

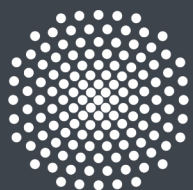
DISSERTATION

GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG BIOGENER
AZID-MODIFIZIERTER EXTRAZELLULÄRER MATRIX
ALS CLICK-CHEMISCH VERNETZBARES BIOMATERIAL

vorgelegt von

Silke Keller

aus Leonberg



Universität Stuttgart

**GEWINNUNG UND CHARAKTERISIERUNG BIOGENER
AZID-MODIFIZIERTER EXTRAZELLULÄREER MATRIX
ALS *CLICK*-CHEMISCH VERNETZBARES BIOMATERIAL**

Von der Fakultät 4 *Energie-, Verfahrens- und Biotechnik*
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Silke Keller

aus Leonberg

Hauptberichter: Prof. Dr. Günter E. M. Tovar

Mitberichterinnen: Prof. Dr. Petra J. Kluger und
Prof. Dr. Christina Wege

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2021

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP der
Universität Stuttgart 2021

Stand proudly on the shoulders of giants.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Danksagung.....	V
Kurzzusammenfassung.....	IX
Abstract.....	XI
1 Einleitung und Stand der Wissenschaft.....	1
1.1 Biomaterialien.....	1
1.1.1 Fremdkörperreaktion.....	4
1.1.2 Biokompatibilität.....	5
1.2 Aufbau humaner Gewebe und der extrazellulären Matrix	6
1.2.1 Humane Gewebe	6
1.2.2 Die Extrazelluläre Matrix.....	7
1.3 Verwendung natürlicher extrazelluläre Matrix als Biomaterial	18
1.3.1 Dezellularisierte Gewebe und Organe	19
1.3.2 <i>In vitro</i> generierte, dezellularisierte Zellmonolagen (engl. <i>cell-derived matrices</i> , CDMs)	19
1.3.3 Methoden zur Dezellularisierung von extrazellulärer Matrix und ganzen Geweben	20
1.3.4 Anwendungsbeispiele von natürlicher extrazellulärer Matrix als Biomaterial.....	22
1.3.5 Herausforderung bei der Verwendung von extrazellulärer Matrix als Biomaterial	25
1.3.6 Aufarbeitung der dezellularisierten und isolierten extrazellulären Matrix für die Verwendung als Biomaterial	26
1.3.7 Charakterisierung der extrazellulären Matrix für die Verwendung als Biomaterial	28
1.4 Modifizierung von <i>in vitro</i> generierter extrazellulärer Matrix für die Verwendung als Biomaterial	34
1.4.1 Unspezifische Funktionalisierung mittels Carbodiimid-Chemie	35
1.4.2 Nicht natürliche Aminosäuren	35
1.4.3 Metabolisches Glykoengineering (MGE)	36
2 Zielsetzung/ Hypothesen.....	39
3 Verwendete Materialien und Geräte	41
3.1 Verwendete Zellen.....	41

4	Angewandte Methoden	42
4.1	Herstellung und Aufarbeitung der (<i>click</i>)ECM.....	42
4.1.1	Zellkulturtechnik.....	42
4.1.2	Gewinnung von (<i>click</i>)ECM und Metabolisches Glykoengineering (MGE).....	47
4.1.3	Aufkonzentrierung isolierter (<i>click</i>)ECM	49
4.1.4	Homogenisierung isolierter (<i>click</i>)ECM.....	50
4.1.5	Lyophilisation der (<i>click</i>)ECM.....	56
4.1.6	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
4.2	Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der <i>click</i> ECM.....	58
4.3	Biochemische Charakterisierung der (<i>click</i>)ECM	62
4.3.1	Histochemische Untersuchung der (<i>click</i>)ECM.....	62
4.3.2	Mikroskopische Techniken	70
4.3.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts der (<i>click</i>)ECM.....	72
4.3.4	Bestimmung des Kollagengehalts in der (<i>click</i>)ECM	74
4.3.5	Bestimmung des Gehalts sulfatierter Glykosaminoglykane in der (<i>click</i>)ECM	77
4.4	Generierung von Oberflächenbeschichtungen aus (<i>click</i>)ECM.....	79
4.4.1	Charakterisierung der (<i>click</i>)ECM-Oberflächenbeschichtungen	82
4.4.2	Untersuchung der Stabilität von (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen auf DIBO-funktionalen Oberflächen.....	83
4.4.3	Untersuchung der Zellantwort auf (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen.....	89
4.5	(<i>click</i>)ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattformen.....	90
4.6	Generierung von Hybridhydrogelen mit Azid-modifizierter Gelatine (<i>click</i> Gel) als Modellsubstanz für die <i>click</i> ECM und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA).....	93
4.6.1	Synthese von Azid-modifizierter Gelatine (<i>click</i> Gel) als Modellsubstanz für die <i>click</i> ECM	94
4.6.2	Synthese des heterobifunktionalen Linkers <i>N</i> -Propargylacrylamid	94
4.6.3	Generierung Azid-Gelatine (<i>click</i> Gel)-haltiger Hybridhydrogele	94
4.6.4	Chemische Charakterisierung der Azid-Gelatine (<i>click</i> Gel) sowie <i>click</i> Gel-haltiger Hybridhydrogele.....	95
4.6.5	Biologische Charakterisierung Azid-Gelatine-haltiger Hydrogele.....	98
4.7	Statistik	101
5	Ergebnisse und Diskussion	102
5.1	Aufarbeitung der (<i>click</i>)ECM	102
5.1.1	Aufkonzentrierung isolierter (<i>click</i>)ECM.....	104
5.1.2	Homogenisierung isolierter und aufkonzentrierter (<i>click</i>)ECM.....	106
5.1.3	Bewertung der ersten Hypothese zur Aufarbeitung der (<i>click</i>)ECM.....	112
5.2	Quantifizierung der Azidkonzentration in der (<i>click</i>)ECM	113
5.2.1	Bewertung der zweiten Hypothese zur Bestimmung der Azidkonzentration in der <i>click</i> ECM.....	117

5.3	Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der (<i>click</i>)ECM	118
5.3.1	Qualitative Analyse der biochemischen <i>click</i> ECM-Zusammensetzung	119
5.3.2	Quantitative Analyse der biochemischen <i>click</i> ECM-Zusammensetzung	128
5.3.3	Bewertung der dritten Hypothese zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der (<i>click</i>)ECM	146
5.4	Generierung von homogenen und reproduzierbaren Oberflächenbeschichtungen aus (<i>click</i>)ECM	148
5.4.1	Homogenität der erzeugten (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen	149
5.4.2	Zelluläre Antwort von Fibroblasten auf (<i>click</i>)ECM-Oberflächenbeschichtungen	153
5.4.3	Stabilität der erzeugten (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen	156
5.4.4	Bewertung der vierten Hypothese zur Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (<i>click</i>)ECM	159
5.5	<i>click</i> ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform	160
5.5.1	Bewertung der fünften Hypothese zur Verwendung von <i>click</i> ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform	164
5.6	Generierung von Hybridhydrogelen mit Azid-modifizierter Gelatine (<i>click</i> Gel) als Modellsubstanz für die <i>click</i> ECM und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)	165
5.6.1	Synthese von Azid-modifizierter Gelatine (<i>click</i> Gel) als Modellsubstanz für die <i>click</i> ECM	166
5.6.2	Charakterisierung der (<i>click</i>)Gel sowie des <i>click</i> Gel-Linker-Konjugats	168
5.6.3	Herstellung und Charakterisierung von Hybridhydrogelen aus <i>click</i> Gel und PEG-DA	177
5.6.4	Untersuchung der Zellantwort auf (<i>click</i>)Gel-haltige Hybridhydrogele	182
5.6.5	Bewertung der sechsten Hypothese zur Generierung von Hybridhydrogelen aus Azid-modifizierter Gelatine als Modellsubstanz für die <i>click</i> ECM und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)	186
6	Schlussbetrachtung und Ausblick	188
7	Anhang	VIII
7.1	Anhang zu den verwendeten Materialien und Geräten	VIII
7.2	Anhang zur Aufarbeitung der (<i>click</i>)ECM	XXIV
7.2.1	Homogenisierung isolierter (<i>click</i>)ECM	XXIV
7.3	Anhang zur Quantifizierung der Azidkonzentration in der <i>click</i> ECM	XXVI
7.4	Anhang zur Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der (<i>click</i>)ECM	XXVII
7.4.1	Qualitative Analyse der biochemischen <i>click</i> ECM-Zusammensetzung	XXVII
7.4.2	Quantitative Analyse der biochemischen Zusammensetzung der (<i>click</i>)ECM	XXIX
7.5	Anhang zur Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (<i>click</i>)ECM	XXXIV

Veröffentlichungen.....XLII

KonferenzbeiträgeXLIII

Abbildungsverzeichnisse..... XLV

Tabellenverzeichnisse..... XLVIII

Literaturverzeichnis.....XLIX

Verwertungsrechte..... LXVI

Eidesstattliche Versicherung..... LXVIII

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei all denen bedanken, die mich während meines Dissertationsvorhabens in so vielfältiger Art und Weise unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

- Mein aufrichtiger Dank gilt **Prof. Dr. Günter Tovar**, **Prof. Dr. Thomas Hirth**, **Dr. Markus Wolperdinger** und **Prof. Dr. Katja Schenke-Layland** für die Möglichkeit, mein Dissertationsvorhaben am **Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP)** der **Universität Stuttgart** und am **Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB)** in Stuttgart verfolgen zu können.
- Der **Peter und Traudl Engelhorn Stiftung** danke ich überdies aufrichtig für deren großzügige finanzielle Unterstützung in Form des Peter und Traudl-Promotionsstipendiums und das mir auf diese Weise entgegengebrachte Vertrauen.
- **Meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Tovar** möchte ich ebenfalls ein herzliches Dankeschön aussprechen. Lieber Günter, Danke für deine hervorragende Betreuung und Begleitung meiner Doktorarbeit. Danke für die zahlreichen hilfreichen und konstruktiven fachlichen Diskussionen, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.
- **Prof. Dr. Christina Wege** und **Prof. Dr. Petra Kluger** gilt mein Dank für die Übernahme der Zweitgutachten sowie die gute Zusammenarbeit während meiner gesamten Zeit am IGVP.
- **Prof. Dr. Roland Kontermann** danke ich herzlich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes am Tag meiner mündlichen Prüfung.
- Ein herzliches Dankeschön möchte ich an meine Fachbetreuer:innen **Dr. Alexander Southan**, **Prof. Dr. Petra Kluger** und **Dr. Monika Bach** aussprechen. Vielen Dank, dass ihr mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt habt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standet. Danke, dass ihr mich inspiriert und motiviert habt und ich so viel von euch lernen durfte.

- Bei meinem Innovationsfeld- und Gruppenleiter am Fraunhofer IGB **Prof. Dr. Peter Loskill** möchte ich ebenfalls ganz herzlich für seine Unterstützung danken. Lieber Peter, Danke, dass ich die Labore, Räumlichkeiten und Infrastruktur des μ -Organo-Labs nutzen durfte und von Anfang an Teil deines Teams sein durfte.
- Für die finanzielle Förderung der Projekte danke ich der **Vector Stiftung** (Fördernummer 2015-052) sowie dem **Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst (MWK) Baden-Württemberg** (Glykobiologie/ Glykobiotechnologie“, Fördernummer 33-7533-7-11.9/7/2).
- Für das tolle Teamwork und die praktische Unterstützung im Labor möchte ich mich von Herzen bei **Anke Liedek, Tomke Bakker, Katharina Wörgötter, Chris Marc Göhring, Philipp Wachter, Benedikt Endreß, Benjamin Kimmel, Janine Raßloff, Sascha Klar, Gabriele Kraut** und **Jonas Muschter** bedanken, die im Rahmen ihrer Abschluss- oder Studienarbeiten ganz maßgeblich zum Erfolg dieses Projekts beigetragen haben.
- Bei allen **Mitarbeiter:innen der Arbeitsgruppe *Chemisch-Physikalische Grenzflächen* am IGVP** danke ich für die schöne gemeinsame Zeit, die vielen tollen Erlebnisse, die gegenseitige Unterstützung sowie den fachlichen Austausch. Mein besonderer Dank gilt dabei **Paul Reichle** für seine Unterstützung bei fluidmechanischen Fragestellungen, **Oliver Gorke** für die Synthese des *N*-Propargylacrylamids, **Felix Markus** für die Durchführung der Rheologie-Messungen, **Dr. Lisa Rebers** für ihre praktische Hilfe bei allen Hydrogel-Fragestellungen, **Tobias Götz** für die Durchführung der ATR-FT-IR- und GPC-Messungen, der Synthese der *click* Gelatine sowie seiner Unterstützung bei allen chemischen Fragestellungen und **Dr. Christiane Claaßen** für die Durchführung des TNBS-Assays.
- **Allen Mitarbeiter:innen der Abteilung *Zell- und Tissue Engineering* sowie der *Organ-on-Chip*-Gruppe** danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die produktive Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt **Brigitte Höhl** für ihre Hilfe in der Histologie, **Sibylle Thude** für die Hilfe bei den Zytotoxizitätsversuchen sowie **Jens Wetschky** und **Dr. Eileen Sauer** für die Hilfe bei der Ultrazentrifugation. Auch **allen Kolleg:innen der IT- und der Personalabteilung** möchte ich an dieser Stelle für ihre Unterstützung danken.
- **Ingeborg Wagner** gilt mein herzlichster Dank für ihre tolle Unterstützung und stets unkomplizierte Zusammenarbeit während meiner Zeit am IGVP.

- **Dr. Claudia Koch** und **Ulf Müller** an der **Universität Stuttgart** danke ich für ihre Unterstützung bei der Biotinylierung sowie der Polarisationsmikroskopie.
- **Felix Remppel** und **seinen Kolleg:innen an der Werkstatt des IGVPs** danke ich herzlich für die Unterstützung und die Anfertigung der laminaren Durchflusszelle sowie der Hydrogelformen.
- Unseren Kooperationspartnern an der Hochschule Reutlingen, **Dr. Ann-Cathrin Volz**, **Svenja Nellinger** und **Kiriaki Athanasopulu** danke ich herzlich für den tollen Austausch, die angenehme Zusammenarbeit sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Fragmentgrößenanalysen und der REM-Aufnahmen.
- An der **Universität Hohenheim** möchte ich neben **Dr. Monika Bach** auch **Johannes Günther** und **Dr. Klaus Schwadorf** für ihre Hilfe, die Durchführung der Elementaranalyse und der ssNMR-Versuche sowie den anregenden Austausch danken.
- Ein weiterer Dank gilt unseren Projektpartnern der **Universität Konstanz** **Prof. Dr. Valentin Wittmann** und **Dr. Daniel Wieland** für die Synthese und die Bereitstellung des Dibenzocyclooctins sowie ihrer Unterstützung bei allen Fragen rund um die *Click*-Chemie.
- **Dr. Dalia Shendi** danke ich für ihre fachliche Unterstützung bei allen Fragestellungen rund um die Biologie der extrazellulären Matrix, die tolle Zusammenarbeit im Labor und die schöne gemeinsame Zeit in Stuttgart.
- Von Herzen möchte ich mich auch bei **Dr. Lisa Rebers** bedanken. Liebe Lisa, ich bin sehr dankbar dafür, dass wir diesen Weg gemeinsam gehen konnten. Danke für all die schönen Erinnerungen an unsere gemeinsame Doktorandenzeit, für deine unglaubliche Unterstützung, die unzähligen fachlichen Diskussionen, die allzeit gute Stimmung im Büro und dass du mir auch in schwierigen Zeiten immer zur Seite gestanden bist.
- Ebenfalls aufrichtig bedanken möchte ich mich bei **Dr. Benjamin Riegger**. Lieber Benjamin, danke für deine Unterstützung, deine Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen, deinem fachlichen Rat und dass du mich immer angespornt hast mein Bestes zu geben. Danke, dass du immer für mich da warst und bist und wir gemeinsam alles schaffen können.
- **Isabel, Christian, Tobias, Lisa, Lauritz, Peter, Julia, Matthias, Benjamin, Aline, Pascal, Julia, Vanessa, Martin und Kodi**, euch allen Danke ich von Herzen, dass ihr mich auf meinem Weg begleitet habt – erst als Kolleg:innen und heute als Freunde.

- **Renate und Bernd Riegger** danke ich aufrichtig für ihre Unterstützung und die vielen lieben Worte.
- Ein ganz besonderer Dank geht an meinen lieben Freundinnen **Julia, Linda, Nadine, Melanie und Tina**. Ich danke euch von ganzem Herzen für die unglaubliche Unterstützung, die ermutigenden Zusprüche, dass ihr mir stets den Ausgleich zur Arbeit geschaffen habt und ganz besonders auch für euer Verständnis und eure Geduld insbesondere während der letzten Monate und Wochen meiner Doktorarbeit. Danke, dass ihr immer hinter mir steht und immer für mich da seid!
- Zu guter Letzt danke ich aus tiefstem Herzen meiner **Familie**. Danke, dass ihr immer an mich glaubt, mich in jeglicher Hinsicht bedingungslos unterstützt und mir auch durch schwere Zeiten geholfen habt. Ohne euch wäre dieser Weg und die Doktorarbeit undenkbar gewesen.

Kurzzusammenfassung

Unter dem Begriff „*clickECM*“ wird eine biogene, d. h. eine von *in vitro* kultivierten Fibroblasten gebildete, extrazelluläre Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) verstanden, die sich durch das Vorhandensein von abiotischen Azidgruppen für *click*-chemische Vernetzungsreaktionen auszeichnet. Dadurch vereinen diese Materialien vorteilhafte nutzbare bioaktive Eigenschaften der natürlichen biogenen ECM mit spezifischer chemischer Reaktivität. Sie ermöglichen über die niedermolekularen funktionellen Azidgruppen die selektive Konjugation dieser biomakromolekularen Materialien in einer bioorthogonalen Azid-Alkin-Cycloaddition mit verschiedenen Alkin-funktionalen Molekülen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der effizienten Gewinnung und umfangreichen Charakterisierung solcher biogenen *clickECM* für die Anwendung als Biomaterial. Dabei wurde zunächst das bestehende Verfahren zur Isolation und Aufarbeitung der *clickECM* mit einem Aufkonzentrierungsschritt auf Basis der Mikrozentrifugation erweitert. Dadurch wurde gegenüber dem bisherigen Verfahren die ECM-Konzentration um das ca. 20-fache gesteigert. Durch den mechanischen Krafteintrag eines Kugelmühlen-Homogenisators ließ sich die aufkonzentrierte *clickECM* zuverlässig homogenisieren, sodass die entstehenden *clickECM*-Suspensionen Fragmentgrößen im Bereich von ca. 8–31 µm aufwiesen und reproduzierbar verarbeitet werden konnten. Die Proteinstrukturen sowie die Azide der *clickECM* wurden dabei nicht geschädigt.

In umfassenden Untersuchungen wurden unterschiedliche Methoden zur Charakterisierung der biomolekularen Zusammensetzung des Materials evaluiert. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowie (immun)histochemische Färbemethoden in Kombination mit verschiedenen mikroskopischen Techniken wurden als geeignete qualitative Methoden identifiziert. Kommerziell erhältliche kolorimetrische Protein-Assays wurden umfassend evaluiert und als nicht geeignet für die zuverlässige Quantifizierung der *clickECM*-Proteinkonzentration bewertet. Es wurde eine verlässliche Methode etabliert, in der der Stickstoffgehalt zunächst durch eine Elementaranalyse quantifiziert und dann mithilfe spezieller Umrechnungsfaktoren in den Gesamtproteingehalt umgerechnet werden konnte. Dieser lag im Bereich von ca. 54 - 61 % (w/w). Durch Quantifizierung und Umrechnung des Hydroxyprolinegehalts mittels geeigneter Umrechnungsfaktoren konnte die Menge an unlöslichem Kollagenen auf ca. 19 – 25 % (w/w) bestimmt werden. Der *Sircol*TM-Assay zur Quantifizierung löslicher Kollagene ergab, dass diese

in der *click*ECM nicht nachgewiesen werden konnten, während mithilfe des *Blyscan*TM-Assays der Gehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen auf ca. 3 % (w/w) bestimmt werden konnte. Es zeigte sich, dass das Metabolische Glykoengineering mit peracetyliertem *N*-Azidoacetylgalactosamin die Konzentration an unlöslichem Kollagen in der *click*ECM im Vergleich zur unmodifizierten ECM signifikant erhöhte. Alle anderen Messwerte unterschieden sich nicht voneinander.

Angewandt als Oberflächenbeschichtung war es möglich, homogene und bioaktive Beschichtungen mit einer mittleren Schichtdicke von ca. 31 µm zu erzeugen, die die darunterliegende Oberfläche vollständig bedeckten und stabil gegen fluidmechanischen Abrieb waren. Durch Konjugation der *click*ECM-Azide in diesen Schichten mit Alkin-gekoppelten Biotin-Molekülen konnten die Schichten erfolgreich biotinyliert werden, um basierend auf der vielseitigen Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung eine universelle Biokonjugationsplattform aufzubauen. Auf diese Weise gelang es, die *click*ECM-Schichten mit zusätzlichen, nicht natürlicherweise in der ECM vorkommenden Funktionen wie der Meerrettichperoxidase auszurüsten.

Unter Verwendung von Azid-modifizierter Gelatine (*click*Gel) als Modellsubstanz für die *click*ECM wurden bioaktive Hybridhydrogele aus Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) generiert. Um ein Auswaschen der *click*Gel aus dem Polymernetzwerk zu verhindern, konnten die Azide mit dem heterobifunktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid konjugiert und anschließend im Zuge der Vernetzungsreaktion anhand der photopolymerisierbaren Gruppen kovalent im Hydrogelnetzwerk verankert werden.

Abstract

The term "*click*ECM" refers to a biogenic extracellular matrix (ECM) obtained from *in vitro* cultured fibroblasts which is characterized by the presence of abiotic azide groups for click-chemical crosslinking reactions. Thus, these materials combine the advantageous bioactive properties of natural biogenic ECM specific chemical reactivity. They enable the selective conjugation of these biomacromolecular materials in a bioorthogonal azide-alkyne-cycloaddition with different alkyne functional molecules via the low molecular weight functional azide groups. The aim of this work was the efficient generation and extensive characterization of such biogenic *click*ECM for their application as biomaterial.

In the course of this work, the existing process for isolation and purification of *click*ECM was first extended by a concentration step based on microcentrifugation. This increased the ECM concentration by a factor of about 20 compared to the previous method. The mechanical forces applied by a bead mill reliably homogenized the concentrated *click*ECM so that the resulting *click*ECM suspensions contained fragment sizes in the range of approximately 8 – 31 μm and which could be reproducibly processed. The protein structures and azides of the *click*ECM were thereby not damaged.

In comprehensive investigations, different methods for characterizing the biomolecular composition of the material were evaluated. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and (immune)histochemical staining methods in combination with various microscopic techniques proved to be suitable qualitative methods for characterizing the biomolecular composition of the material. Commercially available colorimetric protein assays were comprehensively evaluated and were found to be unsuitable for the reliable quantification of the *click*ECM protein concentration. A reliable method was established in which the nitrogen content was first quantified by elemental analysis and then converted into the total protein content using specific conversion factors. The protein content was found to lie in the range of approximately 54 – 61 % (w/w). By quantifying and converting the hydroxyproline content using suitable conversion factors, the amount of insoluble collagen could be determined to be approximately 19 – 25 % (w/w). The *Sircol*TM assay for the quantification of soluble collagens showed that these molecules could not be detected in the *click*ECM, while the *Blyscan*TM assay was applied to determine the content of sulfated glycosaminoglycans and found their concentration to be around 3 % (w/w). It was shown that metabolic glycoengineering with peracetylated *N*-azidoacetyl galactosamine significantly increased the concentration of insoluble

collagen in the *click*ECM compared to the unmodified ECM. All other measured values did not differ from each other.

Applied as a surface coating, it was possible to produce homogeneous and bioactive coatings with an average layer thickness of approximately 31 μm , which completely covered the underlying surface and were stable against fluid mechanical abrasion. By conjugating the *click*ECM azides in these layers with alkyne-coupled biotin molecules, the layers could be successfully biotinylated to set up a universal bioconjugation platform based on the versatile biotin-streptavidin interaction. In this way, it was possible to equip the *click*ECM layers with additional functions not naturally occurring in the ECM, such as horseradish peroxidase.

By using azide-modified gelatin (*click*Gel) as model substance for *click*ECM, bioactive hybrid hydrogels were generated from polyethylene glycol diacrylate (PEG-DA). In order to prevent the *click*Gel from leaking out of the polymer network, the azides were conjugated with the heterobifunctional linker *N*-propargylacrylamide and subsequently anchored in the hydrogel network during the crosslinking reaction sacrificing the photopolymerizable groups.

1 Einleitung und Stand der Wissenschaft

In den nachfolgenden Kapiteln werden die Grundlagen und die Motivation dieser Arbeit dargelegt. Zunächst wird das Forschungsfeld der Biomaterialien vorgestellt. Dabei wird der Begriff „Biomaterialien“ sowie deren Anforderungen und Anwendungen definiert. Die sich anschließenden Kapitel beschäftigen sich dann eingängig mit der extrazelluläre Matrix, um darzustellen, weshalb diese komplex zusammengesetzten Biomolekülnetzwerke der Biomaterialentwicklung stets als Vorbild dienen.

Danach wird in der Darstellung des aktuellen Stands der Wissenschaft dargelegt und aufgezeigt, wie extrazelluläre Matrices als Biomaterialquelle gewonnen und genutzt werden können. Es wird erläutert, an welchen Stellen natürliche extrazelluläre Matrices bereits Anwendung als Biomaterialien finden und weshalb sich die Verarbeitung sowie die Charakterisierung dieser isolierten Matrices bis dato äußerst anspruchsvoll gestalten. Dabei werden auch die Limitierungen dieser Materialien aufgezeigt. Im letzten Unterkapitel wird dann beschrieben, welche Bestrebungen es bisher gibt, diese grundsätzlich äußerst interessanten Materialien für die Anwendung als Biomaterialien zu modifizieren und zu charakterisieren.

1.1 Biomaterialien

Der Begriff „Biomaterial“ ist in der Fachliteratur in mehreren, leicht voneinander abweichenden Varianten definiert. Eine der verbreitetsten Definitionen wurde im Jahr 1991 auf der „2nd Consensus Conference on Definitions“ der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien (engl. *European Society for Biomaterials*, ESB) in Chester, Großbritannien festgelegt. Hier wurden Biomaterialien definiert als: „...materials intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body.“ – frei übersetzt „Materialien, die als Schnittstelle zu biologischen Systemen bestimmt sind, um Gewebe, Organe oder Funktionen des Körpers zu evaluieren, zu behandeln, zu verbessern oder zu ersetzen“ [1-3]. Das Forschungsfeld zeichnet sich durch einen außerordentlich hohen Grad an Interdisziplinarität aus, sodass für die Forschung und Entwicklung dieser Materialien eine Vielzahl unterschiedlicher Expertisen gebündelt werden (schematisch dargestellt in **Abbildung 1**).

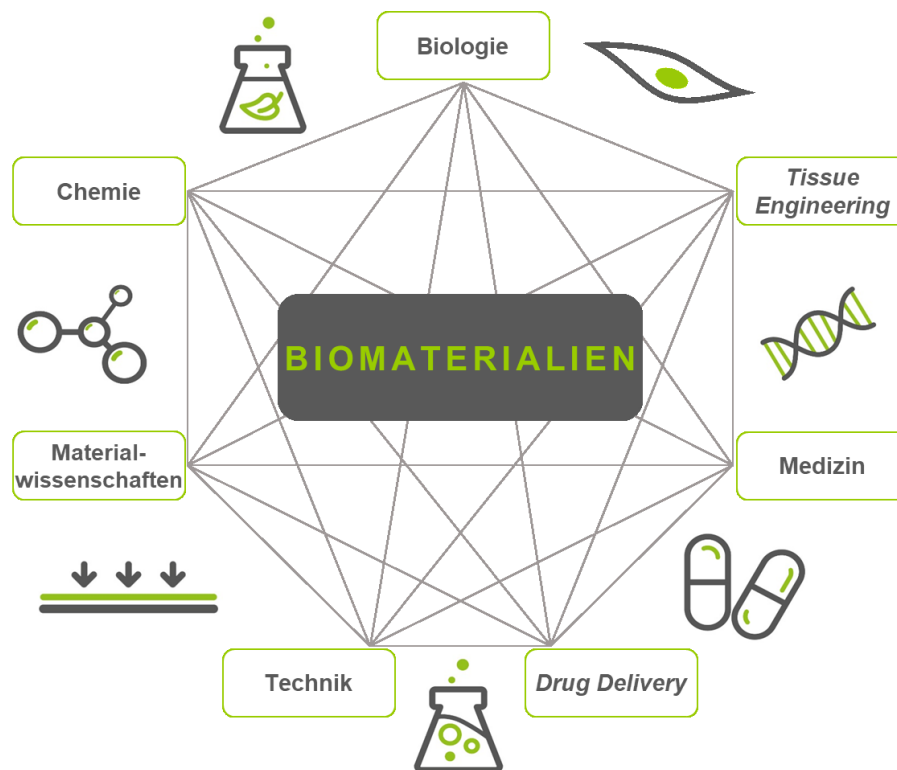


Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wissenschaftsfelder, die an der Erforschung und Entwicklung von Biomaterialien zusammenarbeiten.

Biomaterialien werden schon seit geraumer Zeit in der Medizin für ganz unterschiedliche Anwendungen genutzt. Der Anwendungsbereich erstreckt sich von vergleichsweise simplen Verbrauchsmaterialien und Temporärimplantaten (z. B. Kathetersystemen) bis hin zu hochkomplexen Langzeitimplantatsystemen (z. B. Hüftgelenksimplantate oder Herzschrittmacher). Je nach Anforderung und angedachter Verweilzeit des jeweiligen Materials im oder am Körper des Patienten kann es erstrebenswert sein, dass die Materialien einen festen Verbund mit dem Körper eingehen (z. B. bei knochengeführten Knie- oder Hüftprothesen) oder dass sich das Implantat nach einer definierten Zeit problemlos wieder entfernen lässt (z. B. bei Kathetersystemen). Eine Unterteilung von Biomaterialien kann anhand der oben genannten angedachten Kontaktzeit des Materials mit dem Körper vorgenommen werden [4]. Die Biomaterialien werden in diesem Kontext i. d. R. als Implantate beschrieben, auch wenn es sich dabei z. T. nur um medizinische Geräte handelt, die nicht dazu gedacht sind, im Körper zu verbleiben. Als eines der Standardwerke in der Biomaterialforschung gilt Erich Wintermantels Buch „*Medizintechnik: Life Science Engineering*“ [4], worin der Begriff Implantat wie folgt definiert wird:

„Ein Implantat ist ein jenseits der Haut- oder Schleimhautbarriere des Körpers eingebrachter Werkstoff, Bauteil, ein Werkstoff- oder Bauteilsystem. Dies schließt die Verankerung auf oder die Belegung von äusseren und inneren Oberflächen des Körpers ein. Unter den Aspekten der Biokompatibilität, darunter der Struktur- und der Oberflächenkompatibilität werden damit auch Applikationen von Werkstoffen oder Bauteilen auf der Haut oder auf der Schleimhaut verstanden. Je nach Implantationsdauer unterscheidet man Ultrakurzzeit-, Kurzzeit- oder Langzeitimplantate.“ (direktes Zitat [4]).

Anhand dieser Definition lassen sich Bio- bzw. Implantatmaterialien entsprechend der Kontaktzeit mit dem Körper in drei Klassen unterteilen [4]:

- 1) **Ultrakurzzeitimplantate**
- 2) **Kurzzeitimplantate**
- 3) **Langzeitimplantate**

Während zu den **Ultrakurzzeitimplantaten** alle Verbrauchsmaterialien und Instrumente wie bspw. chirurgische Skalpelle o. Ä. gezählt werden, umfasst die Klasse der **Kurzzeitimplantate** Materialien wie z. B. Osteosyntheseplatten (Implantate, mit denen Knochen oder Knochenfragmente während einer Operation miteinander verbunden werden können), die lediglich für eine begrenzte Zeit im Körper des Patienten verbleiben sollen. Gelenkprothesen, die per Definition für den dauerhaften Verbleib im Körper bestimmt sind, sind Teil der Klasse der **Langzeitimplantate** [4].

1.1.1 Fremdkörperreaktion

Wird ein dem Körper fremdes Material in den Körper eingebracht, so löst dieses unbekanntes Implantatmaterial eine Reaktion aus, die auch als sogenannte „Fremdkörperreaktion“ bezeichnet wird [5]. Anders als bei der normalen Wundheilungs- und Gerinnungskaskade kommt es auf der Oberfläche des Implantatmaterials bei dieser Reaktion zu einer unspezifischen Adsorption von Proteinen durch Denaturierungs- und Konformationsänderungsprozesse. Dieser Vorgang führt dazu, dass die an der normalen Wundheilung beteiligten Zellen auf der Implantatmaterialoberfläche adhären und es dadurch zu einem entzündungsfördernden Prozess kommt [6]. Wenn das Implantat von den Makrophagen nicht phagozytiert und abgebaut werden kann, wird die von den Immunzellen ausgelöste Entzündung chronisch, was zur Folge hat, dass die Makrophagen mehrkernige Riesenzellen (auch engl. *foreign-body giant cells*) bilden, die im betroffenen Gewebe verbleiben und weiterhin Zytokine freisetzen, die die Entzündung langfristig aufrechterhalten. Da die Phagozytose nicht möglich ist, kommt es zur Abscheidung einer fibrösen Schicht auf der Fremdkörperoberfläche, wodurch der Fremdkörper vom Körper abgekapselt wird [5-7]. Im Idealfall verläuft dieser Prozess für den Patienten unbemerkt und frei von Komplikationen. Es ist jedoch auch möglich, dass die Kapsel immer dicker wird und sich dadurch verhärtet. Dies kann zu Spannungsgefühlen, dauerhaften Schmerzen und Durchblutungsstörungen führen [6]. In schwerwiegenderen Fällen kann es jedoch auch zu chronischen Entzündungen oder im schlimmsten Fall zum Tod des Patienten durch Funktionsverlust des Implantats kommen [8].

Obwohl die spezifischen Aufgaben, die die Biomaterialien im oder am Körper erfüllen müssen, stark variieren, gilt für alle Implantatmaterialien in gleichem Maße eine gemeinsame Anforderung, um die oben beschriebene Fremdkörperreaktionen zu vermeiden: Sie müssen stets eine angemessene biologische Verträglichkeit im Körper aufweisen. Diese Eigenschaft wird in der Biomaterialforschung und -entwicklung als „Biokompatibilität“ bezeichnet [4].

1.1.2 Biokompatibilität

Die Definition dieses Begriffs wurde mit dem Fortschritt der Forschung im Laufe der letzten 60 Jahre immer wieder aktualisiert [9]. Während Biokompatibilität von Erich Wintermantel in seinem oben genannten Werk [4] als „die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System“ definiert wird, postulierte David F. Williams, einer der führenden Pioniere auf dem Gebiet der Biomaterialien, in seiner 2008 veröffentlichten Publikation „*On the mechanisms of biocompatibility*“ [9], dass sich ein Biomaterial von einem herkömmlichen Material durch seine Fähigkeit unterscheidet, im direkten Kontakt mit dem umliegenden Gewebe existieren zu können, ohne dass das Gewebe des Patientenkörpers in einem inakzeptablen Maße geschädigt wird. Williams betont dabei, dass die Biokompatibilität eines Implantatmaterials nicht nur von der Beschaffenheit des Materials selbst abhängt, sondern auch von der An- oder Abwesenheit von Mikroorganismen oder Endotoxinen und ganz maßgeblich auch vom jeweiligen Allgemeinzustand des Patienten. So können sich nach Williams u. a. der allgemeine Gesundheitszustand, das Alter und das Geschlecht des Patienten, aber auch dessen Lebensweise und Krankengeschichte auf den Verlauf und Erfolg einer Implantation auswirken [9]. Aufgrund dessen schlägt Williams in seiner oben genannten Arbeit vor, den Begriff der Biokompatibilität speziell in Bezug auf die geforderten Funktionen, die das Implantat im Patienten ausüben soll, zu definieren. Er betont, dass ein Implantat diese geforderte/n Funktion/en nur dann erfolgreich ausüben kann, wenn das Biomaterial oder häufig auch die Biomaterialien, die im Verbund das Implantat bilden, eine Reaktion des umliegenden Gewebes hervorrufen, die mindestens kompatibel mit der geforderten Funktion oder sich gar förderlich darauf auswirkt. Williams empfiehlt deshalb, den Begriff der Biokompatibilität wie folgt neu zu definieren: „*Biocompatibility refers to the ability of a biomaterial to perform its desired function with respect to a medical therapy, without eliciting any undesirable local or systemic effects in the recipient or beneficiary of that therapy, but generating the most appropriate beneficial cellular or tissue response in that specific situation, and optimising the clinically relevant performance of that therapy.*“ - frei übersetzt) „Biokompatibilität bezieht sich auf die Fähigkeit eines Biomaterials, die erwünschten Funktionen hinsichtlich einer medizinischen Therapie auszuführen, ohne dabei irgendeinen unerwünschten lokalen oder systematischen Effekt im Empfänger hervorzurufen. Stattdessen soll die bestmöglich passende zelluläre oder gewebspezifische Antwort in der jeweiligen Situation erzeugt werden, die die klinisch notwendige Therapiefunktion optimiert.“ [9].

Wird diese Definition auf Biomaterialien übertragen, so stellen die Materialien, die gemeinsam das Implantat bilden, nach wie vor das technische und der menschliche Körper das biologische System dar. Die Verträglichkeit muss dementsprechend zwischen dem Implantat selbst und den Zellen der Gewebe, die mit dem Material unmittelbar in Kontakt stehen, gegeben sein, und die Reaktion des Patientenkörpers darf die Funktion des Implantats nicht negativ beeinflussen. Die Verweilzeit des Implantats im oder am Körper spielt dabei, wie oben bereits erwähnt, keine Rolle.

1.2 Aufbau humaner Gewebe und der extrazellulären Matrix

Um Biomaterialien, die als Implantat in den menschlichen Körper verbracht werden und dort einen festen Verbund mit den umliegenden Geweben ausbilden sollen, möglichst attraktiv für Zellen zu gestalten, ist es wichtig zu verstehen, welche Umgebung Zellen in einem natürlichen Gewebe vorfinden, um diese möglichst exakt nachzuahmen.

1.2.1 Humane Gewebe

Der menschliche Körper besteht aus den vier Grundgewebearten Epithelgewebe, Binde- und Stützgewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe [10]. Sie alle sind auf die Erfüllung unterschiedlicher Aufgaben spezialisiert und dementsprechend unterschiedlich aufgebaut. Grundsätzlich können Gewebe als Zellverbände aus gleichartig differenzierten Zellen verstanden werden, die i. d. R. eine gemeinsame Funktion erfüllen und durch spezifische, nicht zelluläre Strukturen ergänzt werden [10-14]. Gewebe bestehen demnach stets aus den gewebespezifischen Zellen sowie der von diesen spezialisierten Zellen gebildeten Biomolekülmatrix, die sie in den Interzellularraum sezernieren (**Abbildung 2**). Diese Interzellulärschubstanz wird auch extrazelluläre Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) genannt [13].

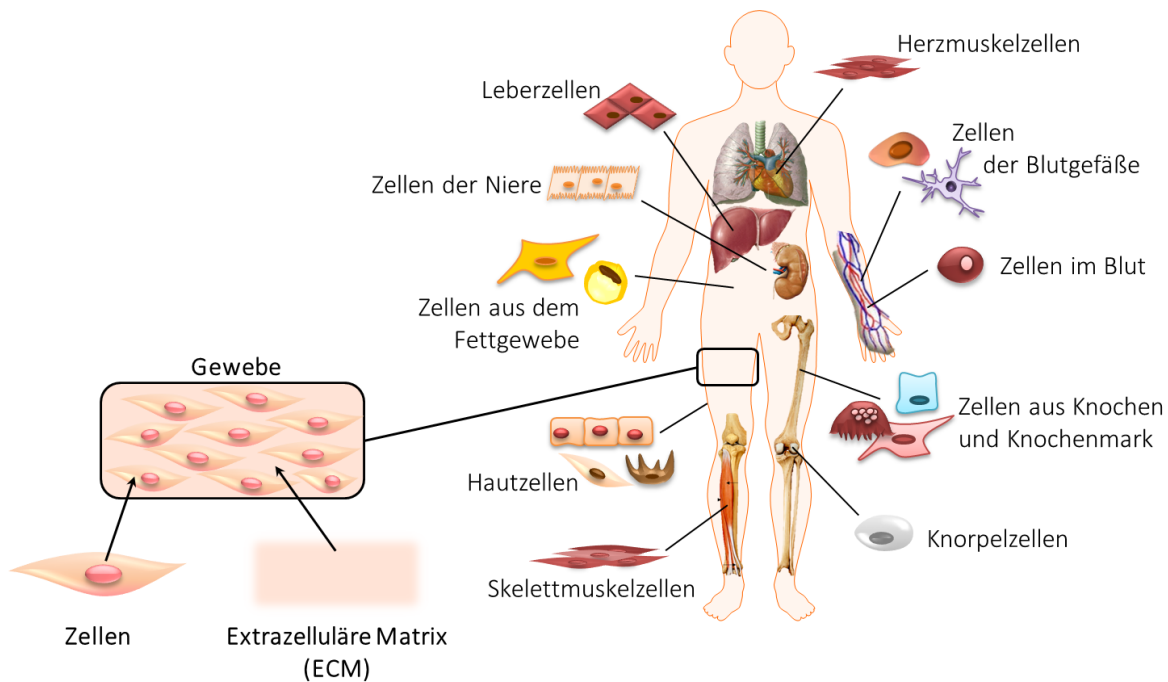


Abbildung 2: Schematische Darstellung unterschiedlicher menschlicher Gewebe mit den dort residierenden gewebespezifischen Zellen und der von ihnen sekretierten extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM). (Abbildung modifiziert nach Vorlage von Freia Schmid, Fraunhofer IGB Stuttgart, Abteilung Zellsysteme, 2014.)

1.2.2 Die Extrazelluläre Matrix

Neben den gewebespezifischen eukaryotischen Zellen ist jedes der vier oben genannten Grundgewebe im menschlichen Körper aus spezifischer extrazellulärer Matrix aufgebaut. Den Anteil, den die ECM im jeweiligen Gewebe einnimmt, schwankt jedoch unter den einzelnen Gewebetypen z. T. recht stark. Im Bindegewebe ist dieser Anteil bspw. sehr hoch, während er in der Epidermis der Haut aufgrund des spezifischen Aufbaus und der Anordnung der Zellen sehr klein ist [10, 15, 16]. Neben dem Anteil der ECM oder anders ausgedrückt dem Verhältnis zwischen Zellzahl und ECM-Menge, wirkt sich auch die gewebespezifische Zusammensetzung der ECM-Biomoleküle auf den jeweiligen Gewebetyp und dessen physikalisch-mechanische sowie biochemische Eigenschaften aus [10, 15, 17, 18].

Außer für die strukturelle und funktionelle Organisation von Zellen und der mechanischen Stabilität von Geweben dient die ECM überdies als Reservoir für zahlreiche Hormone, Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle, die eine Reihe zellulärer Funktionen (Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung) steuern [10, 15, 18]. Auch am Transport von Nährstoffen und Abbauprodukten, die im Zuge des natürlichen Metabolismus entstehen, ist die ECM aktiv beteiligt [13].

Trotz der oben genannten gewebespezifischen Eigenschaften besteht die ECM grundsätzlich aus zwei Hauptbestandteilen, die jeweils von den Zellen selbst gebildet und in den Interzellularraum sezerniert werden [10, 13, 18]:

1) **Grundsubstanz**

2) **Fasern**

Die **Fasern** der ECM bilden das dreidimensionale, gewebespezifische Grundgerüst, an dem die Bestandteile der Grundsubstanz (z. B. die adhäsiven Glykoproteine oder Proteoglykane) adhärieren und dort mit den angrenzenden Zellen über deren Matrixrezeptoren (wie bspw. den Integrinen) interagieren. Die ECM stellt dabei kein statisches, sondern ein hochdynamisches Konstrukt dar. In diesem Zusammenhang wird auch von der Ultrastruktur, d. h. der Mikromorphologie oder Feinstruktur des Gewebes gesprochen. Die ECM wird *in vivo* von den Zellen des Gewebes konstant ab-, auf- und umgebaut [19, 20]. Maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt sind spezifische Proteasen wie bspw. die Metalloproteasen [19, 20]. In **Abbildung 3** ist der grundsätzliche Aufbau der ECM schematisch dargestellt.

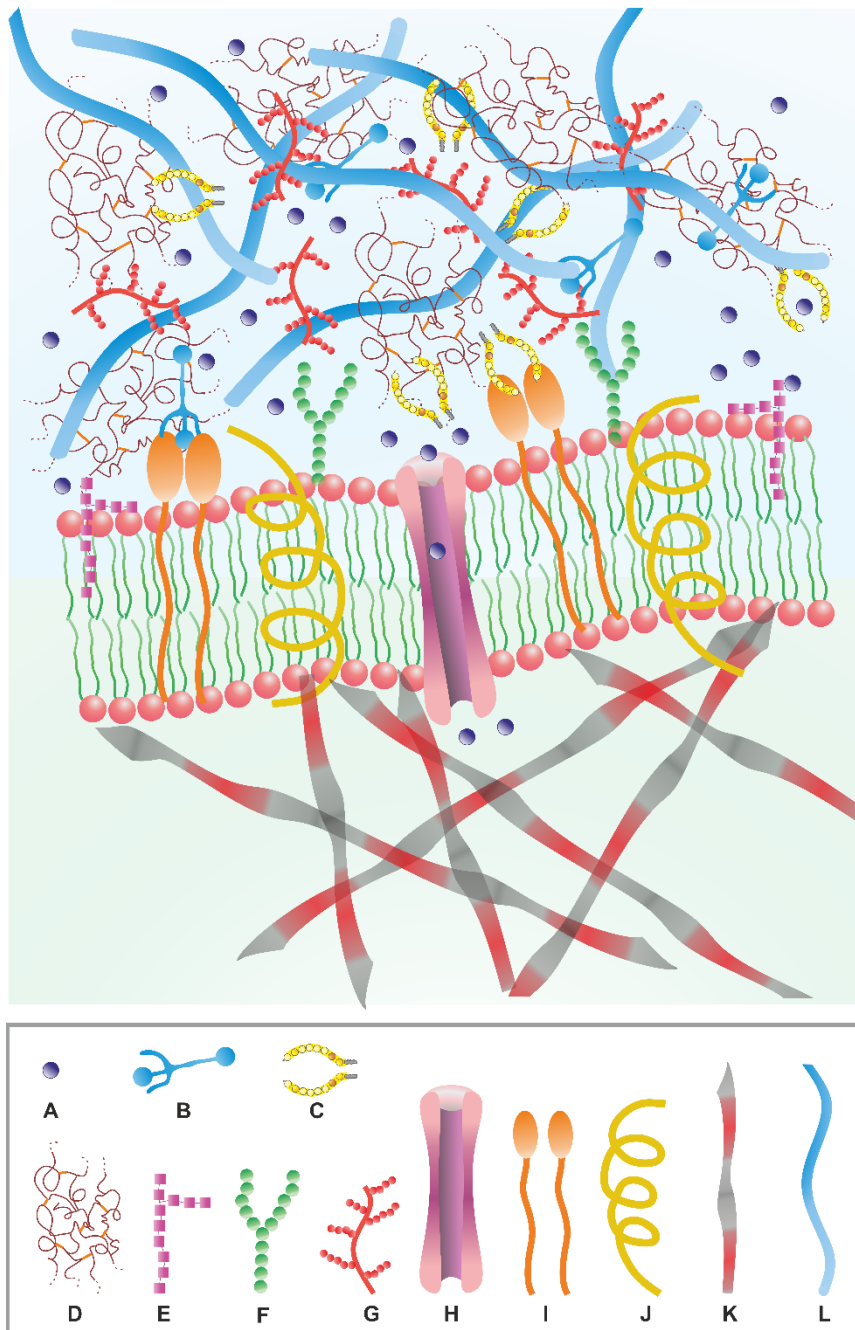


Abbildung 3: Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM), die sich grundsätzlich aus Fasern und der Grundsubstanz zusammensetzt und von den residierenden Zellen in den Extrazellularraum sekretiert wird. (Abbildung in Anlehnung an [5] und [21], grafisch nach eigener Skizze umgesetzt von Dr. Benjamin Riegger, IGVP.).

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| A: Kleines lösliches Signalmolekül | G: Proteoglykan |
| B: Laminin | H: Kanalprotein / Rezeptor |
| C: Fibronectin | I: Integrin |
| D: Elastische Fasern | J: Integrales Transmembranprotein |
| E: Glykolipid | K: Zytoskelett / Aktinfilament |
| F: Glykoprotein | L: Fibrilläres Kollagen |

Die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix

Die **Grundsubstanz** enthält neben Wasser eine komplexe Mischung aus hydrophilen Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Nachfolgend sind die Biomolekülklassen der Grundsubstanz genauer beschrieben [10, 15-17].

Glykosaminoglykane sind aus unverzweigten sauren Polysaccharidketten zusammengesetzt. Die Disaccharideinheiten bestehen dabei aus einer Uronsäure (meistens Glucuronsäure, selten auch aus Iduronsäure). Diese Disaccharideinheiten sind durch eine 1,4-glykosidische Bindung miteinander verknüpft. Überdies sind sie in einer 1,3-glykosidischen Bindung mit einem Aminozucker wie dem *N*-Acetylglucosamin oder dem *N*-Acetylgalactosamin verbunden. An diesen Aminozucker sind teilweise Sulfat- und ggf. auch Carboxygruppen gebunden, durch welche die Moleküle mit einer negativen Ladung versehen werden. Glykosaminoglykane können in sulfatierte Glykosaminoglykane (sGAGs) und nicht sulfatierte Glykosaminoglykane (GAGs) eingeteilt werden, wobei Hyaluronsäure das einzige nicht sulfatierte Glykosaminoglykan darstellt. Je nach Art der Verbindung sowie Art und Anzahl der Sulfatgruppen lassen sich GAGs in folgende Gruppen einteilen (**Abbildung 4**):

- Hyaluronsäure
- Chondroitinsulfat und Dermatansulfat
- Keratansulfat
- Heparansulfat und Heparin

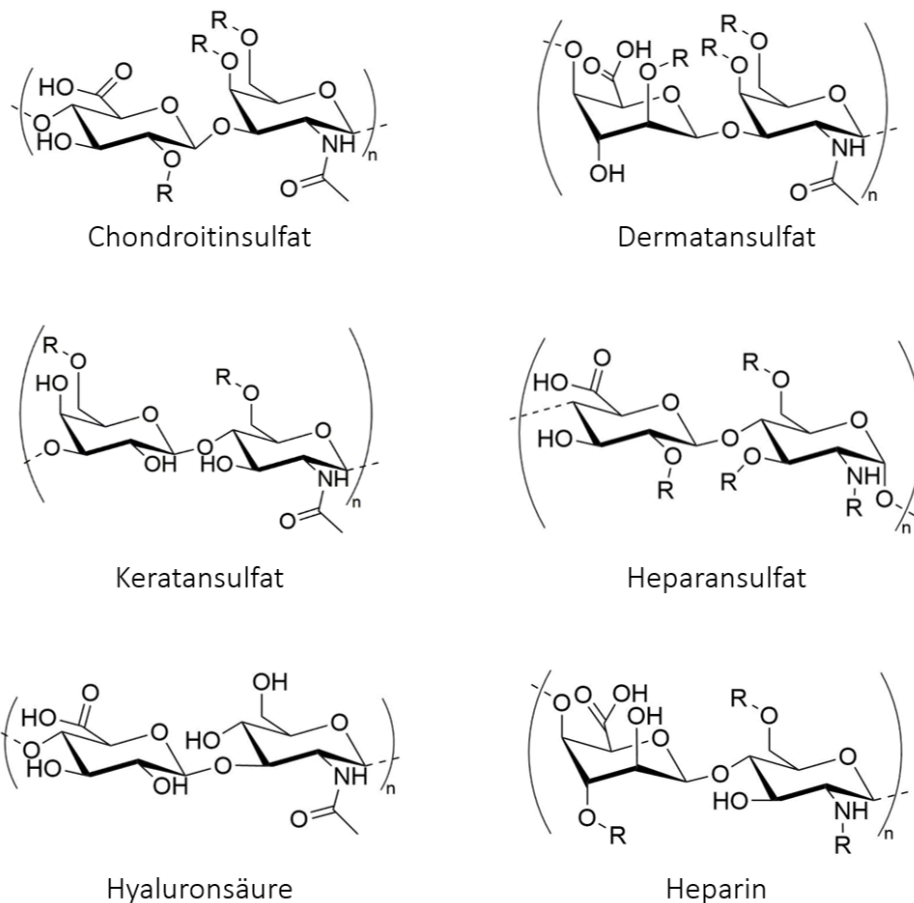


Abbildung 4: Strukturformeln der Glykosaminoglykane (GAGs) Hyaluronsäure, Heparansulfat, Chondroitinsulfat/ Dermatansulfat und Keratansulfat. Rest (R) je nach Typ: -OH oder -SO₃⁻. (Strukturformeln gezeichnet und zur Verfügung gestellt von Tobias Götz, IGVP.)

Bei physiologischem pH sind Glykosaminoglykane durch deprotonierte Säuregruppen negativ geladen, wodurch sie u. a. an der Aufrechterhaltung des Turgors beteiligt sind. Auf diese Weise erhöhen sie die Elastizität der ECM und dienen bspw. im Knorpelgewebe als Bestandteil der Synovialflüssigkeit als eine Art biologisches Schmiermittel [10, 15]. Durch ihre chemischen Eigenschaften ermöglichen sie die Diffusion von hydrophilen Substanzen, während sie gleichzeitig die Fortbewegung von größeren Partikeln wie z. B. Mikroorganismen einschränken [10].

Mit Ausnahme von Hyaluronsäure liegen GAGs als sogenannte **Proteoglykane** vor [18, 22]. Proteoglykane bestehen zu 80 – 94%(w/w) aus GAGs und zu 6 – 20 %(w/w) aus Proteinen. Dabei binden die Polysaccharide/ Glykane stern- oder bürstenförmig an ein zentrales Kernprotein (**Abbildung 5**).

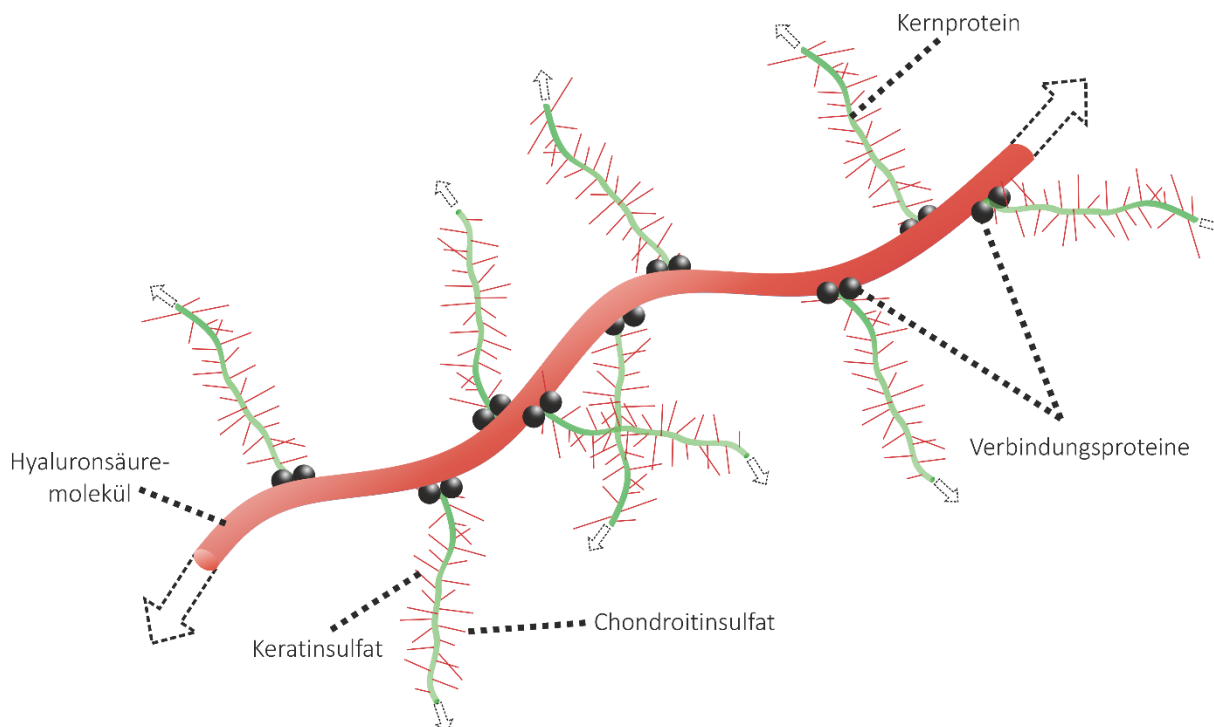


Abbildung 5: Schematische Darstellung der molekularen Zusammensetzung eines Proteoglykans. Bei dieser Biomolekülklasse liegen eine oder mehrere Glykosaminoglykanketten an das Kernprotein gebunden vor. Damit unterscheiden sie sich von den Glykoproteinen, bei denen Oligosaccharidketten an die Proteine gebunden sind. Proteoglykane kommen hauptsächlich im Extrazellarraum vor, während Glykoproteine in der Zellmembran zu finden sind. (Abbildung in Anlehnung an [17], grafisch nach eigener Skizze umgesetzt von Dr. Benjamin Riegger, IGVP.)

Die Makromoleküle kommen entweder membranständig, d. h. in der Plasmamembran verankert oder als transmembrane Proteoglykane vor. Die häufigsten Vertreter dieser Biomolekülklasse sind Aggrecan (im Knorpel), Decorin (im Bindegewebe) und Perlecan (in der Basallamina) [17].

Proteine, die mit einer oder mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen an den Enden versehen sind, werden als **Glykoproteine** bezeichnet. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Proteoglykanen ist der Glykangehalt bei diesen Biomolekülen deutlich geringer. Bei den gebundenen Zuckerresten kann es sich um verzweigte oder unverzweigte Mono-, Di-, Oligo- oder Polysaccharide handeln. Glykoproteine kommen u. a. in der Zellmembran vor und ragen mit den Kohlenhydratketten in die umgebende ECM. Gemeinsam mit den Glykolipiden der Zellmembran formen sie die Glykokalix, d. h. eine dichte Kohlenhydratschicht auf der extrazellulären Seite der Zelle. Sie spielt als Schutz und als Rezeptor eine wichtige Rolle, ist aber auch an der gegenseitigen Erkennung von Zellen und der Zelladhäsion maßgeblich beteiligt [14]. Glykoproteine vermitteln ferner die Haftung der Zellen

an den Fasern der ECM. Zu den Glykoproteinen zählen Laminine, Fibronectin, Nidogen, Tenascin und im Knochen zudem Osteocalcin, Osteonectin, und Osteopontin [10, 13, 23]. Zelladhäsionsproteine wie bspw. das Fibronectin (**Abbildung 6**) weisen in ihrer Proteinstruktur spezielle Bindungsmotive (die bekannteste darunter ist die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure, kurz Arg-Gly-Asp, oder im Einbuchstabencode RGD) auf, die von den Integrinen der Zellmembran erkannt und gebunden werden [16, 20, 23]. Fibronectin und Laminin verfügen zusätzlich zur RGD-Sequenz als Adhäsionsmotiv für Zellen auch über hoch affine Bindungsstellen für andere ECM-Proteine (z. B. Heparansulfat oder Kollagene) [16]. Auf diese Weise verknüpfen Glykoproteine sich mit den Zellen und der Grundsubstanz und ermöglichen die Adhäsion der Zellen [10].

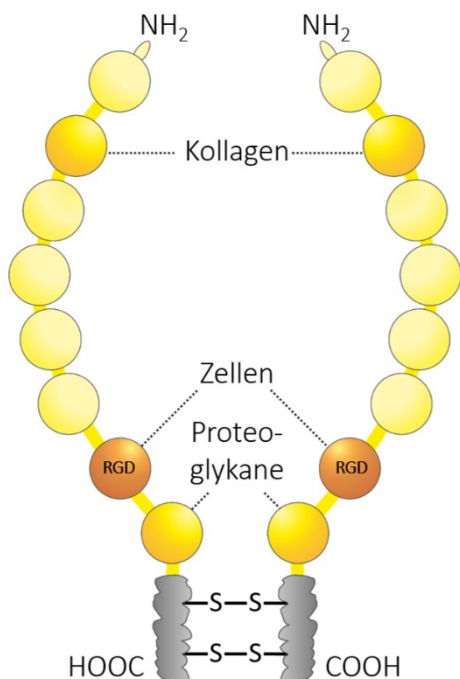


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Glykoproteins Fibronectin. Das Dimer, das durch Disulfidbrücken verbunden ist, weist u. a. Bindungsdomänen für Proteoglykane, Zellen und Kollagen auf und dient als universelles Adhäsionsmolekül. Es bindet an die transmembranen Integrine der Zellen und verknüpft auf diese Weise die Zelle mit den Kollagenen oder den Proteoglykanen der ECM. (Abbildung in Anlehnung an [24], grafisch nach eigener Skizze umgesetzt von Dr. Benjamin Riegger, IGVP.)

Nidogen und Laminin sind typische Glykoproteine, welche in der Basallamina zu finden sind und ebenfalls von Integrinen der Zelloberfläche gebunden werden [23]. Die Bindung von Glykoproteinen und Integrinen löst in der Zelle Signalkaskaden aus, die zellulären Vorgänge wie das Zellwachstum, die Zellteilung, aber auch das Überleben der Zellen stimulieren können [17].

Die Fasern der extrazellulären Matrix

Neben der Grundsubstanz besteht die ECM aus Fasern, deren Funktion die Verstärkung und Unterstützung des Gewebes ist. Sie werden in drei Faserarten unterteilt.

- **Kollagenfasern**
- **Elastische Fasern**
- **Retikuläre Fasern**

Kollagenfasern bilden mit einem Anteil von ca. 25 - 30 % das häufigste Protein im menschlichen Körper [10, 15, 18]. Die Primärstruktur der Kollagene bilden die Aminosäureketten, die sich durch eine repetitive Sequenz der Form G-X-Y auszeichnet. An jeder dritten Stelle ist somit die Aminosäure Glycin zu finden. Die X-Position ist i. d. R. von Prolin belegt, während die Y-Position von der α -Aminosäure Hydroxyprolin eingenommen wird. Aufgrund der geringen Größe des Glycins und der heterocyclischen Struktur des Prolins legen sich die Aminosäureketten in engen Wendungen zur Sekundärstruktur des Kollagens umeinander, sodass eine linksgängige Helix entsteht, die durch das Hydroxyprolin (genauer gesagt durch die sich ausbildenden Wasserstoffbrückenbildungen) stabilisiert wird. Für die Tertiärstruktur des Kollagens winden sich drei Kollagen-Helices zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammen, die auch als Prokollagen bezeichnet wird und einen Durchmesser von ca. 1,5 nm sowie eine Länge von ca. 300 nm aufweist [14]. Nach der Sekretierung der Prokollagene werden im Interzellularraum spezifische Peptide an den Enden der Moleküle enzymatisch abgespalten, die im Zellinneren eine Polymerisierungsreaktion dieser Kollagenvorstufen verhindert haben. Durch die Abspaltung der Peptide entsteht das sogenannte Tropokollagen [14]. Diese polymerisieren anschließend zu Mikrofibrillen, wobei sich die Tropokollagene in dieser Quartärstruktur parallel zusammenlagern und schließlich als sogenannte Primärfilamente einen Durchmesser im Bereich von ca. 1 – 10 μ m aufweisen. Die auf diese Weise gebildeten Fasern lagern sich häufig zu sogenannten Kollagenbündeln zusammen, die zwar extrem zugresistent, dennoch aber biegsam sind und dem Gewebe so eine Art Rahmenkonstruktion und dadurch Form und Festigkeit verleihen. Der schematische Aufbau von Kollagen ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt.

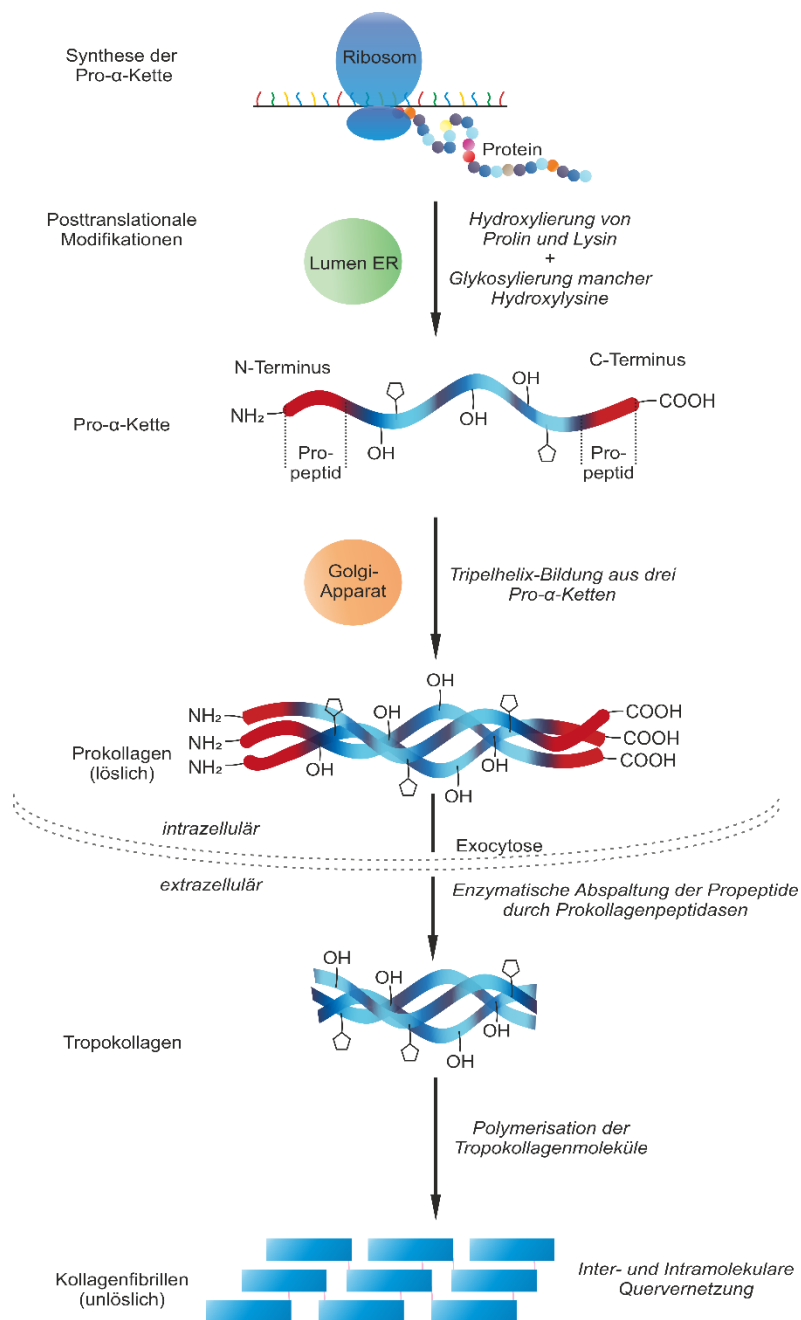


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kollagensynthese.

Die Synthese der Kollagenpolypeptide erfolgt an den membrangebundenen Ribosomen. Von dort werden die Ketten als sogenannte „Pro- α -Ketten“ in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingeschleust. Dort erfolgt die posttranslationale Modifikation (Hydroxylierung und Glykosylierung). Jeweils drei dieser modifizierten Pro- α -Ketten verbinden sich anschließend in einer Tripelhelix zum Prokollagenmolekül, das in den Interzellularraum sekretiert wird. Dort werden die Propeptide an den Enden der Moleküle abgespalten, wodurch das sogenannte Tropokollagen entsteht. Diese lagern sich anschließend parallel zusammen und polymerisieren zu Kollagenfibrillen. Diese Fasern lagern sich wiederum zu sogenannten Kollagenbündeln zusammen.

(Abbildung in Anlehnung an [14] und [24], grafisch nach eigener Skizze umgesetzt von Dr. Benjamin Riegger, IGVP.)

Derzeit sind 28 verschiedene Subtypen von Kollagenen bekannt, die zu unterschiedlichen Anteilen in den Geweben und den jeweiligen ECMs zu finden sind [10, 13, 17, 18].

Die **elastischen Fasern** der ECM bilden in einem Gewebe ein quervernetztes Netzwerk und bestehen aus dem Protein Elastin und dem Glykoprotein Fibrillin. In einer elastischen Faser bildet das Elastin als amorphe Grundsubstanz das Zentrum und wird dabei vom Fibrillin

umgeben. Durch ihre extrem hohe Elastizität sind diese Fasern in der Lage, sich auf bis zu 150 % ihrer entspannten Länge auszudehnen, ohne zu brechen und bei Entlastung wieder in ihre ursprüngliche Form zu kontrahieren (**Abbildung 8**). Elastische Fasern entstehen im Gewebe, indem Fibroblasten Tropoelastinmoleküle in den Interzellularraum sekretieren, welche dort zu Elastin quervernetzt und vom Fibrillin umgeben werden, sodass in der ECM Mikrofibrillen entstehen. Die einzelnen Elastin-Moleküle sind über Lysin-Seitenketten kovalent miteinander verbunden und bilden, anders als bei den Kollagenen die Tripelhelices, eine sogenannte „*Random Coil*“-Sekundärstruktur („*random*“ engl. für „beliebig/ zufällig“ und „*coil*“ für „Knäuel“), die durch Streckung und Rückstellung für die elastischen Eigenschaften verantwortlich ist [10, 13, 15, 17].

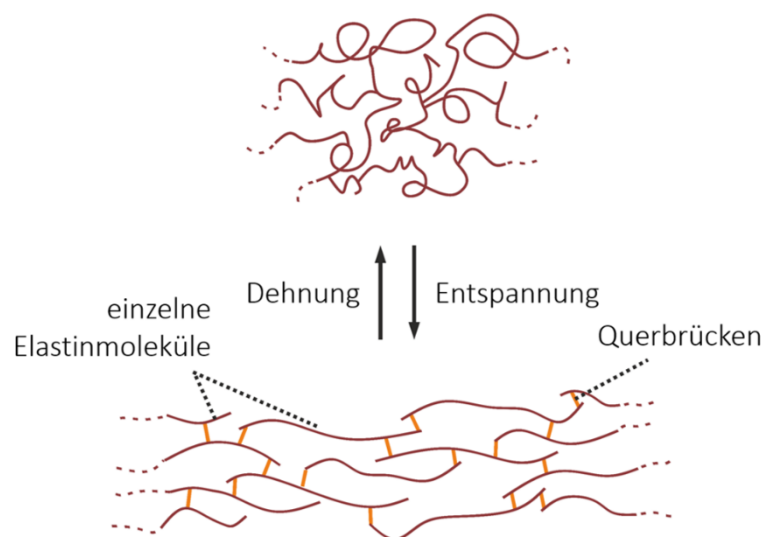


Abbildung 8: Schematische Darstellung der "Random Coil"-Konformation elastischer Fasern im Ruhezustand (oben) und im gestreckten Zustand (unten). Nach Abklingen der mechanischen Belastung kehrt das Biomolekül wieder in seinen Ausgangszustand zurück. (Abbildung in Anlehnung an [24], grafisch nach eigener Skizze umgesetzt von Dr. Benjamin Riegger, IGVP.)

Retikuläre Fasern bestehen hauptsächlich aus Kollagenfibrillen des Kollagen-Typs III, wodurch sie vom molekularen Aufbau den kollagenen Fasern ähneln, jedoch deutlich dünner (0,2 – 1 μm) sind und feine, stark verzweigte Netzwerke ausbilden. Sie sind mit Glykoproteinen beschichtet und geben den Blutgefäßwänden und anderen Stützgerüsten der lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe) Halt und Festigkeit und stellen einen Bestandteil der Basallamina dar, die Epithelien und Endothelien vom Bindegewebe abtrennen [10, 13].

Neben den oben genannten Aufgaben kommt der ECM auch eine wichtige Kontrollfunktion zu. Über **extrazelluläre Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren** werden essenzielle Vorgänge wie die Zellteilung, das Zellwachstum und die Apoptose (Zelltod) kontrolliert.

Viele dieser Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Die Kontrolle ist jedoch überlebenswichtig, damit der Organismus, dessen Organe und Gewebe während des Wachstums ihre jeweilige Größe erreichen und später auch beibehalten. Bei der Zellteilung bspw. stimulieren Wachstumsfaktoren die Synthese von Makromolekülen und hemmen gleichzeitig deren Abbau. Damit das jeweilige Gewebe jedoch nicht zu groß wird, hemmen extrazelluläre Signalmoleküle die Zellteilung wieder oder induzieren Apoptose [17, 20]. Auch bei der Wundheilung und der Angiogenese (Blutgefäßbildung) spielt die ECM eine essenzielle Rolle [20].

Biosynthese der extrazellulären Matrix in der Zelle

Die Proteine der ECM werden wie alle Proteine des Körpers an den Ribosomen gebildet. Diese Proteinbiosynthese lässt sich grundsätzlich in zwei Schritte einteilen [17, 25]:

1) Transkription

2) Translation

Bei der **Transkription** wird ein spezieller Abschnitt der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), auch als Gen bezeichnet, in ein *Messenger*-RNA (mRNA)-Molekül umgeschrieben. Das Gen bildet hierbei den Bauplan für die mRNA und damit auch für die spätere Aminosäuresequenz und dementsprechend das Protein. Da die mRNA im Gegensatz zur DNA mobil ist, wandert das Transkript für die **Translation** zu den Ribosomen. Bei diesem Vorgang wird jeweils ein Basentriplet der mRNA, auch als Codon bezeichnet, mithilfe der Transfer-RNA (tRNA) in eine Aminosäure übersetzt und diese anschließend enzymatisch durch Peptidbindungen zur Primärstruktur des Proteins zusammengesetzt. Durch den Zerfall des Ribosoms in seine beiden Untereinheiten wird die neu synthetisierte Aminosäuresequenz freigesetzt. Nach der Freisetzung der Proteinstruktur bildet sich die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur [17, 25].

An die Translation bzw. die Proteinbiosynthese schließen sich häufig noch sogenannte **posttranslationale Modifikationen** an. Dabei werden die gebildeten Proteine mithilfe spezieller Enzyme verändert. Diese Veränderungen sind extrem vielseitig. Die wohl bekanntesten Modifizierungen umfassen bspw. die Abspaltung spezifischer Gruppen oder Peptide (bspw. bei der Umwandlung von Prokollagen zu Kollagen), Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Sulfatierungen, Glykosylierungen, Verknüpfungen via Disulfidbrücken oder die Ausbildung von Proteinkomplexen [17, 25].

Bei der **Glykosylierung** werden die Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und/ oder im Golgi-Apparat enzymatisch mit Glykanen verknüpft. Dieses Anhängen von Kohlenhydratgruppen erfolgt an spezifischen Aminosäureseitenketten der neu synthetisierten Proteine unter Ausbildung einer *N*-glykosidischen Bindung (*N*-Glykosylierung an Asparagin) oder einer *O*-glykosidischen Bindungen (*O*-Glykosylierung an Serin oder Threonin). Die Kohlenhydratreste, die an diesen beiden Modifizierungen beteiligt sind, sind im Falle der ***N*-Glykosylierung**, die im ER startet und im Golgi-Apparat fortgesetzt wird, Glucose, Mannose, Fucose, Galactose, *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure). Im Falle der ***O*-Glykosylierung**, die vollständig im Golgi-Apparat stattfindet, hingegen Galactose, *N*-Acetylgalactosamin, *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylneuraminsäure [17, 25].

Mithilfe der Transportvesikel des ER werden die modifizierten Proteine zu den jeweiligen Zielorten weitertransportiert. Diese Zielorte können sich sowohl im Intrazellularraum, in der Zellmembran oder auch in der ECM befinden [10, 17]. Der Vorgang der Sezernierung der Proteine aus der Zelle in den Extrazellularraum wird auch Exozytose genannt. Bei manchen Proteinen, wie z. B. dem Kollagen, erfolgt im Anschluss der Exozytose im Extrazellularraum, wie oben bereits beschrieben, noch eine Prozessierung der sezernierten Moleküle wie bspw. die Abspaltung spezieller Peptide, die Ausbildung von Fibrillen (auch Fibrillogenese genannt) oder die finale Faserbildung [14].

1.3 Verwendung natürlicher extrazelluläre Matrix als Biomaterial

Die ECM bildet, wie oben ausführlich beschrieben, die natürliche, bioaktive Mikroumgebung der Zellen in einem Gewebe. Schon seit geraumer Zeit werden **Einzelkomponenten der ECM** für eine Vielzahl an Biomaterialien verwendet. Als Beispiele können hier Beschichtungen aus Kollagen, Chondroitinsulfat, RGD-Peptiden oder Fibronectin aufgeführt werden [26-29]. Auch in sogenannten Hybridbiomaterialien, bei denen synthetische und biologische Komponenten vereint werden, kommen diese Einzelmoleküle häufig zum Einsatz [30-35]. Auf diese Weise lassen sich die vorteilhaften Eigenschaften der synthetischen Materialien (i. d. R. die hervorragenden mechanischen Eigenschaften sowie die einfache Verfügbarkeit) mit den vorteilhaften Eigenschaften der biologischen Komponente (i. d. R. die hohe Bioaktivität) kombinieren [30-35]. Der Vorteil dieser Verwendung von ECM-Einzelkomponenten besteht in der Einfachheit der Anwendung bzw. Verarbeitbarkeit, der kommerziellen Verfügbarkeit und der reduzierten Komplexität. Jedoch ist es aufgrund der fehlenden biomolekularen

Zusammensetzung und Anordnung mit diesen Einzelkomponenten nicht möglich, die multifunktionellen Eigenschaften natürlicher ECM nachzubilden [8, 36]. Die Biomaterialforschung fokussiert sich deshalb zunehmend auf die Verwendung natürlicher, komplex zusammengesetzter Matrices [8, 36-38]. Diese können in den folgenden Formen für die Anwendung als Biomaterial untersucht und verwendet werden:

1) **Dezellularisierte Gewebe und Organe**

2) ***In vitro* generierte dezellularisierte Zellmonolagen (engl. *cell-derived matrices*, CDMs)**

1.3.1 Dezellularisierte Gewebe und Organe

Bei der Verwendung **ganzer dezellularisierter Gewebe oder Organe** besteht das Ziel im Allgemeinen darin, die natürliche Biomolekülzusammensetzung und Anordnung des Originalgewebes beizubehalten [36]. Für die regenerative Medizin und das *Tissue Engineering* werden auf diese Weise bspw. Gerüste für den Aufbau eines neuen Gewebes (auch engl. *Scaffolds* genannt) geschaffen [39]. Durch die Dezellularisierung soll die Immunreaktion reduziert und das Risiko der Übertragung von Krankheiten durch das Transplantat verringert werden [5, 8, 39, 40]. Sowohl in der Forschung als auch schon in der (prä)klinischen Anwendung wurden hierfür bereits eine Vielzahl unterschiedlichster dezellularisierter Gewebe und Organe verwendet. Dezellularisierte Herzklappen [41-43], Haut [44], die Submukosa des Dünndarms (engl. *small intestinal submucosa*, SIS) [45-47], Harnblasen [48-50], Bänder [51] und Blutgefäße [40, 52, 53] sind nur ein paar wenige hier zu nennende Beispiele [36, 39].

Grundsätzlich gilt es bei der Arbeit mit dezellularisierten Geweben oder Organen den Gewebersprung und die Spendervariabilität (z. B. Geschlecht, Alter, Gesundheitszustand, Krankengeschichte, Größe, Gewicht des Donors) zu beachten [36]. Ferner ist die Verfügbarkeit solcher Gewebe (besonders bei menschlichen Geweben) i. d. R. stark limitiert [36, 54].

1.3.2 *In vitro* generierte, dezellularisierte Zellmonolagen (engl. *cell-derived matrices*, CDMs)

Um hinsichtlich der Zellart (z. B. Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen, Chondrocyten, usw.), dem Zellursprung (Primärzellen oder Zellen einer immortalisierten Zelllinie), ggf. des Zelldonors (Geschlecht, Alter, ethnische Herkunft usw.) sowie der Möglichkeit einer chemischen Modifizierung der sezernierten ECM variabel zu sein, werden immer häufiger *in vitro* generierte Matrices aus Zellmonolagen (engl. *cell-derived matrices*, CDMs) als

potenzielle Biomaterialien verwendet [36]. Sie bieten den Vorteil, dass sie eine komplexe, gewebespezifische, aber dennoch organisierte Biomolekülzusammensetzung aufweisen und somit - zumindest in weiten Teilen - die natürlichen Gewebeeigenschaften imitieren [36]. Hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften unterscheiden sich diese CDMs jedoch z. T. sehr stark von natürlichen Geweben [36]. In der Literatur wird dessen ungeachtet z. T. argumentiert, dass die ECM-Struktur im Gegensatz zur ECM-Zusammensetzung lediglich eine untergeordnete Rolle spielt [36]. Ferner besteht die Möglichkeit, Zellen auch mechanisch zu konditionieren oder externen Stimuli wie bspw. Sauerstoffmangel oder der Zugabe von Wachstumsfaktoren auszusetzen [36]. Im Gegensatz zu dezellularisierten Geweben und Organen ist die Verfügbarkeit dieser *in vitro* generierten dezellularisierten Matrices bedeutend weniger limitiert, da sowohl primäre Zellen als auch Zelllinien durch Cryokonservierung und das Anlegen von Zellbanken nahezu unbegrenzt zur Verfügung stehen [36]. Bei der Auswahl der Zellart gilt es hierbei jedoch zu beachten, welche Mikroumgebung des Körpers mit dem jeweiligen Biomaterial imitiert werden soll und welche gewebespezifischen Zellen dort in einem natürlichen Gewebe residieren. Immortalisierte Zelllinien, die in vielen Fällen aus Tumorzellen generiert wurden, stellen hierfür bspw. durch den veränderten Phänotyp i. d. R. keine geeignete Zellart dar [36]. Die Generierung von CDMs kann grundsätzlich in 2D erfolgen, indem die Zellen als Monolage auf einem geeigneten Substrat kultiviert werden, oder in 3D. Für letztere Methode können die Zellen entweder auf eine abbaubare Gerüststruktur ausgesät werden, welches sie im Zuge der *In-vitro*-Kultivierung abbauen und durch eigene ECM ersetzen, oder die Aussaat erfolgt auf ein nicht abbaubares Konstrukt, wodurch die Zellen ihre ECM auf der Oberfläche dieses *Scaffolds* abscheiden und dieses damit mit einer Art physisorbierter ECM-Beschichtung versehen. Eine dritte Methode, dreidimensionale CDM-Konstrukte zu generieren, stellt die Kultivierung von Zellen als Zellaggregate dar. Für diese Art ist kein *Scaffold* erforderlich [36].

1.3.3 Methoden zur Dezellularisierung von extrazellulärer Matrix und ganzen Geweben

Unabhängig davon, ob ganze Gewebe/ Organe oder CDMs dezellularisiert werden sollen, können grundsätzlich dieselben Methoden angewandt werden [36, 54]. Da das Immunsystem des Empfängers implantierte Fremdstoffe erkennt und abstößt, ist es wichtig, alle immunogen wirkenden Komponenten wie Zell- und Zellkerntrümmer, Lipide, Nucleinsäuren, Endotoxine und immunogene Proteine zu entfernen [5, 37, 39]. Gelingt dies nicht, kann es zur Aktivierung der T-Zellen durch fremdartige Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) oder zur oben beschriebenen Fremdkörperreaktion kommen [6, 7, 55, 56].

Demnach besteht das generelle Ziel der Dezellularisierung in der Entfernung aller Zellen mitsamt ihres Zytoplasmas sowie deren Zellkernen [8, 36, 39]. Zurück bleibt im Optimalfall lediglich die komplex zusammengesetzte ECM, die idealerweise noch die exakte Architektur und Ultrastruktur (siehe auch **Kapitel 1.2.2**) der nativen ECM aufweist [5, 37-39].

Für die Erreichung des vollständig dezellularisierten Zustandes sind in der Fachliteratur eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden beschrieben. Die zur Verfügung stehenden Methoden lassen sich grundsätzlich in drei Kategorien unterteilen [8, 36, 38, 39]:

- 1) **Chemische Dezellularisierung**
- 2) **Physikalische Dezellularisierung**
- 3) **Enzymatische Dezellularisierung**

Bei der **chemischen Dezellularisierung** kommen u. a. Alkohole und Lösemittel, Säuren und Basen, ionische und nicht ionische Detergenzien sowie hypotone oder hypertone Lösungen zum Einsatz. Der Vorteil dieser Reagenzien besteht in der meist effizienten Dezellularisierung, die auch bei sehr dichten Geweben angewandt werden kann. Allerdings kann die Ultrastruktur der ECM durch die teilweise harschen Bedingungen geschädigt werden, wodurch die mechanische Stabilität der Matrix verloren gehen kann [54]. Ferner besteht das Risiko, dass Kollagene, GAGs und Wachstumsfaktoren aus der Matrix ausgewaschen werden [8, 36, 38, 54].

Die **physikalische Dezellularisierung** erfolgt durch die Einwirkung von Temperatur, wie bspw. bei der Einwirkung durch wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen, durch Druck, Elektroporation, Ultraschall oder durch einen mechanischen Krafteintrag wie bspw. in Form von Bewegung. Die Vorteile dieser Dezellularisierungsart liegen in der sehr einfachen Anwendbarkeit. Jedoch schädigen diese Methoden die Ultrastruktur der ECM z. T. recht stark und die bei der Anwendung dieser Methoden entstehenden Zelltrümmer verbleiben zunächst einmal in der ECM, sodass weitere Schritte durchgeführt werden müssen, um diese vollständig aus der ECM zu entfernen.

Bei der **enzymatischen Dezellularisierung** werden Enzyme wie Nukleasen, Proteasen, Kollagenasen, Galactosidasen, Phospholipasen oder Dispase angewandt, um Zellbestandteile spezifisch zu zersetzen. Allerdings müssen diese Moleküle nach der Dezellularisierung ebenfalls vollständig wieder aus dem zurückbleibenden ECM-Konstrukt entfernt werden [8, 36, 38, 39].

Die vorgestellten Dezellularisierungsklassen stellen allesamt keine idealen Methoden dar [39]. Der Erfolg hängt neben der gewählten Methode auch ganz maßgeblich von der Natur und Beschaffenheit der Probe ab, die dezellularisiert werden soll [8]. Bislang stehen keine

Standardprotokolle zur Verfügung, mit denen alle Proben gleichermaßen erfolgreich und vollständig dezellularisiert werden könnten. Häufig werden Methoden aus den drei unterschiedlichen Klassen in einem Lyseprotokoll zusammengefasst und nacheinander durchgeführt [39].

1.3.4 Anwendungsbeispiele von natürlicher extrazellulärer Matrix als Biomaterial

Die Anwendungsbereiche von dezellularisierten *in vitro* generierten CDMs als Biomaterial sind extrem vielseitig, da es bislang die einzige realistisch umsetzbare Möglichkeit ist, die Komplexität hinsichtlich der Biomolekül-Zusammensetzung nativer ECM möglichst genau zu imitieren, ohne dabei auf dezellularisierte Gewebe oder Organe zurückgreifen zu müssen [36]. Nicht nur für Anwendungen im *Tissue Engineering* und der regenerativen Medizin, sondern auch in der *In-vitro*-Zellkultur stellen gewebespezifische CDMs ein interessantes Substrat dar, um auch anspruchsvolle oder sensible Zelltypen wie bspw. mesenchymale Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSCs) oder Chondrocyten kultivieren zu können. Die Verwendung gewebespezifischer CDMs als Zellkultursubstrat reduziert das Risiko von Dedifferenzierungen, spontanen Differenzierungen, Funktionsverlusten oder der Veränderung des Phänotyps [36].

Extrazelluläre Matrix als Zellkultursubstrat

Besonders zur Nachstellung der Stammzellnische, d. h. den räumlich abgegrenzten Arealen im Körper, in denen Stammzellen lokalisiert sind, werden gewebespezifische Matrices bereits vielfach angewandt, um die Stammzellfähigkeit zu erhalten. Stammzellen besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Richtungen zu differenzieren und auf diese Weise zu spezialisierten, gewebespezifischen Zellen zu werden. Sie sind für die Selbsterneuerung, die Erhaltung und die Funktion eines Organs verantwortlich. Die ECM der Stammzellnischen liefert den undifferenzierten Zellen innerhalb der Stammzellnische biomechanische Reize und steuert durch Aktivierung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren und mithilfe der in der ECM vorhandenen Wachstumsfaktoren die Bioverfügbarkeit sowie deren Aktivierung [57, 58].

Auf normalen *Tissue Culture* Polystyrol (TCPS)-Oberflächen ist häufig eine ungewünschte Differenzierung der von Stammzellen zu beobachten. Um dies zu verhindern wurden neben MSCs [59-61] und embryonalen Stammzellen [62, 63] und Chondrocyten [64-67] auf Zellkultursubstraten mit ECM kultiviert.

Zell-Sheets und Zellringe

Für die Generierung von sogenannten *Zell-Sheets* werden Zellen auf einer artifiziellen Oberfläche kultiviert und bilden dabei ihre spezifische ECM sowie enge Zell-Zell-Kontakte [161]. Entweder durch die Veränderung der Temperatur bei der Verwendung thermoresponsibler Zellkulturoberflächen oder durch mechanische Ablösung bei herkömmlichen Oberflächen kommt es zur Ablösung des Zellrasens mitsamt der gebildeten ECM [68-70]. Diese können entweder dezellularisiert werden oder – sofern autologe Zellen verwendet wurden – dem Patienten direkt als Implantat eingesetzt werden [68]. Ferner besteht die Möglichkeit, die Materialien zunächst zu dezellularisieren und anschließend bspw. durch Elektrosponnen zu *Scaffolds* zu verarbeiten [70].

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Lumenstrukturen publizierten Adebayo *et al.* [71], Gwyther *et al.* [72] und Dash *et al.* [73], die u. a. glatte Muskelzellen in Ringformen kultivierten. Nachdem die Zellen adhäriert und proliferiert waren, begannen sie ihre gewebespezifische ECM zu bilden, sodass durch Selbstassemblierung Ringe aus ECM und den darin eingebetteten glatten Muskelzellen entstanden, die sich u. a. durch eine hohe Zugfestigkeit auszeichneten und folglich interessante Konstrukte für das *Tissue Engineering* und die Regenerative Medizin darstellen.

Hybridmaterialien aus extrazellulärer Matrix

Hydrogele können als hydrophile Polymernetzwerke verstanden werden, die in Wasser gequollen vorliegen und aufgrund dessen eine wässrige, viskoelastische Umgebung darstellen, in der Zellen grundsätzlich überleben und proliferieren können [74-76]. Durch ihre chemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften bildet diese Materialklasse einen interessanten Ansatz, um die ebenfalls hydratisierte und stark quervernetzte natürliche ECM nachzuahmen, weshalb auf diese Materialklasse in der Biomaterialforschung und -entwicklung bereits seit geraumer Zeit ein wichtiger Fokus liegt [77-80].

Entsprechend der verwendeten Ausgangspolymere werden Hydrogele in synthetische und biobasierte Hydrogele unterteilt [81]. Synthetische Hydrogele können auf einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten wie z. B. Polyethylenglykol (PEG) basieren [82, 83]. Der Vorteil dieser Materialien liegt in deren einfacher Verfügbarkeit, den vorteilhaften physikalisch-mechanischen Eigenschaften, die über einen weiten Bereich im Zuge der Synthese eingestellt werden können, sowie der Möglichkeit, chemisch funktionelle Gruppen integrieren zu können. Ihnen fehlt jedoch häufig die intrinsische Bioaktivität der biobasierten

Polymere [3, 33, 81, 84-86]. Diese bestehen im Gegensatz zu synthetischen Hydrogelen meist aus ECM-Einzelkomponenten wie Kollagen oder dessen denaturiertem Derivat Gelatine [87-91]. Diese biologischen Hydrogele weisen oft nicht die benötigten mechanischen Eigenschaften auf, die für die Verwendung als Biomaterial notwendig wären. Zudem sind sie aufgrund der fehlenden biologischen Komplexität nicht in der Lage, die natürliche ECM zu imitieren, weder hinsichtlich der Biomolekülzusammensetzung noch hinsichtlich der Ultrastruktur und Architektur.

Ein Ansatz, um die vorteilhaften Eigenschaften beider Polymerklassen in einem Material zu vereinen, besteht in deren Kombination in sogenannten Hybridhydrogelen [30-35]. Allerdings sind auch diese Materialien nicht in der Lage, die komplexe gewebespezifische Zusammensetzung der natürlichen Zell-Mikroumgebung in einem Gewebe widerzuspiegeln [36]. Bis dato sind in der Fachliteratur ausschließlich Arbeiten zu Hybridhydrogelen zu finden, bei denen entweder nur ECM-Einzelkomponenten oder ganze dezellularisierte Gewebe oder Organe als biologische Komponente verarbeitet wurden (siehe **Kapitel 1.3**) [54, 92].

Extrazelluläre Matrix als Beschichtungsmaterial für Scaffolds

Als Beschichtung für ein *Scaffold* kann (gewebespezifische) CDM dazu genutzt werden, den verwendeten synthetischen Gerüstmaterialien bioaktive Eigenschaften zu verleihen und so die Oberfläche möglichst zelladhäsiv zu gestalten. Diese Technik wird z. B. häufig für osseointegrative *Scaffolds* [36, 93-100] oder in der Hernienchirurgie [101] angewandt, sodass die Zellen des umliegenden Gewebes möglichst schnell einen festen Verbund mit dem *Scaffold* ausbilden können.

Oberflächenbeschichtungen aus extrazellulärer Matrix

Neben den oben beschriebenen Arbeiten, bei denen die Zellen direkt auf ein *Scaffold* ausgesät wurden, um dort ihre ECM als eine Art Beschichtung zu sezernieren, können Beschichtungen von artifiziellen Oberflächen auch generiert werden, indem die CDMs zunächst isoliert werden. I. d. R. werden diese Matrices vorab noch auf unterschiedliche Weisen aufgearbeitet. Lin *et al.* beschichteten bspw. Polystyroloberflächen mit unterschiedlich aufgearbeiteten MSC-ECM-Extrakten via Physisorption und konnten zeigen, dass sie mit diesen Beschichtungen die zellulären Vorgänge wie z. B. die Proliferation, Migration und Differenzierung von MSCs vorteilhaft verändern konnten [102]. Heng *et al.* berichteten von

ähnlichen Ergebnissen bei der Verwendung von paradontalen Ligament-Stammzellen sowie einer Stammzellkultur, die aus Milchzähnen gewonnen wurde. Die CDMs wurden nach der Aufarbeitung in den Wells einer 6-Well-Platte trocknen gelassen, bevor sie erneut mit den oben genannten Zellen besiedelt wurden. Auch hier stellte sich heraus, dass sich die Beschichtungen positiv auf die Zelladhäsion und -proliferation sowie auf die Kapazität der osteogenen Differenzierung der Stammzellen auswirkte [103]. Bedair *et al.* beschichteten CDM, die sie zuvor aus NIH 3T3-Zellen isoliert und aufgearbeitet hatten, über eine unspezifische Carbodiimid-Kopplung kovalent auf eine Cobalt-Chrom-Legierung und waren mit diesen Beschichtungen in der Lage, eine verbesserte Endothelialisierung des Stent-Materials zu erreichen [104].

Ein wichtiger Parameter bei der Generierung von Beschichtungen stellt neben der Homogenität stets auch die Beschichtungsstabilität dar, um sicherzustellen, dass die ECM-Biomoleküle sich nicht durch mechanische Einflüsse oder Diffusionsvorgänge von der Oberfläche lösen [104, 105].

1.3.5 Herausforderung bei der Verwendung von extrazellulärer Matrix als Biomaterial

Im Gegensatz zur Verwendung von ECM-Einzelkomponenten wie bspw. Kollagen, Fibronectin, Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat ergeben sich durch die äußerst komplexe Biomolekül-Zusammensetzung und die Ultrastruktur natürlicher ECM (siehe auch **Kapitel 1.2.2**) zahlreiche, mitunter nicht triviale Herausforderungen [5, 106-109]:

- **Spendervariabilität:** unterschiedliche Matriceigenschaften und -zusammensetzungen abhängig von den für die ECM-Generierung verwendeten Zellen.
- **Protokolle zur Generierung und Verarbeitung der ECM:** die Vielzahl an unterschiedlichen, in der Fachliteratur beschriebenen Methoden erschwert die allgemeine Vergleichbarkeit.
- **Charakterisierung des Materials:** es stehen keine universell anerkannten Methoden zur Verfügung, um die komplexe Zusammensetzung der ECM zu charakterisieren. Durch die Unlöslichkeit der Matrices stehen viele Standardanalytikmethoden, bei denen die Probe in gelöster Form vorliegen muss, nicht zur Verfügung. Des Weiteren existieren in der Fachliteratur weder für den Nachweis von ECM-Bestandteilen noch von Verunreinigungen standardisierte Richtlinien oder Grenzwerte.
- **Mengenbegrenzung:** die manuelle *in-vitro*-Generierung von CDM ist vergleichsweise zeit-, arbeits- und ressourcenaufwändig wodurch die Menge an manuell isolierbarer CDM extrem limitiert ist.

Neben den oben aufgeführten Herausforderungen bei der Charakterisierung und der Verarbeitung von ECM besteht hinsichtlich der Anwendung als Biomaterial häufig noch eine weitere Einschränkung: In den Biomolekülen der natürlichen ECM stehen **keine spezifischen funktionellen Gruppen** zur Verfügung, die in bioorthogonalen chemischen Reaktionen selektiv adressiert werden können. **Bioorthogonale Reaktionen** zeichnen sich dadurch aus, dass die biologischen Prozesse in einer Zelle, einem Gewebe oder einem ganzen Organismus durch die ablaufende Reaktion nicht beeinträchtigt werden [110-112]. Aufgrund der fehlenden funktionellen, spezifisch adressierbaren Gruppen wird die ECM häufig nur durch Physisorption/ Adsorption an Oberflächen immobilisiert [100]. Dies hat häufig jedoch eine ungenügende Beschichtungsstabilität zur Folge [104, 113]. Eine weitere, in der Literatur beschriebene Methode stellt die kovalente, d. h. über Chemisorption vermittelte Immobilisierung mithilfe der Carbodiimid-Chemie dar. Die Amine der ECM-Proteine werden hierbei chemisch umgesetzt und führen zur kovalenten Anbindung der ECM an das jeweilige Substrat [104]. Durch diese unspezifische Kopplung wird das Bulk-Material jedoch signifikant bspw. durch Konformationsänderung der Proteine verändert. Diese Änderungen können zum Funktionsverlust der Biomoleküle führen [27, 114-117].

1.3.6 Aufarbeitung der dezellularisierten und isolierten extrazellulären Matrix für die Verwendung als Biomaterial

Für die Anwendung als potenzielles Biomaterial ist es zum einen wichtig, die dezellularisierte und isolierte ECM in einer Form vorliegen zu haben, die reproduzierbar und einfach verarbeitet werden kann. Wie unter **Kapitel 1.3.5** beschrieben, stellt die Arbeit mit diesen Materialien nicht zuletzt aufgrund der Unlöslichkeit der stark quervernetzten Biomoleküle und des stark in Wasser gequollenen Zustands eine Herausforderung dar. Zum anderen ist es essenziell, Methoden zur Verfügung zu haben, mit denen die Hauptbestandteile der CDM qualitativ aber insbesondere auch quantitativ bestimmt werden können.

Aufkonzentrierung dezellularisierter und isolierter extrazellulärer Matrix

Um den ECM-Gehalt einer dezellularisierten und isolierten Matrix zu erhöhen, kann es hilfreich sein, die Matrix aufzukonzentrieren. Durch Zentrifugation wurde dies bspw. von Bedair *et al.* erreicht, die die unlöslichen CDM-Bestandteile abzentrifugierten [104]. Das Risiko dieser Methode liegt darin, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass kleinere Moleküle sich

durch die Zentrifugation bei 1000 rpm nicht ausreichend absetzen und dadurch beim Verwerfen des Überstands verloren gehen.

Eine andere Methode zur Steigerung der ECM-Konzentration stellt die Cryopulverisierung dar, die in der Literatur recht häufig beschrieben ist. Hierbei werden die Matrices zunächst lyophilisiert, um jegliches Wasser zu entfernen und schließlich gemahlen. Das entstehende Pulver wird dann i. d. R. in einem definierten Volumen an Wasser oder Puffer resuspendiert [118-120]. Die Nachteile dieser Methode liegen in den für die Biomoleküle harschen Bedingungen sowie in der benötigten Menge. CDMs werden häufig im Mikrogramm-Maßstab isoliert; die Cryopulverisierung eignet sich jedoch häufig nur für größere Probenmengen [121].

Homogenisierung von dezellularisierter und isolierter extrazellulärer Matrix

Die Arbeiten, die zu CDMs in der Literatur beschrieben sind, beschränken sich häufig darauf, dass die Matrices für die jeweiligen Versuche nicht aus dem Zellkulturgefäß, in dem sie generiert wurden entnommen wurden oder dass die Zellen direkt auf dem zu beschichteten *Scaffold* kultiviert wurden, um diese so mit einer physisorbierten ECM-Beschichtung zu versehen. Als potenzielles Biomaterial muss die CDM jedoch reproduzierbar und einfach z. B. durch simples Pipettieren handhabbar sein.

Ruff *et al.* nutzten hierfür bspw. eine chemische Homogenisierungsmethode, bei der die isolierte ECM sukzessive mit Essigsäure versetzt und dadurch chemisch homogenisiert wurde [114, 122]. Die Forscher zeigten dabei lichtmikroskopische Aufnahmen der auf diese Weise homogenisierten ECM, bei denen die ECM homogen verteilt vorzuliegen schien. Es wurde jedoch keine quantitative Analyse der entstehenden ECM-Fragmente hinsichtlich deren Größe, Verteilung und Konzentration in der entstehenden Suspension durchgeführt. Angewandt als Beschichtung mutet die ECM-Konzentration jedoch recht gering an, da die resultierenden Beschichtungen nur wenige, recht weit auseinanderliegende ECM-Fragmente zeigten [114, 122].

Bedair *et al.* homogenisierten ihre von NIH 3T3-Zellen generierten Matrices mit einem nicht weiter beschriebenen Homogenisator [104]. Die gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen der über die Carbodiimid-Chemie unspezifisch kovalent gebundenen Matrixfragmente lassen vermuten, dass die Homogenisierung der Matrices erfolgreich war.

1.3.7 Charakterisierung der extrazellulären Matrix für die Verwendung als Biomaterial

Um *in vitro* generierte CDMs reproduzierbar gewinnen, isolieren, ggf. modifizieren und schlussendlich verarbeiten zu können, ist es essenziell, das Material so genau wie möglich zu analysieren und die charakteristischen Bestandteile der gewebespezifischen Matrices zu quantifizieren. Grundsätzlich steht eine enorme Vielzahl an unterschiedlichsten Methoden zur Verfügung, jedoch stellt die Natur der ECM, die Bioanalytik und die Biochemie an dieser Stelle immer wieder vor nicht triviale Herausforderungen (siehe **Kapitel 1.3.5**). Eine Auswahl in der Literatur beschriebener Methoden zur Charakterisierung von CDMs steht nachfolgend beschrieben.

1.3.7.1 Untersuchung der biologischen Reinheit der extrazellulären Matrix

Wie unter **Kapitel 1.1** erläutert, muss die ECM für eine potentielle Anwendung als Biomaterial frei von immunogen wirkenden Bestandteilen (z. B. Zelltrümmern, Nucleinsäuren, Lipiden, Endotoxinen oder immunogenen Proteinen) sein, um die Fremdkörperreaktion zu verhindern oder zumindest abzuschwächen. Ein gleichzeitiger Nachweis all dieser Bestandteile, die eine solche Immunreaktion auslösen können, ist unrealistisch, weshalb i. d. R. lediglich eine Auswahl relevante Marker untersucht werden. Die DNA stellt hierbei eines der am häufigsten nachgewiesenen Markermoleküle dar, die in den meisten Fällen entweder qualitativ in histochemischen Färbemethoden oder quantitativ anhand des *PicoGreen*TM-Assays oder der Gelelektrophorese untersucht werden [5, 123]. Allerdings spielen hierbei die Färbeparameter sowie die Mikroskopeinstellungen eine wichtige Rolle, um das Vorhandensein oder die Abwesenheit von DNA verlässlich feststellen zu können. Weder für biologische *Scaffold*-Materialien noch für CDMs, die als Biomaterial genutzt werden sollen, existieren derzeit verbindliche Richtlinien, was den potenziellen Restgehalt an DNA in diesen Materialien angeht [123]. Crapo *et al.* empfahlen in ihrer 2011 publizierte Studie, dass die Dezellularisierung und biologische Reinheit dann als gegeben angesehen werden kann, wenn das Material drei Kriterien erfüllt [38]:

- 1) **Gehalt an doppelsträngiger DNA** (bspw. quantifiziert durch den *PicoGreen*TM-Assay, Propidiumiodid (PI), Bisbenzimid oder via Gelelektrophorese): < 50 ng DNA/mg ECM (entspricht 0,005 %(w/w)).
- 2) **Maximale DNA-Fragmentlänge** (detektierbar in einer Gelelektrophorese): < 200 Basenpaare.

3) **(Immun-)histochemische Färbemethoden** (wie eine 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)- oder Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung): kein sichtbares Signal mehr bei der Detektion von DNA.

Aamodt und Grainger [5] bezogen sich hinsichtlich eines Aussage zum DNA-Grenzwerte auf Gilbert *et al.* [123] sowie Badylak und Gilbert [124], die in ihren Untersuchungen Anzeichen dafür fanden, dass es scheinbar eine Art natürlichen Grenzwert an verbleibender Fremd-DNA geben muss, bevor das Immunsystem überhaupt mit einer Fremdkörperreaktion auf diese immunogenen Moleküle reagiert. Aamodt und Grainger schlugen deshalb ebenfalls eine maximale Restkonzentration von $< 50 - 60$ ng DNA/mg ECM und einer maximalen DNA-Fragmentlänge von 300 Basenpaaren vor. Der Grenzwert von < 50 ng DNA/mg ECM wird ebenfalls von Dzobo *et al.* vorgeschlagen [54].

Ruff *et al.* schlossen aufgrund des fehlenden DAPI-Signals auf die Abwesenheit von DNA in der *clickECM* [114, 122]. Basierend auf den Berichten von Badylak und Gibert [124] sowie Gilbert *et al.* [123] scheint dieses Ergebnis jedoch zweifelhaft, sodass die biologische Reinheit der *clickECM* zum aktuellen Stand als unbekannt eingestuft werden sollte. In vielen Aufarbeitungsprotokollen werden die CDMs zur Reduzierung des Rest-DNA-Gehalts aus diesem Grund mit Desoxyribonukleasen (DNasen) behandelt. Die Enzyme spalten die verbleibende DNA in kürzere Basenpaarsequenzen und bauen sie somit ab [8, 36, 100].

1.3.7.2 Untersuchung der Biomolekülzusammensetzung der extrazellulären Matrix

Wie unter **Kapitel 1.2.2** sowie **Kapitel 1.3.4** bereits erläutert, besteht die natürliche ECM aus einem äußerst komplexen Gemisch an Biomolekülen, dessen Zusammensetzung u. a. von der Gewebeherkunft sowie dem Donor der für die ECM verwendeten Zellen zusammenhängt. Für die Anwendung des Materials als Biomaterial ist es jedoch unverzichtbar, Methoden zur Verfügung zu haben, um die wichtigsten Biomoleküle in der Matrix nachweisen zu können, um so eine reproduzierbare Anwendung zu ermöglichen.

(Immun-)Histochemische Methoden

Der Begriff „Histologie“ leitet sich vom altgriechischen Wort *ιστός histos*, zu Deutsch „Gewebe“ und dem griechischen Wort *λόγος logos* der „Lehre“ ab. Analog der Etymologie kann dieses Teilgebiet der Biologie und der Medizin als die Lehre der Gewebe verstanden werden [23]. In der Histologie wird die Eigenschaft verschiedener Zell- und Gewebekompartimente ausgenutzt, unterschiedliche Affinitäten hinsichtlich chemischer

Chromophormoleküle aufzuweisen. Diese Affinitätsunterschiede basieren i. d. R. auf unterschiedlichen elektrischen Ladungen und werden genutzt, um verschiedene Biomolekülklassen differenziert voneinander, jedoch oft in einer einzigen Färbung darzustellen [23]. Ein Teilgebiet der Histologie bildet die Immunhistochemie. Bei dieser Technik werden spezifische Epitope auf dem Zielmolekül des Analyten mithilfe der Antikörper-Paratope gebunden und auf diese Weise markiert. Der Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper richtet sich mit seinem Paratop wiederum gegen ein Epitop auf dem Primärantikörper, wodurch mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie die so markierten Biomoleküle fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können [125].

Für die Charakterisierung von ECM stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Färbemethoden zur Verfügung. In ihrem Review stellen Vigier und Fülöp mehrerer solcher Techniken vor [126]. Auch Ruff *et al.* [114, 122], Gutmann *et al.* [127, 128], Schenke-Layland *et al.* [70], Heng *et al.* [103], Abraham *et al.* [58], oder Shendi *et al.* [129] nutzen bspw. mehrere (immun-)histochemische Färbemethoden, um ihre CDMs qualitativ zu untersuchen.

Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration spielt bei der Verwendung von CDMs eine wesentliche Rolle, um diese reproduzierbar verwenden und verarbeiten zu können und um eine Bezugsgröße bei der Charakterisierung der einzelnen charakteristischen Matrixbestandteile zu schaffen. In der Literatur werden zur Bestimmung des Proteingehalts standardmäßig kolorimetrische Assays angewandt [125, 130]. Der häufig verwendete Bradford-Assay basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau im sauren Milieu und in der Gegenwart von Proteinen von 465 nm zu 595 nm. Die Farbstoffmoleküle lagern sich dabei an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an, wodurch der Chromophor von seiner kationischen in seine anionische Form übergeht [125]. Anhand einer mitgeführten Kalibrationsreihe, die i. d. R. aus bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt wird, können anhand der photometrisch ermittelten Absorptionswerte anschließend die Konzentrationen der untersuchten Proben berechnet werden.

Einen weiteren zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendeten Assay stellt der sogenannte Lowry-Assay dar. Dieser zweistufige Nachweis basiert im ersten Schritt auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der Kupferionen (Cu^{2+}) im alkalischen Milieu mit den Peptidbindungen der Proteine einen blauvioletten Farbstoffkomplex bilden. Im zweiten Schritt reduziert der Komplex das gelbe Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, wodurch sich die Farbe der

Lösung von blauviolett in ein intensives Blau verändert und bei 750 nm, 650 nm oder 540 nm photometrisch detektiert werden kann [125, 130]. Auch bei diesem Assay wird eine Standardreihe eines Einzelproteins mit bekannten Konzentrationen mitgeführt, um anhand der ermittelten Absorptionswerte auf die Proteinkonzentration der Probe rückschließen zu können. Eine vielverwendete Alternative zum Lowry-Assay stellt der sogenannte Bicinchoninsäure (engl.: *bicinchoninic acid*, BCA)-Assay dar, bei dem die Biuret-Reaktion mit BSA als Detektionssystem kombiniert wird. Bei der einstufigen Reaktion werden in Abhängigkeit der Proteinkonzentration die zugegebene Cu^{2+} -Ionen durch die Peptidbindungen der Proteine zu Cu^+ -Ionen reduziert. Diese Cu^+ -Ionen reagieren wiederum mit der BCA, wobei ein BCA-Kupfer-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm entsteht. Wie bei den anderen vorgestellten kolorimetrischen Assays können die photometrisch bestimmten Absorptionswerte anhand einer mitgeführten Protein-Standardreihe in die Proteinkonzentration der Probe umgerechnet werden [125, 130].

Allen kolorimetrischen Assays ist gemein, dass die Proben vollständig gelöst vorliegen müssen und dass der verwendete Standard der Probenkomplexität entsprechen muss [131]. Das bedeutet, dass diese Assays i. d. R. nicht für komplexe Proteingemische wie CDMs geeignet sind, die aus bis zu 300 unterschiedlichen biologischen Komponenten bestehen [132]. Bei dieser Art von Probe kommt erschwerend hinzu, dass es sich bei der ECM um einen komplexen Verbund großer, quervernetzter, kovalent gebundener, unlöslicher und stark glykosylierter Proteine handelt und die Voraussetzungen für die kolorimetrischen Assays demnach i. d. R. nicht erfüllt werden [131, 133]. Mangels Alternativen werden diese Assays jedoch trotzdem standardmäßig angewandt, um die Proteinkonzentration der CDMs zu analysieren [102, 103, 109, 128, 129, 134-136].

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) stellt in der Bioanalytik eine qualitative Standardmethode dar, mit deren Hilfe eine komplexe proteinhaltige Probe in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt werden kann. Durch entsprechend mitgeführte Standards und teilweise auch durch das entstehende Proteinbandenmuster ist es anschließend möglich, Einzelproteine in der Mischung zu identifizieren, ggf. Verunreinigungen zu erkennen und unterschiedliche Proben miteinander zu vergleichen [21, 125]. Die Proteine werden in der Vorbereitung der elektrophoretischen Trennung zunächst mit SDS versetzt und für kurze Zeit

stark erhitzt. Dabei kommt es zur Denaturierung der Proteine, sodass diese anschließend in ihrer Primärstruktur, d. h. als aufgefaltete Aminosäureketten vorliegen. Durch das zugegebene SDS werden die Eigenladungen der Proteine mit der negativen Ladung überdeckt. Pro Gramm Protein werden dabei 1,4 Gramm SDS gebunden, wodurch es zur Ausbildung eines konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis kommt. Aufgegeben auf das Polyacrylamid-Gel, werden die Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes dann durch die negative Ladung abhängig von ihrer Molekülgröße in Richtung der Anode gezogen. Das Gel wirkt dabei aufgrund der Gelporen wie ein Sieb und hält größere Moleküle stärker zurück als kleine, wodurch es zur elektrophoretischen Auftrennung der Einzelproteine kommt. Um die auf diese Weise aufgetrennten Proteinbanden sichtbar zu machen, werden die Proteine i. d. R. unspezifisch mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Um den aufgetrennten Proteinen anhand ihres Laufwegs im Gel eine Molekülgröße zuzuordnen zu können, werden parallel zu den Proben Proteinstandards mit bekannter Molekülgröße aufgetrennt.

Western Blot

Um die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine für weitere Detektionsmethoden zugänglich zu machen, wird nach der Gelelektrophorese häufig noch ein sogenannter Western Blot angeschlossen [21, 125]. Bei dieser Technik werden die aufgetrennten Proteine mithilfe eines Elektrobotters vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dabei wird in einem sandwichartigen Aufbau das Acrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinbanden auf die Membran gelegt und zwischen zwei Filterpapieren eingeschlossen, die zuvor mit dem Transferpuffer getränkt wurden. Nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die nach wie vor mit SDS-beladenen (und dadurch negativ geladenen) Proteine erneut in Richtung der Anode. Beim Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran bleibt das Bandenmuster der SDS-PAGE erhalten, sodass die einzelnen Banden bspw. nach der oben erläuterten immunhistochemischen Markierung der einzelnen Matrixproteine über die Fluoreszenzsignale der Fluorophor-konjugierten Sekundärantikörper dem jeweiligen Protein zugeordnet werden können [21, 125].

Kollagen-Quantifizierung

Als charakteristische Kenngröße der ECM können die Kollagene angesehen werden, die einen Großteil der in der Matrix enthaltenen Proteine darstellen [16]. Gängige, in der Literatur verwendete Methoden, den Gehalt an Kollagen in der ECM zu quantifizieren, stellen die

Bestimmung des Hydroxyprolin-Anteils und der *Sircol*TM-Assay dar [70, 103, 129, 137]. Die Hydroxyprolinbestimmung ermöglicht aufgrund der Tatsache, dass die α -Aminosäure Hydroxyprolin in Kollagen und sonst prinzipiell in keinem anderen Protein vorkommt, die Umrechnung des ermittelten Hydroxyprolingehalts in den Gesamtkollagengehalt der Probe [137, 138]. Der *Sircol*TM-Assay hingegen basiert auf der Interaktion des charakteristischen Kollagen-Peptids $[\text{Gly-X-Y}]_n$ mit dem Farbstoff Pikro-Siriusrot [126]. In beiden Assays werden jeweils entsprechende Kollagen-Standardreihen mitgeführt, um anschließend anhand einer Kalibrationsfunktion auf die Kollagenkonzentration in der Probe rückschließen zu können.

Glykosaminoglykan-Bestimmung

Neben den Kollagenen stellen GAGs einen weiteren Hauptbestandteil der ECM dar. Für die Detektion und Identifikation von GAGs existieren zahlreiche Methoden. Als Beispiele können der Carbazol-Assay, der Alcianblau-Assay, der Nachweis durch Hochleistungsflüssigkeitchromatographie-basierte Methoden (engl.: *high performance liquid chromatography*, HPLC) [139], der Dimethylmethylenblau-Assay (DMMB) [140], *Enzyme-linked-Immunosorbent Assays* (ELISA) oder die Massenspektrometrie [141] aufgeführt werden. Ein weiterer, häufig in der Literatur verwendeter Nachweis ist mit dem sogenannten *Blyscan*TM-Assay möglich, bei dem es zu einer photometrisch verfolgbaren Interaktion eines speziellen Farbstoffes mit den Glykanen kommt.

Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bietet durch das hohe Auflösungsvermögen (Vergrößerung bis zu 100.000-fach) die Möglichkeit, die molekulare Struktur und die supramolekulare Organisation der ECM näher zu untersuchen [126, 142]. Auf diese Weise ist es bspw. möglich, Informationen über die Topografie, die Molekülorganisation, die Porosität und die elementare Zusammensetzung zu erhalten [142]. Bei dieser Technik wird ein Elektronenstrahl zeilenförmig über die Probe gerastert. Zur Bildgenerierung werden die Wechselwirkungssignale der Strahlelektronen mit der Probenoberfläche synchron detektiert. Trifft der Elektronenstrahl auf die Probe, entstehen durch die auftretenden Wechselwirkungen Sekundärelektronen (SE) und Rückstreuielektronen (RE), die je nach Detektionsmodus für die Bildgenerierung anhand ihrer Intensität in Kontrastwerte umgerechnet werden. Im Computer werden diese Informationen anschließend in eine Aufnahme der Probe umgerechnet [142].

Diese Technik kam in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der (*click*)ECM-Beschichtungen zum Einsatz.

1.4 Modifizierung von *in vitro* generierter extrazellulärer Matrix für die Verwendung als Biomaterial

Um die in **Kapitel 1.3.5** aufgeführten Einschränkung der ECM hinsichtlich fehlender chemisch spezifisch adressierbarer Gruppen zu umgehen, wurden in der Fachliteratur bis dato mehrere Methoden vorgestellt, mit denen es möglich ist, CDMs mit spezifischen chemischen Gruppen auszurüsten. Für die gewünschten, ebenfalls unter **Kapitel 1.3.5** bereits beschriebenen bioorthogonalen Reaktionen haben sich als chemisch funktionelle Gruppe die Azide ($-N_3$) bewährt [111, 112, 143-146]. Diese abiotische, d. h. in der Natur nicht vorkommende Gruppe zeichnet sich durch ihre sehr geringe Molekülgröße und ihre dadurch vergleichsweise einfache Einführung in andere Moleküle aus. Azide reagieren höchst selektiv und spezifisch in sogenannten „*Click-Reaktionen*“ mit Alkinen (Kohlenstoff-Kohlenstoff-Dreifachbindungen, $-C\equiv C-$) und formen dabei einen kovalenten und irreversiblen Triazolring.

Unter dem Begriff „*Click-Chemie*“ werden eine Reihe extrem selektiver Reaktionen zusammengefasst, die sich u. a. durch ihre hohe Reaktionseffizienz, ihre Stereo- und Regiospezifität und durch die hohen Ausbeuten auszeichnen [111, 112, 146, 147]. Sie laufen unter milden Reaktionsbedingungen (üblicherweise in Wasser), bei annähernd neutralem pH-Wert und bei Raumtemperatur ab, wobei ihre Reagenzien nicht toxisch sind und keine kritischen Nebenprodukte gebildet werden [113, 148, 149].

Diese zu dieser Kategorie gehörende 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen läuft jedoch nur bei hohen Temperaturen oder hohen Drücken ab, sodass die Reaktion für biologische Anwendungen zunächst nicht nutzbar war. Um die Reaktion jedoch auch bei moderaten Bedingungen und damit in einem biologischen Milieu nutzen zu können, wurden in zwei separaten Ansätzen jeweils die sogenannte „*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*“ (**CuAAC**, zu Deutsch: „Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition“) entwickelt, bei der die Reaktion durch reaktive Kupferspezies (Cu^+) katalysiert wird, sodass keine erhöhten Temperaturen oder Drücke mehr notwendig sind [110, 150, 151]. Die Reaktion ist bioorthogonal, d. h. auch hier reagieren weder die Reaktionspartner noch die Reaktionsprodukte mit Biomolekülen oder Zellen [111, 112, 146]. Eine Limitierung für

biologische Anwendungen ergibt sich jedoch aus der zytotoxischen Wirkung der Cu⁺-Spezies [111, 112, 146, 147, 152].

Um den Reaktionstyp dennoch für biologische Anwendungen nutzbar zu machen, entwickelten Bertozzi *et al.* Kupfer-freie Reaktionen, die in der Literatur unter „*strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*“ (**SPAAC**, zu Deutsch: „Ringspannungs-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition) aufgeführt werden [153, 154]. Statt auf terminalen Alkinen basiert die SPAAC auf der Verwendung gespannter cyclischer Alkine, deren intrinsische Energie den Einsatz des Kupfer-Katalysators überflüssig macht [112, 144, 145, 147]. Um die natürliche ECM mit den für die *Click*-Chemie notwendigen chemischen funktionellen Gruppen auszurüsten und damit die Einschränkung fehlender chemisch spezifisch adressierbarer Gruppen zu umgehen, wurden in der Fachliteratur bis dato mehrere Methoden vorgestellt, mit denen es möglich ist, CDMs mit spezifischen chemischen Gruppen auszurüsten, sodass diese Matrices spezifisch und selektiv adressiert werden können:

- 1) **Unspezifische Funktionalisierung mittels Carbodiimid-Chemie**
- 2) **Biosynthetischer Einbau von Alkynyl-Methionin**
- 3) **Metabolisches Glykoengineering**

1.4.1 Unspezifische Funktionalisierung mittels Carbodiimid-Chemie

Um CDMs mit Aziden zu funktionalisieren, kann die Carbodiimid-Chemie angewandt werden, um die Amine in den ECM-Proteinen zu Azid-funktionellen Molekülen umzusetzen. Diese unspezifische Methode birgt, wie unter **Kapitel 1.3.5** bereits erwähnt, jedoch die Gefahr eines Funktionsverlusts der ECM-Proteine und einer Veränderung der Bulk-Eigenschaften der ECM [117].

1.4.2 Nicht natürliche Aminosäuren

Eine Möglichkeit, CDMs direkt mit Azidgruppen zu modifizieren, bietet die biosynthetische Einbringung von L-Homopropargylglycin (L-HPG), eine chemisch modifizierte Variante der natürlichen Aminosäure Methionin. Dabei wird die nicht natürliche Aminosäure den *in vitro* kultivierten Zellen über das Zellkulturmedium angeboten. Im Zuge ihres natürlichen Metabolismus nehmen die Zellen diesen Aminosäureersatz auf und nutzen ihn als Bausteinen für deren ECM-Biomoleküle. Nach der Dezellularisierung bleibt dann eine Azid-modifizierte ECM zurück [117].

1.4.3 Metabolisches Glykoengineering (MGE)

Diese biotechnologische Methode ähnelt der oben beschriebenen metabolischen Einbringung nicht natürlicher Aminosäuren. In diesem Fall werden jedoch synthetische Monosaccharide über die natürliche Biosynthese der Zelle in zelluläre Glykane eingebracht. In der Fachliteratur sind hierzu u. a. Arbeiten zu finden, in denen die Methode genutzt wurde, um bspw. die chemische Modifizierung von Zelloberflächen, metabolische Flüsse innerhalb von Zellen sowie das Proteom oder die Glykosylierung zu untersuchen [155].

Dem Zellkulturmedium werden bei dieser Technik chemisch modifizierte Zuckermoleküle beigesetzt. Im Zuge ihres natürlichen Metabolismus nehmen die Zellen die i. d. R. in peracetylierter Form angebotenen und dadurch membrangängigen Monosaccharide in ihr Zellinneres auf und verstoffwechseln sie dort. Auf diese Weise werden die funktionellen Gruppen der über das Zellkulturmedium angebotenen Monosaccharide auf die Zuckerstrukturen der Zellen (z. B. Glykane, Proteoglykane, Proteolipide) übertragen (siehe auch **Kapitel 1.2.2**) [155]. Im Zellinneren werden mithilfe spezieller Deacetylasen die Acetylgruppen enzymatisch abgespalten, sodass sich die Moleküle im Zytoplasma anreichern können. Im ER findet anschließend die Glykansynthese statt, bei der die Moleküle enzymatisch zu Glykanen zusammengesetzt werden oder für die Generierung von Proteoglykanen mit Proteinen verknüpft werden. Die fertigen Glykane oder Glykanderivate werden anschließend über den Golgi-Apparat entweder aus der Zelle ausgeschleust oder in verschiedene zellinnere Kompartimente transportiert [156].

Hinsichtlich der verwendeten Monosaccharide wurde bereits eine große Zahl an Arbeiten publiziert, in denen verschiedenste Zuckerderivate verwendet wurden. So wurden bspw. durch das Einbringen chemisch modifizierter Derivate der *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), des *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc), des *N*-Acetylmannosamin (ManNAc), des *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und der Fucose in die Glykokonjugate der Zelle chemisch reaktive funktionelle Gruppen wie Azide, Ketone oder Thiole in die Glykokonjugate der Zelle integriert [145]. Bei der Zugabe des Azid-modifizierten *N*-Azidoacetylgalactosamin (Ac₄GalNAz) zum Zellkulturmedium einer *In-vitro*-Zellkultur werden die Moleküle in die zentralen Positionen von *O*-verknüpften Glykoproteinen eingebaut [157, 158]. Diese Bausteine sind anschließend intrazellulär, membranständig sowie in den *O*-verknüpfte Glykanstrukturen der ECM-Proteine zu finden [158-160].

1.4.3.1 Azid-modifizierte extrazelluläre Matrix („*clickECM*“)

Die Tatsache, dass neben den intrazellulären auch die extrazellulären Glykanstrukturen durch das MGE mit Aziden funktionalisiert werden, wurde 2017 zum ersten Mal von Ruff *et al.* für die gezielte Funktionalisierung von CDM genutzt [114]. Sie konnten zeigen, dass die *in vitro* generierte ECM von Fibroblasten mithilfe des MGEs reproduzierbar mit Aziden modifiziert werden kann. Die eingebrachten Azide waren dabei mit einem Alkin-funktionalen Fluorophor chemisch adressierbar und sterisch zugänglich. Die über das MGE eingebrachte Azidkonzentration ist dabei jedoch bis dato nicht bekannt. Ruff *et al.* konnten zeigen, dass diese sogenannte „*clickECM*“ nach siebentägiger, statischer *In-vitro*-Zellkultur durch die Behandlung des Zellrasens mit Reinstwasser und Ammoniaklösung über einen osmotischen Schock dezellularisiert und so isoliert werden konnte. Diese isolierte *clickECM* wurde anschließend für Beschichtungen von Alkin-funktionalen Oberflächen verwendet. Durch die ablaufende Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen der Azid-funktionalen *clickECM* und der Dibenzocyclooctin (DIBO)-funktionalen Siliciumoberfläche wurde auf diese Weise eine vermutlich kovalent gebundene Oberflächenbeschichtung generiert. In einem Waschversuch unter turbulenten Strömungsbedingungen und im direkten Vergleich zu einer physisorbierten Beschichtung aus nicht funktionalisierter ECM zeigte sich, dass die Beschichtung aus Azid-modifizierter *clickECM* eine signifikant erhöhte Stabilität unter turbulenten Strömungsbedingungen in einem Waschversuch aufwies [114]. Ferner stellte sich heraus, dass Keratinocyten der immortalisierten HaCaT-Zelllinie auf diesen *clickECM*-Beschichtungen eine signifikant erhöhte Zellproliferationsrate nach 72-stündiger statischer Zellkultur im direkten Vergleich zu unbeschichteten, DIBO-funktionalisierten Glasoberflächen zeigten. Die Zelladhäsionsrate nach 0,5 Stunden bzw. 4 Stunden unterschied sich hingegen statistisch nicht signifikant von den unbeschichteten Glasoberflächen [122].

In ihrer 2015 veröffentlichten Dissertationsschrift konnte Ruff überdies zeigen, dass neben der CDM von dermalen humanen primären Fibroblasten auch die CDMs von undifferenzierten MSCs oder epidermalen Keratinocyten durch die Zugabe von Ac₄GalNAz oder Ac₄ManNAz erfolgreich mit Aziden modifiziert werden konnten [122].

Die von Ruff *et al.* vorgestellte Methode wurde seither auch mit anderen Monosacchariden, anderen Zellen und für andere Anwendungen angewandt. 2018 verwendeten Gutmann *et al.* bspw. eine ähnliche Methode, um die ECM von NIH 3T3-Fibroblasten unter Verwendung des Glucosaminderivats 2-Azidoacetyl-amino-2-desoxy-(1,3,4,6)-tetra-*O*-acetyl-*D*-glucopyranosid (Ac₄GlcNAz) erfolgreich mit Aziden zu modifizieren, um die generierten Matrices anschließend

mit funktionellen Peptiden wie einem therapeutischen Myostatininhibitor zu konjugieren [127]. Nellinger *et al.* modifizierten die ECM aus Stammzellen, welche zuvor aus dem Fettgewebe isoliert wurden (engl. *adipose-derived stem cells*, ASCs) mithilfe des oben genannten Ac₄GalNAz mit Aziden und konnten auf diese Weise zeigen, dass mittels des MGEs auch ASC-Matrices erfolgreich modifiziert werden können [161].

2 Zielsetzung/ Hypothesen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in der Gewinnung und umfangreichen Charakterisierung der biogenen, d. h. aus *in vitro* kultivierten Fibroblasten gewonnenen, Azid-modifizierten extrazellulären Matrix für die Anwendung als Biomaterial. Zur besseren und übersichtlicheren Strukturierung der Arbeit wurden die Teilziele über die nachfolgenden sechs Hypothesen definiert und abgegrenzt. Diese Hypothesen werden am Ende jedes Ergebniskapitels zusammenfassend diskutiert.

Wird nachfolgend gleichermaßen von der unmodifizierten ECM als auch von der Azid-modifizierten *click*ECM gesprochen, so wird fortan der Begriff „(*click*)ECM“ verwendet, um dies kenntlich zu machen.

1) Aufarbeitung der (*click*)ECM

Durch die Erweiterung des Aufarbeitungsprotokolls der isolierten (*click*)ECM mit einem Aufkonzentrierungsschritt mittels Zentrifugation kann die ECM-Konzentration signifikant gesteigert werden. Diese gesteigerte Konzentration kann beibehalten werden, wenn die Homogenisierung der (*click*)ECM durch einen mechanischen Krafteintrag mithilfe eines Kugelmühlen-Homogenisators erfolgt, sodass auf die Zugabe von Essigsäure und Neutralisierungspuffer verzichtet werden kann. Die dabei entstehenden (*click*)ECM-Suspensionen weisen vergleichbare Fragmentgrößenverteilungen auf und können reproduzierbar verarbeitet werden. Die Proteinstrukturen sowie die Azide der *click*ECM werden durch die mechanische Fragmentierung nicht geschädigt.

2) Bestimmung der Azidkonzentration in der *click*ECM

Die Konzentration an Aziden innerhalb der *click*ECM kann anhand der Fluoreszenzintensität einer Fluorophorlösung abgeschätzt werden, die zuvor mit einer definierten Menge *click*ECM inkubiert wurde. Nach Abtrennung der unlöslichen *click*ECM mittels Ultrazentrifugation kann die Fluoreszenzintensität des Überstandes mit der Fluoreszenzintensität der Fluorophorstammlösung abgeglichen und anhand einer Kalibrationsreihe in die Azidkonzentration der *click*ECM umgerechnet werden.

3) Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der (*click*)ECM

In Bezug auf die Biomolekülzusammensetzung unterscheidet sich die Azid-modifizierte *click*ECM nicht von der unmodifizierten ECM. Dies lässt sich qualitativ anhand (immun)histochemischer Färbemethoden in Kombination mit verschiedenen Mikroskopietechniken und SDS-PAGE-Versuchen nachweisen. Ferner unterscheiden sich die beiden Matrices quantitativ nicht in ihrem Gesamtproteingehalt, in der Konzentration löslicher und unlöslicher Kollagene sowie dem Glykosaminoglykangehalt. Spezielle kommerziell verfügbare Assays sind dazu geeignet, diese Konzentrationen verlässlich zu bestimmen.

4) Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM

Durch die optimierte Aufarbeitung der (*click*)ECM und die Modifizierung des von Ruff *et al.* entwickelten Beschichtungsprotokolls [114, 122] ist es möglich, reproduzierbare Oberflächenbeschichtungen auf Dibenzocyclooctin (DIBO)-funktionalisierten Silicium-Wafern und DIBO-funktionalisierten Glasoberflächen zu erreichen. Die dabei entstehenden Beschichtungen sind homogen, stabil, bioaktiv und bedecken die Oberflächen vollständig.

5) Verwendung von *click*ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform

Die Azide in den generierten *click*ECM-Beschichtungen können mit Alkin-gekoppelten Biotin-Molekülen konjugiert werden, um unter Ausnutzung der vielseitigen Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung eine universelle Biokonjugationsplattform aufzubauen. Die bioaktiven *click*ECM-Beschichtungen können auf diese Weise mit zusätzlichen Funktionalitäten ausgerüstet werden, die in der natürlichen ECM ansonsten nicht vorkommen würden. Als Modell eignet sich hier die Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase.

6) Generierung von Hybridhydrogelen aus Azid-modifizierter Gelatine (*click*Gel) als Modellsubstanz für die *click*ECM und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)

Unter Verwendung von Azid-modifizierter Gelatine (*click*Gel) als Modellsubstanz für die *click*ECM ist es möglich, bioaktive Hybridhydrogele aus Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) zu generieren. Um ein Auswaschen der *click*Gel aus dem Polymernetzwerk zu verhindern, können die Azide mit dem heterobifunktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid konjugiert und anschließend im Zuge der Vernetzungsreaktion anhand der photopolymerisierbaren Gruppen kovalent im Hydrogelnetzwerk verankert werden.

3 Verwendete Materialien und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen, Fluorophore, Puffer, Zellkulturmedien und –zusätze, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Glaswaren, Antikörper, Kits, Software, Geräte und Hilfsmittel sowie alle Angaben zu selbst angesetzten Puffern und Lösungen sind im Anhang dieser Arbeit unterteilt in die jeweilige Kategorie alphabetisch gelistet.

3.1 Verwendete Zellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Zellversuche sowie für die *In-vitro*-Generierung der extrazellulären Matrix wurden primäre humane dermale Fibroblasten aus Präputien isoliert. Für die Verwendung der humanen Biopsate lag bereits im Vorfeld dieser Arbeit die Zustimmung durch die Ethik-Kommission der Landesärztekammer Baden-Württemberg vor (IGBZSF-2012-278).

Die Biopsate wurden mit dem Einverständnis der Patienten von der Praxis Dr. Yurttas in Stuttgart Bad Cannstatt zur Verfügung gestellt. Nach der Operation erfolgte die Lagerung und der Transport in einer phosphatgepufferten Salzlösung (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) mit Calcium- und Magnesiumionen (PBS⁺), die mit 1 %(v/v) Gentamycin versetzt war, bei 4° C. Die Aufbewahrungszeit der Biopsate vor der Aufarbeitung im Zellkulturlabor betrug maximal zwei Tage. Bei den drei Donoren handelte es sich jeweils um einjährige männliche Patienten. **Tabelle 1** enthält eine Übersicht über die jeweiligen Spenderdetails.

Tabelle 1: Übersicht über die Zelldonoren der in dieser Arbeit verwendeten primären, humanen, dermalen Fibroblasten.

Zellisoliationsnummer	Geschlecht	Alter	Bezeichnung
1	männlich	1 Jahr	Donor 1
2	männlich	1 Jahr	Donor 2
3	männlich	1 Jahr	Donor 3

4 Angewandte Methoden

Nachfolgend sind alle angewandten Techniken und Methoden der Untersuchungen im Rahmen dieses Dissertationssvorhabens beschrieben.

4.1 Herstellung und Aufarbeitung der (*click*)ECM

4.1.1 Zellkulturtechnik

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mit primären humanen, juvenilen dermalen Fibroblasten durchgeführt (siehe auch **Kapitel 3.1**). Alle Arbeitsschritte der Zellkulturtechnik wurden unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Das verwendete Standardzellkulturmedium war *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), welches mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (englisch: *fetal calf serum*, FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/ Streptomycin (P/S) supplementiert wurde. Lediglich direkt nach der Isolierung der Zellen wurde das Medium zunächst mit 1 % Gentamycin statt 1 % P/S versetzt. Alle Lösungen und Puffer für die Zellkultur wurden vor Arbeitsbeginn im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der isolierten Primärzellen erfolgte stets im Inkubator unter statischen Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit).

Zellisolation aus humanem Biopsatmaterial

Für die Isolation der humanen primären Fibroblasten aus Präputien wurden die Biopsate (siehe auch **Kapitel 3.1**) zunächst mechanisch zerkleinert und die Zell-Zell-Kontakte enzymatisch aufgespalten, wodurch die Fibroblasten anschließend vereinzelt vorlagen. Die auf diese Weise entstehende Zellsuspension wurde gewaschen, die Zellen gezählt und in definierter Zellzahl in Kultur genommen.

Durchführung:

- Biopsat aus der Transport- und Lagerlösung (PBS⁺ + 1 % Gentamycin) entnehmen und drei Mal mit jeweils 20 mL PBS⁺ spülen.
- Präputium in eine sterile Polystyrol-Petrischale (Ø 94 mm) überführen und ab diesem Zeitpunkt stets mit etwas PBS⁺ feucht halten.
- Präputium mit einem Skalpell der Länge nach aufschneiden, sodass aus der Röhre ein flächiges Gewebestück entsteht.

- Subkutanes Fett und andere Gewebereste entfernen und ordnungsgemäß entsorgen.
- Das verbleibende Gewebe mithilfe des Skalpells in möglichst lange, ca. 1 mm breite Streifen zerteilen.
- Die entstehenden Streifen in eine weitere sterile Petrischale überführen und mit ca. 20 mL phosphatgepufferter Salzlösung ohne Calcium- und Magnesiumionen (PBS⁻) waschen.
- Anschließend die Hautstreifen mit mindestens 10 mL Dispase-Lösung (2 U/mL in PBS⁻) überschichten und bei 4° C ü. N. inkubieren.
- Am Folgetag die Dermis mithilfe zweier Pinzetten vorsichtig von der Epidermis trennen und gesondert jeweils in eine sterile, mit ca. 20 mL PBS⁺ gefüllten Petrischale überführen.
- Für die Isolation der dermalen Fibroblasten, die Dermisstückchen mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilen, bis das Gewebe eine breiige Konsistenz aufweist. Anschließend Überführung in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten.
- Überstand abnehmen und verwerfen, das entstandene Pellet im Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Kollagenase-Lösung versetzen und 45 Minuten bei 37° C inkubieren.
- Anschließend Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm.
- Überstand abnehmen, verbleibendes Pellet mit 10 mL supplementiertem DMEM waschen und erneut für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugieren.
- Das entstandene Pellet in 2 mL DMEM supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Gentamycin resuspendieren und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche (ZKF) überführen.
- Inkubation ü. n. im Brutschrank.
- Am darauffolgenden Tag weitere 6 mL des Mediums zugeben.
- Weiterkultivierung im Brutschrank mit regelmäßigen Medienwechseln (i. d. R. alle zwei bis drei Tage, siehe auch Abschnitt „*Medienwechsel*“).
- Ab Passage 1 das Zellkulturmedium mit 1 % P/S statt 1 % Gentamycin supplementieren.

Cryokonservierung

Um die biologische Varianz in den Untersuchungen zu berücksichtigen und damit die biologische Relevanz der Ergebnisse abzusichern, wurden die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche stets parallel mit drei biologischen Replikaten, d. h. Zellen dreier individueller Donoren, durchgeführt (siehe auch **Kapitel 3.1**). Um für den gesamten Zeitraum der experimentellen Untersuchungen ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben, wurde zu Beginn des Dissertationsvorhabens mithilfe der Cryokonservierung der Zellen eine Zellbank angelegt.

Hierzu wurden die Fibroblasten aus den Biopsaten isoliert und zunächst über eine Passage expandiert (siehe auch Abschnitt „*Zellisolation aus humanem Biopsatmaterial*“), bevor sie unter Zugabe der Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren und bei Temperaturen unter $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Die korrekte Durchführung des Einfrierprozesses, die Einhaltung der exakten Lagerungsbedingungen sowie später auch die korrekte Durchführung des Auftauprozesses sind für die Vitalität der Zellen essenziell [15].

Durchführung Einfrierprozess:

- Zellen wie im Abschnitt „*Passagieren*“ von der Wachstumsfläche der ZKF ablösen.
- Zellzahl der dabei entstehenden Zellsuspension wie im Abschnitt „*Impedanzbasierte Zellzählung*“ bestimmen und mit Zellkulturmedium auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL einstellen. Dabei die gewünschte Zellzahl/mL so berechnen, dass 10 % DMSO als Gefrierschutzsubstanz zugegeben werden kann.
- Anschließend je 1 mL der mit DMSO versetzten Zellsuspension in ein entsprechend beschriftetes Cryoröhrchen geben.
- Röhrchen sorgfältig verschließen und in einen mit Isopropanol gefüllten und auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ vortemperierten Gefrierbehälter geben.
- Cryoröhrchen im Gefrierbehälter 24 Stunden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ einfrieren (Einfrierrate $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{Minute}$), anschließend in die Gasphase des mit flüssigem Stickstoff gefüllten Cryotanks überführen.

Durchführung Auftauprozess:

- Vorab für jedes aufzutauende Zellaliquot ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit 9 mL $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmem Medium befüllen.
- Cryoröhrchen aus dem Cryotank entnehmen (Kälteschutzhandschuhe!).
- 1 mL des vorgewärmten Mediums entnehmen und vorsichtig in das Cryoröhrchen überführen. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren die gefrorene Zellsuspension zügig auftauen und in das Zentrifugenröhrchen zum restlichen vortemperierten Medium überführen.
- Zur Entfernung des Gefrierschutzmittels die aufgetaute Zellsuspension 5 Minuten lang bei 1000 rpm abzentrifugieren, Überstand möglichst rasch mithilfe der Absaugvorrichtung und einer sterilen Pasteurpipette aus Glas absaugen.

- Das entstehende Zellpellet in 1 mL Medium resuspendieren und in der gewünschten Zellzahl in ein entsprechend beschriftetes Zellkulturgefäß einsäen.
- Da das Einfrieren als eine Form der Zwischenlagerung gilt und die kontinuierliche Kultur dadurch unterbrochen wird, wird beim Auftauen der Zellen die Passagenzahl um eins erhöht.

Passagieren

Werden adhärenente Zellen auf den Wachstumsflächen von Zellkulturgefäßen kultiviert, nimmt die Teilungsaktivität mit zunehmender Konfluenz ab [15]. Aus diesem Grund ist es nötig, Zellkulturen zu passagieren, d. h. die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % enzymatisch abgelöst und in verminderter Zellzahl in neue Zellkulturgefäße ausgesät werden. Bei der enzymatischen Ablösung werden die Proteine, die die Zell-Substrat-Adhäsion vermitteln, verdaut, sodass die Zellen als Zellsuspension vorliegen [15].

Durchführung:

- Zellkulturmedium absaugen, adhärenenten Zellrasen mit PBS⁻ spülen.
- Zugabe von mit 0,5 % Trypsin supplementierter EDTA-Lösung, Inkubation für 3 Minuten im Brutschrank.
- Ablösefortschritt phasenkontrastmikroskopisch überprüfen, ggf. durch vorsichtiges Klopfen gegen die Zellkulturflasche vervollständigen.
- Trypsin-Reaktion durch Zugabe von 10 % FCS abstoppen, Zellsuspension in 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführen.
- Zellkulturgefäß nochmals mit PBS⁻ nachspülen
- Anschließend Zellsuspension 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugieren, Überstand absaugen und entstandenes Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendieren.
- Aliquot für Zellzählung entnehmen und die Zellzahl wie im Abschnitt **„Impedanzbasierte Zellzählung“** bestimmen.
- Zellen in gewünschter Zellzahl in ein neues, entsprechend beschriftetes Zellkulturgefäß aussäen und mit Zellkulturmedium auf das gewünschte Volumen auffüllen.

Impedanzbasierte Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in dieser Arbeit mithilfe einer impedanzbasierten Messung. Die Methode beruht auf der Detektion des elektrischen Widerstands. Im verwendeten Messaufbau wird ein mit einer Elektrolytlösung versetztes Aliquot der zu messenden Zellsuspension durch eine zylindrische Öffnung geführt, welche von zwei Elektroden gesäumt wird und an die eine elektrische Spannung angelegt wird. Passiert eine Zelle oder auch ein Zelltrümmer die Messöffnung, so verdrängt der Partikel das äquivalente Volumen des isotonen Messpuffers, wodurch die Impedanz der Messöffnung kurzfristig erhöht wird. Die Anzahl der dabei entstehenden Signale entspricht der gemessenen Partikelzahl, die Größe des Signals hingegen ist von der Größe des gemessenen Partikels abhängig. Auf diese Weise ist es möglich, Zelltrümmer anhand des verdrängten Volumens an Elektrolytlösung von ganzen Zellen zu unterscheiden. Bei ganzen Zellen kann überdies zwischen vitalen Zellen und toten Zellen unterschieden werden. Eine vitale Zelle besitzt eine intakte Zellmembran, durch welche die Zelle beim Anlegen einer Spannung wie ein Isolator wirkt. Bei toten oder beschädigten Zellen, bei denen die Zellmembran nicht länger intakt ist, setzt lediglich die Kernmembran der angelegten Spannung noch einen Widerstand entgegen. Folglich können diese Zustände entsprechend des stärkeren oder schwächeren Signals unterschieden und für das analysierte Messvolumen aufaddiert werden [15].

Durchführung:

- Vor der Messung die Kapillare mit der isotonen Elektrolytlösung spülen.
- 50 μL der Zellsuspension mit 10 mL der isotonen Elektrolytlösung in einem Messgefäß verdünnen ($\cong 1 : 200$ Verdünnung).
- Messgefäß unter der Kapillare platzieren.
- Die Messung starten und den Messbereich mithilfe des Cursors so einstellen, dass Zelltrümmer und tote Zellen im Messergebnis nicht berücksichtigt werden.
- Verdünnungsfaktor einstellen, Ergebnisse ablesen und anschließend die Kapillare nochmals mit der isotonen Elektrolytlösung spülen.

Medienwechsel

Während der *In-vitro*-Kultivierung verstoffwechseln die Zellen im Zuge ihres natürlichen Metabolismus die im Medium enthaltenen Inhaltsstoffe und geben dabei Stoffwechselprodukte an das Medium ab. Um eine gleichbleibende Versorgung der Zellen zu gewährleisten, ist es notwendig, das Medium in regelmäßigen Abständen (i. d. R. alle drei Tage) in einem Medienwechsel erneuert, ohne den Zellrasen dabei von der Wachstumsfläche des Zellkulturgefäßes abzulösen [15].

Praktische Durchführung:

- Das verbrauchte Zellkulturmedium absaugen, ohne den Zellrasen zu beeinträchtigen.
- Anschließend das abgenommene Volumen an altem Medium durch frisches, vortemperiertes Zellkulturmedium ersetzen.

Neben einem vollständigen Medienwechsel (MW) ist es überdies möglich, auch nur einen sogenannten konditionierten Medienwechsel (kMW) durchzuführen. Hierbei wird nur die Hälfte des alten Mediums abgesaugt und durch dasselbe Volumen an frischem, vortemperierten Medium ersetzt. Dieses Verfahren bedeutet für die Zellen weniger Stress, da sich die Zusammensetzung des Mediums nicht so drastisch verändert, wie dies bei einem vollständigen Medienwechsel der Fall ist. Signalmoleküle, mit denen Zellen untereinander kommunizieren, bleiben hierbei zumindest teilweise erhalten [15].

4.1.2 Gewinnung von (*click*)ECM und Metabolisches Glykoengineering (MGE)

In den folgenden Abschnitten werden die angewandten Methoden und Arbeitsschritte zur *In-vitro*-Generierung, Isolation und Aufarbeitung von nicht modifizierter ECM und von Azid-modifizierter *click*ECM erläutert. Wird nachfolgend von beiden Matrixarten gleichermaßen gesprochen, so wird fortan der Begriff „(*click*)ECM“ verwendet, um dies kenntlich zu machen. Für die *In-vitro*-Gewinnung von (*click*)ECM werden Fibroblasten in Zellkulturschalen (ZKS) über sieben Tage kultiviert und dabei in beiden Fällen ab dem ersten Tag zur Steigerung der Kollagensynthese mit Na-L-Ascorbat [162-164] sowie ab dem vierten Tag im Zuge des MGE (siehe auch **Kapitel 1.4**, Abschnitt „**Metabolisches Glyko-Engineering (MGE)**“) mit dem jeweiligen Monosaccharid behandelt. Im Fall der ECM handelt es sich hierbei um den natürlichen Zucker *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc), im Falle der *click*ECM um das peracetylierte Azid-Analoga *N*-Azidoacetylgalactosamin (Ac₄GalNAz). Die einzelnen Arbeitsschritte zur Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten (*click*)ECM ist im zeitlichen Verlauf in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht über die Arbeitsschritte im Zuge der *in-vitro*-Generierung von nicht modifizierter und Azid-modifizierter extrazellulärer Matrix (*click*ECM) im zeitlichen Verlauf.

Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5+6	Tag 7
Aussaat der Zellen	Zugabe von Na-L-Ascorbat zum Zellkulturmedium	kMW	-	kMW + Zugabe der Monosaccharide	-	Lyse + Aufreinigung + ECM-Isolation

Durchführung:

- Die Fibroblasten ggf. aus der Cryokonservierung auftauen (siehe auch **Kapitel 4.1**, Abschnitt „*Cryokonservierung*“).
- Die Zellen *in vitro* expandieren, bis eine ausreichende Zellzahl erreicht ist (siehe auch **Kapitel 4.1**, Abschnitt „*Passagieren*“ und „*Medienwechsel*“).
- Die Fibroblasten aus der ZKF ablösen und die Zellzahl bestimmen (siehe auch **Kapitel 4.1**, Abschnitt „*Passagieren*“ und „*Impedanzbasierte Zellzählung*“).
- **Tag 0:** $3,2 \cdot 10^6$ Zellen pro \varnothing 14,5 cm-ZKS mit 20 mL Zellkulturmedium aussäen ($\cong 143 \text{ cm}^2 \cong 20.000 \text{ Zellen/cm}^2$).
- **Tag 1:** Zugabe von 25 μL Na-L-Ascorbat (50 mg/mL in PBS⁻).
- **Tag 2:** kMW (12,5 mL verbrauchtes Medium entnehmen, durch 12,5 mL frisches Medium ersetzen + Zugabe von 12,5 μL Na-L-Ascorbat (50 mg/mL in PBS⁻).
- **Tag 4:** kMW analog zu Tag 2 + Zugabe der 2 mM Monosaccharid-Lösung:
 - Nicht modifizierte ECM: 625 μL GalNAc (2 mM in PBS⁻).
 - Azid-modifizierte *click*ECM: 625 μL Ac₄GalNAz (2 mM in PBS⁻).
- **Tag 7:** Lyse, Aufreinigung und Isolation der (*click*)ECM:
 - Medium absaugen.
 - Zum Waschen des Zellrasens und der gebildeten (*click*)ECM vorsichtig 20 mL steriles Reinstwasser auftropfen und wieder absaugen, Waschschrift zwei weitere Male wiederholen.
 - Zur osmotischen Zelllyse äußerst vorsichtig 10 mL sterile Lyselösung (360 mM NH₄OH) auftropfen, 5 Minuten im Brutschrank inkubieren. Diesen Schritt zwei weitere Male wiederholen, ohne die Lösung zwischen den Zugaben abzunehmen.

- Phasenkontrastmikroskopische Kontrolle des Lysefortschritts, ob alle Zellen geplatzt sind.
- Die Lyselösung vorsichtig mit der Kolbenhubpipette abnehmen, ohne die (*click*)ECM abzulösen.
- Zum Waschen der (*click*)ECM vorsichtig 10 mL steriles Reinstwasser auftropfen und wieder absaugen, Waschschrift zwei weitere Male wiederholen.
- (*click*)ECM mithilfe eines sterilen Zellschabers vom Schalenboden ablösen und in ein entsprechend beschichtetes 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführen.
- (*click*)ECM bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur (RT) unter sterilen Bedingungen lagern.

4.1.3 Aufkonzentrierung isolierter (*click*)ECM

Nach der osmotischen Lyse, der Aufreinigung mit Reinstwasser und der Isolation liegt die (*click*)ECM im sogenannten nativen Zustand als ein stark in Wasser gequollener, zusammenhängender hydrogelartiger Film vor, der sich weder mit einer Kolbenhubpipette reproduzierbar transferieren noch reproduzierbar verarbeiten lässt. Um diese Problematik für die weiteren Versuche zu umgehen, wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um das durch die Quellung aufgenommene Wasser zunächst durch einen Aufkonzentrierungsschritt durch Mikrofiltration zu entfernen. Zur Aufkonzentrierung wurde die isolierte (*click*)ECM in einen sterilen sogenannten „Spin-Filter“ überführt. Dieser besteht aus einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit einem trichterförmigen Einsatz, der aus einer regenerierten Zellulosemembran besteht, die eine molekulare Ausschlussgrenze (engl. *molecular weight cut-off*, MWCO) von 10 kDa aufweist. Nachdem die (*click*)ECM in den Einsatz überführt wurde, wurde durch Zentrifugation das Wasser ausgeschleudert, während die (*click*)ECM-Biomoleküle durch die Membran im Einsatz zurückgehalten wurden. Nach der Zentrifugationszeit konnte die aufkonzentrierte (*click*)ECM dann aus dem Einsatz entnommen werden.

Durchführung:

- Die native (*click*)ECM in den membranbestückten Filtereinsatz eines sterilen Spin-Filters überführen.
- Zentrifugation bei 4.000 rpm für 90 Minuten.
- Rückgewinnung der aufkonzentrierten (*click*)ECM aus dem Membraneinsatz und Überführung in ein entsprechend beschriftetes steriles Gefäß.

4.1.4 Homogenisierung isolierter (*click*)ECM

Auch nach der Aufkonzentrierung liegt die (*click*)ECM noch als stark quervernetztes und dadurch zusammenhängendes hydrogelartiges Netzwerk vor, welches sich weder mit einer Kolbenhubpipette reproduzierbar transferieren noch reproduzierbar verarbeiten lässt. Um jedoch für die Versuche dieser Arbeit reproduzierbar und verlässlich definierte Mengen einsetzen zu können, war es notwendig, die aufkonzentrierte (*click*)ECM zunächst zu einer homogenen Suspension zu verarbeiten. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll entwickelt und etabliert, bei der die aufkonzentrierte (*click*)ECM durch einen mechanischen Krafteintrag fragmentiert und dadurch homogenisiert werden konnte. Hierfür wurde ein Kugelmühlen-Homogenisator mit passenden sogenannten „Lysis-Tubes“ verwendet. Die Röhrchen sind dabei mit kleinen Kügelchen gefüllt, die laut Hersteller aus 83 % aus Zirkoniumoxid (ZrO) und zu 17 % aus Ceriumoxid (CeO) bestehen und Durchmesser im Bereich von 1,4 mm - 1,6 mm aufweisen [165]. Um mit allen Matrices der drei Spender ein möglichst einheitliches Material zu generieren, wurde die (*click*)ECM vor der Homogenisierung gewogen und mit sterilem Reinstwasser auf eine definierte Masse von 150 mg/ZKS (\varnothing 145 cm) eingestellt. Durch den mechanischen Krafteintrag der Kügelchen wird die (*click*)ECM in kleine Fragmente zerteilt. Die (*click*)ECM-Konsistenz ändert sich dabei von einem eher festen Hydrogelagglomerat zu einer leicht viskosen, aber mit einer Direktverdrängerpipette einfach zu pipettierenden Suspension.

Durchführung:

- Aufkonzentrierte (*click*)ECM in ein steriles Lysis-Tube überführen und Röhrchen gut verschließen.
- Lysis-Tube in die Halterung des Kugelmühlen-Homogenisators einsetzen und verriegeln.
- Homogenisierungsprogramm programmieren: vier aufeinanderfolgende einminütige Intervalle getrennt voneinander durch jeweils ein dreißigsekündiges Abkühlintervall.
- Homogenisierung starten.

- Nach der Homogenisierung die entstandenen (*click*)ECM-Suspensionen in ein steriles und entsprechend beschriftetes Gefäß überführen.
- Die Lagerung erfolgt bis zur weiteren Verwendung bei RT.

4.1.4.1 Impedanzbasierte Fragmentgrößenanalyse homogener (*click*)ECM

Die durch die mechanische Homogenisierung der aufkonzentrierten (*click*)ECM resultierenden Fragmentgrößen wurden mithilfe eines Partikelanalysators bestimmt. Das Messprinzip ist bei dieser Analyse dasselbe wie das für die Zellzählung angewandte Verfahren (siehe auch **Kapitel 4.1.1**, Abschnitt „*Impedanzbasierte Zellzählung*“). Die für die Analyse der (*click*)ECM-Fragmente wurde eine Kapillare mit einem Messbereich von 2,3 µm – 60 µm verwendet. Der gesamte Größenbereich wurde für die Messung automatisch in 300 Messpunkte unterteilt. Aus der erhaltenen absoluten Häufigkeiten n_d kann mithilfe von **Formel 1** die relative Häufigkeit $A_n(d)$ berechnet werden:

$$A_n(d) = \frac{n_d}{\sum_{i=2.3 \mu m}^{60 \mu m} n_i}$$

Formel 1: Berechnung der relativen Häufigkeit $A_n(n_d)$.

Die kumulative relative Häufigkeit $A_{n,kum}$ konnte anschließend mithilfe von **Formel 2** von A_n berechnet werden:

$$A_{n,kum}(d) = \sum_{i=2.3 \mu m}^d A_n(i)$$

Formel 2: Berechnung der kumulativen relativen Häufigkeit $A_{n,kum}$.

Die Volumenverteilung $V_n(d)$ der (*click*)ECM-Fragmente wurde unter der Annahme mithilfe von **Formel 3** berechnet, dass es sich bei den Fragmenten um annähernd sphärische Partikel handelt:

$$V_n(d) = \frac{n_d \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^3}{\sum_{i=2.3 \mu m}^{60 \mu m} n_i \left(\frac{i}{2}\right)^3}$$

Formel 3: Berechnung der Volumenverteilung $V_n(d)$ aus der numerischen Häufigkeit.

Die kumulative Volumenverteilung $V_{n,kum}$ wurde anschließend mit **Formel 4** berechnet:

$$V_{n,cum}(d) = \sum_{i=2.3 \mu m}^d V_n(i)$$

Formel 4: Berechnung der kumulativen Volumenverteilung $V_{n,kum}$.

Aus der kumulativen Volumenverteilung $V_{n,kum}$ konnten ferner die d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Werte ermittelt werden. Der d_{10} -Wert entspricht hierbei dem Durchmesser, unter dem 10 % der Volumenverteilung liegen. Die d_{50} - und d_{90} -Werte sind analog definiert; daher stellt der d_{50} -Wert gleichzeitig auch den Median der Verteilung dar.

Durchführung:

- Vor der Messung die Kapillare mit der isotonen Elektrolytlösung spülen.
- 50 μ L der jeweiligen aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM mit 9,95 mL isotonem Messpuffer in einem Messgefäß verdünnen.
- Messgefäß unter der Kapillare platzieren und Messung starten.

4.1.4.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Proteine in der (*click*)ECM mit Fluorescamin

Die Bewertung der Homogenität der (*click*)ECM-Suspensionen nach der Homogenisierung im Kugelmühlen-Homogenisator erfolgte durch eine unspezifische Proteinfärbung mittels Fluorescamin und anschließender konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (engl. *confocal laser-scanning-microscopy*, cLSM)-Analyse (siehe auch **Kapitel 4.3.2**). Fluorescamin als selbst nicht fluoreszierendes Reagenz reagiert mit Aminosäuren, primären Aminen und Peptiden zu einem stabilen, stark fluoreszierenden Produkt, dessen Fluoreszenz bei λ_{ex} 234 nm angeregt und bei λ_{em} 480 nm detektiert werden kann [125].

Durchführung:

- Die aufkonzentrierte und homogenisierte (*click*)ECM auf gereinigte Objektträger aufbringen und vollständig aufdrehen lassen (100 μ L (*click*)ECM-Suspension/cm²).
- Fluorescamin-Stammlösung ansetzen (3 mg Fluorescamin in 1 mL Aceton lösen).
- Fluorescamin-Gebrauchslösung ansetzen (Fluorescamin-Stammlösung 1 : 9 mit Reinstwasser verdünnen).
- Proben mit Fluorescamin-Gebrauchslösung überschichten und 5 Minuten im Dunkeln bei RT inkubieren.
- Gefärbte Proben mit Reinstwasser waschen.

- Mit einem Tropfen wässrigen Eindeckmedium und einem Deckglas eindecken und unter dem cLSM auswerten.

4.1.4.3 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Azide in der aufkonzentrierten und homogenisierten *click*ECM mit Alexa Fluor® 488-Alkin

Die chemische Adressierbarkeit der über das MGE in die Glykanstrukturen der *click*ECM eingebrachten Azide wurde mit einem Alkin-funktionalen Fluorophor untersucht. In einer CuAAC (siehe auch **Kapitel 1.4**) wurden die *click*ECM-Azide mit einem Alkin-funktionalen Fluorophor konjugiert und damit fluoreszenzmarkiert. Die nicht modifizierte ECM diente für die anschließende fluoreszenzmikroskopische cLSM-Analyse als Kontrolle (siehe auch **Kapitel 4.3.2**). Für eine direkte Vergleichbarkeit erfolgte die cLSM-Auswertung mit identischen Mikroskopeinstellungen. Als zusätzliche Färbekontrolle wurde die Färbung ohne die Zugabe des Kupferkatalysators an Azid-funktionaler *click*ECM durchgeführt. Hierzu wurde die *Click-iT®-Cell Reaction Buffer-Kit*-Reaktionslösung entsprechend ohne die Kupferlösung angesetzt. Der Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifizierung der ECM via MGE kann in Mikroskopieschälchen mit einem Deckglasboden, an histologischen Dünnschnitten (siehe auch **Kapitel 1.3.7.2**) oder an Oberflächenbeschichtungen (siehe auch **Kapitel 4.4**) aus *click*ECM erfolgen.

Durchführung:

- Die *Click-iT®-Cell Reaction Buffer-Kit*-Reaktionslösung entsprechend der Herstellerangaben ansetzen. Für die Reaktionskontrolle auf die Kupferlösung verzichten.
- Den Alkin-funktionalen Fluorophor (Alexa Fluor® 488-Alkin, 2 mM in DMSO) im Verhältnis 1 : 1000 zugeben und vortexen.
- Die jeweilige Probe für die Färbung vorbereiten:
 - In Paraffin eingebettete *click*ECM: die Proben wie unter **Kapitel 4.3.1** beschrieben auf einen Glasobjektträger aufziehen und entparaffinieren.
 - In Mikroskopieschälchen mit Deckglasboden generierte *click*ECM: PBS⁻ abnehmen.
 - *click*ECM-Beschichtungen: (*click*)ECM-beschichtete Substrate in ein entsprechendes Gefäß einlegen.
- Die zu färbende Probe mit der Reaktionslösung überschichten und 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubieren.

- Anschließend die Lösung abnehmen und die Probe vorsichtig drei Mal gründlich mit PBS⁻ waschen.
- Für die cLSM-Analyse vorbereiten:
 - Histologische Dünnschnitte: wie unter **Kapitel 4.3.1** beschrieben mit einem Deckglas eindecken.
 - In Mikroskopieschälchen mit Deckglasboden: mit PBS⁻ bedecken, um die Probe vor dem Austrocknen zu schützen.
 - *click*ECM-Beschichtungen: Substrate mit einem Tropfen wässrigem Eindeckmittel und einem Deckglas eindecken.
- Unter dem cLSM auswerten (siehe auch **Kapitel 4.3.2**).

4.1.4.4 Immunhistochemischer Nachweis charakteristischer ECM-Proteine in der aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM

Für die Charakterisierung der biomolekularen Zusammensetzung der (*click*)ECM wurden fünf charakteristische Matrixproteine (Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin) mittels immunhistochemischer Färbetechniken nachgewiesen (siehe auch **Kapitel 1.3.7**). Für diese Technik werden Primärantikörper verwendet, die sich mit ihrem Paratop, d. h. der Antikörper-Bindungsstelle, gegen eine bestimmtes Epitop auf dem zu detektierenden Protein, d. h. der molekularen Zielregion auf dem Antigen, richten. Die molekulare Erkennung kommt durch die stereochemische Komplementarität von Epitop und Paratop zustande und basiert auf dem hochspezifischen Schlüssel-Schloss-Prinzip [125]. Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion wurde anschließend ein mit einem fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper zugegeben, der spezifisch an den Primärantikörper bindet und so die Position des Primärantikörpers und dementsprechend auch die des Zielmoleküls anzeigt [125].

Durchführung:

- Die jeweilige Probe für die Färbung vorbereiten:
 - In Mikroskopieschälchen mit Deckglasboden generierte *click*ECM: PBS⁻ abnehmen.
 - *click*ECM-Beschichtungen: Substrate in ein entsprechendes Gefäß einlegen.
- Fixierung: die Proben für 10 Minuten bei RT mit 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung überschichten und inkubieren.
- Permeabilisierung: die Proben für 15 Minuten bei RT mit Permeabilisierungslösung (0,2 % Saponin in PBS⁻) überschichten und inkubieren.
- Blocken unspezifischer Bindungsstellen: die Proben für 30 Minuten bei RT mit Blocklösung (3 % BSA + 0,1 % Triton X-100 in PBS⁻) überschichten und inkubieren.
- Überschichtung und Inkubation der Proben mit der Primärantikörperlösung (Antikörper im Verhältnis 1 : 100 mit Blocklösung verdünnt) für 1 Stunde bei RT.
- Die Proben dreimal mit PBS⁻ waschen.
- Überschichtung und Inkubation der Proben mit der fluorophormarkierten Sekundärantikörperlösung (Sekundärantikörper im Verhältnis 1 : 200 in Blocklösung verdünnt) 1 Stunde im Dunkeln bei RT.
- Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T (PBS⁻ + 0,1 % Tween[®] 20) Proben noch einmal mit Reinstwasser waschen.
 - In Mikroskopieschälchen mit Deckglasboden generierte *click*ECM: mit PBS⁻ überschichten.
 - *click*ECM-Beschichtungen: mit einem Tropfen wässrigem Eindeckmittel und einem Deckglas eindecken und unter dem cLSM analysieren.

Für diesen Versuch wurden zudem passende Isotypkontrollen parallel analysiert, um die Spezifität der Primärantikörper zu bestätigen. Ferner wurden Sekundärantikörperkontrollen mitgeführt, um eine unspezifische Bindung oder Adsorption der Moleküle an die (*click*)ECM oder die Substrate ausschließen zu können.

4.1.5 Lyophilisation der (*click*)ECM

Für manche Versuche war es notwendig, die aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM-Suspensionen zu lyophilisieren. Bei dieser auf Sublimation, d. h. dem Übergang von gefrorenem Wasser in die Gasphase unterhalb des Gefrierpunkts bei sehr niedrigen Drücken, werden die Proben schonend getrocknet [166].

Durchführung:

- Die Gefriertrocknungsanlage und die Vakuumpumpen einschalten und vorkühlen lassen.
- Die benötigten Volumina an (*click*)ECM-Suspensionen mithilfe einer Kolbenhubpipette in ein Glasgefäß überführen.
- Die Öffnung des Glasgefäßes mit Laborfilm verschließen und mithilfe einer Kanüle kleine Löcher in den gespannten Film stechen.
- Die Glasgefäße unter den entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen (Kälteschutzhandschuh, Schutzbrille, Reagenzglasklammer aus Holz) schräg in flüssigen Stickstoff eintauchen und vorsichtig drehen, sodass die Suspensionen möglichst flächig an die Wandungen anfrieren.
- Anschließend die Gefäße möglichst rasch in den Innenraum der Gefriertrocknungsanlage verbringen, Vakuum anlegen und die Gefriertrocknung starten.
- Je nach zu trocknender Menge kann der Prozess i. d. R. nach 12-24 Stunden beendet, die Gefäße aus dem Gerät entnommen und verschlossen werden.

Sollte der Prozess zur Bestimmung der Trockenmasse durchgeführt werden, so wird vor Beginn der Gefriertrocknung das Taragewicht des Glasgefäßes sowie das Gewicht des Glasgefäßes mit der enthaltenen (*click*)ECM-Suspension vor und nach der Lyophilisation gravimetrisch bestimmt (jeweils ohne den Laborfilm).

4.1.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) diene in der vorliegenden Arbeit dem Zweck, die (*click*)ECM-Proteine elektrophoretisch aufzutrennen, um anschließend die entstandenen charakteristischen Bandenmuster vergleichen zu können (siehe auch **Kapitel 1.3.7**) [125].

Im Zuge der Probenvorbereitung wurden die aufkonzentrierte und homogenisierte (*click*)ECM-Aliquots zunächst lyophilisiert (siehe auch **Kapitel 4.1.5**). Anschließend wurden die

mit Reinstwasser versetzen gefriergetrockneten (*click*)ECM-Aliquots mithilfe einer Ultraschallsonotrode behandelt, um die unlöslichen Fragmente noch weiter zu zerteilen und dem SDS-haltigen Probenpuffer so eine möglichst große Kontaktfläche auf den (*click*)ECM-Proteinen zu bieten. Bei der Ultraschallbehandlung werden über die metallische Ultraschallsonde Ultraschallwellen im Frequenzbereich von 10 – 40 kHz in die Probe eingebracht, die durch die starken Druckänderungen Kavitäten im Flüssigvolumen erzeugen, die ab einer bestimmten Größe kollabieren und so zu sehr starken Scherkräften führen, wodurch die (*click*)ECM-Fragmente noch weiter zerrissen werden [125]. Um dabei eine Schädigung der Proben durch die entstehende Wärme zu verhindern, wurden die Proben während des Prozesses mithilfe eines Eisbads gekühlt. Für die Detektion der aufgetrennten Proteine können diese nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung durch eine unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt und die Bandenmuster so sichtbar gemacht werden [125].

Ultraschallbehandlung

Durchführung:

- 40 µg gefriergetrocknete (*click*)ECM in ein Glasgefäß überführen.
- 40 µL Reinstwasser zugeben.
- Das Glasgefäß in einem Eisbad stabil fixieren und die Ultraschallsonde so befestigen, dass sie in die Flüssigkeit eintaucht, dabei die Glaswandung aber an keiner Stelle berührt.
- Bei einer Amplitude von 60 % für 6 Minuten (Beschallungszeit: 10 Sekunden, gefolgt von 20 Sekunden Pause) beschallen (Gehörschutz!).

SDS-PAGE

Durchführung:

- Als Referenz Kollagen Typ I ebenfalls mit Reinstwasser verdünnen, um Lösungen mit Kollagenkonzentrationen von 2 µg/40 µL, 6 µg/40 µL und 10 µg/40 µL herzustellen.
- Die beschallten Proben sowie die angesetzten Standards im Verhältnis 1 : 1 mit Probenpuffer auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/mL ((*click*)ECM), bzw. 0,025 mg/mL, 0,075 mg/mL und 0,125 mg/mL (Kollagen Typ I-Standards) verdünnen.
- Proben- und Referenzproteine bei 95 °C für 5 Minuten in einem Thermoschüttler denaturieren.

- Für die Elektrophorese 5 μ L des Molekulargewichtsmarkers zusammen mit je 40 μ L der jeweiligen Proben und Kollagenstandards auf ein auftragen.
- Den Laufpuffer durch 10-faches Verdünnen der Stocklösung in Wasser ansetzen.
- Das Tris-Glycin-Polyacrylamid-Gradientengel (8 – 16 %) in die Laufkammer einstecken und diese mit Puffer befüllen.
- Die Geltaschen durch Auf- und Abpipettieren des Puffers spülen.
- Pro Tasche entweder 5 μ L des vorgefärbten Molekulargewichtsmarkers oder 40 μ L der jeweiligen (*click*)ECM-Probe bzw. der Kollagen Typ I-Standards laden.
- Die elektrophoretische Trennung durch Anlegen von 225 V für 45 – 60 Minuten starten.

Coomassie-Brilliant-Blau Imperial™ Protein-Färbung

- Nach Abschluss der Elektrophorese das Gel 20 Minuten lang in Reinstwasser äquilibrieren.
- Anschließend das Gel in der Coomassie-Brilliant-Blau *Imperial™* Protein-Färbelösung für 1,5 Stunden auf einem Orbitalschüttler inkubieren.
- Um nach der Färbung überschüssige Farbstoffmoleküle zu entfernen, die Gele ü. N. in Reinstwasser auf dem Orbitalschüttler waschen.
- Zur Auswertung der Bandenmuster die gefärbten Gele in eine transparente und möglichst glatte Aktenhülle legen und mit einem herkömmlichen Scanner einscannen.

4.2 Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM

Zur Abschätzung der Azidkonzentration in der *click*ECM wurden die Azide innerhalb der *click*ECM mit den Alkinen eines Alkin-funktionalen Fluorophors (Alexa Fluor® 488-Alkin) über eine kupferkatalysierte Huisgen 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition (siehe auch **Kapitel 1.4**) kovalent konjugiert. Durch die Abtrennung der unlöslichen *click*ECM-Fragmente durch Ultrazentrifugation wird der Anteil an Alkin-Fluorophoren mit der unlöslichen *click*ECM abgeschieden, der den spezifisch gebundenen sowie den unspezifisch an den Biomolekülen adsorbierten Fluorophormolekülen entspricht. Die daraus resultierende Abnahme der Fluorophorkonzentration in der Färbelösung sollte demnach sowohl mit den kovalent gebundenen Molekülen als auch mit den unspezifisch physikalisch gebundenen Molekülen korrelieren. Um für den Anteil an unspezifisch adsorbierten Molekülen zu korrigieren, wurde parallel eine unmodifizierte ECM mit den Fluorophorlösungen inkubiert und diente folglich als Kontrolle. Die verwendete Katalysatorlösung (*Click-iT®-Cell Reaction Buffer Kit*), die die

Komponenten CuSO_4 und Na-L-Ascorbat enthielt, wurde für die Verdünnung der Fluorophorlösung genutzt, um verschiedene Fluorophorkonzentrationen in den Färbe- und Kalibrationslösungen zu realisieren. Ferner diente die Katalysatorlösung als Blindwert (engl. *blank*).

Im ersten Schritt des Versuchs wurden die Trockenmassen der verwendeten (*click*)ECM-Suspensionen vor und nach der Lyophilisation mittels gravimetrischer Analyse bestimmt (siehe auch **Kapitel 4.1.5**). Anschließend wurden (*click*)ECM-Aliquots in ein Ultrazentrifugationsröhrchen überführt, die einer Trockenmasse von 0,5 g (*click*)ECM entsprachen. Im nächsten Schritt wurde der Alkin-funktionale Fluorophor in der Katalysatorlösung verdünnt, um Fluorophorlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,03 μM , 0,02 μM , 0,01 μM , 0,005 μM , 0,00025 μM und 0,00125 μM) herzustellen. 500 μL dieser Lösungen wurden dann zu jedem (*click*)ECM-Aliquot hinzugefügt und 30 Minuten im Dunkeln bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die unlöslichen (*click*)ECM-Fragmente durch Ultrazentrifugation für 1 Stunde bei 55.000 U/min von der Lösung getrennt. Die Analyse der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Überstände erfolgte anschließend mit einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader. Zur Umrechnung der Fluoreszenzintensität in die Fluorophorkonzentration diente eine Standardreihe mit Fluorophorlösungen bekannter Konzentration. Das Vorgehen im Versuch ist in **Abbildung 9** schematisch dargestellt.

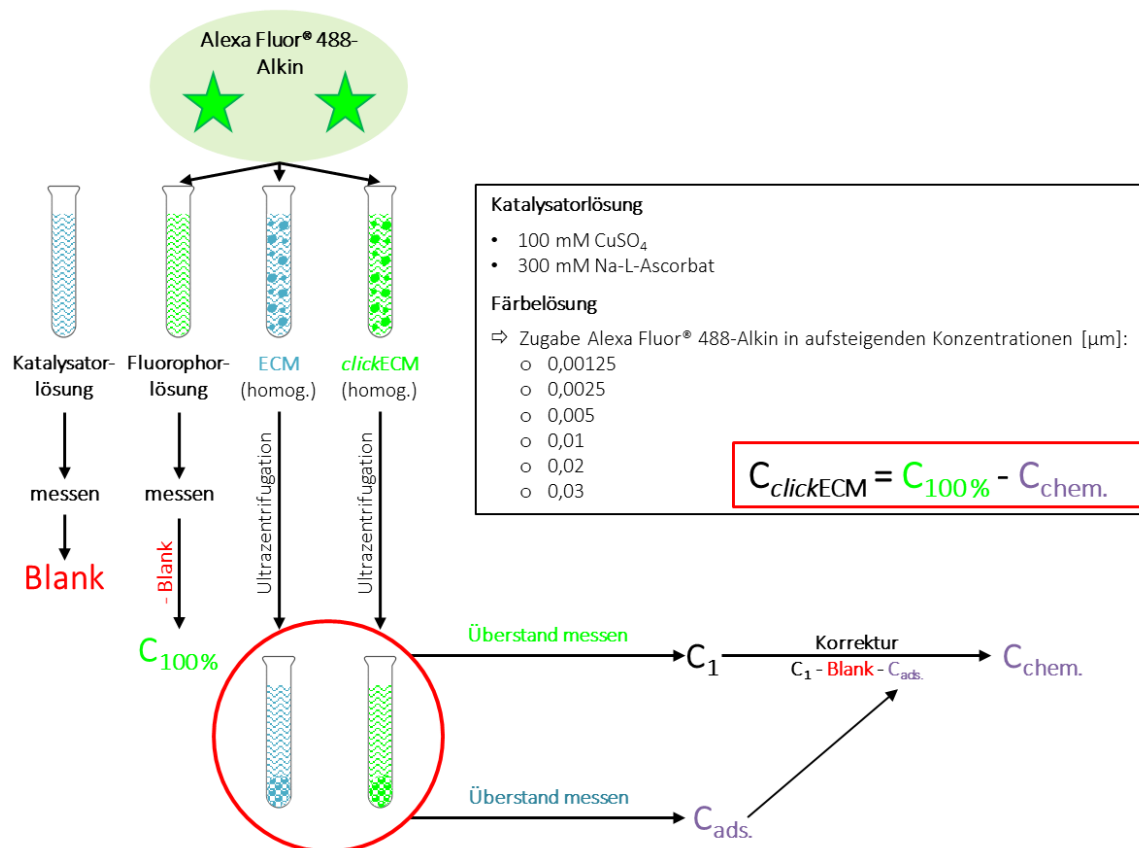


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der *clickECM*. Durch die Inkubation der *clickECM* mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin werden die enthaltenen Azide in einem äquimolaren Verhältnis im Zuge der ablaufenden CuAAC mit dem Fluorophor konjugiert. Durch Ultrazentrifugation wird die konjugierte *clickECM* anschließend abgetrennt. Der dabei entstehende Überstand wird auf dessen Fluoreszenzintensität hin untersucht. Nicht modifizierte ECM dient als Kontrolle und wird auf die gleiche Weise behandelt. Fluorophormoleküle können hier nur durch unspezifische Adsorption anhaften. Die Fluoreszenzintensität des Überstandes der konjugierten *clickECM* wird im Zuge der Auswertung um diese unspezifisch aus dem ECM-Überstand ausgetragene Fluorophorkonzentration korrigiert. Anschließend kann die korrigierte Fluoreszenzintensität der *clickECM* von der Fluoreszenzintensität der für die Färbung verwendeten Fluorophorlösung abgezogen werden. Die dabei entstehende Differenz kann abschließend anhand einer erstellten Kalibrationsgerade mit Alkin-Fluorophorlösungen bekannter Konzentrationsstufen in die Fluorophorkonzentration umgerechnet werden, die mit der *clickECM* bei der Ultrazentrifugation abgetrennt wurde. Aufgrund der äquimolaren Reaktion der Azidgruppen mit den Alkingruppen entspricht dieser Wert gleichzeitig der Azidkonzentration in der *clickECM*.

Durchführung:

- Die Trockenmasse der aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM-Suspensionen vor und nach der Lyophilisation (siehe auch **Kapitel 4.1.5**) gravimetrisch bestimmen.
- (*click*)ECM-Aliquots entsprechend ihrer Trockenmasse mit einer Direktverdrängerpipette in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführen, sodass die überführte Menge einer Trockenmasse von 0,5 mg entspricht (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Übersicht über die für die Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM eingesetzten (*click*)ECM-Volumina.

Donor, ECM		Trockenmasse [mg/mL (<i>click</i>)ECM-Suspension]	Volumen (<i>click</i>)ECM- Suspension [μ L] (\cong 0,5 mg Trockenmasse)
Donor 2	ECM	6,67	75
	<i>click</i> ECM	3,33	150
Donor 3	ECM	9,33	54
	<i>click</i> ECM	10,67	47

- Die *Click-iT[®]-Cell Reaction Buffer-Kit*-Katalysatorlösung entsprechend der Herstellerangaben ansetzen.
- Aus der Fluorophor-Stammlösung (2 mM/ DMSO) eine Fluorophor-Vorverdünnung (1 μ M/ Katalysatorlösung) ansetzen.
- Aus der Vorverdünnung (1 μ M/ Katalysatorlösung) die Färbelösungen (unterstrichen) und Kalibrationslösungen mit Katalysatorlösung ansetzen (0 μ M (*Blank*), 0,04 μ M, 0,035 μ M, 0,03 μ M, 0,025 μ M, 0,02 μ M, 0,015 μ M, 0,01 μ M, 0,005 μ M, 0,0025 μ M, 0,00125 μ M, 0,000625 μ M).
- Die (*click*)ECM-Aliquots in den Ultrazentrifugenröhrchen mit jeweils 500 μ L der jeweiligen Färbelösung und 30 Minuten auf dem Schüttler im Dunkeln bei RT inkubieren.
- Anschließend 1 Stunde bei 55.000 rpm bei RT in der Ultrazentrifuge abzentrifugieren.
- 400 μ L der Überstände abnehmen und bis zur Fluoreszenzmessung lichtgeschützt in einem 0,5 mL-Reaktionsgefäß aufbewahren.
- Je 100 μ L der jeweiligen Lösung in Triplikaten in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Well-Platte überführen.

- Fluoreszenzintensität mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroplatten-Readers mit den nachfolgenden Parametern analysieren:
 - Schütteln: 10 Sekunden, Amplitude: 1, Modus: linear
 - Wellenlänge $\lambda_{\text{Anregung}}$: 490 nm, $\lambda_{\text{Emission}}$: 525 nm
 - Verstärkung: 100
 - Modus: von oben
 - Z-Position: 20.000 μm
 - Mehrfachmessungen pro Well (gefülltes Quadrat): 3 x 3, 750 μm
 - Integrationszeit: 20 μs
- Nach Abziehen des Blindwertes (Katalysatorlösung) von allen Messpunkten jeweils den Mittelwert der Mehrfachmessungen pro Well und der Replikate bilden und aus den korrigierten Messwerten der Standards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser Funktion die Fluorophorkonzentrationen der Proben berechnen.

4.3 Biochemische Charakterisierung der (*click*)ECM

Nachfolgend sind alle Analysemethoden beschrieben, die zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften und der biomolekularen Zusammensetzung der (*click*)ECM in dieser Arbeit angewandt wurden (siehe auch **Kapitel 1.3.7**).

4.3.1 Histochemische Untersuchung der (*click*)ECM

Um einen qualitativen Überblick über die biomolekulare Zusammensetzung der (*click*)ECM sowie der Verteilung, Anordnung der Biomoleküle und der Architektur des Netzwerks zu erhalten, wurden die histochemischen Multichrom-Färbungen Masson-Goldner-Trichrom, eine modifizierte Movat-Pentachrom und die Ladewig-Färbung an (*click*)ECM-Dünnschnittpräparaten durchgeführt. Des Weiteren wurden die Glykosaminoglykane innerhalb der (*click*)ECM mittels Alcianblau kombiniert mit der Periodsäure-Schiff-Reaktion (engl. *periodic acid-Schiff*, PAS) und die Kollagene mittels Pikro-Siriusrot-Färbung selektiv angefärbt. Die histochemische Untersuchung der (*click*)ECM gliederte sich dabei stets in die nachfolgend beschriebenen fünf Arbeitsschritte:

- 1) Fixierung
- 2) Einbettung in Paraffin
- 3) Anfertigung von Dünnschnitten
- 4) Entparaffinierung
- 5) Färbung
- 6) Mikroskopische Auswertung (Licht-, Fluoreszenz-, Polarisationsmikroskopie)

Fixierung und Einbettung der Proben in Paraffin

Die Fixierung einer biologischen Probe dient in erster Regel dazu, die Autolyse zu verhindern und das Probenmaterial in einem möglichst naturgetreuen Zustand zu konservieren [23, 142, 167].

Durchführung:

- Eine kleine Menge Fixierlösung auf den Boden des Fixiergefäßes aufgeben.
- Das Probenmaterial sauber und ohne Medium in das vorbereitete Gefäß legen und mit Fixierlösung bedecken.
- In der Zwischenzeit Einbettkassetten entsprechend mit Bleistift beschriften.
- Filterpapier in die Kassette einlegen.
- Nach Ablauf der Fixierzeit ((*click*)ECM: mind. 5 Stunden, juvenile Haut: ü. N.) Fixierlösung vorsichtig abnehmen und sachgerecht entsorgen.
- Probe mit einer Pinzette in die vorbereitete Kassette überführen und möglichst glatt auf dem Filterpapier ablegen, Kassettendeckel fest verschließen.
- Die Einbettkassetten in den Einbettautomaten einlegen und das Programm starten. Die Proben werden hierbei automatisch mithilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 96 %), Isopropanol (100 %), einer 1 : 1-Mischung aus 100 % Isopropanol und Xylol sowie reinem Xylol entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Blocken in Paraffin

Um für die histochemische Untersuchung gleichmäßige und dünne Schnitte anfertigen zu können, wurden die entsprechenden Proben mit Paraffin durchtränkt. Auf diese Weise sind die Proben nahezu unbegrenzt haltbar und lassen sich sehr einfach und gleichmäßig in Schnittdicken zwischen 2 und 15 µm schneiden [142].

Durchführung:

- Die Einbettkassetten aus dem Einbettautomat entnehmen und die Kassette öffnen.
- Eine vorgewärmte Gießform mit einer kleinen Menge flüssigem Paraffin befüllen und anschließend die Probenstücke in der erforderlichen Ausrichtung und Position in das langsam erkaltende Paraffin rasch einsetzen.
- Das beschriftete Kassettenteil so auf die Gießform legen, dass die Beschriftung lesbar ist und mit Paraffin bedecken, bis das Kassettengitter vollständig bedeckt ist.
- Den Block bei RT abkühlen lassen, anschließend im Kühlschrank noch mind. 1 Stunde weiter kühlen, bevor der kalte Block vorsichtig aus der Form herausgelöst wird.

Anfertigung von Paraffindünnschnitten

Besonders bei der lichtmikroskopischen Analyse der histochemischen Färbungen können mit optisch transparenten Proben qualitativ hochwertige mikroskopische Aufnahmen erzielt werden. Aus diesem Grund werden mithilfe eines Mikrotoms aus den in Paraffin eingebetteten Proben histologische Dünnschnitte angefertigt [142].

Durchführung:

- Blöcke auf einer Kälteplatte vorkühlen.
- Frische Blöcke zunächst mit absteigenden Schnittdicken trimmen (30 μm , 15 μm , 5 μm) danach Schnitte in gewünschter Stärke (3 μm) anfertigen.
- Die entstehenden Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel und einer Pinzette aufnehmen, auf dem Streckbad ablegen.
- Von dort auf einen entsprechend beschrifteten Objektträger aufziehen.
- Objektträger schräg auf einem Papiertuch abstellen, damit anhaftendes Wasser ablaufen kann und später zur vollständigen Trocknung auf eine Wärmeplatte ablegen.

Entparaffinieren

Um die Anfärbung der Biomoleküle innerhalb der angefertigten Dünnschnittpräparate möglich zu machen, muss das Paraffin aus den Schnitten entfernt werden und die Schnitte an die bei den Färbungen verwendeten wässrigen oder alkoholischen Lösungen angepasst werden.

Durchführung:

- Die Objektträger mit den aufgezogenen Paraffindünnschnitten der (*click*)ECM in einen Färberahmen einsetzen nacheinander in den mit den Lösungen der absteigenden Ethanolreihe gefüllten Küvetten inkubieren. Bei welcher Lösung die Entparaffinierung beendet wird, hängt davon ab, in welchem Medium der jeweils erste Färbeschritt der angewandten Protokolle beginnt.
- Xylol-Ersatzmedium I (10 Minuten)
- Xylol-Ersatzmedium II (3 Minuten)
- 96 % Ethanol I (2 Minuten)
- 96 % Ethanol II (2 Minuten)
- 70 % Ethanol (2 Minuten)
- 50 % Ethanol (2 Minuten)
- Destilliertes Wasser (2 Minuten)

Modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung

Die Movat-Pentachromfärbung wurde nach den Vorgaben von Olah *et al.* [168] durchgeführt und dabei leicht modifiziert. Da es sich bei den Proben um die dezellularisierte (*click*)ECM handelte, wurde auf die Kernfärbung nach Weigert verzichtet. Kollagene werden bei dieser Färbetechnik leuchtend gelb, saure GAGs hellblau dargestellt.

Durchführung:

- Alcianblau-Lösung ansetzen: 1 g Alcianblau 8GX in 100 mL destilliertem Wasser und 1 mL Eisessig lösen.
- Brilliant-Crocein-Säurefuchsin-Lösung ansetzen:
 - Brilliant-Crocein-Lösung: 0,1 g Brilliant Crocein in 99,5 mL destilliertem Wasser und 0,5 mL Eisessig lösen.
 - Säurefuchsin-Lösung: 0,1 g Säurefuchsin in 99,5 mL destilliertem Wasser und 0,5 mL Eisessig lösen.
 - Gebrauchslösung: 8 Teile Brilliant-Crocein-Lösung mit 2 Teilen Säurefuchsin-Lösung vermischen.
- Safran du Gâtinais-Lösung ansetzen: 6 g Safran du Gâtinais mit 100 mL Ethanol (absolut) vermischen und luftdicht verschlossen für 48 Stunden bei 50 °C im Wärmeschrank extrahieren.

- Alkalischer Alkohol ansetzen: 10 mL Ammoniaklösung auf 100 mL mit 96 % Ethanol auffüllen.
- Phosphorwolframsäure auf 5 % (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnen.
- Die Entparaffinierung und Bewässerung wurden bis zum destillierten Wasser wie oben beschrieben durchgeführt.
- Färbeschritte:
 - Färbung in 1 % Alcianblau (12 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (5 Minuten)
 - Differenzierung in alkalischem Alkohol (60 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (10 Minuten)
 - Färbung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin (10 Minuten)
 - Differenzierung mit 0,5 % Essigsäure (30 Sekunden)
 - Beizen in 5 % Phosphorwolframsäure (20 Minuten)
 - Differenzieren in 1 % Essigsäure (2 Minuten)
 - Spülen mit Ethanol absolut (15 Minuten)
 - Färben mit Safran du Gâtinais (60 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (6 Minuten)
 - Entwässern mit 100 % Isopropanol (10 Minuten)
 - Eindecken mit Isomount und einem Deckglas

Masson-Goldner-Trichrom-Färbung mit Anilinblau

Die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung wurde mithilfe des Färbekits der Firma Morphisto und entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Wie nachfolgend beschrieben, wurde anstelle der Lichtgrün-Färbung eine Anilinblau-Färbung durchgeführt. Da es sich bei den Proben um die dezellularisierte (*click*)ECM handelte, wurde auf die Kernfärbung nach Weigert verzichtet. Kollagene werden bei dieser Färbetechnik blau dargestellt.

Durchführung:

- Die Entparaffinierung und Bewässerung wurden bis zum destillierten Wasser wie oben beschrieben durchgeführt.
- Färbeschritte:
 - Färben mit Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin (4 Minuten)
 - Differenzieren in 1 % Essigsäure (0,5 Minuten)
 - Beizen und Färben mit Phosphormolybdänsäure-Orange G (5 Minuten)
 - Differenzieren in 1 % Essigsäure (30 Sekunden)
 - Färben mit Anilinblau (6 Minuten)
 - Spülen mit 1 % Essigsäure (5 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (1 Minute)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit 100 % Isopropanol (2 Minuten)
 - Eindecken mit Isomount und einem Deckglas

Ladewig-Färbung

Die Ladewig-Färbung wurde mithilfe des Färbekits der Firma Morphisto und entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die Vorgaben wurden hierbei wie nachfolgend beschrieben z. T. leicht modifiziert. Da es sich bei den Proben um die dezellularisierte (*click*)ECM handelte, wurde auf die Kernfärbung nach Weigert verzichtet. Kollagene werden bei dieser Färbetechnik lila/ violett und Glykokonjugate blau dargestellt.

Durchführung:

- Die Entparaffinierung und Bewässerung wurden bis zum destillierten Wasser wie oben beschrieben durchgeführt.
- Färbeschritte:
 - Beizen in 1 % Phosphorwolframsäure (5 Minuten)
 - Spülen in destilliertem Wasser (0,5 Minuten)
 - Färben in Ladewig-Lösung (4 Minuten)
 - Spülen in destilliertem Wasser (30 Sekunden)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit 100 % Isopropanol (2 Minuten)
 - Eindecken mit Isomount und einem Deckglas

Alcianblau kombiniert mit der Periodsäure-Schiff-Reaktion (engl. periodic acid-Schiff, PAS)

Die Alcianblau-PAS-Färbung wurde mithilfe des Färbekits der Firma Morphisto und entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Da es sich bei den Proben um die dezellularisierte (*click*)ECM handelte, wurde auf die Kernfärbung nach Gill verzichtet. Glykoproteine und Proteoglykane werden bei dieser Färbetechnik lila/ violett dargestellt.

Durchführung:

- Die Entparaffinierung und Bewässerung wurden bis zum destillierten Wasser wie oben beschrieben durchgeführt.
- Färbeschritte:
 - Färben mit 1 % Alcianblau (pH 2,5) (5 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
 - Spülen in destilliertem Wasser (10 Sekunden)
 - Färben/ Oxidieren mit 1 % Periodsäure (20 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
 - Spülen in destilliertem Wasser (10 Sekunden)
 - Färben mit dem Schiffschenschen Reagenz (20 Minuten)
 - Spülen in fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
 - Spülen in destilliertem Wasser (10 Sekunden)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)

- Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
- Entwässern mit 100 % Isopropanol (2 Minuten)
- Eindecken mit Isomount und einem Deckglas

Pikro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler

Für die Pikro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler [169] wurde zunächst die Pikro-Siriusrot-Färbelösung angesetzt. Bei dieser Färbetechnik werden Kollagene leuchtend rot dargestellt.

Durchführung:

- 0,1 g Siriusrot F3B in 100 mL gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung lösen.

Da es sich bei den Proben um die dezellularisierte (*click*)ECM handelte, wurde auf die Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin nach Weigert verzichtet. Im Hellfeld erscheinen Kollagene leuchtend rot; im polarisierten Licht hingegen grün/ blau oder gelb/ rot.

Durchführung:

- Die Entparaffinierung und Bewässerung wurden bis zum destillierten Wasser wie oben beschrieben durchgeführt.
- Färbeschritte:
 - Färben mit der Pikro-Siriusrot-Lösung (60 Minuten)
 - Spülen mit 30 % Essigsäure (10 Sekunden)
 - Spülen mit 30 % Essigsäure (10 Sekunden)
 - Differenzieren in 5 % Phosphorwolframsäure (2 Minuten)
 - Spülen mit 1 % Essigsäure (5 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit Ethanol absolut (2 Minuten)
 - Entwässern mit 100 % Isopropanol (2 Minuten)
 - Eindecken mit Isomount und einem Deckglas

4.3.2 Mikroskopische Techniken

Für die mikroskopische Analyse der Versuche in der vorliegenden Arbeit kamen mehrere Mikroskopietechniken zum Einsatz.

Lichtmikroskopie

Bei der Lichtmikroskopie wird ein Lichtstrahl auf die Probe gerichtet. Beim Durchtritt der Lichtwellen kommt es je nach Beschaffenheit und Eigenschaften der Probe lokal zur Absorption bestimmter Wellenlängenbereiche des Lichts, wodurch auf der Kamera ein entsprechendes Bild entsteht [142].

Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast

Bei der Lichtmikroskopie mit Phasenkontrast können transparente Objekte, die kaum Licht absorbieren und damit im Hellfeld nahezu unsichtbar sind, detailliert und kontrastreich dargestellt werden. Im Mikroskopaufbau wird dabei eine Ringblende in den Lichtweg eingebaut, sodass die Phasenverschiebung durch das Präparat in einen Bildkontrast umgewandelt werden kann [142]. Diese Technik wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit bspw. zur mikroskopischen Überprüfung der Zellen während der *In-vitro*-Kultur, dem Lysefortschritts oder der Untersuchung der Reaktionslösungen im Zuge der kolorimetrischen Protein-Assays angewandt.

Polarisationsmikroskopie

Bei der Polarisationsmikroskopie werden doppelbrechende Eigenschaften von Molekülen für die Bildgenerierung ausgenutzt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik für die Detektion von Kollagen in der (*click*)ECM verwendet. Anders als bei einem herkömmlichen Lichtmikroskop wird die Probe bei der Polarisationsmikroskopie mit polarisiertem Licht beleuchtet, d. h. die Wellen des Lichts passieren zunächst ein Gitter (den sogenannten Polarisator), das nur Lichtwellen durchlässt, die parallel zum Polarisator orientiert sind. Nachdem das Licht die Probe durchdrungen hat, wird es im Lichtweg durch einen zweiten Polarisationsfilter (der sogenannte Analysator) geleitet, der gegenüber dem Polarisator um 90° gedreht ist. Dies bedeutet, Licht, dessen Schwingungsrichtung durch die Probe nicht verändert wurde, wird am Analysator abgeblockt; das Bild auf der Kamera erscheint folglich schwarz. Verändert die Probe durch ihre doppelbrechenden oder optisch anisotropen Eigenschaften die Schwingungsebene, kommt es nicht länger zur vollständigen Auslöschung, sodass ein Teil des Lichtes den Analysator passiert und auf der Kamera entsprechend ein Bild entsteht.

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Laser-Scanning-Mikroskopie (engl. *confocal laser-scanning-microscopy*, cLSM) ist die am häufigsten in dieser Arbeit angewandte fluoreszenzmikroskopische Technik, die bspw. für die Untersuchung der Immunfluoreszenzfärbungen oder dem Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifikation der *clickECM* durch das MGE genutzt wurde. Anders als bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie wird die Probe bei dieser Technik mithilfe eines fokussierten Laserstrahls als Lichtquelle punktuell abgerastert. Die bei der Anregung entstehende lokale Fluoreszenzintensität wird mithilfe eines Scanners detektiert und digital in ein Bild zusammengesetzt [142]. Durch die im Lichtweg vorhandene Lochblende (engl. *pinhole*) werden Fluoreszenzsignale, welche nicht aus der Fokusebene stammen, abgehalten. Auf diese Weise ist es möglich, die Probe in z-Richtung in sogenannte optische Scheibchen zu zerlegen (z-Stapelaufnahme), die später durch den Computer in eine dreidimensionale Projektion umgerechnet werden können. Die gewonnenen 3D-Daten können auch mithilfe einer sogenannten Maximumintensitätsprojektion (MIP) in eine 2D-Aufnahme umgerechnet werden, indem entlang der z-Richtung jeweils der Datenpunkt mit der maximalen Intensität ausgewählt und zu einer neuen Aufnahme zusammengesetzt wird.

Differentialinterferenzkontrastmikroskopie

Bei dieser Mikroskopietechnik wird ein Bild basierend auf den Brechungsindex-Unterschieden der Probe generiert. Der Lichtstrahl wird hierbei vor dem Auftreffen auf die Probe mithilfe eines Prismas in zwei Teilstrahlen zerlegt. Der Bildkontrast entsteht durch die Interferenz der beiden Teilstrahlen, die unterschiedliche optische Weglängen auf ihrem Weg durch die Probe oder die Probenumgebung durchlaufen haben, bevor sie mit einem weiteren Prisma vor dem Detektor wieder vereint werden. Solche Weglängenunterschiede oder Interferenzen können durch Unterschiede im Brechungsindex oder durch unterschiedliche Objektdicken entstehen. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt, um bei der Azid-Detektion an *clickECM*-Dünnschnitten die korrekte Fokusebene sicherzustellen.

Rasterelektronenmikroskopie

Wie bereits in **Kapitel 1.3.7** ausführlicher erläutert, wird bei der hochauflösenden Rasterelektronenmikroskopie (Vergrößerung bis zu 100.000-fach), ähnlich wie bei der cLSM, ein Elektronenstrahl zeilenförmig über die Probe gerastert. Zur Bildgenerierung werden die Wechselwirkungssignale der Strahlelektronen mit der Probenoberfläche synchron detektiert. Im Computer werden die detektierten Wechselwirkungseffekte anschließend in eine Aufnahme der Probe umgerechnet [142]. Diese Technik kam in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der (*click*)ECM-Beschichtungen zum Einsatz.

4.3.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts der (*click*)ECM

Für die Quantifizierung des Gesamtproteingehalts wurden in der vorliegenden Arbeit der kommerziell erhältliche Bradford-Assay (*Coomassie Plus-Assay-Kit* von Thermo Fisher) sowie der BCA-Assay durchgeführt. Ferner wurde der Proteingehalt anhand des durch Elementaranalyse ermittelten Stickstoffgehalts berechnet.

Um als Ausgangsmaterial für alle drei Bestimmungsmethoden lyophilisierte (*click*)ECM (siehe auch **Kapitel 4.1.5**) verwenden zu können, wurden für die beiden kolorimetrischen Assays zunächst 100 µL der aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM gefriergetrocknet und die trockenen Proben mit 1 mL Wasser versetzt. Um die unlösliche (*click*)ECM in möglichst kleine Fragmente zu zerteilen, wurden die Suspensionen mithilfe einer Ultraschallsonotrode bei einer Amplitude von 60 % für 6 Minuten (Beschallungszeit: 10 Sekunden, gefolgt von einer Pause von 20 Sekunden) beschallt (siehe auch **Kapitel 4.1.6**). Um eine Erhitzung der Proben zu vermeiden, wurden diese während des Prozesses mithilfe eines Eisbads gekühlt.

4.3.3.1 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay wurde an zuvor mit Ultraschall fragmentierten (*click*)ECM-Proben (siehe auch **Kapitel 4.1.6**) mit dem *Coomassie Plus-Assay-Kit* von Thermo Fisher nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Durchführung:

- Die Bradford-Arbeitslösung durch Verdünnen der 5X-Stocklösung mit Reinstwasser herstellen.
- In die Vertiefungen einer 96-Well-Platte 250 μL dieser Arbeitslösung vorlegen.
- 5 μL der Proben pro Well (insgesamt je vier Wells) oder 5 μL des Standards pro Well (insgesamt je zwei Wells) zugeben.
- Die 96-Well-Platte in den Mikroplatten-*Reader* einlegen und für 30 Sekunden schütteln lassen.
- Anschließend 10 Minuten bei RT inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit die Platte erneut für 30 Sekunden schütteln lassen und anschließend die Absorption bei 595 nm messen.
- Nach Abziehen des Blindwertes von allen Messpunkten jeweils den Mittelwert der Replikate bilden und aus den korrigierten Messwerten des Proteinstandards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser resultierenden Funktion die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.

4.3.3.2 BCA-Test

Der BCA-Assay wurde an zuvor mit Ultraschall fragmentierten (*click*)ECM-Proben mit dem *PierceTM BCA Protein Assay* von Thermo Fisher nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (siehe auch **Kapitel 4.1.6**).

Durchführung:

- Die BCA-Arbeitslösung durch Mischen der Reagenzien A und B im Verhältnis 50 : 1 herstellen.
- In jede Vertiefung einer 96-Well-Platte 200 μL dieser Arbeitslösung vorlegen.
- 25 μL der Proben pro Well (insgesamt je vier Wells) oder 25 μL des Standards pro Well (insgesamt je zwei Wells) zugeben.
- Die 96-Well-Platte in den Mikroplatten-*Reader* einlegen und für 30 Sekunden schütteln lassen.
- Anschließend 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit die Platte erneut für 30 Sekunden schütteln lassen und anschließend die Absorption bei 562 nm messen.

- Nach Abziehen des Blindwertes von allen Messpunkten jeweils den Mittelwert der Replikate bilden und aus den korrigierten Messwerten des Proteinstandards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser resultierenden Funktion die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.

4.3.3.3 Elementare Analyse des Stickstoffgehalts zur Abschätzung des Gesamtproteingehalts

Zur Abschätzung des Gesamtproteingehaltes von unlöslichen (*click*)ECM-Suspensionen wurde der Stickstoffgehalt mittels Elementaranalyse quantifiziert. Diese quantitative Analyse wurde an der *Core Facility* der Universität Hohenheim durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Moduls 3: Analytische Chemie durchgeführt. Der Gesamtgehalt an Kohlenstoff und Stickstoff wurde in Anlehnung an die DIN EN ISO 16948 ("Biogene Festbrennstoffe - Bestimmung des Gesamtgehaltes an Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff") nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse) bestimmt. Die Analyseproben wurden im Sauerstoffstrom bei 900 °C oxidativ verbrannt. Das dabei entstehende Gasmisch wurde gereinigt und in seine Bestandteile aufgetrennt. Die Stickoxide Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid (NO₂) wurden an einem Kupferkontakt im Reduktionsrohr quantitativ zu molekularem Stickstoff reduziert und dann relativ mit einer Genauigkeit von bis zu ±0,1% mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt.

4.3.4 Bestimmung des Kollagengehalts in der (*click*)ECM

Im Zuge der Kollagensynthese sekretieren die Zellen zunächst die löslichen Prokollagenmoleküle, von denen außerhalb der Zelle dann C- und N-terminal spezifische Peptide enzymatisch abgespalten werden (siehe auch **Kapitel 1.2.2**). Dies führt zur Polymerisation der enzymatisch prozessierten Moleküle zu den sogenannten Tropokollagenen, welches sich anschließend parallel zusammenlagern und dadurch die Primärfilamente bilden [14].

4.3.4.1 Bestimmung des Gehalts an reifem Kollagen mittels Hydroxyprolin (HP)

Die Quantifizierung des Kollagengehalts innerhalb der untersuchten (*click*)ECM erfolgte in der vorliegenden Arbeit anhand des kolorimetrisch bestimmten Gehalts an Hydroxyprolin (HP). Aufgrund der Tatsache, dass die α -Aminosäure fast ausschließlich in Kollagen und nur in sehr geringen Mengen in Elastin vor kommt sowie der Tatsache, dass Elastine unter Standard-*In-vitro*-Zellkulturbedingungen aufgrund fehlender mechanischer Reize nicht als reife

Fasern kovalent in die zellbasierte ECM integriert werden [170, 171], kann der proteingebundene HP-Gehalt daher für die Kollagenquantifizierung mit einem akzeptablen Genauigkeitsgrad verwendet werden [138, 172-176]. Für diese quantitative Analyse des HP-Gehalts wurde das von Capella-Monsonis *et al.* [138] veröffentlichte Protokoll geringfügig modifiziert.

Durchführung:

- Ca. 7 mg der lyophilisierte (*click*)ECM-Proben in V-förmiges Borsilikatglasfläschchen mit Polytetrafluorethylen (PTFE)-Verschluss überführen.
- 500 µL konzentrierte Salzsäure (HCl) zugeben und die fest verschlossenen Gläschen ü. N. bei 110 °C inkubieren.
- Am darauffolgenden Tag die Gläschen aus dem Ofen entnehmen (Hitzeschutzhandschuhe!) und auf RT abkühlen lassen.
- Die Proben durch einen Polytetrafluorethylen (PTFE)-Spritzenvorsatzfilter (Ø 0,2 µm) filtrieren, um die unlösliche Huminfraction abzutrennen.
- Anschließend für jede gefilterte Probe eine Verdünnung (50X) mit Reinstwasser ansetzen.
- Als Referenzproben HP-Standardlösungen von 0 µg/mL (Blindwert), 1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL und 20 µg/mL mit Reinstwasser herstellen.
- Die Lösungen entsprechend der Capella-Monsonis *et al.*-Angaben [138] ansetzen:
 - Diluent: Isopropanol und Wasser im Verhältnis 1 : 2 mischen.
 - Citratpuffer: 17,19 g Natriumacetat, 18,75 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 2,75 g Zitronensäure in 200 mL Reinstwasser lösen, mit 200 mL Isopropanol vermischen und mit Reinstwasser auf ein Endvolumen von 500 mL einstellen.
 - Chloramin-T-Reagenz (erst unmittelbar vor der Bestimmung frisch ansetzen): 0,2625 g Chloramin T in 18,75 mL des Citratpuffers lösen und 3,75 mL Reinstwasser zugeben.
 - Ehrlich-Reagenz (ebenfalls erst unmittelbar der Bestimmung frisch ansetzen): 2 g 4-(Dimethylamino)benzaldehyd (*p*-DMAB) in 3 mL 70 %iger Perchlorsäure (HClO₄) lösen und mit 16,7 mL Isopropanol versetzen.
- Für die Reaktion 110 µL der verdünnten Proben oder Standards mit 254 µL des Assay-Diluents und 176 µL des frisch zubereiteten Chloramin T-Reagenzes in einem 1,5 mL-Eppendorf Tube vermischen und für 10 Minuten bei RT inkubieren.

- Anschließend 460 μL des frisch zubereiteten Ehrlich-Reagenzes in jedes Mikrozentrifugationsröhrchen zugegeben, mit einem Vortexmixer mischen und für 10 Minuten bei 70 °C inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit 200 μL jeder Probe bzw. jedes Standards in eine 96-Well-Platte überführt und die Absorption der Lösungen bei 555 nm mithilfe eines Mikroplatten-Readers messen.
- Den Blindwert von allen Messpunkten abziehen und aus den korrigierten Messwerten der Standards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser Funktion die HP-Konzentrationen der Proben berechnen.
- Die 50X-Verdünnung mit Reinstwasser sowie die Verdünnung der Proben durch die Zugabe der konzentrierten HCl herausrechnen.
- Die HP-Konzentration anschließend auf die eingesetzte (*click*)ECM-Trockenmasse beziehen.

4.3.4.2 Bestimmung des Gehalts an löslichem Kollagen

Die Konzentration der löslichen Prokollagene wurde mit dem *Sircol™ Soluble Collagen Assay* von Biocolor nach den Anweisungen des Herstellers quantifiziert. Lediglich im Hinblick auf die Probenvorbereitung wurde das Protokoll leicht abgewandelt, indem die für diese Bestimmung verwendete (*click*)ECM in einer 12-Well-Platte mit $7,76 \cdot 10^4$ Zellen und 3 mL supplementiertem Medium generiert wurde. Die Dezellularisierung und (*click*)ECM-Isolation erfolgte wie unter **Kapitel 4.1.2** beschrieben und die verwendeten Volumina an Reinstwasser bzw. LyseLösung wurden entsprechend verringert (3x 3 mL Reinstwasser, 2x 1,5 mL LyseLösung (dabei Inkubation für jeweils 3 Minuten), 3x 3 mL Reinstwasser). Die Propeptide des Kollagens wurden zunächst durch einen Verdau mit der Aspartatprotease Pepsin [125] abspalten.

Durchführung:

- 0,1 mg Pepsin in 1 mL 0,5 M kalter Essigsäure lösen.
- Pro Well vorsichtig 1 mL der Pepsinlösung auf die (*click*)ECM auftropfen und ü. N. bei 4 °C inkubieren.
- Am darauffolgenden Tag die Überstände abnehmen und je 100 μL Neutralisierungs-Reagenz zugeben.
- Kollagen-Standards mit 0 μg , 1 μg , 5 μg und 10 μg Kollagen ansetzen, ebenfalls je 100 μL Neutralisierungs-Reagenz zugeben und das Volumen mit 0,5 M Essigsäure auf 1,1 mL einstellen.

- Pro Probe bzw. Standard 1 mL *SircolDye* zugeben und für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler mit etwa 30 rpm inkubieren.
- Anschließend bei 12.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugieren.
- Überstand vorsichtig verwerfen und jeweils 750 µL Waschpuffer zu den Pellets zugeben.
- Anschließend erneut für 10 Minuten bei 12.000 rpm abzentrifugieren.
- Den Überstand vorsichtig vollständig abnehmen und verwerfen.
- Pro Probe bzw. Standard 250 µL des Alkalireagenzes zugeben und für 5 Minuten vortexen.
- Pro Probe bzw. Standard 200 µL (Proben in Triplikaten messen, Standards in Duplikaten) in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte-überführen und die Absorption mithilfe eines Mikroplatten-Readers bei 555 nm messen.
- Den Blindwert von allen Messpunkten abziehen, aus den jeweiligen Messpunkten den Mittelwert der Replikate berechnen und aus den korrigierten Messwerten der Standards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser Funktion die Konzentration an löslichem Kollagen in den Proben berechnen und auf die eingesetzte (*click*)ECM-Trockenmasse beziehen.

4.3.5 Bestimmung des Gehalts sulfatierter Glykosaminoglykane in der (*click*)ECM

Der Gesamtgehalt an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) in den (*click*)ECM-Proben wurde mit dem kommerziell erhältlichen *BlyscanTM Assay* von Biocolor entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Lediglich im Hinblick auf die Probenvorbereitung wurde das Protokoll leicht abgewandelt, indem die für diese Bestimmung verwendete (*click*)ECM in einer 12-Well-Platte mit $7,76 \cdot 10^4$ Zellen und 3 mL supplementiertem Medium generiert wurde. Die Dezellularisierung und (*click*)ECM-Isolation erfolgte wie unter **Kapitel 4.1.2** beschrieben und die verwendeten Volumina an Reinstwasser bzw. Lyselösung wurden entsprechend verringert (3x 3 mL Reinstwasser, 2x 1,5 mL Lyselösung (dabei Inkubation für jeweils 3 Minuten), 3x 3 mL Reinstwasser). Vor der eigentlichen sGAG-Quantifizierung wurden die sGAGs mithilfe der Cysteinprotease Papain [125] aus den Proben extrahiert.

Durchführung:

- Die sGAGs durch einen Papain-Verdau aus den Proteoglykan-Komplexen lösen. Dafür 0,1 mg/mL in *Blyscan*-Extraktionsreagenz lösen.
- Pro Well 1 mL Papain-Lösung vorsichtig auf die (*click*)ECM auftropfen und für 3 Stunden bei 65 °C inkubieren. Dabei die Well-Platte gelegentlich vorsichtig bewegen.

- Die Überstände abnehmen und bei 10.000 rpm für 10 Minuten inkubieren.
- Die Überstände abnehmen und je Probe 500 µL für die sGAG-Quantifizierung verwenden.
- sGAG-Standards mit 0 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg Chondroitinsulfat ansetzen.
- Das Volumen mit *Blyscan*-Extraktionsreagenz (ohne Papain) auf jeweils 500 µL auffüllen. Jeweils Duplikate ansetzen.
- Pro Probe bzw. Standard 1 mL *BlyscanDye* zugeben und für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler mit etwa 30 rpm inkubieren.
- Anschließend Lösungen bei 12.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugieren.
- Den Überstand vorsichtig verwerfen, je Probe bzw. Standard 500 µL Dissoziationsreagenz zugeben und für ca. 10 Minuten vortexen.
- Anschließend erneut für 5 Minuten bei 12.000 rpm abzentrifugieren.
- Pro Probe bzw. Standard 200 µL in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte übertragen und die Absorption bei 656 nm mithilfe eines Mikroplatten-*Readers* auslesen.
- Nach Abziehen des Blindwertes von allen Messpunkten jeweils den Mittelwert der Replikate bilden und aus den korrigierten Messwerten der Standards eine Kalibrationsfunktion erstellen.
- Anhand dieser Funktion die sGAG-Konzentrationen der Proben berechnen.
- Durch den Abgleich mit der durchschnittlichen Matrix-Trockenmasse pro Wachstumsfläche den sGAG-Anteil in Gewichtprozent [mg sGAG/ mg (*click*)ECM] berechnen.

4.4 Generierung von Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM

Für die Generierung von Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM wurden Silicium (Si)-Wafer zunächst gereinigt, aktiviert, silanisiert und mit Dibenzocyclooctingruppen (DIBO) ausgerüstet, sodass im Fall der Azid-modifizierten *click*ECM eine kovalente Anbindung durch die SPAAC (siehe auch **Kapitel 1.4**) der *click*ECM-Azide mit den Cyclooctinen auf der Oberfläche möglich war. Der gesamte Reaktionsmechanismus ist in **Abbildung 10** dargestellt.

Funktionalisierung von Oberflächen mit Dibenzocyclooctingruppen

Für die Funktionalisierung von artifiziellen Oberflächen mit Dibenzocyclooctingruppen (DIBO) wurden die Oberflächen (Glas oder Silicium) zunächst gründlich mit Aceton, Isopropanol und Reinstwasser gereinigt, anschließend durch eine Behandlung mit basischer Piranhalösung (30 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) + ~ 24 % Ammoniumhydroxidlösung (NH_4OH) im Verhältnis 3 : 2) aktiviert und danach mittels Carboxyethylsilantriol (CES) in einer Kondensationsreaktion zu endständigen Carboxygruppen umgesetzt. Diese wurden im nächsten Schritt über die Carbodiimid-Chemie mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) zunächst in eine Aktivesterzwischenstufe überführt und anschließend mit DIBO-OEG-NH₂ gekoppelt, sodass es zur kovalenten Ausrüstung der Oberfläche mit endständigen DIBO-Gruppen kam.

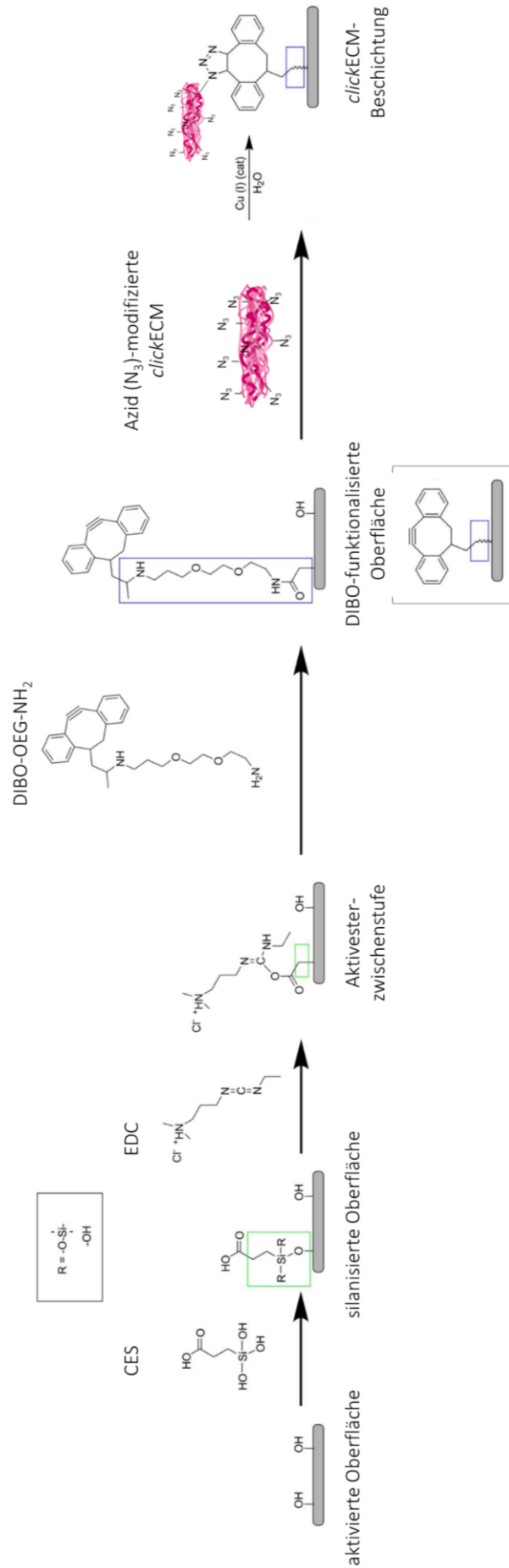


Abbildung 10: Reaktionsschema der Oberflächenfunktionalisierung mit Dibenzocyclooctingruppen und anschließenden Beschichtung mit Azid-funktionaler *clickECM* in einer SPAAC-Reaktion.

Durchführung:

- Oberflächen in Aceton schwenken und mit einem Acetonstrahl aus einer Spritzflasche gründlich abspülen. Anschließend im Stickstoffstrom trocknen.
- Den Reinigungsschritt als nächstes in derselben Art und Weise mit Isopropanol und abschließend mit Reinstwasser wiederholen.
- In einer Plastikkuvette die basische Piranhalösung ansetzen (30 % Wasserstoffperoxid + ~ 24 % Ammoniumhydroxidlösung im Verhältnis 3 : 2) und unter dem Abzug mithilfe von Stativmaterial in einem auf 70 °C temperierten Wasserbad befestigen, sodass die Lösung im Inneren der Kuvette gleichmäßig erhitzt wird.
- Sobald die erste Blasenbildung in der Reaktionslösung beobachtet werden kann, die Reaktionszeit (40 Minuten) starten.
- Nach Ablauf der Zeit die Substrate entnehmen und nacheinander in drei separaten, mit Reinstwasser gefüllten Bechergläsern schwenken und abschließend im Stickstoffstrom trocknen.
- Die Substrate in eine Glaspetrischale legen, mit der 25 %igen CES-Lösung überschichten und für 45 Minuten bei RT inkubieren.
- Die Substrate anschließend erneut nacheinander in drei separaten, mit Reinstwasser gefüllten Bechergläsern schwenken und abschließend im Stickstoffstrom trocknen.
- Die DIBO-OEG-NH₂-Gebrauchslösung ansetzen (125 mM DIBO-OEG-NH₂ in 0,1 M MES 45-Puffer (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, eingestellt auf pH 4,5 mit Salzsäure) und 5 mg/mL EDC).
- Substrate in einer 5-Well-Platte mit der DIBO-OEG-NH₂-Gebrauchslösung überschichten, mit einem Deckglas abdecken. Dabei in einem der Wells mithilfe von Zellstofftüchern und Wasser ein Feuchtigkeitsdepot anlegen, um ein Austrocknen zu verhindern.
- Die Platte mit Laborfilm versiegeln und ü. N. bei RT für etwa 18 Stunden inkubieren.
- Am darauffolgenden Tag die Wells mit PBS-T (mit 0,1 % Tween® 20 supplementiertes PBS⁻) füllen, die Deckgläser vorsichtig entfernen und die Substrate auf einem Laborschüttler für 5 Minuten waschen.
- Abschließend mit Reinstwasser gründlich spülen und im Stickstoffstrom trocknen.

Beschichtung von DIBO-funktionalen Oberflächen mit (click)ECM

Für die Generierung von Oberflächenbeschichtungen von DIBO-funktionalisierten Oberflächen wurden jeweils 50 µL der aufkonzentrierten und homogenisierten (click)ECM-Suspension auf eine 1 cm² große Substratfläche aufgegeben, gleichmäßig verteilt und bis zur vollständigen Trockene aufgetrocknet.

Durchführung:

- Sterilisation: DIBO-funktionalisierte Substrate 10 Minuten unter der Sterilbank in 70 % Ethanol inkubieren, anschließend Substrate mit einer sterilen Pinzette in einem sterilen Gefäß schräg stellen, sodass eventuelle Ethanolrückstände vollständig verdampfen können.
- Substrate mit einer sterilen Pinzette in ein steriles Gefäß überführen.
- Mithilfe der Kolbenhubpipette 50 µL aufkonzentrierte und homogenisierte (click)ECM pro Quadratzentimeter Substrat aufgeben, gleichmäßig verteilen und vollständig aufrocknen lassen.

Im Fall der Azid-modifizierte *click*ECM ist es theoretisch möglich, eine kovalente Schicht aus *click*ECM an der Grenzfläche zum Substrat auszubilden (siehe Reaktionsschema in **Abbildung 10**). Kommen die Azide der *click*ECM in räumliche Nähe zu den aktivierten Alkinen im Achtring des DIBO, so kann die SPAAC ablaufen (siehe auch **Kapitel 1.4**), die aufgrund der Ausbildung eines Triazolrings eine kovalente Verknüpfung der beiden Materialien zur Folge hat.

4.4.1 Charakterisierung der (click)ECM-Oberflächenbeschichtungen

Zusätzlich zu den unter **Kapitel 4.1.4** bereits erläuterten (immun)fluoreszenz-basierten Methoden wurden die in dieser Arbeit generierten (click)ECM-Beschichtungen auf DIBO-funktionalen Si-Wafer zusätzlich unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) analysiert.

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von (click)ECM-Beschichtungen auf DIBO-funktionalen Oberflächen

Wie unter **Kapitel 1.3.7.2** und **Kapitel 4.3.2** bereits erläutert, wurde die REM angewandt, um die generierten (click)ECM-Beschichtungen auf Si-Wafern zu untersuchen. Dazu wurden die zu beschichtenden Si-Wafer vor der eigentlichen Beschichtung mit konzentrierter und homogenisierter (click)ECM-Suspension teilweise mit Klebeband abgeklebt, um im REM später einen Querschnitt der Beschichtung untersuchen zu können. Nachdem die aufgegebene

(click)ECM vollständig aufgetrocknet war, wurden die Klebebandstreifen vorsichtig entfernt und die Proben vor der REM-Analyse mit Platin besputtert. Die Durchführung der Besputterung sowie die REM-Analyse wurde freundlicherweise von Svenja Nellinger (Hochschule Reutlingen) durchgeführt.

Durchführung:

- Si-Wafer (1 cm x 1 cm) zunächst wie unter **Kapitel 4.4** Abschnitt „*Funktionalisierung von Oberflächen mit Dibenzocyclooctingruppen*“ reinigen, aktivieren, silanisieren und mit DIBO funktionalisieren.
- Anschließend in der Mitte des Wafers über die gesamte Länge einen ca. 0,5 cm breiten Klebebandstreifen aufbringen und vorsichtig andrücken.
- Die Beschichtung mit (click)ECM analog zu **Kapitel 4.4** Abschnitt „*Beschichtung von DIBO-funktionalen Oberflächen mit (click)ECM*“ generieren.
- Nach der vollständigen Trocknung der aufgetragenen (click)ECM-Suspensionen den Klebebandstreifen vorsichtig entfernen, sodass die zuvor abgeklebte Stelle der Wafer frei liegt.
- Die Besputterung der Proben mit Platin (Pt) und Argon (Ar) als Betriebsgas bei 0,05 mbar Druck, 40 mA/ 470 V bei 17 °C für 50 Sekunden und einem Abstand zur Probe von 65 mm durchführen.

4.4.2 Untersuchung der Stabilität von (click)ECM-Beschichtungen auf DIBO-funktionalen Oberflächen

Zur Untersuchung und Evaluation der Stabilität von (click)ECM-Beschichtungen auf DIBO-funktionalen Si-Wafern wurden die beschichteten Oberflächen in dieser Arbeit in einer speziell entwickelten laminare Durchflusszelle mit einer tensidhaltigen Pufferlösung laminar überspült. Die anschließende Analyse der Beschichtungsstabilität erfolgte mithilfe der unter **Kapitel 4.1.4.2** beschriebenen unspezifischen Fluorescamin-Färbung der (click)ECM-Proteine und der Ermittlung der Schichtdicke anhand der Intensitätsprofile der mit dem cLSM generierten z-Stapelaufnahmen (siehe auch **Kapitel 4.3.2**).

Entwicklung und Konstruktion der laminaren Durchflusszelle

Für die Entwicklung der laminaren Durchflusszelle (IDZ) wurde diese im Zuge dieser Arbeit zunächst mithilfe einer computergestütztem *Design-Software* (engl. *computer-aided design*, CAD) konstruiert (**Abbildung 11**). Die maschinelle Fertigung entsprechend der ausgearbeiteten technischen Zeichnungen wurde abschließend freundlicherweise von Felix Rempel und den Mitarbeitenden der Werkstatt des Instituts für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart ausgeführt.

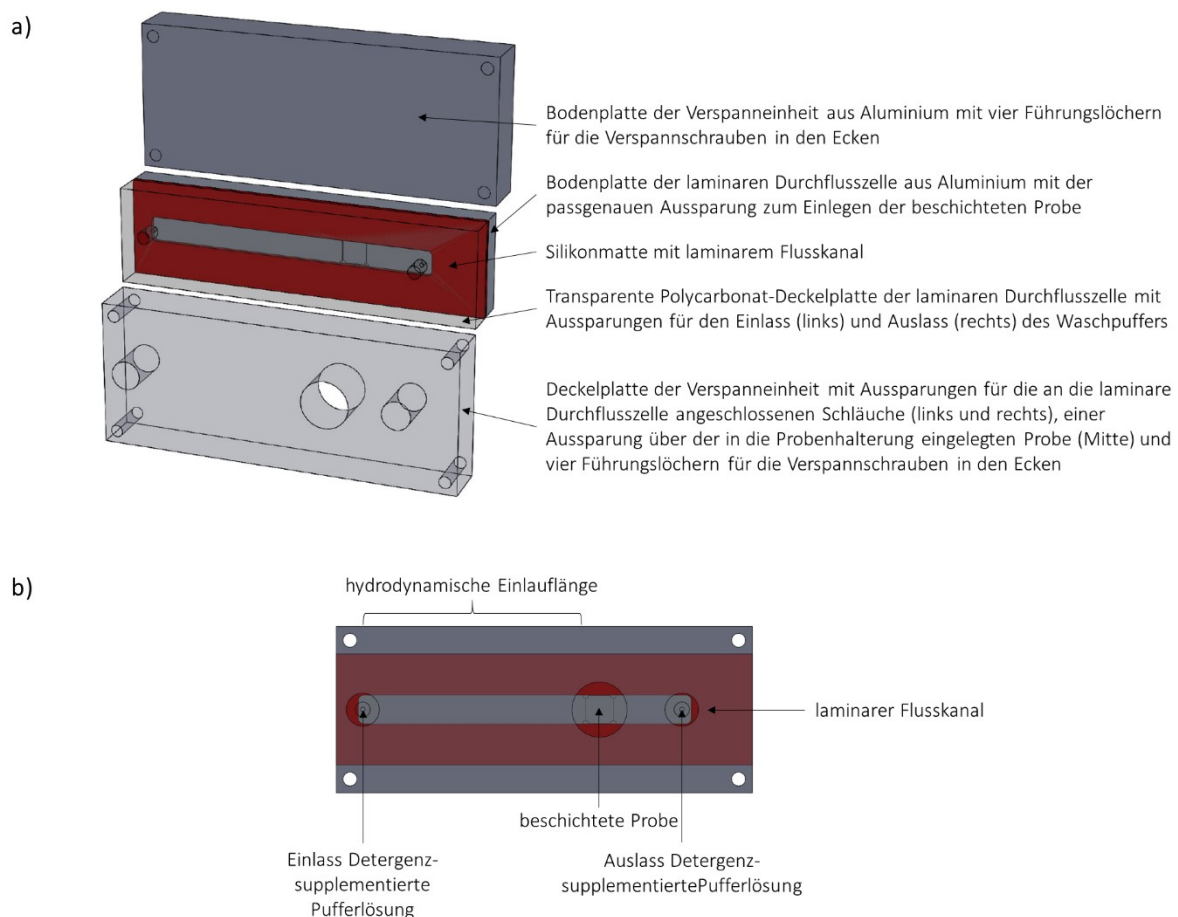


Abbildung 11: Technische Zeichnungen der konstruierten und entwickelten laminaren Durchflusszelle für die Untersuchung von Beschichtungsstabilitäten. a) Komponenten der laminaren Durchflusszelle mit der entsprechend zum Verspannen verwendeten Verspannvorrichtung. **b)** Aufsicht auf die zusammengebaute laminare Durchflusszelle. (Abbildung erstellt von Katharina Wörgötter und verändert nach [177].)

Die laminare Durchflusszelle wurde so konstruiert, dass die beschichtete Probe (ein Si-Wafer der Größe 10 mm x 10 mm x 0,625 mm) passgenau in die dafür eingefräßte Aussparung eingelegt werden konnte. Auf diese Bodenplatte wurde eine Silikonmatte gelegt, aus der mithilfe eines Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Laserschneiders der entsprechende Flusskanal herausgeschnitten wurde. Die Silikonmatte fungierte sowohl als Dichtung als auch als

Strömungskanal selbst. Auf diese Matte wurde dann eine Deckplatte aus Polycarbonat aufgelegt, die mit einem Einlass- und einem Auslassanschluss für das Flussmedium ausgestattet war. Durch die Transparenz des verwendeten Polycarbonats war es möglich, die Probe während des Versuchs beobachten zu können und bspw. eine potenzielle Luftblasenbildung zu erkennen. Für die Verspannung und dadurch gleichzeitig auch zur Abdichtung der Durchflusszelle wurden zwei Verspannplatten aus Aluminium angefertigt, die in allen vier Ecken mit Führungslöcher für die Verspannschrauben versehen waren. Für den Versuch wurde die zu überströmende Probe in die Probenvertiefung eingelegt und die Silikonmatte sowie die Deckelplatte aufgelegt. Dieser sandwichartige Aufbau wurde dann zwischen der Boden- und der Deckelplatte der Verspanneinheit zentriert und mithilfe der Verspannschrauben zusammengepresst. Um über die gesamte Fläche der Durchflusszelle einen gleichmäßigen Verspannungsdruck zu erzielen, wurden auf die Verspannschrauben Abstandshalter aus Aluminium aufgesetzt und die Flügelmuttern an allen vier Ecken gleichmäßig angezogen.

Für die Versuche zur Stabilitätstestung der erzeugten Beschichtungen wurde eine Hydraulikpumpe verwendet, um während des gesamten Versuchs eine definierte Flussrate zu gewährleisten. Die Durchflusszelle konnte bei einem Volumenstrom Q von 116 mL/min leakagefrei betrieben werden, was einer durchschnittlichen Strömungsgeschwindigkeit u von 0,39 m/s bei den in **Abbildung 11** angegebenen Abmessungen entspricht.

Um im Bereich der Probe eine laminare Strömung mit einer definierten Schubspannung zu gewährleisten und Turbulenzen oder andere unerwünschte Effekte wie die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, wurde die Durchflusszelle mit einem einfachen Strömungskanal ausgelegt. Um sicherzustellen, dass die zu überströmenden Beschichtungen mit einer voll entwickelten laminaren Strömung überströmt wurden, wurden zwei theoretische Parameter (die Reynoldszahl Re und die hydrodynamische Eintrittslänge L_h) mit **Formel 5** und **Formel 6** abgeschätzt [178-181]:

$$Re = \frac{\rho \cdot u \cdot D_h}{\eta} \approx 401$$

Formel 5: Berechnung der Reynoldszahl Re .

$$L_h = 0.05 \cdot Re \cdot D_h \approx 19 \text{ mm}$$

Formel 6: Berechnung der hydrodynamischen Einlaufstrecke L_h .

ρ steht hierbei jeweils für die Dichte ρ (1,0062 g/mL) und η für die dynamische Viskosität (0,924 mPas) von PBS⁻, das mit 0,1 % Tween[®] 20 (PBS-T) versetzt war und in der Testung der

Beschichtungsstabilität in der vorliegenden Arbeit als Strömungsmedium verwendet wurde. D_h entspricht dem hydraulischen Durchmesser ($D_h = \frac{2 \cdot a \cdot b}{a+b} = 0,95 \text{ mm}$), wobei a für die Breite des Flusskanals steht und b den Abstand zwischen der Deckel- und der Bodenplatte angibt. Die berechnete Reynoldszahl Re , die als ein Maß für die Art der Strömung (laminar oder turbulent) angesehen werden kann, liegt für die in dieser Arbeit entwickelten IDZ im Bereich einer laminaren Strömung. Die hydrodynamische Einlaufstrecke L_H gibt die Weglänge an, die das eingeströmte Fluid nach dem Einlass im Flusskanal benötigt, um sich vollständig laminar auszubilden. Erst hinter dieser Strecke kann die Probe platziert werden, um sicherstellen zu können, dass die Probe laminar und damit definiert überströmt wird. Da L_h im Fall der in dieser Arbeit entwickelten IDZ deutlich kleiner als der tatsächliche Abstand zwischen dem Einlass des Flussmediums und der in der Vertiefung eingelassenen beschichteten Probe ist, kann davon ausgegangen werden, dass im Bereich der Probe eine vollständig ausgebildete laminare Strömung vorherrscht.

Zur Abschätzung der während der Testung an der Probenoberfläche auftretenden Scherspannung τ wurde die Strömung durch den Flusskanal mit seinem rechteckigen Querschnitt durch die Strömung durch parallele Platten angenähert ($a \gg b$), sodass τ mithilfe von **Formel 7** wie folgt abgeschätzt werden kann [182]:

$$\tau = \eta \cdot \frac{6 \cdot Q}{a \cdot b^2} = 4.3 \text{ Pa}$$

Formel 7: Abschätzung der auftretenden Scherspannung τ .

Untersuchung der (click)ECM-Beschichtungsstabilität unter laminaren Scherbelastungen

Für die Untersuchung der Beschichtungsstabilität gegenüber laminarer Scherbelastung wurden die zu testenden Substrate zunächst in zwei gleichgroße Sets aufgeteilt. Ein Set wurde während der Testung zur Seite gelegt und diente später als ungewaschene Kontrolle, während die Substrate des anderen Probensets jeweils in die Vertiefung der IDZ eingelegt wurden. Die IDZ wurden dann in einem sandwichartigen Aufbau zusammengesetzt und in die Verspanneinheit eingelegt. Mithilfe der vier Verspannschrauben wurde die Verspanneinheit anschließend so fest zusammengepresst, dass sich mit der Silikonmatte, aus der zuvor mithilfe eines CO₂-Laser-Schneidplotters der Flusskanal ausgeschnitten wurde, ein dreidimensionaler laminarer Flusskanal mit genau definierten Dimensionen ausbildete. Damit die Verspannung für alle Proben gleichmäßig erfolgen konnte, wurden die vier Verspannschrauben durch Abstandshalter (Röhrchen aus Aluminium) geführt.

Die Überströmung der zu testenden Substrate erfolgte im laminaren Flusskanal mit PBS-T bei einer Fließgeschwindigkeit von 116 mL/min, was einer Scherspannung von 4,3 Pa entspricht. Diese Scherspannung stellte sich in einer von Salehi-Nik *et al.* [183] publizierten Arbeit als ausreichend heraus, um Teile einer zuvor physisorbierten Kollagenbeschichtung zu entfernen. Die in dieser Arbeit untersuchten (*click*)ECM-beschichteten Oberflächen wurden 9 Stunden lang mit den oben angegebenen Parametern laminar überspült. Nach dem Waschen wurden die beschichteten Substrate aus der IDZ entnommen und die (*click*)ECM-Proteine beider Probensätze parallel mit Fluorescamin angefärbt (siehe auch **Kapitel 4.1.4.2**). Von den fluoreszenten (*click*)ECM-Schicht wurden im Anschluss mithilfe des cLSMs z-Stapelaufnahmen mit einem z-Abstand von jeweils 0,5 μm und einer x- und y-Pixelabmessungen von 0,264 μm angefertigt (siehe auch **Kapitel 4.3.2**). Für die Auswertung wurden die einzelnen Intensitäts-(*I*)-Tiefenprofile als eine Faltung der Gaußschen Tiefenschärfe Γ behandelt (mit einem konstanten σ -Wert von 1,36 μm während der gesamten Messungen) und eine Rechteckfunktion R mit einem Mittel d_{offset} und einer Breite d_c behandelt, wobei letztere die Schichtdicke (**Formel 8**) darstellt [184]. Um zu ermöglichen, dass auch variable Signalamplituden und Hintergründe ungleich null berücksichtigt werden können, wurden zusätzlich ein Amplitudenfaktor A und ein Basislinienversatz I_0 berücksichtigt.

$$I(z) = A \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} [\Gamma(\tau - z) \cdot R(\tau, d_c, d_{offset})] d\tau + I_0$$

Formel 8: Funktion zur Beschreibung des Intensitätsprofils $I(z)$ in z-Richtung, die zur Berechnung der Schichtdicken aus den gemessenen Intensitätsprofilen mithilfe der nichtlinearen Regression verwendet wurde.

Vor der Analyse wurden die gemessenen Intensitäten zunächst logarithmisch transformiert. Zusätzlich wurden die Intensitäten über Quadrate von 4 x 4 benachbarten Pixeln in der x-y-Ebene gemittelt. Die transformierten Tiefenprofile enthielten somit die Schichtdicken von 1,056 μm x 1,056 μm Quadraten. Die Schichtdicke wurde dann durch nichtlineare Regression des transformierten Intensitätsprofils (ein Beispiel für ein solches Profil ist im Anhang in **Abbildung A8** dargestellt) mit **Formel 8** und A , I_0 , d_c und d_{offset} als Anpassungsparameter bestimmt. Die nichtlineare Regression wurde mit dem von Storn und Price [185] beschriebenen Algorithmus der differentiellen Entwicklung durchgeführt, wie er im *SciPy* Optimierungspaket (Version 1.2.1) [186, 187] mit der Methode der kleinsten Quadrate unter Verwendung eines von Dr. Alexander Southan programmierten und von ihm freundlicherweise zur Verfügung gestellten *Python*-Skripts implementiert ist. Um die Vergleichbarkeit zu verbessern, wurden die

Schichtdicken nach den Berechnungen auf die Dicken der ungewaschenen (*click*)ECM-Beschichtungen normiert.

Durchführung:

- DIBO-funktionalisierte (siehe auch **Kapitel 4.4**) Si-Wafer (1 x 1 cm) mit 50 μ L (*click*)ECM beschichten und vollständig aufdrocknen lassen.
- Beschichtete Substrate in die Vertiefung der Bodenplatte der IDZ einlegen.
- Silikonmatte passgenau auflegen, dabei darauf achten, dass sich die hydrodynamische Einlaufstrecke vor der Probe befindet.
- Die Schläuche für den Ein- und Auslass des Waschpuffers anschließen, ggf. beim Einschrauben mit Teflonband abdichten.
- Die Polycarbonat-Deckelplatte der Durchflusszelle passgenau auflegen.
- Die Verspannschrauben von unten durch die Führungslöcher der Bodenplatte der Verspanneinheit führen und die Platzhalter von oben aufstecken.
- Den sandwichartigen Aufbau mittig auf die Bodenplatte der Verspanneinheit positionieren.
- Die Deckelplatte der Verspanneinheit auflegen, dabei darauf achten, dass sich die Aussparung über der Probe befindet und die Schläuche durch die Aussparungen links und rechts geführt werden.
- Die Flügelmuttern auf die Verspannschrauben drehen und an allen vier Ecken gleichmäßig an die Platzhalter andrehen.
- Die Schläuche an der Einlassseite an das mit PBS-T gefüllte Vorratsgefäß anschließen und die Schläuche über die Halterung der peristaltischen Pumpe führen.
- Die Schläuche auf der Auslassseite wieder zurück in die mit PBS-T gefüllte Vorratsgefäß führen, sodass der Kreislauf geschlossen ist.
- Die Pumpe programmieren (116 mL/min \pm einer Scherspannung von 4,3 Pa) und starten.
- Den Flusskanal auf eventuelle Luftblasen und die IDZ auf potenzielle Undichtigkeiten überprüfen. Bei korrektem Betrieb können die 9 Stunden Überspülzeit gestartet werden.
- Nach Ablauf der Zeit die Pumpe stoppen, den Aufbau auseinanderbauen, die Substrate vorsichtig entnehmen und in entsprechend beschriftete und mit PBS⁻ gefüllte Gefäße überführen.
- Färbung der (*click*)ECM-Proteine mit Fluorescamin (siehe auch **Kapitel 4.1.4.2**).

- Generierung von z-Stapel-Aufnahmen am cLSM (siehe auch **Kapitel 4.3.2**) im 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Kanal, dazu einen z-Abstand von 0,5 μm und einer x- und y-Pixelabmessungen von 0,264 μm wählen.

4.4.3 Untersuchung der Zellantwort auf (*click*)ECM-Beschichtungen

Die Zellantwort auf Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM wurde durch die Aussaat primärer humaner dermaler Fibroblasten in einer Konzentration von 50.000 Zellen/ cm^2 auf beschichtete Substrate und anschließende Inkubation für entweder 0,5 Stunden (initiale Zelladhäsion) oder 72 Stunden (Zellproliferation) unter statischen Zellkulturbedingungen untersucht. Zur Auswertung wurden die Zytoskelette mit Alexa Fluor®546-Phalloidin und die Zellkerne der adhärenen Zellen mit DAPI fluoreszenzmarkiert und Aufnahmen mit dem cLSM angefertigt. DAPI interkaliert in die Doppelhelix der DNA, d. h. es schiebt sich in die Helix der DNA ein, ohne diese signifikant zu verändern. Phalloidin ist ein Pilzgift, das irreversibel an die F-Aktin-Filamente der Zellen bindet und diese so markiert. Anhand der Zellzahl sowie der Zellmorphologie konnte anschließend auf das Antwortverhalten der auf die beschichteten Oberflächen ausgesäten Zellen rückgeschlossen werden.

Durchführung:

- Die entsprechende Anzahl an Si-Wafern (1 cm x 1 cm) wie in **Kapitel 4.4** beschrieben DIBO-funktionalisieren, sterilisieren und (mit Ausnahme der nicht beschichteten Kontrollen) mit (*click*)ECM beschichten.
- Die Substrate in eine entsprechend beschriftete sterile \varnothing 3,5 cm-Polystyrol-Petrischale legen.
- Die für die Aussaat kultivierten primären Fibroblasten derselben Spender wie der für die Oberflächenbeschichtung verwendeten (*click*)ECM wie unter **Kapitel 4.1**, Abschnitt „*Passagieren*“ beschrieben von der Wachstumsfläche der ZKF ablösen, zählen (**Kapitel 4.1**, Abschnitt „*Impedanzbasierte Zellzählung*“) und mit 50.000 Zellen/ cm^2 , d. h. 50.000 Zellen/ 2,5 mL Medium vorsichtig auf die Substrate geben und Zellen im Brutschrank bei Standardzellkulturbedingungen kultivieren.
- Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit (initiale Zelladhäsion: 0,5 Stunden; Zellproliferation: 72 Stunden) das Zellkulturmedium vorsichtig am Rand der Schale absaugen und den Zellrasen vorsichtig dreimal mit jeweils 2,5 mL PBS⁻ spülen.

- Fixierung: Proben mit 4 %iger PFA-Lösung überschichten und 10 Minuten bei RT inkubieren, anschließend dreimal mit jeweils 2,5 mL PBS⁻ spülen.
- Permeabilisierung: Proben mit Saponinlösung (0,2 % in PBS⁻) für 15 Minuten bei RT überschichten.
- Blocken unspezifischer Bindungsstellen: Proben mit Blocklösung (PBS⁻ + 3 % BSA + 0,1 % Triton X-100) für 30 Minuten bei RT inkubieren.
- Phalloidin-DAPI-Färbung: Alexa Fluor® 546-Phalloidin (3 Units/mL) + DAPI (1 µg/mL) in Blocklösung verdünnen und Proben mit der Färbelösung für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit Proben je zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS⁻ spülen.
- Anschließend einen Tropfen wässriges Eindeckmittel auf die Proben geben, mit einem Deckglas eindecken und unter dem cLSM auswerten.
- *ImageJ*-Auswertung: Abgrenzung der Zellkerne im DAPI-Kanal vom Hintergrund mithilfe des Schwellenwertverfahrens, anschließend Zellzählung über die Funktion „*Analyze Particles*“.

4.5 (*click*)ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattformen

Um die in dieser Arbeit generierten *click*ECM-Beschichtungen mit einer in der ECM nicht natürlicher Weise vorkommenden biologischen Funktion auszurüsten und auf diese Weise eine Biokonjugationsplattform zu schaffen, wurden die *click*ECM-Azide mit Alkin-funktionalen Biotinmolekülen umgesetzt.

Biotinylierung von clickECM-Beschichtungen

Für die Biotinylierung der *click*ECM-Beschichtungen wurden die Azide der *click*ECM unter Verwendung des *Click-iT® Cell-Reaction-Buffer-Kits* mit 0,1 mM Biotin-Alkin konjugiert. Als Kontrollen dienten Beschichtungen aus nicht modifizierter ECM sowie *click*ECM-Beschichtungen, die mit der Biotin-Alkin-*Click-iT®*-Lösung inkubiert wurden, bei der der Kupferkatalysator gezielt weggelassen wurde, sodass die *Click*-Reaktion aufgrund des Fehlens katalysierender Kupferspezies nicht ablaufen konnte.

Durchführung:

- Die entsprechende Anzahl an Substraten (Si-Wafer (0,5 cm x 0,5 cm) für den Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung mit ATTO 594-Streptavidin, bzw. runde \varnothing 18 mm-Glasobjektträger (für die Konjugation mit Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) wie in **Kapitel 4.4** beschrieben DIBO-funktionalisieren, sterilisieren und entsprechend mit (*click*)ECM beschichten.
- Die *Click-iT*[®]-Reaktionslösung entsprechend der Herstellerangaben ansetzen und die Biotin-Alkin-Lösung im Verhältnis 1 : 1000 zugeben.
- Die Substrate in eine entsprechend beschriftete sterile 5-Well-Platte legen und mit 50 μ L des jeweiligen Biotin-Alkin-*Click-iT*[®]-Lösung überschichten und bei RT für 2 Stunden inkubieren.
- Nach Ablauf der Biotinylierungszeit die Lösung abnehmen und die Wells mit PBS-T füllen.
- Auf dem Orbitalschüttler 10 Minuten waschen, danach PBS-T abschütten und den Waschschrift erneut wiederholen.
- Anschließend die Wells mit PBS⁻ füllen und erneut für 10 Minuten auf dem Orbitalschüttler waschen.
- Die Substrate bis zur Weiterverwendung in PBS⁻ lagern.

Direkter fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung

Für den Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung wurden die über die über die CuAAC (**Kapitel 1.4**) kovalent gebundenen Biotinmoleküle mit einem Fluorophor-gekoppelte Streptavidin (Strep) konjugiert.

Durchführung:

- Die ATTO 594-Streptavidin-Lösung ansetzen (0,1 μ M) und jedes Substrat mit 50 μ L der Lösung überschichten und für 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit die Lösung abnehmen und die Wells mit PBS-T füllen.
- Auf dem Orbitalschüttler 10 Minuten waschen, danach PBS-T abschütten und den Waschschrift erneut wiederholen.
- Anschließend die Wells mit PBS⁻ füllen und erneut für 10 Minuten auf dem Orbitalschüttler waschen.
- Danach einen Tropfen wässriges Eindeckmittel auf die Proben geben, mit einem Deckglas eindecken und unter dem cLSM auswerten (siehe auch **Kapitel 4.3.2**).

Indirekter fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung

Als zusätzlicher indirekter Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung wurde mithilfe eines Alkin-funktionalen Fluorophors die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch die Biotinylierung der *click*ECM mit Biotin-Alkin verfolgt.

Durchführung:

- Die Fluoreszenzfärbung mit Alexa Fluor® 488-Alkin wie unter **Kapitel 4.1.4.3** beschrieben durchführen, die Proben mit einem Tropfen wässrigem Eindeckmittel und einem Deckglas eindecken.
- Unter dem cLSM sowohl von den biotinylierten als auch den nicht biotinylierten *click*ECM-Schichten z-Stapelaufnahmen mit identischen Mikroskopeinstellungen generieren (**Kapitel 4.3.2**).
- Die z-Stapel in 8 Bit-Maximumintensitätsprojektion (engl. *maximum intensity projection*, MIP) konvertieren (8 Bit = 256 unterschiedliche Graustufen).
- Mithilfe von *ImageJ* die Bildhistogramme auf ihre individuellen Fluoreszenzintensitäten hin analysieren und die entsprechenden *Counts* mit der jeweiligen Graustufe multiplizieren.
- Das Integral der daraus resultierenden Kurve entspricht der Fluoreszenzintensität und kann genutzt werden, um die Abnahme an freien Azidgruppen durch die Konjugation mit Biotin-Alkin zu detektieren.

Konjugation biotinylierter clickECM-Schichten mit Meerrettichperoxidase

Um die biotinylierten *click*ECM-Schichten mit einer weiteren, nicht in der natürlichen ECM vorhandenen biologischen Funktion auszustatten, wurden die Biotingruppen mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Streptavidin (Strep-HRP) konjugiert. Die Anbindung des Enzyms wurde anschließend durch den enzymatischen Umsatz des farblosen HRP-Substrats 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) in sein blaugrünes Oxidationsprodukt (ABTS⁺) photometrisch verfolgt. Unbeschichtete Glassubstrate dienten als *Blank* und Substrate, die mit nicht modifizierter ECM beschichtet waren, als Kontrolle.

Durchführung:

- Glassubstrate (\varnothing 18 mm) wie unter **Kapitel 4.4** beschrieben zunächst mit DIBO-Gruppen funktionalisieren und anschließend wie oben beschrieben mit Biotin-Alkin biotinylieren.
- Biotinylierte Substrate in eine entsprechend beschriftete 12-Well-Platte legen und mit 50 μ L der Strep-HRP-Lösung (100 μ M) überschichten und bei 4 °C für 2 Stunden inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit die Lösungen abnehmen, die Wells mit PBS⁻ füllen und 15 Minuten auf dem Orbitalschüttler waschen. Das PBS⁻ abnehmen und den Waschschrift noch zwei weitere Male wiederholen.
- Für die enzymatische Reaktion 250 μ L 2,2'-Azino-Bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure (ABTS)-Lösung in jedes Well geben, die Platte direkt in das Mikroplatten-Readers zur Absorptionsmessung bei 405 nm einlegen und die erste Messung (Zeitpunkt 0 Minuten) unmittelbar starten.
- Anschließend die Messungen alle zwei Minuten wiederholen (letzte Messung bei 32 Minuten).

4.6 Generierung von Hybridhydrogelen mit Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*) als Modellsubstanz für die *clickECM* und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)

Hybridhydrogele stellen eine interessante Materialklasse dar, um die vorteilhaften Eigenschaften von synthetischen Polymeren wie bspw. deren mechanische Eigenschaften sowie die einfache Verfügbarkeit mit den bioaktiven Eigenschaften der biobasierten Polymere zu kombinieren (**Kapitel 1.3 und 1.3.4**). Durch die in **Kapitel 1.3.5** erläuterte Limitierung der aktuell verfügbaren Menge der *clickECM* durch die vergleichsweise zeit-, arbeits- und ressourcenaufwändige manuelle *In-vitro*-Generierung konnten im Zeitraum dieses Dissertationsvorhabens noch keine umfangreichen Untersuchungen von *clickECM*-Hybridhydrogelen durchgeführt werden. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine Azid-modifizierte Gelatine als Modellsubstanz synthetisiert werden, mit deren Hilfe geeignete Protokolle etabliert und die Einflüsse und Auswirkungen des entstehenden Hybridmaterials untersucht werden können.

Kollagen entspricht, wie bereits in **Kapitel 1.2.2** ausführlich beschrieben, in der menschlichen Dermis mengenmäßig einem Anteil von ca. 70 -80 % der Trockenmasse und stellt damit einen der Hauptbestandteile des Bindegewebes dar [188]. Aus diesem Grund wurde Gelatine als

denaturiertes Kollagenderivat als eine gut geeignete und in ausreichenden Mengen verfügbare Modellsubstanz für die ECM angesehen. Um die Gelatine analog zur *clickECM* mit abiotischen Aziden zu funktionalisieren, wurde das von Goddard-Borger und Stick [189] veröffentlichte Azid-Transferreagenz Imidazol-1-sulfonylazid-Hydrochlorid verwendet, um die Lysingruppen der Gelatine durch einen Diazotransfer in Azide umzusetzen.

4.6.1 Synthese von Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*) als Modellsubstanz für die *clickECM*

Die Azid-Funktionalisierung der verwendeten Gelatine erfolgte angelehnt an die Vorschrift von van Dongen *et al.* [190]. Das in dieser Arbeit verwendete Diazotransferreagenz wurde am IGVP synthetisiert und freundlicherweise von Oliver Gorke zur Verfügung gestellt.

4.6.2 Synthese des heterobifunktionalen Linkers *N*-Propargylacrylamid

Die Synthese des heterobifunktionalen Linkers *N*-Propargylacrylamid erfolgte angelehnt an die Vorschrift von Yilmaz *et al.* [191]. Der in dieser Arbeit verwendete Linker wurde am IGVP synthetisiert und freundlicherweise von Tobias Götz zur Verfügung gestellt.

4.6.3 Generierung Azid-Gelatine (*clickGel*)-haltiger Hybridhydrogele

Die Hybridhydrogele aus Azid-funktionaler Gelatine (*clickGel*) und 20 % Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) wurden mit *clickGel*-Konzentrationen von 5,5 % (w/w), 3,0 % (w/w) und 0,6 % (w/w) hergestellt.

Für die Herstellung der Hybridhydrogele wurde zunächst die Reaktionslösungen bestehend aus dem Vernetzer *N*-Propargylacrylamid, der (*click*)Gel sowie den Katalysatoren für eine 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und Na-L-Ascorbat hergestellt. Im Folgenden wird die Herstellung der Formulierung mit 5,5 % (w/w) erläutert, alle anderen Konzentrationen wurden mit entsprechend reduzierten Konzentrationen des Linkers *N*-Propargylacrylamid, *clickGel*, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ und Na-L-Ascorbat hergestellt. Für die Herstellung von Hydrogelen mit unmodifizierter Gelatine wurden der Lösung aus PEG-DA und *Irgacure*[®] 2959 lediglich unmodifizierte Gelatine und Wasser zugegeben, sodass identische Konzentrationen wie bei den *clickGel*-haltigen Hydrogelen erreicht wurden. Für die Herstellung von reinen PEG-DA-Hydrogelen wurde die finale Konzentration von 20 % (w/w) PEG-DA durch Zugabe von Wasser zur PEG-DA-*Irgacure*[®] 2959-Lösung eingestellt.

Durchführung:

- 1 g der *N*-Propargylacrylamid-Stammlösung in Wasser mit einer Konzentration von 0,03 M ansetzen (Stoffmenge = 30 μmol = 1 Äquivalent).
- Jeweils Stammlösungen von $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,01 M) und Na-L-Ascorbat (0,1 M) ansetzen.
- In der Stammlösung des heterobifunktionellen Linkers 100 mg *clickGel* lösen und 60 mg der CuSO_4 -Stammlösung (0,6 μmol CuSO_4 = 0,02 Äquivalente) zusammen mit 30 mg der Na-L-Ascorbat-Stammlösung (3 μmol = 0,1 Äquivalente) zugeben.
- Die Mischung mindestens 16 Stunden bei 37 °C in einem Thermoschüttler umsetzen.
- Um das Ausfallen der Gelatine während der Zugabe der PEG-DA-Hydrogellösung zu verhindern, wurden 34,8 mg Natriumchlorid (NaCl) zugeben (Gesamtmasse der Lösung von 1,225 g und einer Konzentration von 8,2 % (w/w) *clickGel* in der Lösung).
- Die Photoinitiator (*Irgacure*[®] 2959)-Stammlösung ansetzen: unter Lichtschutz 7 mg/g (w/w) *Irgacure*[®] 2959 in Reinstwasser lösen, dabei mit einem Heißluftföhn auf ca. 100 °C erhitzen, anschließend auf RT abkühlen lassen.
- 0,128 g der *Irgacure*[®] 2959-Stammlösung zu 0,179 g PEG-DA geben, sodass die Masse des Photoinitiators in der Lösung bezogen auf die PEG-DA-Masse 0,5 % (w/w) beträgt.
- Um die Endkonzentration von 20 % (w/w) PEG-DA in der Hydrogelvorläuferlösung zu erreichen, 0,588 g der *clickGel*-Linker-Lösung, zugeben, sodass eine Lösung mit einer finalen *clickGel*-Konzentration von 5,5 % (w/w) entsteht.
- Diese Hydrogelvorläuferlösungen in eine zylindrische Aluminiumform (\varnothing 3 cm, Höhe: 1 mm) pipettieren, mit einer Quarzglasscheibe abdecken und unter UVA-Licht (50 mW/cm²) für 7,5 Minuten auspolymerisieren.
- Mit Hilfe eines Mikrospatels die auspolymerisierten Hydrogele vorsichtig aus der Form entnehmen und zum Waschen und Quellen in eine mit 20 mL Reinstwasser gefüllte Petrischale überführen.

4.6.4 Chemische Charakterisierung der Azid-Gelatine (*clickGel*) sowie *clickGel*-haltiger Hybridhydrogele

Für die Untersuchung der Herstellungsparameter sowie der resultierenden (*click*)Gel-(Hybrid)Hydrogele wurden umfangreiche chemische, physikalische und biologische Analysen durchgeführt, die im Folgenden einzeln beschrieben sind.

Kernspinresonanz ($^1\text{H-NMR}$)

Für die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse wurden die Proben in Deuteriumoxid (D_2O) gelöst, das mit Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) als internem Standard (1 mg/mL) versetzt war. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden an der Universität Stuttgart aufgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assay

Die nach der Modifikation in der *click*Gel verbleibenden Aminogruppen wurden mithilfe des 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assays bestimmt [196]. Die praktische Bestimmung wurde am IGVP freundlicherweise von Dr. Christiane Claaßen durchgeführt.

Durchführung:

- 25 μL Gelatinelösungen (unmodifizierte Gelatine 5 mg/mL; Gelatinederivate 20 mg/mL) in eine 96-Well-Platten pipettieren.
- Glycin-Standards im Konzentrationsbereich von 0,02 mM - 2,5 mM ansetzen.
- 25 μL Natriumhydrogencarbonatlösung (4 % (w/v), pH 8,5) und 25 μL TNBS (0,1 % (v/v)) hinzufügen.
- Die Platten anschließend für 2,5 Stunden bei 37 °C im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubieren.
- Danach 25 μL SDS-Lösung (10 % (w/v)) und 12,5 μL HCl (1 M) zugeben und die Absorption bei 330 nm mit einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader messen.
- Anhand der Glycin-Standards die Aminogruppen-Konzentration berechnen.

Abgeschwächten Totalreflexion-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)

Bei der abgeschwächten Totalreflexion-Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR) wird die Probe einem durch Totalreflexion entstehendes evaneszenten Feld von Infrarotstrahlung ausgesetzt und die Absorption bzw. der Intensitätsverlust durch die Probe frequenz aufgelöst aufgezeichnet. Die ATR-FT-IR-Spektren wurden mithilfe einer Platinum ATR-Einheit, Diamant 1 in Reflexion an frisch gefriergetrockneten Proben mit 60 Scans im Bereich von 4000 - 400 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} am IGVP freundlicherweise von Tobias Götz aufgenommen. Hintergrundmessungen wurden vor jeder Probenmessung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

Bestimmung des Quellgrads

Der Quellgrad gibt Auskunft über das Quellverhalten der (Hybrid)Hydrogele und gibt an, wie viel Wasser das Polymernetzwerk während der Quellung bis zum Gleichgewichtszustand aufgenommen hat [197].

Durchführung:

- Für die gravimetrische Analyse die Oberfläche der in Wasser bis zum Gleichgewicht gequollenen (Hybrid)Hydrogele auf einem Filterpapier vorsichtig abtupfen.
- Die Masse des gequollenen Gels (m_s) gravimetrisch bestimmen.
- Anschließend die Hydrogele 72 Stunden in einem Vakuumtrockenschrank trocknen und nach Ablauf der Zeit die Trockenmasse (m_d) gravimetrisch ermitteln.

Der gravimetrische Gleichgewichtsgrad der Quellung Q_g wurde abschließend mit **Formel 9** berechnet:

$$Q_g = \frac{(m_s - m_d)}{m_d} \cdot 100 \%$$

Formel 9: Berechnung des Quellgrads der (Hybrid)Hydrogele.

Bestimmung des isoelektrischen Punkts (IEP)

Die isoelektrischen Punkte (IEP) der Gelatinederivate wurden mittels einer von Sewald *et al.* publizierten Deionisierungsmethode analysiert [192], die auf der Arbeit von Janus *et al.* [193] basiert. Die Bestimmungen wurden am IGVP freundlicherweise von Dr. Lisa Rebers durchgeführt.

Durchführung:

- Die Proben in Reinstwasser (5 %(w/v)) bei 60 °C (unmodifizierte Gelatine) oder 40 °C (Azid-modifizierte Gelatine, *clickGel*) auflösen.
- Das Mischbettionenaustauscherharz *Amberlite® IRN150* zugeben und bei 60 °C bzw. 40 °C für weitere 30 Minuten schütteln.
- Die Leitfähigkeitsmessung bei 30 °C messen. Die Deionisierung der Gelatine wird bei einer Leitfähigkeit < 50 $\mu\text{S}/\text{cm}$ angenommen. Da der isoionische und der isoelektrische Punkt der Gelatine bei dieser Deionisierungsmethode gleich sind, entspricht der pH-Wert der deionisierten Gelatinelösung folglich dessen IEP [193].

Zusätzlich zur experimentellen Bestimmung des IEP wurde auch der theoretische IEP mithilfe der *ExPASy Proteomics Tools Site* berechnet [194, 195]. Die von Sewald *et al.* [192] veröffentlichte Aminosäurezusammensetzung für dasselbe Gelatine-Rohmaterial wurde dabei für die IEP-Berechnung von *clickGel* so verändert, dass Lysin und Hydroxylysin teilweise durch Glycin ersetzt wurden, um die Derivatisierung der Aminogruppen zu simulieren.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Um die Gelatinederivate entsprechend ihrer hydrodynamischen Radien aufzutrennen und anhand der dadurch auftretenden Brechungsindexunterschiede zu analysieren, wurde die Größenausschlusschromatographie (GPC) wie zuvor für Gelatine-Methacryloyl-Derivate beschrieben, durchgeführt [192]. Die Messungen wurden am IGVP freundlicherweise von Tobias Götz und Dr. Lisa Rebers durchgeführt. 50 μL der Probenlösungen mit einer Konzentration von je 1 mg/mL wurden bei einer Flussrate von 0,5 mL und 40 °C auf die Trennsäule aufgegeben. Als Eluent wurde eine Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (11,88 g/L, pH 9,2) verwendet.

Rheologische Untersuchungen

Die rheologische Messung der Speicher- und Verlustmoduln (G' und G'') der in Wasser gequollenen Hydrogele erfolgte mithilfe der oszillatorischen Rheologie unter Verwendung einer Parallelplattengeometrie (\varnothing 20 mm). Die Amplitudensweeps (Frequenz = 1 Hz, zwischen 0,01 % und 100 %) und Frequenzsweeps (Amplitude = 0,1 %, zwischen 0,1 Hz und 10 Hz) wurden mit einer Normalkraft von 1 N bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Messungen wurden am IGVP freundlicherweise von Felix Markus durchgeführt.

4.6.5 Biologische Charakterisierung Azid-Gelatine-haltiger Hydrogele

Die biologische Charakterisierung der *clickGel*-haltigen Hybridhydrogele umfasste die Beurteilung der Zytotoxizität sowie der Zellantwort von primären humanen dermalen Fibroblasten.

Zytotoxizitätsuntersuchungen

Die Zytotoxizität von PEG-DA-Hydrogelen, sowohl mit als auch ohne Zusatz von *clickGel*, wurde in einem (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2-tetrazolium)-Test (MTS-Assay) anhand der internationalen Norm DIN EN ISO 10993-5 bewertet, die relative Zellproliferationsraten > 80 % als nicht zytotoxisch definiert [198, 199].

Durchführung:

- Zu testende Hybridhydrogele mit 1 mL DMEM pro 0,1 g der zuvor gewaschenen und gequollenen Hydrogele für 72 Stunden im Brutschrank extrahieren.
- Reines DMEM als Referenz mitführen und identisch behandeln.
- Die Hydrogele entnehmen und die resultierenden Extrakte bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung lagern (max. 24 Stunden).
- 24 Stunden vor Abschluss der Extraktion primäre humane Fibroblasten in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte aussäen. Dazu die Zellzahl der Suspension auf 10^5 Zellen/mL mit supplementiertem DMEM einstellen und 200 μ L dieser Suspension in jede der Vertiefungen der 96-Well-Platte überführen (= $2 \cdot 10^4$ Zellen/ Well). Dabei für jeden zu untersuchenden Hydrogelextrakt sechs Wells mit Fibroblasten besiedeln.
- Als Referenz sechs Wells mit 200 μ L DMEM ohne Zellen füllen.
- Die Zellen ü. N. bei Standardzellkulturbedingungen inkubieren, um eine vollständige Zelladhäsion zu ermöglichen.
- Am darauffolgenden Tag die zu untersuchenden Extrakte mit jeweils 10 % FCS versetzen.
- Anschließend das Zellkulturmedium vorsichtig aus den Wells entfernen und durch die entsprechenden FCS-supplementierten Extrakte ersetzen.
- Als Negativkontrolle supplementiertes Standardzellkulturmedium in die Vertiefungen geben.
- Als Positivkontrolle supplementiertes Zellkulturmedium mit 1 % SDS versetzen und in die entsprechenden Vertiefungen geben.
- Die Zellen anschließend weitere 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen inkubieren.
- Nach Ablauf der Zeit die Extrakte bzw. das Zellkulturmedium aus den Vertiefungen entfernen und vorsichtig 120 μ L MTS-Arbeitslösung (20 μ L MTS-Stammlösung + 100 μ L DMEM ohne jegliche Zusätze) zugeben.

- Sobald die Absorption der Negativkontrollen Werte zwischen 0,8 - 1 erreichen (i. d. R. nach 30 – 45 Minuten bei 37 °C) die Absorption der Proben bei 492 nm mithilfe eines Mikroplatten-Readers messen.
- Den Blind- bzw. Referenzwert von allen Messpunkten abziehen und aus den korrigierten Messwerten den Mittelwert bilden.
- Die Positivkontrolle („zytotoxisch“) auf 0 % Viabilität und die Negativkontrolle („nicht zytotoxisch“) auf 100 % normieren.
- Die Anzahl vitaler Zellen in der Kultur relativ zu den Absorptionswerten der Negativkontrolle berechnen.

Zellantwort auf Azid-Gelatine-haltige Hybridhydrogele

Die Zellantwort auf die (*click*)Gel-haltigen PEG-DA-Hydrogele wurde durch die Aussaat primärer humaner dermaler Fibroblasten auf die jeweiligen Hydrogeloberflächen untersucht. Zu diesem Zweck wurden zylindrische Hydrogele (\varnothing 3,5 cm) generiert, die in der Mitte eine zylindrische Vertiefung (\varnothing 2,4 cm) und einer Tiefe von 0,5 mm aufwiesen.

Durchführung:

- Nach der Präparation die Hydrogele 24 Stunden lang mit Wasser und anschließend jeweils zweimal für je 24 Stunden mit supplementiertem DMEM waschen.
- Nach Ablauf der Zeit $6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in die Vertiefungen der Hydrogele pipettieren.
- Die Zellen zunächst während der ersten 3 Stunden der *in-vitro*-Kultivierung unter Standardzellkulturbedingungen adhären lassen.
- Nach Ablauf der 3 Stunden vorsichtig 3 mL supplementiertes DMEM zugeben und die Zellen für weitere 96 Stunden unter statischen Zellkulturbedingungen kultivieren.
- Nach Ablauf der Zeit die zelluläre Antwort wie unter **Kapitel 4.4.3** beschrieben untersuchen. Dazu die Zellen zunächst fixieren, permeabilisieren, blocken und die Zytoskelette mit Alexa Fluor® 546-Phalloidin sowie die Zellkerne mit DAPI färben.
- Um die fluoreszenzgefärbten Zellen unter dem cLSM analysieren zu können, den äußeren Ring der Hydrogele mit einem Skalpell entfernen, sodass die Hydrogele jeweils mit einem Tropfen Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt werden können (siehe auch **Kapitel 4.3.2**).
- Um die so hergestellten Präparate vor dem Austrocknen zu schützen, ein weiteres Deckglas auf die Unterseite des Hydrogels auflegen.

- *ImageJ*-Auswertung: Abgrenzung der Zellkerne im DAPI-Kanal vom Hintergrund mithilfe des Schwellenwertverfahrens, anschließend Zellzählung über die Funktion „*Analyze Particles*“.

4.7 Statistik

Alle Experimente wurden in unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungsversuchen mit (*click*)ECM von drei individuellen Spendern durchgeführt. Die Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben jeweils in $n \geq 3$ mit mindestens drei technischen Replikaten durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe einer einseitigen Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) untersucht. Die Daten sind jeweils als Mittelwerte \pm Standardabweichung (engl. *standard deviation*, SD) ausgedrückt. Wie in den Diagrammen gekennzeichnet, wurden p -Werte, die kleiner als $\alpha = 0,05$ (*), $\alpha = 0,01$ (**) oder $\alpha = 0,001$ (***) waren, als statistisch signifikant definiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die vorliegende Arbeit baut, wie bereits in **Kapitel 1.4.3.1** erläutert, auf der 2015 veröffentlichten Dissertationsschrift von Sybil Mara Ruff auf [122], deren Ergebnisse in Teilen 2017 auch publiziert wurden [114]. Das unter **Kapitel 1.4.3** und **Kapitel 4.1.2** beschriebene MGE mit Ac₄GalNAz wurde in Ruffs Arbeit zur Modifizierung von *in vitro* generierter Fibroblasten-ECM genutzt, die anschließend als Oberflächenbeschichtung auf DIBO-funktionale Oberflächen aufgebracht wurde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Gewinnung und umfangreichen Charakterisierung der biogenen, d. h. aus *in vitro* kultivierten Fibroblasten gewonnenen, Azid-modifizierten extrazellulären Matrix für die Anwendung als Biomaterial. Dabei wurden zunächst die von Ruff *et al.* [114, 122] etablierten Protokolle zur Isolation und Aufarbeitung der *click*ECM mit einem Aufkonzentrierungsschritt auf Basis der Mikrozentrifugation erweitert, sodass die biogene *click*ECM **verlässlich und reproduzierbar verarbeitet** werden kann. Des Weiteren sollte die **Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM quantifiziert** werden und die generierten *click*ECM-Beschichtungen dahingehend weiterentwickelt werden, dass **bioaktive, reproduzierbare, homogene und geschlossene Oberflächenbeschichtungen** damit erzeugt werden können. Um die *click*ECM für weitere Biomaterialanwendungen wie bspw. als **Biokonjugationsplattform** oder als **kovalent immobilisierte biologische Komponente in Hybridhydrogelen** nutzbar zu machen, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der **umfangreichen Charakterisierung** der *click*ECM hinsichtlich ihrer **biomolekularen Zusammensetzung**.

5.1 Aufarbeitung der (*click*)ECM

Nach der osmotischen Lyse und Aufreinigung liegt die generierte (*click*)ECM als stark quervernetztes und in Wasser gequollenes hydrogelartiges Biopolymernetzwerk vor, das nicht pipettiert werden kann und sich folglich nicht reproduzierbar portionieren oder verarbeiten lässt. Um diese Einschränkung zu umgehen, etablierte Ruff ein Homogenisierungsprotokoll, bei dem die dort generierte (*click*)ECM durch die sukzessive Zugabe von Essigsäure (HAc) fragmentiert wurde (**Anhang Kapitel 7.2.1, Abbildung A1 a**) [114, 122]. Die (*click*)ECM-Konsistenz änderte sich dadurch von einem vergleichsweise festen Hydrogelagglomerat zu einer flüssigen und damit leichter zu pipettierenden Suspension

(Anhang Kapitel 7.2.1, Abbildung A1 b). Allerdings lagen auch nach der Homogenisierung mit HAc z. T. noch relativ große (*click*)ECM-Fragmente vor, die beim Transfer der Suspensionen häufig zu Verschlüssen der Pipettenspitzen führten (Abbildung A1 c). Durch die Zugabe von HAc war es ferner notwendig, den durch die HAc in den sauren Bereich verschobenen pH-Wert zu neutralisieren, weshalb als letzter Schritt ein 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer zugegeben werden musste. Die nicht aufkonzentrierten (*click*)ECM-Suspensionen wurden folglich um weitere 19 % (v/v) verdünnt, sodass die Fragmente relativ vereinzelt in der entstehenden Suspension vorlagen (Anhang Kapitel 7.2.1, Abbildung A1 b). Durch die ungleichmäßige Größenverteilung und die zusätzliche Verdünnung der (*click*)ECM-Suspensionen gestaltete sich der reproduzierbare Transfer definierter Mengen an (*click*)ECM schwierig. Auch die veröffentlichten cLSM-Aufnahmen der resultierenden Schichten waren durch ein relativ inhomogenes Beschichtungsbild charakterisiert und bedeckten die darunterliegende Oberfläche nicht vollständig. Stattdessen waren noch einzelne (*click*)ECM-Fragmente erkennbar, deren Fragmentgrößen in den gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen auf ca. 1 μm bis 7 μm geschätzt werden konnten [114, 122].

Das Ziel des ersten Arbeitspakets dieser Arbeit bestand deshalb in der Etablierung eines verlässlichen Protokolls zur Prozessierung der (*click*)ECM, durch welches eine reproduzierbar verwendbare (*click*)ECM-Suspension generiert werden kann, um so eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu gewährleisten. Zur Strukturierung der hierzu durchgeführten Arbeiten und Experimente wurde folgende Hypothese formuliert:

Durch die **Erweiterung des Aufarbeitungsprotokolls** der isolierten (*click*)ECM mit einem **Aufkonzentrierungsschritt** mittels Zentrifugation kann die **ECM-Konzentration** **signifikant gesteigert** werden. Diese gesteigerte Konzentration kann beibehalten werden, wenn die **Homogenisierung** der (*click*)ECM durch einen mechanischen Krafteintrag mithilfe eines Kugelmühlen-Homogenisators erfolgt, sodass auf die Zugabe von Essigsäure und Neutralisierungspuffer verzichtet werden kann. Die dabei entstehenden (*click*)ECM-Suspensionen weisen **vergleichbare Fragmentgrößenverteilungen** auf und können **reproduzierbar verarbeitet** werden. Die **Proteinstrukturen** sowie die **Azide der *click*ECM** werden durch die mechanische Fragmentierung nicht geschädigt.

Die Ergebnisse, die in diesem Arbeitspaket entstanden sind, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits in zwei *peer-reviewed* Publikationen veröffentlicht [177, 200].

5.1.1 Aufkonzentrierung isolierter (*click*)ECM

Um das während der Lyse durch Quellung aufgenommene Wasser aus der (*click*)ECM zu entfernen und folglich die Biomolekülkonzentration zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Protokoll etabliert, mit dem das aufgenommene Wasser durch Filtration von den (*click*)ECM-Biomolekülen abgetrennt werden konnte. Erfahrungsgemäß konnten aus einer ZKS (\emptyset 14,5 cm) nach der Lyse und Aufreinigung mit Reinstwasser im Mittel etwa 2,8 mL (*click*)ECM isoliert werden. Mithilfe eines sogenannten „Spin-Filters“ (ein Zentrifugenröhrchen mit Membraneinsatz, siehe auch **Kapitel 4.1.3**) und den einwirkenden Zentrifugalkräften wurde das Wasser aus der gequollenen (*click*)ECM durch die Membran ausgeschleudert, während die (*click*)ECM-Biomoleküle durch den Membraneinsatz (10 kDa MWCO) zurückgehalten wurden. Nach der Aufkonzentrierung der (*click*)ECM-Menge aus einer ZKS verblieben im Schnitt ca. 150 μ L (*click*)ECM im Membraneinsatz des Spin-Filters zurück. Dies entsprach einem Aufkonzentrierungsfaktor von etwa 20X. Die (*click*)ECM lag anschließend als relativ festes und kompaktes Agglomerat vor.

Um sicherzustellen, dass keine Proteine die Filtermembran passieren konnten, wurde das Filtrat via Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) und einer anschließender Coomassie-Brilliant-Blau R-250 *Imperial™* Protein-Färbung analysiert (**Abbildung 12**).

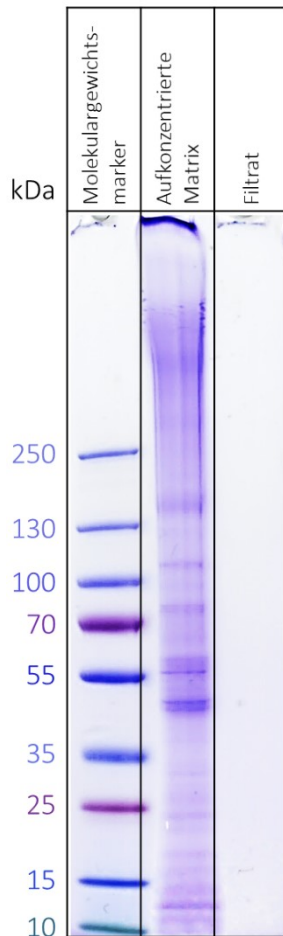


Abbildung 12: Gelelektrophoretische Analyse des Filtrats aus der Aufkonzentrierung der (click)ECM mithilfe eines Spin-Filters. Das durch Quellung aufgenommene Wasser wurde durch die Membran des Einsatzes aus der (click)ECM ausgeschleudert, während die Membran mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 10 kDa die (click)ECM-Biomoleküle zurückhielt und folglich aufkonzentrierte. Das Filtrat sowie die aufkonzentrierte (click)ECM wurden getrennt voneinander via SDS-PAGE in einem Gradientengel aufgetrennt und die Proteine anschließend in einer Coomassie-Brilliant-Blau R-250 *Imperial™* Protein-Färbung angefärbt. In der Spur des Filtrats waren im Gegensatz zur aufkonzentrierten Matrix keine Proteinbanden nachweisbar.

Wie aus dem in **Abbildung 12** gezeigten Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel ersichtlich war, waren - anders als in der Spur der aufgetrennten aufkonzentrierten (click)ECM - im Filtrat keine Banden erkennbar. Dies ließ darauf schließen, dass keine Matrixproteine die Membran passieren konnten und es folglich zu einer Aufkonzentrierung der (click)ECM-Biomoleküle kam.

5.1.2 Homogenisierung isolierter und aufkonzentrierter (*click*)ECM

Wie eingangs erläutert, homogenisierten Ruff *et al.* die generierte (*click*)ECM zuvor durch die sukzessive Zugabe von HAc [114, 122]. Die Nachteile dieser Methode bestanden in der unzureichenden Homogenität der (*click*)ECM-Fragmente sowie der unerwünschten Verdünnung der Suspensionen durch die Zugabe von HAc und HEPES-Puffer.

Um die isolierte (*click*)ECM nach der Aufkonzentrierung in eine homogene Suspension zu überführen, die problemlos und reproduzierbar mit einer Pipette transferiert werden konnte, wurde in dieser Arbeit ein neues Homogenisierungsprotokoll etabliert, welches nicht länger auf der Zugabe von HAc basierte. Stattdessen wurde die Homogenisierung durch den mechanischen Krafteintrag eines Kugelmühlen-Homogenisators erreicht. Hierzu wurde die aufkonzentrierte (*click*)ECM-Suspension in ein steriles, sogenanntes *Lysis-Tube* überführt. Diese kleinen 2,0 mL-Schraubgefäße waren mit Keramikkügelchen (bestehend aus 83 % Zirkoniumoxid (ZrO) und 17 % Ceriumoxid (CeO)) im Größenbereich von \varnothing 1,4 mm - 1,6 mm gefüllt [165]. Durch den mechanischen Krafteintrag des Kugelmühlen-Homogenisators wurden die Kügelchen mit hohen Geschwindigkeiten durch die (*click*)ECM-Suspensionen beschleunigt und zerrissen dabei das Biomolekülnetzwerk. Die (*click*)ECM-Konsistenz änderte sich von einem relativ festen, nicht pipettierbaren Hydrogelagglomerat zu einer leicht viskosen, aber dennoch mit einer Direktverdrängerpipette einfach zu pipettierenden Suspension.

Überprüfung der Homogenität der (*click*)ECM-Suspensionen anhand der Feuchtgewichte

Um zu überprüfen, ob die bei dieser Homogenisierung entstehenden (*click*)ECM-Suspensionen reproduzierbar transferiert werden konnten, wurden zunächst identische Volumina dieser homogenisierter (*click*)ECM-Suspensionen von drei unterschiedlichen Donoren in ein Glasröhrchen überführt und das Gewicht der übertragenen Aliquots gravimetrisch ermittelt (**Abbildung 13**).

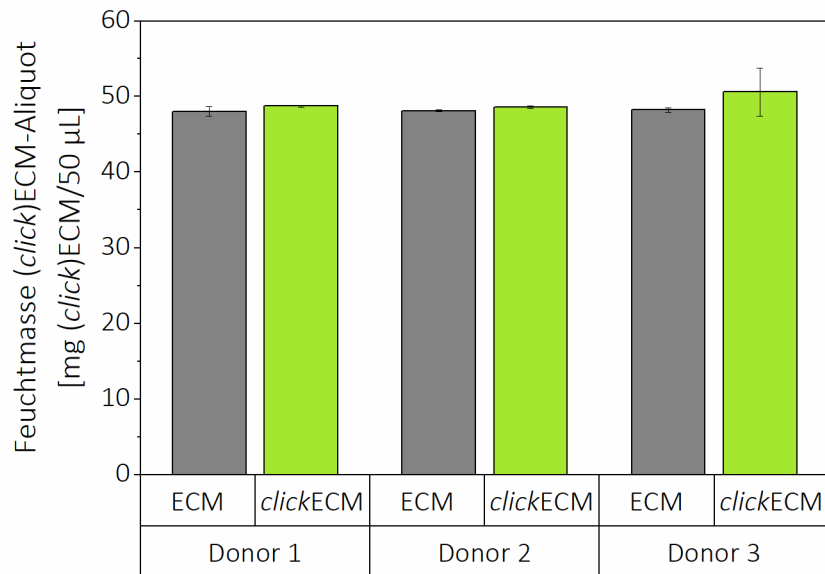


Abbildung 13: Gravimetrische Bestimmung der (click)ECM-Feuchtmassen von 50 µL-(click)ECM-Aliquots. Für die Untersuchung der Homogenität der (click)ECM-Suspensionen nach der mechanischen Homogenisierung durch den verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator wurden in drei unabhängigen Versuchen (n = 3) mit je drei technischen Replikaten je 50 µL der jeweiligen (click)ECM-Suspensionen mit einer Direktverdrängerpipette in ein Glasgefäß überführt und das Gewicht der übertragenen Aliquots gravimetrisch bestimmt. Zwischen den übertragenen Massen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Die in **Abbildung 13** dargestellte gravimetrische Analyse der transferierten Aliquots ergab, dass sich die ermittelten (click)ECM-Feuchtmassen statistisch nicht signifikant voneinander unterscheiden, sodass eine reproduzierbare Portionierung der aufkonzentrierten und mit dem Kugelmühlen-Homogenisator homogenisierten (click)ECM-Suspensionen mithilfe einer Direktverdrängerpipette gezeigt werden konnte.

Fragmentgrößenanalyse der aufkonzentrierten und homogenisierten (click)ECM

Um die aufkonzentrierten und homogenisierten (click)ECM-Suspensionen hinsichtlich der darin enthaltenen Fragmentgrößen zu analysieren, wurde im nächsten Schritt eine impedanzbasierte Messmethode angewandt, um die Häufigkeits- und Volumenverteilungen (A_n und V_n) der einzelnen Suspensionen zu ermitteln. Das Messprinzip entsprach dabei der für die Zellzählung angewandten impedanzbasierten Messmethode, bei der die Fragmente eine Messpore passierten und beim Durchtritt einen elektrischen Impuls im angelegten Spannungsfeld erzeugten (siehe auch **Kapitel 4.1.1** Abschnitt „*Impedanzbasierte Zellzählung*“ und **Kapitel 4.1.4** Abschnitt „*Impedanzbasierte Fragmentgrößenanalyse homogenisierter (click)ECM*“). Die Häufigkeitsverteilung beschreibt, wie viele (click)ECM-Fragmente in der untersuchten Suspension einen bestimmten Durchmesser d aufwiesen; die Volumenverteilung

hingegen beschreibt, welchen Anteil diese Fragmente am Gesamtvolumen hatten. Werden die Verteilungen kumulativ, d. h. aufsummiert dargestellt, können zusätzlich die charakteristischen Kenngrößen d_{10} , d_{50} und d_{90} ermittelt werden. Der d_{10} -Wert gibt den Durchmesser an, unter dem sich 10 % der Verteilung befanden. Die d_{50} - und d_{90} -Werte sind analog definiert. Der d_{50} -Wert entspricht folglich auch gleichzeitig dem Median (oder Zentralwert) der Verteilung. Ein repräsentatives Beispiel der aufgezeichneten Volumenverteilungen für die (*click*)ECM eines Donors ist in **Abbildung 14** aufgeführt. Alle weiteren Volumen- sowie die dazugehörigen Häufigkeitsverteilungen sind im **Anhang** unter **Kapitel 7.2.1, Abbildung A2** gelistet.

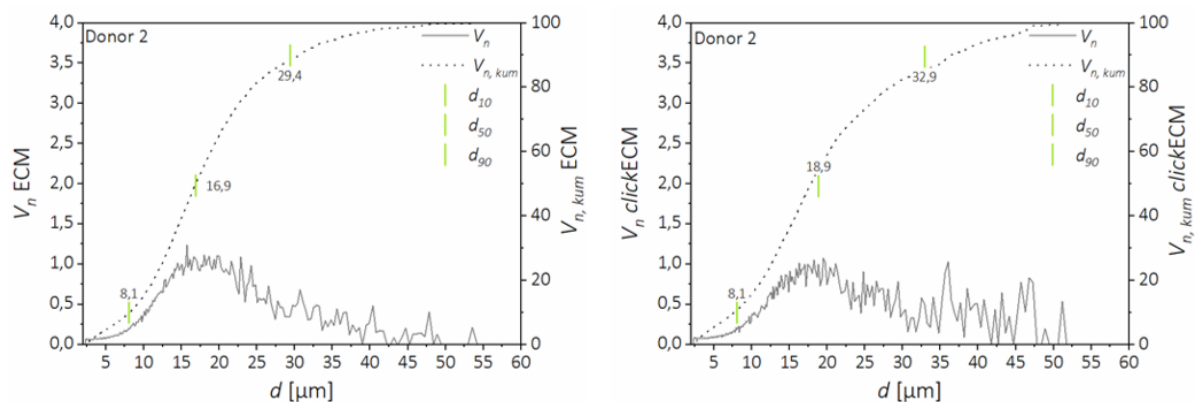


Abbildung 14: Repräsentative Volumenverteilungen (V_n und $V_{n,kum}$) der (*click*)ECM-Fragmente eines Donors nach 4-minütiger mechanischer Homogenisierung im verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator. Gezeigt sind die mittels impedanzbasierter Partikelzählung erhaltenen Mittelwerte dreier unabhängig voneinander homogenisierter und analysierter (*click*)ECM-Suspensionen ($n = 3$) mit jeweils drei technischen Replikaten. Die d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Werte sind in Grün markiert und mit den entsprechenden Durchmessern $[\mu\text{m}]$ versehen. Der d_{10} -Wert gibt den Durchmesser an, unter dem sich 10 % der Verteilung befinden. Die d_{50} - und d_{90} -Werte sind analog definiert.

Die in **Abbildung 14** sowie in **Abbildung A2** gezeigten Volumenverteilungen wiesen allesamt monomodale Formen auf. Da die (*click*)ECM-Fragmentgrößen im Bereich von $2,3 \mu\text{m} - 60 \mu\text{m}$ analysiert wurden, konnte das Vorhandensein von Fragmenten $> 60 \mu\text{m}$ folglich ausgeschlossen werden, da diese aufgrund ihrer Größe die Messkapillare blockiert hätten.

Um weitere Kenngrößen zur Verteilung der Fragmente in den aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM-Suspensionen zu erhalten, wurden neben den d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Werten aus den Volumenverteilungen auch die Span- und Moduswerte (sowohl aus den Häufigkeits- als auch den Volumenverteilungen) berechnet (**Tabelle 4**). Der Span charakterisiert die Breite der Verteilung, während der Modus den Durchmesser der (*click*)ECM-Fragmente angibt, der am häufigsten in der jeweiligen Verteilung vorkam und folglich das Maximum bildete.

Tabelle 4: Vergleich aller d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Mittelwerte (berechnet aus den Volumendistributionen) sowie der mittleren Span- und Moduswerte (berechnet aus den Volumen- und Häufigkeitsverteilungen) der untersuchten homogenisierten (*click*)ECM-Proben. Die Messung erfolgte mit den Matrices dreier individueller Donoren in drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$ mit jeweils drei technischen Replikaten).

Donor	Matrix	Volumendistribution					Häufigkeitsverteilung	
		d_{10} [μm]	d_{50} [μm]	d_{90} [μm]	Span [μm]	Modus [μm]	Span [μm]	Modus [μm]
1	ECM	2,7 $\pm 0,3$	9,7 $\pm 3,8$	20,8 $\pm 2,3$	1,9	23,9 $\pm 6,3$	0,9	2,0
	<i>click</i> ECM	2,9 $\pm 0,4$	12,8 $\pm 3,8$	35,1 $\pm 4,4$	2,5	38,1 $\pm 3,4$	0,9	2,0
2	ECM	8,1 $\pm 0,9$	16,9 $\pm 0,7$	29,5 $\pm 3,0$	1,3	20,0 $\pm 3,8$	2,5	2,4
	<i>click</i> ECM	8,0 $\pm 1,9$	19,0 $\pm 3,2$	32,9 $\pm 7,6$	1,3	29,9 $\pm 14,0$	2,3	2,4
3	ECM	9,7 $\pm 1,3$	19,5 $\pm 1,1$	33,1 $\pm 3,7$	1,2	31,8 $\pm 6,8$	2,9	2,4
	<i>click</i> ECM	10,0 $\pm 2,5$	21,5 $\pm 3,2$	33,6 $\pm 3,1$	1,1	27,9 $\pm 5,5$	2,2	2,3

Anhand der in **Tabelle 4** dargestellten d_{10} - und d_{90} -Mittelwerte konnte darauf geschlossen werden, dass die aus allen Datenpunkten (d. h. alle Donoren, alle Replikate) berechneten mittleren Fragmentdurchmesser der (*click*)ECM-Suspensionen Größenordnungen zwischen $7,6 \pm 3,1 \mu\text{m}$ (Mittelwert d_{10}) und $31,3 \pm 6,1 \mu\text{m}$ (Mittelwert d_{90}) aufwiesen. Der Vergleich dieser charakteristischen Werte zeigte, dass die Fragmentgrößen zwischen den biologischen Replikaten variierten. Diese Spendervariabilität war zu erwarten, da Unterschiede in der Festigkeit der Matrices bereits im Verlauf der (*click*)ECM-Isolierung zu beobachten waren. Basierend auf den in **Abbildung 14** bzw. **Abbildung A2** gezeigten Daten konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass die resultierenden (*click*)ECM-Fragmentgrößen in einem ausreichend engen Bereich lagen, um homogene Oberflächenbeschichtungen erzeugen zu

können. Das in dieser Arbeit etablierte Homogenisierungsprotokoll ermöglichte folglich eine reproduzierbare Handhabung (z. B. Transfer der Suspensionen durch Pipettieren) aller (*click*)ECM-Suspensionen und kam dabei gänzlich ohne die Zugabe zusätzlicher Chemikalien aus.

Nachweis der Integrität der clickECM-Azide sowie charakteristischer ECM-Proteine

Um sicherzustellen, dass die *click*ECM-Azide nach der Prozessierung noch chemisch adressierbar und die (*click*)ECM-Proteine noch intakt waren, wurden im nächsten Schritt (Immun-)Fluoreszenzfärbungen durchgeführt, um die Integrität der Azide und ECM-Proteine zu verifizieren. Dazu wurden die aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM-Suspensionen der drei individuellen Donoren wie unter **Kapitel 4.4** beschrieben auf eine DIBO-funktionale Oberfläche aufgebracht und vollständig aufgetrocknet, sodass eine makroskopische Beschichtung entstand (**Abbildung A3**). Die Azide der *click*ECM wurden anschließend mithilfe eines Alkin-funktionalen Fluorophors (Alexa Fluor® 488-Alkin) in einer CuAAC (siehe auch **Kapitel 1.4**) fluoreszenzmarkiert. Die charakteristischen (*click*)ECM-Proteine Kollagen Typ I und IV sowie Fibronectin wurden immunhistochemisch mithilfe von spezifischen Antikörpern markiert und fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (**Abbildung 15**). Beschichtungen aus nicht modifizierter ECM dienten bei diesen Färbungen jeweils als Kontrolle.

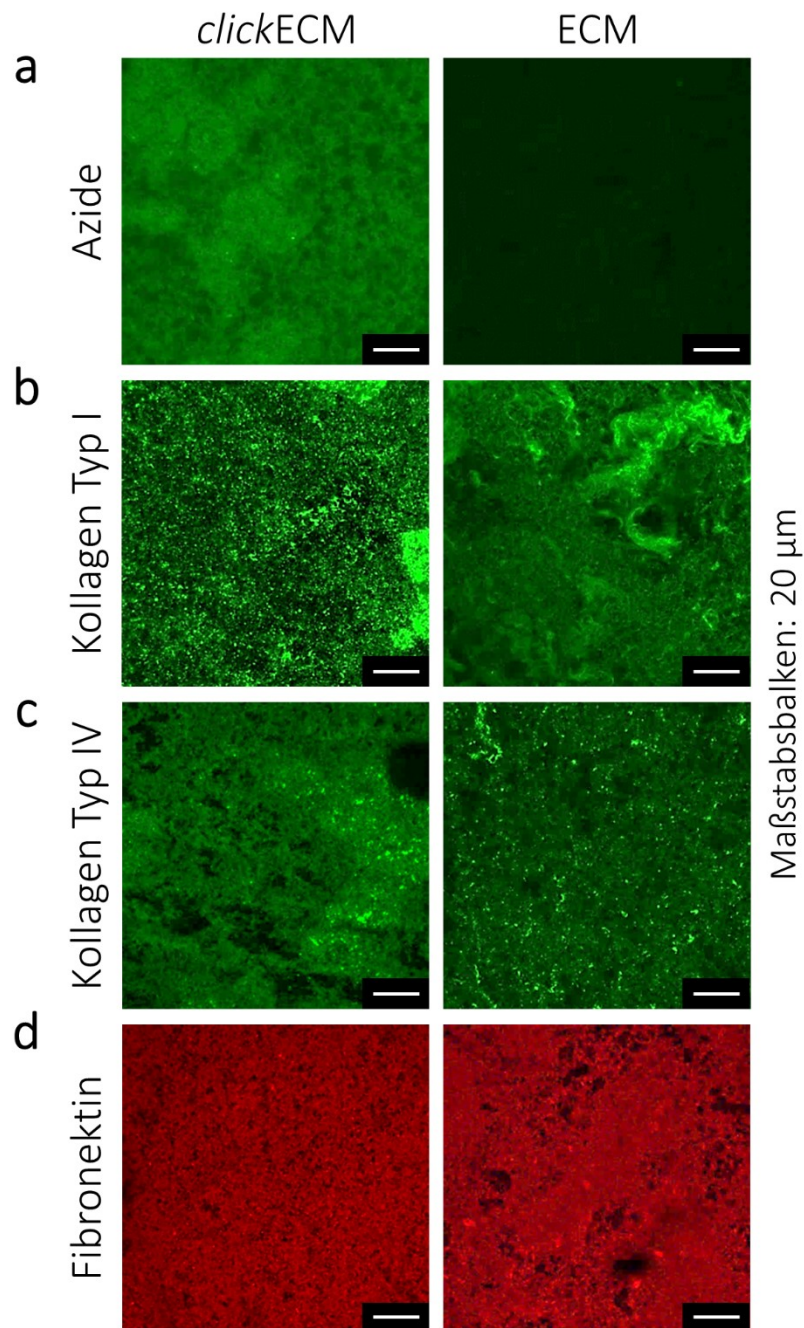


Abbildung 15: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Integrität der *click*ECM-Azide sowie der charakteristischen ECM-Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Fibronectin nach der Aufkonzentrierung und mechanischen Homogenisierung durch den verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator. **a)** Anfärbung der *click*ECM-Azide (in Grün dargestellt) durch die CuAAC mit Alexa Fluor® 488-Alink zum Nachweis der sterischen Zugänglichkeit und chemischen Reaktivität der abiotischen Gruppen in der aufkonzentrierten und homogenisierten *click*ECM. **b-d)** Immunhistochemischer Nachweis der charakteristischen ECM-Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV (beide in Grün dargestellt) und Fibronectin (in Rot dargestellt) in der aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM. Entsprechende Isotyp- und Sekundäntikörperkontrollen (nicht dargestellt) bestätigten die Spezifität der verwendeten Antikörper. Die Mikroskopeinstellungen wurden für die jeweils zusammengehörenden (*click*)ECM-Proben identisch gehalten, um eine direkte Vergleichbarkeit zu schaffen. Maßstabsbalken: 20 µm.

In **Abbildung 15 a** war die erfolgreiche Azid-Modifizierung der ECM via MGE anhand der homogen über die gesamte *click*ECM-Beschichtung verteilten, in Grün dargestellten Azide in der linken Bildreihe eindeutig erkennbar. Die erfolgreiche Konjugation mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor bestätigte zum einen, dass die kleinen chemisch funktionellen Gruppen auch nach der Prozessierung und der vollständigen Auftrocknung der *click*ECM auf die zu beschichtenden Oberflächen sterisch noch zugänglich und chemisch reaktiv waren. Zum anderen konnte davon ausgegangen werden, dass, auch wenn ein Teil der *click*ECM-Azide mit den DIBO-Gruppen auf der Oberfläche abreagiert haben (siehe auch **Abbildung 10**), noch ausreichend freie Azide für die Reaktion mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor zur Verfügung standen und folglich eine intensive Fluoreszenz detektiert werden konnte. Beschichtungen aus nicht modifizierter ECM dienten in diesem Versuch als Kontrolle (rechte Bildspalte in **Abbildung 15 a**) und bestätigten die Spezifität der Färbung und der zugrunde liegenden *Click*-Reaktion. Im Fall der ECM-Kontrolle war lediglich ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal detektierbar, welches mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine unspezifische Adsorption der Alkin-funktionalen Fluorophormoleküle an die ECM-Beschichtungen zurückführbar war.

Zur Untersuchung, ob die Aufkonzentrierung und die mechanische Homogenisierung durch den Kugelmühlen-Homogenisator die Matrixproteine schädigten, wurden Immunfluoreszenzfärbungen der charakteristischen ECM-Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Fibronectin durchgeführt. Die in **Abbildung 15 b-d** gezeigten repräsentativen cLSM-Aufnahmen belegten, dass die (*click*)ECM-Proteine auch nach der Aufarbeitung sowie der vollständigen Trocknung auf den Oberflächen mithilfe der spezifischen Antikörper nachweisbar waren. Diese Tatsache belegte zudem, dass die empfindlichen Epitope innerhalb der (*click*)ECM-Strukturen noch intakt waren, sodass die hochspezifische und selektive Bindung zwischen Epitop und Paratop stattfinden konnte. Passende Isotyp- und Sekundärantikörperkontrollen sicherten die Spezifität der verwendeten Antikörper.

5.1.3 Bewertung der ersten Hypothese zur Aufarbeitung der (*click*)ECM

Zusammenfassend konnte für das erste Arbeitspaket der vorliegenden Arbeit festgestellt werden, dass es möglich war, ein optimiertes Protokoll zur Aufkonzentrierung und zur Homogenisierung der (*click*)ECM zu etablieren. Die bei der Aufkonzentrierung erreichte gesteigerte (*click*)ECM-Konzentration konnte durch die mechanische Homogenisierung und den Verzicht auf die Zugabe von Chemikalien beibehalten werden. Die bei der Homogenisierung entstandenen (*click*)ECM-Suspensionen wiesen gleichbleibend enge

Fragmentgrößenverteilungen auf und konnten reproduzierbar verarbeitet und transferiert werden. Die Proteinstrukturen wurden durch die mechanische Fragmentierung offensichtlich nicht geschädigt und die *click*ECM-Azide waren nach wie vor sterisch zugänglich und chemisch reaktiv. Demnach konnte die erste Hypothese in allen Punkten als bestätigt angenommen werden.

Für eine potenzielle Weiterführung dieser Arbeit wäre es interessant, noch weitere Homogenisierungsmethoden wie bspw. die Rotor-Stator-Homogenisierung zu testen und die entstehenden (*click*)ECM-Suspensionen mit denen aus der vorliegenden Arbeit zu vergleichen. Ferner wäre es wünschenswert, die in dieser Arbeit ermittelte Fragmentgrößen nochmals mit einer anderen, möglichst auf einem anderen Nachweisprinzip beruhenden Methode zu validieren.

5.2 Quantifizierung der Azidkonzentration in der (*click*)ECM

Die erfolgreiche Modifikation der *click*ECM mit Azidgruppen durch das MGE konnte in der Vergangenheit erstmalig von Ruff *et al.* [114, 122] qualitativ gezeigt werden. Auch die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit belegten anhand von Fluoreszenzfärbungen mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin qualitativ das Vorhandensein der Azide in der *click*ECM und die Abwesenheit dieser abiotischen Gruppen in der nicht modifizierten ECM (**Abbildung 15** und **Abbildung A5**).

Während des MGEs werden die chemisch modifizierten Monosaccharide im Zuge der natürlichen metabolischen Vorgänge in den Zellen verstoffwechselt und in der Proteinbiosynthese sowohl in intra- als auch extrazelluläre Glykanstrukturen eingebaut [155, 157, 158, 201-204]. Bisher sind in der Fachliteratur keine Arbeiten publiziert, die die Konzentration an Aziden in modifizierter ECM oder vergleichbaren unlöslichen biologischen Proben quantifizierten. Die Azidkonzentration stellt sowohl für die Optimierung des MGEs als auch für die Stöchiometrie der Konjugationsreaktionen der *click*ECM mit diversen Alkin-gekoppelten Funktionalitäten eine nützliche Kenngröße dar. Zur Strukturierung der hierzu durchgeführten Versuche wurde folgende Hypothese formuliert:

Die Konzentration an Aziden innerhalb der *clickECM* kann anhand der Fluoreszenzintensität einer Fluorophorlösung abgeschätzt werden, die zuvor mit einer definierten Menge *clickECM* inkubiert wurde. Nach Abtrennung der unlöslichen *clickECM* mittels Ultrazentrifugation kann die Fluoreszenzintensität des Überstandes mit der Fluoreszenzintensität der Fluorophorstammlösung abgeglichen und anhand einer Kalibrationsreihe in die Azidkonzentration der *clickECM* umgerechnet werden.

Wie unter **Kapitel 4.2** beschrieben, wurden die Azide innerhalb der *clickECM* zur Abschätzung deren Konzentration mit einem Alkin-funktionalen Fluorophor (Alexa Fluor® 488-Alkin) über eine CuAAC (**Kapitel 1.4**) kovalent konjugiert. Durch die anschließende Abtrennung der unlöslichen *clickECM*-Fragmente durch Ultrazentrifugation wurde der Anteil an Alkin-Fluorophoren mit der unlöslichen *clickECM* abgeschieden, der theoretisch den spezifisch gebundenen sowie einen gewissen Teil an unspezifisch an den Biomolekülen adsorbierten Fluorophormolekülen entsprach (das praktische Vorgehen ist in **Abbildung 9** schematisch dargestellt). Entsprechend der aufgestellten Hypothese wurde experimentell untersucht, ob es zu einer Abnahme der Fluorophorkonzentration in der Färbelösung kam.

Im Zuge der Auswertung des Versuchs wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten zunächst mit dem Blindwert, d. h. der Fluoreszenzintensität der Katalysatorlösung aus dem verwendeten *Click-iT™ Cell Reaction Buffer Kit* korrigiert, mit der die Fluorophorstammlösung zuvor verdünnt wurde. Diese Fluoreszenzintensitäten sind in den Balkendiagrammen in **Abbildung 16** für die (*click*)ECM zweier Donoren grafisch dargestellt.

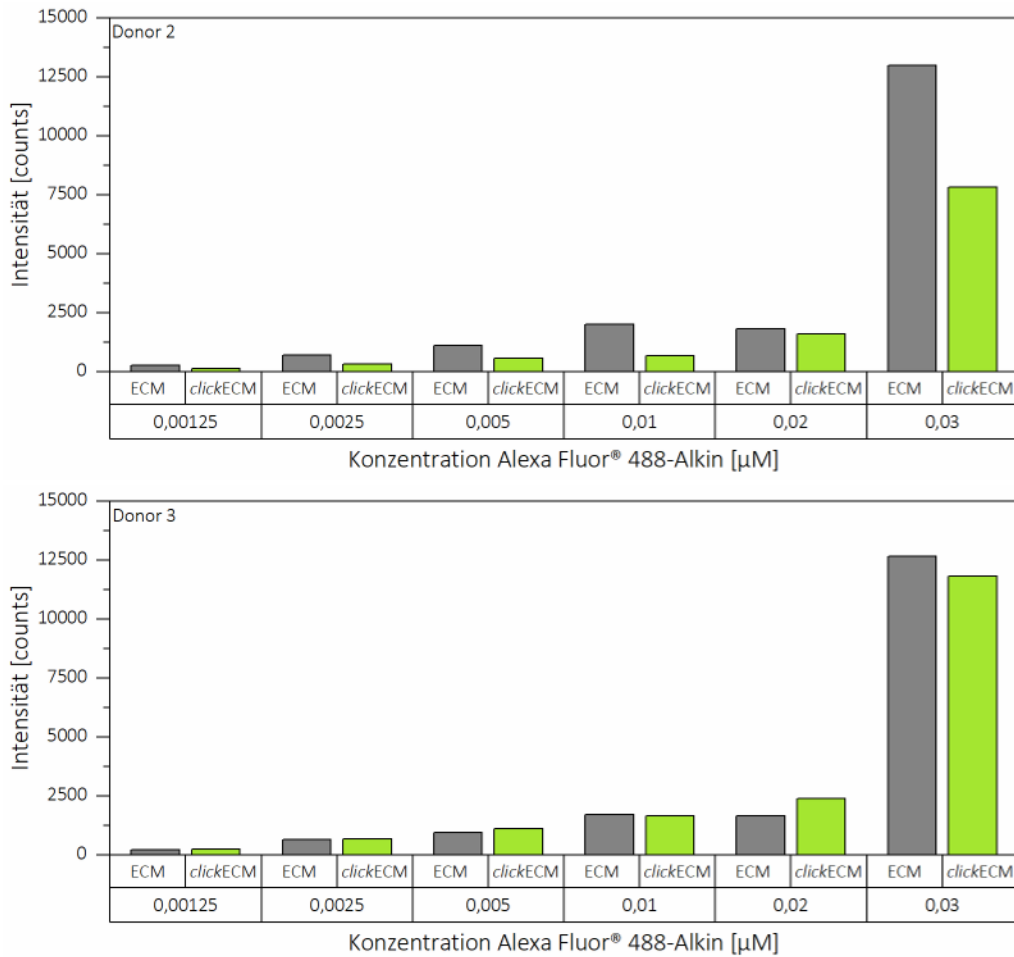


Abbildung 16: Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM. Für die Quantifizierung des Azidgehalts wurde die aufkonzentrierte und homogenisierte (*click*)ECM zweier Donoren mit Fluorophorlösungen (Alexa Fluor® 488-Alkin) unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert. Nach der Abtrennung der (*click*)ECM-Fragmente durch Ultrazentrifugation wurden die Fluoreszenzintensitäten der Überstände ermittelt. An der unmodifizierten ECM konnten Fluorophormoleküle lediglich durch unspezifische Adsorption binden, während bei der Azid-modifizierten *click*ECM eine kovalente Bindung der Alkin-funktionalen Fluorophormoleküle über die ablaufende *Click*-Reaktion möglich war. Es war zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensitätsunterschiede meist recht gering waren. In manchen Fällen war die detektierte Fluoreszenz der *click*ECM-Überstände intensiver, in anderen schwächer als die Fluoreszenzintensitäten der unmodifizierten ECM.

Aus den Diagrammen in **Abbildung 16** war erkennbar, dass die Fluoreszenzsignale der Überstände zwar grundsätzlich messbar waren, die Unterschiede zwischen den Probepaarungen, d. h. der jeweiligen unmodifizierten ECM und der dazugehörigen Azid-modifizierten *click*ECM, jedoch keinem gleichbleibenden Trend folgten. Es wurde erwartet, dass die Fluoreszenzintensität der ECM jeweils höher sein würde als die der *click*ECM, da mit der *click*ECM durch die ablaufende irreversible *Click*-Reaktion zwischen den Aziden und Alkinen signifikant mehr Fluorophor aus der Lösung ausgetragen werden würde als bei der ECM, bei der

Fluorophormoleküle nur durch unspezifische Adsorption an den ECM-Molekülen anhaften konnten. Dies war jedoch nicht der Fall und die Fluoreszenzintensitäten der *click*ECM-Überstände waren häufig annähernd gleich, teilweise jedoch auch höher oder niedriger als die Fluoreszenzintensitäten der unmodifizierten ECM. Folglich musste davon ausgegangen werden, dass die Grundvoraussetzung für die Auswertung des Versuchs nicht gegeben war und die Belastbarkeit der Ergebnisse daher als fraglich eingestuft werden mussten. Warum bei der Abtrennung der unmodifizierten ECM durch Ultrazentrifugation z. T. scheinbar mehr Alkin-Fluorophor ausgetragen wurde als bei der Azid-modifizierten *click*ECM, konnte nicht abschließend aufgeklärt werden. Aufgrund der komplexen und zeitintensiven Versuchsdurchführung war es im Zuge dieser Arbeit nicht möglich, ausreichend große Datensätze zu generieren, mit denen auch eine statistische Untersuchung der beobachteten Unterschiede möglich gewesen wäre oder Ausreißer identifizierbar gewesen wären. Dies war u. a. der Konfiguration der verwendeten Ultrazentrifuge geschuldet. Um die große Anzahl sehr kleiner (*click*)ECM-Fragmente (siehe auch **Kapitel 5.1.2**) abzentrifugieren zu können, war es notwendig, die hohen Zentrifugalkräfte einer Ultrazentrifuge zu nutzen, um davon ausgehen zu können, dass die (*click*)ECM-Fragmente sauber abgetrennt werden konnten. Die verwendete Ultrazentrifuge bot allerdings nur Platz für vier Proben pro Durchgang, sodass immer nur zwei zusammengehörende Probenpaarungen gleichzeitig zentrifugiert werden konnten. Da die Fluorophorlösungen für die Färbungen jeweils unmittelbar vor der Zugabe zur (*click*)ECM frisch angesetzt werden mussten, musste der Versuch folglich jedes Mal neu vorbereitet und durchgeführt werden. Des Weiteren war vor der Versuchsdurchführung nicht bekannt, ob die entstehenden Unterschiede aufgrund der geringen Azidkonzentration in der *click*ECM mit diesem Versuch überhaupt aufgelöst werden konnten. Während des MGEs wurden die Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 50 μM Ac₄GalNAz behandelt (siehe auch **Kapitel 4.1.2**). Folglich konnte bereits berechnet werden, dass pro Zellkulturschale (\varnothing 14,5 cm) eine maximale Azidstoffmenge von 1,25 μmol in die Glykanstrukturen eingebaut werden konnte. Dies entsprach einer Stoffmenge von ca. 0,6 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ *click*ECM, da durchschnittlich 2,1 mg (*click*)ECM aus einer ZKS isoliert werden konnten. Welcher Anteil davon grundsätzlich in die extrazellulären Glykane eingebaut wird, ist unklar. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass die modifizierten Monosaccharide auch in intrazelluläre oder membrangebundene Strukturen integriert werden [157, 158]. Des Weiteren ist nicht davon auszugehen, dass grundsätzlich alle Ac₄GalNAz-Moleküle von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt werden. Dementsprechend wurde angenommen, dass die Azidkonzentration in der *click*ECM noch

geringer sein würde, als es von der zugegebenen Menge an Zucker theoretisch möglich gewesen wäre.

Die etappenweise Durchführung des Versuchs bzw. genauer gesagt die immer neue Herstellung der Färbelösungen durch Verdünnen der Fluorophorstammlösung, stellte auch eine Limitierung hinsichtlich der Qualität der erstellten Kalibrationsfunktion dar. Diese wäre für die Umrechnung der Fluoreszenzintensitäten in die Azidkonzentration der *clickECM* notwendig gewesen, sofern die Daten dies zugelassen hätten. Um für eine potenzielle Weiterführung dieser Versuche abzuklären, wie sich der Pipettierfehler durch das immer neue Ansetzen der Fluorophorlösungen und den Transfer der sehr kleinen Volumina auf das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Kalibrationsfunktion auswirken würde, wurden die hergestellten Färbelösungen gemeinsam mit weiteren, separat angesetzten Kalibrationslösungen analysiert und grafisch als Kalibrationsreihe aufgetragen. Das im **Anhang** unter **Kapitel 7.3, Abbildung A4** gezeigte Diagramm bestätigte den Verdacht, dass der Pipettierfehler und das daraus resultierende geringe Bestimmtheitsmaß der Kalibrationsfunktion ($R^2 = 0,7113$) eine Umrechnung der Fluoreszenzintensitäten in die Azidkonzentration nicht verlässlich ermöglichen würde.

5.2.1 Bewertung der zweiten Hypothese zur Bestimmung der Azidkonzentration in der *clickECM*


Nach umfangreicher experimenteller Überprüfung muss die aufgestellte Hypothese im Rahmen dieses Dissertationsvorabens als widerlegt bewertet werden. Die Azidkonzentration in der *clickECM* konnte anhand der Fluoreszenzintensität auf die durchgeführte Weise nicht quantifiziert werden. Auch die Bestrebungen der Mitarbeitenden der *Core Facility* der Universität Hohenheim, die Azidkonzentration innerhalb der *clickECM* mittels Feststoff-Kernspinresonanz (engl. *solid-state nuclear magnetic resonance*, ssNMR) zu analysieren, lieferten keine Ergebnisse, da die Azidkonzentration vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze lag und die Vielzahl an Proteinsignalen eine Identifikation der Azide noch weiter erschwerte. Auch der Versuch, die Azide vor der Analyse mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin zu koppeln, um die *clickECM* mit zusätzlichen charakteristischen aromatischen Bereichen zu versehen, erbrachte keine neuen Erkenntnisse. Für Bestrebungen, die *clickECM*-Azide mittels ATR-FT-IR (engl. *attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy*, ATR-FT-IR) am IGVP quantitativ nachzuweisen, reichten die generierbaren Probenmengen nicht aus.

Für eine potenzielle Weiterführung dieser Arbeit wäre es wünschenswert, größere Mengen an *click*(ECM) zu generieren und diese ATR-FTIR-spektroskopisch zusammen mit geeigneten Standards quantitativ zu analysieren. Auch wäre es interessant, den Zellen während des MGE eine höhere Zuckerkonzentration anzubieten und/ oder den Zeitraum des MGE zu verlängern und alle bislang angewandten Techniken (die fluoreszenzbasierte Abschätzung der Azidkonzentration, die ssNMR sowie die ATR-FTIR) nochmals zu wiederholen.


5.3 Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der (*click*)ECM

Für den potenziellen Einsatz der Azid-modifizierten *click*ECM als Biomaterial ist es essenziell, charakteristische Kenngrößen wie die biochemische Zusammensetzung, die biomolekulare Organisation und Lokalisation sowie die Verteilung und die Konzentration typischer ECM-Biomoleküle bestimmen zu können. Die bioanalytische Charakterisierung dieser Materialien gestaltet sich jedoch aufgrund der in **Kapitel 1.3.5** erläuterten Unlöslichkeit und der hochkomplexen Zusammensetzung der (*click*)ECM als äußerst herausfordernd [106, 177].

Um dennoch verlässliche und robuste Analysemethoden für die qualitative und quantitative Charakterisierung der (*click*)ECM zu identifizieren, bestand das Ziel des zweiten Arbeitspakets dieser Arbeit in der Neubewertung und Evaluation von gängigen und in der Literatur standardmäßig verwendeten bioanalytischen Methoden. Ferner sollte untersucht werden, ob sich die chemische Modifizierung der ECM mit Azidgruppen durch das MGE auf die Expression typischer ECM-Biomoleküle auswirkt. Zur Strukturierung der hierzu durchgeführten Versuche wurde folgende Hypothese formuliert:



*In Bezug auf die **Biomolekülzusammensetzung** unterscheidet sich die Azid-modifizierte clickECM nicht von der unmodifizierten ECM. Dies lässt sich **qualitativ** anhand **(immun)histochemischer Färbemethoden** in Kombination mit **verschiedenen Mikroskopietechniken** und **SDS-PAGE-Versuchen** nachweisen. Ferner unterscheiden sich die beiden Matrices **quantitativ** nicht in ihrem **Gesamtproteingehalt**, in der Konzentration **löslicher und unlöslicher Kollagene** sowie dem **Glykosaminoglykangehalt**. Spezielle kommerziell verfügbare Assays sind dazu geeignet, diese Konzentrationen verlässlich zu bestimmen.*



Die Ergebnisse, die in diesem Arbeitspaket entstanden sind, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits in zwei *peer-reviewed* Publikationen veröffentlicht [177, 200].

5.3.1 Qualitative Analyse der biochemischen *click*ECM-Zusammensetzung

Um zunächst einen Überblick über die in der (*click*)ECM enthaltenen Biomoleküle, deren Organisation und Verteilung im Netzwerk zu erhalten, wurden im ersten Schritt qualitative Methoden hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für die komplex zusammengesetzten und unlöslichen (*click*)ECM-Proben untersucht.

5.3.1.1 Gelelektrophoretische Auftrennung der (*click*)ECM-Proteine

Wie in **Kapitel 1.3.7** beschrieben, können komplexe proteinhaltige Proben mithilfe der SDS-PAGE in ihre Einzelkomponenten aufgetrennt werden. Durch die Anfärbung der Proteine, den Abgleich der dabei entstehenden Bandenmuster sowie durch den Abgleich mit den mitgeführten Standards lässt sich die Zusammensetzung der Proben qualitativ beurteilen [21, 125]. In dieser Arbeit wurde die (*click*)ECM der drei individuellen Spender, Kollagen Typ I als Referenz sowie ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker

gelelektrophoretisch aufgetrennt und die dabei entstehenden Proteinbanden mittels einer Coomassie-Brilliant-Blau R-250 *Imperial*TM Protein-Färbung angefärbt (**Abbildung 17**).

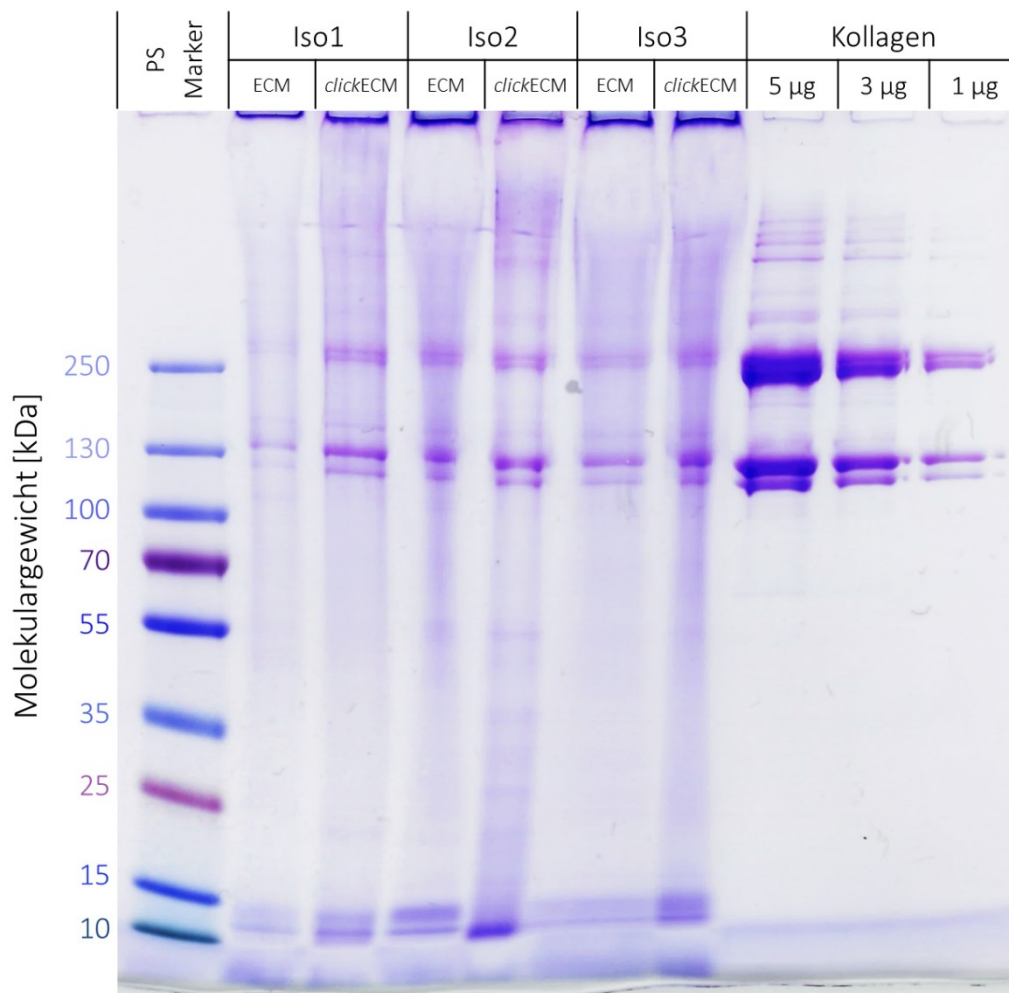


Abbildung 17: Repräsentative Aufnahme einer Coomassie-Brilliant-Blau R-250 *Imperial*TM Protein-Färbung eines SDS-PAGE-Gels zur Beurteilung des durch die elektrophoretische Trennung entstandenen Bandenmusters der (*click*)ECM sowie des mitgeführten Kollagen Typ I-Standards. Für die Elektrophorese wurden jeweils 20 µg Trockengewicht der (*click*)ECM der drei untersuchten Spender aufgetragen. Zusätzlich wurde Kollagen Typ I als Standard in verschiedenen Konzentrationen (5 µg; 3 µg; 1 µg) sowie ein Molekulargewichtsmarker im Gel aufgetrennt. (PS Marker = vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (engl.: *pre-stained marker*, PS Marker), kDa = Kilodalton.)

In **Abbildung 17** ließen sich für alle aufgetrennten (*click*)ECM-Proben unabhängig von der Azid-Modifikation durch das MGE und des Spenders vergleichbare Bandenmuster erkennen. Dominante und intensiver gefärbte Banden waren im Fall der (*click*)ECM bei ca. 10 kDa, 15 kDa, 120 kDa, 130 kDa, 250 kDa und 260 kDa zu erkennen. Die Banden bei 10 kDa und 15 kDa waren dabei vermutlich auf kleine Signalpeptide oder Abbauprodukten der Proteinspaltungen zurückzuführen. Die dunkleren Doppelbanden bei 120 kDa und 130 kDa waren sowohl bei den (*click*)ECM-Proben als auch bei den mitgeführten Kollagen Typ I-Standards gut erkennbar. Sie

entsprachen höchstwahrscheinlich den niedrigmolekularen Alpha-Regionen des Kollagens [129, 205-207]. Die intensiver gefärbten Doppelbanden bei 250 kDa und 260 kDa waren ebenfalls sowohl in den Bandenmustern der (*click*)ECM als auch in den Banden des Kollagen Typ I erkennbar und entsprachen vermutlich der höhermolekularen und quervernetzten Beta-Region des Kollagens. Die klar erkennbaren Banden des Kollagen Typ I-Standards konnten auch im Bandenmuster der (*click*)ECM ausgemacht werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass Kollagen unabhängig von der Modifikation der ECM mit Aziden einen Hauptbestandteil der (*click*)ECM bildete. Diese Beobachtung erschien plausibel, da der Anteil von Kollagen am Gesamtprotein des Menschen in der Literatur mit bis zu 25 % angegeben wird und Kollagen folglich einen Hauptbestandteil der humanen Gesamt-ECM darstellt [16, 138]. In der direkten Gegenüberstellung mit den vergleichsweise definierten und räumlich mehr oder weniger voneinander abgegrenzten Banden des Kollagens fiel jedoch auf, dass die (*click*)ECM-Spuren über die gesamte Länge der Laufstrecke deutlich stärker gefärbt erschienen und praktisch keine ungefärbten Bereiche in der Gelspur ausgemacht werden konnten. Aus dieser Beobachtung ließ sich die enorme Vielzahl an ECM-Komponenten erahnen, die den gesamten Molekulargewichtsbereich des verwendeten Gradientengels überspannten. Aus der Literatur ist bekannt, dass natürliche ECM aus bis zu 300 verschiedenen Proteinen besteht, die je nach Ursprung der ECM in gewebespezifischen Kombinationen und Konzentrationen vorkommen und deren Proteine eine breite Molekulargewichtsverteilung aufweisen [132, 208]. Neben der hohen Komplexität der biomolekularen Zusammensetzung könnte eine weitere Erklärung für die breiteren, ungleichmäßiger und etwas verschwommener wirkenden Banden der (*click*)ECM zusätzlich auch der hohe Gehalt an Glykoproteinen gewesen sein. Da der Grad der Glykosylierung im Fall der ECM bekanntlich stark variiert, ist es plausibel, dass die SDS-Moleküle aus dem Probenpuffer unterschiedlich stark an den ECM-Molekülen adsorbierten und so zum Auftreten dieses Effekts beigetragen haben [209].

Die intensiv gefärbten Taschen im oberen Teil des Gels deuteten darauf hin, dass beim Auftragen der (*click*)ECM vermutlich z. T. noch kovalent verknüpfte, makromolekulare Komplexe vorhanden waren, die aufgrund ihrer Größe nicht in das engmaschige Polyacrylamid-Gradientengel eindiffundieren konnten. Dieser Effekt könnte entweder aus einer unzureichenden Denaturierung der Proben im Zuge der Probenpräparation oder vom hohen Grad der Quervernetzung der ECM-Hauptbestandteile untereinander resultieren. In den ECM-Proteinen sind eine Vielzahl an Peptidsequenzen enthalten, die zur Quervernetzung der Matrixbestandteile untereinander führen, sodass die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein

solcher kovalent verknüpfter makromolekularer Komplexe in der (*click*)ECM grundsätzlich relativ hoch ist [16, 126, 210]. Aus diesem Grund sollte auch berücksichtigt werden, dass die Bildung einer Bande in den SDS-PAGE-Gelen ganz allgemein zwar als (qualitativer) Nachweis für das Vorhandensein einer (*click*)ECM-Komponente angesehen werden kann; die Abwesenheit einer Bande hingegen nicht als Beweis für die Absenz einer ECM-Komponente angesehen werden kann.

Die in dieser Arbeit elektrophoretisch aufgetrennten (*click*)ECM-Proben ähnelten hinsichtlich ihrer Bandenmuster u. a. den von Prewitz *et al.* publizierten SDS-PAGE-Bandenmustern. Die Forscher untersuchten ECM, die von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) mit verschiedenen Stimuli während der *In-vitro*-Kultur gebildet wurde [61]. Ähnliche Ergebnisse wurden ferner bei der Untersuchung humaner Glomeruli-ECM [211], ECM-Schwämmen aus der humanen Plazenta [212] sowie aus Herz- und Skelettmuskel-ECM [118] beobachtet.

Zusammenfassend konnte nach diesen Versuchen festgehalten werden, dass die SDS-PAGE für die qualitative Untersuchung der entstehenden Bandenmuster sehr gut geeignet war und dass lediglich sehr große Matrixbestandteile nicht aufgetrennt werden konnten. Beim Abgleich der Gelspuren der Azid-modifizierten *click*ECM und der nicht modifizierten ECM der drei Spender konnte beobachtet werden, dass die aufgetretenen Bandenmuster und die Intensität der einzelnen Banden vergleichbar waren. Die Ergebnisse dieses ersten qualitativen Experiments deuteten demnach darauf hin, dass die Expression der ECM-Biomoleküle durch das MGE nicht negativ beeinträchtigt wurde.

5.3.1.2 (Immun)Histochemische Untersuchung der (*click*)ECM

(Immun)Histologische Färbemethoden stellen, wie bereits unter **Kapitel 1.3.7.2** erläutert, eine vielfach angewandte Standardtechnik dar, um biologische Strukturen im nativen, nicht denaturierten Zustand differenziert darzustellen. Als solche ermöglichen diese Methoden zusammen mit der sich anschließenden licht-, fluoreszenz- oder polarisationsmikroskopischen Auswertung (siehe auch **Kapitel 4.3.2**) die Identifikation verschiedener Komponenten sowie die Analyse ihrer Verteilung innerhalb komplexer biologischer Proben durch die Verwendung von Farbstoffen, Indikatoren oder Fluorophoren [126].

Histochemische Färbungen

Zur Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der (*click*)ECM und um eine Übersicht über die anfärbbaren Komponenten sowie deren Verteilung in der (*click*)ECM zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit die histochemischen Multichrom-Färbungen Masson-Goldner-Trichrom mit Anilinblau (**Abbildung 18 a**), eine modifizierte Movat-Pentachrom-Färbung (**Abbildung 18 b**) sowie die Ladewig-Färbung (**Abbildung 18 c**) verwendet. Aus den in **Abbildung 18 a-c** dargestellten Übersichtsfärbungen konnte qualitativ abgeleitet werden, dass zwischen der Azid-modifizierten *click*ECM und der nicht modifizierten ECM keine augenscheinlichen Unterschiede in der biomolekularen Zusammensetzung oder Verteilung auftraten.

Die unter dem Lichtmikroskop detektierten Farbnuancen in der nicht modifizierten ECM waren auch in den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Azid-modifizierten *click*ECM ausmachbar. Diese Beobachtung sprach dafür, dass die Expression typischer ECM-Biomoleküle durch das MGE nicht nachteilig beeinflusst wurde. Diese Beobachtung deckte sich folglich mit den Erkenntnissen aus der gelelektrophoretischen Auftrennung, bzw. den entstandenen Bandenmustern in **Abbildung 17**. Vergleichbare Aussagen trafen zuvor bereits Ruff *et al.* [114, 122], die *in vitro* generierte Fibroblasten-(*click*)ECM in einer modifizierten Movat-Färbung untersuchten, die jedoch - anders als in dieser Arbeit - erst nach 21 Tagen statischer Zellkultur isoliert wurden. Auch in dieser Arbeit deutete die histologische Übersichtsfärbung darauf hin, dass die Modifizierung der ECM mit Aziden über das MGE keinen negativen Einfluss auf die Biomolekülexpression hatte.

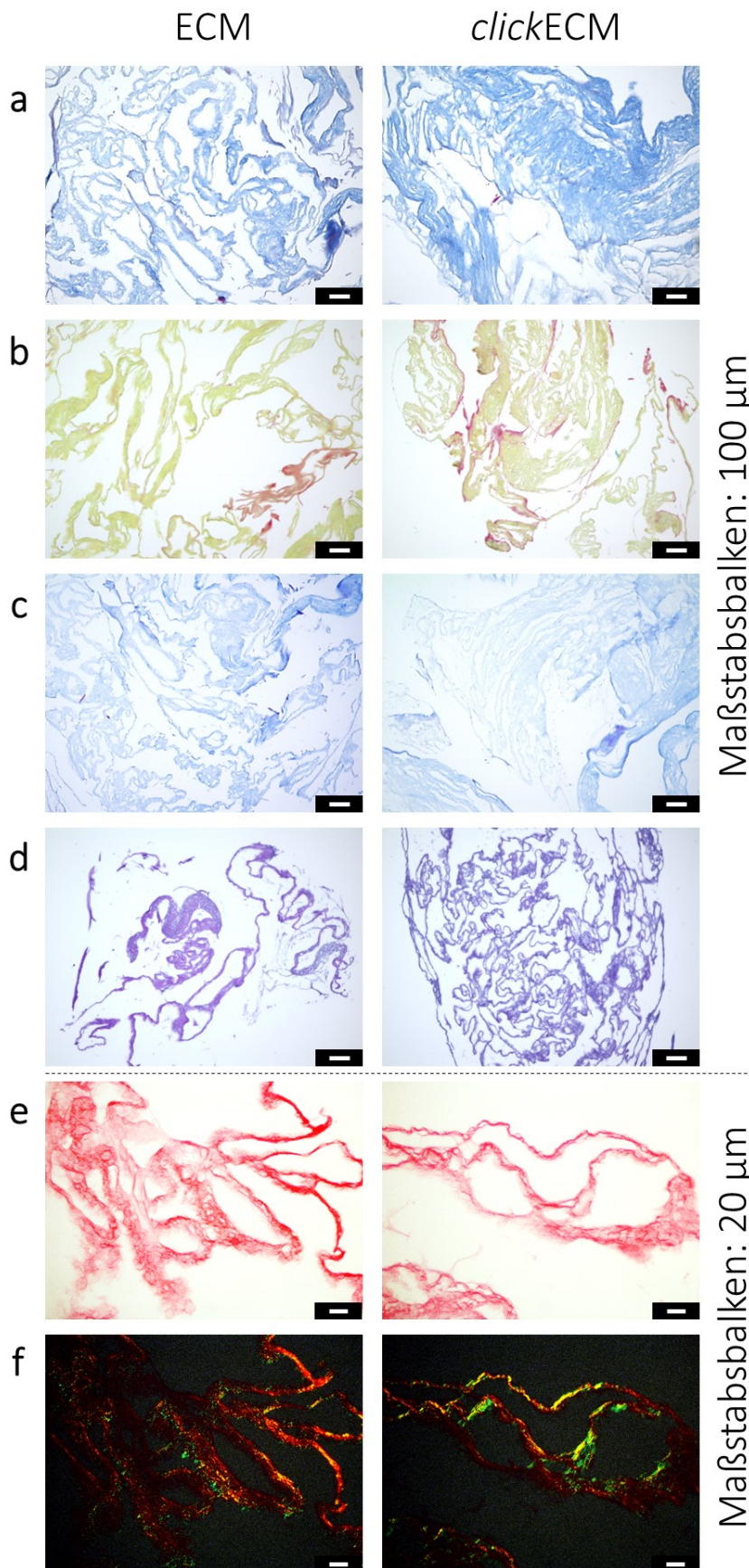


Abbildung 18: Histochemische Untersuchung der (*click*)ECM-Zusammensetzung.

a) Masson-Goldner-Trichromfärbung mit Anilinblau (Kollagene: blau).

b) Modifizierte Movat-Pentachromfärbung (Kollagene: orange/ gelb).

c) Ladewig-Färbung (Kollagene: lila/ violett, Glykokonjugate: blau).

d) Alcianblau-Färbung kombiniert mit der Periodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion (Glykoproteine und Proteoglykane: violett).

e) Picro-Siriusrot-Färbung, dargestellt im Hellfeld (Kollagene: rot).

f) Picro-Siriusrot-Färbung, dargestellt im polarisierten Licht (Kollagene: grün/ blau oder rot/ gelb).

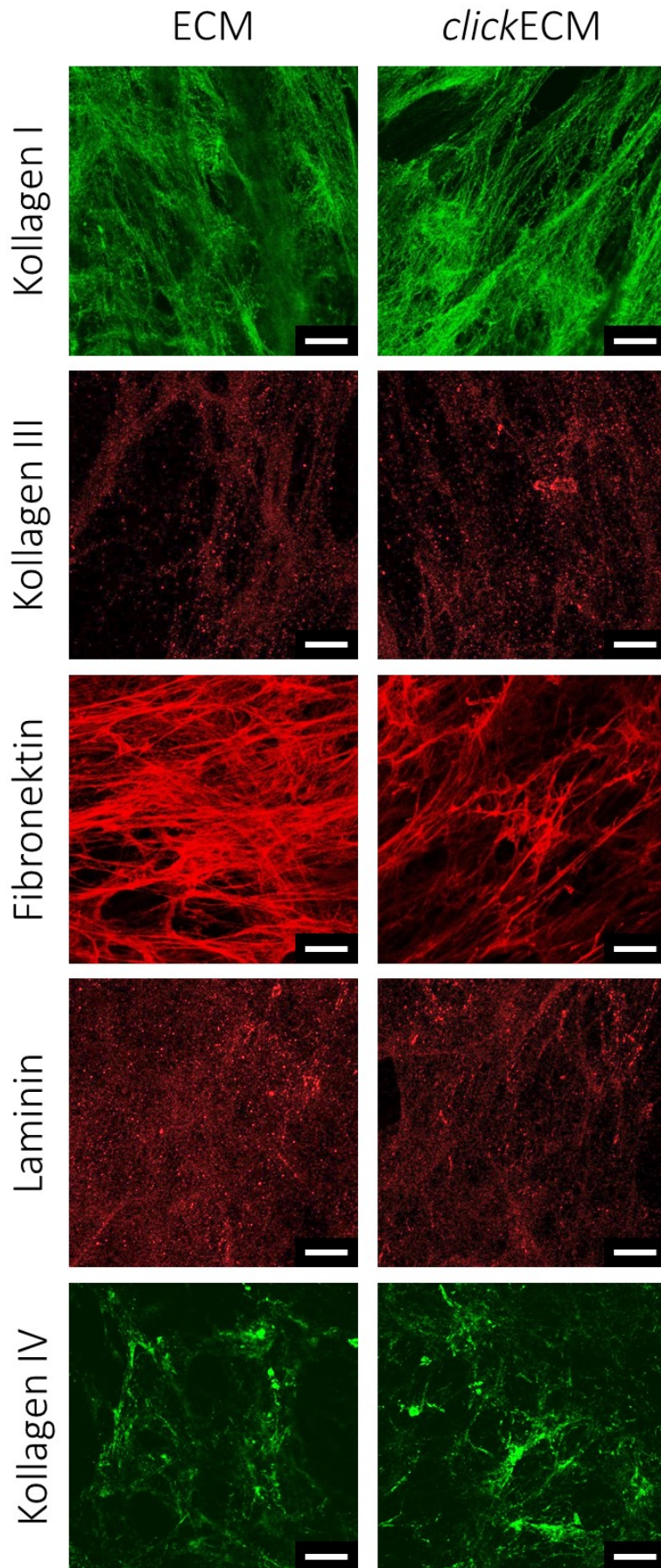
Maßstabsbalken:
(A - D): 100 µm;
(E + F): 20 µm.

Um neben den Übersichtsfärbungen einen detaillierteren Einblick in die Verteilung und das Auftreten der Glykosaminoglykane (GAGs) und der Kollagene in der (*click*)ECM zu erhalten,

wurden neben den histologischen Übersichtsfärbungen zusätzlich noch eine Alcianblau-Färbung in Kombination mit der Periodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion sowie eine Pikro-Siriusrot-Färbung durchgeführt. Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass das in dieser Arbeit verwendet Monosaccharid Ac₄GalNAz metabolisch in O-verknüpfte Glykokonjugate integriert wird, weshalb der Untersuchung der Glykoproteine und Proteoglykane ein besonderer Stellenwert beigemessen wurde [114, 122, 157, 158, 177]. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen in **Abbildung 18 d** ließ sich die homogene Verteilung der Glykokonjugate über die gesamten (*click*)ECM-Strukturen erkennen. Auch diese Erkenntnis deckte sich mit den von Ruff *et al.* publizierten Ergebnissen einer konventionellen Alcianblau-Färbung der nach 21 Tagen Zellkultur isolierten (*click*)ECM [114, 122]. Interessanterweise waren die Glykane ebenso homogen über die gesamte (*click*)ECM verteilt, wie die Azide über die *click*ECM. Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Azide in der *click*ECM ist in dieser Arbeit in **Abbildung 15** und **Abbildung A5** aufgeführt. Ferner war diese Erkenntnis auch in den von Ruff *et al.* publizierten Daten erkennbar [114, 122].

Analog zur Alcianblau-PAS-Färbung für die Darstellung der GAGs stellt die Pikro-Siriusrot-Färbung eine kollagenspezifische Färbetechnik dar. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen in **Abbildung 18 e** war deutlich zu erkennen, dass auch die Kollagene homogen über die gesamte (*click*)ECM-Struktur verteilt vorlagen. Zwischen der nicht modifizierten ECM und der Azid-modifizierten *click*ECM konnte anhand dieser Aufnahmen kein Unterschied in der Expression des Strukturproteins ausgemacht werden. Unter polarisiertem Licht wurde für beide Matrices eine Doppelbrechung beobachtet (**Abbildung 18 f**). Dieser Effekt wurde zuvor bereits u. a. von Schenke-Layland *et al.* beschrieben, die über einen Zeitraum von vier Wochen mithilfe von *in vitro* kultivierten Fibroblasten ECM-Schichten auf siliziumbasierten Nanostrukturen erzeugten [70]. Interessanterweise deutet das Auftreten der in dieser Arbeit beobachteten Doppelbrechungsmuster darauf hin, dass selbst nach nur sieben Tagen statischer *In-vitro*-Zellkultur fibrilläre Kollagene exprimiert wurden und dass das MGE diesen Prozess offensichtlich nicht negativ beeinflusst hatte. Bei Betrachtung der polarisationsmikroskopischen Aufnahmen in **Abbildung 18 f** entstand im Zuge dieser Arbeit der Eindruck, dass der Anteil der detektierten Rot- und Grüntöne in den Aufnahmen der unmodifizierten ECM und der Azid-modifizierten *click*ECM nicht gleich war. In der Literatur sind bezüglich der detektierbaren Farben der Doppelbrechung kontroverse Aussagen zu finden, ob die Farbtöne in den Doppelbrechungsmustern zur Unterscheidung zwischen Kollagen Typ I (gelb/ rot) und Kollagen Typ III (grün) verwendet werden können. Montes und Junqueira [213] sowie

Junqueira *et al.* [214] postulierten, dass dies möglich sei, während Lattouf *et al.* [215] in ihrer Arbeit herausstellten, dass die Farben ausschließlich von der Ausrichtung der Kollagenbündel unter dem Mikroskop abhängen. Um zu untersuchen, ob die Methode eine Unterscheidung zwischen den Farben der beiden Kollagentypen in der (*click*)ECM erlaubte, oder ob sich die Farben ändern würden, wenn die Orientierung der Probe verändert werden würde, wurden polarisationsmikroskopische Aufnahmen von jeweils denselben Positionen auf der Probe vor und nach einer 90°-Rotation der Probe generiert (**Anhang Kapitel 7.4.1, Abbildung A6**). Es stellte sich heraus, dass der gleiche Effekt beobachtet wurde, den bereits Lattouf *et al.* dokumentierten. Die rötlich/ gelblichen Bereiche invertierten sich durch die 90°-Drehung der Probe in grünliche Bereiche und umgekehrt. Daher wurde die Piko-Siriusrot-Färbung in dieser Arbeit ausschließlich für den allgemeinen Nachweis von Kollagenen verwendet und anhand der licht- und polarisationsmikroskopischen Aufnahmen die Aussage getroffen, dass hinsichtlich der Verteilung der Kollagene über die (*click*)ECM-Strukturen keine Unterschiede zwischen den beiden Matrices erkennbar waren. Um dennoch eine Unterscheidung zwischen den wichtigsten ECM-spezifischen Kollagentypen treffen zu können, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen an nicht prozessierter (*click*)ECM durchgeführt (**Abbildung 19**). Für diese Analyse wurde die (*click*)ECM direkt in Mikroskopieschälchen generiert, ohne sie vom Boden der Schälchen abzulösen, sodass die Architektur der gebildeten (*click*)ECM nicht verändert wurde.



Maßstabsbalken: 20 µm

Abbildung 19:

Immunhistochemische Analyse der ECM-spezifischen Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Kollagen Typ IV, Fibronektin und Laminin. Alle Biomoleküle waren sowohl in der unmodifizierten ECM als auch in der Azid-modifizierten *click*ECM nachweisbar. Die Mikroskopeinstellungen wurden für die entsprechenden Probenpaarungen identisch gehalten, um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

Maßstabsbalken: 20 µm.

Durch die immunhistochemische Markierung der ECM-Proteine Kollagen Typ I, Typ III und Typ IV sowie Fibronectin und Laminin konnten das Auftreten und die Verteilung dieser ECM-Einzelmoleküle in den (*click*)ECM-Strukturen noch differenzierter untersucht werden. Auch anhand dieser hochspezifischen und selektiven Färbungen stellte sich heraus, dass alle Proteine unabhängig von der Modifizierung mit Azidgruppen durch das MGE exprimiert wurden und homogen über die gesamte Struktur verteilt nachgewiesen werden konnten. Auch diese Ergebnisse gingen mit den Beobachtungen von Ruff *et al.* einher, die die Proteine Kollagen Typ I und Typ IV sowie Fibronectin in der nach sieben Tagen isolierten (*click*)ECM nachwies [114, 122]. Ferner wurden die Biomoleküle Kollagen Typ I, Typ IV und Fibronectin bereits bei der Untersuchung der Auswirkung der Homogenisierung der (*click*)ECM in **Abbildung 15** nachgewiesen. Die gleichmäßige Verteilung von Fibronectin als wichtiges Zelladhäsionsprotein über die gesamte (*click*)ECM-Struktur stellt für die spätere Anwendung als Biomaterial im direkten Kontakt mit humanen Zellen eine wichtige Voraussetzung für eine rasche und erfolgreiche Zelladhäsion dar.

Zusammenfassend konnte für alle in dieser Arbeit angewandten qualitativen Analysemethoden die Aussagen getroffen werden, dass sie sich als gut geeignete Techniken erwiesen, um die komplexe biomolekulare Zusammensetzung der unlöslichen (*click*)ECM darzustellen und die Verteilung sowie das Vorhandensein der wichtigsten ECM-spezifischen Biomoleküle zu untersuchen. Die bisher gesammelten Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass sich das MGE – abgesehen von der Azid-Modifizierung der Glykoproteine – nicht negativ auf die Konstitution der ECM auswirkte. Die Expression der in diesem Teil der Arbeit untersuchten ECM-spezifischen Biomoleküle schien qualitativ betrachtet durch die Zugabe des chemisch modifizierten Monosaccharids Ac₄GalNAz nicht negativ beeinflusst worden zu sein.

5.3.2 Quantitative Analyse der biochemischen *click*ECM-Zusammensetzung

Nach dem qualitativen Nachweis der typischen ECM-Biomoleküle sowie der Analyse deren Verteilung in der (*click*)ECM sollte im nächsten Schritt die biochemische Zusammensetzung quantitativ aufgeschlüsselt werden. Im Zuge dessen wurden in der Literatur standardmäßig angewandte Methoden für die Analyse von (*click*)ECM evaluiert. Das Ziel bestand darin, verlässliche und robuste Methoden zu identifizieren, mit denen die Gehalte an Proteinen, löslichen und unlöslichen Kollagenen sowie sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAGs) quantifiziert werden konnten.

5.3.2.1 Quantifizierung des Gesamtproteingehalts innerhalb der (*click*)ECM

Für die Quantifizierung des Proteingehalts werden in der Mehrzahl der Studien zur ECM-Analyse in der Fachliteratur kolorimetrische Assays wie der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay oder der Bradford-Assay verwendet [102, 103, 109, 128, 129, 134-136]. Diese biochemischen Assays bestimmen den Gesamtproteingehalt in einer Lösung durch die Wechselwirkung der verwendeten Farbstoffmoleküle mit den Proteinen in der Probe, was zu einer photometrisch messbaren Farbänderung der Reaktionslösung führt (siehe auch **Kapitel 1.3.7.2**). Anhand der Absorptionswerte einer mitgeführten Standardreihe bekannter Konzentration kann dabei der Gesamtproteingehalt der Probe berechnet werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe kommerzieller Protein-Assays

Um zu untersuchen, ob kommerzielle kolorimetrische Assays für die in dieser Arbeit untersuchten (*click*)ECM-Proben geeignet sind, wurden die zwei am häufigsten in der Literatur verwendeten Assays (BCA und Bradford) durchgeführt und der Gesamtproteingehalt der (*click*)ECM-Proben damit quantifiziert (**Abbildung 20**).

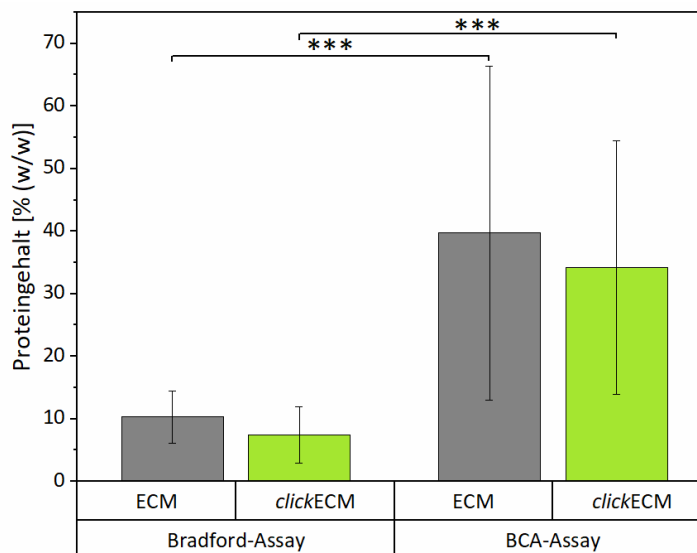


Abbildung 20: Quantifizierung des Gesamtproteingehalts in unmodifizierter ECM und Azid-modifizierter *click*ECM mit dem Bradford-Assay und dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay. Aufgetragen sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der (*click*)ECM-Proben dreier Spender jeweils in $n = 3$ mit je drei technischen Replikaten. Zwischen den Ergebnissen der beiden Assays bestehen statistisch signifikante Unterschiede.

Die kolorimetrische Reaktion im Bradford-Assay wird durch die Fähigkeit des blauen Coomassie-Farbstoffs verursacht, Protein binden zu können. Bei diesem Vorgang kommt es zu einer photometrisch messbaren Farbänderung. Der BCA-Assay hingegen beruht auf der

Reduktion von Kupferionen durch die Peptidbindungen in den Proteinen. Hierbei chelatisieren die gebildeten Cu^+ -Ionen mit zwei BCA-Molekülen zu einem farbigen Produkt, dessen Konzentration ebenfalls anhand der Absorption photometrisch bestimmt werden kann [21, 125].

Obwohl die Ergebnisse innerhalb der einzelnen Assays in **Abbildung 20** für die (*click*)ECM der drei Spender statistisch nicht unterschiedlich waren, variierten die Ergebnisse zwischen den beiden Assays erheblich. Der Bradford-Assay ergab für die unmodifizierte ECM eine mittlere Gesamtproteinkonzentration von $10,3 \pm 4,1 \%$ (w/w) und für die Azid-modifizierte *click*ECM $7,5 \pm 4,5 \%$ (w/w), während die Proben laut BCA-Assay eine mittlere Gesamtproteinkonzentration von $39,7 \pm 26,7 \%$ (w/w) im Falle der unmodifizierten ECM und eine mittlere Gesamtproteinkonzentration von $34,2 \pm 20,3 \%$ (w/w) im Fall der Azid-modifiziertem *click*ECM enthielten.

Um zu beurteilen, ob die ermittelten Werte realistisch waren, wurden zum Vergleich zunächst eine geeignete Angabe aus der Literatur herangezogen. Smith *et al.* bezifferten den Gesamtproteingehalt des menschlichen Bindegewebes auf 88% (w/w) [216]. Da Fibroblasten den prädominanten Zelltyp im Bindegewebe darstellen und hauptsächlich für die Sekretion der ECM verantwortlich sind, schien der von Smith *et al.* publizierte Wert als grober Richtwert zur Einordnung der Ergebnisse geeignet zu sein. Bezogen auf diesen Wert würde die Gesamtproteinkonzentration mit beiden Assays deutlich unterschätzt. Zu beachten galt es an dieser Stelle jedoch, dass aus der Literatur bereits bekannt war, dass einige Vorläufermoleküle der ECM-Proteine (wie bspw. Elastin) *in vitro* zwar in löslicher Form gebildet werden, aufgrund fehlender mechanischer Stimuli aber nicht kovalent als reife Fasern in das Matrixnetzwerk integriert werden [170, 171]. Ein ähnlicher Effekt wurde für Kollagen beschrieben, da auch hier *in vitro* aufgrund der veränderten zellulären Umgebung die enzymatische Umwandlung von Prokollagen in Kollagen nicht auf die gleiche Weise erfolgen kann wie dies *in vivo* der Fall ist. Folglich war zu erwarten, dass die Proteinkonzentration der (*click*)ECM geringer als für das Bindegewebe ausfallen würde.

Der große Unterschied zwischen dem von Smith *et al.* publizierten Proteingehalt des Bindegewebes und den Ergebnissen der beiden kolorimetrischen Assays für die Analyse des (*click*)ECM-Proteingehalts ließ dennoch vermuten, dass diese Assays mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht für die Quantifizierung des (*click*)ECM-Proteingehalts geeignet waren. Diese Vermutung wurde durch die signifikanten Unterschiede zwischen den Assays sowie den vergleichsweise großen Standardabweichungen innerhalb der Assays noch zusätzlich bestärkt.

Um verlässliche Ergebnisse liefern zu können, ist es grundsätzlich entscheidend, dass die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen der Assays ungehindert ablaufen können. Hierbei ist zum einen wichtig, dass die Zielbereiche auf den Proben sterisch zugänglich sind und zum anderen muss sichergestellt werden, dass der optische Lichtweg für die photometrische Absorptionsmessung frei ist. Dies setzt voraus, dass die Proben vollständig gelöst vorliegen. In **Kapitel 5.1** wurde gezeigt, dass das in dieser Arbeit verwendete Homogenisierungsprotokoll zu (*click*)ECM-Fragmenten im Größenbereich von 7,62 μm - 31,29 μm führe. Aufgrund der Tatsache, dass diese (*click*)ECM-Fragmente jedoch unlöslich waren, wurde bei den durchgeführten kolorimetrischen Assays vermutet, dass diese im Verlauf der Bestimmung ebenfalls nicht aufgelöst werden können. Um diesen Verdacht abzuklären, erfolgte im nächsten Schritt eine phasenkontrastmikroskopische Analyse der Reaktionslösungen. Die dabei generierten Aufnahmen (**Abbildung 21**) zeigten, dass auch nach den Assays noch unlösliche (*click*)ECM-Fragmente vorhanden waren, die höchstwahrscheinlich die zugrunde liegenden Reaktionen sowie den Messvorgang beeinträchtigten und folglich zu den großen Varianzen zwischen den Ergebnissen beitrugen.

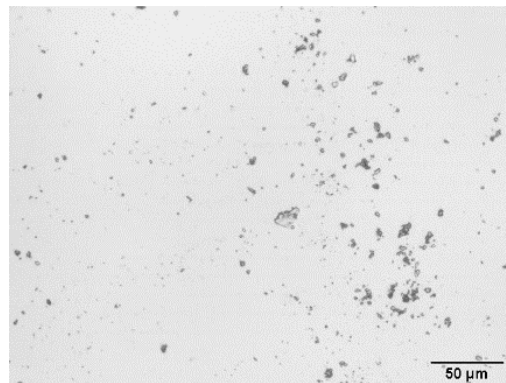


Abbildung 21: Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer BCA-Assay-Reaktionslösung. Unlösliche (*click*)ECM-Fragmente waren auch nach der Durchführung des Assays als solche sichtbar. Der gleiche Effekt war für die Reaktionslösung des Bradford-Assays zu beobachten. Maßstabsbalken: 50 μm .

Ein weiterer Grund für die statistisch signifikanten Abweichungen, die zwischen den Ergebnissen der beiden Assays beobachtet wurden, könnte neben den oben erwähnten Unterschieden im zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus auch die hochkomplexe Proteinzusammensetzung der ECM sein. Sapan *et al.* stellten in ihrem *Review* verschiedene chromogene Proteinassays gegenüber und betonten, dass die Ergebnisse dieser Assays oft stark von den Unterschieden in der Proteinzusammensetzung der Probe beeinflusst werden [131]. Ferner betonten sie, dass sich die Auswahl des verwendeten Standardproteins maßgeblich auf das Ergebnis der Assays

auswirkt. Wird als Standard ein Protein verwendet, das nicht auf die gleiche Weise mit dem im Assay verwendeten Chromophor reagiert wie die Probe selbst, sind die Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht repräsentativ. Beide in dieser Arbeit getesteten kommerziellen Assays verwendeten das kleine lösliche Rinderserumalbumin (BSA) als Standard. Um zuverlässige Ergebnisse liefern zu können, hätte der ideale Standard für die Analyse der (*click*)ECM jedoch die gewebe- und spenderspezifische, komplexe Proteinzusammensetzung sehr genau imitieren müssen. Da es weder möglich war, die (*click*)ECM-Proben vollständig aufzulösen, noch einen passenden gewebe- und spenderspezifischen Standard einzusetzen, wurden die beiden Assays für die Untersuchung der (*click*)ECM in dieser Arbeit als nicht geeignet bewertet.

Bestimmung der Proteinkonzentration über den Stickstoffgehalt der (*click*)ECM

Um die Löslichkeits- und Komplexitätsproblematik zu umgehen, wurde im nächsten Schritt nach einer alternativen Methode zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts innerhalb der (*click*)ECM gesucht, bei der weder die Unlöslichkeit noch das Fehlen eines repräsentativen Standards eine Rolle spielten. Eine potenziell geeignete Methode, die seit vielen Jahren in den Ernährungswissenschaften für die Lebens- und Futtermittelanalyse nahezu universell eingesetzt wird, stellt die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration basierend auf dem Gesamtstickstoffgehalt der Probe dar [217-219]. Für diese Bestimmung wird der Stickstoffgehalt bspw. mit der Kjeldahl-Analyse oder einer vergleichbaren Methode quantifiziert und anschließend mit einem sogenannten "Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor" multipliziert. Der bekannteste Umrechnungsfaktor ist 6,25, der auf eine im Jahr 1839 von Mulder veröffentlichte Studie zurückzuführen ist [220]. In dieser Arbeit schlug Mulder eine universelle Zusammensetzung ($C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$) von Proteinen vor und stellte fest, dass der durchschnittliche Stickstoffgehalt von Proteinen etwa 16 % beträgt. Der reziproke Wert dieser Stickstoffkonzentration führte schließlich zum Umrechnungsfaktor von 6,25, der fortan generisch verwendet wurde [218, 220]. Einige Jahre später postulierte Jones, dass die Verwendung von 6,25 als universeller Faktor trügerisch ist, da sich der Gesamtstickstoffgehalt einer biologischen Probe nicht ausschließlich aus dem Proteinstickstoff zusammensetzt, sondern auch zu einem kleinen Teil aus anderen Biomolekülen wie den GAGs, DNA-Resten oder freien Aminosäuren. Zudem betonte er, dass der Stickstoffgehalt bestimmter Aminosäuren in den Proteinen je nach Molekulargewicht und der Anzahl der darin enthaltenen Stickstoffatome variiert [219]. Er schlug daher probenspezifische sogenannte "Jones-Faktoren" für die am häufigsten verzehrten Lebensmittel im Bereich von 5,18 bis 6,38 vor.

Für Gelatine (das denaturierte Derivat von Kollagen [87-89, 91]) schlug er 5,55 als geeigneten Umrechnungsfaktor vor [218, 219]. Wie sich in den qualitativen Untersuchungen in **Kapitel 5.3.1** zeigte, stellte Kollagen eine der Hauptkomponenten der untersuchten (*click*)ECM dar (**Abbildung 17 - Abbildung 19**) [16, 126, 210]. Aus diesem Grund wurde der Jones-Faktor für Gelatine in erster Näherung als ein potenziell geeigneter Umrechnungsfaktor angesehen. Da aus den qualitativen Analysen in **Kapitel 5.3.1** jedoch bereits bekannt war, dass die (*click*)ECM nicht nur aus Kollagenen, sondern mindestens auch aus Fibronectin und Laminin bestand, wurden zusätzlich weitere theoretische Umrechnungsfaktoren berechnet. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum einen wurden die Aminosäuresequenzen für Kollagen Typ I, Typ III und Typ IV sowie Fibronectin und Laminin von der universellen Proteindatenbank (*UniProt* [221, 222]) heruntergeladen und die jeweiligen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren daraus berechnet (die hierfür verwendeten *UniProt*-Einträge sowie die Berechnungsformeln sind im **Anhang** unter **Kapitel 7.4.2** aufgeführt). Zum anderen wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt und dabei Arbeiten ausgewählt, die sich mit der experimentellen Analyse der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Gewebe und ECM-Einzelkomponenten beschäftigten. Da Fibroblasten den Hauptzelltyp der Dermis bilden, wurde als repräsentatives Gewebe humane juvenile Haut gewählt und hierzu verschiedene Literaturstellen ausgewählt, in denen die Aminosäurezusammensetzung entsprechend analysiert wurden [223, 224]. Die vollständige Liste aller konsultierter Publikationen ist im **Anhang, Kapitel 7.4.2, Tabelle A2** aufgelistet, ebenso alle zur Berechnung der Umrechnungsfaktoren verwendeten Formeln. Alle auf diese Weise erhaltenen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten proteinspezifischen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren. Neben dem Jones-Faktor für Gelatine [218, 219] wurden weitere theoretische Umrechnungsfaktoren für die fünf ECM-spezifischen Proteine Kollagen Typ I, III, IV, Fibronektin und Laminin sowie für humane juvenile Haut berechnet. Für die Berechnung dieser theoretischen Werte wurden die Aminosäuresequenzen der ECM-Proteine von der universellen Proteindatenbank *UniProt* heruntergeladen [213, 214] oder für die humane juvenile Haut aus der Literatur bezogen [223, 224].

Jones Faktor	Kollagen			Fibronektin	Laminin	Juvenile Haut	
	I	III	IV				
Jones <i>et al.</i> [218, 219]	<i>UniProt</i> [213, 214]					Bornstein und Piez [223]	Miyahara <i>et al.</i> [224]
5,55	5,25	5,31	5,69	5,88	5,66	5,45	5,65

Die berechneten theoretischen Faktoren aus den *UniProt*-Aminosäuresequenzen und die berechneten theoretischen Faktoren aus der Fachliteratur überspannten einen Bereich von 5,25 (Kollagen Typ I) bis 5,88 (Fibronektin). D. h. sowohl der erwähnte Jones-Faktor für Gelatine (5,55) als auch die beiden für menschliches Hautkollagen berechneten Faktoren (5,45 und 5,65) lagen in diesem Bereich.

Im nächsten Schritt wurde der Stickstoffgehalt der (*click*)ECM von den drei Spendern in drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten in der *Core Facility* der Universität Hohenheim (Modul 3: Analytische Chemie) analysiert. Dazu wurden die Proben katalytisch verbrannt und die dabei entstehenden Verbrennungsgase mithilfe eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors (engl. *thermal conductivity detector*, TCD) analysiert. Anschließend wurden die gemessenen Stickstoffgehalte mit Hilfe der in **Tabelle 5** aufgeführten Faktoren umgerechnet. Die aus der Umrechnung resultierenden Gesamtproteingehalte sind in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6: Bestimmung des Proteingehalts in [% (w/w)] in der (*click*)ECM über die Umrechnung der experimentell quantifizierten Stickstoffgehalte. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3 mit drei Donoren und jeweils drei technischen Replikaten) für die aufkonzentrierte und homogenisierte (*click*)ECM. Der Gesamtproteingehalt wurde durch die Umrechnung des quantifizierten Stickstoffgehalts mithilfe der in **Tabelle 5** angegebenen spezifischen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren berechnet.

	Jones Faktor	Kollagen			Fibronektin	Laminin	Juvenile Haut	
		I	III	IV				
ECM	56 ± 4	53 ± 4	54 ± 4	57 ± 4	59 ± 4	57 ± 4	55 ± 4	57 ± 4
<i>click</i> ECM	58 ± 4	54 ± 4	55 ± 4	59 ± 4	61 ± 4	59 ± 4	57 ± 4	59 ± 4

Abgeleitet von den in **Tabelle 6** aufgeführten Gesamtproteingehalten konnte davon ausgegangen werden, dass der mittlere Proteingehalt mit hoher Wahrscheinlichkeit im Bereich von $53 \pm 4 \%$ (w/w) - $59 \pm 4 \%$ (w/w) für unmodifizierte ECM und im Bereich von $54 \pm 4 \%$ (w/w) - $61 \pm 4 \%$ (w/w) für Azid-modifizierte *click*ECM lag. Zwischen den Ergebnissen der unmodifizierten ECM und dem Azid-modifizierten *click*ECM wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Eine statistische Analyse darüber, wie sich die einzelnen Umrechnungsfaktoren auf die Proteingehalte auswirkten, ist im **Anhang** unter **Kapitel 7.4.2, Tabelle A3** aufgeführt. Diese Analyse bestätigte die Erwartung, dass es in Abhängigkeit von den verwendeten Umrechnungsfaktoren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen geben würde. Es wurde klar, dass die Entscheidung darüber, welcher Umrechnungsfaktor für eine individuelle Probe der richtige ist, nicht trivial ist. Aus der Literatur war zwar bekannt, dass die ECM ein hochkomplexes und dynamisches Konglomerat aus bis zu 300 verschiedenen Proteinen in gewebespezifischen Kombinationen und Konzentrationen darstellt [132], dennoch war die exakte Zusammensetzung der in dieser Arbeit untersuchten (*click*)ECM bis dato nicht vollständig entschlüsselt. Folglich war es nicht möglich, einen einzigen spezifischen Faktor für die Bestimmung des Proteingehalts auszuwählen. Vielmehr legen die Erkenntnisse dieser Arbeit nahe, dass eine gewebespezifische Spanne in Betracht gezogen werden sollte, mit der die Proteinkonzentration mit einer gewissen Verlässlichkeit bestimmt werden kann. Trotz dieser Einschränkung und basierend auf den vergleichsweise kleinen Standardabweichungen der Stickstoffquantifizierung erschienen diese Werte dennoch wesentlich robuster und zuverlässiger als die aus den beiden kolorimetrischen Assays erhaltenen Ergebnisse. Dieser Untersuchung zufolge waren die Proteingehalte der *in vitro* von

Fibroblasten erzeugten (*click*)ECM folglich etwas niedriger als der von Smith *et al.* [216] publizierte Proteingehalt des natürlichen Bindegewebes (88 %(w/w)). Wie oben bereits erwähnt, waren diese niedrigeren Proteinkonzentrationen zum einen aufgrund der statischen *In-vitro*-Kulturbedingungen und der dabei fehlenden mechanischen Stimuli und zum anderen aufgrund der kurzen Kultivierungsdauer von nur 7 Tagen jedoch zu erwarten. Die Ergebnisse waren daher plausibel und lagen in einem realistischen Bereich.

Um die Ergebnisse der Proteinbestimmung zu verifizieren, wäre es in der Fortführung dieser Arbeit erstrebenswert, zusätzliche Methoden anzuwenden, die idealerweise auf einer anderen Analyseverfahren basieren. Bisher konnte die (*click*)ECM aufgrund der arbeits- und zeitintensiven Herstellung und Aufarbeitung nicht in ausreichend großen Mengen generiert werden, um noch weitere Methoden wie bspw. eine Aminosäureanalyse zur Validierung der Ergebnisse durchzuführen. Bei dieser Methode werden die Proben zunächst mit Salzsäure hydrolysiert und die Aminosäuren dann durch eine Ionenchromatographie aufgetrennt. Anschließend werden die getrennten Aminosäuren in einer Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin umgesetzt und die resultierenden Derivate dann mit einem photometrischen Detektor analysiert. Die Quantifizierung des Aminosäuregehaltes und damit des Proteingehaltes erfolgt schließlich anhand von mitgeführten Aminosäurestandards [225]. Diese Methode ließe eine probenspezifische und vermutlich relativ exakte Bestimmung des Proteingehalts der analysierten Proben zu.

Insgesamt kann bezüglich der in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen Methode jedoch festgestellt werden, dass der Ansatz der Quantifizierung des Gesamtproteingehaltes der (*click*)ECM durch die Elementaranalyse und die Umrechnung des dabei quantifizierten Stickstoffgehaltes in die Gesamtproteinkonzentration eine robuste, zuverlässige und praktikable Methode darstellte, bei der weder die Unlöslichkeit komplexer biologischer Matrices noch das Fehlen eines repräsentativen Standards eine Rolle spielten.

5.3.2.2 Quantifizierung des Kollagengehalts in der (*click*)ECM

Im nächsten Schritt der quantitativen Untersuchung der (*click*)ECM-Zusammensetzung sollte der Gesamtkollagengehalt quantifiziert werden. Kollagen bildet, wie oben bereits ausführlich erläutert (siehe auch **Kapitel 1.2.2**), eine der Hauptklassen der Strukturproteinproteine im Bindegewebe von Wirbeltieren und folglich auch in der von Fibroblasten stammenden ECM [138, 216, 226-228]. Die Familie der Kollagene enthält eine Vielzahl verschiedener Kollagensubtypen, wobei Typ I und Typ III bspw. zur Gruppe der fibrillären Kollagene gehören, die hauptsächlich im Bindegewebe und den Knochen vorkommen, während Typ IV zur Gruppe der Basalmembran-Kollagene zählt [16, 138].

Die Primärstruktur dieser großen Familie von Glykoproteinen ist, wie in **Kapitel 1.2.2** bereits ausführlich erklärt, durch die sich wiederholende Tripeptid-Aminosäuresequenz Glycin-X-Y gekennzeichnet. Prolin nimmt hierbei häufig die X- und Hydroxyprolin (HP) die Y-Position ein. Während der Kollagenbiosynthese wird jeweils aus drei Prokollagen α -Ketten eine Tripelhelix gebildet. Diese als Prokollagen bezeichnete lösliche Kollagenvorstufe wird in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie durch Abspaltung von C- und N-terminalen Peptiden enzymatisch in Tropokollagen umgewandelt wird. Während der Fibrillogenese werden unlösliche Kollagenfibrillen durch die kovalente Vernetzung mehrerer Tropokollagenmoleküle gebildet. Diese Moleküle bilden schließlich Kollagenfasern, wenn sich mehrere Kollagenfibrillen zusammenlagern [16].

Die α -Aminosäure HP kommt fast ausschließlich in Kollagen und nur in sehr geringen Mengen in Elastin vor. Aufgrund der Häufigkeit der Kollagene in den meisten Säugetiergeweben und der Tatsache, dass Elastine unter Standard-*In-vitro*-Zellkulturbedingungen aufgrund fehlender mechanischer Reize [170, 171] nicht als reife Fasern kovalent in die ECM integriert werden, kann der proteingebundene HP-Gehalt daher für die Kollagenquantifizierung mit einem akzeptablen Genauigkeitsgrad verwendet werden [138, 172-176].

Quantifizierung des Gehalts an unlöslichem Kollagen in der (click)ECM

Zur Quantifizierung des Gehalts an unlöslichem Kollagen über die HP-Konzentration wurden die Proben zunächst mit Salzsäure hydrolysiert, wobei die Polypeptide in einzelne Aminosäuren aufgespalten und dann mit Chloramin T oxidiert wurden. Das Oxidationsprodukt bildete mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd ein rotes Kondensationsprodukt, das durch photometrische Absorptionsmessung bei 555 nm quantifiziert werden konnte [138]. Der gemessene HP-Gehalt war anschließend, ähnlich der Proteinbestimmung über die Stickstoffkonzentration, in den Kollagengehalt umrechenbar ($\text{HP } [\%(\text{w/w})] / 100$).

In den immunhistochemischen Färbungen in **Abbildung 19** war bereits zu erkennen, dass die (click)ECM mindestens die Kollagentypen I, III und IV enthielt. Um einen geeigneten HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktor für die Abschätzung des Kollagengehalts zu finden, wurde zunächst erneut eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. Dabei wurden Studien ausgewählt, in denen der HP-Gehalt von juveniler menschlicher Haut analysiert wurde. Die vollständige Liste aller konsultierter Publikationen ist im **Anhang** unter **Kapitel 7.4.2.1, Tabelle A2** aufgelistet. Die Berechnung der HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren wurde analog zur Berechnung des Gesamtstickstoffgehalts $\% N_{total}$ im **Anhang** unter **Kapitel 7.4.2.1 (Formel A1 und Formel A2)** durchgeführt. Statt dem N-Gehalt wurde der HP-Gehalt eingesetzt. Wie auch schon bei der Proteinbestimmung stellte sich auch für die Umrechnung der HP-Konzentration in den Kollagengehalt heraus, dass auch hier kein universell anwendbarer Umrechnungsfaktor zur Verfügung stand. Vielmehr wurden anhand der in der Literatur publizierten Aminosäurezusammensetzungen verschiedener ECM-Einzelmoleküle oder auch komplexer humaner Gewebe mehrere leicht voneinander abweichende Faktoren berechnet. Capella-Monsonis *et al.* [138] schlugen bspw. 7,4 als geeigneten Umrechnungsfaktor vor und postulierten, dass dieser sich aus dem prozentualen Anteil (13,5 $\%(\text{w/w})$) des HPs im Kollagen Typ I in Säugetiergeweben ergibt. Sie wiesen aber auch darauf hin, dass für Fischgewebe oder andere Kollagensubtypen die geeignete HP-Konzentration verwendet werden sollte. Diese Speziesabhängigkeit wurde auch von Hofman *et al.* [176] beschrieben, die Säugetierkollagen mit einem HP-Gehalt von 14 $\%(\text{w/w})$ bezifferten. Neuman und Logan [175] stellten ebenfalls HP-Konzentrationen aus der Literatur zusammen, die sie als die "beste Werte in der Gelatine-Fachliteratur" bezeichneten. Diese Werte überspannten einen Bereich von 12,9 $\%(\text{w/w})$ - 14,6 $\%(\text{w/w})$. Die Forscher stellten fest, dass ihre eigenen Werte für Gelatine und Kollagene (13 $\%(\text{w/w})$ – 14 $\%(\text{w/w})$) in diesem Bereich lagen. Ein ähnlicher Bereich (10 $\%(\text{w/w})$ – 14 $\%(\text{w/w})$) wurde für aus Haut extrahiertem Kollagen von

Edwards und O'Brien Jr. [172] berichtet, die eine durchschnittliche HP-Menge von 12,5 g/ 100 g Protein annahmen.

Ein weiterer wichtiger Beitrag wurde von Etherington und Sims [229] geleistet, die zeigten, dass einzelne Kollagentypen in Fleisch und Fleischprodukten unterschiedliche HP-Konzentrationen enthielten. Sie führten u. a. die HP-Konzentrationen für Typ I (13,1 %(w/w)), Typ III (17,4 %(w/w)) und Typ IV (16,6 %(w/w)) auf. Ferner wiesen sie darauf hin, dass aufgrund der Tatsache, dass alle chemischen Bestimmungen an den freien Aminosäuren nach der Hydrolyse der Proteine vorgenommen werden, die HP-Konzentrationen um die (formale) Zugabe eines Wassermoleküls zu jedem Aminosäurerest korrigiert werden sollten. Auf diese Weise repräsentieren die ermittelten Werte die freien Aminosäuren und der erhaltene Wert versteht sich folglich als Masse des hydrolysierten HP, das pro Masse an nicht hydrolysiertem Protein erzeugt wird.

Da die genaue Kollagenzusammensetzung und die Konzentrationen der einzelnen Kollagentypen innerhalb der (click)ECM noch unbekannt waren, wurde die Kollagenkonzentrationen, ähnlich wie bei der Bestimmung des Proteingehalts durch eine Auswahl von gewebespezifischen Umrechnungsfaktoren aus der Literatur abgeschätzt. Aus der Literatur war bekannt, dass Kollagen 70 – 80 % des Trockengewichts der menschlichen Dermis ausmacht und die Kollagentypen I und III dabei mengenmäßig am häufigsten vorkommen [188]. Aus diesem Grund wurden für die Berechnung geeigneter Umrechnungsfaktoren zusätzlich zu juveniler Haut als komplexes Gewebe (7,4 [223] und 7,5 [224]) auch die HP-Gehalte aus experimentell bestimmten Aminosäureanalysen von menschlichem Kollagen Typ I (7,4) [138] und Säugetierkollagen Typ III (5,6) [230] aus der Literatur herangezogen. Alle berechneten HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren zur Berechnung des Kollagengehalts sowie die Ergebnisse dieser Umrechnungen sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Auflistung der proteinspezifischen HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren, die entweder aus den in der Literatur für die Kollagen (COL)-Subtypen I und III oder für humane juvenile Haut publizierten Aminosäurezusammensetzungen berechnet wurden.

Referenz	COL		Juvenile Haut	
	I	III		
	Capella-Monsonis <i>et al.</i> [138]	Chung und Miller [230]	Bornstein und Piez [223]	Miyahara <i>et al.</i> [224]
Hydroxyprolin-zu-Kollagen Umrechnungsfaktor	7,4	5,6	7,4	7,5

Die berechneten theoretischen Faktoren überspannten somit einen Bereich von 7,5 (juvenile Haut) bis 5,6 (Kollagen Typ III). Die mit diesen HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren berechneten Konzentrationen an unlöslichem Kollagen sind in **Tabelle 8** aufgelistet.

Tabelle 8: Bestimmung des Gehalts an unlöslichem Kollagen in [% (w/w)] in der (click)ECM über die Umrechnung des enthaltenen HP-Gehalts. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen (n = 2 mit jeweils drei technischen Replikaten mit (click)ECM von jeweils drei Donoren. Der Kollagengehalt wurde durch die Umrechnung des quantifizierten HP-Gehalts mithilfe der in **Tabelle 7** angegebenen spezifischen HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren für Kollagen Typ I, Typ III sowie für juvenile Haut berechnet.

	Kollagen		Juvenile Haut	
	Typ I	Typ III		
ECM	16,5 ± 3,4	12,4 ± 2,5	16,5 ± 3,4	17,9 ± 3,4
clickECM	24,9 ± 5,4	18,7 ± 4,0	24,9 ± 5,4	25,2 ± 5,5

Abhängig vom verwendeten HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktor ergaben sich in dieser Untersuchung für die unmodifizierte ECM eine Konzentrationsspanne von 12,4 ± 2,5 % (w/w) - 17,9 ± 3,4 % (w/w) und für die Azid-modifizierte clickECM eine Konzentrationsspanne von 18,7 ± 4,0 % (w/w) - 25,2 ± 5,5 % (w/w) (**Tabelle 8**). Aus der statistischen Analyse der Ergebnisse (**Anhang, Kapitel 7.4.2.2, Tabelle A4**) konnte abgeleitet werden, dass sich die Auswahl des jeweiligen HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktor signifikant auf den berechneten Kollagengehalt der (click)ECM auswirken kann. Wird der Kollagengehalt mit den beiden Umrechnungsfaktoren berechnet, die aus den publizierten Aminosäurezusammensetzungen juveniler Haut berechnet wurden (7,4 und 7,5), so

unterscheiden sich die Kollagenkonzentrationen der (*click*)ECM nicht signifikant voneinander, egal welcher der beiden Faktoren für die Umrechnung herangezogen wird. Wird der HP-Gehalt jedoch mit dem Umrechnungsfaktor ermittelt, der aus der publizierten Aminosäurezusammensetzung von Kollagen Typ III (5,6) berechnet wurde, sind die Kollagenkonzentrationen signifikant kleiner als die bei denen, die mit den Umrechnungsfaktoren für juvenile Haut erhalten wurden. Dies verdeutlicht, dass auch bei dieser Bestimmung die Auswahl des HP-zu-Kollagenfaktors entscheidend ist. Sofern die Aminosäurezusammensetzung oder die genaue Kollagenzusammensetzung nicht bekannt sind, sollte folglich eher eine Konzentrationsspanne angegeben werden, analog zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts oben.

Eine weitere Erkenntnis der statistischen Analyse der Kollagengehalte war, dass die Azid-modifizierte *click*ECM signifikant mehr unlösliches Kollagen enthielt als die unmodifizierte ECM. In der Fachliteratur war dieser Effekt des MGEs mit Ac₄GalNAz bis dato noch nicht untersucht oder beschrieben worden. Der genaue Grund für den erhöhten Kollagengehalt in der chemisch modifizierten *click*ECM bleibt deshalb zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Abgesehen von den zugesetzten Monosacchariden (ECM: GalNAc (C₈H₁₅NO₆) und *click*ECM: Ac₄GalNAz (C₁₆H₂₂N₄O₁₀)) wurden die Zellen während der *In vitro*-Zellkultur exakt identisch behandelt. Um das Phänomen der offensichtlich erhöhten Kollagenexpression eingehender zu untersuchen, wäre es für die Zukunft interessant, eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchzuführen, um zu untersuchen, ob durch das MGE mit Ac₄GalNAz auf der molekularbiologischen Ebene eine erhöhte Genexpression auftritt.

Verglichen mit den Literaturangaben von Smith *et al.* [216], die den Kollagengehalt von dermaletem juvenilen Bindegewebe (Alter < 1 Jahr) untersuchten, erschienen die in dieser Arbeit quantifizierten Konzentrationen an unlöslichem Kollagen zunächst recht gering. Der von Smith *et al.* quantifizierte Gehalt an unlöslichem Kollagen betrug 63,7 % (w/w). Allerdings stellten die Forscher in ihrer Arbeit heraus, dass der Gesamtkollagengehalt mit dem Alter zunimmt. Angesichts dieser Tatsache wäre es folglich durchaus plausibel, dass die nach nur 7 Tagen isolierte (*click*)ECM signifikant weniger unlösliches Kollagen enthielt, als dies im dermalen juvenilen Bindegewebe der Fall war. Ferner war auch hier zu berücksichtigen, dass die (*click*)ECM unter statischen Zellkulturbedingungen generiert wurde ohne den Einfluss von externen Stimuli, die der Matrixproduktion ggf. zuträglich gewesen wären. Ein weiterer Einfluss, der für die verringerte Kollagenkonzentration in der (*click*)ECM verglichen zum Kollagengehalt

des juvenilen Bindegewebes geführt haben könnten, könnten die Bedingungen während der *In-vitro*-Generierung der (*click*)ECM gewesen sein. Die Zellen werden im Zuge der Zellkultur auf dem Boden einer Zellkulturschale kultiviert und über die Zugabe mehrerer Milliliter Zellkulturmedium versorgt, die lediglich eine geringere Biopolymerkonzentration beinhalten. Damit unterscheiden sich die *In-vitro*-Bedingungen von den *In-vivo*-Bedingungen, die im natürlichen Gewebe vorherrschen, da dort die Konzentration biologischer Makromoleküle bedeutend höher ist [231]. Nach der Sezernierung der ECM-Biomoleküle im Zuge der Proteinbiosynthese (siehe auch **Kapitel 1.2.2**) gelangen die Vorläufermoleküle wie z. B. die Prokollagene im Fall des Kollagens ins Zellkulturmedium. Aufgrund des großen Volumens und der vergleichsweise geringen Biomolekülkonzentration kann es dort zur ungehinderten Diffusion dieser Vorläufermoleküle ins Zellkulturmedium kommen, wodurch die Integrationsrate dieser Moleküle in die ECM und somit folglich auch die isolierbare (*click*)ECM-Menge verringert wird, was den Konzentrationsunterschied weiter erklären könnte [129, 231]. Insgesamt wurde deutlich, dass die Entscheidung, welcher Umrechnungsfaktor der geeignetste ist, auch bei der Bestimmung des Gehalts an unlöslichem Kollagen nicht trivial war [188]. Da die genaue Zusammensetzung der Kollagene in der (*click*)ECM bis dato noch nicht vollständig aufgeschlüsselt wurde, war es nicht sinnvoll, einen einzigen universellen Faktor zu benennen. Vielmehr war es auch in diesem Fall ratsam, einen gewebespezifischen Konzentrationsbereich in Betracht zu ziehen.

Für eine potenzielle Weiterführung dieser Arbeit wäre es ratsam, alternative Methoden anzuwenden, um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu validieren. Auch hier könnte eine Aminosäureanalyse der jeweiligen Probe eine hilfreiche Methode darstellen, mit der der HP-Gehalt analysiert werden könnte, um die aus dem HP-Assay erhaltenen Werte zu validieren. Ratsam wäre es aber auch, die Kollagenkonzentration mithilfe einer alternativen und direkten Methode zu bestimmen, die auf einem anderen Reaktionsmechanismus beruht. Dies würde den Vorteil bringen, dass auf die Umrechnung des HP-Gehalts in die Kollagenkonzentration verzichtet werden könnte. Denkbar wäre hier bspw. ein quantitativer Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) zum quantitativen Nachweis der einzelnen Kollagentypen. Für eine abschließende Aussage müssten hierbei jedoch alle bekannten Kollagentypen quantifiziert werden, was sich allerdings aufgrund der benötigten Antikörper vermutlich sehr kostenintensiv gestalten würde. Auch die Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*, NMR) könnte

eine geeignete, aber ebenfalls vergleichsweise aufwendige Methode für die Analyse und Quantifizierung von Aminosäuren darstellen [229].

Quantifizierung des Gehalts an löslichem Kollagen in der (click)ECM

Im Zuge der Kollagensynthese sekretieren die Zellen zunächst die löslichen Prokollagenmoleküle, von denen außerhalb der Zelle dann spezifische Peptide an den Molekülen enzymatisch abgespalten werden. Dies führt zur Polymerisation der enzymatisch prozessierten Moleküle zu den sogenannten Tropokollagenen, welches sich anschließend parallel zusammenlagern und dadurch die Primärfilamente bilden (**Kapitel 1.2.2**).

Um zu untersuchen, ob in der *in vitro* erzeugten (click)ECM auch lösliche Kollagene vorhanden waren, wurde zusätzlich zur Bestimmung des unlöslichen Kollagens über die HP-Quantifizierung der *SircolTM Soluble Collagen Assay* durchgeführt. Mit diesem Assay kann der Gehalt an frisch exprimiertem Kollagen (Typ I–IV) bestimmt werden, das noch nicht kovalent quervernetzt vorliegt.

Bei der experimentellen Durchführung dieser Bestimmung stellte sich heraus, dass weder in der unmodifizierten ECM noch in der Azid-modifizierten clickECM lösliches Kollagen nachgewiesen werden konnte. Einer der Gründe für dieses Ergebnis könnte die ungehinderte Diffusion der Prokollagenmoleküle nach deren Sezernierung in das Zellkulturmedium gewesen sein, was aus der vergleichsweise geringeren Biopolymerkonzentration des Zellkulturmediums im Vergleich zur *In-vivo*-Situation resultiert haben könnte. Zudem musste davon ausgegangen werden, dass die löslichen Kollagene auch im Zuge der durchgeführten Medienwechsel aus dem Gesamtsystem entfernt wurden oder schlussendlich durch die Waschschrte bei der Dezellularisierung und Isolierung herausgewaschen wurden [129].

Der von Smith *et al.* quantifizierte Gesamtkollagengehalt von 72,3 %(w/w) im dermalen juvenilen Bindegewebe setzte sich aus 8,6 %(w/w) löslichem und 63,7 %(w/w) unlöslichem Kollagen zusammen [216]. Angesichts dieses relativ geringen Anteils an löslichem Kollagen in juveniler Haut und der Tatsache, dass die in dieser Arbeit untersuchte (click)ECM bereits nach 7 Tagen isoliert wurde, erschien es durchaus plausibel, dass in dieser Arbeit kein lösliches Kollagen nachgewiesen werden konnte.

Wie bereits zuvor diskutiert, wäre es in der möglichen Fortführung dieser Untersuchungen auch für die Quantifizierung des Gehalts an löslichem Kollagen hilfreich, eine weitere, auf einem anderen Reaktionsmechanismus beruhende Methode heranzuziehen und die Erkenntnisse dieser Arbeit damit zu verifizieren.

Quantifizierung des Gehalts an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) in der (click)ECM

Polysaccharide in Form von Glykanen bilden eine wichtige Klasse von ECM-Biomolekülen [16, 36]. Die qualitative Beurteilung der in **Abbildung 18 d** dargestellten Glykanverteilung zeigte, dass die GAGs homogen über die gesamte (click)ECM verteilt vorlagen. Die quantitative Bewertung des Gehalts an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) wurde mit dem kommerziellen *Blyscan*TM Assay durchgeführt. Die dabei ermittelten Werte sind in **Tabelle 9** aufgelistet.

Tabelle 9: Quantitative Bestimmung des Gehalts an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) in der (click)ECM unter Verwendung des *Blyscan*TM Assays. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD aus n = 3 Versuchen mit drei individuellen Donoren und jeweils drei technischen Replikaten. Zwischen den Ergebnissen der nicht modifizierten ECM und der Azid-modifizierten *click*ECM bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

	ECM	<i>click</i> ECM
sGAG-Konzentration (MW ± SD [(w/w)])	3,1 ± 0,6	3,3 ± 0,9

Der sGAG-Gehalt der unmodifizierten ECM wurde auf diese Weise auf 3,1 ± 0,6 (w/w) bestimmt, während die Konzentration der sGAGs in der Azid-modifizierten *click*ECM 3,3 ± 0,9 (w/w) betrug. Zwischen den Ergebnissen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied, was den Schluss zuließ, dass die sGAG-Expression durch das MGE nicht negativ beeinträchtigt wurde.

Der verwendete *Blyscan*TM Assay ist eine kommerziell vertriebene Version des 1,9-Dimethyl-Methylenblau (DMMB)-Tests, der sGAG auf der Grundlage des Phänomens der Metachromasie nachweist, wobei sich das charakteristische Blau des kationischen DMMB-Farbstoffs in einen violetten Farbton verändert, wenn der Farbstoff an polyanionische Substrate wie sGAG bindet [232, 233]. Es ist bekannt, dass Artefakte bei der quantitativen Bestimmung des sGAG-Gehalts die Ergebnisse aufgrund des Vorhandenseins von zell- und ECM-assoziierten polyanionischen Verunreinigungen erheblich beeinflussen können. Zheng und Levenston [232] postulieren in ihrer Arbeit, dass dadurch der tatsächliche sGAG-Gehalt signifikant überschätzt werden kann. Dieser Effekt ist laut der Forscher besonders zu frühen Zeitpunkten in der Kultur oder bei Proben mit einer relativ geringen sGAG-Konzentration stärker ausgeprägt. Um das Risiko für solche falsch-positiven Ergebnisse für die in dieser Arbeit untersuchte und bereits nach 7-tägiger *In-vitro*-Zellkultur isolierte (click)ECM zu umgehen, wurde der pH-Wert des verwendeten *Blyscan*TM-Farbstoffreagenzes

überprüft. Die Messung ergab einen pH von 1,6. Damit lag dieser sehr nah an dem von Zheng und Levenston [232] empfohlenen pH-Wert von 1,5, sodass eine quantitative Protonierung der z. B. in den ECM-Proteinen vorhandenen Carbonsäuregruppen gewährleistet werden konnte. Folglich war davon auszugehen, dass das Risiko einer Überschätzung der sGAG-Konzentration in den Versuchen dieser Arbeit sehr gering war und die Ergebnisse vertrauenswürdig waren. Im Vergleich zu der von Schenke-Layland *et al.* publizierten Studie, in der der sGAG-Gehalt von auf siliziumbasierten Nanostrukturen abgeschiedener Fibroblasten-ECM nach einem Zeitraum von vier Wochen auf 2,4 %(w/w) beziffert wurde, lagen die Ergebnisse dieser aktuellen Studie in einer vergleichbaren Größenordnung.

Wie oben erwähnt, stellt der *BlyscanTM Assay* die am häufigsten verwendete Methode zur Quantifizierung des sGAG-Gehalts dar. Andere nicht kolorimetrische Methoden zur (s)GAG-Quantifizierung, wie z. B. die Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie-Techniken (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS) oder spezielle ELISA-Kits für die einzelnen sGAG-Moleküle wären interessante Möglichkeiten zur Überprüfung der ermittelten Gehalte. Allerdings birgt die für die LC-MS-Analyse notwendige Probenpräparation der unlöslichen (*click*)ECM aufgrund der vielen aufeinanderfolgenden Extraktions- und Fällungsschritte ein hohes Risiko für den Verlust von (s)GAG-Molekülen und folglich unverlässlichen Ergebnissen. Neben der Quantifizierung des sGAG-Gehalts wäre es in der Fortführung dieser Arbeit überdies interessant, auch den Gehalt des nicht sulfatierten GAGs Hyaluronsäure zu quantifizieren. Hierfür könnten eine Reihe kommerzielle Assays angewandt werden oder ein spezielles ELISA-Kit.

5.3.3 Bewertung der dritten Hypothese zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der (*click*)ECM

Zusammenfassend konnte für das dritte Arbeitspaket der vorliegenden Arbeit folglich festgestellt werden, dass sich alle untersuchten qualitativen Techniken (SDS-PAGE und (Immun)Histochemische Färbemethoden in Kombination mit verschiedenen Mikroskopietechniken) als durchaus geeignet erwiesen, um eine Einschätzung über die biochemische Zusammensetzung und Architektur der (*click*)ECM zu erhalten. Allerdings stellte sich durch die nachfolgend durchgeführten quantitativen Analysen heraus, dass die angewandten Methoden nicht in der Lage waren, kleinere Konzentrationsunterschiede zwischen unmodifizierter ECM und Azid-modifizierter *click*ECM aufzulösen, wie sie bspw. bei der Konzentration an unlöslichem Kollagen laut der quantitativen Analysen auftraten. Folglich stellten diese Methoden hilfreiche Instrumente dar, um einen ersten Überblick über die Natur der biologischen Proben zu erhalten. Sie können allerdings die quantitativen Methoden aufgrund ihres Auflösungsvermögens hinsichtlich kleinerer Konzentrationsunterschiede keinesfalls ersetzen, sondern sollten eher als Ergänzung angesehen werden.

Die angewandten quantitativen Analysemethoden erlaubten es, die Konzentrationen von Proteinen, Kollagenen (unlösliche sowie lösliche) und von den sGAG zu bestimmen. Im Falle der Proteinquantifizierung stellte sich heraus, dass die in der Literatur vielfach verwendeten chromogenen Proteinassays (Bradford und BCA) für die Analyse der in dieser Arbeit untersuchten hochkomplexen und unlöslichen (*click*)ECM ungeeignet waren. Infolgedessen musste zunächst eine alternative Methode implementiert werden, die auf der Umrechnung des durch Elementaranalyse ermittelten Stickstoffgehalts in die Gesamtproteinkonzentration basierte. Die Quantifizierung des Gehalts an löslichem Kollagen sowie des sGAG-Gehalts mittels der jeweiligen kommerziellen Assays erwiesen sich hingegen als gut geeignet.

Die Ergebnisse der quantitativen Charakterisierung der (*click*)ECM demonstrierten sehr eindrücklich, dass nicht alle in der Literatur routinemäßig verwendeten analytischen Methoden ohne Weiteres für die Analyse von unlöslichen und komplex zusammengesetzten ECMs und CDMs geeignet sind. Vielmehr zeigte sich, dass es unerlässlich ist, die Eignung der jeweiligen Assays kritisch zu hinterfragen und zu überprüfen, um die jeweilige Kenngröße zuverlässig untersuchen zu können. Dasselbe gilt für die Auswahl der geeigneten gewebespezifischen Umrechnungsfaktoren im Zuge der Bestimmung des Proteingehalts und des Gehalts an unlöslichem Kollagen.

Wie aus **Abbildung 22** erkennbar ist, ergaben die quantitativen Analysen der *click*ECM in dieser Arbeit eine Zusammensetzung, bei der die Proteine mit ca. 55 – 60 % (w/w) den Hauptanteil ausmachten. Davon nahmen laut Hydroxyprolin-Assay ca. 20 – 25 % (w/w) die unlöslichen Kollagene ein. Laut des *Blyscan*TM-Assays bestand die *click*ECM ferner aus ca. 3 % (w/w) sulfatierten Glykosaminoglykanen. Damit verblieben ca. 37 % (w/w) der *click*ECM-Zusammensetzung unbekannt. Woraus sich dieser Anteil zusammensetzt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen. Vorausgesetzt alle durchgeführten Bestimmungen lieferten die korrekten Angaben, könnten im noch unbekanntem Anteil möglicherweise nicht sulfatierte Glykosaminoglykane vorhanden sein, die im Zuge dieser Arbeit noch nicht quantifiziert wurden. Auch ob möglicherweise Vorläufermoleküle der Elastine enthalten sein könnten, verbleibt zum aktuellen Zeitpunkt unbekannt.

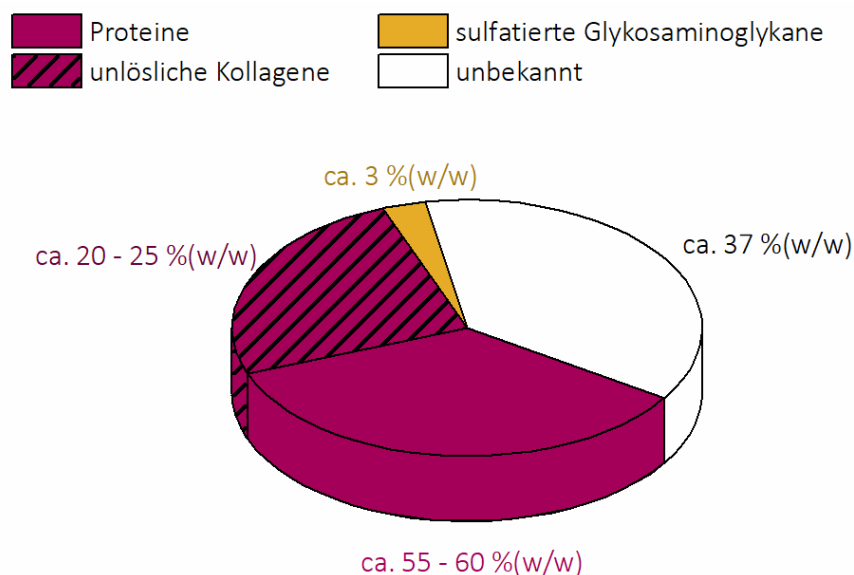


Abbildung 22: Grafische Darstellung der in dieser Arbeit quantifizierten (*click*)ECM-Komponenten.

Insgesamt stellte sich im Zuge dieses Arbeitspakets heraus, dass das MGE, abgesehen von der Modifikation der Matrix mit Azidgruppen, die Kollagenmenge innerhalb der *click*ECM im Vergleich zur unmodifizierten ECM signifikant erhöhte. Dieser Unterschied konnte, wie oben bereits diskutiert, mit den qualitativen Methoden nicht dargestellt werden, was die Wichtigkeit der quantitativen Methoden nochmals unterstreicht. Zwischen allen anderen analysierten Kenngrößen wurden im direkten Vergleich zur unmodifizierten ECM keine statistischen Unterschiede festgestellt. Folglich konnte abschließend festgestellt werden, dass die dritte Hypothese zur Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der (*click*)ECM nur teilweise als bestätigt angenommen werden konnte.

Für eine potenzielle Fortsetzung dieser Arbeit wäre es, wie oben bereits diskutiert, ratsam, alle Kenngrößen nochmals mit anderen Methoden zu validieren, um sicherzustellen, dass keine der in dieser Arbeit angewandten Methoden den Gehalt der einzelnen Biomolekülklassen über- oder unterschätzt. Des Weiteren wäre es interessant, die (click)ECM nach der Isolierung auch auf potenzielle Zellbruchteile oder DNA-Reste hin zu untersuchen, die möglicherweise durch die Lyse und Aufreinigung noch nicht vollständig aus der (click)ECM entfernt wurden.

5.4 Generierung von homogenen und reproduzierbaren Oberflächenbeschichtungen aus (click)ECM

Im dritten Arbeitspaket der vorliegenden Arbeit sollten die aufgearbeiteten (click)ECM-Suspensionen für die Erzeugung von stabilen, homogenen, dichten und bioaktiven Oberflächenbeschichtung genutzt werden, um auf diese Weise artifizielle Oberflächen mit den komplex zusammengesetzten, gewebespezifischen Biomolekülen der ECM zu versehen. Auch hier wurde zu systematischen Gliederung der Versuche eine entsprechende Hypothese formuliert:

*Durch die **optimierte Aufarbeitung der (click)ECM** und die **Modifizierung des von Ruff et al. entwickelten Beschichtungsprotokolls** [114, 122] ist es möglich, **reproduzierbare Oberflächenbeschichtungen** auf Dibenzocyclootin (DIBO)-funktionalisierten Silicium-Wafern und DIBO-funktionalisierten Glasoberflächen zu erreichen. Die dabei **entstehenden Beschichtungen sind homogen, stabil, bioaktiv und bedecken die Oberflächen vollständig.***

Die Ergebnisse, die in diesem Arbeitspaket entstanden, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits in einer *peer-reviewed* Publikation veröffentlicht [177].

5.4.1 Homogenität der erzeugten (*click*)ECM-Beschichtungen

Die in diesem Arbeitspaket untersuchten Beschichtungen aus (*click*)ECM wurden wie in Kapitel 4.1.3, 4.1.4, 5.1.1 und 5.1.2 ausführlich beschrieben auf DIBO-funktionalisierten Si-Wafern aufgebracht. Das Protokoll, um die DIBO-Funktionalisierung der Oberflächen zu erreichen, wurde dabei in großen Teilen von Ruff *et al.* [114, 122] übernommen und lediglich hinsichtlich der Silanisierungszeit mit Carboxyethylsilantriol (CES) und der Inkubationszeit der Beschichtungsgenerierung optimiert. Der Grund für diese Anpassung war, dass bei der Überprüfung der einzelnen nasschemischen Funktionalisierungsschritte festgestellt wurde, dass eine längere Inkubationszeit (45 Minuten statt 1 Minute) der aktivierten Si-Wafer in der Carboxyethylsilantriol (CES)-Lösung zu einer signifikant hydrophileren Oberfläche führte (4,1 ° statt 13,4 °, siehe auch **Anhang Kapitel 7.5, Abbildung A7**). Es war davon auszugehen, dass der niedrige Kontaktwinkel daraus resultierte, dass sich während der verlängerten Inkubationszeit mehr Carboxy-funktionale Silangruppen an der Oberfläche anlagern und ausrichten konnten.

Eine weitere Optimierung des Beschichtungsprotokolls erfolgte hinsichtlich der Inkubationszeit der DIBO-funktionalen Oberflächen mit der (*click*)ECM. Ruff *et al.* beschichteten die Substrate für 3 Stunden in einer feuchten Atmosphäre. Nicht gebundene (*click*)ECM-Fragmente wurden nach Ablauf der Zeit vorsichtig weggespült [114, 122]. In der vorliegenden Arbeit wurden die (*click*)ECM-Suspensionen auf den zu beschichtenden DIBO-funktionalen Oberflächen vollständig aufgetrocknet, um die maximal verfügbare Menge an (*click*)ECM-Biomolekülen auf den Oberflächen zu immobilisieren (siehe auch **Kapitel 4.4**).

Zur Untersuchung, ob die auf diese Weise generierten (*click*)ECM-Schichten die darunterliegenden Oberflächen vollständig bedeckten und zur Beurteilung der Beschichtungshomogenität wurden die auf den Oberflächen immobilisierten (*click*)ECM-Proteine mittels Fluorescamin unspezifisch angefärbt und unter dem cLSM anhand von z-Stapelaufnahmen analysiert (**Kapitel 4.1.4.2** und **Kapitel 4.3.2**). Aus diesen Aufnahmen konnten im nächsten Schritt die z-Intensitätsprofile der detektierten Fluoreszenz extrahiert werden. Die Schichtdicken wurden dann durch nichtlineare Regression der logarithmisch transformierten Intensitätsprofile ermittelt. Ein veranschaulichendes Beispiel eines solchen Profils ist im **Anhang Kapitel 7.5, Abbildung A8** aufgeführt. Die so ermittelten durchschnittlichen Schichtdicken sind in **Tabelle 10** gelistet:

Tabelle 10: Vergleich der mittleren Schichtdicken von (*click*)ECM-Beschichtungen.

Matrix	Mittelwert ± Standardabweichung [µm]	Minimum [µm]	Maximum [µm]	Median [µm]
ECM	35,0 ± 3,9	29,5	39,5	35,1
<i>click</i> ECM	31,4 ± 2,7	27,1	35,4	32,3

Zur Visualisierung der lokalen Schichtdicken in z-Richtung wurden diese Werte in Falschfarben dargestellt. Eine solche repräsentative Darstellung ist beispielhaft für einen Donor in **Abbildung 23** dargestellt. Alle anderen generierten Aufnahmen der (*click*)ECM-Beschichtungen sind im Anhang unter **Kapitel 7.5, Abbildung A9 – Abbildung A14** aufgeführt.

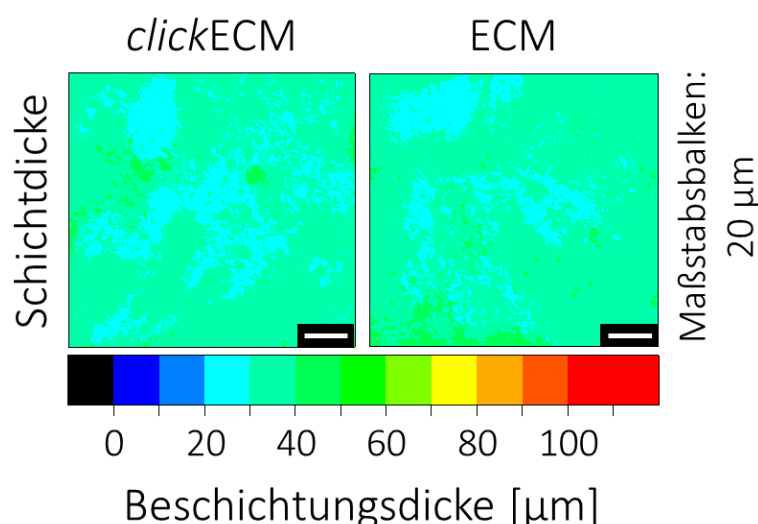


Abbildung 23: Repräsentative Falschfarbendarstellungen von (*click*)ECM-Beschichtungen eines Donors zur Untersuchung der Beschichtungshomogenität und -dichte. Die (*click*)ECM-Proteine wurden für diese Analyse unspezifisch mit Fluorescamin angefärbt und unter dem cLSM analysiert. Anhand der Fluoreszenzintensitätsprofile konnten dann die lokalen Schichtdicken in z-Richtung ermittelt und in Falschfarben dargestellt werden, sodass die Beschichtungsdichte und -homogenität lokal abgelesen werden kann.

Anhand der verwendeten Falschfarbenskala konnten die Schichtdicken der untersuchten (*click*)ECM-Beschichtungen in z-Richtung für die gesamte Beschichtungsfläche analysiert werden. Dabei wurde deutlich, dass die (*click*)ECM-Beschichtungen eine relativ homogene Schichtdicke aufwiesen und dass die darunterliegende Oberfläche vollständig mit (*click*)ECM bedeckt waren. Um zusätzlich einordnen zu können, ob die auf diese Weise generierten

Schichtdicken im erwarteten Bereich lagen, wurde die theoretisch zu erwartende Schichtdicke (d_c) mithilfe von **Formel 10** berechnet:

$$d_c = \frac{V_{(click)ECM}}{A_{wafer}} = \frac{0,86 \cdot 10^{-3} cm^3}{0,25 cm^2} = 34,4 \mu m$$

Formel 10: Berechnung der theoretisch zu erwartenden Schichtdicke (d_c) in [μm] unter Verwendung von 50 μL (*click*)ECM-Suspension ($V_{(click)ECM}$) mit einer angenommenen Dichte von $\rho = 1 \text{ g/mL}$ und einer Beschichtungsfläche (A_{wafer}) von $0,25 \mu m^2$.

Unter Berücksichtigung der Wafergröße von $0,25 \text{ cm}^2$ ($0,5 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$), einem Beschichtungsvolumen von $50 \mu L$ und einer durchschnittlichen Trockenmasse von $0,86 \text{ mg}$ für ein $50 \mu L$ -(*click*)ECM-Aliquot konnte eine erwartete Schichtdicke (d_c) von ca. $34 \mu m$ berechnet werden. Im direkten Vergleich der tatsächlich gemessenen Schichtdicken (*click*ECM: $31,4 \pm 2,7 \mu m$; nicht modifizierte ECM: $35,0 \mu m \pm 3,9 \mu m$) mit diesem theoretischen Erwartungswert (ca. $34 \mu m$) konnte festgestellt werden, dass die Werte sehr gut übereinstimmten.

Rasterelektronenmikroskopische Analyse der (click)ECM-Oberflächenbeschichtungen

Um die anhand der Fluoreszenzintensitätsprofile analysierten Schichtdicken noch mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurden die generierten (*click*)ECM-Beschichtungen zusätzliche unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht (siehe auch **Kapitel 4.3.2**). Für diese Mikroskopieart mussten die (*click*)ECM-Proteine nicht angefärbt oder markiert werden.

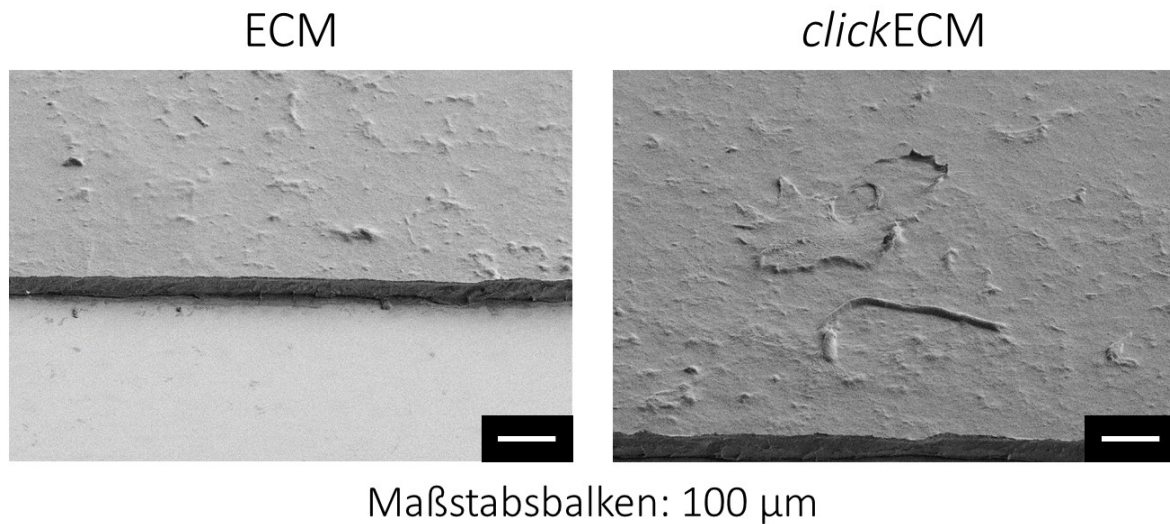


Abbildung 24: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von Oberflächenbeschichtungen auf DIBO-funktionalen Si-Wafern mit nicht modifiziertem ECM (linkes Bild) oder Azid-modifizierter *click*ECM (rechtes Bild). Die an den Vorderseiten der Beschichtungen erzeugten Kanten wurden durch Abkleben der Oberflächenabschnitte mit Klebeband vor der Beschichtung mit den aufkonzentrierten und homogenisierten (*click*)ECM-Suspensionen erreicht. Beide Beschichtungen wurden zunächst vollständig trocknen gelassen, bevor das Klebeband vorsichtig entfernt wurde. Die Proben wurden vor der Bildaufnahme um 50 ° gekippt. Maßstabsbalken: 100 µm.

In den in **Abbildung 24** dargestellten repräsentativen REM-Aufnahmen waren beide Beschichtungen in Bezug auf die vollständige Bedeckung der darunterliegenden Oberfläche sowie der Homogenität der Beschichtung vergleichbar. Diese Erkenntnisse deckten sich mit den aus **Abbildung 23** sowie denen aus **Abbildung A9 - Abbildung A14** gewonnenen Eindrücken. Mithilfe der Maßstabsbalken konnten die Schichtdicken in den generierten REM-Aufnahmen grob auf ca. 30 – 40 µm geschätzt werden. Obwohl diese Werte innerhalb des erwarteten Bereichs (ca. 34 µm) lagen und die in **Abbildung 23 + Abbildung A9 - Abbildung A14** gezeigten cLSM-Ergebnisse bestätigen, sollten sie nur als grobe Schätzung der Schichtdicken genutzt werden. Dies lag an der für die REM-Analyse notwendigen Probenpräparation, der möglichen Artefakt-Bildung (z. B. beim Abziehen des Klebebands) oder durch die Neigung der Probe um 50 ° während der Bildgenerierung. Weiterhin galt es zu beachten, dass im Falle der REM-Analyse die (*click*)ECM-Schichten im trockenen Zustand mit Platin besputtert wurden, während es bei den Schichten in **Abbildung 23** durch die Inkubation in den Färbelösungen sowie durch das verwendete wässrige Eindeckmedium mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Quellung der (*click*)ECM-Schichten kam.

Zusammenfassend konnte zur Generierung und Charakterisierung der Oberflächenbeschichtungen aus prozessierter (*click*)ECM festgestellt werden, dass die verschiedenen Färbe- und Mikroskopiemethoden (**Abbildung 15**, **Abbildung 23** und **Abbildung 24**), die Analyse der Fragmentgrößen (**Abbildung 14** und **Tabelle 4**) sowie die Bestimmung der resultierenden Schichtdicken (**Tabelle 10**) darauf hindeuteten, dass die prozessierten (*click*)ECM-Suspensionen homogen fragmentiert wurden. Die auf diese Weise erzeugten Oberflächenbeschichtungen bedeckten die darunterliegende Oberfläche vollständig und homogen und erfüllten folglich die notwendigen Voraussetzungen für die Anwendung als bioaktives Substrat.

5.4.2 Zelluläre Antwort von Fibroblasten auf (*click*)ECM-Oberflächenbeschichtungen

Für die Anwendung als Biomaterial, das später einmal für den direkten Kontakt mit Zellen vorgesehen ist, stellt die Bioaktivität der (*click*)ECM-Beschichtungen eine essenzielle Eigenschaft dar (siehe auch **Kapitel 1.1**). Um die zelluläre Antwort von primären humanen Fibroblasten auf die Beschichtungen zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt dieser Arbeit primäre humane Fibroblasten auf die entsprechend beschichteten Si-Wafer ausgesät. Zur Untersuchung der initialen Zelladhäsion wurden die Zellen für 0,5 Stunden bzw. zur Untersuchung der Zellproliferation für 72 Stunden auf den beschichteten Oberflächen kultiviert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit unter statischen Zellkulturbedingungen wurden sowohl die Zytoskelette als auch Zellkerne vor der cLSM-Analyse angefärbt und unter dem cLSM untersucht (siehe auch **Kapitel 4.3.2**). Mithilfe einer *ImageJ*-Analyse wurden auf den generierten MIPs anschließend die Zellmorphologie sowie die Zellzahl untersucht (**Abbildung 25**).

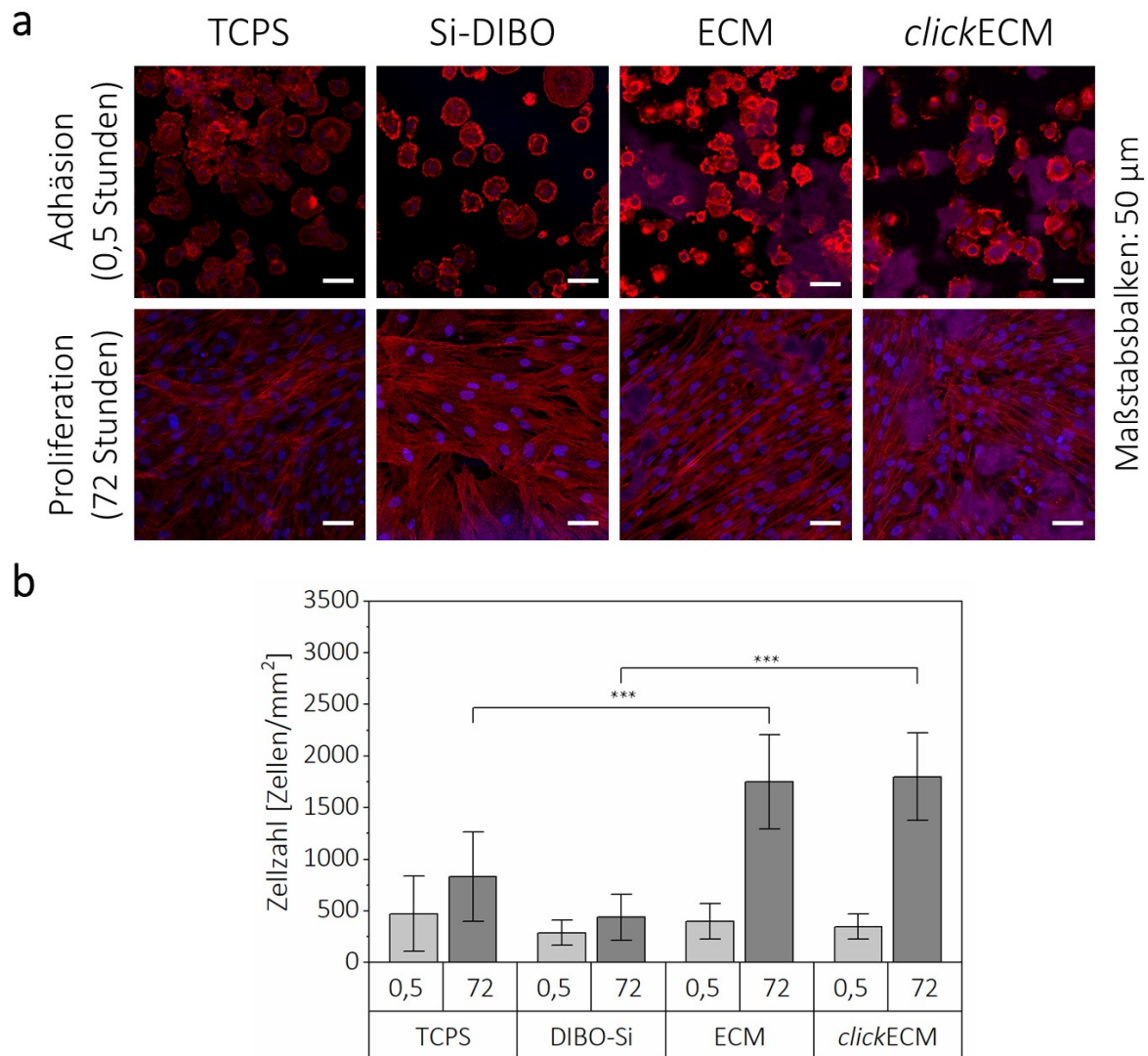


Abbildung 25: Repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aus cLSM-Kachelaufnahmen der zellulären Antwort primärer humaner Fibroblasten auf (*click*)ECM-Beschichtungen. **a)** Durch die Fluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts mit Alexa Fluor® 546-Phalloidin (in rot dargestellt) und der Zellkerne mit DAPI (in blau dargestellt), konnte anhand der Zellzahl sowie der Morphologie der Zellen nach 0,5 Stunden die initiale Zelladhäsion bzw. nach 72 Stunden die Zellproliferation qualitativ beurteilt werden. Oberflächen aus Zellkultur-Polystyrol (engl. *tissue culture polystyrene*, TCPS) dienen als Positiv-, unbeschichtete DIBO-funktionalisierte Si-Wafer (Si-DIBO) als Negativkontrolle. Maßstabsbalken: 50 µm. **b)** Quantifizierung der adhärenenten Zellen auf (*click*)ECM-Beschichtungen nach 0,5 Stunden (initiale Zelladhäsion) und 72 Stunden (Zellproliferation). Unbeschichtete Si-DIBO-Oberflächen dienen auch hier als Negativ-, TCPS-Oberflächen als Positivkontrolle. Es wurde kein statistischer Unterschied zwischen der Azid-modifizierte *click*ECM und der unmodifizierten ECM festgestellt. Die Zelladhäsion unterschied sich nicht signifikant von TCPS, die Zellproliferation wiederum signifikant.

Nach 0,5 Stunden statischer Zellkultur konnte in den in **Abbildung 25 a** gezeigten cLSM-Aufnahmen die initiale Zelladhäsion und das beginnende Ausspreiten der Fibroblasten festgestellt werden. Das Ausspreiten kam dadurch zustande, dass die bei der Aussaat

abgelösten und dadurch abgekugelten Zellen mithilfe von Adhäsionsproteinen Kontakt zu den Oberflächen ausbildeten und sich daraufhin auf der Oberfläche ausspreiteten [234]. Zellen, die versuchten, den Kontakt mit einer Oberfläche zu vermeiden, blieben sphärisch, da die Kugelform es ihnen erlaubte, die Oberfläche und damit die Kontaktfläche mit der Oberfläche zu minimieren. Der Ausspreiteffekt war in diesem Versuch auf allen Oberflächen zu erkennen. In den cLSM-Aufnahmen nach 72 Stunden statischer Zellkultur lagen die Fibroblasten in ihrer typischen spindelartigen Morphologie vor [234]. Anhand der Nuklei konnte die Zahl adhärenter Zellen bestimmt werden (**Abbildung 25 b**). Die statistische Analyse der erhobenen Zellzahlen pro Quadratmillimeter ergab, dass zwischen den Zellzahlen der Beschichtungen aus unmodifizierter ECM und den Beschichtungen mit Azid-modifizierter *click*ECM kein statistisch signifikanter Unterschied auftrat. Diese Tatsache ließ darauf schließen, dass die Zellen durch die über das MGE in die Glykanstrukturen der *click*ECM eingebauten abiotischen Azide nicht negativ beeinträchtigt werden. Dasselbe Verhalten wurde zuvor auch von Ruff *et al.* beobachtet, die das zelluläre Verhalten von HaCaT-Zellen auf (*click*)ECM-beschichteten Glassubstraten analysierten [114, 122]. Auch hier wurde kein Unterschied in der zellulären Antwort der Zellen auf die Azid-modifizierte *click*ECM im direkten Vergleich zur nicht modifizierter ECM festgestellt. Ein weiteres interessantes Ergebnis im Vergleich zu den vorhergehenden Arbeiten war die Tatsache, dass sich die Zelladhäsion in dieser Arbeit nach 0,5 Stunden statischer Zellkultur statistisch nicht signifikant von der Zelladhäsion auf TCPS-Oberflächen unterschied, die in beiden Versuchen als Positivkontrolle genutzt wurden. Wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ruff *et al.* die gleiche positive Wirkung der (*click*)ECM-Beschichtungen auf die Zellproliferation nach 72 Stunden statischer Zellkultur [114]. Die große Anzahl an adhärenter Zellen auf den (*click*)ECM-Beschichtungen in **Abbildung 25 a** und die typische Fibroblastenmorphologie der adhärenter Zellen deuteten folglich darauf hin, dass die erzeugten Beschichtungen eine hohe biologische Aktivität aufweisen, die mit den von Ruff *et al.* erhobenen und publizierten Daten vergleichbar war [114, 122]. Im direkten Vergleich mit den Beschichtungen der Vorarbeiten konnte jedoch festgestellt werden, dass die neuen Protokolle zur Aufarbeitung und zur Generierung der Oberflächenbeschichtungen zu deutlich dichteren und homogeneren Beschichtungen führten, die die darunterliegenden Oberflächen vollständig bedeckten.

5.4.3 Stabilität der erzeugten (*click*)ECM-Beschichtungen

Für die Anwendung als Biomaterial und den direkten Kontakt mit Zellen kommt es maßgeblich darauf an, dass die erzeugten *click*ECM-Beschichtungen stabil auf den Oberflächen anhaften, um die Oberflächen langfristig mit den bioaktiven Eigenschaften auszustatten. Dementsprechend müssen die Beschichtungen so immobilisiert werden, dass sie sich bei Kontakt mit isotonen Flüssigkeiten nicht ab- oder auflösen bzw. dispergiert werden.

In den Vorarbeiten dieses Dissertationsverfahrens beschichteten Ruff *et al.*, wie oben bereits beschrieben, die DIBO-funktionalen Oberflächen in einem feuchten Milieu für drei Stunden [114, 122]. (*click*)ECM-Fragmente, die nach dieser Zeit nicht immobilisiert waren, wurden weggespült. Durch die bei der Beschichtung ablaufende SPAAC zwischen den *click*ECM-Aziden und den DIBO-Gruppen auf den Substratoberflächen wurde auf diese Weise eine vermutlich kovalent gebundene Oberflächenbeschichtung generiert, die in einem Waschversuch unter turbulenten Strömungsbedingungen und im direkten Vergleich zu einer physisorbierten Beschichtung aus nicht funktionalisierter ECM eine signifikant erhöhte Stabilität aufwies [114, 122].

Um auch das weiterentwickelte Beschichtungsprotokoll in Bezug auf die Stabilitäten der dabei generierten (*click*)ECM-Beschichtungen zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt dieser Arbeit eine laminare Durchflusszelle (IDZ) entwickelt und konstruiert, um die Beschichtungen mit einer tensidhaltigen Pufferlösung (PBS⁻ supplementiert mit 0,1 % Tween® 20) zu überspülen. Es wurde untersucht, ob die Schichtdicken unter fluidmechanischer Belastung gleichbleiben oder abnehmen würden. Für diese Untersuchung wurden die (*click*)ECM-Beschichtungen in die Durchflusszelle eingelegt und mit PBS-T für 9 Stunden bei 116 mL/min ($\cong 4,3$ Pa) laminar überströmt. Diese Flussrate zeigte sich in einer von Salehi-Nik *et al.* [183] publizierten Studie als ausreichend, um eine durch Physisorption immobilisierte Oberflächenbeschichtung aus Kollagen abzulösen. Nach Ablauf der Zeit wurden die beschichteten Substrate aus der Durchflusszelle entnommen und die (*click*)ECM-Proteine mit Fluorescamin unspezifisch angefärbt (siehe auch **Kapitel 4.1.4.2** und **Kapitel 4.3.2**). Mithilfe des cLSMs wurden anschließend z-Stapelaufnahmen generiert, die die gesamte Beschichtung in z-Richtung überspannten. Zur Bestimmung der lokalen Schichtdicken wurden, wie zuvor zur Beurteilung der Beschichtungshomogenität, die Fluoreszenzintensitätsprofile der Aufnahmen von ungewaschenen sowie laminar überströmten Beschichtungen analysiert (siehe auch **Kapitel 5.4.1**). Die dabei erhobenen Daten sind als Falschfarbendarstellungen in

Abbildung 26 a zusammengestellt und repräsentieren anhand der jeweiligen Falschfarbe die lokale Schichtdicke in z-Richtung.

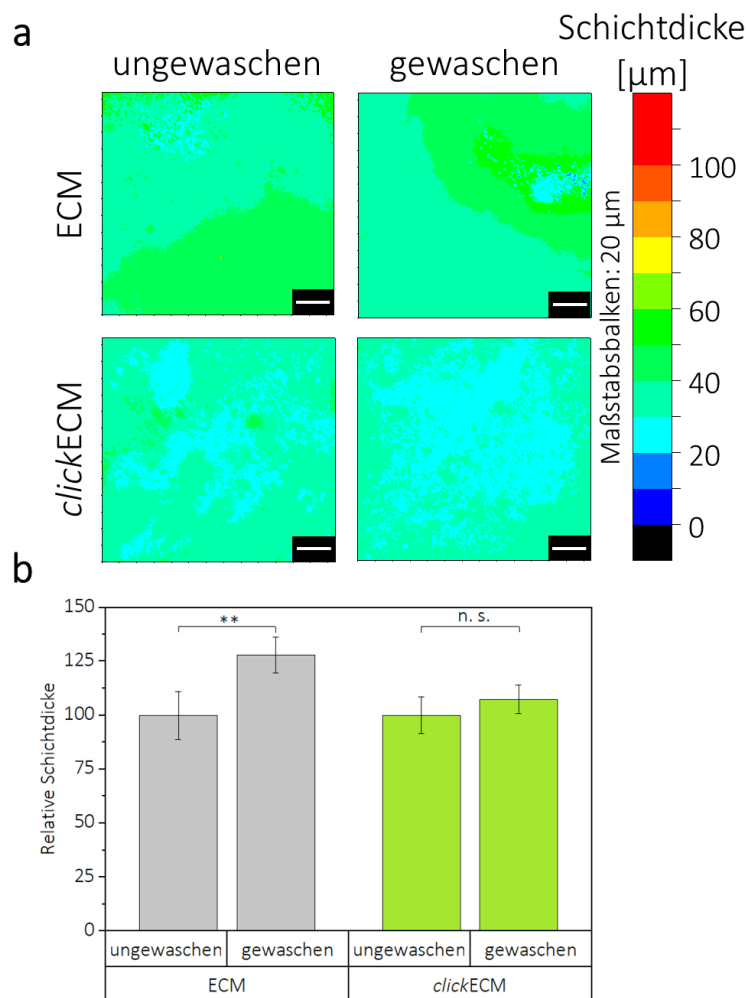


Abbildung 26: Charakterisierung der (*click*)ECM-Beschichtungsstabilität vor und nach laminarem Überströmen der generierten Schichten mit einem tensidhaltigen Waschpuffer. **a**) Repräsentative Falschfarbendarstellung der lokalen Schichtdicken in z-Richtung von Fluorescamin-gefärbten (*click*)ECM-Beschichtungen im ungewaschenen Zustand (linke Spalte) und nach 9-stündigem laminarem Überströmen (rechte Spalte) in einer laminaren Durchflusszelle mit PBS-T bei 116 mL/min (\pm 4,3 Pa). Maßstabsbalken: 20 µm. **b**) Relative Schichtdicke der erzeugten (*click*)ECM-Beschichtungen vor und nach dem Waschen mit einer tensidhaltigen Pufferlösung in der laminaren Durchflusszelle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der mit (*click*)ECM-Schichtdicken der drei individuellen Donoren, die alle in Triplikaten analysiert wurden. Die statistische Analyse der Daten ergab, dass keine der Schichtdicken während des Waschvorgangs abnahm. Stattdessen nahm die Schichtdicke im Fall der nicht modifizierten ECM signifikant zu. Derselbe Effekt war tendenziell bei den Azid-modifizierten *click*ECM-Schichten zu beobachten.

Die aus den z-Stapelaufnahmen der gewaschenen und ungewaschenen (*click*)ECM-Beschichtungen extrahierten z-Intensitätsprofile ließen vermuten, dass das Erscheinungsbild der Beschichtungen durch den Waschvorgang nicht negativ beeinträchtigt

wurde und dass alle Beschichtungen auch nach dem Waschen die darunterliegende Oberfläche noch vollständig bedecken. Wie in **Abbildung 26 b** ablesbar, nahm keine der Schichtdicken während des Waschvorgangs ab. Basierend auf dieser Beobachtung konnte davon ausgegangen werden, dass die erzeugten (*click*)ECM-Beschichtungen sehr stabil gegenüber laminarer Strömungsbelastungen waren. Die mittlere Schichtdicke der untersuchten Beschichtungen mit unmodifizierter ECM betrug $35,0 \mu\text{m} \pm 3,9 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $44,7 \mu\text{m} \pm 2,9 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Im Falle der Azid-modifizierten *click*ECM betrug die mittlere Schichtdicke vor dem Waschen $31,4 \mu\text{m} \pm 2,7 \mu\text{m}$ und $33,7 \mu\text{m} \pm 3,9 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Um die direkte Vergleichbarkeit zu erleichtern, wurden die Schichtdicken auf die Werte der ungewaschenen (*click*)ECM-Schichten normiert (**Abbildung 26 b**).

Bei der unmodifizierten ECM nahmen die Schichtdicken während des laminaren Überströmens statistisch signifikant zu. Obwohl sich die Schichtdicken im Fall der *click*ECM-Beschichtung für den erhobenen Datensatz zwischen den ungewaschenen und den gewaschenen Beschichtungen statistisch nicht signifikant voneinander unterschieden, war dennoch eine Tendenz erkennbar, die vermuten ließ, dass es auch hier zu einer leichten Schichtdickenzunahme kam. Der beobachtete Anstieg war sehr wahrscheinlich auf die Quellung der Biopolymere im Waschpuffer zurückzuführen. Dieser Effekt wäre für den direkten Kontakt mit Zellen vorteilhaft, da auch die natürliche ECM ein hydratisiertes und gequollenes hydrogelartiges Konstrukt darstellt [235]. Interessanterweise und im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ruff *et al.* [114, 122] zeigte die Untersuchung der Beschichtungsstabilität, dass bei Verwendung des in dieser Arbeit erarbeiteten Beschichtungsprotokolls die kovalente Immobilisierung von *click*ECM auf DIBO-funktionalisierten Oberflächen im Vergleich zur unmodifizierten ECM keinen Unterschied machte. Auch der Vergleich der Ergebnisse mit den von Salehi-Nik *et al.* [183] publizierten Daten legte den Schluss nahe, dass die generierten (*click*)ECM-Beschichtungen stabil immobilisiert waren. Daraus konnte geschlossen werden, dass zukünftig auf eine kovalente Immobilisierung verzichtet werden kann, wenn die (*click*)ECM-Suspensionen auf die Oberflächen vollständig aufgetrocknet werden. Somit können zukünftig alle verfügbaren Azide innerhalb der *click*ECM zur Biokonjugation verwendet werden. Darüber hinaus ist diese Erkenntnis vorteilhaft, wenn Oberflächen als Substrat für eine (*click*)ECM-Beschichtung verwendet werden sollen, die nur schwer mit Cyclooctingruppen funktionalisiert werden können.

5.4.4 Bewertung der vierten Hypothese zur Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM

Für das vierte Arbeitspaket dieses Dissertationsvorhabens ließ sich folglich zusammenfassen, dass es mithilfe der optimierten Aufarbeitung der (*click*)ECM und der Modifizierung des bestehenden Beschichtungsprotokolls von Ruff *et al.* [122] möglich war, reproduzierbare Oberflächenbeschichtungen auf DIBO-funktionalisierten Oberflächen zu generieren. Die erzeugten Beschichtungen waren homogen, stabil gegen fluidmechanischen Abrieb, bioaktiv und bedeckten die Oberflächen vollständig, sodass auch die dritte Hypothese in allen Punkten bestätigt werden konnte.

Für eine potentielle Fortsetzung dieser Arbeit wäre es interessant, statt Si-Wafern auch andere Oberflächen als Substrate für die (*click*)ECM-Beschichtung zu verwenden. Ferner könnte untersucht werden, ob die etablierten Protokolle auch für die Beschichtung komplexer Strukturen oder Geometrien verwendet werden könnten.

5.5 *click*ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform

Im vierten Arbeitspaket der vorliegenden Arbeit sollten die generierten (*click*)ECM-Beschichtungen als Grundlage für den Aufbau von Biokonjugationsplattformen verwendet werden. Auch hier wurde zur systematischen Gliederung der Versuche eine entsprechende Hypothese formuliert:

Die Azide in den generierten *click*ECM-Beschichtungen können mit **Alkin-gekoppelten Biotin-Molekülen** konjugiert werden, um unter Ausnutzung der vielseitigen Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung eine **universelle Biokonjugationsplattform** aufzubauen. Die bioaktiven *click*ECM-Beschichtungen können auf diese Weise **mit zusätzlichen Funktionalitäten** ausgerüstet werden, die in der natürlichen ECM ansonsten nicht vorkommen würden. Als Modell eignet sich hier die **Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase**.

Die Ergebnisse, die in diesem Arbeitspaket entstanden, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits in einer *peer-reviewed* Publikation veröffentlicht [177].

Biotinylierung der *click*ECM-Beschichtungen

Wie in Kapitel 5.1.2, **Abbildung 23b** gezeigt wurde, verfügten die generierten *click*ECM-Beschichtungen über sterisch zugängliche und chemisch reaktive Azidgruppen, die in CuAAC- oder SPAAC-Reaktionen adressiert werden konnten (**Abbildung 15** und **Abbildung A5**). Um diese abiotischen Gruppen für Konjugationsreaktionen nutzen zu können, um bspw. die bioaktiven und stabilen *click*ECM-Beschichtungen mit weiteren, in der natürlichen ECM nicht vorkommenden Funktionen auszurüsten, wurden die Azide mit Alkin-funktionalen Biotingruppen umgesetzt und die *click*ECM-Beschichtungen dadurch biotinyliert. Die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung gilt als eine der stärksten bekannten nicht kovalenten

biologischen Bindungen, die für eine Vielzahl an diagnostischen oder bioanalytischen Assays und Anwendungen ausgenutzt wird [236]. Durch die Konjugation der *click*ECM mit Biotin kann eine neue Dimension an vielfältig nutzbaren Kopplungen eröffnet und genutzt werden.

Um zu untersuchen, ob die Azide der *click*ECM mit Alkin-funktionalen Biotinmolekülen konjugiert werden können, wurden dünne Glassubstrate auf die oben beschriebene Weise (**Kapitel 4.5**) mit (*click*)ECM beschichtet. Nach dem Trocknen wurden die *click*ECM-Azide in einer Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Alkin-funktionalen Biotin-Molekülen konjugiert und mithilfe eines Fluorophor-gekoppelten Streptavidins fluoreszenzmarkiert (**Abbildung 27**).

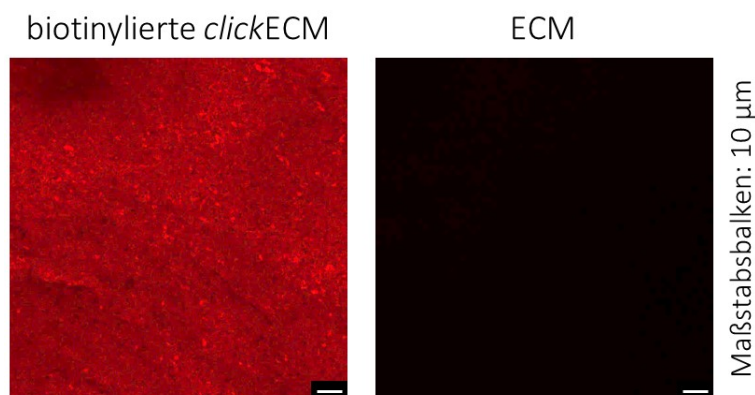


Abbildung 27: Repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) konfokaler z-Stapelaufnahmen von biotinylierten *click*ECM-Beschichtungen auf Si-Wafern. Die erfolgreiche Konjugation der *click*ECM-Azide mit den Alkin-funktionalen Biotin-Molekülen (linke Aufnahme) wurde durch die Kopplung der Biotingruppen mit einem Streptavidin-gekoppelten Fluorophor (ATTO 594-Streptavidin, in rot dargestellt) nachgewiesen. Nicht modifizierte ECM-Beschichtungen dienten als Kontrolle und zeigten kein Signal (rechtes Bild). Die Mikroskopeinstellungen wurden für alle Aufnahmen identisch gehalten, um eine direkte Vergleichbarkeit der Fluoreszenzintensitäten zu gewährleisten. Maßstabsbalken: 10 µm.

In den in **Abbildung 27** gezeigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen war der Unterschied in der Fluoreszenzintensität sehr gut erkennbar, was die erfolgreiche und spezifische Biotinylierung der *click*ECM-Beschichtungen bestätigte. Die Kopplung der Biotingruppen mit dem Streptavidin-konjugierten Fluorophor belegte neben der homogenen Biotinylierung der *click*ECM-Schichten auch die Homogenität der Beschichtung und der durch das MGE integrierten Azide und untermauerte damit die in **Kapitel 5.1** und **Kapitel 5.4** getroffenen Aussagen.

Die aus dem direkten Nachweis der erfolgreichen Biotinylierung (**Abbildung 27**) gezogenen Schlüsse wurden im nächsten Schritt zusätzlich mit einem indirekten Nachweis untermauert. Dazu wurden *click*ECM-Beschichtungen generiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Während die eine Gruppe für die Färbung mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor (Alexa Fluor® 488-Alkin) zur

Seite gelegt wurde, wurden die Azide der anderen Gruppe mit einem Alkin-funktionalen Biotin konjugiert. Danach wurden beide Gruppen gemeinsam mit dem Alkin-Fluorophor inkubiert und unter dem cLSM untersucht. Die dabei generierten z-Stapelaufnahmen wurden in MIPs konvertiert und bezüglich ihrer individuellen Fluoreszenzintensitäten analysiert (siehe auch **Kapitel 4.5**).

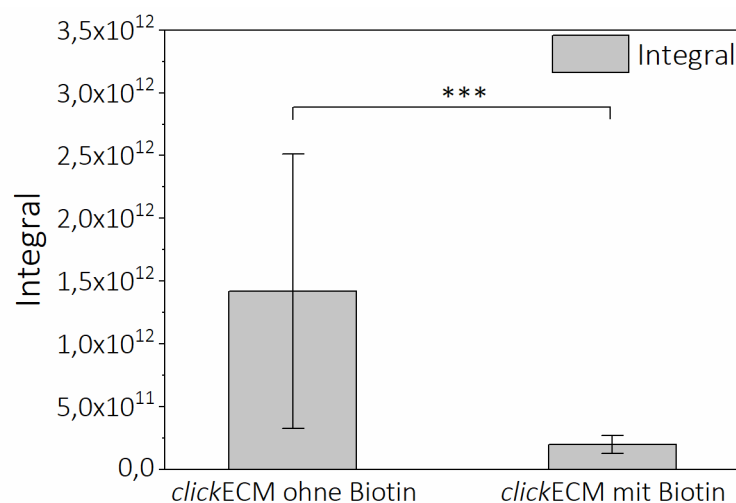


Abbildung 28: Verfolgung der Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Reaktion der *clickECM*-Azide mit den Alkin-funktionalen Biotinmolekülen. Für die Untersuchung wurden *clickECM*-Beschichtungen generiert, von denen die eine Hälfte mit Alkin-funktionalem Biotin konjugiert wurden, während die andere Hälfte nicht mit dem Biotin inkubiert wurde. Alle Proben wurden anschließend parallel mit dem Alkin-funktionalen Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin gefärbt und unter dem cLSM analysiert. Die dabei generierten z-Stapelaufnahmen wurden in MIPs konvertiert und bezüglich ihrer individuellen Fluoreszenzintensitäten analysiert. Nur die chemisch verfügbaren Azide der nicht biotinylierten Schichten (linker Balken) konnten mit dem Fluorophor markiert werden, während im Falle der biotinylierten *clickECM*-Beschichtung (rechter Balken) nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden konnte.

Die cLSM-Analyse ergab, dass im Falle der nicht biotinylierten *clickECM*-Beschichtung ein starkes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, da die Azide dieser *clickECM*-Schichten noch verfügbar waren (**Abbildung 28**). Im Fall der biotinylierten *clickECM*-Beschichtungen konnte nur noch eine sehr geringe Anzahl an Aziden mit dem Fluorophor markiert werden, sodass die Fluoreszenzintensität der MIPs folglich sehr gering war. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten ergab eine Verringerung von 86 %, was auf einen nahezu vollständigen Umsatz der Azide mit den Alkin-Biotinen und damit auf eine effiziente Biotinylierung hindeutete.

Konjugation der biotinylierten *click*ECM-Beschichtungen mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase

Im nächsten Schritt wurden die Biotingruppen, auf den *click*ECM-Oberflächenbeschichtung mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettichperoxidase (engl. *streptavidin-linked horseradish peroxidase*, Strep-HRP) konjugiert, um die *click*ECM-Beschichtungen mit einer zusätzlichen, in der ECM natürlicherweise nicht vorkommenden biologischen Funktion auszurüsten. HRP in seiner aktiven Form ist in der Lage, die Oxidation von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure) (ABTS) zu einem blaugrünen Produkt zu katalysieren. In diesem Versuch wurde den Proben ABTS zugesetzt und die Absorption über einen Zeitraum von 32 Minuten photometrisch verfolgt. Beschichtungen mit nicht modifizierter ECM dienten als Kontrolle, da hier keine Azide für die kovalente Konjugation mit den Alkin-funktionalen Biotingruppen zur Verfügung stehen und folglich keine Ankopplung von Strep-HRP ablaufen sollte. In **Abbildung 29** konnte die Änderung der Absorption über die Messzeit verfolgt werden.

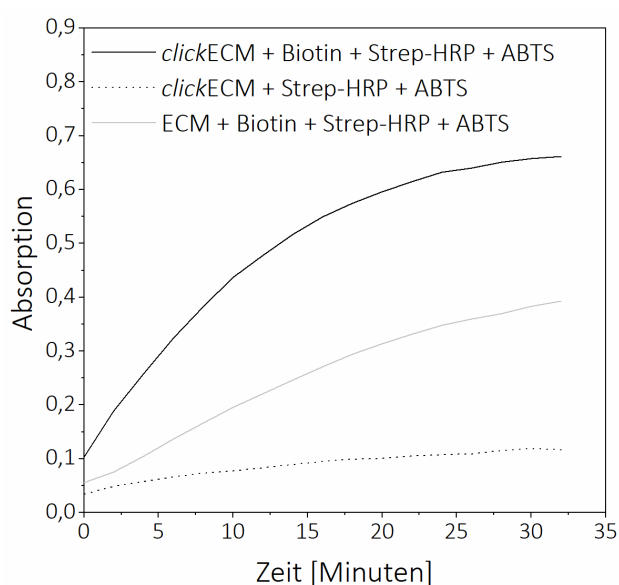


Abbildung 29: Photometrische Verfolgung der Bildung des bläulich-grünen ABTS-Radikalkations (ABTS⁺) durch den enzymatischen Umsatz des farblosen ABTS mittels konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) im zeitlichen Verlauf anhand der Absorption der Lösung. Die höchste Konzentration des bläulich-grünen Produkts durch die enzymatische Umsetzung des farblosen ABTS durch die HRP wurde im Fall der biotinylierten *click*ECM-Schichten bereits nach 2 Minuten detektiert. Beschichtungen aus nicht modifizierter ECM, die ebenfalls mit Biotin, Strep-HRP und ABTS inkubiert wurden, ergaben eine niedrigere Absorptionskurve über 32 Minuten als die biotinylierten *click*ECM-Schichten. *click*ECM-Schichten, die nicht biotinyliert, sondern nur mit Strep-HRP und ABTS inkubiert wurden, diente als Kontrolle und zeigte ebenfalls eine leichte unspezifische Adsorption von Strep-HRP-Molekülen an der *click*ECM.

Aus den in **Abbildung 29** gezeigten Kurven konnte abgeleitet werden, dass im Falle der biotinylierten *click*ECM-Schichten gleich von Beginn an die höchsten Absorptionswerte gemessen wurden. Die hohen Absorptionswerte entsprachen den höchsten Konzentrationen an enzymatisch umgewandeltem ABTS. Dieser Trend setzte sich über den gesamten Messzeitraum fort. Interessanterweise zeigten die *click*ECM-Schichten, die nicht mit der Biotinlösung inkubiert wurden, die geringste Absorption, was darauf hindeutete, dass die Strep-HRP-Moleküle nur sehr schwach an die *click*ECM-Beschichtung adsorbieren. Schichten aus nicht modifizierter ECM, die ebenfalls mit der Biotin-Alkin-Lösung inkubiert wurden, zeigten etwas höhere Absorptionswerte. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen war vermutlich eine etwas stärkere unspezifische Adsorption der Biotin-Alkin-Moleküle an die ECM (graue Linie in **Abbildung 29**). Die gestrichelte Linie in **Abbildung 29** wiederum ließ sich höchstwahrscheinlich auf eine geringfügige unspezifische Adsorption von Strep-HRP-Molekülen an die *click*ECM-Beschichtung zurückführen.

5.5.1 Bewertung der fünften Hypothese zur Verwendung von *click*ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform

Insgesamt deuteten die Ergebnisse dieses Arbeitspakets auf eine erfolgreiche Ausrüstung der *click*ECM-Schichten mit einer zusätzlichen, nicht natürlicherweise in der ECM vorkommenden Funktion hin. Entsprechend konnte die fünfte Hypothese in allen Punkten als bestätigt angenommen werden.

Für die Zukunft wäre es interessant, die *click*ECM-Beschichtungen auch mit anderen Alkin-funktionalen Molekülen auszurüsten, um auf diese Weise maßgeschneiderte Biomaterialien für spezifische Anwendungen zu entwickeln. Interessante Moleküle für eine solche Konjugation wären bspw. Heparin [237], diverse Wachstumsfaktoren, Antibiotika oder *Drug-Delivery*-Systeme. Auf diese Weise könnten zukünftig vermutlich auch Sensorplattformen entwickelt werden, die die Entstehung bzw. die Präsenz spezifischer Moleküle anzeigen könnten. Auch die Verwendung homobifunktionaler Alkin-PEG-Alkin-Linker könnte eine weitere interessante Konjugation darstellen, bei der die *click*ECM bspw. intern zu einer Art Hydrogel verknüpft werden könnte.

5.6 Generierung von Hybridhydrogelen mit Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*) als Modellsubstanz für die *clickECM* und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)

Wie unter **Kapitel 1.3.4** erläutert, stellt die natürliche, gewebespezifische ECM aufgrund ihrer komplexen Biomolekülzusammensetzung und ihrer bioaktiven Eigenschaften ein ideales Biomaterial dar. Da es bislang jedoch sehr herausfordernd ist, *in vitro* generierte Matrices in ausreichender Menge zu gewinnen und zu Biomaterialien zu verarbeiten, gab es in den vergangenen Jahren vermehrt Bestrebungen, verschiedenste Biomoleküle in sogenannten Hybridhydrogelen mit synthetischen Materialien zu kombinieren [30-35]. Solche Hybridhydrogele vereinen die vorteilhaften Eigenschaften der synthetischen Materialien, welche in der Regel physikalisch-mechanischer Natur sind, und die der biologischen Komponenten, die sich meist auf die hohe biologische Aktivität der Materialien beziehen [3, 33, 81, 84-86]. Eine große Herausforderung bei der Generierung solcher Hybridhydrogele stellt nach wie vor die stabile Verbindung der beiden Materialklassen im entstehenden Konstrukt dar. Wird die biologische Komponente der synthetischen Komponente lediglich beigemischt, so kann diese im Laufe der Zeit aus dem Material herausdiffundieren, wodurch die wichtigen biologischen bzw. bioaktiven Eigenschaften des Hybridhydrogels verloren gehen können [238, 239].

Die Fragestellung, ob dies durch die kovalente Immobilisation der Biomoleküle durch die 1,3-dipolare Azid-Alkin-Cycloaddition im Hydrogelkonstrukt umgangen werden kann, stellte den Inhalt des fünften und letzten Arbeitspakets dieser Arbeit dar. Die Limitierung der generierbaren *clickECM*-Menge ließ es bislang nicht zu, Hybridhydrogele aus *clickECM* und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) zu generieren und diese umfangreich zu charakterisieren. Ferner würde die Unlöslichkeit der Matrix die Charakterisierung der einzelnen Syntheseschritte sowie den Nachweis der kovalenten Immobilisation im Hybridhydrogel massiv erschweren. Aus diesem Grund bestand das erste Teilziel dieses Arbeitspakets darin, Gelatine als eine Modellsubstanz für die ECM mit Azidgruppen auszurüsten und die eingebrachten Azide anschließend in einer CuAAC mit einem heterobifunktionalen Linkermolekül (*N*-Propargylacrylamid) zu konjugieren. Im nächsten Schritt sollte dann untersucht werden, ob die Doppelbindungen des Linkers bei der radikalischen Hydrogelvernetzung von PEG-DA mit in das Hydrogel einpolymerisiert werden können, sodass die synthetisierte Azid-Gelatine (*clickGel*) kovalent in das PEG-DA-Hydrogel integriert werden kann. Abschließend sollte das entstehende

Hybridhydrogel chemisch, physikalisch-mechanisch sowie biologisch charakterisiert werden. Zur systematischen Gliederung der Versuche wurde auch für dieses letzte Arbeitspaket eine entsprechende Hypothese formuliert:

Unter Verwendung von **Azid-modifizierter Gelatine (clickGel)** als **Modellsubstanz für die clickECM** ist es möglich, **bioaktive Hybridhydrogele aus Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)** zu generieren. Um ein Auswaschen der clickGel aus dem Polymernetzwerk zu verhindern, können die Azide mit dem **heterobifunktionalen Linker N-Propargylacrylamid** konjugiert und anschließend im Zuge der Vernetzungsreaktion anhand der photopolymerisierbaren Gruppen **kovalent im Hydrogelnetzwerk verankert** werden.

Die Ergebnisse, die in diesem Arbeitspaket entstanden, wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits in einer *peer-reviewed* Publikation veröffentlicht [240].

5.6.1 Synthese von Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*) als Modellsubstanz für die *clickECM*

Neben der starken Limitierung hinsichtlich der zur Verfügung stehenden *clickECM*-Menge, stellte auch die Unlöslichkeit der nativen Matrix ein Problem für die Untersuchung des letzten Arbeitspakets dieser Arbeit dar [106]. Um zunächst die grundlegenden Mechanismen und Reaktionen während der Hybridhydrogel-Herstellung untersuchen und verstehen zu können, wurde für die Etablierung der Hybridhydrogele zunächst eine Azid-modifizierte Gelatine (*clickGel*) als Modellsubstanz synthetisiert.

Für die Azid-Modifizierung einer bovinen Gelatine Typ B wurde eine von Goddard-Borger und Stick [189] veröffentlichte Diazotransfer-Reaktion unter Verwendung des Diazotransfer-Reagenz Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid verwendet. Das dafür verwendete Diazotransferreagenz wurde am IGVP synthetisiert und freundlicher Weise von

Oliver Gorke zur Verfügung gestellt. Die Modifizierung der eingesetzten Gelatine über die Diazotransfer-Reaktion wurde ebenfalls am IGVP durchgeführt und die dabei entstehende Azid-modifizierte Gelatine (*clickGel*) freundlicherweise von Tobias Götz zur Verfügung gestellt. Das Diazotransferreagenz wurde zuvor bereits erfolgreich für die Azid-Modifizierung von Proteinen wie bspw. Meerrettichperoxidase oder DsRed (einem rot fluoreszierenden Protein) verwendet [190]. Die publizierte Reaktionsvorschrift wurde für die Azid-Modifizierung der Gelatine leicht abgeändert. In **Abbildung 30** ist das vollständige Reaktionsschema zur Herstellung einer Hybridhydrogels aus PEG-DA und *clickGel* dargestellt. Im ersten Reaktionsschritt erfolgte der Diazotransfer der Lysingruppen innerhalb der Gelatine in Azidgruppen durch das Diazotransferreagenz Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid (**Abbildung 30 (1)**). Die Reaktion wurde mit 0,68 Äquivalenten des Diazotransferreagenz durchgeführt, um unnötige Nebenreaktionen des nicht abreagierten Reagenzes zu vermeiden.

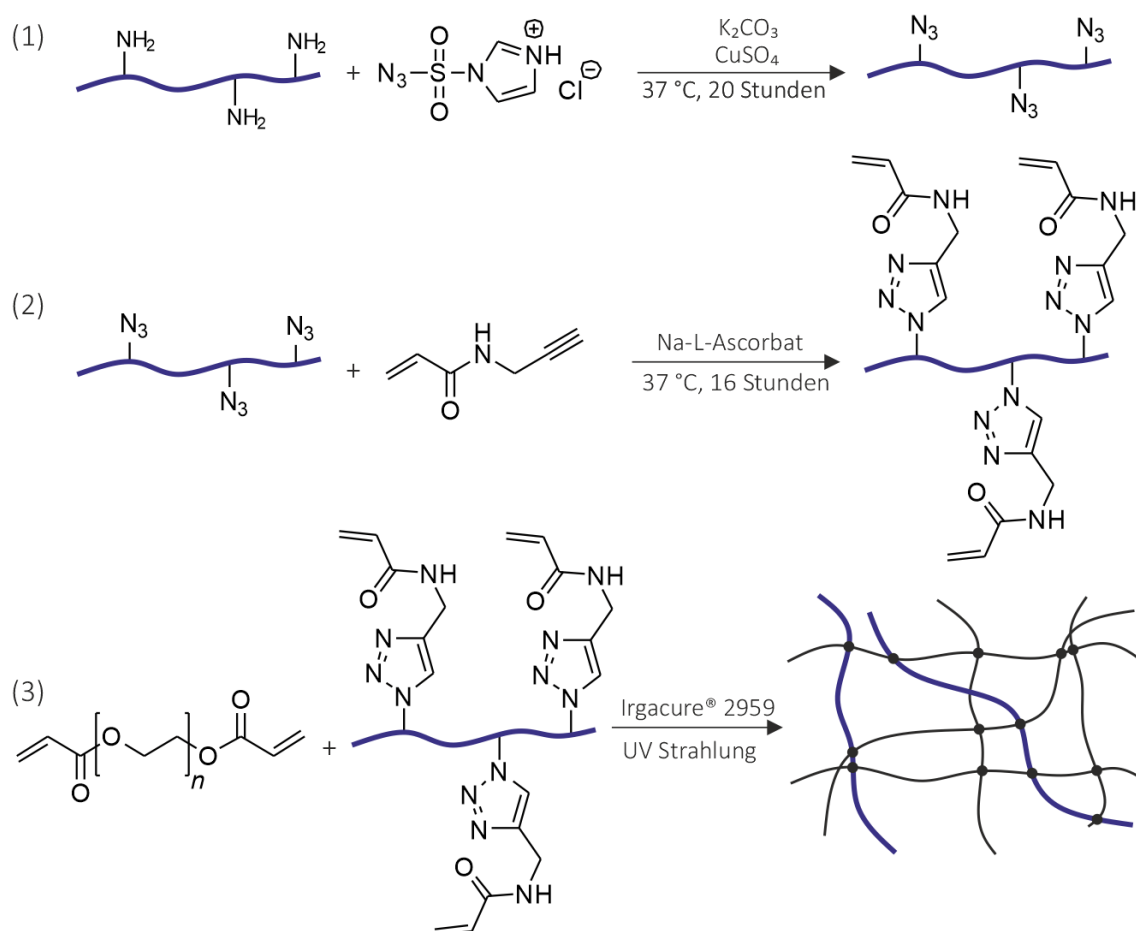


Abbildung 30: Reaktionsschema des Diazotransfers zur Azid-Modifizierung von boviner Gelatine Typ B.

(1) Im ersten Schritt erfolgte die Azid-Modifikation der Gelatine durch den Diazotransfer der Lysingruppen mithilfe des Diazotransferreagenzes Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid. (2) Im nächsten Schritt wurden die eingebrachten Azide in einer Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition mit den Alkylgruppen des heterobifunktionalen Linkers *N*-Propargylacrylamid umgesetzt, sodass ein Gelatine-Konjugat entstand, welches mit photopolymerisierbaren Doppelbindungen ausgestattet war. (3) Im letzten Schritt erfolgte die kovalente Einpolymerisierung des Gelatine-Linker-Konjugats in das Hydrogel aus Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) in einer radikalischen Vernetzungsreaktion mit dem Photoinitiator *Irgacure*[®] 2959 und UVA-Licht. (Abbildung erstellt von Dr. Alexander Southan und übernommen von [240].)

5.6.2 Charakterisierung der (*click*)Gel sowie des *click*Gel-Linker-Konjugats

Der Erfolg dieser Reaktion wurde mittels ¹H-NMR- und ATR-FT-IR-Spektroskopie, einem photometrischen Aminogruppen-Assay, dem Vergleich der isoelektrischen Punkte (IEP) und dem Abgleich charakteristischer Hydrogeleigenschaften nachgewiesen.

Kernspinresonanz-spektroskopischer Nachweis der erfolgreichen clickGel-Synthese sowie der erfolgreichen Konjugation mit dem Linker N-Propargylacrylamid

Im ^1H -NMR-Spektrum in **Abbildung 31** war im unteren Spektrum der unmodifizierten Gelatine ein deutliches, wenn auch nicht Basislinien-getrenntes Signal bei ca. 3 ppm erkennbar. Aus der Fachliteratur war bereits bekannt, dass es sich bei diesem Signal um die ϵ - CH_2 -Protonen der Lysine handelte [241]. Durch den Diazotransfer wurden die Lysine zu Aziden umgesetzt, sodass das Integral des ϵ - CH_2 -Signal um etwa 90 % reduziert wurde (mittleres Spektrum, **Abbildung 31**). Diese Reduktion stimmte vergleichsweise gut mit der eingesetzten Menge des Diazotransferreagenz Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid überein. Um die synthetisierte *clickGel* im nächsten Schritt mit photovernetzbaaren Gruppen auszurüsten, wurden die eingebrachten Azide mit den Alkingruppen des heterobifunktionalen Linkers *N*-Propargylacrylamid in einer CuAAC umgesetzt. Die Doppelbindungsprotonen des Linkers waren im Spektrum des *clickGel*-Linker-Konjugats (oberes Spektrum in **Abbildung 31**) bei einer chemischen Verschiebung von ca. 5,8 ppm deutlich zu erkennen (grau hinterlegt). Alle drei Spektren wiesen überdies keine Verunreinigungen auf, wodurch darauf geschlossen werden konnte, dass die Aufreinigung durch Dialyse gegen Reinstwasser erfolgreich war.

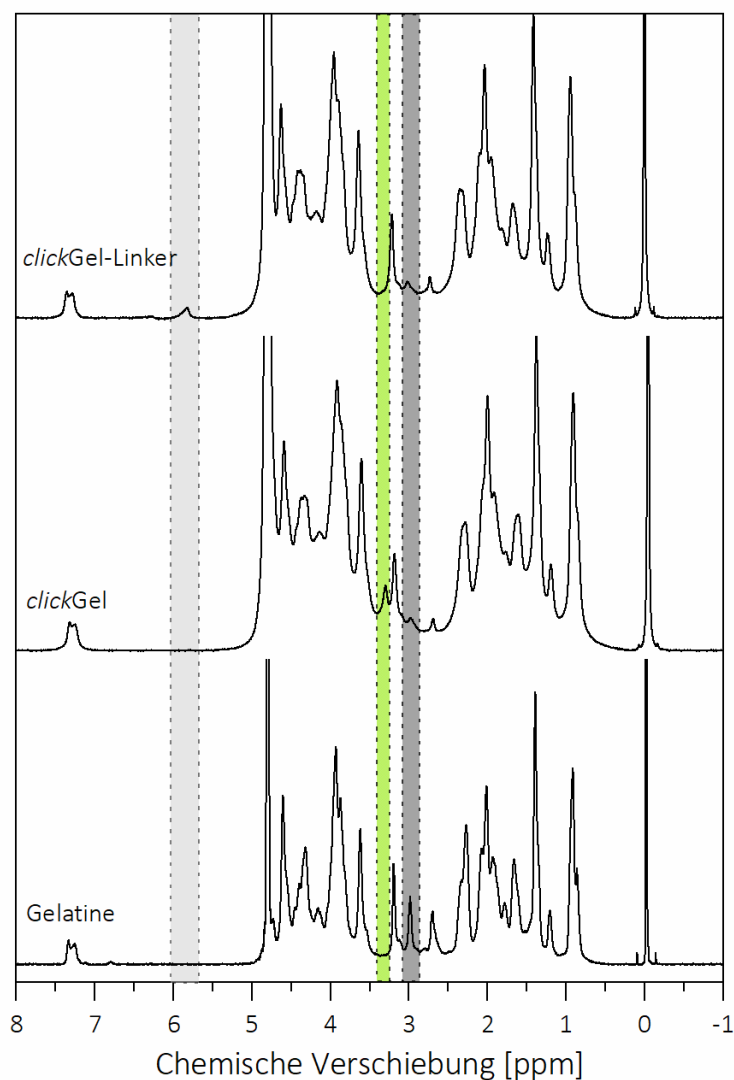


Abbildung 31: ^1H -NMR-Spektren der einzelnen Stufen der Azid-Modifizierung einer Gelatine Typ B zur AzGel sowie deren Konjugation mit dem heterobifunktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid. Die Lysine der unmodifizierten Gelatine (unteres Spektrum) wurden im ersten Schritt in einer Diazotransferreaktion mit dem Diazotransferreagenz Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid umgesetzt. Das Integral des ϵ - CH_2 -Signals der Lysine bei ca. 3 ppm (dunkelgrau hinterlegt) wurde durch den Diazotransfer um ca. 90 % reduziert (mittleres Spektrum). Dafür entstand im Spektrum der Azid-modifizierten Gelatine (*clickGel*, mittleres Spektrum) bei ca. 3,3 ppm (grün hinterlegt) ein neues Signal. Im nächsten Schritt wurden die Azide der entstandenen Azid-modifizierten Gelatine (*clickGel*) mit dem Linker *N*-Propargylacrylamid in einer CuAAC umgesetzt, wodurch die *clickGel* mit photopolymerisierbaren Doppelbindungen ausgerüstet wurde, deren Protonen bei ca. 5,8 ppm (oberes Spektrum) erkennbar waren (graue Markierung). Durch die Konjugation war das Signal der Azide bei 3,3 ppm im oberen Spektrum nicht mehr erkennbar. Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) wurde in allen Proben als interner Standard beigemischt, sodass im Fall des *clickGel*-Linker-Konjugats das Basisliniengetrennte Signal der Doppelbindungsprotonen quantitativ ausgewertet werden konnte. Aus dieser Quantifizierung ließ sich schließen, dass die Azide der *clickGel* und dementsprechend auch indirekt die Lysine der unmodifizierten Gelatine zu 97 % umgesetzt wurden.

Wie oben bereits angesprochen, handelte es sich bei dem ϵ -CH₂-Signal der Lysine in den Spektren in **Abbildung 31** aufgrund der Vielzahl und damit einhergehenden Überlagerung der Signale im ¹H-NMR-Spektrum nicht um ein Basislinien-getrenntes Signal. Aus diesem Grund konnte mithilfe dieses Signals lediglich eine Abschätzung des Aminogruppen-Umsatzes angestellt werden (90 %). Anders verhielt es sich mit dem Signal der Doppelbindungsprotonen im oberen Spektrum, die durch die Reaktion der eingebrachten Azide mit den Alkinen des heterobifunktionalen Linkers *N*-Propargylacrylamid in die Gelatine eingebracht wurden. Anhand des mitgeführten internen Standards Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP) war es möglich, das separierte und ausreichend Basislinien-getrennte Signal bei ca. 5,8 ppm und damit den Umsatz der Azide quantitativ zu bestimmen. Das Ergebnis ergab einen Umsatz von 97 %.

Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assay zur Quantifizierung der Aminogruppen

Um das Ergebnis noch weiter quantitativ zu verifizieren, wurde im nächsten Schritt zusätzlich zur ¹H-NMR-Spektroskopie ein Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Assay durchgeführt. Dieser Assay lieferte einen Absorptionswert, der anhand einer mitgeführten Standardreihe in die Aminogruppenkonzentration in der Probe umgerechnet werden konnte [196]. Mithilfe dieser Methode wurde eine Reduktion der Aminogruppen um 84 % ermittelt. Dieser Wert lag damit in einem ähnlichen Größenordnungsbereich wie der aus dem ϵ -CH₂-Signal abgeschätzte Wert sowie der eingesetzten Menge des Diazotransferreagens.

Infrarotspektroskopischer Nachweis der erfolgreichen clickGel-Synthese sowie der erfolgreichen Konjugation mit dem Alkin-funktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid

Um neben der Reduktion der Aminogruppen durch den Diazotransfer auch das Auftreten der Azide direkt nachweisen zu können, wurden die unmodifizierte Gelatine, die *clickGel* sowie das *clickGel*-Linker-Konjugat ATR-FT-IR-spektroskopisch untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 32** dargestellt.

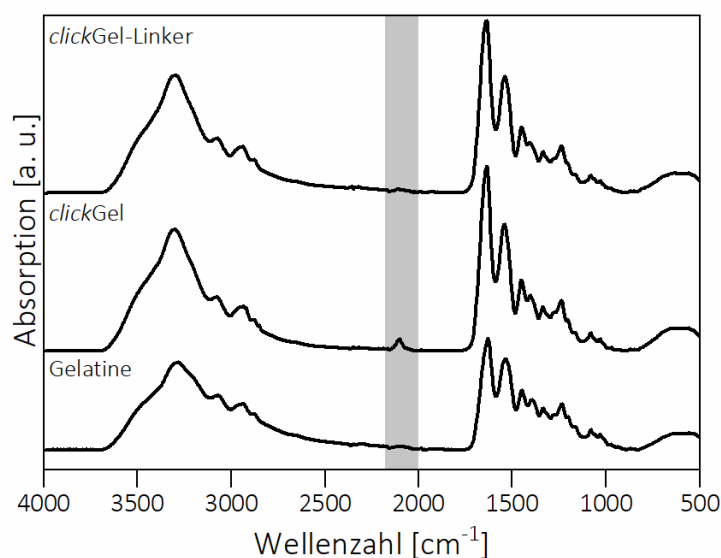


Abbildung 32: Direkter Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifizierung von boviner Gelatine Typ B durch Diazotransfer der Lysingruppen sowie der Umsetzung der eingebrachten Azide mit dem Linker *N*-Propargylacrylamid via ATR-FT-IR-Spektroskopie. Nach dem Diazotransfer der Lysingruppen innerhalb der unmodifizierten Gelatine (unteres Spektrum) mit dem Diazotransferreagenz Imidazol-1-sulfonyl-Azid-Hydrochlorid ist die entstandene Azidbande im Spektrum der Azid-modifizierten Gelatine (*clickGel*) bei ca. 2102 cm^{-1} (grau unterlegt) deutlich erkennbar (mittleres Spektrum). Nach der Umsetzung der eingebrachten Azide mit dem heterobifunktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid ist die charakteristische Bande nicht mehr erkennbar (oberes Spektrum).

Bei 2102 cm^{-1} (grau unterlegtes Signal in **Abbildung 32**) war nach der Azid-Modifizierung der Gelatine (unteres Spektrum) eine neue, charakteristische Absorptionsbande erkennbar (mittleres Spektrum). Diese Bande resultierte aus der asymmetrischen Streckschwingung der Azide [242]. Nach der Reaktion mit dem Alkin-funktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid war diese Bande nicht mehr erkennbar (oberes Spektrum), sodass darauf geschlossen werden konnte, dass die eingebrachten Azide in der CuAAC mit den Alkinen des Linkers reagiert und einen kovalenten Triazolring gebildet hatten. Dieses Ergebnis deckte sich mit der Beobachtung aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in **Abbildung 31**, bei dem die Doppelbindungsprotonen im oberen Spektrum nach der Konjugation der *clickGel* mit dem Alkin-funktionalen Linker deutlich erkennbar waren.

Rheologische Untersuchung der Speicher- (G') und Verlustmoduln (G'') von (click)Gel

Neben den spektroskopischen Eigenschaften änderten sich durch die chemische Modifizierung der Gelatine auch die physikalisch-mechanischen Eigenschaften. Dies wurde (abhängig von der Proteinkonzentration sowie der Temperatur) bspw. bei der physikalischen Gelierung von in Wasser gelöster Gelatine deutlich. Im unmodifizierten Zustand waren die Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) maßgeblich für das physikalische Gelieren verantwortlich. Die H-Brückenbindungen gingen dabei u. a. von der Aminosäure Lysin aus. Durch den Diazotransfer wurden die Lysine umgesetzt, wodurch an dieser Stelle im Protein keine H-Brücken mehr ausgebildet werden konnten. Um diesen Effekt quantitativ nachweisen zu können, wurden im nächsten Schritt Rheologiemessungen (Speicher- (G') und Verlustmoduln (G'')) an der unmodifizierten und der Azid-modifizierten Gelatine durchgeführt. Die Ergebnisse des untersuchten Temperatursweeps sind in **Abbildung 33** grafisch dargestellt.

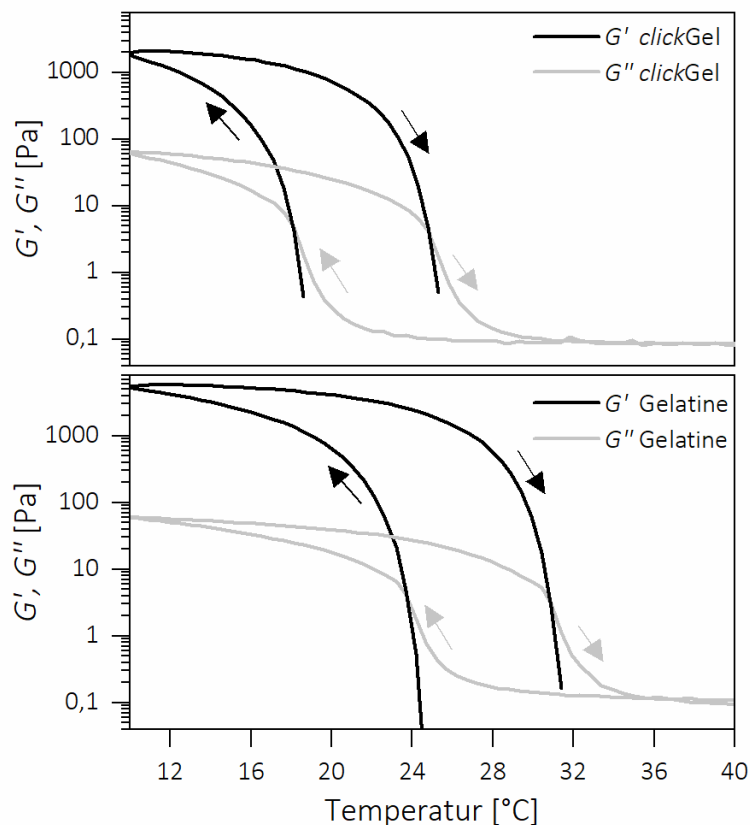


Abbildung 33: Gelierverhalten gemessen anhand der Speicher (G')- und Verlust (G'')-Moduln von 10%(w/w)igen Lösungen aus Gelatine (unterer Graph) bzw. Azid-modifizierter Gelatine (oberer Graph) in Abhängigkeit der Temperatur. Die Pfeile geben an, ob geheizt (Pfeile zeigen nach rechts) oder gekühlt (Pfeile zeigen nach links) wurde.

Anhand der niedrigen Verlustmoduln (G'') und der nicht messbaren Speichermoduln (G') bei hohen Temperaturen konnte abgeleitet werden, dass sowohl die unmodifizierte Gelatine als

auch die *clickGel* als mobile Flüssigkeiten vorlagen. Im Zuge der Abkühlung der Lösungen konnte bei beiden Proben ein Anstieg beider Parameter bis zu dem Punkt beobachtet werden, an dem $G' > G''$ überstieg und ein physikalisches Gel ausgebildet wurde. Der Schnittpunkt der beiden Größen entsprach dem Gelierpunkt.

Beim Erwärmen der Lösungen kreuzten sich die beiden Kurven ebenfalls, was in diesem Fall dem Schmelzpunkt entsprach. Bei allen Werten oberhalb dieses Punkts lagen die Gele wieder als mobile Lösungen vor. Durch die Azid-Modifizierung der Gelatine durch den Diazotransfer der Lysine verringerte sich der Gelierpunkt von 24,7 °C auf 18,6 °C. Ebenso verringerte sich der Schmelzpunkt von 31,4 °C auf 25,3 °C. Beide Effekte wurden auf die Reduktion der Lysine und die dadurch resultierende Verringerung möglicher H-Brücken zurückgeführt [243, 244].

Bestimmung des isoelektrischen Punkts (IEP) von (*click*)Gel

Eine weitere Eigenschaft, die direkt von der chemischen Zusammensetzung der Biopolymere abhängt, ist der isoelektrische Punkt. An diesem charakteristischen Punkt gleichen sich die positiven und negativen Ladungen innerhalb eines Proteins aus. Dieser Zustand ist neben dem molekularen Aufbau des Proteins abhängig vom pH-Wert und stellt für jedes Protein eine charakteristische Kenngröße dar [125].

Der IEP für unmodifizierte und Azid-modifizierte Gelatine wurde in dieser Arbeit mithilfe einer Deionisierungsmethode bestimmt, die ursprünglich von Janus *et al.* [193] publiziert und anschließend von Sewald *et al.* [192] für die Bestimmung des IEP von chemisch modifizierter Gelatine weiterentwickelt wurde. Eine 5 %ige Lösung aus Gelatine bzw. *clickGel* wurde hierbei bei 60 °C (unmodifizierte Gelatine) bzw. 40 °C (*clickGel*) in Reinstwasser gelöst und anschließend mit einem Mischbettionenaustauscherharz versetzt und für 30 Minuten geschüttelt. Der IEP wurde für den Wert angenommen, bei dem die Leitfähigkeit $< 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ betrug.

Der IEP von unmodifizierter Gelatine Typ B liegt im Allgemeinen im sauren Bereich, da durch die basische Hydrolyse von Kollagen als Ausgangssubstanz die Aminosäuren Asparagin und Glutamin als ihre jeweilige Säure, d. h. Asparaginsäure und Glutaminsäure, vorliegen [245]. Mithilfe der beschriebenen Methode wurde für unmodifizierte Gelatine ein IEP von 4,9 bestimmt, während für die *clickGel* ein IEP von 4,2 gemessen wurde. Beide Werte konnten durch das Vorhandensein der Aminogruppen im Fall der unmodifizierten Gelatine und der verminderten Anzahl an Aminogruppen im Fall der *clickGel* erklärt werden. Sewald *et al.* [192] bestimmten für methacrylierte Gelatine, bei der alle Aminogruppen des Ausgangsmaterials modifiziert wurden und dessen Rohmaterial aus demselben Gelatine-Batch entstammte wie die

in dieser Arbeit verwendete unmodifizierte Gelatine, einen IEP von 4,1. Entsprechend dieser Werte und unter Einbeziehung der ¹H-NMR-Ergebnisse sowie dem TNBS-Assay, die einen Lysin-Umsatz von 84 - 90 % ergaben, konnte davon ausgegangen werden, dass der für die *clickGel* mit 4,2 bestimmte IEP durchaus plausibel erschien.

Bestimmung des theoretischen isoelektrischen Punkts (IEP) mithilfe des ExPASy-Proteomic Tools

Um den experimentell bestimmten IEP noch weiter zu verifizieren, wurde der theoretische IEP unter Verwendung der beiden mit ¹H-NMR und TNBS-Assay bestimmten Lysin-Umsätze mithilfe des *ExPASy-Proteomic Tools (SIB Bioinformatics Resource Portal)* berechnet [194, 195]. Sowohl für einen Lysinumsatz von 90 % (¹H-NMR) als auch für 84 % (TNBS-Assay) betrug der errechnete IEP laut der Software 4,3 und unterstützte damit die experimentell erhobenen Daten. Alle charakteristischen Parameter der Charakterisierung der *clickGel* sind gemeinsam in **Tabelle 11** gelistet.

Tabelle 11: Übersichtstabelle über die Ergebnisse zur Charakterisierung der Azid-modifizierten Gelatine (*clickGel*).

	IEP ^{a)}	Gelierungspunkt [°C]	Schmelzpunkt [°C]	Y _{NMR} ^{b)} [%]	Y _{TNBS} ^{c)} [%]	Y _{NMR} ^{d)} [%]
Gelatine	4,9	24,7	31,4	-	-	-
<i>clickGel</i>	4,2	18,6	25,3	90	84	-
<i>clickGel</i> - Linker	-	-	-	-	-	97

^{a)} IEP = Isoelektrischer Punkt; ^{b)} Y_{NMR} = Aminogruppen-Umsatz abgeschätzt anhand des Lysin-Signals bei ca. 3 ppm in der durchgeführten ¹H-NMR-Spektroskopie; ^{c)} Y_{TNBS} = Aminogruppen-Umsatz abgeschätzt anhand des TNBS-Assays; ^{d)} Y_{NMR} = Azid-Umsatz errechnet anhand des Doppelbindungsprotonen-Signals im ¹H-NMR-Spektrum bei ca. 5,8 ppm.

Bezüglich der Azidkonzentration in der *clickGel* konnte eine von van den Bulcke *et al.* [246] für Gelatine vorgeschlagene Aminogruppenkonzentration von 0,35 mmol/g herangezogen werden. Wie in **Tabelle 11** zusammengefasst, konnte basierend darauf ein Azidkonzentrationsbereich in der *clickGel* zwischen 0,315 mmol/g (bestimmt durch die ¹H-NMR-Spektroskopie unter Bezugnahme auf die Lysingruppen), 0,294 mmol/g (bestimmt durch den TNBS-Aminogruppen-Assay) und 0,34 mmol/g (ebenfalls bestimmt durch die ¹H-NMR-Spektroskopie, jedoch basierend auf den Doppelbindungsprotonen) angegeben

werden. Diese Werte ergaben folglich ein durchschnittliches Molekulargewicht zwischen zwei Azidgruppen von 3175 g/mol ($^1\text{H-NMR}$, Lysine), 3401 g/mol (TNBS-Assay) und 2941 g/mol ($^1\text{H-NMR}$, Doppelbindungen).

Gelpermeationschromatographische Untersuchung der (*click*)Gel

Ähnlich des IEP wirkte sich eine veränderte chemische Zusammensetzung auch auf die Molekulargewichtsverteilung aus, die mithilfe der Größenausschluss- bzw. Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt werden konnte (**Abbildung 34**).

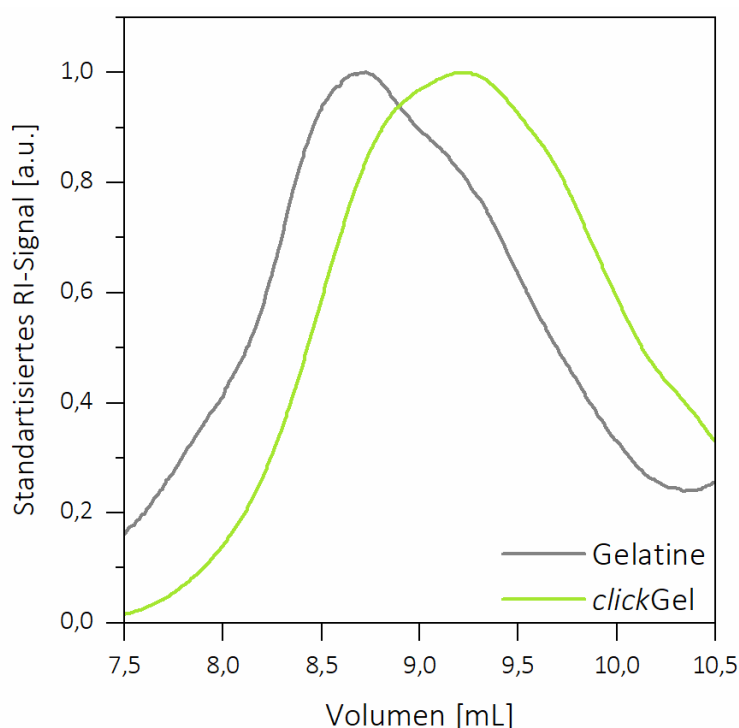


Abbildung 34: Eluogramm der Größenausschluss- bzw. Gelpermeationschromatographie (GPC) von unmodifizierter Gelatine und Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*). Im Vergleich zur unmodifizierten Gelatine wurde die *clickGel* erst später, d. h. bei einem höheren Elutionsvolumen eluiert, was für einen kleineren Moleküldurchmesser der *clickGel* spricht.

Die Eluogramm-Formen in **Abbildung 34** waren für beide Biopolymere vergleichbar, dennoch wurde die *clickGel* deutlich später als die unmodifizierte Gelatine eluiert. Eine solche Verschiebung des Eluogramms nach einer chemischen Modifikation von Gelatine beobachteten auch Sewald *et al.* [192], die Gelatine mit Methacrylgruppen modifizierten. Sie vermuteten in ihrer 2018 publizierten Arbeit, dass die chemische Modifizierung der Gelatine zu einer Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers führt. Sie begründeten diesen Verdacht mit der Annahme, dass aufgrund der chemischen Modifizierung potenziell weniger Gruppen in der Gelatine vorhanden sind, die zur Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen führen.

Demzufolge würde sich aller Voraussicht nach auch die Sekundär- und Tertiärstrukturen des Proteins und dementsprechend auch der Durchmesser der sich in der mobilen Phase der GPC-Säule ausbildenden Solvathülle verändern. Da die Solvathülle in der mobilen Phase mitbewegt wird, käme es entsprechend ihrer Größe zu einer Veränderung des Diffusionsverhaltens.

Van Hoorick *et al.* postulierten in ihrer 2017 veröffentlichten Arbeit, dass eine chemische Modifikation der Gelatine während der Synthese zur Hydrolyse der Gelatine führe und sich die Moleküle aus diesem Grund verändern. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine Hinweise auf diesen Effekt gefunden, welche für eine solche Hydrolyse der Gelatine durch den Diazotransfer sprechen würden, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Theorie von Sewald *et al.* hier vermutlich die schlüssigere Erklärung liefert. Um die Fragestellung jedoch abschließend beantworten zu können, wäre es in der Fortsetzung dieser Arbeit wichtig, eine weitere Analyse der Molekulargewichtsverteilungen von *clickGel* durchzuführen, die in der Lage ist, absolute Messwerte zu liefern.

5.6.3 Herstellung und Charakterisierung von Hybridhydrogelen aus *clickGel* und PEG-DA

Im nächsten Schritt sollte die als Modellsubstanz dienende *clickGel* kovalent in ein Hybridhydrogel aus PEG-DA einpolymerisiert werden. Hierfür wurde sie zunächst mit dem Linker *N*-Propargylacrylamid konjugiert und anschließend in verschiedenen Konzentrationen (0,6 %, 3,0 %, 5,5 %) in die Hydrogelvorläuferlösung beigemischt. Diese Hydrogelvorläuferlösungen wurden anschließend mithilfe von UVA-Licht und dem Photoinitiator *Irgacure*[®] 2959 radikalisch polymerisiert (**Abbildung 30 (3)**). Wie oben bereits beschrieben, konnte der Nachweis der erfolgreichen Konjugation in direkter Weise mithilfe der ATR-FT-IR-Spektroskopie, genauer gesagt dem Verschwinden der Azidbande bei 2102 cm⁻¹, nachgewiesen werden (**Abbildung 32**). Ferner belegte das durch die Konjugation der *clickGel* mit dem Linker entstandene Signal der Doppelbindungsprotonen im ¹H-NMR-Versuch (**Abbildung 31**, oberes Spektrum) die erfolgreiche Konjugation. Hydrogelvorläuferlösungen aus *clickGel*, bei der die Komponenten des Reaktionskatalysators (Na-L-Ascorbat und Kupfer(II)sulfat) weggelassen wurden, dienten als Kontrolle. Ebenso dienten Hydrogelvorläuferlösungen mit unmodifizierter Gelatine als Kontrolle.

Bei der Hydrogelherstellung zeigte sich bereits, dass es im Fall der Hydrogelvorläuferlösungen ohne Katalysator nicht möglich war, makroskopische Hydrogele zu generieren. Der Grund war vermutlich, dass die Azidgruppen unter den Bedingungen der radikalischen Polymerisation nicht

stabil waren und in Nebenreaktionen abreagierten, die die Polymerisation verhinderten [247, 248]. Daher war die Hydrogelbildung erst nach Umwandlung der Azidgruppen in die entsprechenden Triazolringe möglich. Dieser Effekt konnte als weiterer indirekter Hinweis auf die erfolgreiche Konjugation mittels der 1,3-dipolaren Cycloaddition aufgefasst werden. Wurde der Hydrogelvorläuferlösung unmodifizierte Gelatine beigemischt, war es ebenfalls möglich, makroskopische Hydrogele auszubilden. Abhängig von der Konzentration an eingebrachtem Biopolymer zeigten alle Hydrogele eine zunehmende Opazität (**Abbildung 35**). Im Fall der Hybridhydrogele mit *clickGel* war eine leichte grünliche-bläuliche Färbung erkennbar, die sich auch durch die Waschschrte nicht vollständig entfernen ließ (**Abbildung 35**).

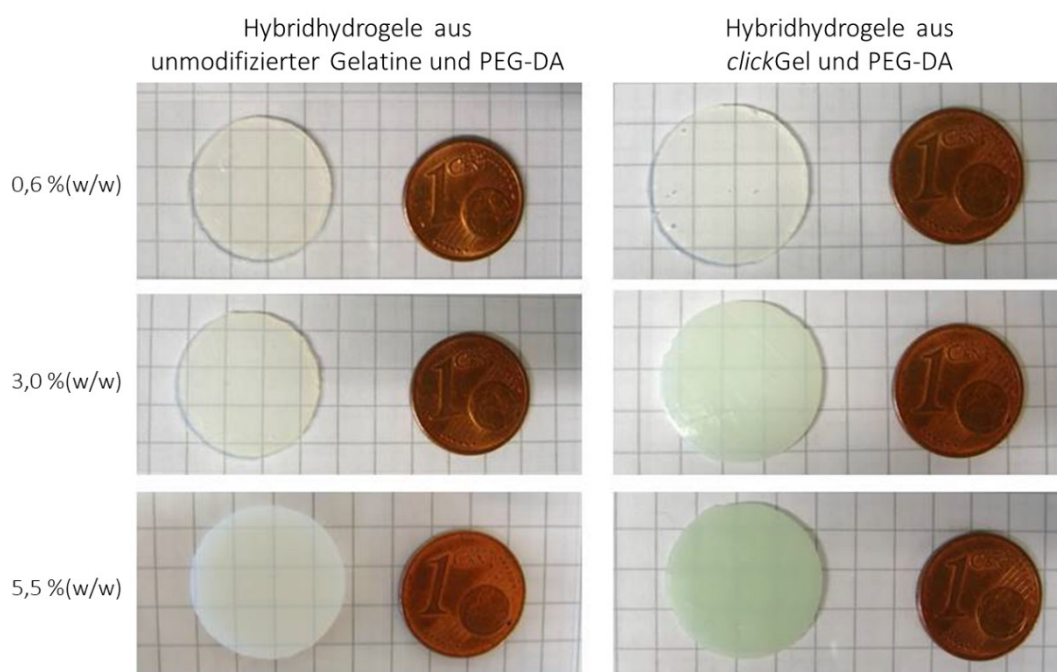


Abbildung 35: Makroskopisches Aussehen der generierten Hybridhydrogele aus unmodifizierter Gelatine (Fotos links) bzw. kovalent gebundener Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*) (Fotos rechts). In beiden Fällen nahm die Opazität der Hydrogele mit steigendem Biopolymergehalt zu. Im Fall der *clickGel* war eine grünlich-bläuliche Färbung der entstehenden Hydrogele erkennbar. Die Herstellung makroskopischer Gele war nur mit unmodifizierter Gelatine bzw. mit *clickGel* möglich, deren Azide zuvor mit dem Linker *N*-Propargylacrylamid umgesetzt wurden. Wurde die Azid-Alkin-Cycloaddition durch das Weglassen der Katalysatorkomponenten (Na-L-Ascorbat und Kupfer(II)sulfat) verhindert, war keine Gelausbildung möglich.

Die grünlich-bläuliche Färbung der *clickGel*-enthaltenden Hybridhydrogele resultierte vermutlich aus dem Vorhandensein komplexierter Kupfer(II)-Ionen, die der Hydrogelvorläuferlösung für die Azid-Alkin-Cycloaddition zugegeben wurden. Dieser Färbeneffekt ist bspw. aus der Biuret-Reaktion bekannt und wird häufig zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen angewandt [249]. Im Fall der unmodifizierten Gelatine wurde dieser

Effekt nicht beobachtet, was die Vermutung erhärtete, dass die Färbung der *clickGel*-enthaltenden Gele mit den zugegebenen Kupferionen zusammenhing.

Physikalisch-mechanische Untersuchung der Speicher (G')- und Verlustmoduln (G'') von (*clickGel*)-haltigen Hybridhydrogelen

Um zu untersuchen, wie sich die (*clickGel*)-Zugabe auf die physikalisch-mechanischen Eigenschaften der entstehenden Hybridhydrogele mit PEG-DA auswirkte, wurden die Speicher (G')- und Verlustmoduln (G'') sowie der Quellgrad der generierten Hydrogele gemessen. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung von Gelatine- und *clickGel*-haltigen Hybridhydrogelen sind in **Abbildung 36** dargestellt.

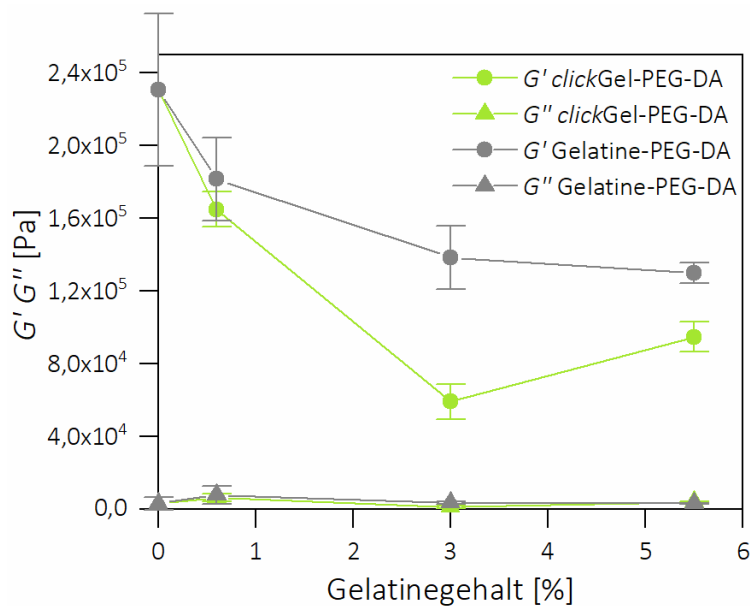


Abbildung 36: Speicher (G')- und Verlustmoduln (G'') von Hybridhydrogelen aus PEG-DA und unterschiedlichen Konzentrationen an Gelatine bzw. kovalent gebundener Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*).

Wie in **Abbildung 36** erkennbar, wurde G' für die Hybridhydrogele sowohl mit unmodifizierter Gelatine als auch mit *clickGel* ein bis zwei Größenordnungen größer als G'' . Daraus konnte abgeleitet werden, dass es sich um vorwiegend elastische Hydrogele handelte. Der höchste Wert für G' wurde mit 231 kPa für reine PEG-DA-Hydrogele, d. h. Hydrogele ohne *clickGel* oder Gelatine gemessen. Durch die Zugabe von 5,5 % unmodifizierter Gelatine in das Hybridhydrogel verringerte sich G' auf 130 kPa. Mit der Zugabe von 5,5 % *clickGel* nahm G' noch weiter ab und verringerte sich auf 95 kPa. Dieser Effekt wurde so vor der Versuchsdurchführung nicht erwartet. Es wurde stattdessen davon ausgegangen, dass sich durch die Zugabe von *clickGel* sowohl der Feststoffgehalt der Hybridhydrogele als auch die Vernetzungsdichte erhöhen würden, was einer Erhöhung von G' entsprechen würde. Dies schien jedoch angesichts der

erhobenen Daten nicht der Fall gewesen zu sein. Allerdings wurde dieser Effekt bereits zuvor von Berkovitch und Seliktar [250] beschrieben, die ebenfalls eine Abnahme von G' beobachteten, nachdem sie Gelatine durch die Thiol-Michael-Addition kovalent in PEG-DA-Netzwerke integriert hatten. Sie stellten die Vermutung auf, dass die Selbstorganisation von Gelatine die Vernetzung von PEG-DA stören könnte. Bislang fehlen für diese Theorie jedoch die Beweise, weshalb der beobachtete Effekt zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Da das Phänomen jedoch sowohl für die Hybridhydrogele mit unmodifizierter Gelatine als auch mit *click*Gel gleichermaßen beobachtet wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass der Diazotransfer der Gelatine die zugrunde liegende Eigenschaft nicht signifikant veränderte. Das Ausmaß der Verringerung von G' war jedoch bei der *click*Gel stärker ausgeprägt als bei der unmodifizierter Gelatine, was vermutlich mit kleinen Mengen nicht umgesetzter Azidgruppen vor dem Auspolymerisieren erklärt werden konnte. Solche noch übrig bleibenden Azide könnten, wie oben bereits beschrieben, die radikalische Vernetzung der Hydrogele stören.

Untersuchung des gravimetrischen Quellgrads von (click)Gel-haltigen Hybridhydrogelen

Der gravimetrische Quellgrad als weitere charakteristische Messgröße zur Hydrogelcharakterisierung gibt die Menge an Wasser an, die in einem Hydrogel enthalten ist, nachdem dieses zum Gleichgewicht in Wasser gequollen wurde (siehe auch **Kapitel 4.6.4**). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen der Hybridhydrogele aus PEG-DA und unmodifizierter Gelatine bzw. *click*Gel sind in **Abbildung 37** gezeigt.

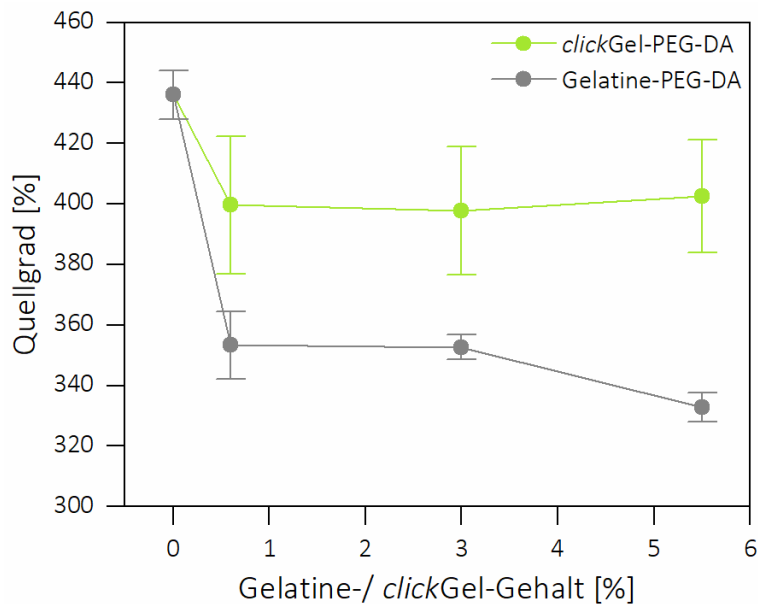


Abbildung 37: Quellgrad von Hybridhydrogelen aus PEG-DA und unmodifizierter Gelatine bzw. Azid-modifizierter Gelatine (*clickGel*).

Der höchste Quellgrad wurde mit 436 % für reine PEG-DA-Hydrogele ermittelt, die kein Gelatinederivat enthielten. Durch Zugabe von 0,6 % unmodifizierter Gelatine oder *clickGel* verringerte sich der Quellgrad auf 353 % bzw. 400 %. Eine weitere Zugabe von unmodifizierter Gelatine und *clickGel* hatte keinen signifikanten Einfluss mehr auf den Quellgrad, was sich für den Gelatine- bzw. *clickGel*-Gehalt von 5,5 % in Werten von 333 % und 409 % widerspiegelte. Der jeweils etwas höhere Quellgrad für die Hybridhydrogele mit *clickGel* verglichen mit den Gelatine-haltigen Hybridhydrogelen entsprach den Messungen der Speichermoduln (G') (Abbildung 36). Sowohl ein niedrigerer Wert für G' als auch ein höherer Quellgrad deuten auf ein weniger dicht vernetztes Polymernetzwerk für die *clickGel*-haltigen Hydrogele hin, was möglicherweise auf die zuvor angesprochenen potenziellen Nebenreaktionen von nicht umgesetzten Azidgruppen zurückzuführen war. Die niedrigeren Quellgrade sowohl für *clickGel* als auch für unmodifizierte Gelatine-enthaltenden Hybridhydrogele im Vergleich zu reinen PEG-DA-Hydrogelen konnten jedoch nicht auf diese Weise erklärt werden, da auch G' von PEG-DA-Hydrogelen größer war. Um diesen Effekt zu verstehen, war es hilfreich, die Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter χ_{PEG} von PEG (0,426)[251] und χ_{Gel} von Gelatine (0,49) [252] zu betrachten. Der größere Wert für χ_{Gel} im Vergleich zu χ_{PEG} gibt an, dass Wasser ein schlechteres Lösungsmittel für Gelatine als für PEG ist. Somit konnten die Hydrogele, die unmodifizierte Gelatine oder *clickGel* enthalten, vermutlich weniger Wasser absorbieren als die reinen PEG-DA-Hydrogele, obwohl G' ebenso kleiner war.

5.6.4 Untersuchung der Zellantwort auf (*click*)Gel-haltige Hybridhydrogele

Das Ziel von Hybridhydrogelen ist es im Allgemeinen, die vorteilhaften Eigenschaften der synthetischen Hydrogelkomponente mit denen der biologischen Komponente zu kombinieren. Die Ausrüstung von Gelatine mit Azidgruppen stellt hierbei einen sehr interessanten Ansatz dar, da bekannt ist, dass diese Gruppen in hochselektiven und spezifischen Azid-Alkin-Cycloadditionen reagieren können. Die Azid-Alkin-Cycloaddition stellt ein wertvolles Werkzeug für Konjugationsreaktionen, wie bspw. die in dieser Arbeit verwendeten Kopplung der *click*Gel mit dem heterobifunktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid, dar. Bis dato waren allerdings noch keine Literaturdaten über *click*Gel-haltige Biomaterialien publiziert. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Hybridhydrogelen aus PEG-DA und *click*Gel war vorab nicht auszuschließen, dass sich insbesondere die Kupfer(I)-katalysierte Huisgen-Cycloaddition zur Umsetzung der Azide mit dem Linker *N*-Propargylacrylamid auf die Toxizität der Hydrogele auswirken würde, da Kupfer(I)-Ionen als zytotoxisch bekannt sind [253]. Um diese Fragestellung zu klären, wurde die Zytotoxizität in der vorliegenden Arbeit in einem MTS-Tetrazolium-Assay (MTS: [3 (4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-tetrazolium (inneres Salz)]) bestimmt.

Untersuchung der Zytotoxizität von PEG-DA-(Hybrid)Hydrogelen mit und ohne unterschiedliche clickGel-Gehalte

Bei diesem kolorimetrischen Assay wurde das MTS durch lebende Zellen zu einem farbigen Produkt reduziert, dessen Konzentration anhand der Absorption und einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden konnte. In **Abbildung 38** sind die Ergebnisse dieser Zytotoxizitätsbestimmung grafisch dargestellt.

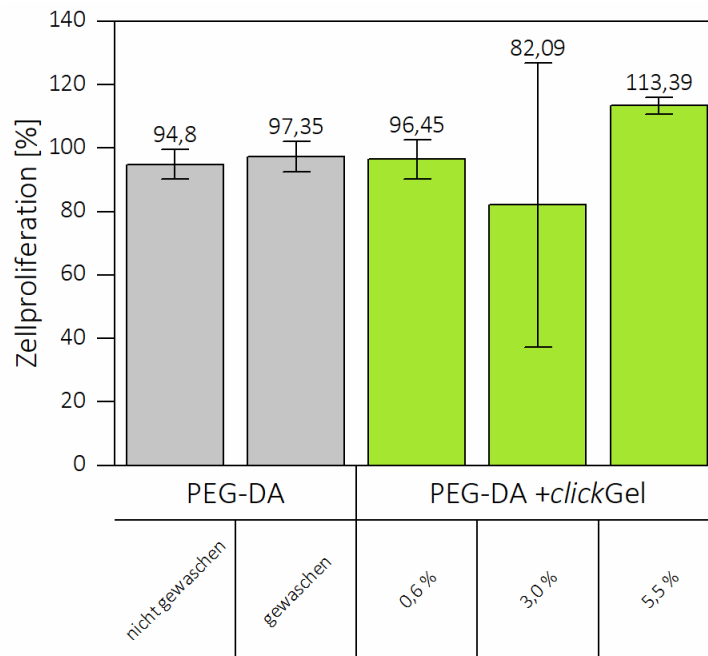


Abbildung 38: Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays von Extrakten aus PEG-DA-(Hybrid)Hydrogelen mit und ohne unterschiedliche *clickGel*-Gehalte. Die Proliferationsraten der Zellen, die mit den jeweiligen Hydrogelextrakten inkubiert wurden, wurden jeweils auf die Negativkontrolle (DMEM mit 10 % FCS, eingestellt auf 100 % Zellproliferation) und die Positivkontrolle (DMEM mit 10 % FCS und 1 % SDS, eingestellt auf 0 % Zellproliferation) normiert.

Die internationale Norm DIN EN ISO 10993-5 definiert relative Zellproliferationsraten > 80 % als nicht zytotoxisch. Wie erwartet zeigten weder PEG-DA-Hydrogele direkt nach der Herstellung („nicht gewaschen“) noch PEG-DA-Hydrogele nach dem Waschen („gewaschen“) eine zytotoxische Wirkung, was wiederum die Zytokompatibilität von PEG-DA-Hydrogelen und dem Photoinitiator *Irgacure*[®] 2959 belegte. Ebenso konnten die *clickGel*-haltigen Hybridhydrogele als nicht zytotoxisch klassifiziert werden. Alle *clickGel*-haltigen Hydrogele wurden vor dem Zytotoxizitätstest gewaschen. Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass das simple Waschprotokoll ausreicht, um alle möglicherweise zytotoxisch wirkenden Komponenten in den Hydrogelformulierungen wie bspw. den Linker *N*-Propargylacrylamid oder auch Kupfer(I)-Ionen zu entfernen.

Diese Beobachtung deckte sich mit der von Yañez-Soto *et al.* [254] und Cuchiara *et al.* [255], dass synthetische Hydrogele auf PEG-DA-Basis zytokompatibel sind. Ebenfalls waren die hier gezeigten Ergebnisse im Einklang mit den Ergebnissen von Williams *et al.* [256], die zeigten, dass der Photoinitiator *Irgacure*[®] 2959 für Polymerisationsreaktionen in Gegenwart von lebenden Zellen gut geeignet ist.

Nachdem aus den Ergebnissen in **Abbildung 38** geschlossen werden konnte, dass die Hybridhydrogele aus PEG-DA und *clickGel* als Modellsubstanz für die *clickECM* keine zytotoxischen Eigenschaften auf lebende Zellen ausübten, wurde im nächsten Schritt die Zellantwort humaner primärer Fibroblasten auf die Hybridhydrogeloberflächen untersucht. Hierzu wurden die Zellen auf die Oberflächen der (Hybrid-)Hydrogele ausgesät und für vier Tage statisch kultiviert. Anschließend wurden die Zytoskelette sowie die Zellkerne angefärbt und die jeweiligen Zellzahlen unter dem cLSM analysiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in **Abbildung 39**, die grafische Darstellung der ermittelten Zellzahlen in **Abbildung 40** dargestellt.

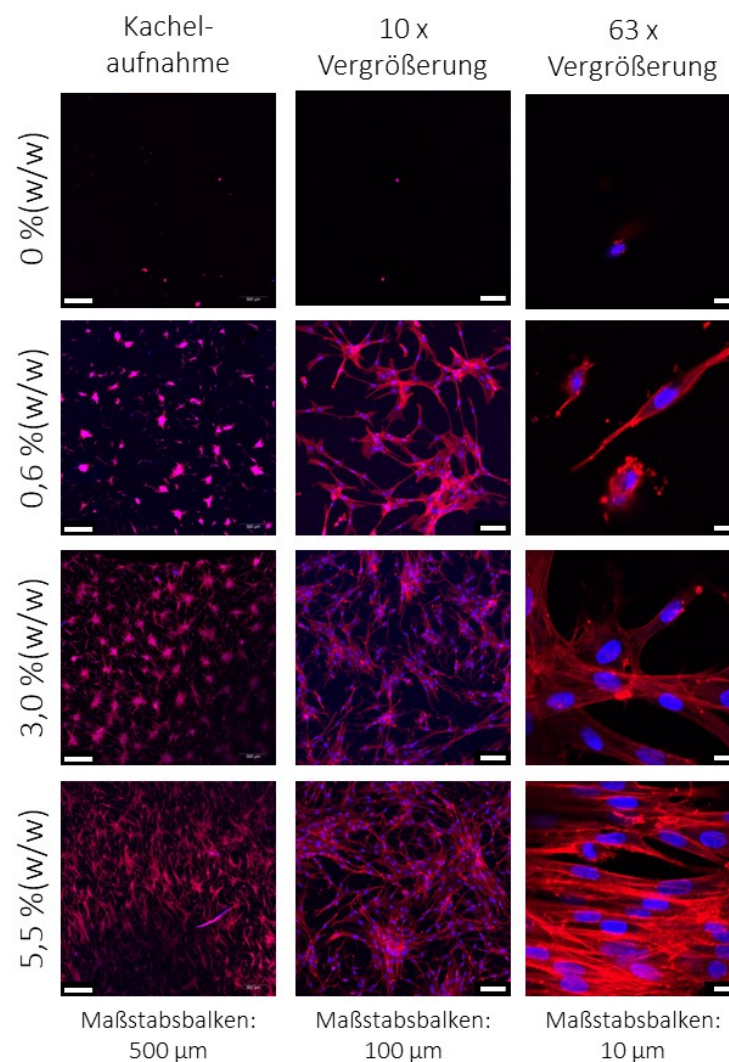


Abbildung 39: Zellantwort auf die *clickGel*-haltigen PEG-DA-Hydrogele. Die Zelladhäsion wurde durch Fluoreszenzfärbung der Aktin-Zytoskelette (Alexa Fluor® 546-Phalloidin, rot) und der Kerne (DAPI, blau) nach 4 Tagen statischer Zellkultur analysiert. Jede Hydrogeloberfläche wurde mit dem cLSM abgerastert, um die Verteilung der Zellen zu bewerten. Die Mikroskopeinstellungen wurden dabei für alle Proben identisch gehalten. Als Kontrolle dienten reine PEG-DA-Hydrogele ohne *clickGel*-Anteil.

Aus den cLSM-Aufnahmen der linken sowie der mittleren Spalte in **Abbildung 39** ließ sich bereits mit dem bloßen Auge ableiten, dass ein zunehmender *clickGel*-Gehalt auch die Anzahl der an den Hydrogeloberflächen adhärierenden Zellen erhöhte. Während auf den unmodifizierten PEG-DA-Hydrogelen so gut wie keine Zellen nachweisbar waren, erhöhte sich die Zelldichte durch den Einbau von *clickGel* stark. Selbst bei einer Zugabe von nur 0,6 % *clickGel* konnte eine deutliche Zunahme anhaftender Zellen festgestellt werden. Diese Beobachtung unterstrich die außergewöhnliche Bioaktivität der *clickGel*-Zugabe zu den ansonsten bioinerten PEG-DA-Hydrogelen.

In den cLSM-Aufnahmen mit einer größeren Vergrößerung (rechte Bildspalte in **Abbildung 39**) waren morphologische Effekte zu beobachten. Hier wurde ersichtlich, dass Zellen, die an reinen PEG-DA-Hydrogelen sowie an PEG-DA-Hydrogelen mit einer geringen Menge an *clickGel* anhafteten, eine eher sphärische Morphologie aufwiesen. Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen eher dazu neigten, Zellcluster zu bilden, was ein Hinweis darauf war, dass diese Zellen den Kontakt mit dem Material, soweit es möglich war, vermieden. Mit zunehmendem *clickGel*-Gehalt elongierten sich die Fibroblasten zu ihrer typischen spindelförmigen Form und die Ausbildung eines konfluenten Zellrasens war zu beobachten [234].

Um die Anzahl der adhärenen Zellen zu quantifizieren, wurden die cLSM-Bilder mit *ImageJ* verarbeitet (**Abbildung 40**).

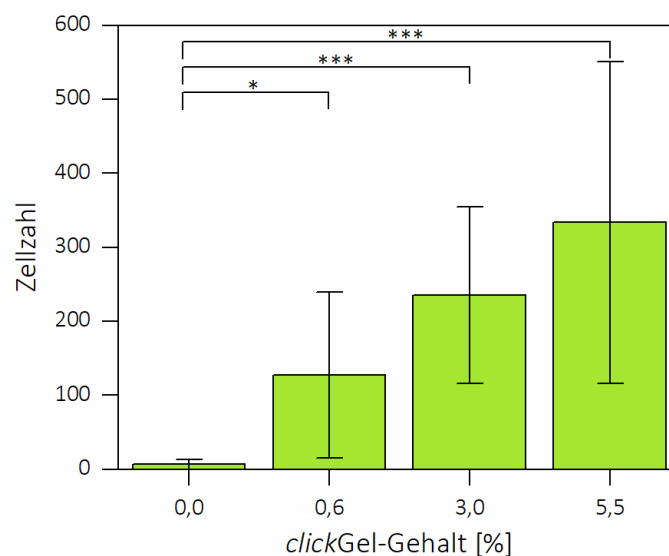


Abbildung 40: Quantifizierung der Anzahl adhärenen primärer humaner Fibroblasten nach viertägiger statischer Zellkultur auf PEG-DA-Hydrogelen mit unterschiedlichen *clickGel*-Gehalten. Die Zellzahl wurde anhand der Zellkerne in einer Schwellenwertanalyse quantifiziert. Der Einbau von *clickGel* führte (unabhängig von der Konzentration) zu einer signifikant höheren Zellzahl als bei reinen PEG-DA-Hydrogelen (Mittelwert ± SD, n = 3 mit 3 Donoren und 9 Hydrogelen pro Gruppe).

Die durchgeführte Schwellwertanalyse und die angeschlossene statistische Untersuchung ergaben, dass die Zellzahl auf den *click*Gel-haltigen Hybridhydrogelen im Vergleich zu den Hydrogelen aus reinem PEG-DA nach 4 Tagen statischer Zellkultur signifikant erhöht war.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der biologischen Charakterisierung der generierten Hybridhydrogele, dass der Einbau von *click*Gel in die PEG-DA-Hydrogele die Bioaktivität des Materials signifikant erhöhte, obwohl die Steifigkeit der Hydrogele gleichzeitig verringert wurde (**Abbildung 36**). Dies war insofern bemerkenswert, als dass andere Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation und Adhäsion von Fibroblasten mit zunehmender Steifigkeit der Hydrogele zunimmt [257]. Sunyer *et al.* [258] verglichen Matrices mit einem Youngschen Modul von $\sim 1 - 240$ kPa und Wang *et al.* [259] verglichen Materialien mit einem Speichermodul von $0,3 - 8,2$ kPa.

Durch die Zellversuche dieses Arbeitspakets (**Abbildung 38 - Abbildung 40**) konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass die Zellen nicht durch möglicherweise verbleibende freie Azidgruppen in der *click*Gel beeinträchtigt wurden. Diese Schlussfolgerung war mit den Beobachtungen dieser Arbeit (**Abbildung 25**) und den zuvor publizierten Daten zur Azid-modifizierten *click*ECM konsistent [114].

5.6.5 Bewertung der sechsten Hypothese zur Generierung von Hybridhydrogelen aus Azid-modifizierter Gelatine als Modellsubstanz für die *click*ECM und Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA)

Insgesamt belegten die Untersuchungen im Rahmen dieses Arbeitspakets, dass es möglich war, Gelatine mit Azidgruppen durch einen Diazotransfer der nativen Aminogruppen in der Gelatine zu synthetisieren. Die einstufige Reaktion konnte erfolgreich genutzt werden, um die Gelatine mit Aziden auszurüsten, ohne die Seitenketten der Aminosäuren unnötig zu verlängern oder hydrophober Gruppen einzuführen. Da die *click*Gel in ausreichenden Mengen synthetisiert werden konnte und überdies in Wasser löslich war, stellte das Material eine annähernd ideale Modellsubstanz dar, um die Generierung von Hybridhydrogelen besser zu verstehen und etablieren zu können. Durch den kovalenten Einbau der *click*Gel in die PEG-DA-Hydrogele konnten die sonst bioinerten Hydrogele mit biofunktionalen Eigenschaften versehen werden. Anhand verschiedenster direkter und indirekter Methoden konnte gezeigt werden, dass der Diazotransfer erfolgreich war, die Azide chemisch adressierbar und reaktiv waren und sich mit Alkin-funktionalen Linker *N*-Propargylacrylamid in einer Huisgen 1,3-dipolaren Cycloaddition umsetzen ließen. Durch die Konjugation mit dem Linker war es

möglich, die Gelatine mit photovernetzbaren Gruppen auszustatten und diese im Zuge einer radikalischen Vernetzung kovalent in Hybridhydrogele mit PEG-DA zu integrieren. Folglich konnte die sechste Hypothese dieser Arbeit in allen Punkten als bestätigt angenommen werden. Für die potenzielle Fortführung der Untersuchungen wäre es zunächst noch interessant, die generierten Hybridhydrogele nicht nur als 2D-Zellkultursubstrat, sondern auch für die 3D-Kultur von Zellen zu verwenden und die Zellantwort zu untersuchen. Nach Abschluss der Etablierung geeigneter Protokolle sollte die *clickGel*-Modellsubstanz gegen die komplexe *clickECM* ersetzt und die Zellantwort auf das biologisch komplexere Hybridmaterial untersucht werden. Ebenfalls interessant wäre es, neben PEG-DA auch noch andere synthetische Hydrogelmaterialien mit *clickGel* oder im weiteren Verlauf mit *clickECM* zu biologisieren, um so in einer Art Baukastenprinzip Hybridmaterialien mit spezifisch eingestellten materialcharakteristischen und biologischen Eigenschaften generieren zu können.

6 Schlussbetrachtung und Ausblick

Aus *In-vitro*-Zellkulturen isolierte Azid-modifizierte dezellularisierte Matrices stellen eine sehr interessante und äußerst vielversprechende Materialklasse für die Anwendung als Biomaterial dar. Die natürlichen bioaktiven Eigenschaften der ECM werden in diesem Ansatz durch die chemische Modifikation mithilfe des Metabolischen Glykoengineerings (MGE) zusätzlich mit abiotischen Aziden ausgestattet und die entstehende *click*ECM so für bioorthogonale Azid-Alkin-Biokonjugationsreaktionen ausgerüstet.

Trotz ihrer erstrebenswerten biologischen Eigenschaften und ihres Potenzials ist die Untersuchung ihrer biochemischen Eigenschaften und deren biomolekularer Zusammensetzung nicht zuletzt aufgrund der hochkomplexen und unlöslichen Natur dieser biogenen Biopolymergemische äußerst herausfordernd und bislang nur unzureichend erforscht. Für die Charakterisierung, die Vorhersage der zu erwartenden Funktionen sowie der Weiterentwicklung dieser Materialklasse ist eine gründliche qualitative und quantitative Analyse der Materialzusammensetzung unerlässlich. Neben den Einschränkungen hinsichtlich der analytischen Untersuchung erschweren die Komplexität und Unlöslichkeit der Materialien auch die reproduzierbare Verarbeitung der Materialien, um diese bspw. für bioaktive Oberflächenbeschichtungen oder als Hybridmaterialien nutzen zu können.

Um die biogene, Azid-modifizierte extrazelluläre Matrix für die Anwendung als Biomaterial nutzen zu können, bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit deshalb zunächst in der Optimierung der von Ruff *et al.* etablierten Protokolle, sodass die aus *In-vitro*-Fibroblastenkulturen isolierte *click*ECM **verlässlich und reproduzierbar verarbeitet** werden kann. Des Weiteren sollte die **Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM quantifiziert** werden und die generierten *click*ECM-Beschichtungen dahingehend weiterentwickelt werden, dass **bioaktive, reproduzierbare, homogene und geschlossene Oberflächenbeschichtungen** damit erzeugt werden können. Um die *click*ECM für weitere Biomaterialanwendungen, wie bspw. als **Biokonjugationsplattform** oder als **kovalent immobilisierte biologische Komponente in Hybridhydrogelen** nutzbar zu machen, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der **umfangreichen Charakterisierung** der *click*ECM hinsichtlich ihrer **biomolekularen Zusammensetzung**.

Mit den experimentellen Versuchen zur Aufarbeitung der (*click*)ECM im ersten Arbeitspaket dieses Dissertationsvorhabens konnte gezeigt werden, dass es möglich war, ein optimiertes Protokoll zur Aufkonzentrierung und zur Homogenisierung der (*click*)ECM zu etablieren.

Die bei der Aufkonzentrierung erreichte gesteigerte (*click*)ECM-Konzentration konnte durch die mechanische Homogenisierung und den Verzicht auf die Zugabe von Chemikalien beibehalten werden. Die bei der Homogenisierung entstandenen (*click*)ECM-Suspensionen wiesen gleichbleibend enge Fragmentgrößenverteilungen im Größenbereich von ca. 8 μm - 31 μm auf und konnten reproduzierbar verarbeitet und transferiert werden. Wenn auch nicht zwingend notwendig, wäre es für eine Weiterführung der experimentellen Versuche interessant, auch andere Homogenisierungsmethoden wie bspw. die Rotor-Stator-Homogenisierung anzuwenden. Hinsichtlich der verlässlichen Angabe der Fragmentgrößenbereiche wäre es überdies erstrebenswert, diese Kenngröße nochmals mit einer anderen Analysetechnik zu analysieren, die nicht auf der Messung der Impedanz basiert.

Durch die mechanische Fragmentierung wurden die Proteinstrukturen der (*click*)ECM offensichtlich nicht geschädigt und die *click*ECM-Azide waren nach wie vor sterisch zugänglich und chemisch reaktiv. Aktuell wird am IGVP in Kooperation mit der Hochschule Reutlingen und der Universität Konstanz ein vom Ministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst des Landes Baden-Württemberg gefördertes Projekt bearbeitet, in dessen Zuge alternative Zucker mit anderen chemisch funktionellen Gruppen für die Anwendung im MGE untersucht werden. Im Rahmen dieser Dissertation wurde an den entsprechenden Untersuchungen mitgearbeitet. Eine Publikation der dabei erzielten Ergebnisse wird aktuell vorbereitet. Andere bzw. weitere funktionelle Gruppen in die Matrix einzubringen, würde eine neue Dimension an Konjugationsmöglichkeiten eröffnen und würde dementsprechend das Potenzial der *click*ECM noch weiter ausbauen.

Die isolierbaren Mengen an (*click*)ECM sind zum jetzigen Zeitpunkt noch sehr stark begrenzt. So müssen für 1 Gramm *click*ECM-Trockenmasse ca. 480 Zellkulturschalen (\varnothing 14,5 cm) kultiviert, isoliert und aufgearbeitet werden. Um die Menge zu steigern, wäre ein interessanter Ansatz für die Fortführung dieser Arbeit das sogenannte *Macromolecular Crowding* (zu Deutsch „Makromolekulare Verdichtung“) während der *In-vitro*-Zellkultur anzuwenden. Diese Methode, bei der das Zellkulturmedium mit hochmolekularen Molekülen (wie bspw. Hyaluronsäure) versetzt werden, wurden u. a. von Shendi *et al.* beschrieben und ein Teil der Charakterisierung im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt [129]. Durch die dicht gedrängte Anordnung der hochmolekularen *Crowding*-Moleküle im Zellkulturmedium wird die Diffusion von ECM-Vorläufermolekülen wie bspw. den Prokollagenmoleküle in das Medium verhindert, was die Auspolymerisation der Moleküle direkt an der Matrix begünstigt und dementsprechend eine höhere ECM-Biomolekülkonzentration zur Folge hat [129, 260-264].

Bei den Untersuchungen zur Bestimmung der Azidkonzentration innerhalb der *click*ECM im zweiten Arbeitspaket konnte bis dato keine Strategie gefunden werden, mit der diese Kenngröße verlässlich ermittelt werden konnte. Dies sollte in einer potenziellen Fortsetzung dieser Arbeit unbedingt weiterverfolgt werden. Falls größere Mengen an (*click*)ECM gewonnen werden könnten, wäre es hier bspw. möglich, die ATR-FT-IR-Spektroskopie anzuwenden und die Azid-Stoffmenge innerhalb der *click*ECM mit entsprechenden Standards zu quantifizieren. Wäre diese Kenngröße analytisch bestimmbar, wäre es auch möglich, das MGE bspw. hinsichtlich der Behandlungskonzentration oder –dauer der Zellen mit dem Zuckerderivat zu optimieren und so ggf. einen höheren Azidgehalt in der *click*ECM zu realisieren.

Wichtige Erkenntnisse konnten im Zuge des dritten Arbeitspaketes bei der Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften der (*click*)ECM erzielt werden. Es stellte sich heraus, dass die untersuchten qualitativen Methoden (SDS-PAGE, (immun)histochemische Färbungen in Kombination mit verschiedenen Mikroskopiearten) hilfreiche Instrumente darstellen, um einen ersten Überblick über die Natur der biologischen Proben und der darin vorliegenden Verteilung der Biomoleküle zu erhalten. Jedoch sind sie aufgrund ihres limitierten Auflösungsvermögens hinsichtlich kleinerer Konzentrationsunterschiede nicht in der Lage, quantitative Untersuchungen der jeweiligen Merkmale zu ersetzen und sollten folglich eher als Ergänzung angesehen werden.

Die Ergebnisse dieses Arbeitspakets hinsichtlich der quantitativen Charakterisierung zeigen sehr eindrücklich, dass nicht alle in der Literatur routinemäßig verwendeten Methoden ohne Weiteres für die Analyse solcher unlöslicher und komplex zusammengesetzter (*click*)ECM geeignet sind. So haben sich der Bradford-Assay sowie der BCA-Assay für die Proteingehaltsbestimmung in dieser Arbeit als gänzlich ungeeignet herausgestellt. Stattdessen hat sich gezeigt, dass es unerlässlich ist, die Eignung und insbesondere auch die Limitierungen der jeweiligen Methoden und der verfügbaren Assays kritisch zu evaluieren, um das jeweilige Merkmal zuverlässig untersuchen zu können. Die Bestimmung des Proteingehalts über die elementare Zusammensetzung sowie die Bestimmung der Kollagenkonzentration über den Hydroxyprolinegehalt haben sich zwar in der praktischen Durchführung als geeignet erwiesen, dennoch muss auch bei diesen Methoden die Auswahl geeigneter Umrechnungsfaktoren sehr sorgfältig erfolgen. Falls in Zukunft mehr (*click*)ECM generiert werden kann, wäre es in der Fortführung dieser Untersuchungen erstrebenswert, die Aminosäurezusammensetzung der (*click*)ECM zu bestimmen. Auf diese Weise könnten die quantifizierten Kenngrößen validiert und bestätigt werden und ein geeigneter individueller Umrechnungsfaktor für den Protein- und

Kollagengehalt benannt werden. Auch für die Validierung des Gehalts an löslichem Kollagen sowie der Konzentration sulfatierter Glykosaminoglykane (sGAG) in der (*click*)ECM wäre es vorteilhaft, in Zukunft noch andere, idealerweise auf einem anderen Reaktionsmechanismus/ Nachweissystem basierende Analysemethoden zu identifizieren.

Ein Aspekt, der im Zuge dieser Dissertation bislang nur in Vorversuchen [265] untersucht werden konnte, bezieht sich auf den Restgehalt an DNA. Wie unter **Kapitel 1.1** und **Kapitel 1.3.7.1** erläutert, muss die ECM für eine potentielle Anwendung als Biomaterial frei von immunogen wirkenden Bestandteilen (z. B. Zelltrümmern, Nucleinsäuren, Lipiden, Endotoxinen oder immunogenen Proteinen) sein, um die Fremdkörperreaktion zu verhindern oder zumindest abzuschwächen. Anhand von Fluoreszenzfärbungen konnte im Zuge von ersten Vorversuchen bereits sichergestellt werden, dass bereits nach der Isolierung der (*click*)ECM keine intakten Zellen mehr in der ECM vorlagen und der Großteil des Aktin-Zytoskeletts ausgewaschen war. Hinsichtlich des Restgehalts an DNA in der ECM wiesen erste vorläufige Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit darauf hin, dass der DNA-Gehalt in der ECM nach der Isolation den von Crapo *et al.* [38] vorgeschlagenen Grenzwert von 50 ng DNA/ mg ECM ($\pm 0,005\%$ (w/w)) noch übersteigt. Ein zusätzlicher DNase-Verdau im Zuge der Isolierung scheint jedoch in der Lage zu sein, den Gehalt an Rest-DNA in der ECM von 1590,80 ng DNA/ mg auf 11,6 ng DNA/ mg zu verringern, sodass der vorgeschlagene Grenzwert eingehalten werden kann. Um hier jedoch belastbare Ergebnisse vorlegen zu können, bedarf es eines größeren Datensatzes und idealerweise zusätzlich zum durchgeführten *PicoGreen*TM-Assay auch noch eine zweite Methode, um die Ergebnisse zu validieren.

Eine weitere Erkenntnis, die aus den experimentellen Untersuchungen des dritten Arbeitspakets abgeleitet werden konnte, war, dass das MGE, abgesehen von der Modifikation der Matrix mit Azidgruppen, die Kollagenmenge innerhalb der *click*ECM im Vergleich zur unmodifizierten ECM signifikant erhöhte. Dieser Effekt sollte in der Fortführung der Arbeit molekularbiologisch untersucht werden, um verstehen zu können, was durch die Zugabe des Azidzuckers auf zellulärer Ebene geschieht. Insgesamt konnten in diesem Arbeitspaket eine Reihe geeigneter qualitativer und quantitativer Methoden identifiziert werden, mit denen die (*click*)ECM reproduzierbar und verlässlich charakterisiert werden kann.

Große Fortschritte konnten im Zuge dieses Dissertationsvorhabens hinsichtlich der Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (*click*)ECM im vierten Arbeitspaket dieses Dissertationsvorhabens erreicht werden. Mithilfe der optimierten Aufarbeitung der (*click*)ECM und der Modifizierung des bestehenden Beschichtungsprotokolls

war es möglich, reproduzierbare Oberflächenbeschichtungen auf DIBO-funktionalisierten Oberflächen mit einer mittleren Schichtdicke von 31 μm – 35 μm zu generieren. Die erzeugten Beschichtungen waren nicht nur homogen und bioaktiv, sondern auch stabil gegenüber fluidmechanischem Abrieb und bedeckten die Oberflächen vollständig.

Diese vorteilhaften Eigenschaften konnten für die Untersuchungen im Zuge des fünften Arbeitspakets gezielt genutzt werden, um die *click*ECM-Beschichtungen als Biokonjugationsplattform nutzen zu können und sie über die bioorthogonale Azid-Alkin-Cycloaddition mit zusätzlichen, in der ECM natürlicherweise nicht vorkommenden Funktionen auszurüsten. Hier eröffnet sich eine ganz neue Dimension an denkbaren Anwendungen im Bereich der Regenerativen Medizin, des *Tissue Engineerings* oder der Zellkulturtechnik. Anstelle der in dieser Arbeit als Modellfunktion verwendeten Meerrettichperoxidase könnten die *click*ECM-Azide bspw. mit Alkin-funktionalen Wachstumsfaktoren, Antibiotika, Inhibitoren, Linker-Molekülen oder ganzen partikulären *Drug-Delivery*-Systemen konjugiert werden.

Konjugiert mit einem entsprechenden photoreaktiven Linker könnte die *click*ECM so bspw. in einem weiteren vielversprechenden Konjugationsansatz mit synthetischen Hydrogelmaterialien konjugiert werden. Durch die kovalente Integration der biologischen Komponente in das Hybridkonstrukt könnten synthetische, aber bioinerte Materialien für den Einsatz als Biomaterial biologisiert werden, um so die vorteilhaften Eigenschaften beider Materialklassen zu vereinen. Dieses enorme Potenzial zeigte sich bereits im Zuge des sechsten Arbeitspakets. Hier wurde das bioinerte Polyethylenglykol-Diacrylat (PEG-DA) durch kovalente Integration von Azid-modifizierter Gelatine als Modellsubstanz für die *click*ECM biologisiert. Die experimentellen Arbeiten in diesem letzten Arbeitspaket ergaben, dass es zum einen möglich war, Gelatine durch einen Diazotransfer der nativen Aminogruppen in der Gelatine mit Azidgruppen zu modifizieren und so eine biologische Komponente zur Verfügung zu haben, die der *click*ECM ähnelt, dabei aber in ausreichender Menge synthetisiert werden kann und überdies in Wasser löslich ist. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die Azide mit einem Alkin-funktionalen Linker umgesetzt werden können, sodass die biologische Komponente durch radikalische Vernetzung kovalent in das PEG-Netzwerk integriert werden konnte und dem resultierenden Hybridhydrogel auf diese Weise bioaktive Eigenschaften verlieh. In der Fortführung der Arbeiten auf diesem Gebiet müsste im nächsten Schritt untersucht werden, ob Zellen in diesem Hybridmaterial verkapselt werden können und ob das Material folglich für die 3D-Zellkultur geeignet ist. Die logische Konsequenz wäre dann, die etablierten Protokolle auf

die aufgearbeitete *clickECM* zu übertragen und die Eigenschaften der dabei entstehenden Hybridhydrogele zu analysieren. Wird die Komplexität der Biomoleküle im Hybridhydrogel durch Verwendung der *clickECM* im Vergleich zur *clickGel* als Einzelkomponente noch weiter erhöht, ist davon auszugehen, dass auch die bioaktiven Eigenschaften noch deutlich stärker ausgeprägt sein werden. Auch der Einsatz von gewebespezifischer *clickECM* wäre hier interessant, um bspw. die dreidimensionalen Stammzellnischen des Körpers zu imitieren und pluri- oder multipotente Stammzellen darin im undifferenzierten Stadium zu vermehren und am Leben zu erhalten. Gelänge es überdies, die Azidkonzentration in der *clickECM* zu analysieren, wäre ein weiterer spannender Ansatz, nur einen Teil der Azide mit dem Alkin-funktionalen Linker umzusetzen und die verbleibenden Azide mit den oben genannten Alkin-modifizierten Funktionalitäten auszurüsten.

In Anbetracht aller in diesem Dissertationsvorhaben gewonnener Erkenntnisse kann abschließend festgestellt werden, dass die aus *In-vitro*-Fibroblastenkulturen gewonnene und über das MGE mit Aziden modifizierte *clickECM* ein äußerst interessantes Biomaterial für den direkten Kontakt mit Zellen darstellt. Aufgrund der hochkomplexen Zusammensetzung sowie der Möglichkeit, die vorhandenen Azide in bioorthogonalen Konjugationsreaktionen mit einer Vielfalt an Alkin-funktionalen Molekülen und Funktionalitäten verknüpfen zu können, eröffnet sich grundsätzlich ein breites Spektrum für unterschiedlichste Anwendungen in der Regenerativen Medizin, dem *Tissue Engineering* oder der Zellkulturtechnik. Zum jetzigen Zeitpunkt lässt jedoch besonders die massive Limitierung hinsichtlich der generierbaren Mengen sowie die vergleichsweise hohen Kosten (knapp 2000 € pro Gramm *clickECM*-Trockenmasse) die Plausibilität des Einsatzes der *clickECM* als Biomaterial fraglich erscheinen. Ferner ergeben sich durch die Unlöslichkeit nicht triviale Herausforderungen hinsichtlich der Verarbeitung und Charakterisierung, sodass in der Fortführung dieser Arbeit auch kritisch untersucht werden muss, ob sich dieses anspruchsvolle Material verglichen mit bestehenden, kommerziell bereits vertriebenen ECM-Einzelmolekülen oder ECM-Mimikry durchsetzen kann und den vermehrten Arbeitsaufwand sowie die höheren Kosten rechtfertigt, oder ob bspw. die ebenfalls im Zuge dieser Arbeit entwickelte Azid-modifizierte Gelatine (*clickGel*) bereits in der Lage ist, die gewünschten biologischen Effekte in ein Material einzubringen.

7 Anhang

7.1 Anhang zu den verwendeten Materialien und Geräten

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen, Fluorophore, Puffer, Zellkulturmedien und -zusätze, Verbrauchsmaterialien, Enzyme, Glasware, Antikörper, Kits, Software, Geräte und Hilfsmittel sowie Angaben zu selbst angesetzten Puffern und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge gelistet.

Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC,)	TCl Deutschland GmbH, Eschborn, DE	D1601	> 98.0 %
2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS, C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄)	Sigma-Aldrich, München, DE	A3219-100ML	Substrat für die Meerrettichperoxidase
2,4,6- Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS, C ₆ H ₃ N ₃ O ₉ S)	Sigma-Aldrich, München, DE	P2297-10ML	ioReagent, 5 % (w/v) in H ₂ O, für die Bestimmung primärer Amine
3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 (TMSP)	Merck, Darmstadt, DE	269913-1G	98 Atom-% D
4-(Dimethylamino)-benzaldehyd (p-DMAB, C ₉ H ₁₁ NO)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	X867.1	≥ 98 %, p. a., ACS
4',6-Diamidino-2-phenylindol · 2 HCl (DAPI)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	18860.01	p. a., 1 mg/mL in PBS ⁻ , 1:1000 eingesetzt
Aceton (C ₃ H ₆ O)	Merck, Darmstadt, DE	100014	p. a. EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur
Alcianblau 8GX	Alfa Aesar, Karlsruhe, D	J60122	
Ammoniaklösung (NH ₄ OH)	Fluka Analytical, München, D	9870	~24 %
Anilinblau (C ₃₇ H ₂₇ N ₃ O ₉ S ₃ Na ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4002.2	p. a., wasserlöslich
Atto 594-Streptavidin	Sigma-Aldrich, München, DE	68606-1MG	
Biotin-Alkin	Lumiprobe, Hannover, DE	C37B0	
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, DE	A9647	Heat shock fraction, pH 7, ≥ 98 %

ANHANG

Brilliant Crocein R (C ₂₂ H ₁₄ N ₄ Na ₂ O ₇ S ₂)	Alfa Aesar, Karlsruhe, D	A14642	
Carboxyethylsilantriol (CES,)	abcr GmbH, Karlsruhe, DE	AB110934	25 % in H ₂ O
Chloramin T Trihydrat (CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂ NCINa · 3 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	0271.1	≥ 98 %, p. a.
Citronensäure Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, D	5110.3	≥ 99,5 %, Ph. Eur.
Coomassie Färbelösung für die SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	24615	<i>Imperial™ Protein Stain</i>
Coomassie-Brilliant-Blau G 250	Carl Roth, Karlsruhe, D	9598.1	
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, DE	1133660010	<i>deuteration degree min. 99,9 % for NMR spectroscopy MagniSolv™</i>
Dibenzocyclooctin- Polyethylenglykol-Amin (DIBO- PEG-NH ₂)	Universität Konstanz, DE		Synthetisiert von der AG Valentin Wittmann
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, DE	D2438	sterilfiltriert, <i>BioPerformance-</i> zertifiziert
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, D	4984.1	≥ 99,5 %, p. a.
Direkt Rot 80	Alfa Aesar, Karlsruhe, D	B21693.14	
EDTA-Lösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	15040066	Versene
Eindeckmittel	VWR, Bruchsal, D	05547535.	Isomount 2000 Q Path®
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Carl Roth, Karlsruhe, D	3738.2	ROTIPURAN® 100 %, p. a.
Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Merck, Darmstadt, DE		Absolut und 96 % vergällt mit MEK
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, München, DE	E1644	BioUltra, 98,5 - 101,5 %
Flüssigstickstoff	Linde GmbH, Pullach, DE		
Gelatine Typ B	Gelita, Ebersbach, DE		(Rind, 232 g Bloom, Viskosität: 4,5 mPas, Batch: 635621
Glycin	Merck, Darmstadt, D	104169	Puffersubstanz für die Elektrophorese
<i>Irgacure 2959</i> (1-[4-(2- hydroxyethoxy)phenyl]-2-	Bodo Möller Chemie GmbH,		Der radikalische Photoinitiator wurde freundlicherweise

hydroxy-2-methyl-1-propan-1-one)	Offenbach am Main, DE		kostenlos zur Verfügung gestellt.
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE	1096341000	EMSURE® ACS, ISO, Reagent Ph. Eur. p. a.
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	6781.3	≥ 99,5 %, p. a., ACS, ISO
Kollagen Typ I-Lösung (Rattenschwanz)	Fraunhofer IGB, Stuttgart, DE	-	6 mg/mL
Kupfersulfat Pentahydrat			
Kupfersulfat Pentahydrat (CuSO ₄ · 5 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, DE	C8027-500G	BioReagent, <i>suitable for cell culture</i> , ≥ 98 %
L-4-Hydroxyprolin (C ₅ H ₉ NO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, D	3893.1	≥ 99 %, für die Biochemie
L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat (C ₃ H ₈ ClNO ₂ S · H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe	1694.2	CELLPURE® ≥ 99 %
Methanol (CH ₃ OH)	Honeywell, Morristown, NJ USA	34860	CHROMASOLV™, für HPLC, ≥ 99,9 %
N-Acetylgalactosamin (GalNAc, C ₈ H ₁₅ NO ₆)	Sigma-Aldrich, München, DE	A2795	~ 98 %
Na-L-Ascorbat (C ₆ H ₇ NaO ₆)	Alfa Aesar, Karlsruhe, D	A17759	99 %
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Th. Geyer, Renningen, DE	8694	Wasserfrei, > 99,0 %
Natriumacetat (NaCH ₃ COO)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	6773.1	≥ 99 %, p. a., ACS, wasserfrei
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9265.2	≥ 99,8 %, mit Antitackmittel
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE	106346	
Natriumdodecylsulfat (SDS, H ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na)	Sigma-Aldrich, München, DE	L3771-25G	BioReagent, <i>suitable for electrophoresis, for molecular biology</i> , ≥ 98,5 % (GC)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	0965.3	≥ 99 %
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, DE	106482	Plättchen
N-Azidoacetylgalactosamin, tetraacetyliert (Ac ₄ GalNAz, C ₁₆ H ₂₂ N ₄ O ₁)	Jena Bioscience, Jena, DE	CLK-1086	
Paraffin	Merck, Darmstadt, DE	107164	Pastillenform, für Histologie
Perchlorsäure (HClO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9216.1	ROTIPURAN® 70 %, p. a.
Phosphatgepufferte Formaldehydlösung	Carl Roth, Karlsruhe, DE	P087.5	Roti®-Histofix 4 %, säurefreie (pH 7)
Phosphatgepufferte Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, München, DE	P4417	Tabletten

ANHANG

Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)			
Phosphorwolframsäure (H ₃ [P(W ₃ O ₁₀) ₄] · x H ₂ O)	Sigma-Aldrich, München, DE	79690-100G	Für die Mikroskopie
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, München, DE	36011-1L-R	0,9 - 1,1 % (<i>alkalimetric</i>)
Polyethylenglykol-Diacrylat			Mittleres MW: 700 g/mol
Protease-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	78430	Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)
Reinigungslösung für das Zellzählgerät	OLS OMNI Life Science, Bremen	5651787	CASYclean
Safran du Gâtinais			
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4625.1	ROTIPURAN® 37 % rauchend, p. a., ACS, ISO
Saponin	Sigma-Aldrich, München, DE	47036	<i>for molecular biology, used as non-ionic surfactant</i>
Säurefuchsin (C ₂ OH ₁₇ N ₃ Na ₂ O ₉ S ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	T128.1	Für die Mikroskopie
Streptavidin- Meerrettichperoxidase	abcam, Cambridge, UK	ab7403	Streptavidin (HRP)
tri-Natriumcitrat Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	4088.3	≥ 99 %, Ph. Eur.
TRIS	Sigma-Aldrich, München, DE	T6066	Trizma® Base
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, München, DE	T3253	Trizma® Hydrochlorid
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, München, DE	T9284- 500ML	
Tween®-20	Sigma-Aldrich, München, DE	P1379	
Vorgefärbter Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	26619	PageRuler™ Plus <i>Prestained Protein Ladder</i> , 10 - 250 kDa
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9681.1	30 %, Ph. Eur., stabilisiert
Wässriges Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	TA-030-FM	Lab Vision™ PermaFluor™
Xylol (C ₈ H ₁₀)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	9713.3	> 98 %, rein, für die Histologie
Xylol-Ersatzmedium (ROTICLEAR®)	Carl Roth, Karlsruhe, DE	A538.5	

Verwendete Fluorophore

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München, DE	D8417	
Alexa Fluor® 488-Alkin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	A10267	
Alexa Fluor®546 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	A22283	
Fluorescamin	Sigma-Aldrich, München, DE	F9015-100MG	≥ 98%

Verwendete Puffer

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
((2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, München, DE	M3671-250G	≥99%
Isotonischer Messpuffer für die Zellzählung	OLS OMNI Life Science, Bremen	5651808	CASYton
Isotonischer Messpuffer für die Zellzählung	Beckman Coulter, Brea, CA USA	8448011	Isoton II
Laufpuffer für die SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	LC2675	Novex™ Tris-Glycine SDS Laufpuffer (10X)
Phosphatgepufferte Saline mit MgCl ₂ und CaCl ₂ (PBS ⁺)	Sigma-Aldrich, München, DE	D8662	steril
Phosphatgepufferte Saline ohne MgCl ₂ und CaCl ₂ (PBS ⁻)	Sigma-Aldrich, München, DE	D8537	steril
Probenpuffer für die SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	LC2676	Novex™ Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2X)

Verwendete Zellkulturmedien und –zusätze

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Biochrom, Berlin, DE	FG0435	ohne Na-Pyruvat, mit 3,7 g/L NaHCO ₃ , mit 4,5 g/L D-Glukose, ohne L-Glutamin
Fetales Kälbersrum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	10270-106	
Gentamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	15710-049	(10 mg/mL)
Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	15070063	(5.000 U/mL)

Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
12-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	665180	PS, transparent, Cellstar®
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	662160	PS, transparent, Cellstar®
5-Well-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	267061	PS, transparent
96-Well-Microtiterplatte, schwarz	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	655900	F-Boden (Kaminform), schwarz, <i>non-binding</i>
96-Well-Microtiterplatte, transparent	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	655180	Cellstar® F-Boden (Kaminform)
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	126261	2 ml-Röhrchen mit Rundboden und Schraubverschluss mit Außengewinde
Einbettkassetten	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt am Main, DE		
Einmalkanüle	B. Braun, Melsungen, DE	4657624	Sterican® Gr. 12, G 22 x 1 1/4" / ø 0,70 mm x 30 mm, schwarz
Einweg Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	606 180	Cellstar®, 5 mL
Einweg Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	607 180	Cellstar®, 10 mL
Einweg Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	760 180	Cellstar®, 25 mL
Einweg Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	768 180	Cellstar®, 50 mL
Einwegspritze	B. Braun, Melsungen, DE	4606205V	Injekt® 20 mL, Luer-Ansatz, exzentrisch

Filterpapier	Macherey-Nagel, Düren, DE		MN 616, Ø 110 mm, Rundfilter
Filterpapiere für Einbettkassetten			
Gradientengele	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	XP08160BOX	Novex™ 8-16% Tris-Glycine Mini Gels, WedgeWell™ Format, 10- well
Kapillarpistone für die Direktverdrängerpipette	Gilson, Middleton, WI, USA	F148314	CP100
Klebefilm	Tesa		Tesafilm
Laborfilm	Bemis, Neenah, WI USA	PM-996	Parafilm M, <i>self sealing laboratory film</i> , 4 in. x 125 ft. roll
Lange Pasteurpipetten aus Glas	VWR, Bruchsal, DE	612-1702	
Lysis Tubes	Analytik Jena, Jena, DE	845-CS- 1010100	innuSPEED Lysis Tube A, Keramikkugeln, 1,4- 1,6 mm Durchmesser, γ -sterilisiert
Messgefäße für die Zellzählung	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE	5651794	CASYcups
Mikroskopie 8-Well-Platte mit Deckglasboden	ibidi, Martinsried, DE	80826	ibidi- μ -slide, ibidiTreat: <i>tissue culture treated, sterilized</i>
Mikroskopieschälchen mit Deckglasboden	ibidi, Martinsried, DE	81156	ibidi- μ --Dish 35 mm, <i>high</i> , ibiTreat: Ø 35 mm, <i>high wall</i> (2 mL Volumen), <i>tissue culture treated, sterilized</i>
Mischbettionenaustauscherh arz	Merck, Darmstadt, DE	115965	Amberlite® IRN150
Multistepper-Spitzen	Eppendorf, Hamburg, DE	30089456	Combitips advanced®, 5,0 mL
Multistepper-Spitzen	Eppendorf, Hamburg, DE	30089464	Combitips advanced®, 10,0 mL
Nitrilhandschuhe, silber	Kimberly-Clark, Dallas, TX USA	99211, 791217, 90626, 701217	Kimtech, Strling Nitrile
Nitrilhandschuhe lila	medProfi, Augsburg, DE		
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 073.380	epT.I.P.S. <i>Reloads</i> , sterilisiert, Volumen 0,1-20 μ L
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	741065	EasyLoad™ 200 μ L <i>Refill System</i>
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	741035	EasyLoad™ 1000 μ L <i>Refill System</i>
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	741035	EasyLoad™ 0,1 – 5 mL <i>Refill System</i>

ANHANG

Pistone für die Direktverdrängerpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	F148414G	Gilson™ MICROMAN™ Capillary Pistons, CP100, 10 bis 100 µL
Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	639102	PS, mit Nocken Ø 145 mm
Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	627102	PS mit Nocken Ø 35 cm
Petrischale	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	633180	PS, mit Nocken Ø 94 mm
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Dallas, TX USA	7552	KimWipes
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 121.023	0,5 mL Röhrchen, sterilisiert, Safe-Lock
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 120.086	1,5 mL Röhrchen, sterilisiert, Safe-Lock
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE	0030 120.094	2,0 mL Röhrchen, sterilisiert, Safe-Lock
Siliciumwafer	Si-Mat Silicon Materials, Kaufering, DE		Ø 12,5 cm, poliert, Dicke: 625 ± 25 µm
Silikonmatte	ExactPlastics GmbH, Bröckel, D		Standardausführung rot, Dicke: 0,5 mm
Silikonschlauch	Schlauchprofi, Hude, DE	1000393-R25	FDA & BfR konform - Lebensmittel, naturfarben
Skalpelle	B. Braun, Melsungen, DE		B. Braun Cutfix
Spritzenvorsatzfilter	VWR, Bruchsal, DE	514-0068	PTFE-Membran, 0,2 µm, 13 mm Durchmesser
Sterilfilter Flaschenaufsatz Vakuumfilter	TPP, Trasadingen, CH	99255	„rapid“-Filtermax, 250 mL, PES 0,22 µm
Sterilfilter Spritzenvorsatzfilter	Th. Geyer, Renningen, DE	7699822	25 mm, Celluloseacetat, Acryl, 0,22 µm
Ultrazentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	45237	Thermo Scientific TUBE PC THICKWALL 1ML
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	658170	Cellstar®, 250 mL, 75 cm ²
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	660160	Cellstar®, 550 mL, 175 cm ²
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	633171	Cellstar®, 94/16 mm, Nocken
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	639160	Cellstar®, 145/20 mm, Nocken
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH	99002	S, Länge 24 cm
Zellsieb	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	542000	EASYstrainer™, 100 µm
Zentrifugenfilter	Merck, Darmstadt, DE	UFC501096	Amicon® Ultra-0.5, 10 kDa, γ-sterilisiert

Zentrifugenfilter	Merck, Darmstadt, DE	UFC901024	Amicon® Ultra-15, 10 kDa, γ -sterilisiert
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	188261	Cellstar®15 mL, 30/115 mm, Konischer Boden
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE	227261	Cellstar®50 mL, 30/115 mm, Konischer Boden

Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
Dispase II	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	11510536	Rnase-frei, aus der bovinen Pancreas, 10 U/ μ L
Kollagenase	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE	17454.01	NB4, 500U/mL
Papain	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO USA	P3125	Papain from papaya latex, buffered aqueous suspension, 2 \times Crystallized, \geq 16 units/mg protein
Pepsin	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO USA	P7012	Pepsin from porcine gastric mucosa, lyophilized powder, \geq 2,500 units/mg protein
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	15400054	0,5 % EDTA, ohne Phenolrot

Verwendete Glasware

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
Bechergläser			
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, DE	LH23.1	Borosilikatglas der 1. hydrolytischen Klasse, Stärke 1.5H rund, \varnothing : 18 mm
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, DE	H878.2	Stärke 1, 24 x 60 mm
Färbeküvetten	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt am Main, DE		
Färberahmen	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt am Main, DE		
Gewindeflasche für die Ultraschall-Behandlung	Lab Logistics Group, Meckenheim, DE	6280953	8 mL
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE		5 mL, 10 mL, 25 mL

Kristallisationsschale			
Menzel Objektträger	Häberle Labortechnik GmbH, Lonsee- Ettlenschieß, DE	9.161 110	Mit und ohne Mattrand
Pasteurpipetten			hitzesterilisiert
Quartzplatte	GVB GmbH, Herzogenrath, D		100 mm x 100 mm x 2 mm
Rollrandflaschen aus Glas für die Gefriertrocknung	Macherey-Nagel, Düren, DE	70251	N8-0,8mL, klar, flacher Boden
Schott-Duran Flaschen	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/ Main DE		1000 mL, 500 mL, 100 mL
V Vial™ Wheaton-33™ Borosilikatglas	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	11506305	mit Schraubkappe mit festem Oberteil, durchsichtig

Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
anti-Fibronektin- Primärantikörper	abcam, Cambridge, UK	ab2413	Aus dem Hase, Konzentration unbekannt
anti-Hase-Alexa Fluor® Plus 647-Sekundärantikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	A32733	Aus der Ziege, 2,0 mg/mL
anti-Kollagen Typ III- Primärantikörper	abcam, Cambridge, UK	HPA007583	Aus dem Hase, 0,1 mg/mL
anti-Kollagen Typ I- Primärantikörper	abcam, Cambridge, UK	ab6308	Aus der Maus, 5,9 mg/mL
anti-Kollagen Typ IV- Primärantikörper	abcam, Cambridge, UK	Ab82281	Aus der Maus, 0,2 mg/mL
anti-Laminin- Primärantikörper	abcam, Cambridge, UK	PA1-16730	Aus dem Hase, 1,0 mg/mL
anti-Maus-Alexa Fluor® Plus 488-Sekundärantikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	A32723	Aus der Ziege, 2,0 mg/mL

Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnr.	Zusatzdetails
BCA-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	23225, SG255492	Pierce™ BCA Protein Assay Kit
<i>Blyscan-Assay</i>	Biocolor, Carrickfergu, UK	B1000, AA700	<i>Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay</i>
Bradford-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	23236	<i>Pierce™ Coomassie Plus™ (Bradford) Protein-Assay</i>
<i>Click-iT® Cell Reaction Buffer Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	C10269, 1897677	
Färbekit: Alcianblau-PAS	MORPHISTO GmbH, Frankfurt am Main, DE	1341600250	
Färbekit: LADEWIG-Färbung	MORPHISTO GmbH, Frankfurt am Main, DE	12086.00100	
MTS-Zytotoxizitäts-Assay	Promega GmbH, Walldorf, DE	G3582	<i>CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS, NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)			
<i>Sircol-Assay</i>	Biocolor, Carrickfergu, UK	S1000, AA788	<i>Sircol™ Soluble Collagen Assay</i>

Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller	Version
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, WA USA	2016
<i>ImageJ</i>	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA	Java 1.8.0_251 (32 bit)
Origin	OriginLab® Corporation, Northampton, MA USA	2019b 32 bit
ZEN <i>black</i> Edition	Carl-Zeiss GmbH, Göttingen, DE	
ZEN <i>blue</i> Edition	Carl-Zeiss GmbH, Göttingen, DE	

Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller	Zusatzdetails
Absaugvorrichtung	ibs tecnomara GmbH, Fernwald, DE	<i>Vacuboy</i>
Abzug	Waldner, Wangen, DE	
Alufolie		
Autoklav	ibs tecnomara GmbH, Fernwald, DE	Fedegari Autoclav SPA
Blockformen	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt am Main, DE	
Cryotank	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/Sieg, DE	Biosafe® MD
Dewargefäß in Schalenform	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schieder GmbH, Karlsruhe, DE	
Direktverdränger-Pipette	Gilson, Middleton, WI USA	Microman™, M100, 10 bis 100 µL
Einbettautomat	Thermo Shandon GmbH, Frankfurt am Main, DE	Citadell 1000
Elementaranalysator	Elementar Analysesysteme GmbH, Langenselbold, DE	Vario El Cube
Feinwaage	Mettler Toledo, Columbus, OH USA	XS 205, <i>DualRange</i>
Fluoreszenz-Imager	Fujifilm, Minato, JP	<i>Fluorescent Image Analyzer, FLA5100</i>
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, DE	
Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	<i>Mr. Frosty™</i> , Nalgene, 500 mL
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, CH	<i>Liebherr profi line</i> , -20 °C
Gefriertrocknungs-Anlage	Christ, Osterode, DE	ALPHA 2-4 LD plus
Gehörschutz		
Gelpermeations-Chromatographie-System	Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn, DE	1260 Infinity GPC-SEC

Glasschneider		
Gussform für Hydrogele	Gefertigt von der Werkstatt des IGVP der Universität Stuttgart, DE	Aus Aluminium
Heißluftföhn	Steinel America Inc., Bloomington, MN USA	HG 2310 LCD
Hitzeschutzhandschuhe		
Infrarotspektrometer	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, DE	Bruker Vertex70-Spektrometer
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	BBD 6220, CO2 Inkubator
Kälteschutzhandschuhe		
Kernspinresonanzspektrometer	Bruker Optik GmbH, Ettlingen, DE	Bruker Avance 500-Spektrometer
Kohlendioxid-Laserschneider		
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, DE	Research® plus, 0,1 – 2,5 µL Research® plus 0,5 – 10 µL Research® plus, 2 – 20 µL Research® plus, 10 – 100 µL Research® plus, 20 – 200 µL Research® plus, 100 – 1.000 µL Research® plus, 0,5 – 5 mL
Kugelmühlen-Homogenisator	Analytik Jena, Jena, DE	<i>SpeedMill</i> PLUS
Kühlplatte	Bavimed Laborgeräte GmbH, Birkenau, DE	Modell 2048
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, CH	Liebherr <i>profi line</i> , 4 °C
Kunststoffbechergläser	VITLAB GmbH, Grossostheim, DE	200 mL, 500 mL
Kunststoffküvette		
Kunststoff-Messzylinder		BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Kunststoffpinzetten		
Labormantel		
Laminare Durchflusszelle	Gefertigt von der Werkstatt des IGVP der Universität Stuttgart, DE	Aus Aluminium und Polycarbonat
Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss, Göttingen, DE	LSM 710
Lichtmikroskop	Nikon, Düsseldorf, DE	Mit Phasenkontrast und Kamera, TMS, Nikon 0,2 A <i>Eclipse</i> TS100 Kamera: <i>Digital Sight</i> DS-2mv

ANHANG

Magnetrührer	IKA, Staufen, DE	RCT Standard Safety Control mit Temperaturfühler
Metallpinzetten	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, DE	Bochem® 18/10, 18/18
Mikroplatten-Reader	Tecan Group AG, Männedorf, CH	Infinite M200Pro
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	HM340E
Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, DE	<i>Microcentrifuge 5415 with fixed-angle Rotor F-45-24-11, for 24x1.5/2 mL tubes, with polypropylene snap-on lid</i>
Milli-Q-Anlage	Merck, Darmstadt, DE	Milli-Q® Reference
Multistepper-Pipette	Eppendorf, Hamburg, DE	Multipette® M4
Orbitalschüttler	Heidolph, Schwabach, DE	Polymax 1040, 10° Neigungswinkel
Paraffintopf	MEDAX GmbH & Co. KG, Langwedel, DE	Typ 47311
Partikelzählgerät	Beckman Coulter, Brea, CA USA	Multisizer 3
Perestaltikpumpe	Ismatec GmbH, Wertheim, DE	MCP-Standard
pH-Meter	Mettler Toledo, Columbus, OH USA	<i>SevenEasy™</i> pH
Pinself		
Pipettierhilfe	IBS, Hudson, NY USA	<i>Pipetboy acu</i>
Polarisationsmikroskop	Leica, Wetzlar, DE	Leitz DM RXP
Rasterelektronenmikroskop	Hitachi High-Tech Europe GmbH, Krefeld, DE	HITACHI SU8030, Lower/ Upper/ Top (Triple) Elektronendetektoren, <i>Large chamber/ large stage model</i> , Bruker EDX Detektor: Bruker QUANTAX 6G
Reagenzglasalterklammer		Holz
Rheometer	Anton Paar, Graz, AT	Physics MCR301
Schutzbrille		
SDS-PAGE Kammer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	<i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>
Spatel		
Sputtergerät	Oerlikon Balzers Coating Germany GmbH, Bingen, DE	SCD 050, Pt Target, Betriebsgas Argon, 0,05 mbar, 50 Sekunden, 65 mm Abstand zum Target, 40 mA/ 470V, bei 17 °C
Stativmaterial und Klemmen		Aus Metall

Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	<i>Herasafe™</i> KS (NSF) biologische Sicherheitswerkbänk der Klasse II (Typ A2)
Streckbad	MEDAX GmbH & Co. KG, Langwedel, DE	Typ 27601
Tauchsieder	Julabo GmbH, Seelbach, DE	ED Einhängethermostat v.2
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, DE	<i>Thermomixer comfort</i> , mit Heizblock für 24x 2 mL Röhrchen
Ultraschall-Prozessor	Hielscher, Teltow, DE	UP 200 S, 200 Watt, 24 kHz
Ultraschallsonde	Hielscher, Teltow, DE	Sonotrode S3, Titan, Durchmesser 3 mm, Länge 100 mm
Ultrazentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	Sorvall MTX 150
UV-Schrank	Hartmann Feinwerkbau, Ober-Mörlen, DE	UV-H 255
Vakuum-Pumpe	VWR, Radnor, PA USA	Mini-Membran-Vakuumpumpe, VP 86
Vakuumtrockenschrank	Heraeus, Hanau, DE	Vacuotherm VT6025
Vortex-Mischer	VWR, Radnor, PA USA	<i>lab dancer</i>
Wärmeplatte	MEDAX GmbH & Co. KG, Langwedel, DE	Typ 13501
Wärmeschrank mit Umluft	Binder GmbH, DE	Serie FD 115
Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach, DE	Makrolon-Badgefäß 5M
Zellzählgerät	Schärfe System GmbH, Reutlingen, DE	CASY®-1 TTC
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA	Heraeus Multifuge 3 S-R, Kühlzentrifuge mit <i>Swing-out</i> Rotor, 4 place rotor, 75006445

Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

- Ac₄GalNAz-Stammlösung: 400 mM/DMSO, Lagerung bei -20 °C
- Ac₄GalNAz-Gebrauchslösung: 2 mM/PBS⁻ (sterilfiltriert), Lagerung bei 4 °C
- GalNAc-Stammlösung: 400 mM/DMSO, Lagerung bei -20 °C
- GalNAc-Gebrauchslösung: 2 mM/PBS⁻ (sterilfiltriert), Lagerung bei 4 °C
- Na-L-Ascorbat-Gebrauchslösung (für die Zellkultur): 50 mg/mL in PBS⁻ (sterilfiltriert), Lagerung bei 4 °C
- Na-L-Ascorbat-Gebrauchslösung (für die *Click*-Reaktion): 0,1 M in Reinstwasser, frisch ansetzen
- Lyselösung: 360 mM/ Reinstwasser (sterilfiltriert), Lagerung bei RT (max. 6 Wochen)
- PBS-T: 0,05 %(v/v) Tween[®]-20 in PBS⁻ (sterilfiltriert), Lagerung bei RT
- BSA-Lösung: 3 %(w/v) in PBS⁻
- Towbin-Transferpuffer-Stammlösung: 1,92 M Glycin, 0,25 M TRIS-HCl, pH 8.3; Lagerung bei RT
- Towbin-Transferpuffer-Gebrauchslösung: 10 %(v/v) Stammlösung, 20 %(v/v) Methanol, 70 %(v/v) Reinstwasser
- Saponin-Lösung: 0,2 %(w/v) in PBS⁻, jeweils frisch ansetzen
- Bradford-Reagenz-Stammlösung: 0,05 %(w/v) Coomassie-Brilliant-Blau, 23,5 %(v/v) Methanol, 50 %(v/v) 85 %ige Phosphorsäure, 26,5 %(v/v) Reinstwasser
- Bradford-Reagenz-Stammlösung: 20 %(v/v) Stammlösung, 80 %(v/v) Reinstwasser
- 0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer-Stammlösungen:
 - 0,2 M Na₂HPO₄: 3,56 g in 100 mL; Lagerung bei 4 °C
 - 0,2 M NaH₂PO₄: 2,76 g in 100 mL; Lagerung bei 4 °C
- 0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer-Gebrauchslösung: Zugabe von 0,2 M NaH₂PO₄ zu 0,2 M Na₂HPO₄ bis ein pH-Wert von 6,4 erreicht wird
- Papain-Extraktions-Reagenz: 8 g/L Natrium-Acetat, 4 g/L EDTA, 0,8 g/L Cystein-HCl, 0,1 g/L Papain in Natrium-Phosphat-Puffer
- *Irgacure 2959*: 7 mg/mL in Reinstwasser (Lösen durch Erhitzen), jeweils frisch ansetzen
- Kupfersulfat-Lösung: 0,01 M/Reinstwasser
- N-Propargylacrylamid-Stammlösung: 0,03 M/Reinstwasser, Lagerung bei -20 °C

7.2 Anhang zur Aufarbeitung der (*click*)ECM

7.2.1 Homogenisierung isolierter (*click*)ECM

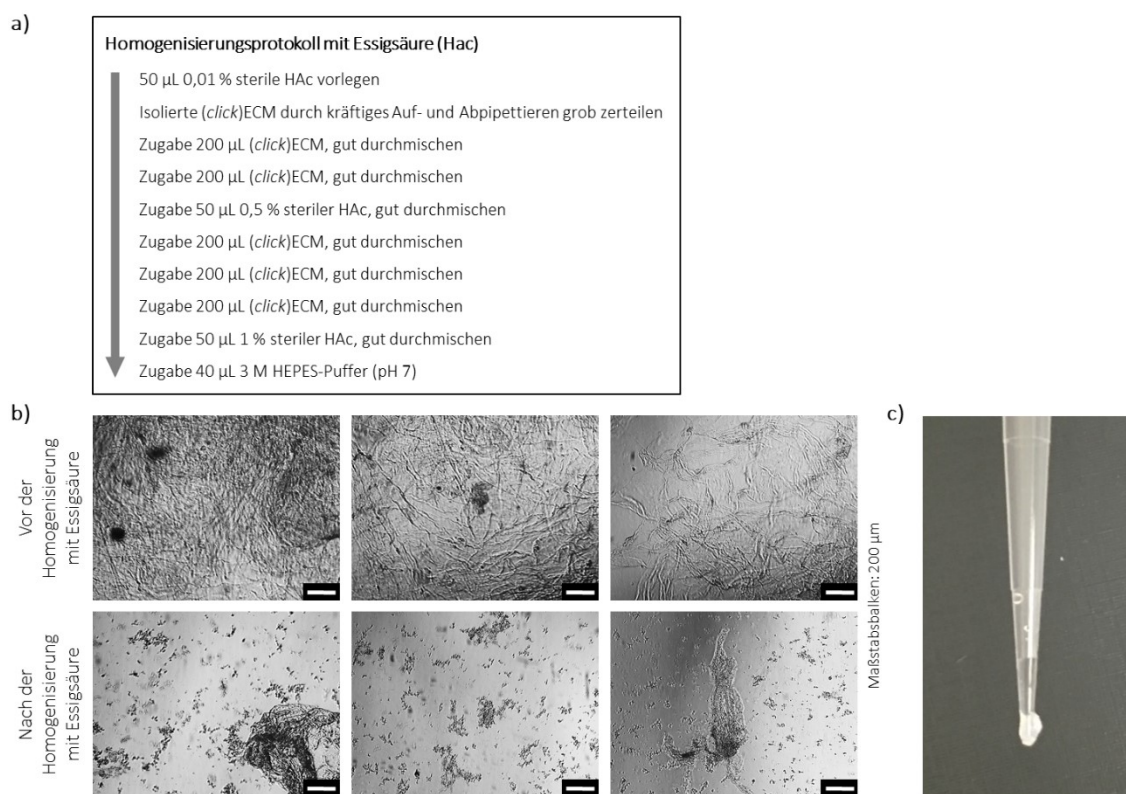


Abbildung A1: Homogenisierung mit Essigsäure (HAc). **a)** Protokoll von Ruff *et al.* [114, 122] zur Homogenisierung von (*click*)ECM durch die sukzessive Zugabe von HAc. **b)** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der (*click*)ECM vor der Homogenisierung (obere Bildreihe) und nach der Homogenisierung mit HAc (untere Bildreihe). Vor der Homogenisierung liegt die (*click*)ECM als stark quervernetztes Biomolekülnetzwerk vor. Nach der Homogenisierung liegt die (*click*)ECM in unterschiedlich großen Fragmenten vor. **c)** Foto einer durch ein verbleibendes größeres (*click*)ECM-Fragment verstopfen Pipettenspitzen. Solche Fragmente konnten nicht mehr aus der Spitze entfernt werden und mussten zusammen mit der Spitze verworfen werden.

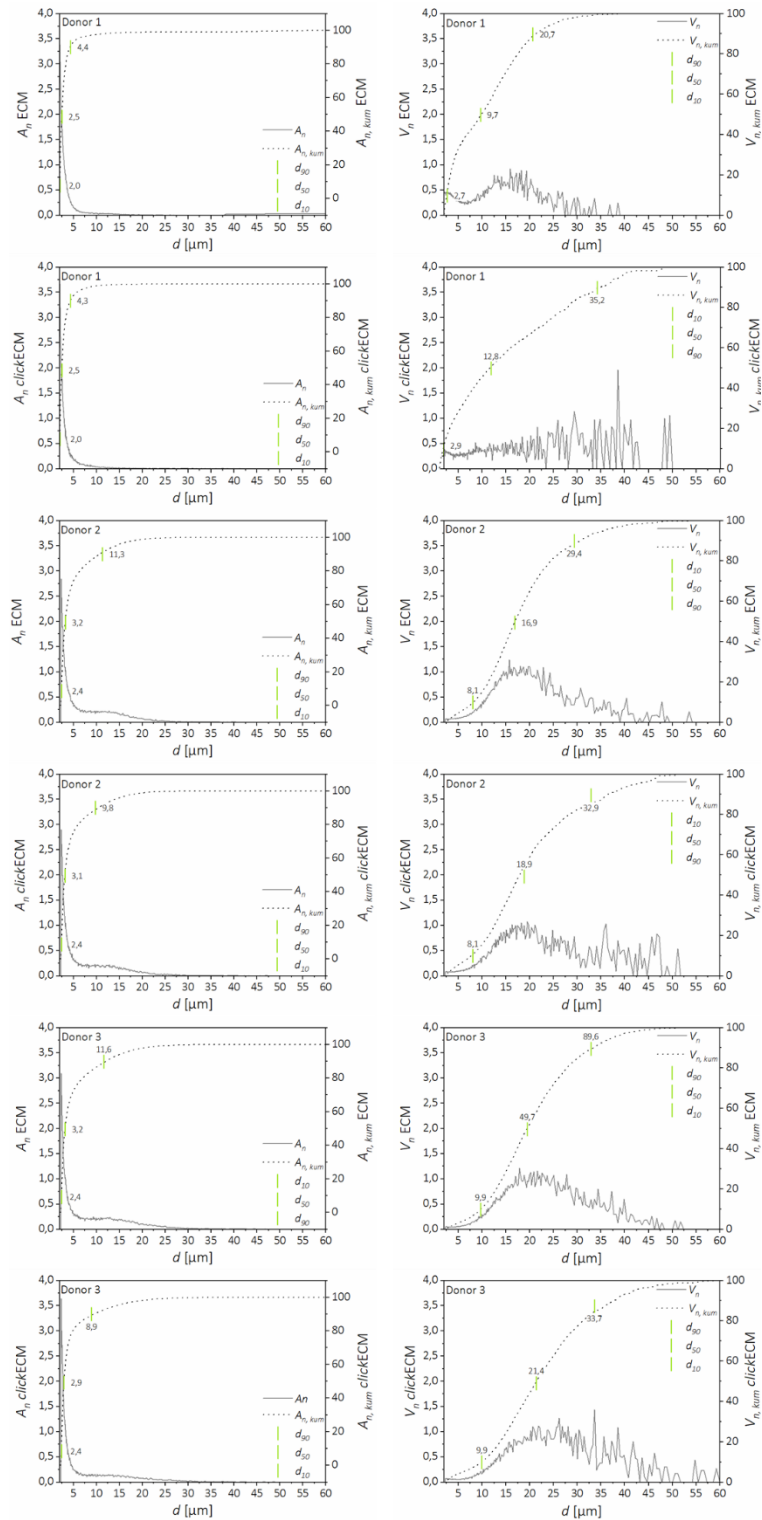


Abbildung A2: Häufigkeits- (A_n und $A_{n,kum}$) und Volumenverteilungen (V_n und $V_{n,kum}$) der (*click*)ECM-Fragmente nach 4-minütiger mechanischer Homogenisierung durch den verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander homogenisierten (*click*)ECMs der drei individuellen Donoren. Die d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Werte sind in Grün markiert und mit den entsprechenden Durchmessern beschriftet. Der d_{10} -Wert gibt den Durchmesser an, unter dem sich 10 % der Verteilung befinden. Die d_{50} - und d_{90} -Werte sind analog definiert.

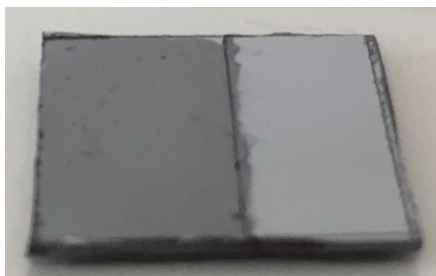


Abbildung A3. Foto eines auf der linken Seite mit *clickECM* beschichteten Si-Wafers (1 cm x 1 cm). Die aufgetrocknete *clickECM* ist als gleichmäßige, opake Schicht mit dem bloßen Auge erkennbar.

7.3 Anhang zur Quantifizierung der Azidkonzentration in der *clickECM*

Für die Umrechnung der Fluoreszenzintensitätsunterschiede in die Azidkonzentration der *clickECM* wäre es notwendig, die Messwerte des *clickECM*-Überstands zunächst mit den Messwerten des Blindwerts (der Katalysatorlösung mit der der Alkin-Fluorophor verdünnt wurde) und denen der unmodifizierten ECM zu korrigieren. Die daraus resultierende Fluoreszenzintensität müsste anschließend von der Fluoreszenzintensität der für die Fluoreszenzfärbung verwendeten Färbelösung abgezogen werden, um die Konzentration an ausgetragenen Fluorophor zu berechnen, die gleichzeitig der Azidkonzentration in der *clickECM* entspricht.

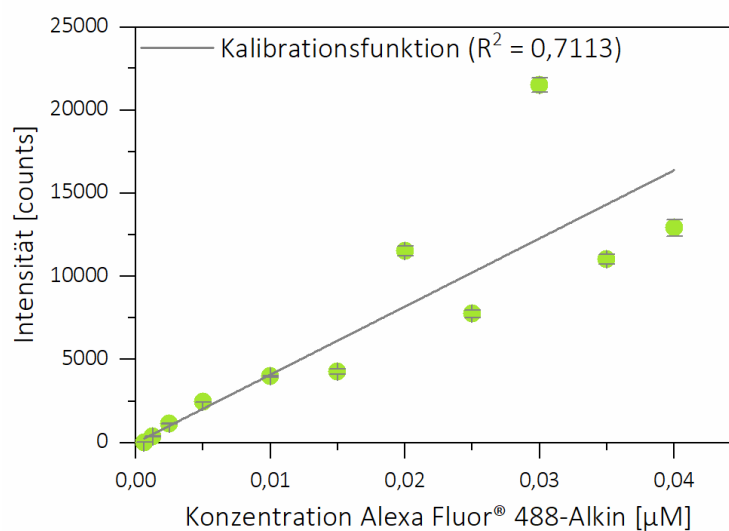


Abbildung A4: Kalibrationsfunktion zur Bestimmung der Azidkonzentration innerhalb der *clickECM*. Aufgrund der Tatsache, dass die einzelnen Fluorophorlösungen jeweils separat aus der Fluorophor-Stammlösung verdünnt werden musste, ergaben sich beim Transfer der kleinen Volumina sehr große Pipettierfehler, wodurch das Bestimmtheitsmaß der Kalibrationsgerade (R^2) 0,7113 betrug.

7.4 Anhang zur Untersuchung der biochemischen Zusammensetzung der *(click)ECM*

7.4.1 Qualitative Analyse der biochemischen *clickECM*-Zusammensetzung

Histologische Untersuchung der (click)ECM

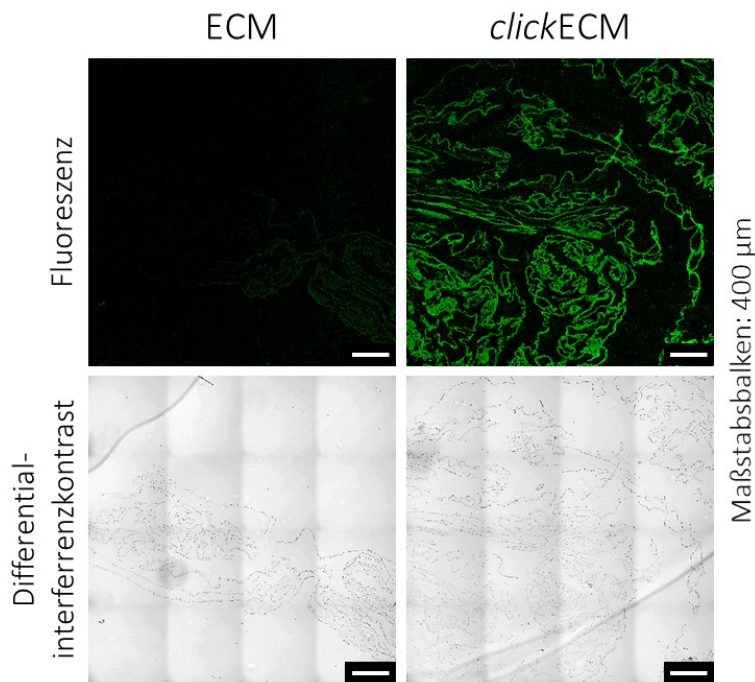


Abbildung A5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifizierung der *clickECM* mit dem Alkin-modifizierten Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin. Die Azidgruppen (in grün dargestellt), die durch das Metabolische Glykoengineering (MGE) in die *clickECM* eingebaut wurden, konnten mithilfe einer kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen den *clickECM*-Aziden und den Fluorophor-konjugierten Alkingruppen nachgewiesen werden. Differentialinterferenzkontrastmikroskopische Aufnahmen dienen der Orientierung in z-Richtung während der cLSM-Analyse und stellen die korrekte Einstellung der Fokusebene während der Bildaufnahme sicher. Die *(click)ECM*-Strukturen waren in den Aufnahmen in der unteren Bildreihe als filigrane Strukturen sichtbar. Die Azide waren - im Falle der *clickECM* - homogen über die gesamte ECM-Struktur verteilt, während für die unmodifizierte ECM kein Signal detektiert wurde. Maßstabsbalken: 400 µm.

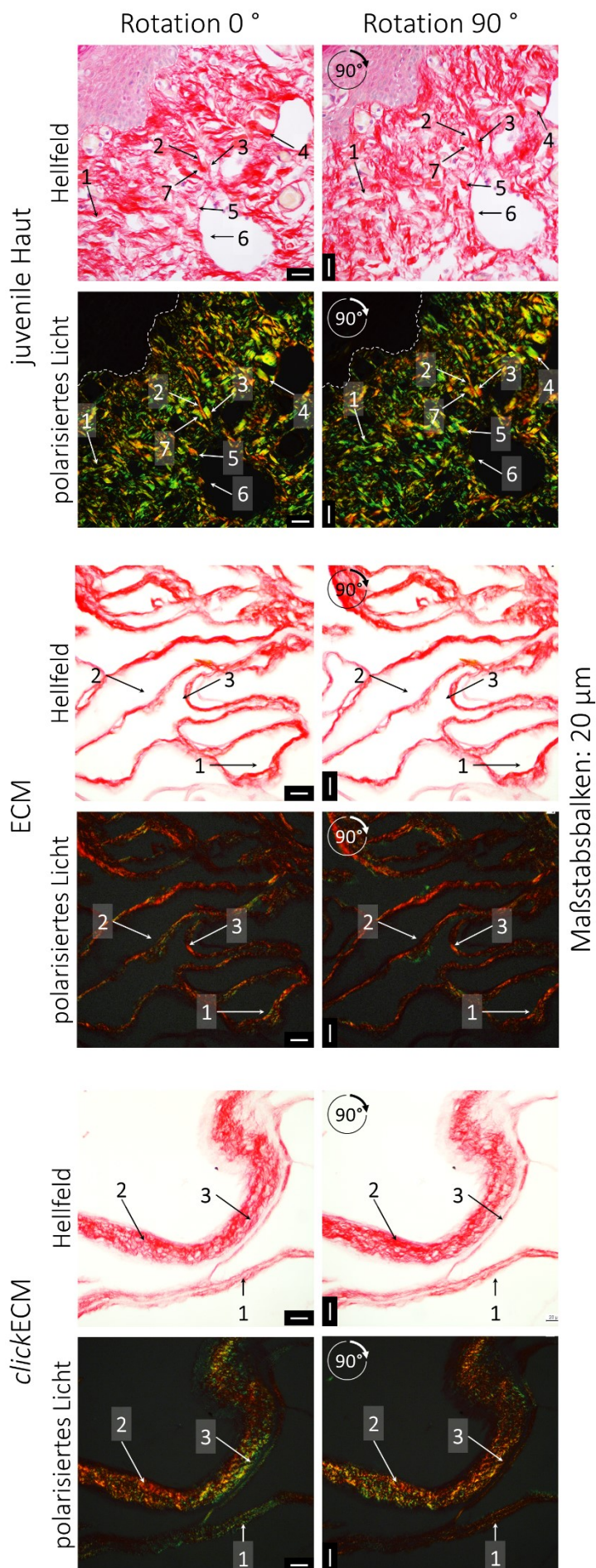


Abbildung A6: Licht- und polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Pikro-Siriusrot-Färbung von juveniler Haut, unmodifizierter ECM und Azid-modifizierter *click*ECM. Die Aufnahmen wurden jeweils vor und nach der Drehung des Mikroskoptisches um 90° aufgenommen. Die beobachtete Umkehrung der Farben von grünlich zu rötlich/ gelblich sowie umgekehrt sind mit weißen Pfeilen markiert. Histologische Dünnschnitte einer juvenilen Haut dienten als Kontrolle, um sicherzustellen, dass die detektierten Effekte nicht nur bei den filigranen (*click*)ECM-Strukturen, sondern auch bei dichten Strukturen wie der Haut auftraten. Maßstabsbalken: 20 µm.

7.4.2 Quantitative Analyse der biochemischen Zusammensetzung der (*click*)ECM

7.4.2.1 Quantifizierung des Gesamtproteingehalts innerhalb der (*click*)ECM

Für die Abschätzung des Gesamtproteingehalts wurden die spezifischen Aminosäuresequenzen (Polypeptidketten im reifen Protein nach der Prozessierung oder proteolytischen Spaltung) für die fünf ECM-spezifischen Proteine Kollagen Typ I, Typ III, Typ IV, Fibronectin und Laminin von der universellen Online-Proteindatenbank *UniProt* heruntergeladen [221, 222]. Die ausgewählten Einträge sind in **Tabelle A1** aufgelistet. Hydroxylierte Prolin- und Lysinreste wurden, wie in der Datenbank angegeben, berücksichtigt.

Tabelle A1: Auflistung der Namen, Bezeichnungen und Referenznummern der fünf ECM-spezifischen Proteine (einschließlich deren spezifischen Untereinheiten), die für die Umrechnung des Stickstoffgehalts in den Proteingehalt sowie für die Umrechnung des Hydroxyprolinegehalts in den Kollagengehalt von der universellen Online-Proteindatenbank *UniProt* [221, 222] bezogen wurden.

Protein		Bezeichnung	Referenznummer
Kollagen	Typ I	CO1A1_HUMAN	P02452
		CO1A2_HUMAN	P08123
	Typ III	CO3A1_HUMAN	P02461
	Typ IV	CO4A1_HUMAN	P02462
		CO4A2_HUMAN	P08572
		CO4A3_HUMAN	Q01955
		CO4A4_HUMAN	P53420
		CO4A5_HUMAN	P29400
CO4A6_HUMAN		Q14031	
Fibronectin		FINC_HUMAN	P02751
Laminin	Alpha-Untereinheit	LAMA1_HUMAN	P25391
		LAMA2_HUMAN	P24043
		LAMA3_HUMAN	Q16787
		LAMA4_HUMAN	Q16363
		LAMA5_HUMAN	O15230
	Beta-Untereinheit	LAMB1_HUMAN	P07942
		LAMB2_HUMAN	P55268
		LAMB3_HUMAN	Q13751
	Gamma-Untereinheit	LAMC1_HUMAN	P11047
		LAMC2_HUMAN	Q13753
		LAMC3_HUMAN	Q9Y6N6

Der Gesamtstickstoffgehalt $\% N_{total}$ wurde mithilfe der **Formel A1** berechnet, wobei $\% N_{AA}$ dem Stickstoffgehalt des proteingebundenen Aminosäurerests entspricht, M_{AA} der molaren Masse des proteingebundenen Aminosäurerests und n_{AA} der Häufigkeit bzw. dem Molenbruch der Aminosäurereste im Protein.

$$\% N_{total} = \frac{\sum \% N_{AA} \cdot M_{AA} \cdot n_{AA}}{\sum M_{AA} \cdot n_{AA}}$$

Formel A1: Berechnung des Gesamtstickstoffgehalts aus den Aminosäurezusammensetzungen der universellen Online-Proteindatenbank *UniProt* [221, 222], bzw. den in der Literatur publizierten Aminosäurezusammensetzungen verschiedener Gewebe oder ECM-Einzelkomponenten.

Die spezifischen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren von dann wie folgt mithilfe der **Formel A2** berechnet:

$$\frac{1}{\% N_{total}}$$

Formel A2: Berechnung des Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktors aus dem reziproken Gesamtstickstoffgehalt $\% N_{total}$.

Tabelle A2: Zusammenstellung der verwendeten Einträge der universellen Online-Proteindatenbank UniProt [221, 222] sowie den konsultierten Literaturstellen zu verschiedenen Geweben und einzelnen ECM-spezifischen Biomolekülen verschiedener Spezies. Für die Berechnung der Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren sowie der Hydroxyprolin (HP)-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren. Die spezifischen Umrechnungsfaktoren wurden jeweils aus den Aminosäuresequenzen der reifen ECM-Proteine bzw. der Aminosäurezusammensetzung der in der Literatur veröffentlichten Studien an humaner Haut oder den ECM-Einzelkomponenten berechnet. Die gelb markierten Umrechnungsfaktoren wurden für die Umrechnung der Stickstoffgehalte in das Gesamtprotein verwendet. Die grün markierten Umrechnungsfaktoren wurden für die Umrechnung der ermittelten HP-Konzentrationen in Kollagengehalte verwendet (n/s = nicht weiter spezifiziert; - = nicht angegeben).

Gewebe oder ECM-Biomolekül	Spezies	Umrechnungsfaktor		Referenz	Kommentar und analytische Methode
		N-zu-Protein	HP-zu-Kollagen		
Gewebe	n/s		7,1	Etherington und Sims [229]	-
	Säugetier		7,1	Hofman <i>et al.</i> [176]	(Faktor übernommen von Piez und Gross [266]) Aminosäurenanalyse
Haut	Mensch	5,45	7,4	Bornstein und Piez [223]	Aminosäurenanalyse
		5,56	7,5	Miyahara <i>et al.</i> [224]	Aminosäurenanalyse
		7,1	Smith <i>et al.</i> [216]	(Faktor übernommen von Eastoe [267]) Harz-Chromatographie Rindsledergelatine	
	Schwein		10 – 7,1 (Mittelwert 8)	Edwards und O'Brien Jr. [172]	(Faktor übernommen von Eastoe [267]) Aminosäurenanalyse
Gelatine	Schwein Haut (Gelatine Typ A)	5,25	7,5	Claaßen <i>et al.</i> [225]	Aminosäurenanalyse
	Schwein Haut (Gelatine Typ B)	5,45	6,8	Sewald <i>et al.</i> [192]	Aminosäurenanalyse
COL I	Säugetier	-	7,4	Capella-Monsonis <i>et al.</i> [138]	n/s
	Mensch	5,25	9,6	UniProt [221, 222]	-
	Rind	5,34	8,2		
	Ratte Haut	-	7,6	Etherington und Sims [229]	(Faktor übernommen von Stoltz <i>et al.</i> [268]) Aminosäurenanalyse
	Rind Haut	5,46	7,0	Bailey und Sims [269]	Aminosäurenanalyse

- Fortsetzung nächste Seite -

Gewebe oder ECM- Biomolekül	Spezies	Umrechnungsfaktor		Referenz	Kommentar und Analytische Methode
		N-zu- Protein	HP-zu- Kollagen		
COL III	Mensch	5,31	5,1	UniProt [221, 222]	-
	Rind	5,16	0,0		
	Mensch juvenile Haut	5,48	5,6	Etherington und Sims [229]	(Faktor übernommen von Chung und Miller [230]) Aminosäurenanalyse
	Rind Haut	5,45	5,7	Bailey und Sims [269]	Aminosäurenanalyse
COL IV	Mensch (α 1(IV))	5,69	71,4	UniProt [221, 222]	-
	Rind (α 1(IV))	5,65	83,3		
	Rind (α 2(IV))	6,04	0,0		
	Rind (α 3(IV))	5,79	1000,0		
	Rind (α 4(IV))	5,65	0,0		
	Rind Linsen kapsel	-	6,0	Etherington und Sims [229]	(Faktor übernommen von Kefalides [270]) Aminosäurenanalyse
	Mensch Plazenta- Basalmembran	6,08	5,1	Glanville <i>et al.</i> [271]	Aminosäurenanalyse
Fibronektin	Mensch	5,88	0,0	UniProt [221, 222]	-
Laminin	Mensch (durchschnittlich)	5,66	0,0	UniProt [221, 222]	-

Tabelle A3: Statistische Untersuchung der mithilfe der unterschiedlichen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktor berechneten Proteingehalte der (*click*)ECM. Kollagen Typ I (COL I), Kollagen Typ III (COL III), Kollagen Typ IV (COL IV), Laminin (LN) und Fibronectin (FN) wurden anhand der Aminosäuresequenzen der universellen Online-Proteindatenbank *UniProt* [221, 222] berechnet. Darüber hinaus wurden der Jones-Faktor für Gelatine [218, 219] sowie die aus den publizierten Aminosäurezusammensetzungen humaner juveniler Haut berechneten Faktoren aus den Studien von Bornstein und Piez [223] und Miyahara *et al.* [224] verwendet.

		COL I	COL III	Haut	Gelatine	COL IV	Haut	LN	FN
		5,25	5,31	5,45	5,55	5,69	5,65	5,66	5,88
COL I	5,25								
COL III	5,31	n. s.							
Haut	5,45	n. s.	n. s.						
Gelatine	5,55	*	n. s.	n. s.					
COL IV	5,69	**	**	n. s.	n. s.				
Haut	5,65	**	*	n. s.	n. s.	n. s.			
LN	5,66	**	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.		
FN	5,88	***	***	**	**	n. s.	n. s.	n. s.	

7.4.2.2 Quantifizierung des Kollagengehalts in der (*click*)ECM

Tabelle A4: Statistische Untersuchung der mithilfe der unterschiedlichen Hydroxyprolin (HP)-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren berechneten Kollagengehalte der (*click*)ECM. Die Umrechnungsfaktoren wurden aus den publizierten Aminosäurezusammensetzungen für Kollagen Typ I (COL I) [138], Kollagen Typ III (COL III) [230] sowie humaner juveniler Haut [223, 224] berechnet.

		COL I/ Haut	COL III	Haut
		7,4	5,6	7,5
COL I/ Haut	7,4			
COL III	5,6	***		
Haut	7,5	n. s.	***	

7.5 Anhang zur Generierung homogener und reproduzierbarer Oberflächenbeschichtungen aus (click)ECM

Funktionalisierung der zu beschichtenden Oberflächen

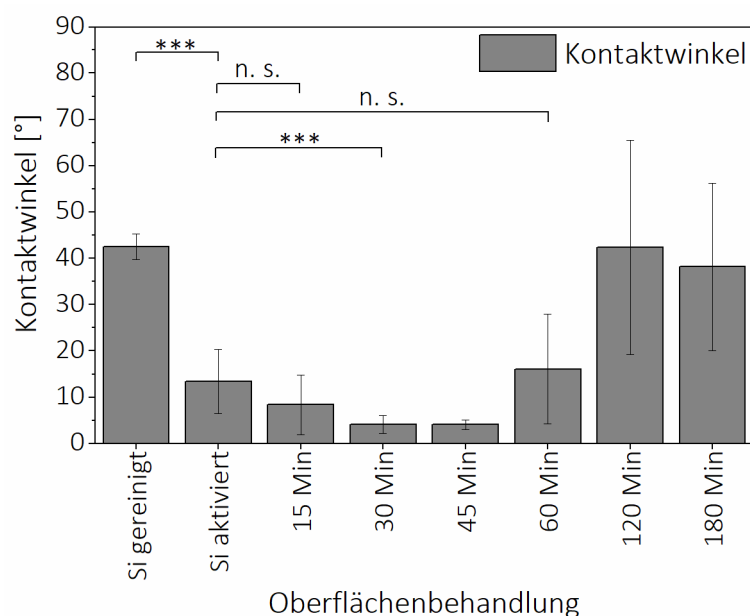


Abbildung A7: Messung des statischen Kontaktwinkels von Wasser in Luft auf unterschiedlich behandelten Si-Oberflächen. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei individuell durchgeführten Versuchen zur Oberflächenfunktionalisierung von gereinigten und aktivierten Si-Wafern mit CES mit jeweils mindestens zwei technischen Replikaten. Die Inkubationszeiten betragen 15 Minuten, 30 Minuten, 45 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 180 Minuten). Als Kontrolle dienten gereinigte sowie aktivierte Si-Oberflächen, die nicht silanisiert wurden. Der statische Kontaktwinkel von Wasser in Luft sank durch die Aktivierung signifikant ab, was einer Hydrophilierung der Oberfläche durch die erzeugten Hydroxygruppen entspricht. Der niedrigste Kontaktwinkel wurde nach einer Silanisierungsdauer von 30 Minuten und 45 Minuten erzielt. Danach stieg der Kontaktwinkel wieder an.

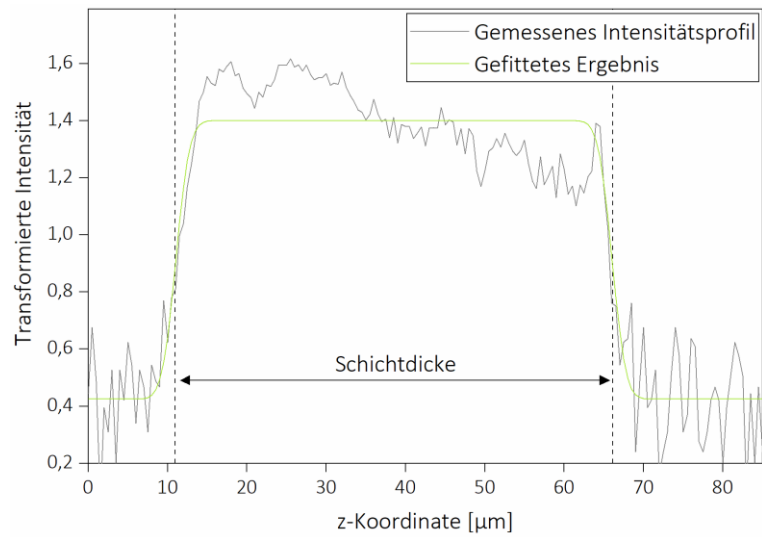


Abbildung A8: Beispiel eines Intensitätsprofils, das zur Bestimmung der Schichtdicken von (*click*)ECM-Oberflächenbeschichtungen verwendet wurde. Vor der Analyse wurden die Intensitäten logarithmisch transformiert. Zusätzlich wurden die Intensitäten über Quadrate von 4 x 4 benachbarten Pixeln in der x-y-Ebene gemittelt. Die transformierten Tiefenprofile enthielten somit die Schichtdicken von 1,056 µm x 1,056 µm großen Quadraten. Die Schichtdicke wurde anschließend durch nichtlineare Regression des transformierten Intensitätsprofils bestimmt.

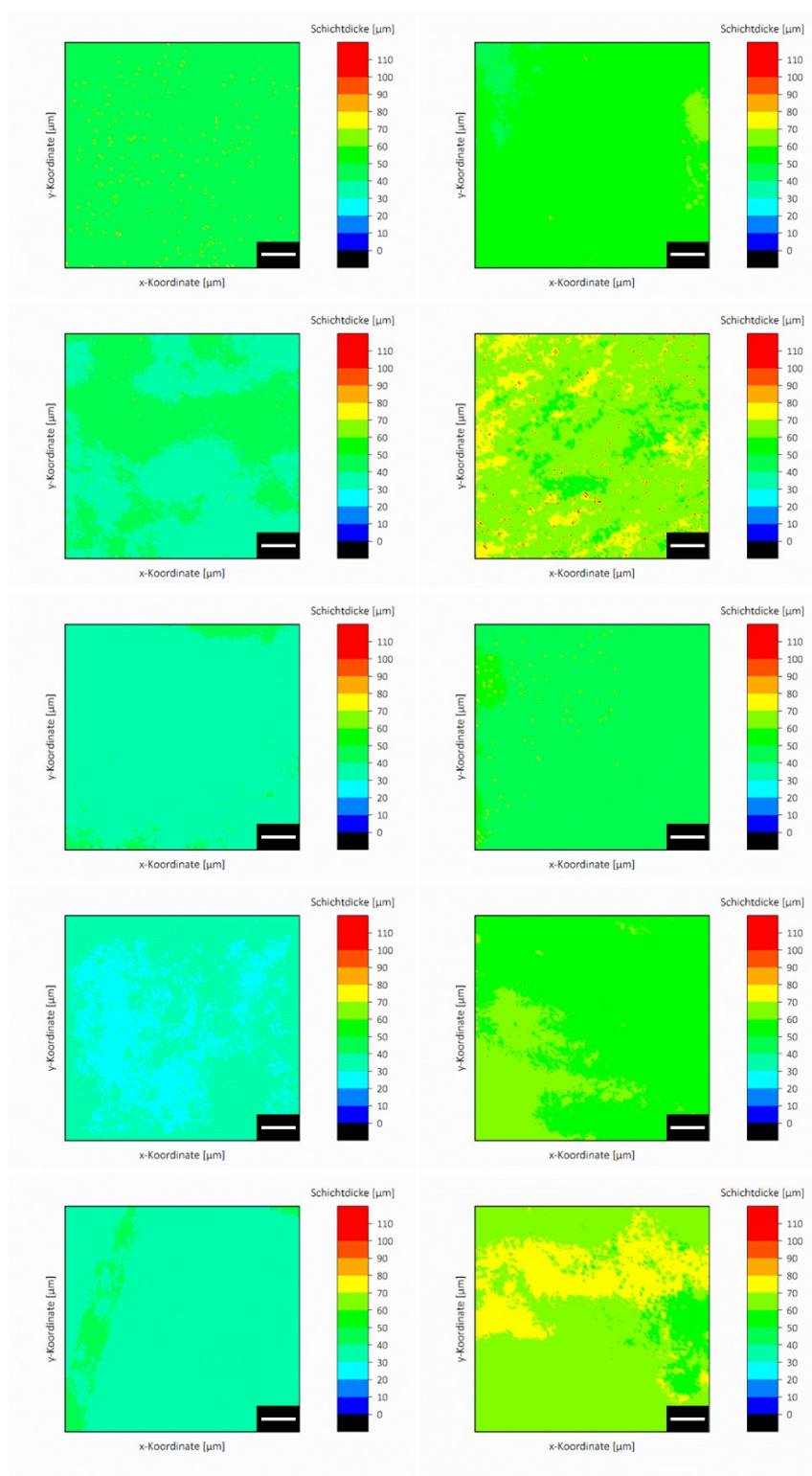


Abbildung A9: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Spender 1 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte) dargestellt in Falschfarben. Die mittlere Schichtdicke betrug $36,4 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $58,5 \mu\text{m} \pm 3,9 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

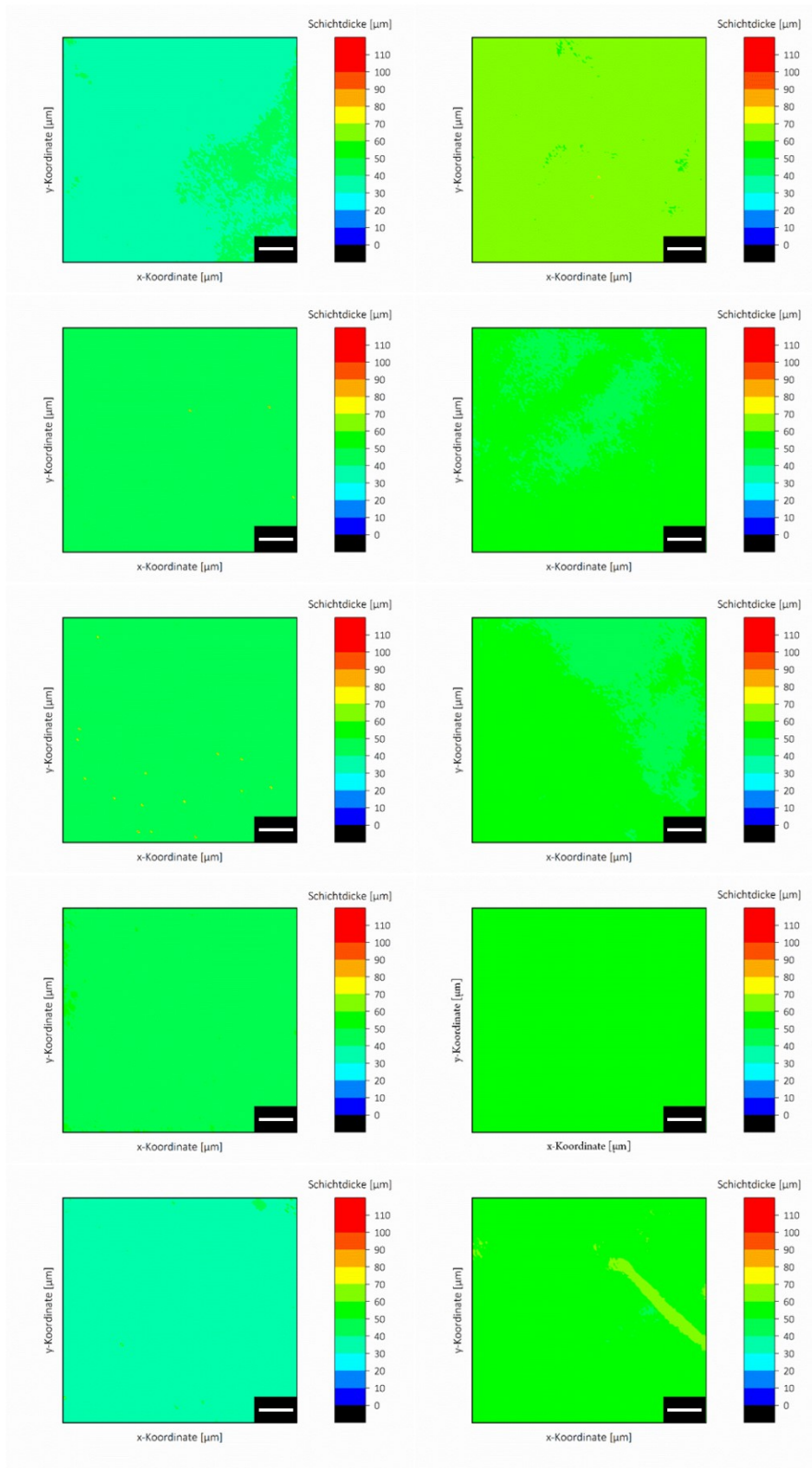


Abbildung A10: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter *clickECM* von Donor 1 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte) dargestellt in Falschfarben. Die mittlere Schichtdicke betrug $41,7 \mu\text{m} \pm 1,8 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $55,4 \mu\text{m} \pm 1,2 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

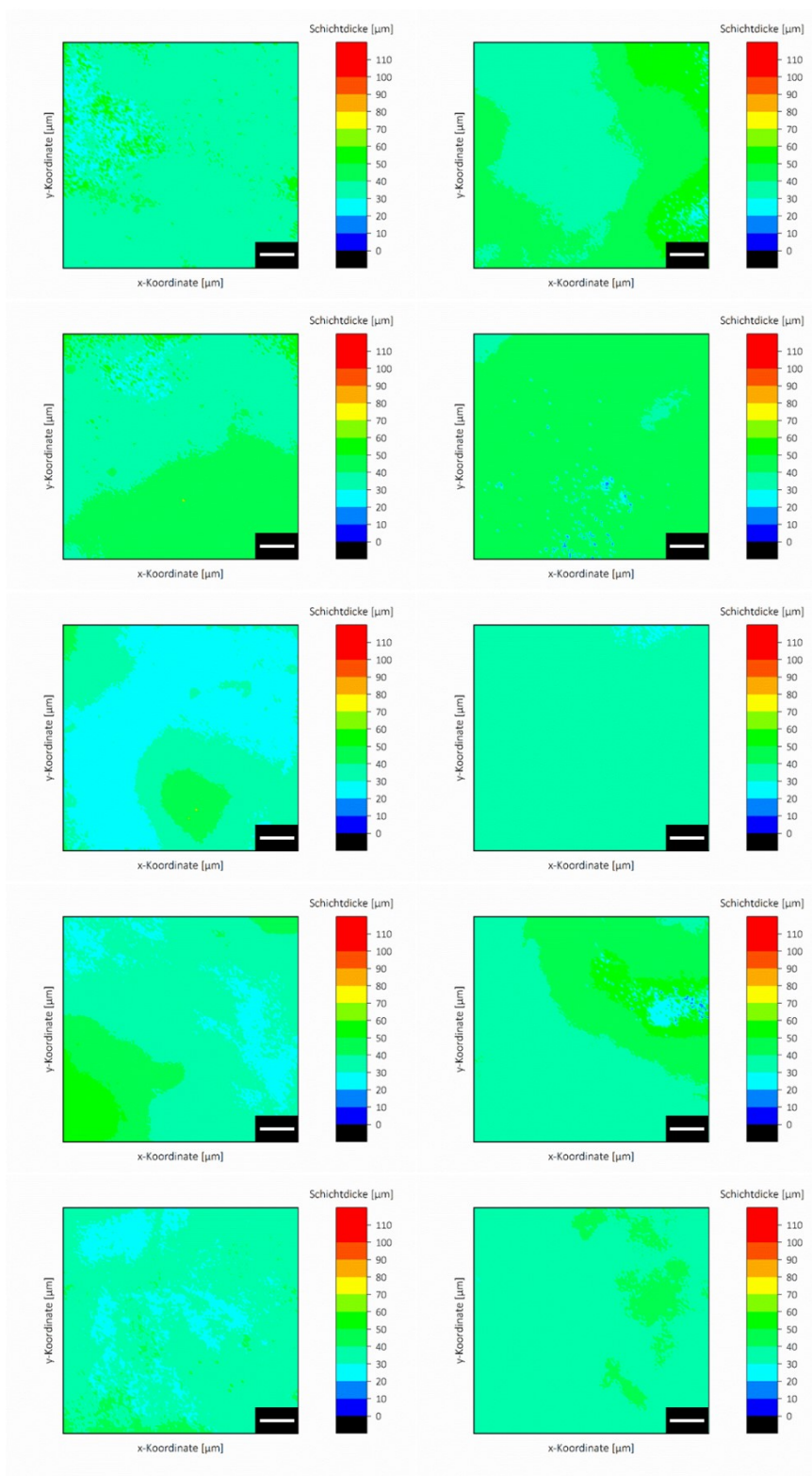


Abbildung A11: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Spender 2 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte) dargestellt in Falschfarben. Die mittlere Schichtdicke betrug $34,9 \mu\text{m} \pm 5,7 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $38,8 \mu\text{m} \pm 3,9 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

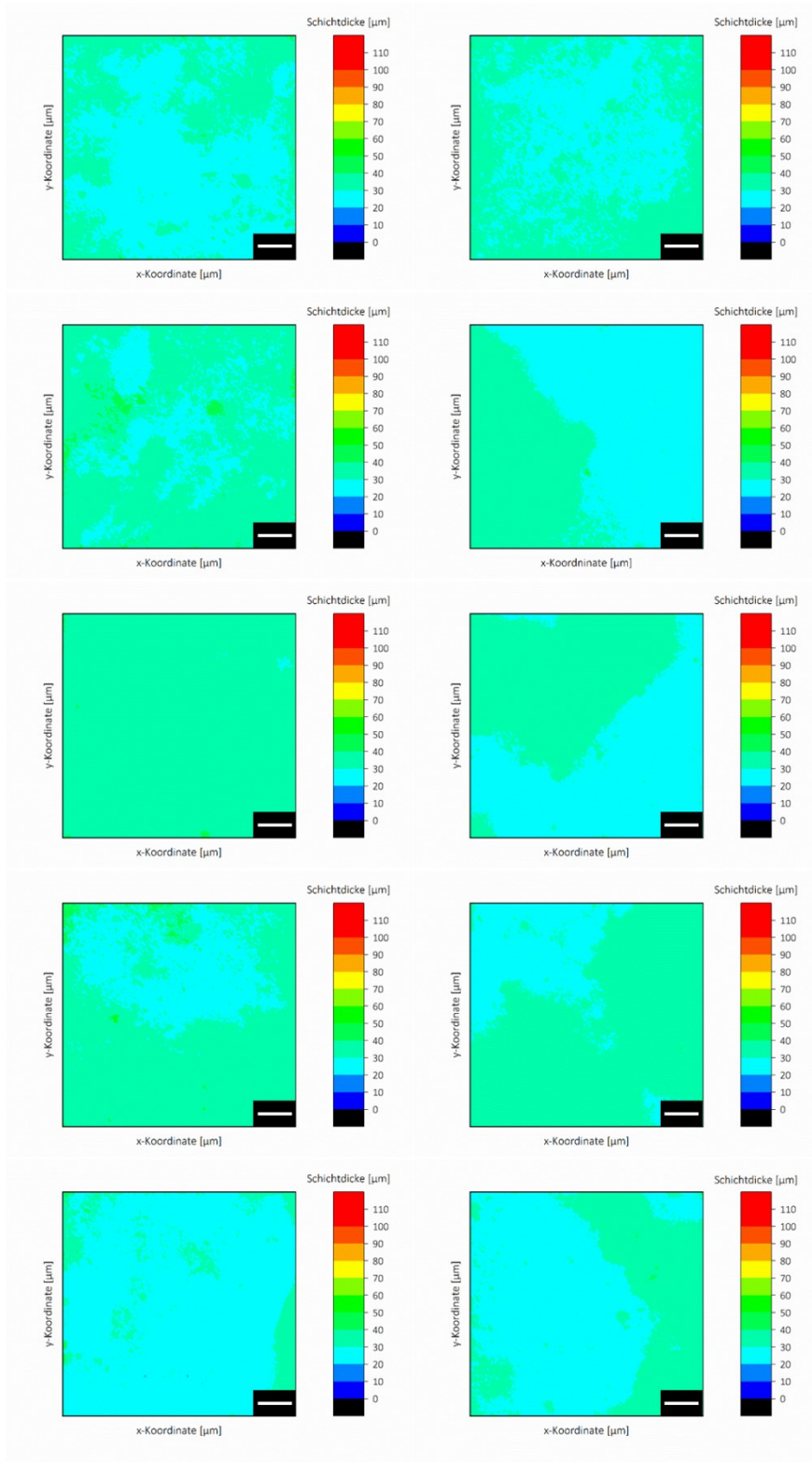


Abbildung A12: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter *click*ECM von Donor 2 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte). Die mittlere Schichtdicke betrug $30,9 \mu\text{m} \pm 3,4 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $30,4 \mu\text{m} \pm 3,0 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

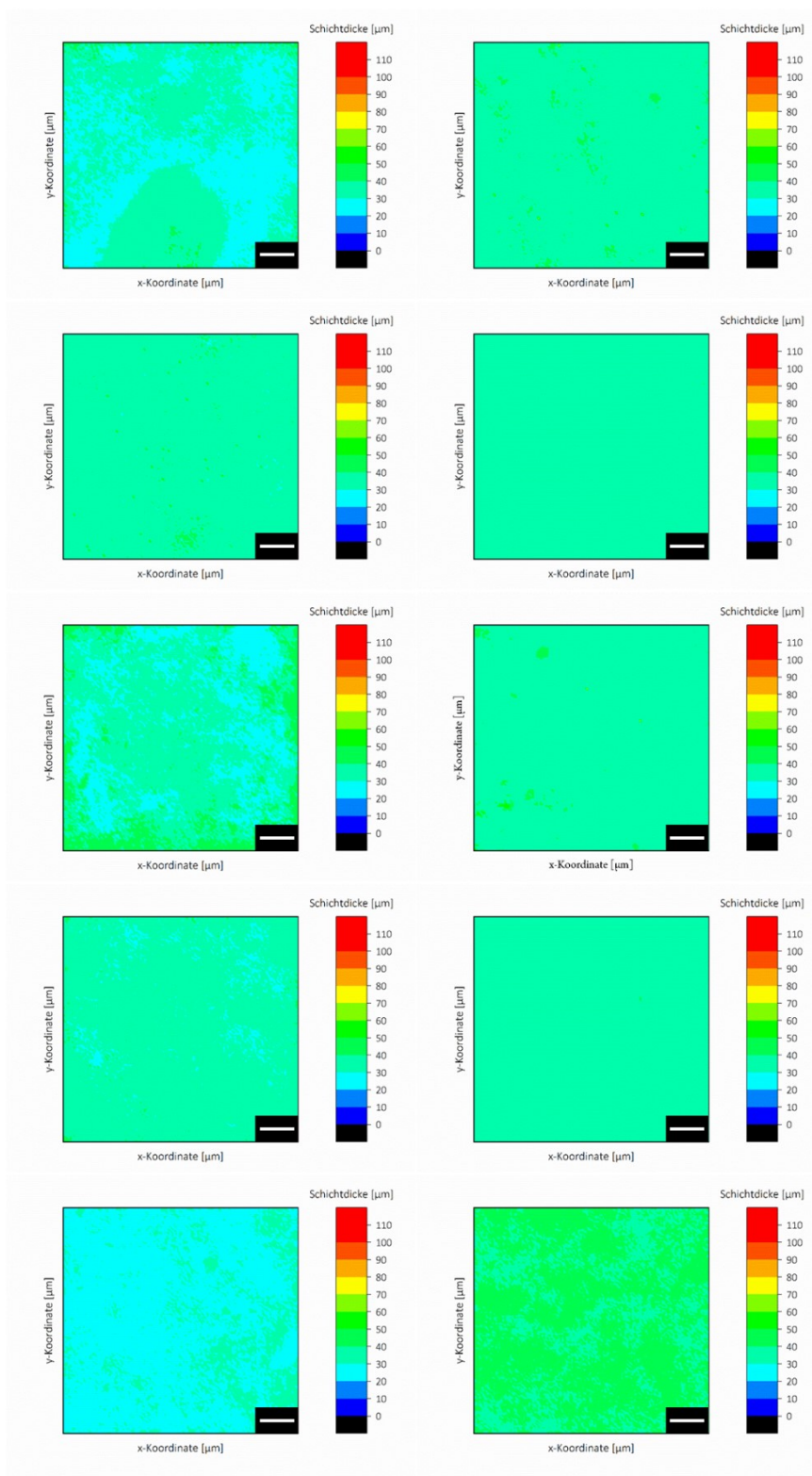


Abbildung A13: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Donor 3 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte) dargestellt in Falschfarben. Die mittlere Schichtdicke betrug $31,7 \mu\text{m} \pm 3,7 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $36,9 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

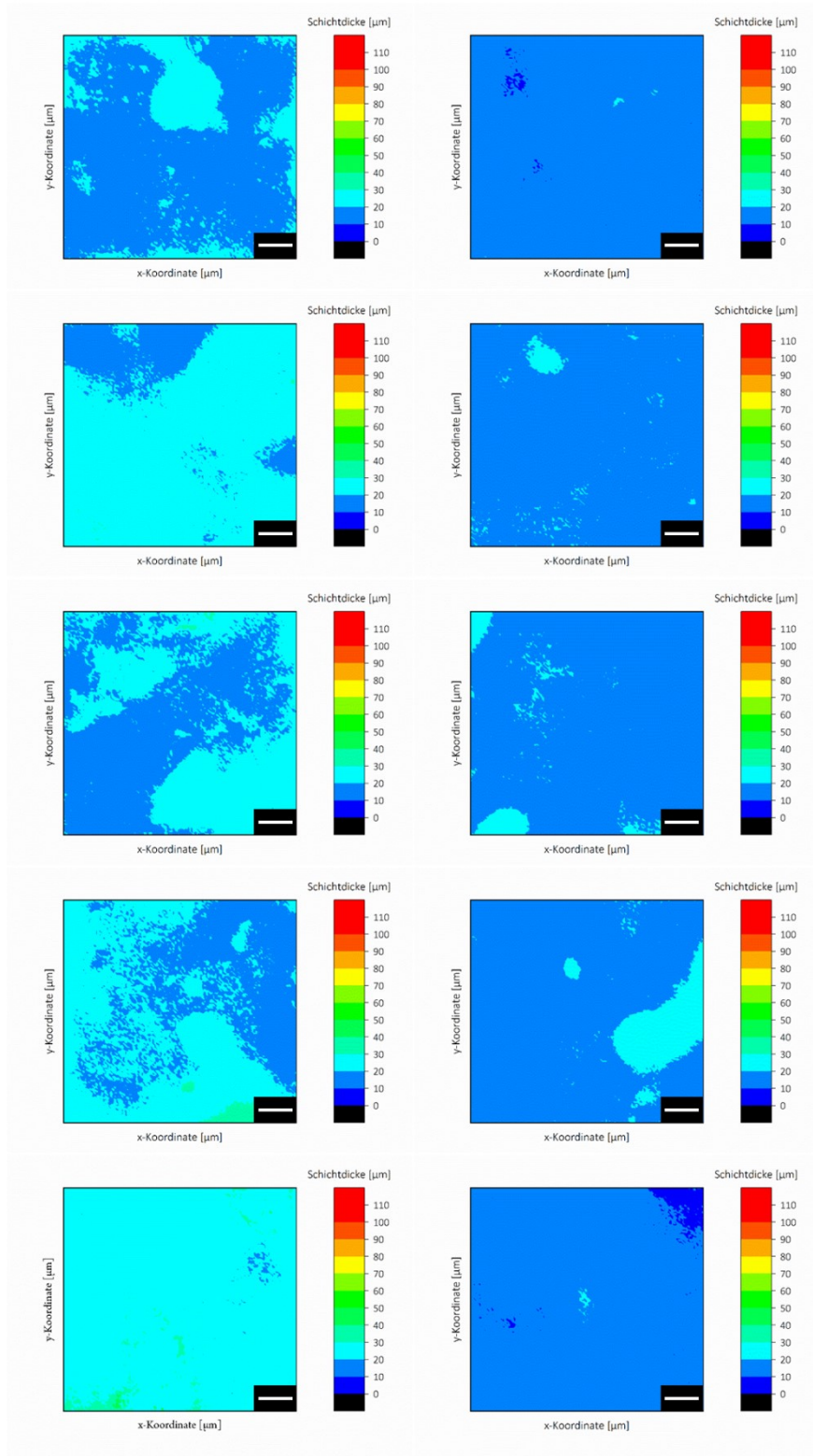


Abbildung A14: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter *click*ECM von Donor 3 vor dem Waschen (linke Spalte) und nach dem Waschen (rechte Spalte). Die mittlere Schichtdicke betrug $21,7 \mu\text{m} \pm 2,8 \mu\text{m}$ vor dem Waschen und $15,3 \mu\text{m} \pm 2,1 \mu\text{m}$ nach dem Waschen. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$.

Veröffentlichungen

Im Zuge des vorliegenden Dissertationsvorhabens entstanden sieben *peer-reviewed* Publikationen. In den fett gedruckten Publikationen wurden Teile dieser Arbeit vorab veröffentlicht.

Keller, S.; Liedek, A.; Shendi, D.; Bach, M.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P. J.; Southan, A. Eclectic Characterisation of Chemically Modified Cell-Derived Matrices Obtained by Metabolic Glycoengineering and Re-Assessment of Commonly Used Methods, *RSC Advances* 10(58) (2020) 35273-35286. <https://doi.org/10.1039/D0RA06819E>

Keller, S.; Wörgötter, K.; Liedek, A.; Kluger, P.J.; Bach, M.; Tovar, G.E.M.; Southan, A. Azide-functional extracellular matrix coatings as bioactive platform for bioconjugation, *ACS Applied Materials & Interfaces* 12(24) (2020) 26868–26879. <https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c04579>

Keller, S.; Bakker, T.; Kimmel, B.; Rebers, L.; Götz, T.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P.J.; Southan, A. Azido-functionalized gelatin via direct conversion of lysine amino groups by diazo transfer as a building block for bifunctional hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 109(1) (2021) 77-91. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37008>

Shendi, D.; Marzi, J.; Linthicum, W., Rickards, A.J.; Dolivo, D., **Keller, S.**; Krauss, A.; Wen, Q.; McDevitt, TC.; Dominko, T.; Shenke-Layland, K.; Rolle, M.W. Hyaluronic acid as a macromolecular crowding agent for production of cell-derived matrices, *Acta Biomaterialia* 100 (2019) 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.042>

Nellinger, S.; **Keller, S.**; Southan, A.; Wittmann, V.; Volz, A.-C.; Kluger, P. J. Generation of an azide-modified extracellular matrix by adipose-derived stem cells using metabolic glycoengineering, *Current Directions in Biomedical Engineering* 5(1) (2019) 393-395. <https://doi.org/10.1515/cdbme-2019-0099>

Adatia, K.K.; **Keller, S.**; Götz, T.; Tovar, G.E.M.; Southan, A. Hydrogels with multiple clickable anchor points: synthesis and characterization of poly(furfuryl glycidyl ether)-block-poly(ethylene glycol) macromonomers, *Polymer Chemistry* 10(32) (2019) 4485-4494. <https://doi.org/10.1039/C9PY00755E>

Jesswein, I.; Uebele, S.; Dieterich, A.; **Keller, S.**; Hirth, T.; Schiestel, T. Influence of surface properties on the dip coating behavior of hollow fiber membranes, *Journal of Applied Polymer Science* 135(16) (2018) 46163. <https://doi.org/10.1002/app.46163>

Konferenzbeiträge

Teile des vorliegenden Dissertationsvorhabens wurden im Rahmen folgender Konferenz- und Tagungsbeiträgen vorgestellt:

- September 2019 **Vortrag bei der „30th Annual Conference of the European Society for Biomaterials“** in Dresden (Titel des Vortrags: „*Development and characterization of a cell-derived extracellular matrix with azide functionalities*“)
- November 2018 **Vortrag bei der „Jahrestagung der 25-Jahr-Feier der Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung“** in Tutzing (Titel des Vortrags: „*Development of an azide-functional cell-derived extracellular matrix*“)
- März 2018 **Vortrag und Präsentation eines wissenschaftlichen Posters bei der „Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Matrixbiologie“** in Stuttgart (Titel des Vortrags und des Posters: „*clickECM – Development of a cell-derived extracellular matrix with azide functionalities*“)
- August 2017 **Präsentation eines wissenschaftlichen Posters bei der „Microscopy Conference 2017“** in Lausanne, Schweiz (Titel des Posters: „*Preparation and characterization of a covalently immobilized biological surface coating using azide-functionalized clickECM*“)
- Juni 2017 **Vortrag und Präsentation eines wissenschaftlichen Posters bei der „NanoBioMater Summer School & International Conference“** in Bad Herrenalb (Titel des Vortrags und des Posters: „*Development of an azide-functional cell-derived extracellular matrix*“)
- September 2016 **Vortrag bei der „Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Biomaterialien“** in Aachen (Titel des Vortrags: „*clickECM – a new approach to covalently immobilize human ECM on artificial surfaces*“)

- Mai 2016 **Vortrag und Posterpräsentation auf dem “World Biomaterials Congress”** in Montreal, Kanada (Titel des Vortrags: *“clickECM – a new approach to covalently immobilize human ECM on artificial surfaces”*; Titel des Posters: *“Advancement of clickECM derived from human differentiated stem cells for the use as tissue-specific surface coatings”*)
- März 2016 **Posterpräsentation bei der „Jahrestagung der Dt. Gesellschaft für Matrixbiologie“** in Freiburg (Titel des Posters: *„clickECM – a new approach to covalently immobilize human ECM on artificial surfaces“*)

Abbildungsverzeichnisse

Alle in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Abbildungen (Schemata, Grafiken, Diagramme, chemische Strukturformeln) wurden, sofern in der jeweiligen Abbildungsunterschrift nicht anders angegeben, eigenständig mithilfe der Software Microsoft PowerPoint (Windows), Origin (OriginLab® Corporation), CorelDRAW Graphics Suite (Corel), ChemDraw (PerkinElmer) und Solidworks (Dassault Systèmes SolidWorks Corp.) entworfen und erstellt. Für die Erlaubnis zur Weiterverwendung grafischer Inhalte, die in den *peer-reviewed* Publikationen enthalten sind, wenden Sie sich bitte an den Verlag der jeweiligen Veröffentlichung. Für Genehmigungen zur Weiterverwendung grafischer Inhalte, die im Vorfeld dieser Arbeit nicht bereits veröffentlicht wurden, wenden Sie sich bitte an das IGVP der Universität Stuttgart.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Wissenschaftsfelder, die an der Erforschung und Entwicklung von Biomaterialien zusammenarbeiten.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung unterschiedlicher menschlicher Gewebe mit den dort residierenden gewebespezifischen Zellen und der von ihnen sekretierten extrazellulären Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i> , ECM).	7
Abbildung 3: Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i> , ECM).....	9
Abbildung 4: Strukturformeln der Glykosaminoglykane (GAGs) Hyaluronsäure, Heparansulfat, Chondroitinsulfat/ Dermatansulfat und Keratansulfat.....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der molekularen Zusammensetzung eines Proteoglykans.	12
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Glykoproteins Fibronectin.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kollagensynthese..	15
Abbildung 8: Schematische Darstellung der "Random Coil"-Konformation elastischer Fasern.	16
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der <i>click</i> ECM.....	60
Abbildung 10: Reaktionsschema der Oberflächenfunktionalisierung mit Dibenzocyclooctingruppen und anschließenden Beschichtung mit Azid-funktionaler <i>click</i> ECM in einer SPAAC-Reaktion.	80
Abbildung 11: Technische Zeichnungen der konstruierten und entwickelten laminaren Durchflusszelle für die Untersuchung von Beschichtungsstabilitäten.	84
Abbildung 12: Gelelektrophoretische Analyse des Filtrats aus der Aufkonzentrierung der (<i>click</i>)ECM mithilfe eines Spin-Filters.	105
Abbildung 13: Gravimetrische Bestimmung der (<i>click</i>)ECM-Feuchtmassen von 50 µL-(<i>click</i>)ECM-Aliquots.....	107
Abbildung 14: Repräsentative Volumenverteilungen (V_n und $V_{n, kum}$) der (<i>click</i>)ECM-Fragmente eines Donors nach 4-minütiger mechanischer Homogenisierung im verwendeten Kugelmöhlen-Homogenisator.....	108

Abbildung 15: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Integrität der <i>click</i> ECM-Azide sowie der charakteristischen ECM-Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV und Fibronektin nach der Aufkonzentrierung und mechanischen Homogenisierung durch den verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator.....	111
Abbildung 16: Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der <i>click</i> ECM.....	115
Abbildung 17: Repräsentative Aufnahme einer Coomassie-Brilliant-Blau R-250 <i>Imperial</i> TM Protein-Färbung eines SDS-PAGE-Gels zur Beurteilung des durch die elektrophoretische Trennung entstandenen Bandenmusters der (<i>click</i>)ECM sowie des mitgeführten Kollagen Typ I-Standards.....	120
Abbildung 18: Histochemische Untersuchung der (<i>click</i>)ECM-Zusammensetzung.....	124
Abbildung 19: Immunhistochemische Analyse der ECM-spezifischen Proteine Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, Kollagen Typ IV, Fibronektin und Laminin.	127
Abbildung 20: Quantifizierung des Gesamtproteingehalts in unmodifizierter ECM und Azid-modifizierter <i>click</i> ECM mit dem Bradford-Assay und dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay.....	129
Abbildung 21: Repräsentative phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer BCA-Assay-Reaktionslösung.....	131
Abbildung 22: Grafische Darstellung der in dieser Arbeit quantifizierten (<i>click</i>)ECM-Komponenten.....	147
Abbildung 23: Repräsentative Falschfarbendarstellungen von (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen eines Donors zur Untersuchung der Beschichtungshomogenität und -dichte.....	150
Abbildung 24: Repräsentative rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von Oberflächenbeschichtungen auf DIBO-funktionalen Si-Wafern mit nicht modifiziertem ECM oder Azid-modifizierter <i>click</i> ECM.....	152
Abbildung 25: Repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) aus cLSM-Kachelaufnahmen der zellulären Antwort primärer humaner Fibroblasten auf (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen.....	154
Abbildung 26: Charakterisierung der (<i>click</i>)ECM-Beschichtungsstabilität vor und nach laminarem Überströmen der generierten Schichten mit einem tensidhaltigen Waschpuffer.....	157
Abbildung 27: Repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) konfokaler z-Stapelaufnahmen von biotinylierten <i>click</i> ECM-Beschichtungen auf Si-Wafern.....	161
Abbildung 28: Verfolgung der Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgrund der Reaktion der <i>click</i> ECM-Azide mit den Alkin-funktionalen Biotinmolekülen.....	162
Abbildung 29: Photometrische Verfolgung der Bildung des bläulich-grünen ABTS-Radikalkations (ABTS ⁺) durch den enzymatischen Umsatz des farblosen ABTS mittels konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) im zeitlichen Verlauf anhand der Absorption der Lösung.....	163
Abbildung 30: Reaktionsschema des Diazotransfers zur Azid-Modifizierung von boviner Gelatine Typ B.	168
Abbildung 31: ¹ H-NMR-Spektren der einzelnen Stufen der Azid-Modifizierung einer Gelatine Typ B zur AzGel sowie deren Konjugation mit dem heterobifunktionalen Linker <i>N</i> -Propargylacrylamid.....	170

Abbildung 32: Direkter Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifizierung von boviner Gelatine Typ B durch Diazotransfer der Lysingruppen sowie der Umsetzung der eingebrachten Azide mit dem Linker <i>N</i> -Propargylacrylamid via ATR-FT-IR-Spektroskopie..	172
Abbildung 33: Gelierverhalten gemessen anhand der Speicher (G')- und Verlust (G'')-Moduln von 10 %(w/w)igen Lösungen aus Gelatine bzw. Azid-modifizierter Gelatine in Abhängigkeit der Temperatur.	173
Abbildung 34: Elugramm der Größenausschluss- bzw. Gelpermeationschromatographie (GPC) von unmodifizierter Gelatine und Azid-modifizierter Gelatine (<i>clickGel</i>).	176
Abbildung 35: Makroskopisches Aussehen der generierten Hybridhydrogele aus unmodifizierter Gelatine bzw. kovalent gebundener Azid-modifizierter Gelatine (<i>clickGel</i>).	178
Abbildung 36: Speicher (G')- und Verlustmoduln (G'') von Hybridhydrogelen aus PEG-DA und unterschiedlichen Konzentrationen an Gelatine bzw. kovalent gebundener Azid-modifizierter Gelatine (<i>clickGel</i>).	179
Abbildung 37: Quellgrad von Hybridhydrogelen aus PEG-DA und unmodifizierter Gelatine bzw. Azid-modifizierter Gelatine (<i>clickGel</i>).	181
Abbildung 38: Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Assays von Extrakten aus PEG-DA-(Hybrid)Hydrogelen mit und ohne unterschiedliche <i>clickGel</i> -Gehalte.	183
Abbildung 39: Zellantwort auf die <i>clickGel</i> -haltigen PEG-DA-Hydrogele.	184
Abbildung 40: Quantifizierung der Anzahl adhärenter primärer humaner Fibroblasten nach viertägiger statischer Zellkultur auf PEG-DA-Hydrogelen mit unterschiedlichen <i>clickGel</i> -gehalten.	185
Abbildung A1: Homogenisierung mit Essigsäure (HAc).	XXIV
Abbildung A2: Häufigkeits- (A_n und $A_{n, kum}$) und Volumenverteilungen (V_n und $V_{n, kum}$) der (<i>click</i>)ECM-Fragmente nach 4-minütiger mechanischer Homogenisierung durch den verwendeten Kugelmühlen-Homogenisator.	XXV
Abbildung A3. Foto eines auf der linken Seite mit <i>click</i> ECM beschichteten Si-Wafers.	XXVI
Abbildung A4: Kalibrationsfunktion zur Bestimmung der Azidkonzentration innerhalb der <i>click</i> ECM.	XXVI
Abbildung A5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der erfolgreichen Azid-Modifizierung der <i>click</i> ECM mit dem Alkin-modifizierten Fluorophor Alexa Fluor® 488-Alkin.	XXVII
Abbildung A6: Licht- und polarisationsmikroskopische Aufnahmen der Pikro-Siriusrot-Färbung von juveniler Haut, unmodifizierter ECM und Azid-modifizierter <i>click</i> ECM.	XXVIII
Abbildung A7: Messung des statischen Kontaktwinkels von Wasser in Luft auf unterschiedlich behandelten Si-Oberflächen.	XXXIV
Abbildung A8: Beispiel eines Intensitätsprofils, das zur Bestimmung der Schichtdicken von (<i>click</i>)ECM-Oberflächenbeschichtungen verwendet wurde.	XXXV
Abbildung A9: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Spender 1 vor dem Waschen und nach dem Waschen dargestellt in Falschfarben.	XXXVI

Abbildung A10: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter <i>click</i> ECM von Donor 1 vor dem Waschen und nach dem Waschen dargestellt in Falschfarben.....	XXXVII
Abbildung A11: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Spender 2 vor dem Waschen und nach dem Waschen dargestellt in Falschfarben.	XXXVIII
Abbildung A12: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter <i>click</i> ECM von Donor 2 vor dem Waschen und nach dem Waschen.	XXXIX
Abbildung A13: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit unmodifizierter ECM von Donor 3 vor dem Waschen und nach dem Waschen dargestellt in Falschfarben.	XL
Abbildung A14: Homogenitätsplots von Oberflächenbeschichtungen mit Azid-modifizierter <i>click</i> ECM von Donor 3 vor dem Waschen und nach dem Waschen.	XLI

Tabellenverzeichnisse

Tabelle 1: Übersicht über die Zelldonoren der in dieser Arbeit verwendeten primären, humanen, dermalen Fibroblasten.....	41
Tabelle 2: Übersicht über die Arbeitsschritte im Zuge der <i>in-vitro</i> -Generierung von nicht modifizierter und Azid-modifizierter extrazellulärer Matrix (<i>click</i>)ECM) im zeitlichen Verlauf.....	48
Tabelle 3: Übersicht über die für die Quantifizierung der Azidkonzentration innerhalb der <i>click</i> ECM eingesetzten (<i>click</i>)ECM-Volumina.....	61
Tabelle 4: Vergleich aller d_{10} -, d_{50} - und d_{90} -Mittelwerte (berechnet aus den Volumenverteilungen) sowie der mittleren Span- und Moduswerte (berechnet aus den Volumen- und Häufigkeitsverteilungen) der untersuchten homogenisierten (<i>click</i>)ECM-Proben.....	109
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten proteinspezifischen Stickstoff-zu-Protein-Umrechnungsfaktoren.....	134
Tabelle 6: Bestimmung des Proteingehalts in [% (w/w)] in der (<i>click</i>)ECM über die Umrechnung der experimentell quantifizierten Stickstoffgehalte.....	135
Tabelle 7: Auflistung der proteinspezifischen HP-zu-Kollagen-Umrechnungsfaktoren, die entweder aus den in der Literatur für die Kollagen (COL)-Subtypen I und III oder für humane juvenile Haut publizierten Aminosäurezusammensetzungen berechnet wurden.....	140
Tabelle 8: Bestimmung des Gehalts an unlöslichem Kollagen in [% (w/w)] in der (<i>click</i>)ECM über die Umrechnung des enthaltenen HP-Gehalts.	140
Tabelle 9: Quantitative Bestimmung des Gehalts an sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAG) in der (<i>click</i>)ECM unter Verwendung des <i>Blyscan</i> TM Assays.....	144
Tabelle 10: Vergleich der mittleren Schichtdicken von (<i>click</i>)ECM-Beschichtungen.....	150
Tabelle 11: Übersichtstabelle über die Ergebnisse zur Charakterisierung der Azid-modifizierten Gelatine (<i>click</i> Gel).	175

Literaturverzeichnis

- [1] Williams, D. F.; European Society for Biomaterials. Definitions in biomaterials : proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986, Elsevier, Amsterdam ; New York NY USA, 1987.
- [2] M. Vert, Y. Doi, K.H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schue, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), Pure and Applied Chemistry 84(2) (2012) 377-408.
- [3] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, Materials Today 14(3) (2011) 88-95.
- [4] E. Wintermantel, S.W. Ha, Medizintechnik: Life Science Engineering, Springer, Berlin, Heidelberg, 2009.
- [5] J.M. Aamodt, D.W. Grainger, Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response, Biomaterials 86 (2016) 68-82.
- [6] B.D. Ratner, S.J. Bryant, Biomaterials: where we have been and where we are going, Annual review of biomedical engineering 6 (2004) 41-75.
- [7] Y.K. Kim, E.Y. Chen, W.F. Liu, Biomolecular strategies to modulate the macrophage response to implanted materials, Journal of Materials Chemistry B 4(9) (2016) 1600-1609.
- [8] K.H. Hussein, K.-M. Park, K.-S. Kang, H.-M. Woo, Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application, Materials Science and Engineering: C 67 (2016) 766-778.
- [9] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, Biomaterials 29(20) (2008) 2941-53.
- [10] G.J. Tortora, B.H. Derrickson, Anatomie und Physiologie, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- [11] N. Menche, Biologie Anatomie Physiologie, 5 ed., Elsevier Urban & Fischer Verlag München/Jena, 2003.
- [12] E.-J. Speckmann, W. Wittowski, Handbuch Anatomie Bau und Funktion des menschlichen Körpers, 19 ed., h.f.ullmann publishing GmbH, Potsdam, 2012.
- [13] N. Ulfing, Kurzlehrbuch Histologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.
- [14] O. Bucher, H. Wartenberg, Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 12., vollst. überarb. Aufl. ed., Huber, Bern; Göttingen [u. a.], 1997.
- [15] S. Schmitz, Der Experimentator Zellkultur, 3 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011.
- [16] A. Teti, Regulation of cellular functions by extracellular matrix, Journal of the American Society of Nephrology 2(10) (1992) 83-87.
- [17] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Molekularbiologie der Zelle, 5 ed., Wiley-VCH Verlag & co. KGaA, Weinheim, 2011.
- [18] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, Journal of Cell Science 123(24) (2010) 4195-4200.
- [19] F.T. Bosman, I. Stamenkovic, Functional structure and composition of the extracellular matrix, Journal of Pathology 200(4) (2003) 423-428.

- [20] R. Wade, J. Burdick, Engineering ECM signals into biomaterials, *Materials Today* 15 (2012) 454–459.
- [21] R.H.G.C.M. Garrett, *Biochemistry*, 4 ed., Brooks/Cole, Boston MA USA, 2010.
- [22] F.H. Blackhall, C.L.R. Merry, E.J. Davies, G.C. Jayson, Heparan sulfate proteoglycans and cancer, *British Journal of Cancer* 85(8) (2001) 1094-1098.
- [23] U. Welsch, *Lehrbuch Histologie*, 4. Aufl. ed., Elsevier, Urban & Fischer, München, 2014.
- [24] L.C.U. Junqueira, J. Carneiro, M. Gratzl, *Histologie*, 6., neu übers., überarb. u. aktual. Aufl. ed., Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2004.
- [25] W. Seyffert, R. Balling, *Lehrbuch der Genetik*, 2. Aufl ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin, 2003.
- [26] S. Rammelt, T. Illert, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Zwipp, W. Schneiders, Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate, *Biomaterials* 27(32) (2006) 5561-71.
- [27] H. Ao, Y. Xie, H. Tan, S. Yang, K. Li, X. Wu, X. Zheng, T. Tang, Fabrication and in vitro evaluation of stable collagen/hyaluronic acid biomimetic multilayer on titanium coatings, *Journal of the Royal Society Interface* 10(84) (2013) 20130070.
- [28] M. Chimutengwende-Gordon, C. Pendegrass, R. Bayston, G. Blunn, Preventing infection of osseointegrated transcutaneous implants: Incorporation of silver into preconditioned fibronectin-functionalized hydroxyapatite coatings suppresses *Staphylococcus aureus* colonization while promoting viable fibroblast growth in vitro, *Biointerphases* 9(3) (2014) 031010.
- [29] M. Morra, C. Cassinelli, G. Cascardo, L. Mazzucco, P. Borzini, M. Fini, G. Giavaresi, R. Giardino, Collagen I-coated titanium surfaces: mesenchymal cell adhesion and in vivo evaluation in trabecular bone implants, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78(3) (2006) 449-458.
- [30] S.C. Rizzi, J.A. Hubbell, Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive and proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part I: Development and physicochemical characteristics, *Biomacromolecules* 6(3) (2005) 1226-1238.
- [31] M.P. Lutolf, J.A. Hubbell, Synthesis and Physicochemical Characterization of End-Linked Poly(ethylene glycol)-co-peptide Hydrogels Formed by Michael-Type Addition, *Biomacromolecules* 4(3) (2003) 713-722.
- [32] T.T. Hoang Thi, J.S. Lee, Y. Lee, K.M. Park, K.D. Park, Enhanced Cellular Activity in Gelatin-Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels without Compromising Gel Stiffness, *Macromolecular bioscience* 16(3) (2016) 334-340.
- [33] X. Jia, K.L. Kiick, Hybrid multicomponent hydrogels for tissue engineering, *Macromolecular bioscience* 9(2) (2009) 140-156.
- [34] J. Zhu, Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering, *Biomaterials* 31(17) (2010) 4639-4656.
- [35] H.K. Lau, K.L. Kiick, Opportunities for multicomponent hybrid hydrogels in biomedical applications, *Biomacromolecules* 16(1) (2015) 28-42.
- [36] L.E. Fitzpatrick, T.C. McDevitt, Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications, *Biomaterials science* 3(1) (2015) 12-24.

- [37] S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert, Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function, *Acta Biomaterialia* 5(1) (2009) 1-13.
- [38] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32(12) (2011) 3233-3243.
- [39] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials* 27(19) (2006) 3675-3683.
- [40] C.E. Schmidt, J.M. Baier, Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering, *Biomaterials* 21(22) (2000) 2215-2231.
- [41] A. Bader, T. Schilling, O.E. Teebken, G. Brandes, T. Herden, G. Steinhoff, A. Haverich, Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves, *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 14(3) (1998) 279-284.
- [42] C. Booth, S.A. Korossis, H.E. Wilcox, K.G. Watterson, J.N. Kearney, J. Fisher, E. Ingham, Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold, *The Journal of heart valve disease* 11(4) (2002) 457-462.
- [43] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. Konig, I. Riemann, K.J. Halbhuber, T. Wahlers, U.A. Stock, Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves, *Journal of structural biology* 143(3) (2003) 201-208.
- [44] R.N. Chen, H.O. Ho, Y.T. Tsai, M.T. Sheu, Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications, *Biomaterials* 25(13) (2004) 2679-2686.
- [45] S.F. Badylak, G.C. Lantz, A. Coffey, L.A. Geddes, Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog, *The Journal of surgical research* 47(1) (1989) 74-80.
- [46] S.F. Badylak, R. Tullius, K. Kokini, K.D. Shelbourne, T. Klootwyk, S.L. Voytik, M.R. Kraine, C. Simmons, The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model, *Journal of Biomedical Materials Research* 29(8) (1995) 977-985.
- [47] B.P. Kropp, B.L. Eppley, C.D. Prevel, M.K. Rippey, R.C. Harruff, S.F. Badylak, M.C. Adams, R.C. Rink, M.A. Keating, Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute, *Urology* 46(3) (1995) 396-400.
- [48] F. Chen, J.J. Yoo, A. Atala, Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair, *Urology* 54(3) (1999) 407-410.
- [49] D.O. Freytes, S.F. Badylak, T.J. Webster, L.A. Geddes, A.E. Rundell, Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds, *Biomaterials* 25(12) (2004) 2353-2361.
- [50] T.W. Gilbert, D.B. Stolz, F. Biancaniello, A. Simmons-Byrd, S.F. Badylak, Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications, *Biomaterials* 26(12) (2005) 1431-1435.
- [51] T. Woods, P.F. Gratzer, Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft, *Biomaterials* 26(35) (2005) 7339-7349.
- [52] B.S. Conklin, E.R. Richter, K.L. Kreutziger, D.S. Zhong, C. Chen, Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft, *Medical engineering & physics* 24(3) (2002) 173-183.

- [53] S.L. Dahl, J. Koh, V. Prabhakar, L.E. Niklason, Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation, *Cell transplantation* 12(6) (2003) 659-666.
- [54] K. Dzobo, K.S.C.M. Motaung, A. Adesida, Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review, *International Journal of Molecular Sciences* 20(18) (2019) 4628.
- [55] J.E. Babensee, J.M. Anderson, L.V. McIntire, A.G. Mikos, Host response to tissue engineered devices, *Advanced drug delivery reviews* 33(1) (1998) 111-139.
- [56] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Seminars in Immunology* 20(2) (2008) 86-100.
- [57] D. Hubmacher, S.S. Apte, The biology of the extracellular matrix: novel insights, *Current Opinion in Rheumatology* 25(1) (2013) 65-70.
- [58] S. Abraham, M.J. Riggs, K. Nelson, V. Lee, R.R. Rao, Characterization of human fibroblast-derived extracellular matrix components for human pluripotent stem cell propagation, *Acta Biomaterialia* 6(12) (2010) 4622-4633.
- [59] Y. Lai, Y. Sun, C.M. Skinner, E.L. Son, Z. Lu, R.S. Tuan, R.L. Jilka, J. Ling, X.D. Chen, Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells, *Stem Cells and Development* 19(7) (2010) 1095-1107.
- [60] Y. Sun, W. Li, Z. Lu, R. Chen, J. Ling, Q. Ran, R.L. Jilka, X.D. Chen, Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix, *FASEB Journal* 25(5) (2011) 1474-1485.
- [61] M.C. Prewitz, F.P. Seib, M. von Bonin, J. Friedrichs, A. Stissel, C. Niehage, K. Muller, K. Anastassiadis, C. Waskow, B. Hoflack, M. Bornhauser, C. Werner, Tightly anchored tissue-mimetic matrices as instructive stem cell microenvironments, *Nature Methods* 10(8) (2013) 766-778.
- [62] R. Nair, A.V. Ngangan, M.L. Kemp, T.C. McDevitt, Gene expression signatures of extracellular matrix and growth factors during embryonic stem cell differentiation, *PLoS one* 7(10) (2012) e42580.
- [63] C. Xu, M.S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu, J.D. Gold, M.K. Carpenter, Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells, *Nature Biotechnology* 19(10) (2001) 971-974.
- [64] M. Pei, F. He, Extracellular matrix deposited by synovium-derived stem cells delays replicative senescent chondrocyte dedifferentiation and enhances redifferentiation, *Journal of Cellular Physiology* 227(5) (2012) 2163-2174.
- [65] M.H. Cha, S.H. Do, G.R. Park, P. Du, K.-C. Han, D.K. Han, K. Park, Induction of Re-Differentiation of Passaged Rat Chondrocytes Using a Naturally Obtained Extracellular Matrix Microenvironment, *Tissue Engineering Part A* 19(7-8) (2012) 978-988.
- [66] T. Hoshiba, T. Yamada, H. Lu, N. Kawazoe, G. Chen, Maintenance of cartilaginous gene expression on extracellular matrix derived from serially passaged chondrocytes during in vitro chondrocyte expansion, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 100(3) (2012) 694-702.
- [67] T. Hoshiba, H.X. Lu, N. Kawazoe, T. Yamada, G.P. Chen, Effects of Extracellular Matrix Proteins in Chondrocyte-Derived Matrices on Chondrocyte Functions, *Biotechnolog Progress* 29(5) (2013) 1331-1336.

- [68] M. Yamato, T. Okano, Cell sheet engineering, *Materials Today* 7(5) (2004) 42-47.
- [69] K. Matsuura, R. Utoh, K. Nagase, T. Okano, Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine, *Journal of Controlled Release* 190 (2014) 228-239.
- [70] K. Schenke-Layland, F. Rofail, S. Heydarkhan, J.M. Gluck, N.P. Ingle, E. Angelis, C.H. Choi, W.R. MacLellan, R.E. Beygui, R.J. Shemin, S. Heydarkhan-Hagvall, The use of three-dimensional nanostructures to instruct cells to produce extracellular matrix for regenerative medicine strategies, *Biomaterials* 30(27) (2009) 4665-4675.
- [71] O. Adebayo, T.A. Hookway, J.Z. Hu, K.L. Billiar, M.W. Rolle, Self-assembled smooth muscle cell tissue rings exhibit greater tensile strength than cell-seeded fibrin or collagen gel rings, *Journal of biomedical materials research. Part A* 101(2) (2013) 428-437.
- [72] T.A. Gwyther, J.Z. Hu, K.L. Billiar, M.W. Rolle, Directed cellular self-assembly to fabricate cell-derived tissue rings for biomechanical analysis and tissue engineering, *Journal of Visualized Experiments* (57) (2011) e3366.
- [73] B.C. Dash, K. Levi, J. Schwan, J. Luo, O. Bartulos, H. Wu, C. Qiu, T. Yi, Y. Ren, S. Campbell, M.W. Rolle, Y. Qyang, Tissue-Engineered Vascular Rings from Human iPSC-Derived Smooth Muscle Cells, *Stem Cell Reports* 7(1) (2016) 19-28.
- [74] N.A. Peppas, E.W. Merrill, Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks, *Journal of Applied Polymer Science* 21(7) (1977) 1763-1770.
- [75] V.H. Mouser, F.P. Melchels, J. Visser, W.J. Dhert, D. Gawlitta, J. Malda, Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting, *Biofabrication* 8(3) (2016) 035003.
- [76] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *Journal of Advanced Research* 6(2) (2015) 105-121.
- [77] Q.T. Nguyen, Y. Hwang, A.C. Chen, S. Varghese, R.L. Sah, Cartilage-like mechanical properties of poly (ethylene glycol)-diacrylate hydrogels, *Biomaterials* 33(28) (2012) 6682-6690.
- [78] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review, *Biomacromolecules* 12(5) (2011) 1387-1408.
- [79] B.V. Slaughter, S.S. Khurshid, O.Z. Fisher, A. Khademhosseini, N.A. Peppas, Hydrogels in regenerative medicine, *Advanced Materials* 21(32-33) (2009) 3307-3329.
- [80] A. Tuin, J. Zandstra, S.G. Kluijtmans, J.B. Bouwstra, M.C. Harmsen, M.J. Van Luyn, Hyaluronic acid-recombinant gelatin gels as a scaffold for soft tissue regeneration, *European Cells & Materials Journal* 24 (2012) 320-330.
- [81] M.W. Tibbitt, K.S. Anseth, Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture, *Biotechnology & Bioengineering* 103(4) (2009) 655-663.
- [82] L.A. Hockaday, K.H. Kang, N.W. Colangelo, P.Y. Cheung, B. Duan, E. Malone, J. Wu, L.N. Girardi, L.J. Bonassar, H. Lipson, C.C. Chu, J.T. Butcher, Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds, *Biofabrication* 4(3) (2012) 035005.
- [83] V. Hagel, T. Haraszti, H. Boehm, Diffusion and interaction in PEG-DA hydrogels, *Biointerphases* 8(1) (2013) 36.
- [84] M.C. Cushing, K.S. Anseth, Hydrogel cell cultures, *Science* 316 (2007) 1133-1134.

- [85] P.M. Kharkar, K.L. Kiick, A.M. Kloxin, Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments, *Chemical Society reviews* 42(17) (2013) 7335-7372.
- [86] C.B. Hutson, J.W. Nichol, H. Aubin, H. Bae, S. Yamanlar, S. Al-Haque, S.T. Koshy, A. Khademhosseini, Synthesis and characterization of tunable poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels, *Tissue engineering. Part A* 17(13-14) (2011) 1713-1723.
- [87] S.A. Klotz, R.L. Smith, Gelatin fragments block adherence of *Candida albicans* to extracellular matrix proteins, *Microbiology* 141(10) (1995) 2681-2684.
- [88] K. Su, C. Wang, Recent advances in the use of gelatin in biomedical research, *Biotechnology letters* 37(11) (2015) 2139-2145.
- [89] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatine handbook : theory and industrial practice*, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [90] J.B. Rose, S. Pacelli, A.J.E. Haj, H.S. Dua, A. Hopkinson, L.J. White, F. Rose, Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering, *Materials (Basel)* 7(4) (2014) 3106-3135.
- [91] E. Hoch, C. Schuh, T. Hirth, G.E. Tovar, K. Borchers, Stiff gelatin hydrogels can be photochemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(11) (2012) 2607-2617.
- [92] A. Skardal, M. Devarasetty, H.W. Kang, I. Mead, C. Bishop, T. Shupe, S.J. Lee, J. Jackson, J. Yoo, S. Soker, A. Atala, A hydrogel bioink toolkit for mimicking native tissue biochemical and mechanical properties in bioprinted tissue constructs, *Acta Biomaterialia* 25 (2015) 24-34.
- [93] N. Datta, Q.P. Pham, U. Sharma, V.I. Sikavitsas, J.A. Jansen, A.G. Mikos, In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8) (2006) 2488-2493.
- [94] N. Datta, H.L. Holtorf, V.I. Sikavitsas, J.A. Jansen, A.G. Mikos, Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells, *Biomaterials* 26(9) (2005) 971-977.
- [95] J. Liao, X. Guo, D. Nelson, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Modulation of osteogenic properties of biodegradable polymer/extracellular matrix scaffolds generated with a flow perfusion bioreactor, *Acta Biomaterialia* 6(7) (2010) 2386-2393.
- [96] R.A. Thibault, L.S. Baggett, A.G. Mikos, F.K. Kasper, Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Pregenerated Extracellular Matrix Scaffolds in the Absence of Osteogenic Cell Culture Supplements, *Tissue Engineering Part A* 16(2) (2010) 431-440.
- [97] Q.P. Pham, F. Kurtis Kasper, L. Scott Baggett, R.M. Raphael, J.A. Jansen, A.G. Mikos, The influence of an in vitro generated bone-like extracellular matrix on osteoblastic gene expression of marrow stromal cells, *Biomaterials* 29(18) (2008) 2729-2739.
- [98] Y.J. Hong, S.E. Bae, S.H. Do, I.H. Kim, D.K. Han, K. Park, Decellularized PLGA-based scaffolds and their osteogenic potential with bone marrow stromal cells, *Macromolecular Research* 19(10) (2011) 1090.
- [99] N. Sadr, B.E. Pippenger, A. Scherberich, D. Wendt, S. Mantero, I. Martin, A. Papadimitropoulos, Enhancing the biological performance of synthetic polymeric materials by decoration with engineered, decellularized extracellular matrix, *Biomaterials* 33(20) (2012) 5085-5093.

- [100] M.L. Decaris, B.Y. Binder, M.A. Soicher, A. Bhat, J.K. Leach, Cell-Derived Matrix Coatings for Polymeric Scaffolds, *Tissue Engineering Part A* 18(19-20) (2012) 2148-2157.
- [101] D.M. Faulk, R. Londono, M.T. Wolf, C.A. Ranallo, C.A. Carruthers, J.D. Wildemann, C.L. Dearth, S.F. Badylak, ECM hydrogel coating mitigates the chronic inflammatory response to polypropylene mesh, *Biomaterials* 35(30) (2014) 8585-8595.
- [102] H. Lin, G. Yang, J. Tan, R.S. Tuan, Influence of decellularized matrix derived from human mesenchymal stem cells on their proliferation, migration and multi-lineage differentiation potential, *Biomaterials* 33(18) (2012) 4480-4489.
- [103] B.C. Heng, S. Zhu, J. Xu, C. Yuan, T. Gong, C. Zhang, Effects of decellularized matrices derived from periodontal ligament stem cells and SHED on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro, *Tissue and Cell* 48(2) (2016) 133-143.
- [104] T. Bedair, I. Min, W. Park, B. Park, y.k. Joung, D. Han, Covalent immobilization of fibroblast-derived matrix on metallic Stent for expeditious re-endothelialization, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 70 (2019) 385-393.
- [105] Y. Yao, Y.-Z. Ma, M. Qin, X.-J. Ma, C. Wang, X.-Z. Feng, NHS-ester functionalized poly(PEGMA) brushes on silicon surface for covalent protein immobilization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66(2) (2008) 233-239.
- [106] A. Naba, K.R. Clauser, R.O. Hynes, Enrichment of Extracellular Matrix Proteins from Tissues and Digestion into Peptides for Mass Spectrometry Analysis, *Journal of Visualized Experiments* (101) (2015) 9.
- [107] R.C. Hill, E.A. Calle, M. Dzieciatkowska, L.E. Niklason, K.C. Hansen, Quantification of extracellular matrix proteins from a rat lung scaffold to provide a molecular readout for tissue engineering, *Molecular & Cellular Proteomics* 14(4) (2015) 961-973.
- [108] R.O. Hynes, A. Naba, Overview of the Matrisome-An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(1) (2012) a004903.
- [109] C.S. Hughes, L.M. Postovit, G.A. Lajoie, Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture, *Proteomics* 10(9) (2010) 1886-1890.
- [110] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angewandte Chemie International Edition* 48(38) (2009) 6974-6998.
- [111] J.M. Baskin, C.R. Bertozzi, Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems, *QSAR & Combinatorial Science* 26(11-12) (2007) 1211-1219.
- [112] K. Horisawa, Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry, *Frontiers in physiology* 5 (2014) 457.
- [113] S.B. Goodman, Z.Y. Yao, M. Keeney, F. Yang, The future of biologic coatings for orthopaedic implants, *Biomaterials* 34(13) (2013) 3174-3183.
- [114] S.M. Ruff, S. Keller, D.E. Wieland, V. Wittmann, G.E.M. Tovar, M. Bach, P.J. Kluger, clickECM: Development of a cell-derived extracellular matrix with azide functionalities, *Acta Biomaterialia* 52 (2017) 159-170.
- [115] Y. Zhang, C. Chai, X.S. Jiang, S.H. Teoh, K.W. Leong, Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET, *Materials Science and Engineering: C* 27(2) (2007) 213-219.

- [116] S. Jang, K. Sachin, H.J. Lee, D.W. Kim, H.S. Lee, Development of a Simple Method for Protein Conjugation by Copper-Free Click Reaction and Its Application to Antibody-Free Western Blot Analysis, *Bioconjugate Chemistry* 23(11) (2012) 2256-2261.
- [117] L. Wang, M. Zhao, S. Li, U.J. Erasquin, H. Wang, L. Ren, C. Chen, Y. Wang, C. Cai, "Click" immobilization of a VEGF-mimetic peptide on decellularized endothelial extracellular matrix to enhance angiogenesis, *ACS Applied Materials and Interfaces* 6(11) (2014) 8401-8406.
- [118] J.A. DeQuach, V. Mezzano, A. Miglani, S. Lange, G.M. Keller, F. Sheikh, K.L. Christman, Simple and High Yielding Method for Preparing Tissue Specific Extracellular Matrix Coatings for Cell Culture, *Plos One* 5(9) (2010) e13039.
- [119] Y.H. Fu, X.J. Fan, C.X. Tian, J.C. Luo, Y. Zhang, L. Deng, T.W. Qin, Q. Lv, Decellularization of porcine skeletal muscle extracellular matrix for the formulation of a matrix hydrogel: a preliminary study, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 20(4) (2016) 740-749.
- [120] M.P. Francis, P.C. Sachs, P.A. Madurantakam, S.A. Sell, L.W. Elmore, G.L. Bowlin, S.E. Holt, Electrospinning adipose tissue-derived extracellular matrix for adipose stem cell culture, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 100(7) (2012) 1716-1724.
- [121] L.I. Wassenaar, K.A. Hobson, Stable-hydrogen isotope heterogeneity in keratinous materials: mass spectrometry and migratory wildlife tissue subsampling strategies, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(16) (2006) 2505-2510.
- [122] S.M. Ruff, Herstellung und Charakterisierung einer Azid-funktionalen Extrazellulären Matrix zur Anwendung als Implantatbeschichtung, *Berichte aus Forschung und Entwicklung ; Nr. 070*, Fraunhofer Verlag, Stuttgart, 2016.
- [123] T.W. Gilbert, J.M. Freund, S.F. Badylak, Quantification of DNA in biologic scaffold materials, *The Journal of surgical research* 152(1) (2009) 135-139.
- [124] S.F. Badylak, T.W. Gilbert, Immune response to biologic scaffold materials, *Seminars in Immunology* 20(2) (2008) 109-116.
- [125] F.E. Lottspeich, J.W., *Bioanalytik*, 2. Auflage ed., Elsevier GmbH, München, 2006.
- [126] S. Vigier, T. Fülöp, *Exploring the Extracellular Matrix to Create Biomaterials, Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body*, IntechOpen, Rijeka HRV, 2016.
- [127] M. Gutmann, A. Braun, J. Seibel, T. Lühmann, Bioorthogonal Modification of Cell Derived Matrices by Metabolic Glycoengineering, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 4(4) (2018) 1300-1306.
- [128] M. Gutmann, J. Bechold, J. Seibel, L. Meinel, T. Lühmann, Metabolic Glycoengineering of Cell-Derived Matrices and Cell Surfaces: A Combination of Key Principles and Step-by-Step Procedures, *ACS Biomaterials Science & Engineering* 5(1) (2019) 215-233.
- [129] D. Shendi, J. Marzi, W. Linthicum, A.J. Rickards, D.M. Dolivo, S. Keller, M.A. Kauss, Q. Wen, T.C. McDevitt, T. Dominko, K. Schenke-Layland, M.W. Rolle, Hyaluronic acid as a macromolecular crowding agent for production of cell-derived matrices, *Acta Biomaterialia* 100 (2019) 292-305.
- [130] J.C. Moore, J.W. DeVries, M. Lipp, J.C. Griffiths, D.R. Abernethy, Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(4) (2010) 330-357.
- [131] C.V. Sapan, R.L. Lundblad, N.C. Price, Colorimetric protein assay techniques, *Biotechnology and applied biochemistry* 29(2) (1999) 99-108.

- [132] H. Tomlin, A.M. Piccinini, A complex interplay between the extracellular matrix and the innate immune response to microbial pathogens, *Immunology* 155(2) (2018) 186-201.
- [133] Email Correspondence with Dr. Sebastiano Bellanca, Technical Application Scientist II, Life Sciences Solutions at Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, 2017.
- [134] Y.K. Noh, P. Du, I.G. Kim, J. Ko, S.W. Kim, K. Park, Polymer mesh scaffold combined with cell-derived ECM for osteogenesis of human mesenchymal stem cells, *Biomaterials research* 20(1) (2016) 1-7.
- [135] Q. Xing, K. Yates, M. Tahtinen, E. Shearier, Z. Qian, F. Zhao, Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation, *Tissue Engineering Part C Methods* 21(1) (2015) 77-87.
- [136] A. Ramanathan, N. Karuri, Proteolysis of decellularized extracellular matrices results in loss of fibronectin and cell binding activity, *Biochemical and biophysical research communications* 459(2) (2015) 246-251.
- [137] J.Q. Coentro, H. Capella-Monsonis, V. Graceffa, Z. Wu, A.M. Mullen, M. Raghunath, D.I. Zeugolis, Collagen Quantification in Tissue Specimens, *Fibrosis. Methods in Molecular Biology* 1627 (2017) Humana Press, New York NY USA. 341-350.
- [138] H. Capella-Monsonis, J.Q. Coentro, V. Graceffa, Z.N. Wu, D.I. Zeugolis, An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens, *Nature Protocols* 13(3) (2018) 507-529.
- [139] S.B. Frazier, K.A. Roodhouse, D.E. Hourcade, L. Zhang, The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods, *Open Glycoscience* 1 (2008) 31-39.
- [140] V.J. Coulson-Thomas, t. ferreira, Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB), *Bio-protocol* 4(18) (2014) e1236.
- [141] F. Kubaski, H. Osago, R.W. Mason, S. Yamaguchi, H. Kobayashi, M. Tsuchiya, T. Orii, S. Tomatsu, Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry, *Molecular Genetics and Metabolism* 120(1-2) (2017) 67-77.
- [142] M. Mulisch, U. Welsch, *Romeis-Mikroskopische Technik*, Springer-Verlag, Heidelberg, 2015.
- [143] M.F. Debets, C.W. van der Doelen, F.P. Rutjes, F.L. van Delft, Azide: a unique dipole for metal-free bioorthogonal ligations, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 11(9) (2010) 1168-1184.
- [144] F. Friscourt, C.J. Fahrni, G.J. Boons, A Fluorogenic Probe for the Catalyst-Free Detection of Azide-Tagged Molecules, *Journal of the American Chemical Society* 134(45) (2012) 18809-18815.
- [145] S.T. Laughlin, J.M. Baskin, S.L. Amacher, C.R. Bertozzi, In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish, *Science* 320 (2008) 664-667.
- [146] K. Nwe, M.W. Brechbiel, Growing applications of "click chemistry" for bioconjugation in contemporary biomedical research, *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 24(3) (2009) 289-302.
- [147] C.A. DeForest, B.D. Polizzotti, K.S. Anseth, Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments, *Nature Materials* 8(8) (2009) 659-664.

- [148] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions, *Angewandte Chemie International Edition* 40 (2001) 2004-2021.
- [149] J.M. Baskin, J.A. Prescher, S.T. Laughlin, N.J. Agard, P.V. Chang, I.A. Miller, A. Lo, J.A. Codelli, C.R. Bertozzi, Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(43) (2007) 16793-16797.
- [150] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, *Angewandte Chemie International Edition* 41(14) (2002) 2596-2599.
- [151] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on solid phase:[1, 2, 3]-triazoles by regiospecific copper (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *The Journal of organic chemistry* 67(9) (2002) 3057-3064.
- [152] V. Hong, N.F. Steinmetz, M. Manchester, M.G. Finn, Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry, *Bioconjugate chemistry* 21(10) (2010) 1912-1916.
- [153] N.J. Agard, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 15046-15047.
- [154] M. Yang, J. Li, P.R. Chen, Transition metal-mediated bioorthogonal protein chemistry in living cells, *Chemical Society reviews* 43(18) (2014) 6511-6526.
- [155] D.H. Dube, C.R. Bertozzi, Metabolic oligosaccharide engineering as a tool for glycobiology, *Current opinion in chemical biology* 7(5) (2003) 616-625.
- [156] J. Koolman, J. Wirth, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, 3. vollständ. überarb., und erw. Aufl. ed., Thieme, Stuttgart [u. a.], 2003.
- [157] H.C. Hang, C. Yu, D.L. Kato, C.R. Bertozzi, A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(25) (2003) 14846-14851.
- [158] D.H. Dube, J.A. Prescher, C.N. Quang, C.R. Bertozzi, Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(13) (2006) 4819-4824.
- [159] C.T. Campbell, S.G. Sampathkumar, K.J. Yarema, Metabolic oligosaccharide engineering: perspectives, applications, and future directions, *Molecular Biosystems* 3(3) (2007) 187-194.
- [160] K.N. Chuh, B.W. Zaro, F. Piller, V. Piller, M.R. Pratt, Changes in metabolic chemical reporter structure yield a selective probe of O-GlcNAc modification, *Journal of the American Chemical Society* 136(35) (2014) 12283-12295.
- [161] S. Nellinger, S. Keller, A. Southan, V. Wittmann, A.-C. Volz, P. Kluger, Generation of an azide-modified extracellular matrix by adipose-derived stem cells using metabolic glycoengineering, *Current Directions in Biomedical Engineering* 5 (2019) 393-395.
- [162] M.J. Barnes, Function of ascorbic acid in collagen metabolism, *Annals of the New York Academy of Sciences* 258(1) (1975) 264-277.
- [163] S. Murad, D. Grove, K.A. Lindberg, G. Reynolds, A. Sivarajah, S.R. Pinnell, Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(5) (1981) 2879-2882.

- [164] S. Murad, S. Tajima, G.R. Johnson, S. Sivarajah, S.R. Pinnell, Collagen synthesis in cultured human skin fibroblasts: effect of ascorbic acid and its analogs, *Journal of Investigative Dermatology* 81(2) (1983) 158-162.
- [165] Email Correspondence with Dr. Christian Weber, Product Specialist Nucleic Acid Isolation at Analytik Jena AG, Jena Germany, 2017.
- [166] K.H. Bauer, B.C. Lippold, C. Müller-Goymann, K.H. Frömming, C. Führer, R. Schubert, J. Breitzkreuz, F. Gaedcke, H.G. Schweim, H. Schilcher, *Pharmazeutische Technologie: mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2016.
- [167] F. Hammersen, J. Sobotta, *Histologie : Atlas der Zytologie, Histologie u. der Mikroskopischen Anatomie, 2., neubearb. u. erw. Aufl. ed.*, Urban & Schwarzenberg, München [u. a.], 1979.
- [168] A.J. Olah, A. Simon, M. Gaudy, W. Herrmann, R.K. Schenk, Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain, *Stain technology* 52(6) (1977) 331-337.
- [169] J.A. Kiernan, *Histological & histochemical methods, 2. ed. ed.*, Pergamon Press, Oxford UK [u. a.], 1990.
- [170] S. Hinderer, N. Shena, L.J. Ringuette, J. Hansmann, D.P. Reinhardt, S.Y. Brucker, E.C. Davis, K. Schenke-Layland, In vitro elastogenesis: instructing human vascular smooth muscle cells to generate an elastic fiber-containing extracellular matrix scaffold, *Biomedical materials* 10(3) (2015) 034102.
- [171] R.P. Mecham, G. Lange, J. Madaras, B. Starcher, Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production, *The Journal of cell biology* 90(2) (1981) 332-338.
- [172] C. Edwards, W. O'Brien Jr, Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate, *Clinica Chimica Acta International Journal of Clinical Chemistry and Diagnostic Laboratory Medicine* 104(2) (1980) 161-167.
- [173] J.P. Bentley, A.N. Hanson, The hydroxyproline of elastin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 175(2) (1969) 339-344.
- [174] A. Dietz, T. Lubrano, H. Covault, H. Rubinstein, Correct for hydroxyproline in elastin when measuring collagen in tissues with a high elastin content, *Clinical chemistry* 28(7) (1982) 1709-1709.
- [175] R.E. Neuman, M.A. Logan, The determination of hydroxyproline, *The Journal of biological chemistry* 184(1) (1950) 299-306.
- [176] K. Hofman, B. Hall, H. Cleaver, S. Marshall, High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen, *Analytical biochemistry* 417(2) (2011) 289-291.
- [177] S. Keller, K. Wörgötter, A. Liedek, P.J. Kluger, M. Bach, G.E.M. Tovar, A. Southan, Azide-functional extracellular matrix coatings as bioactive platform for bioconjugation, *ACS Applied Materials & Interfaces* 12(24) (2020) 26868–26879.
- [178] Y. Nakayama, *Introduction to fluid mechanics*, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford UK, 2018.

- [179] O. Reynolds, XXIX. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels, *Philosophical Transactions of the Royal society of London (174)* (1883) 935-982.
- [180] I. Tosun, D. Uner, C. Ozgen, Critical Reynolds number for Newtonian flow in rectangular ducts, *Industrial & engineering chemistry research* 27(10) (1988) 1955-1957.
- [181] Y.A. Çengel, J.M. Cimbala, *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*. McGraw-Hill Companies, Inc., New York NY USA, 2006.
- [182] R.J. Crawford, P.J. Martin, *Plastics engineering*, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford UK, 2020.
- [183] N. Salehi-Nik, P. Banikarimi, G. Amoabediny, B. Pouran, M. Shokrgozar, B. Zandieh Doulabi, J. Klein-Nulend, Flow Preconditioning of Endothelial Cells on Collagen-Immobilized Silicone Fibers Enhances Cell Retention and Antithrombotic Function, *Artificial organs* 41(6) (2016) 556-567.
- [184] J. Vyorykka, M. Halttunen, H. Iitti, J. Tenhunen, T. Vuorinen, P. Stenius, Characteristics of immersion sampling technique in confocal Raman depth profiling, *Applied Spectroscopy* 56(6) (2002) 776-782.
- [185] R. Storn, K. Price, Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for global Optimization over Continuous Spaces, *Journal of Global Optimization* 11(4) (1997) 341-359.
- [186] P. Virtanen, R. Gommers, T.E. Oliphant, M. Haberland, T. Reddy, D. Cournapeau, E. Burovski, P. Peterson, W. Weckesser, J. Bright, SciPy 1.0--fundamental algorithms for scientific computing in Python, *Nature methods* 17(3) (2020) 261-272.
- [187] The SciPy community (2019). Aufgerufen am: 27. Januar 2020, von: https://docs.scipy.org/doc/scipy-1.2.1/reference/generated/scipy.optimize.differential_evolution.html
- [188] J. Brinckmann, M. Bodo, M. Brey, H. Wolff, P. Müller, Analysis of the age-related composition of human skin collagen and collagens synthesized by fibroblast culture, *Archives of dermatological research* 286(7) (1994) 391-395.
- [189] E.D. Goddard-Borger, R.V. Stick, An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: Imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride, *Organic Letters* 9(19) (2007) 3797-3800.
- [190] S.F.M. van Dongen, R.L.M. Teeuwen, M. Nallani, S.S. van Berkel, J.J.L.M. Cornelissen, R.J.M. Nolte, J.C.M. van Hest, Single-Step Azide Introduction in Proteins via an Aqueous Diazo Transfer, *Bioconjugate chemistry* 20(1) (2009) 20-23.
- [191] G. Yilmaz, M.U. Kahveci, Y. Yagci, A one pot, one step method for the preparation of clickable hydrogels by photoinitiated polymerization, *Macromolecular rapid communications* 32(23) (2011) 1906-1909.
- [192] L. Sewald, C. Claassen, T. Gotz, M.H. Claassen, V. Truffault, G.E.M. Tovar, A. Southan, K. Borchers, Beyond the Modification Degree: Impact of Raw Material on Physicochemical Properties of Gelatin Type A and Type B Methacryloyls, *Macromolecular bioscience* 18(12) (2018) e1800168.
- [193] J.W. Janus, A.W. Kenchington, A.G. Ward, A rapid method for the determination of the isoelectric point of gelatin using mixed bed deionization, *Research; a journal of science and its applications* 4(5) (1951) 247-248.

- [194] Swiss Institute of bioinformatics (SIB), ExPASy bioinformatics resource portal (2011). Aufgerufen am: 22. April 2018, von: <https://www.expasy.org>
- [195] S. Hattori, E. Adachi, T. Ebihara, T. Shirai, I. Someki, S. Irie, Alkali-treated collagen retained the triple helical conformation and the ligand activity for the cell adhesion via $\alpha 2\beta 1$ integrin, *The Journal of Biochemistry* 125(4) (1999) 676-684.
- [196] A.F. Habeeb, Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid, *Analytical biochemistry* 14(3) (1966) 328-336.
- [197] H. Zhang, L. Wang, L. Song, G. Niu, H. Cao, G. Wang, H. Yang, S. Zhu, Controllable properties and microstructure of hydrogels based on crosslinked poly (ethylene glycol) diacrylates with different molecular weights, *Journal of Applied Polymer Science* 121(1) (2011) 531-540.
- [198] J.A. Barltrop, T.C. Owen, A.H. Cory, J.G. Cory, 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1(11) (1991) 611-614.
- [199] C. Goodwin, S. Holt, S. Downes, N. Marshall, Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS, *Journal of immunological methods* 179(1) (1995) 95-103.
- [200] Keller, S.; Liedek, A.; Shendi, D.; Bach, M.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P. J.; Southan, A. Eclectic Characterisation of Chemically Modified Cell-Derived Matrices Obtained by Metabolic Glycoengineering and Re-Assessment of Commonly Used Methods, *RSC Advances* 10(58) (2020) 35273-35286.
- [201] S. Pouilly, V. Piller, F. Piller, Metabolic glycoengineering through the mammalian GalNAc salvage pathway, *The FEBS journal* 279(4) (2012) 586-598.
- [202] O.T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidts, W. Reutter, Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications, *Glycobiology* 11(2) (2001) 11R-18R.
- [203] J.A. Prescher, D.H. Dube, C.R. Bertozzi, Chemical remodelling of cell surfaces in living animals, *Nature* 430(7002) (2004) 873-877.
- [204] S.T. Laughlin, N.J. Agard, J.M. Baskin, I.S. Carrico, P.V. Chang, A.S. Ganguli, M.J. Hangauer, A. Lo, J.A. Prescher, C.R. Bertozzi, Metabolic labeling of glycans with azido sugars for visualization and glycoproteomics, in: M. Fukuda (Ed.), *Glycobiology*, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, 2006, 230-250.
- [205] O.S. Rabotyagova, P. Cebe, D.L. Kaplan, Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation, *Materials Science and Engineering: C* 28(8) (2008) 1420-1429.
- [206] A. BioMatrix, Analysis of Type I Collagen Products, Advanced BioMatrix, Carlsbad CA USA.
- [207] A. Reddi, K.A. Piez, *Extracellular matrix biochemistry*, Elsevier New York NY USA, 1984.
- [208] A. Byron, M.J. Randles, J.D. Humphries, A. Mironov, H. Hamidi, S. Harris, P.W. Mathieson, M.A. Saleem, S.C. Satchell, R. Zent, M.J. Humphries, R. Lennon, Glomerular Cell Cross-Talk Influences Composition and Assembly of Extracellular Matrix, *Journal of the American Society of Nephrology* 25(5) (2014) 953-966.
- [209] G. Jensen, *Cryo-EM Part A: sample preparation and data collection*, Academic Press, Cambridge MA USA, 2010.

- [210] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, A. Barbarisi, From cell-ECM interactions to tissue engineering, *Journal of Cellular Physiology* 199(2) (2004) 174-180.
- [211] R. Lennon, A. Byron, J.D. Humphries, M.J. Randles, A. Carisey, S. Murphy, D. Knight, P.E. Brenchley, R. Zent, M.J. Humphries, Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix, *Journal of the American Society of Nephrology* 25(5) (2014) 939-951.
- [212] A.P. Rameshbabu, P. Ghosh, E. Subramani, K. Bankoti, K. Kapat, S. Datta, P.P. Maity, B. Subramanian, S. Roy, K. Chaudhury, S. Dhara, Investigating the potential of human placenta-derived extracellular matrix sponges coupled with amniotic membrane-derived stem cells for osteochondral tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry B* 4(4) (2016) 613-625.
- [213] G. Montes, L. Junqueira, The use of the Picosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86 (1991) 1-11.
- [214] L.C. Junqueira, G. Bignolas, R.R. Brentani, Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections, *The Histochemical journal* 11(4) (1979) 447-455.
- [215] R. Lattouf, R. Younes, D. Lutomski, N. Naaman, G. Godeau, K. Senni, S. Changotade, Picosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 62(10) (2014) 751-758.
- [216] J.G. Smith, E.A. Davidson, W.M. Sams, R.D. Clark, Alterations in Human Dermal Connective Tissue with Age and Chronic Sun Damage, *Journal of Investigative Dermatology* 39(4) (1962) 347-350.
- [217] M. Yamaguchi, Determination of the nitrogen-to-protein conversion factor in cereals, Seed analysis, Springer, Berlin, Heidelberg, 1992, 95-107.
- [218] F. Mariotti, D. Tome, P.P. Mirand, Converting nitrogen into Protein - Beyond 6.25 and Jones' factors, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(2) (2008) 177-184.
- [219] D.B. Jones, Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins, US Department of Agriculture, Washington, D. C. USA, 1931.
- [220] G.J. Mulder, Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen, *Journal für Praktische Chemie* 16(1) (1839) 129-152.
- [221] U. Consortium, UniProt: a hub for protein information, *Nucleic acids research* 43(Database issue) (2015) D204-D212.
- [222] European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), I.S.I.o. Bioinformatics, P.I.R. (PIR), Universal Protein Resource (UniProt). (2002). Aufgerufen am: 04. Mai 2020, von: <https://www.uniprot.org>
- [223] P. Bornstein, K.A. Piez, A biochemical study of human skin collagen and the relation between intra-and intermolecular cross-linking, *The Journal of clinical investigation* 43(9) (1964) 1813-1823.
- [224] T. Miyahara, S. Shiozawa, A. Murai, The effect of age on amino acid composition of human skin collagen, *Journal of gerontology* 33(4) (1978) 498-503.
- [225] C. Claaßen, M.H. Claaßen, V. Truffault, L. Sewald, G.E.M. Tovar, K. Borchers, A. Southan, Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls, *Biomacromolecules* 19(1) (2018) 42-52.

- [226] D.J. Hulmes, Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures, *Journal of structural biology* 137(1-2) (2002) 2-10.
- [227] C.M. Kielty, M.E. Grant, The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix, *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects* (2002) 159-221.
- [228] B. Brodsky, A.V. Persikov, Molecular structure of the collagen triple helix, *Advances in protein chemistry* 70 (2005) 301-339.
- [229] D.J. Etherington, T.J. Sims, Detection and estimation of collagen, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32(6) (1981) 539-546.
- [230] E. Chung, E.J. Miller, Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition [$\alpha 1$ (III)]₃ in human tissues, *Science* 183(4130) (1974) 1200-1201.
- [231] R.J. Ellis, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in biochemical sciences* 26(10) (2001) 597-604.
- [232] C.H. Zheng, M.E. Levenston, Fact versus artifact: avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs, *European cells & materials* 29 (2015) 224-236.
- [233] D.M. Templeton, The basis and applicability of the dimethylmethylene blue binding assay for sulfated glycosaminoglycans, *Connective Tissue Research* 17(1) (1988) 23-32.
- [234] S. Pellegrin, H. Mellor, Actin stress fibres, *Journal of Cell Science* 120(20) (2007) 3491.
- [235] V.K. Lai, D.S. NedreLOW, S.P. Lake, B. Kim, E.M. Weiss, R.T. Tranquillo, V.H. Barocas, Swelling of Collagen-Hyaluronic Acid Co-Gels: An In Vitro Residual Stress Model, *Annals of biomedical engineering* 44(10) (2016) 2984-2993.
- [236] P.C. Weber, D.H. Ohlendorf, J. Wendoloski, F. Salemme, Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin, *Science* 243(4887) (1989) 85-88.
- [237] F. Reyes-Ortega, F.J. Parra-Ruiz, S.E. Averick, G. Rodríguez, M.R. Aguilar, K. Matyjaszewski, J. San Román, Smart heparin-based bioconjugates synthesized by a combination of ATRP and click chemistry, *Polymer Chemistry* 4(9) (2013) 2800-2814.
- [238] M. Jaiswal, A. Gupta, A.K. Dinda, V. Koul, An investigation study of gelatin release from semi-interpenetrating polymeric network hydrogel patch for excision wound healing on Wistar rat model, *Journal of Applied Polymer Science* 132(25) (2015).
- [239] Y. Fu, K. Xu, X. Zheng, A.J. Giacomini, A.W. Mix, W.J. Kao, 3D cell entrapment in crosslinked thiolated gelatin-poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels, *Biomaterials* 33(1) (2012) 48-58.
- [240] Keller, S.; Bakker, T.; Kimmel, B.; Rebers, L.; Götz, T.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P.J.; Southan, A. Azido-functionalized gelatin via direct conversion of lysine amino groups by diazo transfer as a building block for biofunctional hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 109(1) (2021) 77-91.
- [241] V. Rodin, I. V.N., NMR method in the study of the interfacial adsorption layer of gelatin, *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* 106 (1996) 95-102.
- [242] X.S. Gai, B.A. Coutifaris, S.H. Brewer, E.E. Fenlon, A direct comparison of azide and nitrile vibrational probes, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13(13) (2011) 5926-5930.

- [243] E. Hoch, T. Hirth, G.E.M. Tovar, K. Borchers, Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting, *Journal of Materials Chemistry B* 1(41) (2013) 5675-5685.
- [244] J. Van Hoorick, P. Gruber, M. Markovic, M. Tromayer, J. Van Erps, H. Thienpont, R. Liska, A. Ovsianikov, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, Cross-Linkable Gelatins with Superior Mechanical Properties Through Carboxylic Acid Modification: Increasing the Two-Photon Polymerization Potential, *Biomacromolecules* 18(10) (2017) 3260-3272.
- [245] R. Schrieber, H. Gareis, *Gelatine handbook: theory and industrial practice*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey NJ USA, 2007.
- [246] A.I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E.H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels, *Biomacromolecules* 1(1) (2000) 31-38.
- [247] D. Hua, W. Bai, J. Xiao, R. Bai, W. Lu, C. Pan, A Strategy for Synthesis of Azide Polymers via Controlled/Living Free Radical Copolymerization of Allyl Azide under ^{60}Co γ -ray Irradiation, *Chemistry of Materials* 17(18) (2005) 4574-4576.
- [248] B.S. Sumerlin, N.V. Tsarevsky, G. Louche, R.Y. Lee, K. Matyjaszewski, Highly Efficient "Click" Functionalization of Poly(3-azidopropyl methacrylate) Prepared by ATRP, *Macromolecules* 38(18) (2005) 7540-7545.
- [249] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, *The Journal of biological chemistry* 177(2) (1949) 751-766.
- [250] Y. Berkovitch, D. Seliktar, Semi-synthetic hydrogel composition and stiffness regulate neuronal morphogenesis, *International Journal of Pharmaceutics* 523(2) (2017) 545-555.
- [251] E.W. Merrill, K.A. Dennison, C. Sung, Partitioning and diffusion of solutes in hydrogels of poly(ethylene oxide), *Biomaterials* 14(15) (1993) 1117-1126.
- [252] H.B. Bohidar, S.S. Jena, Kinetics of sol-gel transition in thermoreversible gelation of gelatin, *The Journal of Chemical Physics* 98(11) (1993) 8970-8977.
- [253] J.M. Gutteridge, S. Wilkins, Copper salt-dependent hydroxyl radical formation. Damage to proteins acting as antioxidants, *Biochimica et biophysica acta* 759(1-2) (1983) 38-41.
- [254] B. Yañez-Soto, S.J. Liliensiek, C.J. Murphy, P.F. Nealey, Biochemically and topographically engineered poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomimetic characteristics as substrates for human corneal epithelial cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101(4) (2013) 1184-1194.
- [255] M.L. Cuchiara, S. Coşkun, O.A. Banda, K.L. Horter, K.K. Hirschi, J.L. West, Bioactive poly(ethylene glycol) hydrogels to recapitulate the HSC niche and facilitate HSC expansion in culture, *Biotechnology and Bioengineering* 113(4) (2016) 870-881.
- [256] C.G. Williams, A.N. Malik, T.K. Kim, P.N. Manson, J.H. Elisseeff, Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation, *Biomaterials* 26(11) (2005) 1211-1218.
- [257] R.G. Wells, The role of matrix stiffness in regulating cell behavior, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47(4) (2008) 1394-1400.
- [258] R. Sunyer, A.J. Jin, R. Nossal, D.L. Sackett, Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response, *PLoS One* 7(10) (2012) e46107.

- [259] L.-S. Wang, J.E. Chung, M. Kurisawa, Controlling fibroblast proliferation with dimensionality-specific response by stiffness of injectable gelatin hydrogels, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 23(14) (2012) 1793-1806.
- [260] J.F. Bateman, J.J. Pillow, T. Mascara, S. Medvedec, J.A. Ramshaw, W. Cole, Cell-layer-associated proteolytic cleavage of the telopeptides of type I collagen in fibroblast culture, *Biochemical Journal* 245(3) (1987) 677-682.
- [261] D. Cigognini, D. Gaspar, P. Kumar, A. Satyam, S. Alagesan, C. Sanz-Nogués, M. Griffin, T. O'Brien, A. Pandit, D.I. Zeugolis, Macromolecular crowding meets oxygen tension in human mesenchymal stem cell culture-A step closer to physiologically relevant in vitro organogenesis, *Scientific reports* 6(1) (2016) 1-11.
- [262] A. Satyam, P. Kumar, X. Fan, A. Gorelov, Y. Rochev, L. Joshi, H. Peinado, D. Lyden, B. Thomas, B. Rodriguez, Macromolecular crowding meets tissue engineering by self-assembly: A paradigm shift in regenerative medicine, *Advanced materials* 26(19) (2014) 3024-3034.
- [263] M.C. Prewitz, A. Stißel, J. Friedrichs, N. Träber, S. Vogler, M. Bornhäuser, C. Werner, Extracellular matrix deposition of bone marrow stroma enhanced by macromolecular crowding, *Biomaterials* 73 (2015) 60-69.
- [264] A.S. Zeiger, F.C. Loe, R. Li, M. Raghunath, K.J. Van Vliet, Macromolecular crowding directs extracellular matrix organization and mesenchymal stem cell behavior, *PloS one* 7(5) (2012) e37904.
- [265] A. Liedek, Biologische Charakterisierung einer Azid-modifizierten extrazellulären Matrix, Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP Universität Stuttgart, Stuttgart, 2018.
- [266] K.A. Piez, J. Gross, The amino acid composition of some fish collagens: The relation between composition and structure, *Journal of Biological Chemistry* 235(4) (1960) 995-998.
- [267] J. Eastoe, The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin, *Biochemical Journal* 61(4) (1955) 589.
- [268] M. Stoltz, H. Furthmayr, R. Timpl, Increased lysine hydroxylation in rat bone and tendon collagen and localization of the additional residues, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure* 310(2) (1973) 461-468.
- [269] A.J. Bailey, T.J. Sims, Chemistry of the collagen cross-links. Nature of the cross-links in the polymorphic forms of dermal collagen during development, *Biochemical Journal* 153(2) (1976) 211-215.
- [270] N.A. Kefalides, Isolation and characterization of cyanogen bromide peptides from basement membrane collagen, *Biochemical and biophysical research communications* 47(5) (1972) 1151-1158.
- [271] R.W. Glanville, A. Rauter, P.P. Fietzek, Isolation and Characterization of a Native Placental Basement-Membrane Collagen and Its Component α Chains, *European journal of biochemistry* 95(2) (1979) 383-389.

Verwertungsrechte

Für alle vorab veröffentlichten Teile dieser Dissertationsschrift wurden vorab die Verwertungsrechte eingeholt.

Keller, S.; Liedek, A.; Shendi, D.; Bach, M.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P. J.; Southan, A. Eclectic Characterisation of Chemically Modified Cell-Derived Matrices Obtained by Metabolic Glycoengineering and Re-Assessment of Commonly Used Methods, RSC Advances 10(58) (2020) 35273-35286. <https://doi.org/10.1039/D0RA06819E>

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence. Material from this article can be used in other publications provided that the correct acknowledgement is given with the reproduced material.

Keller, S.; Wörgötter, K.; Liedek, A.; Kluger, P. J.; Bach, M.; Tovar, G.E.M.; Southan, A. Azide-Functional Extracellular Matrix Coatings as a Bioactive Platform for Bioconjugation, ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c04579>

Reprinted (adapted) with permission from (S. Keller, K. Wörgötter, A. Liedek, P.J. Kluger, M. Bach, G.E.M. Tovar, A. Southan, Azide-functional extracellular matrix coatings as bioactive platform for bioconjugation, ACS Applied Materials & Interfaces). Copyright (2020) American Chemical Society."

Keller, S.; Bakker, T.; Kimmel, B.; Rebers, L.; Götz, T.; Tovar, G.E.M.; Kluger, P.J.; Southan, A. Azido-functionalized gelatin via direct conversion of lysine amino groups by diazo transfer as a building block for bifunctional hydrogels. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2020; 1– 15. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37008>

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Permission is not required for this type of reuse.

Shendi, D.; Marzi, J.; Linthicum, W., Rickards, A.J.; Dolivo, D., Keller, S.; Krauss, A.; Wen, Q.; McDevitt, TC.; Dominko, T.; Shenke-Layland, K.; Rolle, M.W. Hyaluronic acid as a macromolecular crowding agent for production of cell-derived matrices, Acta Biomaterialia, 2019, 100, 292-305. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.042>

As the author of this Elsevier article, the right to include it in a thesis or dissertation are retained, provided it is not published commercially. Permission is not required.

S.M. Ruff*, S. Keller*, D.E. Wieland, V. Wittmann, G.E.M. Tovar, M. Bach, P.J. Kluger, clickECM: Development of a cell-derived extracellular matrix with azide functionalities, Acta Biomaterialia 52 (2017) 159-170. (*shared first authors). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.022>

As the author of this Elsevier article, the right to include it in a thesis or dissertation are retained, provided it is not published commercially. Permission is not required.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Silke Keller, geboren am 07.04.1988 in Leonberg, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

*„Gewinnung und Charakterisierung biogener Azid-modifizierter Extrazellulärer Matrix
als click-chemisch vernetzbares Biomaterial“*

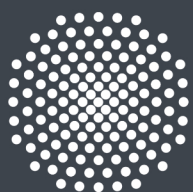
selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommen Stellen deutlich als solche gekennzeichnet habe.

Ich versichere, dass diese Dissertationsschrift bisher weder im In- noch im Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt wurde oder sonstigen Prüfungszwecken gedient hat.

Stuttgart, den

.....

Silke Keller



Dissertation vorgelegt an der
Universität Stuttgart