oder in Kombination mit dem hydrophilen Polymer PEG. Es folgte eine langsamere und dauerhafte Freisetzung der verkapselten Substanz für 22 Tage. Dies kann auf eine unzureichende Lösung des BSA in der Polymerlösung vor dem Prozess des Elektrosinnens hinweisen [84]. Hydrophobe Substanzen verteilen sich gleichmäßig in ebenfalls hydrophoben Polymerlösungen [84]. Zamani et al. demonstrierten die dauerhafte Freisetzung von Metronidazol, einer hydrophoben Substanz, aus elektrogewonnenen hydrophoben PCL-Fasern ohne eine hohe anfängliche Freisetzung zu beobachten [110]. Es wird geschlussfolgert, dass eine homogene Verteilung eine verlängerte und gleichmäßige Freisetzung ermöglicht und somit die hohe Anfangsfreisetzung umgeht [110-112]. Analog sollte demnach aus der Kombination eines hydrophilen Polymers mit einer hydrophilen freizusetzenden Substanz wie BSA eine homogene Verteilung innerhalb der Polymerfaser erfolgen [113].

Wir wiesen eine kontinuierliche Freisetzung des Proteins BSA aus den PLA- bzw. PLGA-Fasern nach, wohingegen die Kombination mit PEG in einer betonten anfänglichen und daraufhin stagnierenden Freisetzung resultierte. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die nach Zugabe von PEG mit einem hohen M_w eine Beschleunigung der Substanzfreisetzung aus elektrogewonnenen PCL-Fasern berichten [114]. Die Zugabe des hydrophilen Polymers PEG führte demnach zu einer inhomogenen Verteilung des Proteins in den Polymerfasern. BSA zeigt eine verstärkte Bindungsinteraktion mit hydrophilen Substanzen im Vergleich zu hydrophoben Substanzen [111]. Daher sammelte es sich vermehrt in den hydrophilen PEG-Anteilen der Fasern an, die jedoch im wässrigen Medium herausgelöst werden [114]. Gleichwohl resultiert hieraus eine schnelle BSA-Freisetzung in den Überstand und erklärt die hohe anfängliche BSA-Freisetzung in den hier hergestellten PLA/PEG- und PLGA/PEG-ETM.

Weiterhin wird angenommen, dass beim Verspinnen einer hydrophilen Substanz mit einem hydrophoben Polymer eine Ansammlung der hydrophilen Substanz an der Oberfläche der Faser erfolgt, wodurch ebenfalls eine hohe anfängliche Freisetzung resultiert [114]. Die hydrophilen BSA-Anteile könnten sich demnach zusätzlich an der Oberfläche der hydrophoben PLA- und PLGA-Anteile angesammelt haben und hierdurch zusätzlich zu einer hohen anfänglichen BSA-Freisetzung geführt haben.

Der hohe Anstieg der freigesetzten Proteinkonzentration von Tag 0 zu Tag 1 in PLA/PEG- bzw. PLGA/PEG-Fasern wird somit durch zwei Mechanismen begünstigt: hydrophile PEG-Anteile, die BSA enthalten, werden frühzeitig im wässrigen Medium aus der Faser gelöst und oberflächengebundenes BSA in hydrophoben PLA- sowie PLGA-Anteilen des ETM gelangt direkt nach Einbringen des ETM in wässriges Medium in den Überstand. Die Fasermorphologie der PLA- und PLGA-Fasern im Vergleich zu den PLA/PEG- und PLGA/PEG-Fasern unterschied sich in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die PLA- und PLGA-Fasern zeigten eine glatte und homogene Struktur wohingegen die Fasern bestehend aus PLA/PEG oder PLGA/PEG Schwankungen des Durchmessers innerhalb einzelner Fasern aufwiesen. Diese Unterschiede in der Fasermorphologie können durch die Auflösung der PEG-Anteile der Fasern in wässrigem Medium bedingt sein [114]. Dies führt zu einer Schrumpfung des ETM und nachfolgend zu einer Verkleinerung der Oberfläche [114]. Diese Verkleinerung der Oberfläche ist für den Einsatz als substanzfreisetzendes System nicht geeignet [115]. Die hieraus entstehende Veränderung der Freisetzungskinetik bedingt eine unzureichende Steuerbarkeit der Proteinfreisetzung [114, 115].

Aufgrund der Hydrophobie der Polymere PLA und PLGA verläuft ihre Degradation im wässrigen Medium langsam [116]. Nach anfänglicher Freisetzung der oberflächengebundenen BSA-Moleküle beruht der folgende Freisetzungsmechanismus deshalb neben der Degradation ebenfalls auf

Diffusion [117, 118]. Der abnehmende Konzentrationsgradient von der Faseroberfläche in Richtung des Faserkerns bedingt allerdings, dass die diffusionsgesteuerte Freisetzung sehr langsam verläuft [117]. Hieraus ergibt sich die niedrigere kumulativ freigesetzte Gesamtmenge aus den PLA- bzw. PLGA-Fasern nach 22 Tagen im Vergleich zu den hydrophileren PLA/PEG- und PLGA/PEG-Fasern.

4.2 Hydrogele sind effektive proteinfreisetzende Depotsysteme

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Variation der Konzentrationen an I 2959 sowie des verkapselten BSA-Konzentration die Generierung unterschiedlicher Freisetzungprofile aus den in dieser Studie hergestellten Hydrogelen untersucht. Dadurch gelang die Identifikation adäquater Herstellungsparameter für den Einsatz des Zielproteins SDF1-GPVI, welches bereits in vivo anhand eines Mausmodells eine effektive Anziehung regenerationsfördernder endogener Stammzellen im Myokard zeigte [119].

4.2.1 Das bifunktionale Protein SDF1-GPVI zur Anziehung autologer Stammzellen

Die eingangs beschriebene niedrige Integrationsrate injizierter Stammzellen erklärt sich aus den Bedingungen, die nach ischämischer Schädigung im Myokard herrschen [120]. Verantwortlich hierfür ist der ablaufende Entzündungsprozess im Zielareal sowie das Strömen des Blutes wodurch die Zelladhäsion und -integration nach intramyokardialer oder intrakoronarer Injektion erschwert wird [8]. Eine zusätzliche Hürde der therapeutisch wirksamen Injektion nicht-autologer Stammzellen stellt das potentielle Auslösen einer immunologischen *Graft-versus-Host-Reaktion* im Empfängersystem dar [121]. Des Weiteren gleichen injizierte Stammzellen in ihrer Funktionalität und Antwort auf die Umgebungsreize nicht den zirkulierenden autologen

Stammzellen [121]. Um die Integration zu verbessern, wurde die Applikation zelladhäsionsfördernder Substrate untersucht. Ein Beispiel hierfür bildet das Chemokin SDF1 [69]. Dieses bindet an den G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR4, der auch als Fusin oder CD184 bezeichnet wird [69]. CXCR4 wiederum befindet sich auf der Oberfläche hämatopoietischer sowie mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark, wie beispielsweise den BMPCs [119, 121, 122]. Die durch BMPCs ausgelösten parakrinen Effekte fördern die Gefäßneubildung und wirken antiinflammatorisch, wodurch die Myokardfunktion unterstützt wird [8, 75, 123]. Durch Injektion von SDF1 wurde bereits versucht dessen stammzellanziehendes Potential therapeutisch zu nutzen [69]. Allerdings waren bisherige Untersuchungen auf eine singuläre Injektion von exogenem SDF1 limitiert [69, 119]. Um die lokale Anreicherung im Infarktgebiet zu erhöhen, entwickelten Ziegler et al. ein rekombinantes bifunktionales Protein mit einer SDF1-Domäne und einer GPVI-Domäne, die als Anker für die spezifische Bindung des Proteins an Col I und III dient (Abbildung 16 A-C) [119]. Anhand eines Mausmodells wurde in dieser Studie das regenerationsfördernde Potential des Proteins SDF1-GPVI in vivo untersucht. Durch die Administration des Granulozyten-stimulierenden Faktors (*granulocyte-colony stimulating factor*; G-CSF) wurden Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert. Die Injektion von SDF1-GPVI nach dem Erzeugen einer transienten Ischämie des Myokards resultierte in einer Akkumulation und Integration der CXCR4-positiven Zellen im Infarktgebiet. Nach Postinfarkt-Therapie mithilfe der Injektion von SDF1-GPVI zeigten die behandelten Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen, die mit dem Fc-Fragment des Immunglobulins G₂ (IgG₂-Fc) des Proteins SDF1-GPVI behandelt wurden, eine höhere Ejektionsfraktion [119]. Dies lässt auf eine gesteigerte Leistung des Herzens schließen. Zudem konnte in der histologischen Aufarbeitung des Myokards der behandelten Mäuse eine erhöhte Rate an neugebildeten Gefäßen nachgewiesen werden [119]. Es konnte beobachtet werden, dass die

Expression von SDF1 im Myokard nach einem Infarkt ereignis rasch hochreguliert wird [124].

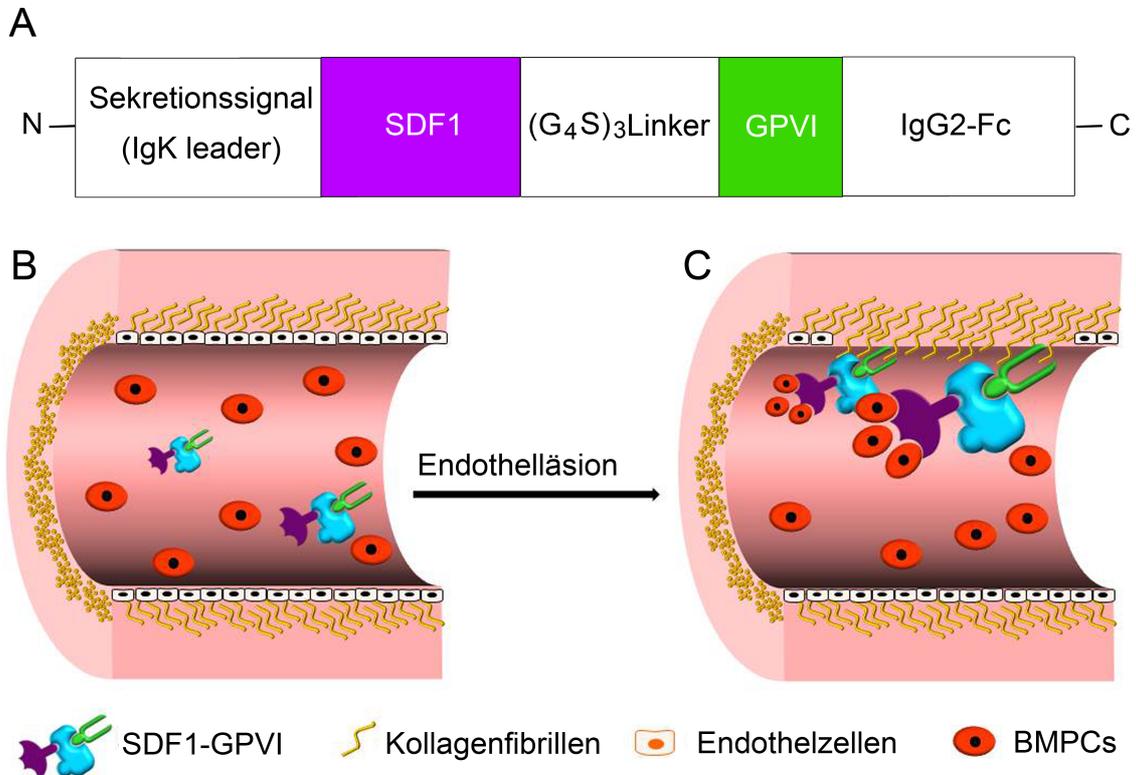


Abbildung 16: Struktur und Wirkung des Proteins SDF1-GPVI. (A) Darstellung der einzelnen Komponenten des rekombinanten Proteins, wobei humanes SDF1 sowie GPVI die Bifunktionalität des Proteins begründen. Modifiziert nach [119]. (B, C) Schema eines Blutgefäßes (B) vor und (C) nach einer Endothelläsion. Im Bereich der Endothelschädigung bindet SDF1-GPVI mit seiner GPVI-Ankerdomäne (grün) an Col I und III und lockt zirkulierende BMPCs mithilfe der SDF1-Domäne (violett) an. Modifiziert nach [99].

Für eine effektive Anziehung von BMPCs wiederum ist deren Expression des Rezeptors CXCR4 nötig [125]. Diese zeigt jedoch erst 4-7 Tage nach dem Infarkt ereignis ihre maximale Ausprägung [125], wobei während dieser Zeit die SDF1-Expression im Myokard erneut abnimmt [124]. Nach Injektion des Proteins SDF1-GPVI in die Schwanzvene der Mäuse konnte 5 Tage nach dem Myokardinfarkt eine Akkumulation CXCR4-positiver Zellen im

Infarktgebiet demonstriert werden [119]. Nach 28 Tagen war allerdings keine erhöhte Präsenz der CXCR4-positiven Zellen detektierbar [119]. Es wird angenommen, dass eine verlängerte Präsenz von SDF1-GPVI zu einer effektiveren Akkumulation der CXCR4-positiven BMPCs führen kann. Die Wirkung des Chemokins SDF1 ist zudem auf das Vorhandensein eines Konzentrationsgradienten angewiesen [123]. Eine verlängerte Freisetzung eines Proteins und die Schaffung eines für die Funktion von Chemokinen essentiellen Konzentrationsgradienten, kann durch den Einsatz eines substanzfreisetzenden Depotsystems erreicht werden [126]. Wir untersuchten daher in der hier präsentierten Studie die Eignung der Hydrogele als Reservoir für SDF1-GPVI und überprüften dessen Freisetzung in einem Zeitraum von 7 Tagen und den Erhalt der Funktionalität der Anker- und der stammzellanziehenden Domäne.

4.2.2 Verlängerte und steuerbare Freisetzung unterschiedlicher Proteine durch Hydrogele

Die Freisetzung von SDF1 aus Hydrogelen konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, wobei analog zu unseren Ergebnissen eine anfänglich schnell ansteigende Konzentration an freigesetztem Protein beobachtet werden konnte. Gefolgt wurde sie von einer langsameren Freisetzung nach 7 [126-128] oder 21 Tagen [129]. Dieser anfänglich schnelle Anstieg der Konzentration an freigesetztem Protein ist von Vorteil, da höhere Konzentrationen an SDF1 notwendig für die BMPC-Mobilisierung aus dem Knochenmark sind [130]. Die schnelle Proteinfreisetzung ergibt sich unter anderem aus der Ansammlung großer Mengen des verkapselten Proteins an der Oberfläche der Hydrogele während des Herstellungsprozesses [131]. Wir beobachteten Unterschiede zwischen den Freisetzungsprofilen von BSA und SDF1-GPVI bzw. CD133-GPVI. Zwar zeigten alle drei Proteine eine anfänglich schnellere Freisetzung, es wurden jedoch Unterschiede in Bezug auf die kumulativ freigesetzte

Gesamtmenge nach 7 Tagen gemessen. Da BSA, SDF1-GPVI und CD133-GPVI in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden (BSA: 3200 µg/ml, SDF1-GPVI und CD133-GPVI: 100 µg/ml), beziehen sich die Ergebnisse auf die verkapselte Gesamtproteinmenge. Hierbei zeigte BSA eine kumulative Freisetzung von 17.7%, CD133-GPVI 6,1% und SDF1-GPVI 4,5%. Des Weiteren wurde zur Herstellung der BSA-Hydrogele ein Volumen von 500 µl verwendet; SDF1-GPVI- und CD133-GPVI-Hydrogele bestanden aus einem Volumen von 75 µl. Hieraus resultierten unterschiedliche Oberflächenmaße. Vorherige Studien beobachteten eine Verlangsamung der Freisetzung nach Verringerung der Hydrogeloberfläche [132]. Wir beobachteten ebenfalls eine langsamere Freisetzung der Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI im Vergleich zu BSA. Neben der unterschiedlich verkapselten Menge bestehen Unterschiede im M_w der Proteine (BSA 66 Kilodalton (kDa) versus SDF1-GPVI 130 kDa [119] und CD133-GPVI 205 kDa [133]). Es konnte beobachtet werden, dass eine Reduzierung der Konzentration an verkapseltem Protein in Kombination mit einem gesteigerten M_w in einer verlangsamten Freisetzung resultiert [132]. Gründe hierfür sind ein verminderter Diffusionsgradient bei geringerer Konzentration, sowie eine erschwerte Diffusion durch das Polymernetzwerk bei steigendem M_w [132]. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen der freigesetzten Gesamtmenge von SDF1-GPVI und CD133-GPVI. Dies spricht für eine ausreichend große Porosität zwischen den vernetzten Polymerketten, die ebenfalls die Diffusion des Proteins CD133-GPVI mit einem M_w von 205 kDa ermöglichte. Als Grund könnte ebenfalls eine Ladungsdifferenz der Moleküle SDF1-GPVI und CD133-GPVI in Frage kommen, die eine relativ schnelle Freisetzung des größeren CD133-GPVI begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass die Ladung eines Proteins ebenfalls die Freisetzungskinetik beeinflusst [134].

Die Zugabe von PEG beim Herstellungsprozess substanzfreisetzender Systeme führt zu einer Reduktion der unspezifischen Proteinbindungen [135].

Diese können unterteilt werden in Wasserstoffbrückenbindungen, Ladungsinteraktionen und nicht-polare Interaktionen [136]. Insbesondere PEGda konnte als geeignet für die Verhinderung unspezifischer Protein-Hydrogel-Interaktionen identifiziert werden [137]. Dies erklärt zusätzlich die Effizienz der Proteinfreisetzung aus den Hydrogelen.

Eine effektive Migration von BMPCs konnte für SDF1-Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,25 µg/ml beobachtet werden [129]. Hydrogele mit einer Gesamtmenge von 3,75 µg SDF1-GPVI zeigten keine anhaltende Freisetzung in dem beobachteten Zeitraum von 7 Tagen. Im Gegensatz hierzu war aus den 7,5 µg SDF1-GPVI Hydrogelen eine stetige Erhöhung der freigesetzten SDF1-GPVI Konzentration messbar, die nach 96 h bei $0,22 \pm 0,01$ µg/ml sowie nach 168 h bei $0,34 \pm 0,03$ µg/ml lag. Daher nehmen wir an, dass die während des beobachteten Zeitraums im Überstand erreichte SDF1-GPVI Konzentration der 7,5 µg SDF1-GPVI Hydrogele für eine Anziehung der BMPCs ausreicht.

Während des UV-vermittelten Vernetzungsprozesses werden Proteine im Hydrogel immobilisiert [138]. Gründe hierfür sind eine Konjugation der Proteine durch freie Radikale an Polymerketten sowie die chemische Reaktion zwischen Acrylatgruppen des PEGda und Lysingruppen des Proteins im Sinne einer Michael-Addition [138]. Die Menge an immobilisiertem Protein kann durch die Konzentration an Fotoinitiator im Verhältnis zu Acrylatgruppen gesteuert werden. Bleibt das Verhältnis dieser beiden Konzentrationen konstant, resultiert dies in einer gleichbleibenden Menge an immobilisiertem Protein unabhängig von der verkapselten Proteinkonzentration [134]. Des Weiteren beobachteten wir in Abhängigkeit der Erhöhung der Fotoinitiatorkonzentration eine Verlangsamung der Freisetzung von BSA aus den Hydrogelen, was vereinbar mit Ergebnissen früherer Studien ist [134]. Es wird angenommen, dass durch die Erhöhung der Fotoinitiatorkonzentration eine höhere Dichte an Vernetzungspunkten und somit ein dichteres Polymernetzwerk entsteht [134]. Zusätzlich entsteht nach Einbringen in ein wässriges Medium durch Aufquellen

der Polymerketten eine Vergrößerung der Diffusionstrecke, die ein Molekül überbrücken muss, um entlang des Konzentrationsgradienten nach außen zu diffundieren [134]. Diese Charakteristik könnte in zukünftigen klinischen Anwendungen die Möglichkeit der Adaptation des Freisetzungsprofils an individualisierte Parameter eines Patienten, wie beispielsweise das Körpergewicht, ermöglichen. Zudem konnten wir feststellen, dass die in dieser Studie hergestellten Hydrogele über einen Zeitraum von 4 Wochen hydrolytisch stabil sind. Hieraus resultiert die Möglichkeit sie als substanzfreisetzendes Depotssysteme über diesen Zeitraum einzusetzen [16].

4.3 Der Herstellungsprozess zeigt keinen Einfluss auf die Biokompatibilität

Sowohl bei der Herstellung von ETM als auch bei der UV-vermittelten Vernetzung der Polymerketten zur Herstellung von Hydrogelen entstehen potentiell schädigende Produkte, die toxisch auf Zell- und Proteinstrukturen wirken können. Wir konnten in der vorliegenden Studie die Vitalität von mEPCs auf dem ETM sowie dem Hydrogel allein und zusätzlich auf dem Hybrid-Biomaterial demonstrieren. Der Erhalt der Proteinfunktionalität nach Freisetzung aus dem Hydrogel konnte zusätzlich durch Nachweis der Spezifität beider Domänen des bifunktionalen Proteins SDF1-GPVI festgestellt werden.

4.3.1 Wirkung auf die Zellvitalität

Wir verwendeten das organische Lösungsmittel HFP zur Herstellung einer verspinnbaren Polymerlösung. Organische Lösungsmittel können eine toxische Wirkung auf Zellen zeigen [50]. Um den Effekt des toxischen Lösungsmittels zu minimieren, wurde auf das ausreichende Verdampfen des Lösungsmittels vor Besiedlung des ETM mit mEPCs geachtet. Die nachfolgende Testung der Zellvitalität mithilfe eines MTT-Tests zeigte lebende Zellen und deutet hiermit auf die Eignung des ETM als zelltragendes Biomaterial hin.

Trotz des Einsatzes als biokompatibel und nicht zytotoxisch eingestufte Polymere in der Herstellung von ETM, können die auf diese Weise gewonnenen Trägersubstrate zytotoxische Effekte zeigen [56]. Der Vergleich zytotoxischer Effekte von Polymeren vor und nach Verarbeitung mittels Elektrosponnen führte zu dem Fazit, dass hierdurch zytotoxische Eigenschaften eines Polymers ausgelöst werden können [56]. Polymerketten werden während des Elektrosponnens hohen Spannungen ausgesetzt, wodurch sie möglicherweise eine Fraktionierung erfahren [56]. Die so entstandenen niedrigmolekularen Anteile bewirken den toxischen Effekt auf Zellen [56]. Pathan et al. fanden zudem heraus, dass die nachfolgende zytotoxische

Wirkung vom M_w des verwendeten Polymers abhängt. Polymere mit hohem M_w zeigten bereits in niedrigen Konzentrationen durch den Zerfall in eine hohe Anzahl toxischer Anteile einen zellschädigenden Effekt [56]. Zusätzlich ist bekannt, dass bei der Degradation von Polyestern (beispielsweise PLA und PLGA) entstehende Säureanteile einen negativen Effekt auf Zellen ausüben können [116, 139]. Wir verwendeten PLA mit einem relativ hohen M_w von 101 kDa zur Herstellung des ETM für die Zytotoxizitätsversuche und konnten das Wachstum der Zellen hierauf für einen Zeitraum von 3 Tagen demonstrieren. Da PLA langsam degradiert ist es allerdings möglich, dass ein negativer Effekt, durch die Degradationsprodukte in dem beobachteten Zeitraum, noch nicht erfassbar war [116].

Nachdem Elektrospinnprozess können die Fasern weiterhin eine Aufladung zeigen. Dies kann zu einer Schädigung der Zellmembran sowie zu einer Veränderung des osmotischen Drucks im Kulturmedium führen [56]. Des Weiteren kann die Zellproliferation durch Bindung der im Kulturmedium vorhandenen Wachstumsfaktoren an das ETM vermindert werden [56]. Die Wahl möglichst schonender Herstellungsparameter vor und während des Elektrospinnens ist somit essentiell, um eine toxische Wirkung auf Zellen abzuschwächen oder zu verhindern. Zur Herstellung der Hydrogele verwendeten wir eine möglichst geringe Konzentration des Fotoinitiators I 2959. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an freien Radikalen, die während des UV-vermittelten Vernetzungsprozesses entstehen mit der eingesetzten Fotoinitiatorkonzentration korreliert [140, 141]. Freie Radikale schädigen die Zellmembran sowie Nukleinsäuren und Proteine [142, 143] und zeigen somit einen zytotoxischen Effekt. In einer Studie von Williams et al. wurden schnell proliferierende Zellarten als besonders anfällig gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Fotoinitiatoren identifiziert [143]. Der zytotoxische Effekt des in dieser Studie verwendeten Fotoinitiators I 2959 wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigten, dass dieser Fotoinitiator sich zur Herstellung

zellverkapselnder Hydrogele eignet [140]. Andere wiederum berichten, dass I 2959 zytotoxische Effekte zeigt, die abhängig vom verwendeten Zelltyp auftreten [143]. Sabnis et al. identifizierten eine I 2959-Konzentration von 100 µg/ml als nicht zytotoxisch, allerdings konnten sie einen zunehmenden zytotoxischen Effekt bei Steigerung der I 2959-Konzentration auf 1600 µg/ml erkennen [60]. Wir konnten stoffwechselaktive mEPCs auf Hydrogelen nachweisen, die mit einer I 2959-Konzentration von 750 µg/ml hergestellt wurden. Allerdings beobachteten wir ebenfalls die Bildung von Zellaggregaten und eine leichte Ablösbarkeit der Zellen von der Hydrogeloberfläche. Dies könnte durch die glatte Hydrogeloberfläche bedingt sein, die im Vergleich zum 3D-Netzwerk eines ETM erschwerte Bedingungen für die Zelladhäsion bietet. Ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt durch die verwendete I 2959-Konzentration ist aufgrund der nachgewiesenen Vitalität der mEPCs innerhalb des beobachteten Zeitraums von 4 Tagen jedoch nicht anzunehmen. Die Acrylatgruppen des Polymers PEGda können ebenfalls einen zytotoxischen Effekt aufweisen [144]. Als Reagenzien mit elektrophilem Charakter weisen sie eine hohe Reaktivität und Tendenz zur Ausübung einer nukleophilen Substitution auf, wodurch ihr toxischer Effekt auf Zellen begründet ist [144]. Dieser Effekt wird zusätzlich durch Bestrahlung mit UV-Licht verstärkt [144]. In der hier vorgestellten Studie konnten wir das Wachstum von mEPCs auf der Oberfläche der Hydrogele für den Zeitraum von 4 Tagen beobachten. Ein Grund hierfür könnte die relativ niedrige Konzentration an I 2959 von 750 µg/ml sein, welche wir zum Vernetzen der PEGda-Ketten verwendeten. Mazzoccoli et al. untersuchten die Effekte der Konzentration und des M_w des verwendeten PEGda auf die Zellvitalität [145]. Sie berichteten, dass der negative Effekt auf die Zellviabilität bei Verwendung von PEGda mit einem M_w von 0,4 kDa im Vergleich zu PEGda mit einem M_w von 3,4 kDa größer war und nehmen an, dass Moleküle mit niedrigerem M_w leichter durch die Zellen aufgenommen werden [145]. Sie folgern hieraus, dass eine möglichst niedrige Konzentration

an PEGda mit einem hohen M_w zur Hydrogelherstellung genutzt werden sollte [145]. In der vorliegenden Studie verwendeten wir PEGda mit einem hohen M_w von 6 kDa, wodurch die Menge an zytotoxisch wirksamen Molekülen vermindert wurde.

4.3.2 Einfluss auf die Funktionalität und Struktur von Proteinen

Obgleich wir in einer vorherigen Studie den Funktionserhalt des Proteoglykans Decorin in elektroversponnenem PCL zeigen konnten [39], berichteten Studien über einen destruirenden Effekt des Elektrosponnprozesses auf die Proteinstruktur [146]. Ekaputra et al. zufolge konnte eine geringe Abnahme der Bioaktivität verkapselter Wachstumsfaktoren nach Freisetzung aus einem elektrogenesponnenen ETM ermittelt werden. Sie nehmen an, dass der Kontakt mit dem Lösungsmittel HFP sowie der hohen Spannung während des Herstellungsprozesses hierfür verantwortlich ist [45]. Das Auflösen der Polymere erfolgt häufig in organischen Lösungsmitteln, um eine verspinnbare Polymerlösung herzustellen [147]. Der Kontakt eines Proteins mit einem organischen Lösungsmittel allerdings kann zu dessen Denaturierung führen [147]. Dieses Problem kann umgangen werden, indem das Protein zunächst in einer wässrigen Phase aufgelöst und danach in einer organischen Polymerlösung verkapselt wird [148]. Aufgrund dieses Prinzips, das als Emulsionselektrosponnen bezeichnet wird, blieb die Bioaktivität von verkapseltem Doxorubicin nach dessen Freisetzung erhalten [113]. Wir verwendeten ebenfalls das Prinzip des Emulsionselektrosponnens, um einen möglichst geringen Kontakt des Proteins BSA mit der organischen Polymerlösung zu gewährleisten. Yang et al. demonstrierten die erfolgreiche Freisetzung des Modellproteins Lysozym aus Fasern, die mithilfe der gleichen Herstellungsmethode generiert wurden [149]. Obwohl die Proteinstruktur erhalten blieb, wurde nach Lysozym-Freisetzung ein Verlust der spezifischen Bioaktivität von 16% detektiert [149]. Die Autoren schlussfolgerten, dass der

hydrophobe Proteinkern anfällig für eine Auflösung durch das organische Lösungsmittel ist und nachfolgend möglicherweise die hydrophile Proteinhülle zerstört wird. Demnach kann durch das Emulsionselektrospinnen zwar eine Veränderung der Proteinstruktur vermieden werden; die Gefahr einer Verringerung der Bioaktivität besteht allerdings weiterhin. Zusätzlich berichteten Yang et al. über einen negativen Effekt der Degradationsprodukte von PLA auf die Proteinstruktur, die eine Verminderung der Bioaktivität von Lysozym bewirkte [149]. Der Erhalt der Proteinfunktionalität trotz des Einsatzes schädigender Herstellungsparameter während des Elektrospinnens stellt demnach weiterhin eine Herausforderung dar.

Die bisher veröffentlichten Studien über den Effekt der UV-vermittelten Vernetzung bei der Herstellung von Biomaterialien auf die Bioaktivität verkapselter Proteine, zeigten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse [141]. Frühere Studien berichteten bereits mehrfach über eine Herabsetzung der Proteinbioaktivität nach Freisetzung aus mittels Fotopolymerisation hergestellter Biomaterialien [129, 150, 151]. Der Kontakt mit niedrigen UV-Lichtintensitäten zeigte bisherigen Berichten zufolge keinen bedeutsamen Einfluss auf die Proteinaktivität [151]. UV-Lichtintensitäten von 100 mW/cm^2 hingegen führten durch Oxidation und Bildung von Proteinaggregaten zu einer Verminderung der Bioaktivität der verkapselten Substanz [141]. In unserer Studie wurden PEGda Polymerketten mit der minimal notwendigen UV-Lichtintensität von 5 mW/cm^2 zur Herstellung eines soliden Hydrogels vernetzt. Dies hatte vermutlich einen schonenden Einfluss auf die Proteinstruktur und die Neigung zur Proteinaggregation konnte vermindert werden. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht dissoziiert der Fotoinitiator I 2959 und es entstehen freie Radikale [151]. Deren hohe Reaktivität in Kombination mit einer unzureichenden Selektivität führt zum Angriff funktioneller Aminosäuregruppen der Proteine [151, 152]. Dies wiederum kann durch die Knüpfung neuer Querverbindungen zwischen Aminosäuren und der Zerstörung von Peptidbindungen zum Verlust

der Proteinstruktur führen [151]. Es wird angenommen, dass durch gleichzeitige Präsenz von Proteinen und freien Radikalen in der wässrigen Phase während der Hydrogelherstellung die Proteinschädigung zusätzlich verstärkt wird [141]. Im Unterschied hierzu konnten wir die selektive Bindung der GPVI-Domäne des Proteins SDF1-GPVI für Col I auch nach Freisetzung aus dem Hydrogel nachweisen. Dies beweist den Erhalt der GPVI-Funktionalität auch nach Herstellung und Diffusion des Proteins durch das Hydrogel. Die Reduktion der Bindungssignalintensität zwischen freigesetztem Protein an Tag 2 und Tag 6 weist auf eine Verminderung der Bindungsspezifität der GPVI-Domäne an Tag 6 hin. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine sensibel auf pH-Änderungen reagieren [45, 153]. Des Weiteren beträgt die geschätzte Halbwertszeit von SDF1-GPVI 48 h [119]. Die Reduzierung der Bindungssignalintensität beruht demnach vermutlich auf einer Degradation des Proteins im wässrigen Medium nach 6 Tagen und auf der hieraus resultierenden Reduzierung der GPVI-Affinität zu Col I. Zusätzlich konnten wir den Funktionserhalt der stammzellanziehenden SDF1-Domäne des freigesetzten bifunktionalen Proteins beweisen. Dies wird durch die hochreproduzierbaren Ergebnisse der SDF1-Bindung an den CXCR4 auf hECFCs veranschaulicht. Hierzu verwendeten wir den Überstand aus Hydrogelen nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen. Die SDF1-GPVI-Bindung an CXCR4 auf hECFCs wurde fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen. Der hierbei detektierte signifikant höhere Signalwert des freigesetzten SDF1-GPVI im Vergleich zur Negativkontrolle beweist den Funktionserhalt der SDF1-Domäne. Zudem gleichen die gemessenen Signalwerte von freigesetztem SDF1-GPVI den Signalwerten des frischen, als Positivkontrolle verwendeten SDF1-GPVI. Dies beweist das Fehlen von schädigenden Einflüssen der Herstellungsparameter auf die Funktionalität des freigesetzten SDF1-GPVI. Zur Herstellung des Hydrogels wurden jeweils möglichst niedrige Konzentrationen an Substraten sowie schonende Herstellungsparameter gewählt, um die Generation freier

Radikale und die UV-Bestrahlung zu reduzieren. Dieser Umstand könnte erklären, weshalb beide funktionellen Domänen des Proteins SDF1-GPVI ihre Spezifität behielten. Des Weiteren verwendeten wir PEGda mit einem M_w von 6 kDa, wodurch eine hochviskose Polymerlösung entstand. Hochviskose Polymerlösungen wiederum wirken ähnlich einem Käfig, der die Proteine vor dem Angriff der freien Radikale schützt [141]. Zusätzlich kann das Vorhandensein von Acrylatgruppen einen schützenden Effekt auf die Proteinbioaktivität zeigen [141]. Sie sind in der Lage, die freien Radikale aufzufangen und durch Konversion in weniger aggressive Komponenten, ihre unspezifische Reaktivität zu vermindern [141, 151]. Im Vergleich zur bisherigen Injektion des bifunktionalen Proteins SDF1-GPVI könnte die verlängerte Freisetzung aus den hier vorgestellten Hydrogelen die Rate an integrierten BMPCs im Myokard erhöhen. Diese Herangehensweise zur Myokardregeneration nach ischämischer Schädigung bildet eine Therapiealternative, deren Potential in einem in vivo Myokardinfarktmodell untersucht werden sollte [99].

4.4 Vorteile eines Hybrid-Biomaterials

Die Hydrophilie der auf PEG-basierenden Hydrogele erleichtert die Diffusion von zytotoxischer Substanzen und bedingt dadurch eine erschwerte Interaktion zwischen Hydrogel und Zellen [58]. Gleichzeitig zeigen die Oberflächen von auf PEG-basierenden Hydrogelen kaum unspezifische biomolekulare Interaktionen, wodurch ihr Potential als substanzfreisetzendes Depotsystem bedingt wird [58]. Dies erschwert jedoch die Adsorption von Proteinen aus der EZM, welche für das Zellwachstum wichtig sind [58]. Frühere Studien berichteten bereits über die Herstellung eines Hydrogels aus PEG in Kombination mit dem degradierbaren Polymer PLA [154]. Hierdurch konnte die Bereitstellung und Integration von Zellen durch die Hydrogele verbessert werden [58, 154]. In der hier vorgestellten Studie verwendeten wir PLA in Form eines elektrogenesponnenen Fasernetzwerks in Kombination mit dem PEG Hydrogel. Die Kombination der beiden morphologisch unterschiedlichen Biomaterialien aus hydrophobem ETM und Hydrogel kann zu einer Verbesserung der Freisetzungskinetik der Proteine führen und somit die therapeutische Effizienz der Einzelkomponenten erhöhen [155]. Das Potential zellbesiedelter Trägermaterialien wurde bereits untersucht, jedoch besteht die Frage nach einer adäquaten Zellquelle [8]. Azelluläre Biomaterialien umgehen dieses Problem und könnten hierdurch die klinische Translation eines Biomaterials erleichtern [8]. Durch Kombination des für die Zellkultur geeigneten 3D-Trägermaterials aus elektrogenesponnenen Fasern mit einem substanzfreisetzenden Biomaterial kann ein primär azelluläres Biomaterial implantiert werden. Azelluläre Materialien zeigten bereits in früheren Studien das Potential die Größe des Infarkts zu verringern und die Angiogenese im umgebenden Areal zu erhöhen [79]. Durch Freisetzung bioaktiver Substanzen, die eine Anziehung von Stammzellen begünstigen, kann trotz fehlender Zellinjektion die Angiogenese gefördert werden [45].

Ein weitere Herausforderung bei der Implantation eines Trägermaterials besteht in dessen unzureichender Integration durch fehlende Vaskularisierung [45, 156]. Auch hier besteht eine Lösungsstrategie in der Kombination eines 3D-Trägermaterials mit die Angiogenese fördernden Substanzen, die über einen verlängerten Zeitraum freigesetzt werden [45]. Hierdurch kann die Integration des Biomaterials verbessert und das Umgebungsgewebe in seiner Regeneration unterstützt werden [45]. Das ETM kann zusätzlich verwendet werden, um die Substanzfreisetzung aus Hydrogelen zu modifizieren. Han et al. konnten zeigen, dass durch Kombination eines PEG/PCL Hydrogels mit einem PCL-ETM eine Verringerung der anfänglich hohen Freisetzung sowie eine verlängerte gleichmäßige Freisetzung gewährleistet werden konnte [155]. Das PCL-ETM stellte in dieser Studie aufgrund seiner hydrophoben Charakteristik eine zusätzliche Diffusionsbarriere dar und führt durch Verdickung des Biomaterials insgesamt zu einer Erhöhung der Diffusionsstrecke [155]. Diese gleichmäßigere Freisetzungskinetik kann vorteilhaft sein, falls niedrige, jedoch langanhaltende Dosen notwendig sind, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erreichen [110].

4.5 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Im Rahmen dieser *in vitro* Studie verwendeten wir PLA zur Generierung eines stabilisierenden, nicht-zytotoxischen 3D-Trägermaterials, welches das Einwachsen von Zellen ermöglichte. Analog stellten wir Hydrogele aus dem Polymer PEGda mithilfe der Fotopolymerisation her, und wiesen die hydrolytische Stabilität der Hydrogele über einen Zeitraum von 816 h nach. Zusätzlich zeigten die Hydrogele unter den in dieser Studie vorliegenden Versuchsbedingungen keinen zytotoxischen Effekt auf Zellen, die auf ihrer Oberfläche kultiviert wurden. Durch unterschiedliche Polymerkombinationen zur Herstellung der ETM konnten variable BSA-Freisetzungprofile generiert werden. Wir identifizierten das Hydrogel als Depotsystem, welches die effektive Freisetzung unterschiedlicher Proteine gewährleistet. Durch Variation der Vernetzungsdichte konnten anpassbare Freisetzungprofile generiert werden. Zudem konnte der Funktionserhalt beider spezifischer Domänen des Proteins SDF1-GPVI nach Freisetzung aus dem Hydrogel demonstriert werden. Das in der vorliegenden Studie präsentierte Hydrogel eignet sich demnach für die anhaltende effektive Bereitstellung variabler therapeutischer Substanzen. Zudem demonstrierten wir die Möglichkeit der Kombination des PLA-ETM mit dem Hydrogel. Dies könnte zu einer Erhöhung der Biokompatibilität und Biofunktionalität beider Materialien führen. Das hier vorgestellte Hybrid-Biomaterial besitzt als implantierbares Depotsystem das Potential die Freisetzung unterschiedlicher Substanzen zu ermöglichen und gleichzeitig eine Integration des Biomaterials in den Organismus zu gewährleisten. Damit stellt es eine neuartige Therapieoption in der kardiovaskulären regenerativen Medizin dar. Inwieweit sich das 3D-Trägersubstrat als kardiales Flicker-Implantat zur Regenerationsförderung des Gewebes nach einem Myokardinfarkt eignet muss jedoch in zukünftigen *in vivo* Studien untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Der funktionelle Organersatz als Ziel unterschiedlicher Therapiestrategien des Tissue Engineerings begegnet dem heutigen Mangel an transplantierbaren Organen. Eine wichtige Rolle bei der Implantation eines körperfremden Materials stellt die Vaskularisierung des Implantates und des umgebenden Gewebes dar, wodurch die Integration des Implantates in den Organismus erleichtert und die Funktionalität ischämisch geschädigter Areale verbessert werden kann. Das Ziel der vorliegenden Dissertation war das Design eines dreidimensionalen (3D-)Trägermaterials, welches durch Freisetzung von bioaktiven Faktoren adulte Stammzellen anlocken kann, die fördernd auf die Angiogenese wirken. Zusätzlich sollte durch Herstellung eines strukturell der extrazellulären Matrix ähnelndem Trägermaterials eine Zellbesiedlung ermöglicht werden. Zu Beginn der Arbeit wurden Netzwerke aus Polymerfasern mithilfe des Elektrosinnens generiert. Durch Kultivierung muriner Endothelprogenitorzellen (mEPCs) auf dem elektrogenesponnenen Trägermaterial (ETM) wurden die ETM zunächst auf ihre Morphologie und die Möglichkeit als 3D-Zellkultursysteme zu dienen untersucht. Dabei konnte das Einwachsen der Zellen in das ETM rasterelektronenmikroskopisch nachgewiesen sowie ihre Vitalität bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein Hydrogel durch UV-vermittelte Fotopolymerisation des Polymers Polyethylenglycol diacrylate (PEGda) in Kombination mit dem Fotoinitiator Irgacure 2959 (I 2959) hergestellt. Das Hydrogel konnte für einen Zeitraum von 4 Wochen als hydrolytisch stabil identifiziert werden. Nach Kultivierung von mEPCs für einen Zeitraum von 4 Tagen auf der Oberfläche der Hydrogele konnte deren Vitalität nachgewiesen werden. Sowohl ETM als auch Hydrogele wurden auf ihr Potential Proteine freizusetzen untersucht. Je nach verwendeter Polymerkombination aus Polylactid, Polylactid-co-Glycolid und Polyethylenglycol konnten unterschiedliche Freisetzungsprofile des Proteins bovines Serumalbumin (BSA) aus den ETM generiert werden. Die Hydrogele

zeigten eine effektive und anhand der variierenden I 2959-Konzentration eine steuerbare BSA-Freisetzung für 7 Tage. Nach Identifikation der geeigneten Herstellungsparameter wurden zwei Proteine mit Molekulargewicht von 130 und 205 kDa in den Hydrogelen verkapselt und ihre Freisetzung untersucht. Hierdurch konnten die Hydrogele als Depotsysteme für eine breite Auswahl an Proteinen identifiziert werden. Die Funktionalität sowohl der Glykoprotein (GP)VI-Domäne als auch der *stromal cell-derived factor 1* (SDF1)-Domäne des bifunktionalen Proteins SDF1-GPVI wurde durch Überprüfung der spezifischen Bindung der beiden Domänen getestet. Anhand eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) konnte die spezifische Bindungsfähigkeit der Glykoprotein (GP)VI-Domäne an Kollagen Typ I nach Freisetzung bestätigt werden. Durch fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Bindung der SDF1-Domäne an den Chemokinrezeptor 4 des CXCR-Motives auf humanen endothelialen kolonie-formenden Zellen konnte zudem der Erhalt der Funktionalität der SDF1-Domäne bestätigt werden. Dies zeigte, dass die Parameter zur Herstellung des Hydrogels die Proteinfunktionalität nicht beeinträchtigten. Zur Ermöglichung der Kombination der Vorteile des ETM als zelltragendes Biomaterial und dem Hydrogel als proteinfreisetzendem Biomaterial wurde das ETM während der UV-Bestrahlung in die Oberfläche des Hydrogels integriert. Hierdurch entstand ein Hybrid-Biomaterial welches nach Besiedlung mit mEPCs ebenfalls keine zytotoxischen Effekte zeigte. Als Kombination aus azellulären Materialien mit einstellbaren Struktureigenschaften zur Anpassung an unterschiedliche Gewebe sowie steuerbaren Freisetzungsprofilen einer Diversität an Proteinen könnte das in dieser Studie vorgestellte Hybrid-Biomaterial zu einer verbesserten Gefäßversorgung und zur Verbesserung der Wiederherstellung von ischämisch geschädigtem Gewebe beitragen. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Studie deuten somit auf das vielversprechende Potential des 3D-Trägersubstrates für den Einsatz in der kardiovaskulären regenerativen Medizin hin.

6 Literaturverzeichnis

1. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2011. **13**: p. 27-53.
2. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003. **23**(6): p. 1002-6; discussion 1006.
3. Fitzpatrick, L.E. and T.C. McDevitt, *Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications*. *Biomater Sci*, 2015. **3**(1): p. 12-24.
4. Minuth, W.W., Strehl, R., Schumacher, K., *Zukunftstechnologie Tissue Engineering 2003*: Wiley-VCH Verlag.
5. Aufklärung, B.f.g. *Statistiken zur Organ- & Gewebespende*. 25.04.15]; Available from: <https://www.organspende-info.de/infothek/statistiken>.
6. Williams, D.F., *On the nature of biomaterials*. *Biomaterials*, 2009. **30**(30): p. 5897-909.
7. Badylak, S.F. and R.M. Nerem, *Progress in tissue engineering and regenerative medicine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(8): p. 3285-6.
8. Hastings, C.L., et al., *Drug and cell delivery for cardiac regeneration*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014.
9. Hamdi, H., et al., *Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition? A head-to-head comparison*. *Ann Thorac Surg*, 2009. **87**(4): p. 1196-203.
10. Shieh, S.J. and J.P. Vacanti, *State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building*. *Surgery*, 2005. **137**(1): p. 1-7.
11. Lalan, S., I. Pomerantseva, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering and its potential impact on surgery*. *World J Surg*, 2001. **25**(11): p. 1458-66.
12. Medicine, U.T.A.-L.f.T.E.a.R. *The concept of tissue engineering*. 10.04.15]; Available from: <http://www.lifesciences.tau.ac.il/departments/biotech/members/dvir/dvir.html>.
13. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
14. L'Heureux, N., T.N. McAllister, and L.M. de la Fuente, *Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(14): p. 1451-3.
15. Lam, M.T. and J.C. Wu, *Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration*. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2012. **10**(8): p. 1039-49.

16. Garg, T., et al., *Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2012. **29**(1): p. 1-63.
17. Sokolsky-Papkov, M., et al., *Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(4-5): p. 187-206.
18. Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 24): p. 4195-200.
19. Shtrichman, R., et al., *The generation of hybrid electrospun nanofiber layer with extracellular matrix derived from human pluripotent stem cells, for regenerative medicine applications*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(19-20): p. 2756-67.
20. Chen, J., et al., *Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products*. Expert Rev Med Devices, 2009. **6**(1): p. 61-73.
21. Flory, P.J., *Principles of polymer chemistry*. 1953: Cornell University Press.
22. Bergsma, J.E., et al., *Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws*. Biomaterials, 1995. **16**(1): p. 25-31.
23. Groeber, F., et al., *Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 352-66.
24. Cho, K.S., et al., *The efficacy of Cutanplast nasal packing after endoscopic sinus surgery: a prospective, randomized, controlled trial*. Laryngoscope, 2013. **123**(3): p. 564-8.
25. Altman, G.H., et al., *Silk-based biomaterials*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 401-16.
26. Tuch, B.E., T.C. Hughes, and M.D. Evans, *Encapsulated pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells as a therapy for insulin-dependent diabetes*. Diabetes Metab Res Rev, 2011. **27**(8): p. 928-32.
27. Rossi, S., et al., *Wound dressings based on chitosans and hyaluronic acid for the release of chlorhexidine diacetate in skin ulcer therapy*. Pharm Dev Technol, 2007. **12**(4): p. 415-22.
28. Lyons, F., S. Partap, and F.J. O'Brien, *Part 1: scaffolds and surfaces*. Technol Health Care, 2008. **16**(4): p. 305-17.
29. Sui, R., et al., *The current status of engineering myocardial tissue*. Stem Cell Rev, 2011. **7**(1): p. 172-80.
30. Zhu, J., *Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(17): p. 4639-56.
31. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. **49**(36): p. 6288-308.
32. Lasprilla, A.J., et al., *Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review*. Biotechnol Adv, 2012. **30**(1): p. 321-8.

33. Goh, B.T., et al., *Novel 3D polycaprolactone scaffold for ridge preservation--a pilot randomised controlled clinical trial*. Clin Oral Implants Res, 2015. **26**(3): p. 271-7.
34. Schantz, J.T., et al., *Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report*. Neurosurgery, 2006. **58**(1 Suppl): p. ONS-E176; discussion ONS-E176.
35. Lewis, G., *Properties of acrylic bone cement: state of the art review*. J Biomed Mater Res, 1997. **38**(2): p. 155-82.
36. Xue, L. and H.P. Greisler, *Biomaterials in the development and future of vascular grafts*. J Vasc Surg, 2003. **37**(2): p. 472-80.
37. Scott, J.E., *Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape*. J Anat, 1995. **187** (Pt 2): p. 259-69.
38. Li, M., et al., *Co-electrospun poly(lactide-co-glycolide), gelatin, and elastin blends for tissue engineering scaffolds*. J Biomed Mater Res A, 2006. **79**(4): p. 963-73.
39. Hinderer, S., et al., *Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea*. Biomaterials, 2012. **33**(21): p. 5259-66.
40. Zamani, M., M.P. Prabhakaran, and S. Ramakrishna, *Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 2997-3017.
41. Zomer Volpato, F., et al., *Preservation of FGF-2 bioactivity using heparin-based nanoparticles, and their delivery from electrospun chitosan fibers*. Acta Biomater, 2012. **8**(4): p. 1551-9.
42. Patterson, J. and J.A. Hubbell, *Enhanced proteolytic degradation of molecularly engineered PEG hydrogels in response to MMP-1 and MMP-2*. Biomaterials, 2010. **31**(30): p. 7836-45.
43. Seliktar, D., et al., *MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing*. J Biomed Mater Res A, 2004. **68**(4): p. 704-16.
44. Hong, Y., et al., *Mechanical properties and in vivo behavior of a biodegradable synthetic polymer microfiber-extracellular matrix hydrogel biohybrid scaffold*. Biomaterials, 2011. **32**(13): p. 3387-94.
45. Ekaputra, A.K., et al., *The three-dimensional vascularization of growth factor-releasing hybrid scaffold of poly (epsilon-caprolactone)/collagen fibers and hyaluronic acid hydrogel*. Biomaterials, 2011. **32**(32): p. 8108-17.
46. Pelipenko, J., et al., *The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes*. Eur J Pharm Biopharm, 2013. **84**(2): p. 401-11.
47. George, M. and T.E. Abraham, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review*. J Control Release, 2006. **114**(1): p. 1-14.

48. Lin, Y.J., et al., *Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression*. J Biomed Mater Res A, 2009. **88**(1): p. 23-33.
49. Cascone, M.G., et al., *Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides*. J Biomater Sci Polym Ed, 2001. **12**(3): p. 267-81.
50. Mooney, D.J., et al., *Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents*. Biomaterials, 1996. **17**(14): p. 1417-22.
51. Liu, L., et al., *Porous polycaprolactone/nanohydroxyapatite tissue engineering scaffolds fabricated by combining NaCl and PEG as coporogens: structure, property, and chondrocyte-scaffold interaction in vitro*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012. **100**(4): p. 956-66.
52. Kim, S.W., et al., *Fabrication of porous titanium scaffold with controlled porous structure and net-shape using magnesium as spacer*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013. **33**(5): p. 2808-15.
53. Schugens, C., et al., *Poly lactide macroporous biodegradable implants for cell transplantation. II. Preparation of poly lactide foams by liquid-liquid phase separation*. J Biomed Mater Res, 1996. **30**(4): p. 449-61.
54. Mikos, A.G., et al., *Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**(2): p. 183-9.
55. Pelipenko, J., P. Kocbek, and J. Kristl, *Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration*. Int J Pharm, 2015. **484**(1-2): p. 57-74.
56. Pathan, S.G., et al., *Cytotoxicity associated with electrospun polyvinyl alcohol*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015.
57. Li, F., Zhao, Y., Song, Y., *Core-Shell Nanofibers: Nano Channel and Capsule by Coaxial Electrospinning*, in *Nanotechnology and Nanomaterials - Nanofibers*, A. Kumar, Editor. 2010, InTech.
58. Lin, C.C. and K.S. Anseth, *PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine*. Pharm Res, 2009. **26**(3): p. 631-43.
59. Bryant, S.J., C.R. Nuttelman, and K.S. Anseth, *Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro*. J Biomater Sci Polym Ed, 2000. **11**(5): p. 439-57.
60. Sabnis, A., et al., *Cytocompatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth muscle cells*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(1): p. 52-9.
61. Sawhney, A.S., et al., *Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention*. J Biomed Mater Res, 1994. **28**(7): p. 831-8.

62. Elisseeff, J., et al., *Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks*. J Biomed Mater Res, 2000. **51**(2): p. 164-71.
63. Wang, H., et al., *Fabrication of PU/PEGMA crosslinked hybrid scaffolds by in situ UV photopolymerization favoring human endothelial cells growth for vascular tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(6): p. 1499-510.
64. Skoog, S.A., P.L. Goering, and R.J. Narayan, *Stereolithography in tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(3): p. 845-56.
65. Sun, Y. and K.T. Weber, *Infarct scar: a dynamic tissue*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(2): p. 250-6.
66. Hsueh, Y.C., et al., *Prostaglandin E(2) promotes post-infarction cardiomyocyte replenishment by endogenous stem cells*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(4): p. 496-503.
67. Zangi, L., et al., *Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(10): p. 898-907.
68. Segers, V.F. and R.T. Lee, *Protein therapeutics for cardiac regeneration after myocardial infarction*. J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(5): p. 469-77.
69. Saxena, A., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2224-31.
70. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001. **410**(6829): p. 701-5.
71. Schenke-Layland, K., et al., *Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction*. J Surg Res, 2009. **153**(2): p. 217-23.
72. Leistner, D.M., et al., *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy*. Clin Res Cardiol, 2011. **100**(10): p. 925-34.
73. Lunde, K., et al., *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1199-209.
74. Leor, J. and S. Cohen, *Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1015**: p. 312-9.
75. Gnechchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. Faseb j, 2006. **20**(6): p. 661-9.
76. Venugopal, J.R., et al., *Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction*. J R Soc Interface, 2012. **9**(66): p. 1-19.

77. Mun, C.H., et al., *Effects of pulsatile bioreactor culture on vascular smooth muscle cells seeded on electrospun poly (lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold*. *Artif Organs*, 2013. **37**(12): p. E168-78.
78. Wall, S.T., et al., *Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation*. *Circulation*, 2006. **114**(24): p. 2627-35.
79. Serpooshan, V., et al., *The effect of bioengineered acellular collagen patch on cardiac remodeling and ventricular function post myocardial infarction*. *Biomaterials*, 2013. **34**(36): p. 9048-55.
80. Chachques, J.C., et al., *Myocardial Assistance by Grafting a New Bioartificial Upgraded Myocardium (MAGNUM trial): clinical feasibility study*. *Ann Thorac Surg*, 2008. **85**(3): p. 901-8.
81. Rouwkema, J., N.C. Rivron, and C.A. van Blitterswijk, *Vascularization in tissue engineering*. *Trends Biotechnol*, 2008. **26**(8): p. 434-41.
82. Bertonecelj, V., et al., *Development and bioevaluation of nanofibers with blood-derived growth factors for dermal wound healing*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014. **88**(1): p. 64-74.
83. Hu, J., et al., *Novel controlled drug delivery system for multiple drugs based on electrospun nanofibers containing nanomicelles*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2014. **25**(3): p. 257-68.
84. Zeng, J., et al., *Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation*. *J Control Release*, 2005. **105**(1-2): p. 43-51.
85. Yu, D.G., et al., *Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(3): p. 5665-72.
86. Rosic, R., et al., *Nanofibers and their biomedical use*. *Acta Pharm*, 2013. **63**(3): p. 295-304.
87. Xie, C., et al., *Release modulation and cytotoxicity of hydroxycamptothecin-loaded electrospun fibers with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inoculations*. *Int J Pharm*, 2010. **391**(1-2): p. 55-64.
88. Zong, X., et al., *Prevention of postsurgery-induced abdominal adhesions by electrospun bioabsorbable nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)-based membranes*. *Ann Surg*, 2004. **240**(5): p. 910-5.
89. Vargas, E.A., et al., *Hyperbranched polyglycerol electrospun nanofibers for wound dressing applications*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(3): p. 1069-78.
90. Nguyen, K.T. and J.L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. *Biomaterials*, 2002. **23**(22): p. 4307-14.
91. Graham, N.B., *Hydrogels: their future, Part I*. *Med Device Technol*, 1998. **9**(1): p. 18-22.
92. Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000. **50**(1): p. 27-46.

93. Schenke-Layland, K., et al., *Recapitulation of the embryonic cardiovascular progenitor cell niche*. *Biomaterials*, 2011. **32**(11): p. 2748-56.
94. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. *Arch Biochem Biophys*, 1993. **303**(2): p. 474-82.
95. Compton, S.J. and C.G. Jones, *Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay*. *Anal Biochem*, 1985. **151**(2): p. 369-74.
96. Votteler, M., et al., *Elastogenesis at the onset of human cardiac valve development*. *Development*, 2013. **140**(11): p. 2345-53.
97. Schenke-Layland, K., et al., *Collagen IV induces trophoectoderm differentiation of mouse embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 2007. **25**(6): p. 1529-38.
98. Hansen, U. and P. Bruckner, *Macromolecular specificity of collagen fibrillogenesis: fibrils of collagens I and XI contain a heterotypic alloyed core and a collagen I sheath*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37352-9.
99. Schesny, M.K., et al., *Preserved bioactivity and tunable release of a SDF1-GPVI bi-specific protein using photo-crosslinked PEGda hydrogels*. *Biomaterials*, 2014. **35**(25): p. 7180-7.
100. Glukhova, M., et al., *Laminin variants and integrin laminin receptors in developing and adult human smooth muscle*. *Dev Biol*, 1993. **157**(2): p. 437-47.
101. Silvestri, A., et al., *Biomimetic materials and scaffolds for myocardial tissue regeneration*. *Macromol Biosci*, 2013. **13**(8): p. 984-1019.
102. Rane, A.A. and K.L. Christman, *Biomaterials for the treatment of myocardial infarction: a 5-year update*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(25): p. 2615-29.
103. Geng, X., O.H. Kwon, and J. Jang, *Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution*. *Biomaterials*, 2005. **26**(27): p. 5427-32.
104. Powell, H.M., D.M. Supp, and S.T. Boyce, *Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes*. *Biomaterials*, 2008. **29**(7): p. 834-43.
105. Son, Y.J., W.J. Kim, and H.S. Yoo, *Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems*. *Arch Pharm Res*, 2014. **37**(1): p. 69-78.
106. Li, W.J., et al., *Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds*. *J Biomed Mater Res A*, 2003. **67**(4): p. 1105-14.

107. Yoo, J.W. and S. Mitragotri, *Polymer particles that switch shape in response to a stimulus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(25): p. 11205-10.
108. Eichhorn, S.J. and W.W. Sampson, *Statistical geometry of pores and statistics of porous nanofibrous assemblies*. J R Soc Interface, 2005. **2**(4): p. 309-18.
109. Kumbar, S.G., et al., *Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(30): p. 4100-7.
110. Zamani, M., et al., *Controlled release of metronidazole benzoate from poly epsilon-caprolactone electrospun nanofibers for periodontal diseases*. Eur J Pharm Biopharm, 2010. **75**(2): p. 179-85.
111. Jeyachandran, Y.L., et al., *Quantitative and qualitative evaluation of adsorption/desorption of bovine serum albumin on hydrophilic and hydrophobic surfaces*. Langmuir, 2009. **25**(19): p. 11614-20.
112. Zeng, J., et al., *Biodegradable electrospun fibers for drug delivery*. J Control Release, 2003. **92**(3): p. 227-31.
113. Xu, X., et al., *Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions*. J Control Release, 2005. **108**(1): p. 33-42.
114. Kim, T.G., D.S. Lee, and T.G. Park, *Controlled protein release from electrospun biodegradable fiber mesh composed of poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene oxide)*. Int J Pharm, 2007. **338**(1-2): p. 276-83.
115. Zong, X., et al., *Structure and morphology changes during in vitro degradation of electrospun poly(glycolide-co-lactide) nanofiber membrane*. Biomacromolecules, 2003. **4**(2): p. 416-23.
116. Kobayashi, H., K. Shiraki, and Y. Ikada, *Toxicity test of biodegradable polymers by implantation in rabbit cornea*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(11): p. 1463-76.
117. Norouzi, M., et al., *PLGA/gelatin hybrid nanofibrous scaffolds encapsulating EGF for skin regeneration*. J Biomed Mater Res A, 2014.
118. Fu, Y. and W.J. Kao, *Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems*. Expert Opin Drug Deliv, 2010. **7**(4): p. 429-44.
119. Ziegler, M., et al., *The bispecific SDF1-GPVI fusion protein preserves myocardial function after transient ischemia in mice*. Circulation, 2012. **125**(5): p. 685-96.
120. Zhang, M., et al., *Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 907-21.
121. Thevenot, P.T., et al., *The effect of incorporation of SDF-1alpha into PLGA scaffolds on stem cell recruitment and the inflammatory response*. Biomaterials, 2010. **31**(14): p. 3997-4008.

122. Zhang, G., et al., *Controlled release of stromal cell-derived factor-1 alpha in situ increases c-kit+ cell homing to the infarcted heart*. Tissue Eng, 2007. **13**(8): p. 2063-71.
123. Takahashi, M., *Role of the SDF-1/CXCR4 system in myocardial infarction*. Circ J, 2010. **74**(3): p. 418-23.
124. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
125. Penn, M.S., *Importance of the SDF-1: CXCR4 axis in myocardial repair*. Circ Res, 2009. **104**(10): p. 1133-5.
126. Purcell, B.P., et al., *Synergistic effects of SDF-1alpha chemokine and hyaluronic acid release from degradable hydrogels on directing bone marrow derived cell homing to the myocardium*. Biomaterials, 2012. **33**(31): p. 7849-57.
127. Prokoph, S., et al., *Sustained delivery of SDF-1alpha from heparin-based hydrogels to attract circulating pro-angiogenic cells*. Biomaterials, 2012. **33**(19): p. 4792-800.
128. Sobkow, L., et al., *Prolonged transendothelial migration of human haematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) towards hydrogel-released SDF1*. Ann Hematol, 2011. **90**(8): p. 865-71.
129. He, X., J. Ma, and E. Jabbari, *Migration of marrow stromal cells in response to sustained release of stromal-derived factor-1alpha from poly(lactide ethylene oxide fumarate) hydrogels*. Int J Pharm, 2010. **390**(2): p. 107-16.
130. Davis, M.E., et al., *Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials*. Circ Res, 2005. **97**(1): p. 8-15.
131. Batycky, R.P., et al., *A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres*. J Pharm Sci, 1997. **86**(12): p. 1464-77.
132. Huang, X. and C.S. Brazel, *On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems*. J Control Release, 2001. **73**(2-3): p. 121-36.
133. Lin, C.C. and A.T. Metters, *Enhanced protein delivery from photopolymerized hydrogels using a pseudospecific metal chelating ligand*. Pharm Res, 2006. **23**(3): p. 614-22.
134. Bures, P., et al., *Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications*. J Control Release, 2001. **72**(1-3): p. 25-33.
135. Ross, P.D. and S. Subramanian, *Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability*. Biochemistry, 1981. **20**(11): p. 3096-102.
136. Charles, P.T., et al., *Reduction of Non-Specific Protein Adsorption Using Poly(ethylene) Glycol (PEG) Modified Polyacrylate Hydrogels In*

- Immunoassays for Staphylococcal Enterotoxin B Detection*. Sensors (Basel), 2009. **9**(1): p. 645-55.
137. Mellott, M.B., K. Searcy, and M.V. Pishko, *Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization*. Biomaterials, 2001. **22**(9): p. 929-41.
138. Chen, D.W., et al., *Sustainable release of vancomycin, gentamicin and lidocaine from novel electrospun sandwich-structured PLGA/collagen nanofibrous membranes*. Int J Pharm, 2012. **430**(1-2): p. 335-41.
139. Mironi-Harpaz, I., et al., *Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity*. Acta Biomater, 2012. **8**(5): p. 1838-48.
140. Gu, F., R. Neufeld, and B. Amsden, *Maintenance of vascular endothelial growth factor and potentially other therapeutic proteins bioactivity during a photo-initiated free radical cross-linking reaction forming biodegradable elastomers*. Eur J Pharm Biopharm, 2007. **66**(1): p. 21-7.
141. Atsumi, T., et al., *Cytotoxicity of photosensitizers camphorquinone and 9-fluorenone with visible light irradiation on a human submandibular-duct cell line in vitro*. Arch Oral Biol, 1998. **43**(1): p. 73-81.
142. Williams, C.G., et al., *Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation*. Biomaterials, 2005. **26**(11): p. 1211-8.
143. Nylander-French, L.A. and J.E. French, *Comparative in vitro cytotoxicity of ethyl acrylate and tripropylene glycol diacrylate to normal human skin and lung cells*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000. **36**(9): p. 611-6.
144. Mazzoccoli, J.P., et al., *Mechanical and cell viability properties of crosslinked low- and high-molecular weight poly(ethylene glycol) diacrylate blends*. J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(2): p. 558-66.
145. Rho, K.S., et al., *Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1452-61.
146. Briggs, T., et al., *Evaluating protein incorporation and release in electrospun composite scaffolds for bone tissue engineering applications*. J Biomed Mater Res A, 2015.
147. Briggs, T. and T.L. Arinzeh, *Examining the formulation of emulsion electrospinning for improving the release of bioactive proteins from electrospun fibers*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(3): p. 674-84.
148. Yang, Y., et al., *Release pattern and structural integrity of lysozyme encapsulated in core-sheath structured poly(DL-lactide) ultrafine fibers prepared by emulsion electrospinning*. Eur J Pharm Biopharm, 2008. **69**(1): p. 106-16.
149. Baroli, B., V.P. Shastri, and R. Langer, *A method to protect sensitive molecules from a light-induced polymerizing environment*. J Pharm Sci, 2003. **92**(6): p. 1186-95.

150. Lin, C.C., S.M. Sawicki, and A.T. Metters, *Free-radical-mediated protein inactivation and recovery during protein photoencapsulation*. *Biomacromolecules*, 2008. **9**(1): p. 75-83.
151. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. *Amino Acids*, 2003. **25**(3-4): p. 207-18.
152. Gu, F., R. Neufeld, and B. Amsden, *Sustained release of bioactive therapeutic proteins from a biodegradable elastomeric device*. *J Control Release*, 2007. **117**(1): p. 80-9.
153. Katari, R.S., A. Peloso, and G. Orlando, *Tissue engineering*. *Adv Surg*, 2014. **48**: p. 137-54.
154. Metters, A.T., K.S. Anseth, and C.N. Bowman, *Fundamental studies of biodegradable hydrogels as cartilage replacement materials*. *Biomed Sci Instrum*, 1999. **35**: p. 33-8.
155. Novosel, E.C., C. Kleinhaus, and P.J. Kluger, *Vascularization is the key challenge in tissue engineering*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. **63**(4-5): p. 300-11.
156. Han, N., et al., *Hydrogel-electrospun fiber composite materials for hydrophilic protein release*. *J Control Release*, 2012. **158**(1): p. 165-70.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika einiger in der Biomaterialherstellung verwandter natürlicher Polymere sowie zugehörige Anwendungsbeispiele. Modifiziert nach [16].	13
Tabelle 2: Auswahl einiger zur Herstellung von Biomaterialien verwendeter synthetischer Polymere, zugehörige Charakteristika und klinische Anwendungsbeispiele. Modifiziert nach [16].	14
Tabelle 3: Übersicht über häufig eingesetzte Techniken zur Herstellung poröser Trägersubstrate.	16
Tabelle 4: Übersicht der regulierbaren Parameter vor und während des Elektrosinnens. Modifiziert nach [55].	18
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Laborgeräte	28
Tabelle 7: Zusammensetzung der Polymerlösungen, die mit BSA und mithilfe der hier dargestellten Parameter versponnen wurden.	35
Tabelle 8: Zusammensetzung der PEGda Lösungen unterschiedlicher BSA-Konzentrationen.	36
Tabelle 9: Zusammensetzung der PEGda-Lösungen unterschiedlicher I 2959-Konzentrationen.	37
Tabelle 10: Maße eines ETM, hergestellt aus PLA 20% in HFP.	43
Tabelle 11: Vergleich der kumulativ freigesetzten BSA-Menge durch unterschiedlich zusammengesetzte ETM an Tag 1 und Tag 22. * < 0.05 Tag 22 versus Tag 1.	52
Tabelle 12: Darstellung der freigesetzten BSA-Konzentration an Tag 22 aus reinen PLA bzw. PLGA-Fasern und PLA/PEG bzw. PLGA/PEG-Fasern	53
Tabelle 13: Maße der Hydrogele, die zur Freisetzung der bifunktionalen Proteine verwendet wurden.	60

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip des TE.	10
Abbildung 2: Aufbau eines Elektrosppinnapparats und Schema des Elektrosppinnens.	19
Abbildung 3: REM-Aufnahmen eines elektrogewebenen Fasernetzwerks, hergestellt mithilfe von unterschiedlichen Polymerlösungen.	44
Abbildung 4: Aufnahmen des Hybrid Biomaterials.	46
Abbildung 5: Generation eines hydrolytisch stabilen und nicht zytotoxischen Hydrogels.	48
Abbildung 6: Einarbeitung des Proteins BSA in unterschiedlich zusammengesetzte ETM: (A) PLA 20%, (B) PLGA 20%, (C) PLA 12,5%, PEG 12,5%, (D) PLGA 12,5 %, PEG 12,5 %, jeweils mit BSA 1%.	50
Abbildung 7: BSA-Freisetzungprofile unterschiedlich zusammengesetzter ETM.	55
Abbildung 8: BSA-Freisetzungprofile aus Hydrogelen unterschiedlicher Netzwerkdichte, die durch den Einsatz variierender (750, 1000 und 5000 µg/ml) I 2959-Konzentrationen hergestellt wurden.	57
Abbildung 9: BSA-Freisetzungprofile aus Hydrogelen nach Verkapselung variierender Konzentrationen an verkapseltem BSA (1000, 5000 und 10000 µg/ml).	59
Abbildung 10: Freisetzungprofile der bifunktionalen Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI.	62
Abbildung 11: Kumulative SDF1-GPVI Konzentration im Überstand von Hydrogelen die 15 µg SDF1-GPVI enthielten.	63
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung einer humanen adulten Arterienwand.	64
Abbildung 13: Spezifische Bindungsaffinität der GPVI-Domäne von SDF1-GPVI an Col I.	66

Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von CXCR4-präsentierenden hECFCs.68

Abbildung 15: Semi-Quantifizierung der Bindungsaffinität der SDF1-Domäne an CXCR4 auf den Oberflächen von hECFCs dargestellt als GVI pro Zelle.69

Abbildung 16: Struktur und Wirkung des Proteins SDF1-GPVI.78

9 Veröffentlichungen

Schesny, M.K., Monaghan M., Bindermann, A. H., Freund, D., Seifert, M., Eble, J. A., Vogel, S., Gawaz, M. P., Hinderer, S., Schenke-Layland, K. *Preserved bioactivity and tunable release of a SDF1-GPVI bi-specific protein using photo-crosslinked PEGda hydrogels*. *Biomaterials*, 2014. **35**(25): p. 7180-7.
[DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.116]

Hinderer S., **Schesny M.**, Bayrak, A.Ibold, B., Hampel, M., Walles, T., Stock, U. A., Seifert, M., Schenke-Layland, K. *Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea*. *Biomaterials*, 2012. **33**(21): p. 5259-66.
[DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.075]

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Department für Frauengesundheit unter Betreuung von Frau Professor Dr. Katja Schenke-Layland durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Katja Schenke-Layland und Frau Dr. Svenja Hinderer.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Frau Dr. Svenja Hinderer, Frau Susanne Geist und Frau Simone Liebscher) von mir (eigenständig und im Falle der Versuche der Abbildung 3 in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Svenja Hinderer, im Falle der Versuche der Abbildung 12 in Zusammenarbeit mit Frau Simone Liebscher, im Falle der Versuche der Abbildung 14 in Zusammenarbeit mit Frau Andrea Bindermann) durchgeführt.

Die Versuche der Abbildung 13 wurden in Zusammenarbeit mit der AG Eble (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Münster) durchgeführt. Der Versuchsaufbau hierfür wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. Eble konzipiert. Frau Désirée Freund unterstützte mich bei der Versuchsdurchführung.

Die statistische Auswertung der Versuche der Abbildungen 5, 8, 10, 13 und 15 erfolgte durch Frau Dr. Svenja Hinderer. Die statistische Auswertung der Versuche der Abbildungen 6, 7, 9, 10 und 11 erfolgte durch mich.

Die Proteine SDF1-GPVI und CD133-GPVI, die in den Versuchen der Abbildungen 10, 11, 13, 14 und 15 verwendet wurden, erhielten wir von der AG Gawaz (Medizinische Universitätsklinik, Abteilung Innere Medizin III, Tübingen).

Herr Alexander Grimme unterstützte mich bei der grafischen Erstellung der Abbildungen 1 und 2.

Herr Daniel Carvajal Berrio (Fraunhofer IGB Stuttgart, Abteilung Zellsysteme) arbeitete mit mir an der Gestaltung der Abbildung 16.

Die Inhalte dieser Dissertation wurden als Manuskript „*Preserved bioactivity and tunable release of a SDF1-GPVI bi-specific protein using photo-crosslinked PEGda hydrogels*“ in *Biomaterials*, 2014, **35**(25): p. 7180-7. [DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.04.116]“ publiziert, welches von mir als Erstautor verfasst wurde. Alle in der vorliegenden Dissertationsschrift verwendeten Abbildungen wurden als Original mit Referenz ausgewiesen. Korrekturen erfolgten durch Herrn Dr. Michael Monaghan, Frau Dr. Svenja Hinderer und Frau Professor Dr. Katja Schenke-Layland.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 24.07.15

Marianne K. Schesny

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katja Schenke-Layland für die Möglichkeit das Thema dieser Dissertation bearbeiten zu dürfen und an der Begeisterung für die Forschung teilhaben zu können.

Herzlichen Dank für die motivierende Betreuung während der gesamten Zeit und die zahlreichen Möglichkeiten sich weiterzuentwickeln und zu lernen.

Danken möchte ich Frau Dr. Svenja Hinderer für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, die ich während der Arbeit erfahren durfte.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen weiteren Mitgliedern der AG Schenke-Layland in Tübingen und der Abteilung Zellsysteme in Stuttgart. Insbesondere danke ich Shannon Layland für die Unterstützung während der gesamten Zeit und Dr. Michael Monaghan für die Hilfestellung beim Anfertigen wissenschaftlicher Texte. Andrea Bindermann, Simone Liebscher und Susanne Geist danke ich für die Hilfe und die schöne Zeit im Labor.

Bedanken möchte ich mich bei der AG Gawaz (Medizinische Universitätsklinik, Innere Medizin III, Tübingen) sowie bei der AG Eble (Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universität Münster) für die wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Dem IZKF Promotionskolleg der Universität Tübingen danke ich für die finanzielle Unterstützung. Mein Dank gilt ebenfalls der Abteilung Zellsysteme des Fraunhofer IGB Stuttgart für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die ich nutzen konnte.

Meinen engen Freunden Sandra Reitinger, Anne Knopf, Kerstin Pracht, Michaela Mathes, David Ehrhard und Alexander Grimme möchte ich ebenfalls herzlich danken. Zeit mit euch zu verbringen ist ein wahres Fest.

Meinen Eltern und meinem Bruder Andreas möchte ich von ganzem Herzen dafür danken mir meine gewünschte Ausbildung zu ermöglichen und mir jeden Tag ein Beispiel dafür zu sein, wie man lernt, ein gutes Leben zu führen. Der Unterstützung vonseiten meiner Freunde und Familie gilt mein tiefer Dank.