

# Hydrogele aus Polyethylenglykol und methacryloylierter Gelatine für biosensorische Oberflächen

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

Vorgelegt von  
**Jana Grübel**  
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Günter E. M. Tovar  
Mitberichterin: Prof. Dr. Christina Wege

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP  
der Universität Stuttgart  
2024



*Wirklich innovativ ist man nur dann,  
wenn mal etwas danebengegangen ist.*

Woody Allen



## Danksagung

Viele Personen haben mich während meiner Promotion für ein Stück oder den ganzen Weg begleitet, mich unterstützt und an mich geglaubt. Ich habe in dieser Zeit viel dazugelernt. Dafür bin ich sehr dankbar.

Ich danke meinem Doktorvater und Betreuer **Prof. Dr. Günter E. M. Tovar** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP schreiben zu dürfen. Vielen Dank für dein Vertrauen in meine Fähigkeiten von Beginn an, deinen Zuspruch und den wertvollen wissenschaftlichen Austausch.

Bei meinem fachlichen Betreuer und Leiter unserer Gruppe Chemisch-physikalische Grenzflächen, **Dr. Alexander Southan**, möchte ich mich herzlich für die regelmäßigen Besprechungen und hilfreichen Diskussionen bedanken. Ich habe sehr viel von dir gelernt.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Christina Wege** vom Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme IBBS für die Übernahme des Zweitgutachtens, wertvolle Diskussionen und die Möglichkeit, Versuche am IBBS durchführen zu können. Ebenfalls bedanke ich mich bei **Dr. Tim Wendlandt** für die Unterstützung bei praktischen Versuchen am IBBS.

Vielen Dank an das Innovationsfeld Funktionale Oberflächen und Materialien am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass ich die Labore und Geräte nutzen konnte. Besonderer Dank gilt dabei **Dr. Michaela Müller, Melanie Dettling, Veronika Schönhaar, Regina Buck, Sarah Schmidt** und **Dr. Achim Weber**.

Bei der **Evonik-Stiftung** möchte ich mich ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen **Dr. Lena Marie Spindler, Dr. Andre Michele, Anastasia Tsianaka, Paul Reichle, Nils von Seggern, Oliver Gorke, Dr. Tobias Götz, Dr. Silke Riegger** und **Dr. Lisa Rebers**. Ich danke euch für die großartige Arbeitsatmosphäre, die Unterstützung im Arbeitsalltag und all die schönen und witzigen Momente, die die Zeit an der Uni zu etwas ganz Besonderem gemacht haben.

Herzlichen Dank an meine Studentinnen **Miriam Seitz, Silia Quirin, Rahel Rauleder, Rebecca Hirsch, Corinna Jauch, Daniela Urban** und **Maria Zyrianova**. Danke für eure Neugier, Motivation und praktischen Arbeiten, die mir sehr geholfen haben.

Danke an **Tobias Granse** und **Jessica Braun** vom Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA für die Möglichkeit, die Labore nutzen zu können und die Einführung in den *Inkjet*-Druck.

Vielen Dank an meine Projektpartner **Alexander Peter** vom Institut für Strahlwerkzeuge IFSW, **Kai Hirzel** und **Jun. Prof. Dr. Michael Heymann** vom IBBS für die gute Zusammenarbeit und das Hinausblicken über den Tellerrand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freunden und dabei insbesondere bei **Lena, Rebecca, Ira, Jan, Lennart, Liane** und **Alexandra** für die Unterstützung und die aufmunternden Worte bedanken. Und vor allem auch danke für alles, was für Abwechslung gesorgt hat. Ich bin sehr froh, auf euch zählen zu können.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie. Vielen Dank an meine **Eltern**, meinen **Bruder** und meine **Schwägerin**. Ich danke euch dafür, dass ich diese Laufbahn wählen konnte. Danke für eure Unterstützung und euren Rückhalt, ohne euch wäre es nicht möglich gewesen.

Und zu guter Letzt danke ich dir, **Jens**. Danke, dass du mich immer bestärkt hast, mir Geborgenheit schenkst und für mich da bist.

---

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Abkürzungen und Symbole .....	V
Kurzzusammenfassung .....	XI
Abstract .....	XIV
1. Einleitung .....	1
1.1 Herstellung von Hydrogelen .....	1
1.2 Eigenschaften und Anwendungen von Polyethylenglykol-basierten Hydrogelen .....	2
1.3 Eigenschaften und Anwendungen von Hydrogelen auf Basis von methacryloylierter Gelatine .....	4
1.4 Funktionalisierungen von Polymeren und Polymernetzwerken .....	6
1.4.1 Funktionalisierungen mit Monomeren .....	6
1.4.2 Funktionalisierungen mit Isothiuroniumgruppen oder Thiolen .....	9
1.4.3 Biofunktionalisierung von Polymeren und Polymernetzwerken .....	10
1.5 Druckverfahren für Biopolymere .....	11
1.5.1 Druckverfahren mit UV-Vernetzung .....	11
1.5.2 Druckverfahren mit 2-Photonen-Polymerisation .....	15
1.6 Biosensoren .....	17
1.6.1 Hydrogele als Komponenten für Biosensoren .....	17
1.6.2 Biosensoren mit Tabakmosaikviren .....	20
2. Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit .....	24
2.1 Zielsetzung der Arbeit .....	24
2.2 Hypothesen .....	25
3. Polyethylenglykol-basierte Hydrogele mit verfügbaren Isothiuroniumgruppen .....	29
3.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung .....	29
3.2 Preparation of multifunctional hydrogels with accessible isothiuronium groups via radical cross-linking copolymerization .....	31
3.2.1 Abstract .....	32
3.2.2 Introduction .....	32
3.2.3 Experimental Section .....	34
3.2.4 Results and Discussion .....	40
3.2.5 Conclusions .....	49
3.2.6 Acknowledgements .....	49
3.2.7 Author Contributions .....	50
3.2.8 Supporting Information .....	51

4. Vernetzung von Hydrogelen aus methacryloylierter Gelatine mit 2-Photonen-Polymerisation.....	58
4.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung.....	58
4.2 Two-photon printing of arbitrary hydrogel structures using 3D beam shaping with high throughput rates.....	59
4.2.1 Abstract.....	60
4.2.2 Introduction.....	60
4.2.3 Materials and Methods.....	61
4.2.4 Results.....	65
4.2.5 Discussion.....	69
4.2.6 Conclusion.....	70
4.2.7 Author Contributions.....	71
4.2.8 Supporting Information.....	72
5. Hydrogel-basierte biosensorische Oberflächen in Kombination mit Tabakmosaikviren .	75
5.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung.....	75
5.2 Soft sub-structured multi-material biosensor hydrogels with enzymes retained by plant viral scaffolds.....	77
5.2.1 Abstract.....	78
5.2.2 Introduction.....	78
5.2.3 Results and Discussion.....	80
5.2.4 Conclusions.....	91
5.2.5 Experimental Section.....	91
5.2.6 Acknowledgements.....	97
5.2.7 Author Contributions.....	97
5.2.8 Supporting Information.....	98
6. Diskussion.....	106
6.1 Diskussion zu Hypothese I.....	106
6.2 Diskussion zu Hypothese II.....	110
6.3 Diskussion zu Hypothese III.....	116
7. Schlussfolgerungen.....	120
8. Ausblick.....	123
I. Anhang.....	XVII
I.I Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation.....	XVII
I.II Lebenslauf.....	XVIII
II. Abbildungsverzeichnis.....	XIX
III. Tabellenverzeichnis.....	XXVI
IV. Literaturverzeichnis.....	XXVII



## Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
(k)Da	(kilo)Dalton
(P)MMA	(Poly)Methylmethacrylat
*	Signifikanzlevel $p < 0,05$
**	Signifikanzlevel $p < 0,01$
***	Signifikanzlevel $p < 0,001$
[LAP] <sub>(0)</sub>	(ursprüngliche) LAP-Konzentration, in $\text{mg mL}^{-1}$
°C	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{S}$	Mikro-Siemens
<sup>1</sup> H-NMR	Englisch: <i>proton nuclear magnetic resonance</i> , Protonen-Kernmagnetresonanz
2PP	Englisch: <i>2-photon polymerization</i> , 2-Photonen-Polymerisation
3D	dreidimensional
3DBSP	Englisch: <i>3D beam shape printing</i>
A	Englisch: <i>surface area</i> , Flächeninhalt, in $\text{mm}^2$
Å	Angström
a.u.	Englisch: <i>arbitrary units</i> , willkürliche Einheit
AAm	Acrylamid
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
$a_e$	Konzentration im gequollenen Hydrogel, in $\mu\text{mol g}^{-1}$
ANOVA	Varianzanalyse
ASC	Englisch: <i>adipose-derived stem cells</i> , aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen
AUITB	2-(11-(Acryloyloxy)undecyl)isothiuroniumbromid
AUPDS	<i>p</i> -(11-Acrylamido)undecanoyloxyphenyldimethylsulfonium-methylsulfat
AUTMAB	(11-(Acryloyloxy)undecyl)trimethylammoniumbromid
BC	nicht sulfatiertes biotechnologisch hergestelltes Chondroitin

BSA	bovines Serumalbumin
CA	Englisch: <i>contact angle</i> , Kontaktwinkel, in °
CAD	Englisch: <i>computer-aided design</i>
$c_e$	Gleichgewichtskonzentration im Überstand, in $\mu\text{mol mL}^{-1}$
CFU	Englisch: <i>colony forming units</i> , Kolonie-bildende Einheiten
CIJ	Englisch: <i>continuous Inkjet</i> , kontinuierlicher <i>Inkjet</i> -Druck
cm	Zentimeter
CNT	Englisch: <i>carbon nanotubes</i>
CP	Englisch: <i>coat protein</i> , Hüllprotein
CS	Chondroitinsulfat
d	Englisch: <i>day</i> , Tag
$d$	Durchmesser, in $\mu\text{m}$
DLP	Englisch: <i>digital light processing</i> , digitale Lichtverarbeitung
DLW	Englisch: <i>direct laser writing</i>
DMA	Dimethacrylat
DOD	Englisch: <i>drop-on-demand</i> , Tropfen auf Anforderung
dpi	Englisch: <i>dots per inch</i>
dPS	deuteriertes Polystyrol
DSC	Englisch: <i>differential scanning calorimetry</i> , dynamische Differenzkalorimetrie
DSS	Englisch: <i>diclofenac sodium salt</i> , Diclofenac-Natriumsalz
$E$	Englisch: <i>enhancement factors</i> , Anreicherungsfaktoren
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>e.g.</i>	Latein: <i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
ECM	Englisch: <i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDS	Englisch: <i>equilibrium degree of swelling</i> , Quellgrad
EGDMA	Ethylenglykol-Dimethacrylat
EIS	Englisch: <i>electrolyte-insulator-semiconductor</i> , Elektrolyt-Isolator-Halbleiter
<i>et al.</i>	Latein: <i>et alii</i> , und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
fs	Femtosekunden
g	Gramm

$G'$	Speichermodul, in Pa
$G''$	Verlustmodul, in Pa
GAG	Glykosaminoglykane
GM	Englisch: <i>gelatin methacryloyl</i> , methacryloylierte Gelatine
GMA	Methacryloylierte und acetylierte Gelatine
GOx	Glucoseoxidase
h	Englisch: <i>hour</i> , Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HAM	Methacrylierte Hyaluronsäure
HAp	Hydroxyapatit
HPAA	Englisch: <i>hyperbranched poly(amido amine)</i> , hochverzweigtes Poly(Amidoamin)
HRP	Englisch: <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
$I$	Laser-Intensität, in W cm <sup>-2</sup>
<i>i.e.</i>	Latein: <i>id est</i> , das heißt
IEP	Isoelektrischer Punkt
J	Joule
$K_d$	Dissoziationskonstante, in mol L <sup>-1</sup>
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante, in mol L <sup>-1</sup>
$K_s$	Gleichgewichtskonstante, in mL μmol <sup>-1</sup>
L929-Zellen	Fibroblasten-Zelllinie aus der Maus
LAP	Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat
LVER	Englisch: <i>linear visco-elastic range</i> , linear viskoelastischer Bereich
$m$	Masse, in g
MAAnh	Methacrylsäureanhydrid
MAC	Methacryliertes Kollagen
MAETAC	(Methacryloyloxy)ethyltrimethylammoniumchlorid
$M_c$	Englisch: <i>molecular weight between cross-links</i> , Molekulargewicht zwischen Vernetzungspunkten, in g mol <sup>-1</sup>
MC3T3-E1-Zellen	Osteoblasten-Vorläuferzelllinie aus der Maus
MEDDAB	(2-(Methacryloyloxy)ethyl)dodecyldimethylammoniumbromid

MEMS	Englisch: <i>micro-electromechanical systems</i> , mikroelektro-mechanische Systeme
MET	11-(Methacryloyloxy)undecanylsulfat
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
mmol	millimol
$M_n$	Zahlenmittlere Molmasse, in $\text{g mol}^{-1}$
MW	Molekulargewicht, in $\text{g mol}^{-1}$
N	Newton
NA	Numerische Apertur
nA	nano-Ampere
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIPAAm	<i>N</i> -isopropylacrylamid
nm	Nanometer
NP	Nanopartikel
NT	Englisch: <i>non-treated</i> , nicht behandelt
<i>Oh</i>	Ohnesorge-Zahl
<i>P</i>	Englisch: <i>laser power</i> , Laser-Leistung, in W
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PEG-DA, PEGDA	Polyethylenglykol-Diacrylat, <i>poly(ethylene glycol) diacrylate</i>
PEG-DM	Polyethylenglykol-Dimethacrylat
PEG-MEA	Polyethylenglykol-Methylether-Acrylat
Pen	Penicillinase
PEO	Polyethylenoxid
PET	Polyethylenterephthalat
pH	Latein: <i>pondus hydrogenii</i> , Potenzial des Wasserstoffs
PHEMA	Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)
PI	Photoinitiator
PITMS	Polyisothiuronium-Methylstyrol

---

pKs	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pL	Pikoliter
PME3MA	Poly(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethylmethacrylat)
ppm	Englisch: <i>parts per million</i>
ps	Pikosekunden
PS	Polystyrol
Pt	Platin
PVA	Polyvinylalkohol
$q_m$	Adsorptionskapazität, in $\mu\text{mol g}^{-1}$
$r_0$	Reaktionsrate, in $\text{s}^{-1}$
RAFT-Polymerisation	Englisch: <i>reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization</i> , reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation
$Re$	Reynolds-Zahl
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Englisch: <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, in $^{\circ}\text{C}$
s	Sekunde
SA	Streptavidin
SE	Englisch: <i>surface energy</i> , Oberflächenenergie, in $\text{mN m}^{-1}$
SLA	Stereolithographie
SMAS	Englisch: <i>sodium methallyl sulfonate</i> , Natriummethallylsulfonat
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galactosidase
T	Englisch: <i>treated</i> , behandelt
TE	Englisch: <i>tissue engineering</i> , Gewebezüchtung
TEM	Englisch: <i>transmission electron microscopy</i> , Transmissions-elektronenmikroskopie
TMV	Englisch: <i>tobacco mosaic virus</i> , Tabakmosaikvirus
TMV <sub>Cys</sub>	Cysteinmutante des TMV
TMV <sub>Cys</sub> -Bio	Cysteinmutante des TMV gekoppelt an Biotin-enthaltenden Linker
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett

$v$	Englisch: <i>scan speed</i> , Scan-Geschwindigkeit, in $\text{mm s}^{-1}$
$V$	Volumen, in mL
V	Volt
vol%	Volumenprozent
W	Watt
WCA	Englisch: <i>water contact angle</i> , Wasserkontaktwinkel, in $^{\circ}$
$We$	Weber-Zahl
wt%	Gewichtsprozent
$Y_g$	Englisch: <i>gel yield</i> , Gelausbeute
z. B.	zum Beispiel
$\beta_{\text{AUITB}}$	Massenanteil von AUITB, in %
$\gamma$	Deformation, in %
$\eta$	Viskosität, in $\text{mPa s}$
$\vartheta$	Strömungsgeschwindigkeit, in $\text{m s}^{-1}$
$\zeta$	Maschenweite, in $\text{Å}$
$\rho$	Dichte, in $\text{g mL}^{-1}$
$\sigma$	Oberflächenspannung, in $\text{mN m}^{-1}$
$\phi$	Polymer-Volumen-Fraktion

## Kurzzusammenfassung

Hydrogele aus synthetischen und biobasierten Materialien finden vielseitige Anwendungen im Bereich des *Drug Delivery*, *Tissue Engineering* und für Biosensoren. Die Eigenschaften der dreidimensionalen Polymernetzwerke können dabei durch mehrere Parameter eingestellt oder kontrolliert werden. Zwei typische Polymere für die Herstellung von Hydrogelen sind Polyethylenglykol (PEG) und methacryloylierte Gelatine (GM), welche oft auch kombiniert werden. Im Gegensatz zu unmodifizierter Gelatine hat GM den Vorteil, dass sie wie PEG-Diacrylat (PEG-DA) radikalisch vernetzt werden kann und somit chemisch vernetzte Hydrogele aus den Polymerlösungen entstehen. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Hydrogele basierend auf PEG-DA und GM ausführlich charakterisiert. Letztendlich wurden beide Materialien miteinander kombiniert, um eine Hydrogel-basierte biosensorische Oberfläche zu entwickeln.

PEG-basierte Hydrogele gelten im Gegensatz zu GM-Hydrogelen als biologisch inert und wurden daher funktionalisiert, um spezifische Eigenschaften zu erreichen. Zunächst war es das Ziel, funktionalisierte PEG-basierte Polymernetzwerke herzustellen, die entweder verfügbare Isothiuroniumgruppen oder Thiole enthalten, was ihnen wertvolle Eigenschaften verleihen kann. Beides ist für makroskopische Hydrogele nicht typisch, da Isothiuroniumgruppen oft als Thiol-Vorläufer dienen und deshalb zu Thiolen umgesetzt werden oder Thiole selbst in Vernetzungsreaktionen Reaktanden sind und verbraucht werden. Um verfügbare funktionelle Gruppen in einem ursprünglich inerten makroskopischen Polymernetzwerk zu erhalten, wurde PEG-DA mit dem *surface active monomer (Surfmer)* 2-(11-(Acryloyloxy)undecyl)-isothiuroniumbromid (AUITB), welches eine Isothiuroniumgruppe besitzt, co-ernetzt. Die Synthese des *Surfmers* war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und das *Surfmer* wurde hier zum ersten Mal in makroskopische Polymernetzwerke eingebunden. Es wurden verschiedene Massenanteile von AUITB eingesetzt, um eine stufenweise Funktionalisierung der Proben zu erreichen. Zuerst wurde über den Quellgrad (*EDS*), die Gelaube und Ramanspektren überprüft, ob der Vernetzungsprozess der Hydrogele trotz Integration des *Surfmers* vollständig ablaufen konnte. Dies war für alle getesteten Massenanteile von AUITB bis 3 wt% gegeben mit einem *EDS* der Hydrogele zwischen 0,52 und 0,54. Als nächstes wurden die Hydrogele charakterisiert, um zu prüfen, ob die Funktionalisierung erfolgreich und einstellbar war. Die Messung des Zetapotenzials der Hydrogeloberflächen mit den ermittelten isoelektrischen Punkten (IEP) ergab, dass durch Einbringen der Isothiuroniumgruppen der IEP von ca. 4,5 – typisch für Oberflächen ohne funktionelle Gruppen – auf ca. 9,0 anstieg, was auf eine positiv geladene Oberfläche im sauren und neutralen pH-Bereich hindeutete. Die Wasserkontaktwinkel auf den gequollenen unfunktionalisierten Hydrogelen nahmen Werte von ca. 45° an und stiegen durch die Funktionalisierung, gemessenen über die *sessile drop* Methode, auf bis zu ca. 52° und sanken bei Messungen mit der *captive bubble* Methode auf ca. 35°. Dies deutete daraufhin, dass die funktionellen Gruppen an der Hydrogeloberfläche durch die Anbindung an die flexible Alkylkette des *Surfmers* ihre Orientierung je nach Umgebungsmedium ändern können. Eine potenzielle Anwendung dieser neu erzeugten Polyelektrolytmaterialien konnte über das

Adsorptionsverhalten von Diclofenac gezeigt werden mit einer Adsorptionskapazität  $q_m$  von bis zu  $74,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  und einer Gleichgewichtskonstante  $K_s$  von bis zu  $192 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1}$ . Durch Behandlung der vernetzten Hydrogele mit Natriummetabisulfit gelang es, die Isothiouoniumgruppen im Hydrogel erfolgreich zu Thiolen zu reduzieren. Dies wurde anhand einer Fluoreszenzfärbung mit einem Maleimidfarbstoff überprüft und durch Enzymversuche weiterhin bestätigt. Das Modellenzym Meerrettichperoxidase (HRP) wurde über einen Biotin-funktionalen Linker an die Hydrogeloberfläche gebunden und zeigte seine bestehende Aktivität durch seine spezifische Farbreaktion. Somit konnte gezeigt werden, dass die Thiol-haltigen Hydrogele für Biokonjugationsreaktionen genutzt werden können und sich auch grundsätzlich für biosensorische Anwendungen eignen.

Als nächstes wurden GM-basierte Hydrogele untersucht, welche später in Form einer orts aufgelösten Beschichtung auf den PEG-Hydrogelen als biologische Matrix dazu dienen sollten, Enzyme zu verkapseln. Hierfür wurde immer das hochmodifizierte GM-Derivat GM<sub>10</sub> mit einem Methacryloylierungsgrad von ca.  $1 \text{ mmol g}^{-1}$  verwendet. Außerdem wurde immer derselbe Photoinitiator Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) genutzt, der als sehr effektiv und zytokompatibel gilt, da er auch im Bereich des sichtbaren Lichts angeregt werden kann. Zum einen wurden GM-basierte Hydrogele ebenfalls funktionalisiert, um die Steifigkeit der Hydrogele zu erhöhen. Eine gesteigerte Stabilität der GM-Hydrogele durch Einbringen von Glykosaminoglykanen könnte besonders für filigrane Strukturen relevant sein. Dabei zeigte sich, dass sich der *EDS* durch die Integration von Chondroitinsulfat oder biotechnologisch hergestelltem Chondroitin verringerte, während die Speichermoduln  $G'$  durch die Funktionalisierung erfolgreich erhöht wurden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich der 3D-Druck mittels 2-Photonen-Polymerisation (2PP) für die Herstellung filigraner GM-Hydrogele für strukturierte biosensorische Oberflächen grundsätzlich eignen könnte. Dafür wurde zunächst überprüft, ob GM-basierte makroskopische Hydrogele, die über einen 3D-Druck mittels 2PP hergestellt wurden, vergleichbare Eigenschaften wie herkömmlich UV-vernetzte GM-Hydrogele besitzen, wenn ebenfalls LAP verwendet wird. Die Analyse des Zerfalls von LAP bei der Bestrahlung ergab, dass dieser nach einer Zweiphotonenabsorption erfolgte und sich der Photoinitiator damit für die Vernetzung der GM-Hydrogele mittels 2PP eignete. Durch Variation der *Laser*-Leistung und *Scan*-Geschwindigkeit konnten Hydrogele mit unterschiedlichen Vernetzungsgraden erzeugt werden. Dabei wurden Einstellungen ausgemacht, welche zu vergleichbaren *EDS* der Hydrogele wie bei den UV-vernetzten Hydrogelen führten, wobei die UV-vernetzten Hydrogele höhere Speichermoduln  $G'$  aufwiesen. Dennoch erwies sich der 2PP-Druck aufgrund der vielseitigen Parametereinstellungen und Auflösung als vielversprechende Methode für die Strukturierung von Hydrogel-basierten Biosensoren. Außerdem wurden Parameter identifiziert, mit welchen GM-*Spots* reproduzierbar mittels *Inkjet*-Druck als weitere Methode auf Oberflächen aufgebracht werden konnten. Über eine mit befeuchtetem Argon gespülte Kammer wurde der Sauerstoffgehalt ausreichend reduziert, um die GM-*Spots* erfolgreich mit UV-Licht zu vernetzen.

Nachdem die Funktionalisierung der PEG-Hydrogele gelungen war und die filigranen GM-Hydrogele erzeugt und ausreichend vernetzt werden konnten, wurden sie als Basis bzw.



Beschichtung in Form von *Spots* für die biosensorischen Oberflächen genutzt. Zunächst wurden die verschiedenen PEG-basierten Hydrogeloberflächen – nicht funktionalisiert, Isothiuronium-funktionalisiert und Thiol-funktionalisiert – für ihre Eignung als Sensorbasis überprüft, indem sie mittels *Inkjet*-Druck ortsaufgelöst mit GM-Lösung beschichtet wurden. Es zeigte sich, dass bei beiden funktionalisierten Oberflächen ein präziseres *Spot*-Muster mit kleineren *Spots* erhalten werden konnte und dass die gequollenen PEG-Hydrogele ein Austrocknen der GM-*Spots* verhinderten. Hydrogel-basierte Biosensoren sind in der Literatur schon oft beschrieben worden, allerdings ist es ein bekanntes Problem, dass die Enzyme aus den Hydrogelmaschen herausgewaschen werden, weshalb die Sensoren nur einmalig verwendet werden können. Die Enzyme können zwar auch kovalent eingebunden werden, hierbei kann aber die Enzymaktivität reduziert werden. Um ein Auswaschen der Enzyme möglichst zu verhindern, wurden die Enzyme HRP und Penicillinase (Pen) an Tabakmosaikvirus (TMV)-Partikel gebunden, welche in pipettierte GM-*Spots* verkapselt wurden. Damit waren die TMV-Enzym-Konjugate groß genug, um bis zu einer Woche nicht herausgewaschen zu werden und die Enzyme zeigten ihre spezifische Funktionalität anhand einer Farbreaktion. Für die Pen konnte sogar nach 22 Monaten noch eine Enzymaktivität festgestellt werden. Die Kombination aus TMV-Enzym-Konjugaten und der ortsaufgelösten Hydrogel-Beschichtung ermöglichte damit die Erzeugung von biosensorischen Oberflächen, die potenziell wiederverwendbar und für die Detektion mehrerer Substrate geeignet sind.

## Abstract

Hydrogels made of synthetic and biobased materials find versatile applications in the field of drug delivery, tissue engineering and for biosensors. The properties of the three-dimensional polymer networks can be tuned or controlled by several parameters. Two typical polymers for the preparation of hydrogels are poly(ethylene glycol) (PEG) and gelatin methacryloyl (GM), which are often combined. In contrast to unmodified gelatin, GM has the advantage that it can be radically cross-linked like PEG diacrylate (PEGDA), resulting in chemically cross-linked hydrogels from the polymer solutions. In this dissertation, hydrogels based on PEGDA and GM were characterized in detail. Finally, both materials were combined to develop a hydrogel-based biosensing surface.

PEG-based hydrogels, in contrast to GM hydrogels, are considered biologically inert and have therefore been functionalized to achieve specific properties. Initially, the aim was to prepare functionalized PEG-based polymer networks containing either available isothiuronium groups or thiols, which can confer valuable properties. Neither is typical for macroscopic hydrogels, since isothiuronium groups often serve as thiol precursors and are therefore converted to thiols, or thiols themselves are reactants in cross-linking reactions and are consumed. To obtain available functional groups in an originally inert macroscopic polymer network, PEGDA was co-cross-linked with the surface active monomer (surfmer) 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)-isothiuronium bromide (AUITB), which has an isothiuronium group. The synthesis of surfmer was already established in the research group and the surfmer was incorporated into macroscopic polymer networks here for the first time. Different mass fractions of AUITB were used to achieve a stepwise functionalization of the samples. With the degree of swelling (*EDS*), gel yield and Raman spectra it was first investigated whether the cross-linking process of the hydrogels could proceed completely despite integration of the surfmer. This was the case for all tested mass fractions of AUITB to 3 wt% with an *EDS* of the hydrogels between 0.52 and 0.54. Next, the hydrogels were characterized to examine if the functionalization was successful and adjustable. Measurements of the zeta potential of the hydrogel surfaces with the determined isoelectric points (IEP) showed that the introduction of the isothiuronium groups increased the IEP from approx. 4.5 - typical for surfaces without functional groups - to approx. 9.0, indicating a positively charged surface in the acidic and neutral pH range. The water contact angles on the swollen non-functionalized hydrogels reached values of approx. 45° and increased to approx. 52° due to the functionalization when measured by the sessile drop method and decreased to approx. 35° when measured by the captive bubble method. This indicated that the functional groups on the hydrogel surface can change their orientation depending on the surrounding medium due to the attachment to the flexible alkyl chain of the surfmer. A potential application of these newly generated polyelectrolyte materials was demonstrated via the adsorption behavior of diclofenac with an adsorption capacity  $q_m$  of up to 74.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  and an equilibrium constant  $K_s$  of up to 192  $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}$ . By treating the cross-linked hydrogels with sodium metabisulfite, the isothiuronium groups in the hydrogels were successfully reduced to thiols. This was verified by fluorescent staining with a maleimide dye and further confirmed by

enzyme experiments. The model enzyme horseradish peroxidase (HRP) was bound to the hydrogel surface via a biotin-functional linker and showed its existing activity by its specific color reaction. Thus, it could be shown that the thiol-containing hydrogels can be used for bioconjugation reactions and are in principle suitable for biosensing applications.

Next, GM-based hydrogels were investigated, which should later serve as a biological matrix in the form of a spatially defined coating on the PEG hydrogels to encapsulate enzymes. For this purpose, the highly modified GM derivative GM<sub>10</sub> with a degree of methacryloylation of approx. 1 mmol g<sup>-1</sup> was always used. In addition, the same photo initiator lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoyl phosphinate (LAP) was always utilized, which is considered to be very effective and cytocompatible, as it can also be excited in the visible light range. GM-based hydrogels were also functionalized to increase their stiffness. An increased stability of GM hydrogels by introducing glycosaminoglycans could be particularly relevant for delicate structures. The *EDS* were decreased by the integration of chondroitin sulfate or biotechnologically produced chondroitin, while the storage moduli *G'* were successfully increased by the functionalization.

Furthermore, it was investigated whether 3D printing via 2-photon polymerization (2PP) could be in principle suitable for the fabrication of delicate GM hydrogels for patterned biosensing surfaces. Therefore, it was first examined whether GM-based macroscopic hydrogels fabricated via 3D printing using 2PP possess comparable properties to conventionally UV-cross-linked GM hydrogels when LAP is also used. Analysis of the cleavage of LAP upon irradiation revealed that it occurred after 2-photon absorption, making the photo initiator suitable for cross-linking GM hydrogels using 2PP. By varying the laser power and scan speed, hydrogels with different degrees of cross-linking could be generated. Settings were identified that resulted in comparable *EDS* of the hydrogels to the UV-cross-linked hydrogels, with the UV-cross-linked hydrogels exhibiting higher storage moduli *G'*. Nevertheless, 2PP printing proved to be a promising method for patterning hydrogel-based biosensors due to its versatile parameter settings and resolution. Parameters were also identified with which GM spots could be reproducibly deposited onto surfaces using inkjet printing as another method. Using a chamber flushed with humidified argon, the oxygen content was reduced sufficiently to successfully cross-link the GM spots with UV light.

Once the functionalization of the PEG hydrogels was successful and the delicate GM hydrogels could be generated and sufficiently cross-linked, they were used as a base or coating in the form of spots for the biosensing surfaces. First, the different PEG-based hydrogel surfaces - non-functionalized, isothiuronium-functionalized and thiol-functionalized - were tested for their suitability as sensing bases by coating them with GM solution in a spatially defined manner using inkjet printing. It was found that a more precise spot pattern with smaller spots could be obtained for both functionalized surfaces and that the swollen PEG hydrogels prevented the GM spots from drying out. Hydrogel-based biosensors have been described many times in the literature, but it is a known problem that the enzymes are washed out of the hydrogel meshes, which is why the sensors can only be used once. The enzymes can also be covalently incorporated, but this can reduce the enzyme activity. To prevent the enzymes from washing out as much as possible, the enzymes HRP and penicillinase (Pen) were bound to tobacco

mosaic virus (TMV) particles, which were encapsulated in pipetted GM spots. Hence, the TMV-enzyme conjugates were large enough not to be washed out for up to one week and the enzymes showed their specific functionality based on a color reaction. For Pen, enzyme activity could still be detected even after 22 months. The combination of TMV-enzyme conjugates and the spatially defined hydrogel coating thus enabled the generation of biosensing surfaces that are potentially reusable and suitable for the detection of multiple substrates.

# 1. Einleitung

## 1.1 Herstellung von Hydrogelen

Hydrogele sind dreidimensionale (3D) Polymernetzwerke, die in wässrigem Medium quellen aber sich nicht darin auflösen [1]. Ihr Quellverhalten ergibt sich dabei aus der Interaktion des Polymernetzwerks mit dem Medium [2-4]. Durch ihre poröse Struktur finden sie zahlreiche Anwendungen und werden oft im Bereich des *Tissue Engineering* (TE), für *Drug Delivery*-Systeme oder für Biosensoren eingesetzt [5-11]. Im Alltag sind sie vor allem in Form von weichen Kontaktlinsen oder als sogenannte Superabsorber in Windeln bekannt, welche eine große Menge an Flüssigkeit binden können [12-15].

Hydrogele können entweder physikalisch oder chemisch vernetzt werden [16-18]. Bei der physikalischen Vernetzung bilden sich z. B. Wasserstoffbrücken, ionische oder hydrophobe Interaktionen aus, über welche die Molekülketten zusammengehalten werden. Bei der chemischen Vernetzung entstehen irreversible kovalente Bindungen innerhalb des Netzwerkes. Dafür ist es notwendig, dass die Makromere bzw. Polymere, die das Netzwerk bilden, funktionelle Gruppen aufweisen, die für die Vernetzung zur Verfügung stehen. Oft werden Kettenwachstumsreaktionen, wie z. B. die radikalische Polymerisation mit Verwendung eines bi- oder multifunktionalen Vernetzers, der die Polymerketten miteinander verbindet, verwendet. Dafür wird mindestens ein Initiator hinzugegeben, welcher mittels Radikalbildung die Reaktion startet [16-18]. Die radikalische Polymerisation wird in drei Schritte unterteilt, die Initiierung, das Kettenwachstum und die Terminierung [19]. Bei der Initiierung zerfallen die Initiatormoleküle in primäre Radikale, welche mit den Doppelbindungen der vernetzbaren Gruppen zu reagieren beginnen. Die primären Radikale können thermisch [20, 21], photochemisch [22, 23] oder über Redoxreaktionen [9, 24, 25] erzeugt werden. Bei Photoinitiatoren (PI) werden Radikale typischerweise über die Bestrahlung mit UV- oder sichtbarem Licht generiert [16, 18]. Dabei wird zwischen Typ I und Typ II PI unterschieden. Die Typ I PI zerfallen durch die Bestrahlung direkt in Radikale. Die Typ II PI erzeugen die Radikale mithilfe von Co-Initiatoren. Beim Kettenwachstum werden weitere vernetzbare Einheiten zur bestehenden Polymerkette hinzugefügt. Die Terminierung findet entweder über eine Rekombination von zwei Radikalen oder mittels Disproportionierung statt, wobei ein Wasserstoffatom neben einem Radikalzentrum auf ein anderes Radikalzentrum übertragen wird [19].

Für die Herstellung von Hydrogelen stehen zahlreiche Materialien zur Verfügung. Es kann grundsätzlich zwischen biobasierten und synthetischen Polymeren für die Herstellung der 3D-Netzwerke unterschieden werden [26, 27]. Beispiele für biobasierte Polymere sind Gelatine, Alginat und Chitosan [28]. Die Verwendung von biobasierten Materialien für die Herstellung von Hydrogelen hat den Vorteil, dass sie biodegradierbar sind und biofunktionale Eigenschaften aufweisen, weshalb sie sich sehr gut im TE als Gerüst für Zellen eignen [26, 27, 29]. Synthetische Polymere sind gut verfügbar und deren Hydrogele können oft auf einfache Weise modifiziert werden, wie durch die Integration von funktionalen Monomeren oder

Aminosäuresequenzen, um den jeweiligen Anforderungen zu entsprechen [30-33]. Als synthetische Polymere werden häufig Polyethylenglykol (PEG), Poly(2-hydroxyethylmethacrylat) (PHEMA) und Polyvinylalkohol (PVA) eingesetzt [34]. Hydrogele aus synthetischen Polymeren sind in der Regel mechanisch stabiler, weshalb sie auch mit Hydrogelen aus biobasierten Materialien kombiniert werden, um diese zu unterstützen [35-38]. Durch die Kombinationen von biobasierten und synthetischen Polymeren können die Eigenschaften von Hydrogelen gezielt eingestellt werden, was zahlreiche Anwendungen ermöglicht.

### 1.2 Eigenschaften und Anwendungen von Polyethylenglykol-basierten Hydrogelen

PEG ist ein klassisches synthetisches Material für die Hydrogel-Herstellung. Oft wird es in Form des Acrylat-terminierten PEG-Diacrylat (PEG-DA) verwendet (Abbildung 1). Über die Kettenenden kann PEG-DA radikalisch vernetzt werden. Die Vernetzung wird dabei häufig photochemisch mit einem PI gestartet [32, 33, 39, 40]. PEG-basierte Hydrogele gelten *in vivo* als langsam degradierend, primär aufgrund einer hydrolytischen Spaltung der Estergruppe an den Vernetzungspunkten, weshalb sie sich nicht als Langzeitimplantate eignen [41-44].

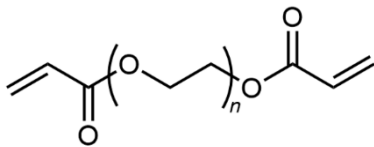


Abbildung 1: Strukturformel von PEG-DA. PEG-DA wird über die beiden Acrylatgruppen am Kettenende, beispielsweise mittels eines Photoinitiators bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, vernetzt.

Durch die Verwendung von verschiedenen Molekulargewichten (MW) und Konzentrationen können die Eigenschaften der PEG-basierten Hydrogele gezielt eingestellt werden [45-47]. So entstehen Netzwerke mit unterschiedlichen Maschenweiten  $\xi$  und Quellgraden (*equilibrium degree of swelling*, EDS). Bei geringen MW von PEG-DA von beispielsweise  $575 \text{ g mol}^{-1}$  oder  $700 \text{ g mol}^{-1}$  liegt das Polymer als viskose Flüssigkeit vor und kann auch ohne Zugabe eines Lösemittels mit einem Initiator vernetzt werden [40, 48]. Bei höheren MW, wie  $4000 \text{ g mol}^{-1}$ , liegt es als Pulver vor, wobei ein Lösemittel benötigt wird, um ein 3D-Netzwerk zu erzeugen [32, 33]. Mazzocchi *et al.* stellten Hydrogele aus PEG-DA mit den MW 400 Da und 3400 Da in unterschiedlichen Konzentrationen her und erzeugten dabei *Blends* durch die Kombination beider MW in verschiedenen Verhältnissen [45]. Die Hydrogele, die ausschließlich aus niedrigmolekularem PEG-DA hergestellt wurden, waren trüb und wurden mit zunehmender Konzentration des höhermolekularen PEG-DA transparenter. Für alle *Blends* wurde ein höherer Kompressionsmodul bei höherer PEG-DA-Konzentration gemessen, während bei konstanter PEG-DA-Konzentration der Kompressionsmodul durch die Veränderung des Verhältnisses von PEG-DA mit geringerem und höherem MW erhöht werden konnte. Für die reinen PEG-DA400-Proben wurde ein mittlerer Kompressionsmodul von 1,02 MPa bei 40 wt% gemessen. Bei gleicher PEG-DA-Konzentration wurde für die reinen PEG-DA3400-Proben ein Kompressionsmodul von 0,52 MPa bestimmt. Die höchsten Kompressionsmoduln bei einer

PEG-DA-Konzentration von 40 wt% wurden für die 20/80 bzw. 40/60 *Blends* (3400 Da/400 Da) gemessen mit 1,60 MPa bzw. 1,71 MPa. Somit war die Kombination aus PEG-DA mit einem niedrigen und einem hohen MW am besten geeignet, um sowohl eine hohe Vernetzungsdichte, als auch eine ausreichende Elastizität zu erzielen [45]. Nguyen *et al.* erzeugten ebenfalls Hydrogele aus PEG-DA mit verschiedenen MW von 508 Da, 3,4 kDa, 6 kDa und 10 kDa [47]. Bei kleinerem MW und höherer PEG-DA-Konzentration verringerte sich u. a. der *EDS*, während sich beispielsweise der Kompressionsmodul und die dynamische Drucksteifigkeit der Hydrogele erhöhten. Damit einher gehend verringerten sich mit steigenden PEG-DA-Konzentrationen das MW zwischen den Vernetzungspunkten ( $M_c$ ) und die Maschenweite  $\zeta$  [47]. Letztere ist die durchschnittliche Distanz zwischen zwei benachbarten Vernetzungspunkten und steigt mit dem MW in PEG-basierten Hydrogelen [49, 50]. Temenoff *et al.* synthetisierten Oligo(PEG-Fumarat) mit unterschiedlichen MW von PEG und stellten fest, dass sich bei den daraus vernetzten Hydrogelen  $\zeta$  von 76 Å bei einem MW von 860 Da auf 160 Å bei einem MW von 9300 Da erhöhte [49]. Bryant *et al.* zeigten, dass sich  $\zeta$  von PEG-basierten Hydrogelen mit zunehmender PEG-Dimethacrylat (DMA)-Konzentration verringerte [51, 52]. Es wurden vergleichbare MW von 3000 Da bzw. 3400 Da verwendet und  $\zeta$  verringerte sich von 160 Å bzw. 140 Å auf 80 Å bzw. 60 Å, wenn die Konzentration von PEG-DMA von 10 wt% auf 20 wt% erhöht wurde [51, 52]. Damit haben sowohl das MW der verwendeten Makromere als auch deren Konzentration Einfluss auf  $M_c$  [47, 49, 51, 52]. Bei dem *EDS* von Hydrogelen lässt sich dies auch beobachten. So berichteten Tan *et al.* einen mittleren *EDS* von 9,27 für 20 % PEG-DA-Hydrogele mit einem MW von 4000 Da [32]. Mellott *et al.* stellten hochvernetzte PEG-DA-Sphären her, indem sie den PI direkt zu PEG-DA mit einem MW von 575 Da hinzugaben und bestimmten einen *EDS* von 0,49, ein  $M_c$  von 62,4 g mol<sup>-1</sup> und eine  $\zeta$  von 9,78 Å [40].

In Abhängigkeit des MW und der Konzentration und damit des  $M_c$  sind PEG-basierte Hydrogele permeabel für Proteine wie beispielsweise Myoglobin [53-55]. Damit eignen sie sich für *Drug Delivery*-Systeme, wobei sie als Schale bei Kern-Schale-Strukturen verwendet werden [7, 8, 56]. PEG-basierte Hydrogele sind bioinert und inhibieren sowohl die Adsorption von Proteinen [32, 33, 57, 58] als auch die Zelladhäsion [32, 33, 59-61]. Diese Eigenschaften können je nach Anwendung gewünscht sein, weshalb PEG bzw. Polyethylenoxid (PEO) mit höherem MW auch als sogenannte *Anti-fouling*-Beschichtung von Materialien genutzt wird [62-67]. Hierfür wurde z. B. Polydimethylsiloxan (PDMS) über photoinduzierte Pfropfpolymerisation mit PEG-DA durch die Verwendung von Photomasken mikrostrukturiert [67]. Dabei zeigte sich eine geringere Proteinadsorption und Zelladhäsion auf den PEG-DA-Oberflächen im Vergleich zu den PDMS-Bereichen, was vielversprechend für die Anwendung von Mikrofluidiksystemen ist. Kuo *et al.* stellten ebenfalls Mikrofluidiksysteme aus PEG-DA her [68]. Um die Adsorption von kleinen, hydrophoben Molekülen zu untersuchen, wurden *Wells* aus PEG-DA oder PDMS mit einem hydrophoben Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und anschließend gewaschen. Die verbliebene Fluoreszenz ergab, dass im Vergleich zu PDMS die Molekülabsorption in den PEG-DA-Kanälen geringer war, was die Aussagekraft für *Screenings* erhöht [68]. Somit bilden PEG-basierte Hydrogele vielversprechende Oberflächen, wenn eine Interaktion mit Biomolekülen nicht gewünscht ist.

Ebenso wird PEG im Bereich des 3D-Drucks und für Biosensoren eingesetzt [69-72], worauf in den Kapiteln 1.5 und 1.6.1 eingegangen wird.

### 1.3 Eigenschaften und Anwendungen von Hydrogelen auf Basis von methacryloylierter Gelatine

Gelatine wird durch die Hydrolyse von Kollagen, der Hauptkomponente der extrazellulären Matrix (EZM) erzeugt. Abhängig davon, ob eine saure oder eine alkalische Behandlung durchgeführt wird, entsteht entweder Gelatine Typ A oder Gelatine Typ B [73, 74]. Aufgrund der guten Verfügbarkeit, Biokompatibilität und -degradierbarkeit, wird Gelatine vielseitig eingesetzt [28, 73]. Gelatine besitzt Erkennungssequenzen, um von Matrix-Metalloproteasen abgebaut werden zu können [75, 76]. Ebenfalls wird davon ausgegangen, dass Gelatine weiterhin die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) enthält, an welche Zellen über Integrine adhären können [77-79]. Da physikalisch vernetzte Hydrogele auf der Basis von Gelatine unter physiologischen Bedingungen wenig stabil sind [80], wird Gelatine oft modifiziert, um eine chemische Vernetzung der Hydrogele zu ermöglichen. Dies kann beispielsweise durch die Generierung von methacryloylierter Gelatine (GM) erreicht werden [81, 82]. Dabei werden die Amino- und Hydroxylgruppen von Aminosäuren in der Seitenkette z. B. durch Methacrylsäureanhydrid (MAAnh) zu Methacrylamiden und Methacrylaten umgesetzt (Abbildung 2) [81, 82]. Das Suffix  $x$  der  $GM_x$ -Derivate gibt dabei den eingesetzten molaren Überschuss an MAAnh gegenüber den verfügbaren Aminogruppen an [22, 83]. Die eingeführten Gruppen ermöglichen eine chemische Vernetzung der Hydrogele durch radikalische Polymerisation, welche oft photochemisch erfolgt. Hierfür werden typischerweise die PI Irgacure 2959 oder Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) verwendet [22, 23, 83-87]. Durch den Methacryloylierungsgrad, der die Funktionalisierung und damit den Gehalt der vernetzbaren Gruppen angibt, können beispielsweise die Viskosität der GM-Lösung, der *EDS* und die rheologischen Eigenschaften der chemisch vernetzten Hydrogele eingestellt werden. Anhand der unterschiedlichen Vernetzungsdichte der Hydrogele kann damit eine große Bandbreite an GM-Hydrogelen mit verschiedenen Eigenschaften erzeugt werden [22, 83].

Hoch *et al.* untersuchten Hydrogele aus GM-Derivaten mit niedrigem und hohem Methacryloylierungsgrad ( $GM_{1,5}$ ,  $GM_2$  und  $GM_{10}$ ) [22]. Dabei wurde festgestellt, dass  $GM_{1,5}$ - und  $GM_2$ -Lösungen beim Abkühlen auf Raumtemperatur gelierten, während dies bei  $GM_{10}$ -Lösungen nicht der Fall war, was durch eine abgeschwächte Interaktion zwischen den Molekülen zustande kam. Innerhalb eines GM-Derivates verringerte sich der *EDS* der Hydrogele mit zunehmender GM-Konzentration, während ein geringerer Methacryloylierungsgrad in einem erhöhten *EDS* resultierte. Mit steigendem Methacryloylierungsgrad als auch mit steigender GM-Konzentration erhöhte sich damit die Vernetzungsdichte. Damit konnten mittlere *EDS* von 772 % bis 194 % eingestellt werden und Speichermoduln  $G'$  von bis zu 368 kPa bei 37 °C erreicht werden [22]. Sewald *et al.* berichteten, dass 10 wt%  $GM_2$ - bzw.  $GM_5$ -Lösungen bei ca. 21 °C bzw. 14 °C gelierten, während für  $GM_{10}$ -Lösungen keine physikalische Gelierung im Temperaturbereich zwischen 10 °C und 40 °C festgestellt wurde [23]. Dies bestätigte die verringerte Interaktion zwischen



den Molekülen durch einen steigenden Methacryloylierungsgrad. Für die Speichermoduln im linear viskoelastischen Bereich ( $G'_{\text{LVER}}$ ), gemessen bei 37 °C, wurde zwischen GM<sub>2</sub>-, GM<sub>5</sub>- und GM<sub>10</sub>-Hydrogelen kein signifikanter Unterschied festgestellt, was einer synergistischen Wirkung der physikalischen Interaktion und der chemischen Vernetzung zugeschrieben wurde. Für 10 wt% Hydrogele, die aus GM<sub>10</sub> auf Basis von Gelatine Typ B hergestellt wurden, wurden mittlere  $G'_{\text{LVER}}$  von 12,60 kPa gemessen und  $EDS$  von ca. 704,7 % bestimmt [23].

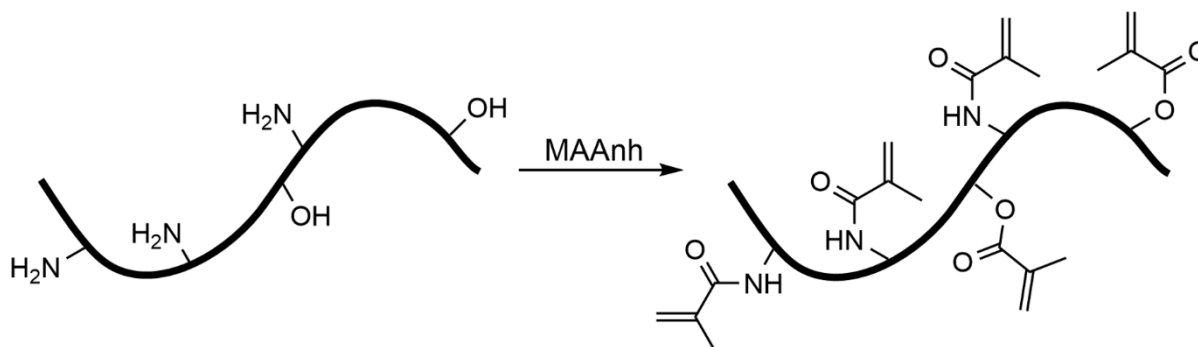


Abbildung 2: Modifizierung von Gelatine mit MAAnh zu methacryloylierter Gelatine. Bei der Reaktion werden Amino- und Hydroxylgruppen zu Methacrylamiden und Methacrylaten umgesetzt.

Es wurde bereits berichtet, dass GM-Hydrogele die Zelladhäsion und -proliferation unterstützen [88, 89], und auch, dass sie enzymatisch durch Kollagenase abgebaut werden können [89], womit sich GM-Hydrogele gut für das TE und *Bioprinting*-Anwendungen eignen (s. Kapitel 1.5) [5, 6]. Dabei ist es auch wichtig, dass die rheologischen und mechanischen Eigenschaften der Hydrogele den Anforderungen entsprechen und z. B. dem gewünschten Gewebe möglichst nahekommen. Häufig werden GM-Hydrogele für den Einsatz im Knorpel-TE untersucht. Beispielsweise wurde für einen porcinen Gelenkknorpel bei einer Frequenz bis 5 Hz bei 37 °C ein  $G'$  von ca. 0,8 MPa bestimmt [90] oder für einen bovinen Gelenkknorpel bei einer Frequenz von 100 Hz und Raumtemperatur ein  $G'$  von ca. 2,5 MPa ermittelt [91]. Es wurde beschrieben, dass eine vorangegangene physikalische Gelierung die Kompressions- und Speichermoduln von chemisch vernetzten GM-Hydrogelen erhöhen kann [84, 86, 92]. Außerdem können die rheologischen und mechanischen Eigenschaften von GM-basierten Hydrogelen durch Zugabe weiterer Bestandteile gezielt eingestellt werden [5, 87, 93] (s. auch Kapitel 1.4.3). Mit der Zugabe von Hydroxylapatit-Partikeln (HAp) in Hydrogelen aus GM mit niedrigem und mittlerem Methacryloylierungsgrad (GM<sub>2</sub> und GM<sub>5</sub>), zusammen mit methacrylierter Hyaluronsäure (HAM) wurden höhere  $G'$  als ohne HAp erzielt [5]. Die Hydrogele ohne HAp hatten bei 37 °C und 1,5 Hz einen mittleren  $G'$  von 29,6 kPa und die Hydrogele mit HAp einen mittleren  $G'$  von 35,1 kPa. Gu *et al.* stellten Komposithydrogele aus GM und bakterieller Cellulose für eine mögliche Anwendung im Knorpel-TE her [87]. Die GM hatte einen Methacryloylierungsgrad von ca. 84 % und es wurden verschiedene Konzentrationen der Cellulose in die Hydrogele integriert.  $G'$  stieg in Abhängigkeit der Konzentration der Cellulose. Reine GM-Hydrogele hatten ein  $G'$  von ca. 1,7 kPa, während die am meisten funktionalisierten Hydrogele ein  $G'$  von ca. 12,0 kPa hatten.

Somit können die Eigenschaften von GM-Hydrogelen vielseitig eingestellt werden, z. B. durch die Wahl des GM-Derivates, der Konzentration, durch die Kombination von chemischer und

physikalischer Gelierung oder den Zusatz weiterer Komponenten, wenn mehr Stabilität gewünscht ist. Da sich GM-Hydrogele hervorragend als biologische Matrix für die Kultivierung von Zellen eignen, sind sie auch grundsätzlich für die Verkapselung von Proteinen, wie Enzyme, passend. Darauf wird in Kapitel 1.6.1 eingegangen.

### 1.4 Funktionalisierungen von Polymeren und Polymernetzwerken

#### 1.4.1 Funktionalisierungen mit Monomeren

Wie bereits erwähnt, können Polymernetzwerke, wie u. a. PEG-basierte Hydrogele, modifiziert werden, um bestimmte Eigenschaften zu erhalten. Dies kann beispielsweise über eine Copolymerisation mit Monomeren erfolgen [32, 33, 94]. Tan *et al.* integrierten das positiv geladene Monomer 2-(Methacryloyloxy)ethyltrimethylammoniumchlorid (MAETAC) in PEG-DA-Hydrogele in verschiedenen Konzentrationen, um die Zellkompatibilität zu erhöhen [32]. Dabei stellten sie fest, dass der mittlere *EDS* der funktionalisierten Hydrogele mit steigender MEATAC-Konzentration in H<sub>2</sub>O von ca. 9,27 auf ca. 15,55 anstieg, während er in phosphatgepufferter Saline (PBS) vergleichbar blieb. Ebenso änderte sich das Zetapotenzial von in H<sub>2</sub>O dispergierten Hydrogelpartikeln von ca. -1,18 mV auf ca. 6,15 mV. Das Quellverhalten wurde damit erklärt, dass sich mit zunehmender MEATAC-Konzentration eine geringere Vernetzungsdichte der Hydrogele ergab. Es wurde angenommen, dass sich beim Quellen in PBS ein Gleichgewichtszustand für die Diffusion durch die ionischen Gruppen im Hydrogel einstellt. Da die Gegenionen im positiv geladenen Hydrogel leichter adsorbiert werden können als beim unfunktionalisierten Hydrogel (HG-0), könnte sich ein Gleichgewicht zwischen dem internen und externen osmotischen Druck einstellen. Durch die Funktionalisierung mit MEATAC wurde eine 2,6x Erhöhung der Proteinadsorption auf den Hydrogeloberflächen im Vergleich zu HG-0 festgestellt. Ebenso ergab sich durch die Funktionalisierung eine erhöhte initiale Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten-ähnlichen MC3T3-E1-Zellen [32]. In einer ähnlichen Studie wurden ebenfalls PEG-DA-Hydrogele funktionalisiert und dabei das negativ geladene Monomer Natriummethylsulfonat (SMAS) verwendet [33]. Mit zunehmender Funktionalisierung wurde ebenso ein steigender *EDS* der Hydrogele in H<sub>2</sub>O festgestellt, während er in PBS vergleichbar blieb. Das Zetapotenzial von Hydrogelpartikeln in H<sub>2</sub>O änderte sich hierbei von ca. 1,01 mV auf ca. -3,82 mV. Für die unfunktionalisierten Hydrogele wurde eine Porengröße von 5 µm bis 10 µm festgestellt, während die Porengröße bei den funktionalisierten Hydrogelen ungleichmäßiger wurde und zwischen 5 µm und 50 µm schwankte. Außerdem wurde eine bis zu 3,9x Erhöhung der Proteinadsorption und eine höhere Zellproliferation von MC3T3-E1 Zellen festgestellt [33]. Diese Veröffentlichungen zeigen, dass durch eine Funktionalisierung die Eigenschaften von PEG-basierten Hydrogelen leicht verändert werden können und die Hydrogele weniger inert sind. Allerdings hatte die Funktionalisierung beides mal Einfluss auf die Vernetzung der Hydrogele.

Funktionalisierungen zur Erzeugung von Polyelektrolytmaterialien eignen sich aber nicht nur, um die Zellkompatibilität zu verbessern, sondern können auch genutzt werden, um die Adsorption von bestimmten Molekülen, wie Medikamenten, zu erhöhen [95, 96]. Liu *et al.*

erzeugten Ethylenglykol-Dimethacrylat (EGDMA)-Nanopartikel (NP) und funktionalisierten diese ebenfalls mit dem positiv geladenen Monomer MAETAC [95]. Sie untersuchten die Adsorption von Diclofenac und stellten fest, dass die NP wiederholt für sechs Zyklen verwendet werden konnten, ohne eine signifikante Verringerung der Adsorptionskapazität aufzuzeigen. Um das Adsorptionsverhalten zu beschreiben, können Langmuir- und Freundlich-Isothermen verwendet werden. Beim Langmuir-Modell wird von einer Adsorption von Molekülen in einer Monolage ausgegangen mit energetisch gleichwertigen Bindestellen des adsorbierenden Materials. Das empirische Freundlich-Modell geht von einer Heterogenität der Bindestellen aus und nimmt an, dass die Adsorbatmoleküle miteinander wechselwirken [97, 98]. Für die Adsorptionskinetik wird ebenfalls zwischen zwei Modellen unterschieden. Bei dem Modell der Pseudo-ersten Ordnung wird angenommen, dass die Adsorption durch Diffusion bestimmt wird und damit die Physisorption dominant ist. Beim Modell der Pseudo-zweiten Ordnung wird von einer Chemisorption ausgegangen [98-104].

Eine besondere Art von Monomeren für die Funktionalisierung von Polymernetzwerken bilden die sogenannten *Surfmere*. Sie sind auch unter der Bezeichnung *surface active monomer* oder *polymerizable surfactant* bekannt. Diese Monomere bestehen aus drei Bereichen: einem polymerisierbaren Teil, der oft eine Doppelbindung enthält, einem hydrophoben Teil, wie eine Alkylkette, und einem hydrophilen Teil. Durch die vorhandene Doppelbindung können *Surfmere* kovalent in Polymernetzwerke eingebunden werden [105]. Eine typische Anwendung von *Surfmern* ist die Oberflächenfunktionalisierung von NP durch eine Copolymerisation des *Surfmers* mit dem Monomer, das den Kern des NPs bildet [106, 107]. So nutzten beispielsweise Albernaz *et al.* das *Surfmer* *p*-(11-Acrylamido)undecanoyloxyphenyldimethylsulfoniummethylsulfat (AUPDS) in einer Mini-Emulsionspolymerisation mit dem Monomer Methylmethacrylat (MMA) oder Styrol, um NP zu erzeugen [107]. Dabei befanden sich das Monomer und der Initiator in der dispersen Phase, während als kontinuierliche Phase Wasser mit dem *Surfmer* gewählt wurde, damit sich die Aktivester-Gruppe des *Surfmers* gezielt ausrichten konnte. Die Mischung wurde über Ultraschall emulgiert, um Monomertropfen zu bilden, welche dann polymerisiert wurden. AUPDS ersetzte dabei das sonst notwendige Tensid und diente gleichzeitig als Comonomer für die Herstellung der Poly-MMA (PMMA)-*co*-AUPDS- bzw. Polystyrol (PS)-*co*-AUPDS-Partikel. Auf diese Weise konnten monodisperse und stabile Partikel hergestellt werden, welche durch ihre Aktivester-Gruppe auf der Oberfläche das Potenzial für die Anbindung von Biomolekülen über Amine hatten [107]. Hartmann *et al.* verwendeten ebenfalls MMA und Styrol und copolymerisierten diese Monomere jeweils mit dem *Surfmer* 11-(Methacryloyloxy)undecanylsulfat (MET) mit 1,5 mol% bis 6 mol% MET im Copolymer [108]. Da sie den Einfluss von MET auf die Eigenschaften in der Masse untersuchen wollten, wurden die Copolymere MET-PS und MET-PMMA über eine freie radikalische Polymerisation in Chloroform hergestellt anstatt in Emulsion, um eine mögliche Selbstaggregation des *Surfmers* vor der Polymerisation zu verhindern. Sie stellten fest, dass die getrockneten Copolymere nicht mehr in Chloroform löslich waren. Anhand von Messungen mit dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) und Aufnahmen mittels Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) wurde vermutet, dass die MET-Wiederholungseinheiten im Copolymer über ihre ionischen Kopfgruppen intermolekular interagierten und selbst

assemblierten. Dies wurde durch die Inkompatibilität der Sulfonatgruppen mit der unpolaren Polymermatrix erläutert.

*Surfmere* wurden auch schon für eine Funktionalisierung von Hydrogelen verwendet [109-111]. Friedrich *et al.* untersuchten die mechanischen Eigenschaften von Hydrogelen basierend auf *N*-isopropylacrylamid (NIPAAm), bei denen NIPAAm mit dem kationischen *Surfmer* (11-(Acryloyloxy)undecyl)trimethylammoniumbromid (AUTMAB) oder (2-(Methacryloyloxy)-ethyl)dodecyldimethylammoniumbromid (MEDDAB) copolymerisiert wurde [110]. Bei AUTMAB war die vernetzbare Einheit am Ende der hydrophoben Kette, während sie sich bei MEDDAB neben der polaren Kopfgruppe befand. Für die nicht funktionalisierten Hydrogele wurden 10 wt% NIPAAm in der Hydrogelvorläuferlösung verwendet. Für die funktionalisierten Hydrogele wurden entweder bis zu 1 wt% MEDDAB oder bis zu 5 wt% AUTMAB hinzugegeben. Die Wissenschaftler stellten fest, dass die mechanische Stabilität der Hydrogele mit zunehmender *Surfmer*-Konzentration im Hydrogel anstieg, und erklärten dies über copolymerisierte mizellare Aggregate, welche als zusätzliche Vernetzungseinheiten dienen. MEDDAB hatte einen deutlich höheren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Hydrogele als AUTMAB. Die Maschenweite zwischen den Vernetzungspunkten,  $M_c$ , ist mit zunehmendem Gehalt von AUTMAB oder MEDDAB in den Hydrogelen gestiegen. Bei *Surfmer*-Konzentrationen von 1 wt% wurde bei AUTMAB eine  $M_c$  von  $506 \text{ kg mol}^{-1}$  bestimmt, während sie bei MEDDAB bei  $782 \text{ kg mol}^{-1}$  lag [110]. Es wurde bereits eine Inkorporation von NIPAAm in die Schale der Mizellen der beiden kationischen *Surfmere* beschrieben [109]. Damit standen weniger NIPAAm-Moleküle zur Vernetzung zur Verfügung, während die copolymerisierten Mizellen neue und größere Vernetzungspunkte bildeten. Insgesamt war die Anzahl an Vernetzungspunkten deutlich geringer als im reinen NIPAAm-Hydrogel und die Copolymer-Hydrogele waren damit dehnbarer und härter. Bei den MEDDAB-Mizellen befanden sich die polymerisierbaren Gruppen auf der Oberfläche der Mizellen, während sie sich bei den AUTMAB-Mizellen im Kern befanden, wodurch weniger Polymerketten von der Mizelle aus starteten. Durch die höhere Netzwerkdicke waren die Hydrogele mit MEDDAB stabiler, da sie größeren Belastungen widerstehen und gleichzeitig mehr gedehnt werden konnten [110]. Des Weiteren erzeugten Li *et al.* hydrophob assoziierte Hydrogele durch die Copolymerisation von Acrylamid (AAm) mit dem *Surfmer* 9- oder 10-Acrylamidostearinsäure [111]. Dieses *Surfmer* bildete dabei stabile Multi-Mizellen-Aggregate. Die resultierten physikalischen Hydrogele zeigten ein pH-abhängiges Quellen und Entquellen und eine hohe mechanische Stärke gegenüber den konventionellen PAAM-Hydrogelen, die chemisch vernetzt wurden.

Diese Studien sind sehr interessant aber zeigen auf, dass die Vernetzung der Hydrogele durch das Einbringen der *Surfmere* sehr beeinflusst wurde und die Struktur und die Eigenschaften der Hydrogele stark verändert wurden. Damit ist eine Funktionalisierung von Hydrogelen noch nicht vollständig gelungen, da durch die Ausbildung von Mizellen und Aggregaten die funktionellen Gruppen der *Surfmere* nur schlecht zugänglich sind, was sie für Interaktionen oder weitere Konjugationen mit anderen Molekülen ungeeignet macht. Auf diesem Gebiet sind weitere Untersuchungen nötig, um besser verstehen zu können, wie *Surfmere*, eingebunden in

Hydrogelen, einen Mehrwert bringen und vielversprechende Polyelektrolytmaterialien erzeugt werden können.

#### 1.4.2 Funktionalisierungen mit Isothiuroniumgruppen oder Thiolen

Durch das Einbringen von funktionellen Gruppen können Polymernetzwerke mit gezielten Eigenschaften erzeugt werden. Eine besonders relevante funktionelle Gruppe stellt durch ihre Vielseitigkeit die Isothiuroniumgruppe dar. Cohen *et al.* erzeugten Polyisothiuronium-Methylstyrol (PITMS)-NP durch eine Copolymerisation des Monomers Isothiuronium-Methylstyrol mit EGDMA [112]. Durch die Isothiuroniumgruppe zeigten die Partikel eine antibakterielle Wirkung in Suspension und ebenfalls ihr Potenzial, eine Biofilmbildung zu verhindern, indem Polyethylenterephthalat (PET)-Filme damit beschichtet wurden. Über die Zetapotenzialmessung untersuchten sie die Stabilität der NP und bestimmten einen isoelektrischen Punkt (IEP) von 10,2, bei welchem die Partikeldispersion durch mögliche Aggregation als nicht stabil gilt. Bei steigenden pH-Werten nahm das Zetapotenzial wieder zu, wodurch sie auf eine Hydrolyse der Isothiuroniumgruppen zu deprotonierten Thiolen schlossen [112]. Die Messung des Zetapotenzials gibt Aufschluss über die Oberflächenladung von z. B. NP oder makroskopischen Festkörpern [113]. Bei Kontakt mit einer wässrigen Flüssigkeit nimmt ein Festkörper eine Oberflächenladung an. Das Ladungsverhalten an der Grenzfläche zwischen einem Festkörper und einer Flüssigkeit kann mit einer stationären immobilen Phase an Ionen und einer mobilen Phase an Gegenionen, welche die Oberflächenladung kompensieren, beschrieben werden. Bei funktionellen Gruppen an der Oberfläche finden Säure-Base-Reaktionen statt. Bei Oberflächen ohne funktionelle Gruppen werden Hydroxid- oder Hydronium-Ionen adsorbiert [113]. Durch eine Veränderung des pH-Wertes der Flüssigkeit während der Messung kann ein IEP bestimmt werden. Der IEP ist der pH-Wert, an welchem die Nettoladung null ist und das Zetapotenzial 0 mV annimmt [114].

Die antibakterielle Wirkung von Isothiuronium-Derivaten wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben [115]. Es ist bekannt, dass kationische Gruppen die negativ geladene Zellmembran von Mikroorganismen beschädigen können [116, 117]. Zusätzlich zu ihrer antibakteriellen Wirkung wurde auch eine antitumorale Aktivität von Isothiuroniumgruppen gezeigt, indem sie einen proapoptotischen Effekt auf Leukämiezellen hatten [118, 119]. Außerdem werden Isothiuronium-funktionelle Partikel als Adsorber für Schwermetallionen verwendet [120-123]. In makroskopischen Hydrogelen sind Isothiuroniumgruppen aber unzureichend beschrieben.

Eine weitere Besonderheit von Isothiuroniumgruppen ist, dass sie mit Natriumhydroxid oder Natriummetabisulfit zu Thiolen reduziert werden können [124-126], wodurch sie als Thiol-Vorläufer gelten. Dies ist von besonderer Relevanz, da es sehr schwierig ist, Thiol-Funktionalitäten direkt in Hydrogele einzubringen. Thiole können Vernetzungsreaktionen, wie radikalische Polymerisationen, entweder beeinträchtigen [127, 128] oder bei Vernetzungsreaktionen selbst als Reaktanden dienen und verbraucht werden, wie bei Thiol-Alkin- oder Michael Additionen [129, 130]. Eine Thiol-Funktionalität eröffnet die Möglichkeit, weitere Moleküle zu binden oder Biokonjugationsreaktionen durchzuführen [131, 132]. Allerdings gibt es nur wenige Studien, die von verfügbaren Thiolen in Hydrogelen berichten

und diese für weitere Reaktionen nutzen. Southan *et al.* synthetisierten Polymere mit einem PEG-*Backbone* und copolymerisierten Poly(glycidylthiol) mit PEG-DA [60]. Die daraus entstandenen Hydrogele mit Thioleffunktionalität erhöhten die Zelladhäsion von Fibroblasten im Gegensatz zu nicht funktionalisierten PEG-Hydrogelen. In einer weiteren Studie wurden Hydrogel-Mikropartikel basierend auf Polymethacrylsäure, PEG und Chitosan mit einer Thioleffunktionalität für die Insulingabe hergestellt [133]. Außerdem wurden PEG-basierte Hydrogele über reaktives *micro-contact printing* mit Gold-NP beschichtet [134]. Die NP konnten durch die Interaktion der Thiole mit Gold einfacher auf die Hydrogele aufgebracht werden und Zellen der murinen Fibroblasten-Zelllinie L929 adhärten bevorzugt auf der NP-Schicht. Cai *et al.* erzeugten ebenfalls PEG-Hydrogele über nukleophile Thiol-Alkin-Addition mit 4-armigen PEG-Alkinen und PEG-Thiolen [129]. Sie bestimmten auch verbleibende Thiole in den Hydrogelen, nutzen diese aber nicht, sondern schlussfolgerten, dass es auch verfügbare Alkine geben müsse, an welche sie ein antimikrobielles Peptid banden.

### 1.4.3 Biofunktionalisierung von Polymeren und Polymernetzwerken

Eine Biofunktionalisierung von inerten Polymernetzwerken, wie PEG-basierten Hydrogelen, kann dazu dienen, ihre Bioaktivität zu steigern und sie z. B. für das TE zu nutzen. Für die Funktionalisierung können Biomoleküle, wie Aminosäuresequenzen oder Biopolymere, in die Hydrogelvorläuferlösung integriert und mit vernetzt werden [31, 93]. So wurde die Aminosäuresequenz RGD, an welche Zellen über ihre Integrine binden können, schon oft für die Funktionalisierung von PEG-basierten Hydrogelen genutzt [30, 31, 59]. Hern und Hubbell integrierten die RGD-Sequenz in PEG-DA-Hydrogele und untersuchten die Zelladhäsion von Fibroblasten [30]. Dabei stellten sie fest, dass RGD über einen PEG-*Spacer* in den Hydrogelen immobilisiert werden sollte, um ein Spreiten der Zellen spezifisch und effektiv zu fördern. Burdick und Anseth untersuchten das Potenzial von PEG-basierten Hydrogelen für die Verkapselung von Osteoblasten für Knochendefekte [31]. Sie stellten PEG-DA-Hydrogele her, die zusätzlich das Makromer Acryloyl-PEG-RGD in der Vorläuferlösung enthielten. Auf den funktionalisierten Hydrogelen adhärten innerhalb 24 h mehr Osteoblasten als auf den nicht funktionalisierten. Zusätzlich spreiteten die Zellen auf den funktionalisierten Hydrogelen und zeigten keine abgerundete Morphologie wie auf den unfunktionalisierten PEG-DA-Hydrogelen. Durch die Funktionalisierung konnte zudem eine höhere Mineralisierung der Hydrogele mit steigendem RDG-Gehalt festgestellt werden [31].

Abgesehen von Aminosäuresequenzen können auch biobasierte Polymere in bioinerte Hydrogele eingebracht werden. Ravichandran *et al.* synthetisierten methacryliertes Typ I Kollagen (MAC) und erzeugten durch Vernetzung PEG-Thiol-Hydrogele mit einstellbaren Eigenschaften [135]. Die Thiol-Michael-Addition ermöglichte dabei eine Click-Reaktion ohne Nebenprodukte. Sie stellten fest, dass die Tripelhelices des Kollagens, die essenziell für die mechanischen Eigenschaften sind, trotz der Methacrylierung noch vorhanden waren. Unter Verwendung verschiedener Verhältnisse der PEG-Thiole und MAC konnten Hydrogele mit einem  $G'$  von 10 kPa bis 100 kPa für die 8-Arm PEG-Thiole und von 15 kPa bis 90 kPa für die 4-Arm PEG-Thiole erzeugt werden. Durch diese hohe Variabilität könnten die Hydrogele sowohl als Zellsubstrat als auch als injizierbare Matrix mit verkapselten Zellen eingesetzt

werden [135]. Wang *et al.* entwickelten Hydrogele aus GM und PEG-DA für die Regenerierung von Knochen [93]. Es wurden entweder reine GM-Hydrogele in den Konzentrationen 10 w/v%, 20 w/v% und 30 w/v% (G10, G20, G30) hergestellt oder GM/PEG-DA (GP)-Hydrogele mit jeweils zusätzlich 5 w/v% PEG-DA (P5). Im Vergleich zu den G10- und G20-Hydrogelen war der *EDS* bei den G10P5- und G20P5-Hydrogelen geringer durch eine höhere Vernetzungsdichte der Hydrogele. Die GP-Hydrogele zeigten alle jeweils eine höhere Druckspannung als die reinen GM-Hydrogele. So war die Druckspannung der G10P5-Hydrogele 70,6 kPa, während sie bei den G10-Hydrogelen bei 12,1 kPa lag. Damit wurde durch PEG-DA die mechanische Stärke der Hydrogele erhöht, ohne die Zellkompatibilität, getestet mit MC3T3-E1-Zellen, zu beeinträchtigen [93].

Wie schon erwähnt, können Thiole dazu genutzt werden, über Biokonjugationsreaktionen Proteine oder andere Biomoleküle zu binden [131]. Dafür wird oft der Mechanismus der radikalischen Thiol-En-Reaktion oder der ähnlich ablaufenden Thiol-Michael-Addition genutzt [131, 136, 137]. Die Thiol-Michael-Addition wird typischerweise durch eine Base oder ein Nukleophil katalysiert. Deprotonierte Thiole reagieren mit elektronenarmen Alkenen, wodurch eine kovalente Bindung entsteht. Bei dem Alken kann es sich beispielsweise um ein Maleimid oder (Meth-)Acrylat handeln [136, 137]. Boyer *et al.* erzeugten Poly(NIPAAm) über eine *reversible addition-fragmentation chain transfer* (RAFT)-Polymerisation [138]. In einem ersten Ansatz wurde über eine Aminolyse und Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ein Pyridyl-Disulfid funktionalisiertes Polymer gebildet. Dadurch war es möglich, sowohl ein Hexapeptid als auch ein Thiol-modifiziertes Oligonukleotid an Poly(NIPAAm) zu binden. Durch die Anbindung der Biomoleküle über Disulfidbrücken konnten diese unter reduzierenden Bedingungen wieder vom Polymer freigesetzt werden. In einem zweiten Ansatz wurde die hohe Reaktivität von Thiolen gegenüber Alkenen für eine direkte, nicht reversible Biofunktionalisierung über Thioether-Verbindungen genutzt. Dafür wurden ein Maleimid-modifiziertes Biotin und eine 6-*O*-Methacryloylmannose verwendet, die während der Aminolyse konjugiert wurden [138]. Yu *et al.* erzeugten Glykopolymere mit einem hoch verzweigten Poly(Amidoamin) (HPAA)-Kern und einer Zucker-Schale über die Thiol-En Click-Reaktion [125]. Dafür wurden 1-Thio- $\beta$ -*D*-Glucose und HPAA mit Vinyltermini synthetisiert. Koch *et al.* nutzten ebenfalls Thiolgruppen für Biokonjugationsreaktionen [132]. Sie verwendeten die Cystein-Mutante des Tabakmosaikvirus (TMV) und banden daran einen Maleimid-PEG-Biotin-Linker, um Streptavidin (SA)-gekoppelte Enzyme an die TMV zu konjugieren. Auf die Verwendung der TMV als Biosensorkomponenten wird in Kapitel 1.6.2 genauer eingegangen.

## 1.5 Druckverfahren für Biopolymere

### 1.5.1 Druckverfahren mit UV-Vernetzung

Für die Herstellung von komplexeren Hydrogelstrukturen, typischerweise genutzt für das TE aber auch geeignet für strukturierte Oberflächen im Bereich von Biosensoren [139, 140], werden additive Fertigungsverfahren verwendet. Die Strukturen können über verschiedene

Druckverfahren erzeugt werden. Gängige Verfahren für Druckprozesse, bei denen photosensitive Polymerlösungen vernetzt werden, sind der *Inkjet*-, Extrusions-, Stereolithographie (SLA)- und *Digital Light Processing* (DLP)-Druck [141-143]. Für die Druckverfahren fanden schon zahlreiche Hydrogelmaterialien Anwendung, wie z. B. GM, Chitosan, Hyaluronsäure, Alginat und synthetische Materialien wie PEG-DA [5, 69, 70, 83, 144-151].

Beim *Inkjet*-Druck wird zwischen zwei Mechanismen unterschieden: dem *continuous Inkjet*- (CIJ)-Druck und dem *drop-on-demand* (DOD)-*Inkjet*-Druck [152-154]. Beim CIJ-Druck wird ein kontinuierlicher Strom an Tropfen erzeugt. Für den Druck unerwünschte Tropfen werden durch ein elektrisches Feld abgelenkt, wodurch nicht benutzte Tinte potenziell recycelt werden kann. Beim DOD-Druck werden die Tropfen durch einen Druckpuls in der Flüssigkeit erzeugt. Sobald der Puls einen Schwellenwert überschreitet, wird ein Tropfen ausgestoßen. Es wird zwischen dem thermischen und dem piezoelektrischen DOD-Druck unterschieden [154]. Beim thermischen DOD-Druck befindet sich ein schmales Heizelement in der Flüssigkeitskammer. Der Druckpuls wird aufgebaut, indem die Flüssigkeit erwärmt wird und sich eine Dampfblase bildet, welche kollabiert, sobald der Strom im Heizelement entfernt wird. Beim piezoelektrischen DOD-Druck wird ein piezoelektrischer Wandler verwendet und damit der Druckpuls über einen mechanischen Antrieb erzeugt (Abbildung 3a). Beim DOD-Druck bildet sich der Tropfen aus einer Flüssigkeitssäule, welche sich ausdünn und dabei einen Haupttropfen und einen verlängerten Schweif bildet. Durch Brüche innerhalb des Schweifes können Satellitentropfen entstehen, welche die Druckpräzision beeinträchtigen können, wenn sie sich nicht rechtzeitig vor Auftreffen auf dem Substrat mit dem Haupttropfen verbinden (Abbildung 3c) [154]. Das Verhalten der Tropfen kann mit der Reynolds- (*Re*), der Weber- (*We*) und der Ohnesorge- (*Oh*) Zahl beschrieben werden. Die *Re*-Zahl trifft eine Aussage über die Art der Strömung. Die *We*-Zahl beschreibt das Verhältnis zwischen Trägheitskräften und kohäsiven Kräften [155]. Die *Oh*-Zahl ergibt sich aus der Wurzel der *We*-Zahl geteilt durch die *Re*-Zahl. Zusätzlich wurde die Zahl *Z* eingeführt, die dem Kehrwert der *Oh*-Zahl entspricht. Für Werte  $1 < Z < 10$  gilt die Tropfenbildung als stabil. Nimmt *Z* höhere Werte an, entstehen Satellitentropfen, während bei zu geringen Werten die Drucktinte zu viskos für das Ausstoßen von Tropfen ist (Abbildung 3b) [154, 156, 157]. Die Viskosität von Tinten für den *Inkjet*-Druck sollte einen Wert von 20 mPa s nicht überschreiten, da die Kraft des Piezoelements limitiert ist [152, 153].

Hoch *et al.* untersuchten die Eignung verschiedener Tinten mit 5 wt% bis 20 wt% GM für den *Inkjet*-Druck [83]. Es wurde ein piezoelektrischer *Inkjet*-Drucker von GeSiM GmbH mit dazugehöriger Nano-Tip-Mikropipette verwendet, wobei Tropfengrößen zwischen 350 pL und 400 pL entstanden und die Tinten bei 25 °C und 37 °C gedruckt wurden. Durch eine zusätzliche Acetylierung der GM mit einem geringen Methacryloylierungsgrad ( $GM_2$ ) wurden die intermolekularen Interaktionen zusätzlich verringert ( $GM_2A_8$ ). Damit wurden Lösungen gewonnen, die bei 25 °C, ähnlich wie  $GM_{10}$ -Lösungen, nicht gelierten. Für 10 wt%  $GM_{10}$ -Lösungen wurde bei 37 °C eine dynamische Viskosität von  $(3,3 \pm 0,5)$  mPa s bestimmt, während sie bei 25 °C einen Wert von  $(4,4 \pm 1,0)$  mPa s annahm. Bei den 10 wt%  $GM_2A_8$ -Lösungen lag die dynamische Viskosität bei 37 °C bei  $(2,9 \pm 0,2)$  mPa s und bei 25 °C bei



( $3,9 \pm 0,3$ ) mPa s. Damit waren beide Formulierungen potenziell für den *Inkjet*-Druck geeignet. Bei 5 wt% Lösungen war ein stabiler Druckprozess bei 25 °C und bei 37 °C möglich. Bei höheren Konzentrationen der Biopolymere von 10 wt% und 15 wt% war ein stabiler Druckprozess bei 37 °C nur noch mit der 10 wt% GM<sub>2</sub>A<sub>8</sub>-Lösung durchführbar. Dies wurde auf mögliche Verklebungen der Druckdüse zurückgeführt durch ein beschleunigtes Verdampfen der Lösung bei der höheren Temperatur. In *proof-of-principle* Versuchen konnten ebenfalls erfolgreiche Drucke bei 25 °C mit porzinen Chondrozyten gezeigt werden. Die Zellen wurden in die Drucktinten verkapselt, auf gequollene Hydrogelsubstrate aufgedruckt und deren Viabilität nach bis zu 72 h beurteilt (Abbildung 3c-f) [83].

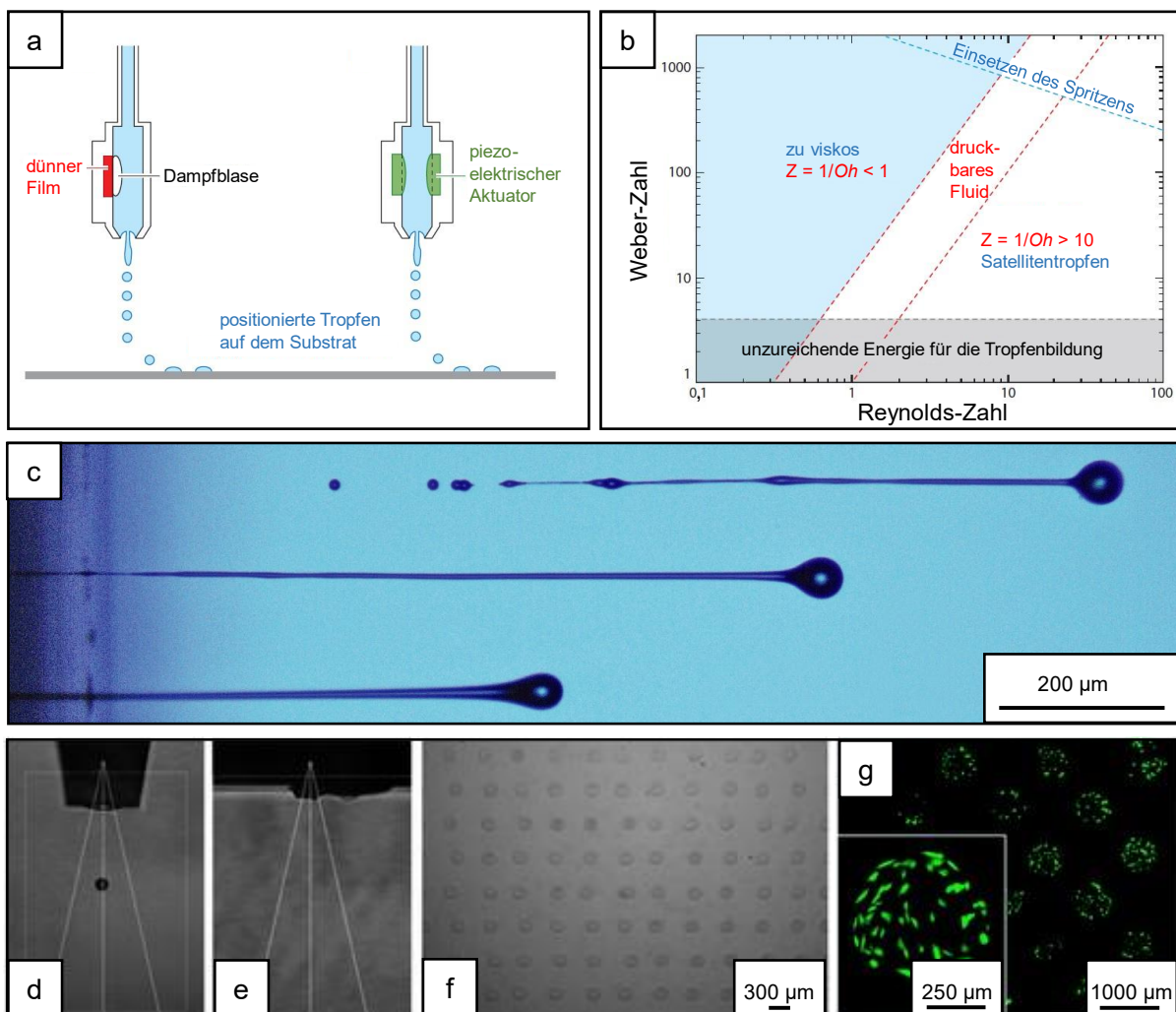


Abbildung 3: Funktionsweise und Anwendung des Inkjet-Drucks. a) DOD Inkjet-Druck mit thermischer (links) oder piezoelektrischer Funktionsweise (rechts). b) Druckbarer Bereich von Tinten in Abhängigkeit der Weber- und Reynolds-Zahl. Für Z-Zahlen ( $1/Oh$ -Zahl)  $< 1$  gelten Tinten als zu viskos. Bei Werten  $> 10$  bilden sich Satellitentropfen aus, die das Druckbild beeinträchtigen können. c) Erzeugte Tropfen mit dem DOD-Druck an drei unterschiedlichen Stadien der Tropfenbildung. Der Tropfen bildet sich aus einer Flüssigkeitssäule, woraus sich ein Haupttropfen und ein verlängerter Schweif bildet. Der Schweif zerbricht in einzelne Satellitentropfen hinter dem Haupttropfen. a), b) und c) verändert nach [154]. d) Tropfenbildung einer Tinte mit 10 wt% GM<sub>10</sub> bei 25 °C. e) Verklebung der Druckdüse mit einer 10 wt% GM<sub>10</sub>-Tinte bei 37 °C. f) Gedrucktes Muster mit derselben Tinte bei 25 °C. g) Morphologie von gedruckten porzinen Chondrozyten in der GM<sub>10</sub>-Tinte nach 72 h. Zellen wurden mit Fluoresceindiacetat gefärbt. d) bis g) verändert nach [83].

Beim Extrusionsdruck wird eine Pumpe oder ein Kolben verwendet, um die Drucktinte kontinuierlich als zylinderförmige Linien auszugeben [142]. Damit wurden beispielsweise Gitterstrukturen basierend auf GM mit niedrigem und mittlerem Methacryloylierungsgrad (GM<sub>2</sub> und GM<sub>5</sub>), HAM und LAP als PI gedruckt. Aufgrund der Auflösung von ca. 200 µm [158] bei Biopolymerlösungen ist der Extrusionsdruck allerdings eher ungeeignet, um filigrane Strukturen zu erzeugen oder orts aufgelöste Beschichtungen auf Oberflächen zu generieren. Eine weitere Methode ist der SLA-Druck, bei welchem mit einem UV-Laserstrahl ein Muster auf die Oberfläche eines flüssigen, photosensitiven Harzes, wie einer Polymerlösung, übertragen wird [159]. Das gewünschte Modell wird über *computer-aided design* (CAD) erstellt. Das Harz wird bis zu einer definierten Schichtdicke vernetzt und haftet auf einer Bauplattform. Die Bauplattform wird vertikal verfahren und frisches Harz wieder mit dem Muster belichtet, wobei die zweite Schicht an die erste Schicht vernetzt wird. Durch weiteres Verfahren der Bauplattform wird der 3D-Körper erzeugt [159]. Das DLP-Verfahren basiert auf einem ähnlichen Prinzip. Im Gegensatz zum SLA-Druck wird dabei ein digitales Mikrospiegelgerät (*digital micro mirror device*, DMD) verwendet, welches aus einer Million Spiegeln besteht. Durch die Projektion eines Musters kann dabei die ganze Schicht auf einmal ausgehärtet werden. Auch hier wird nach jeder Schicht die Bauplattform verfahren [141, 159]. Durch das Harzbad wird bei beiden Verfahren allerdings deutlich mehr Lösung benötigt als im Endeffekt vernetzt wird. Morris *et al.* nutzten das SLA-Verfahren, um Hybrid-Hydrogele aus Chitosan (50-190 kDa) und PEG-DA (575 Da) mit Irgacure 819 und einem 405 nm Laser zu drucken [145]. Dabei bestimmten sie ein Verhältnis von Chitosan zu PEG-DA von 1:7,5, welches am besten geeignet war für die Druckbarkeit, die Zelladhäsion und die mechanischen Eigenschaften. Die Hydrogele hatten eine mittlere Porengröße von ca. 67 µm und ein Elastizitätsmodul von ca. 400 kPa. Wang *et al.* nutzten verschiedene Verhältnisse von PEG-DA und GM mit einem Eosin Y-basierten PI, um mittels SLA Hydrogele im grünen Lichtbereich zu drucken [150]. Sie nutzen einen Wasser-Filter, um die Infrarot-Strahlen, generiert durch den Projektor, abzuschirmen. Die mechanischen Eigenschaften wurden von gegossenen Hydrogelen untersucht. Dabei bestimmten sie einen Kompressionsmodul von ca. 200 kPa für die 10 wt% PEG-DA-Hydrogele. Bei den Hydrogelen aus 5 wt% PEG-DA und 5 wt% GM lag er bei ca. 60 kPa und bei der Kombination aus 2,5 wt% PEG-DA und 7,5 wt% GM bei ca. 20 kPa. Durch den Zusatz von GM wurde der *EDS* und die Porengröße von 5 µm auf 50 µm bis 100 µm in den Hydrogelen erhöht, was vorteilhaft für eine Zellbesiedelung ist. Sie druckten sowohl ohne als auch mit NIH3T3-Fibroblasten in der Tinte und bestimmten eine Auflösung von 50 µm und eine Zellviabilität von > 80 % nach fünf Tagen für Hydrogele mit GM [150]. Grigoryan *et al.* verwendeten PEG-DA und LAP, um 3D-Konstrukte mittels SLA zu drucken [70]. Durch die Addition von Lebensmittelfarbstoffen, wie Tartrazin, als Photoabsorber in der Drucktinte, gelang es ihnen, Hohlräume und damit vaskularisierte Strukturen zu erzeugen. Die Photoabsorber verzögerten den Start der Photovernetzung, eine Beeinträchtigung der Reaktion wurde aber nicht festgestellt. Das Tartrazin konnte nach dem Druck wieder ausgewaschen werden, sodass nahezu transparente Hydrogele entstanden. Die Verwendung von Photoabsorbieren könnte damit eine hilfreiche Methode sein, um filigrane Strukturen zu drucken. Mandon *et al.* demonstrierten, wie wichtig die 3D-Druckverfahren für

die Erzeugung komplexer biosensorischer Oberflächen sein können [139]. Zunächst druckten sie mit dem DLP-Verfahren aus PEG-DA-Lösungen *Puzzle*-Strukturen, wobei in eine Struktur die Glucoseoxidase (GOx) und in die andere die Meerrettichperoxidase (HRP) verkapselt wurde. Die *Puzzle*-Strukturen wurden zusammengesetzt und in Puffer mit Glucose und Luminol eingelegt. Beim Umsatz von Glucose entstand Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches als Substrat für die HRP diente und durch das Luminol eine Chemilumineszenz-Reaktion auslöste, welche an der Grenze der beiden Strukturen sichtbar war. Des Weiteren wurden komplexere Strukturen gedruckt, in welche beide Enzyme zusammen verkapselt wurden.

### 1.5.2 Druckverfahren mit 2-Photonen-Polymerisation

Bei dem Druck mittels 2-Photonen-Polymerisation (*2-photon polymerization*, 2PP) wird ein kurz-gepulster *Laser*-Strahl auf das Volumen eines flüssigen Harzes fokussiert, sodass eine nahezu gleichzeitige Absorption von zwei Photonen stattfindet. Damit zwei Photonen absorbiert werden können, werden meist gepulste *Laser* im Femtosekunden (fs)-Bereich verwendet, um hohe Intensitäten zu erreichen [160, 161]. Typischerweise werden *Laser* im Nahinfrarotbereich mit Wellenlängen von ca. 800 nm verwendet, nahe an der doppelten Wellenlänge für die Polymerisation vieler UV-vernetzbarer Harze [160]. Es wird ein Volumen, das den Strahl umgibt, polymerisiert, wenn genug Energie absorbiert wird, um einen bestimmten Schwellenwert zu überschreiten, der für die Polymerisation nötig ist [141, 160]. Durch die Energieverteilung resultiert ein Volumen, welches einem Doppelkegel ähnelt. Dieses Volumen, in dem die Polymerisation stattfindet, wird als *Voxel* (*volumetric pixel*) bezeichnet [161]. Bei der 2PP handelt es sich um einen nicht-linearen optischen Prozess. Dabei ist die Rate proportional zum Quadrat der *Laser*-Intensität, wodurch Auflösungen von unter 100 nm erreicht werden können [160]. Die Auflösung der Strukturen hängt dabei von mehreren Parametern ab, wie z. B. der *Laser*-Leistung, der Expositionszeit, der Pulsfrequenz, der *Scan*-Geschwindigkeit, der Distanz zwischen zwei Voxeln, der numerischen Apertur (NA) des Objektivs sowie der Wahl und Konzentration des PIs [160, 161]. Die Dimensionen eines Voxels sind hauptsächlich von der *Laser*-Dosis bestimmt, die sich aus der Kombination von *Laser*-Leistung und Expositionszeit ergibt [160].

Für den 2PP-Druck werden sowohl biobasierte als auch synthetische Drucktinten auf Basis von u. a. GM, bovinem Serumalbumin (BSA), Acrylaten und PEG-DA verwendet [6, 162-167]. Ovsianikov *et al.* druckten poröse Strukturen aus GM mit Irgacure 2959 als PI mittels *direct laser writing* (DLW) mit einem 20x Objektiv und einer NA von 0,40 [163]. Sie nutzten einen fs-gepulsten Laser mit einer Wellenlänge von 515 nm. Die Strukturen waren so konzipiert, dass die Poren eine Fläche von  $250\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$  hatten. Nach dem Druck stellten die Wissenschaftler fest, dass die Poren nicht vollständig geöffnet, sondern mit einer maschenartigen Struktur durchzogen waren. Da die Poren nicht mit dem *Laser* bestrahlt wurden, wurde davon ausgegangen, dass Radikale des PIs dorthin diffundierten und eine Polymerisation auslösten. Durch eine Behandlung der Proben mit Kollagenase wurde beobachtet, dass die maschenartigen Strukturen degradierten, bevor die gedruckte Struktur sichtbar beeinträchtigt wurde. Zellversuche mit porzinen mesenchymalen Stammzellen haben allerdings gezeigt, dass die Zelladhäsion auf den nicht behandelten Strukturen initial verstärkt war und die Zellen auch

innerhalb der Maschen adhären [163]. Engelhardt *et al.* druckten u. a. Linien mit GM<sub>10</sub> und Irgacure 2959 als PI bei 690 nm [164]. Die Linien hatten eine Dicke von ca. 1 µm, eine Höhe von 2 µm und einen Abstand von 4 µm zueinander. Die Polymerlösung wurde auf ein Glassubstrat gegeben und unter Verwendung eines *Spacers* mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Glassubstrat wurde mit 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylat silanisiert, um ein Haften der Struktur auf der Oberfläche zu ermöglichen. Bei Adhäsionsversuchen mit porzinen Chondrozyten stellten die Wissenschaftler fest, dass sich die Zellen gezielt entlang der Linien ausrichteten.

Oft wird für den 2PP-Druck der *Nanoscribe GT Photonic Professional* (Nanoscribe GmbH & Co. KG) mit einer Wellenlänge des fs-gepulsten *Lasers* von 780 nm verwendet [6, 166, 168]. Bei dem Druck mit Biopolymer-Lösungen ist es gängig, Deckgläschen zu silanisieren, um Methacrylgruppen auf der Oberfläche zu erzeugen, damit die gedruckte Struktur direkt daran vernetzt wird. Außerdem wird häufig unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs gedruckt [166, 168]. So druckten Brigo *et al.* *Woodpile*-Strukturen mit unterschiedlichen seitlichen Abständen der Balken von 6-18 µm und axialen Abständen von 0,50-1,25 µm durch eine Änderung der *Laser*-Leistung und *Scan*-Geschwindigkeit [168]. Sie verwendeten 10 wt% GM-Lösungen mit PEG-DA als Vernetzer und einen Benzyliden-Cycloketon-basierten PI. Für den Druck mit einem 63x 1,4 NA Ölimmersionsobjektiv wurde ein erstes Deckgläschen silanisiert, um die gedruckten Strukturen daran zu binden. Ein zweites Deckgläschen wurde auf die Lösung gegeben, damit diese nicht verdunstet. Dieses Deckgläschen wurde mit einem anderen Silan behandelt, um eine antiadhäsive Oberfläche zu erzeugen. Zur Untersuchung der Zellkompatibilität wurden humane Vorhautfibroblasten auf einer gedruckten Balkenstruktur bestehend aus zwanzig Schichten ausgesät. Dabei betrug der seitliche Abstand der Balken 12 µm und der axiale Abstand 0,5 µm. Die Zellen spreiteten gezielt entlang der Strukturen [168].

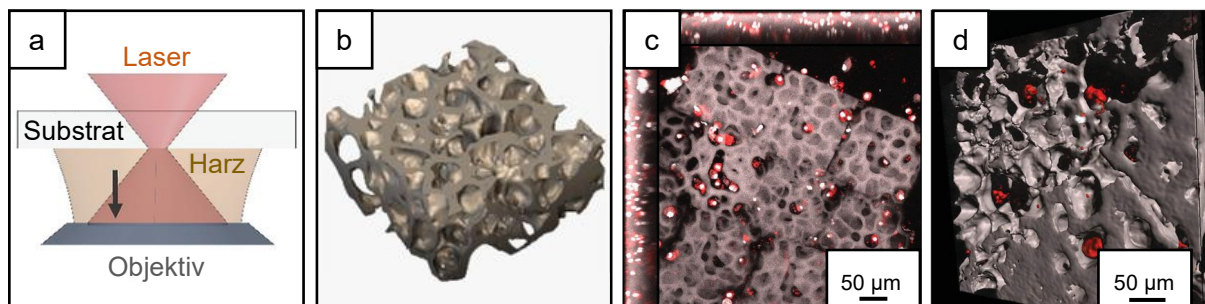


Abbildung 4: 3D-Druck mit 2-Photonen-Polymerisation. a) Beim Dip-in Modus dient die Drucktinte als Immersionsmedium, indem die Tinte direkt auf das Objektiv aufgebracht wird. b) 3D-Struktur des Alveolargewebes, das durch Schnitte in z-Richtung in einzelnen Ebenen dargestellt werden kann. c) Ansicht einer 4x4 222x222x104 µm Gerüststruktur. Am oberen und linken Rand ist die 3D-Verteilung der primären humanen Lungenfibroblasten gezeigt. d) 3D Darstellung von einem z-Stack aus c). Abbildung verändert nach [6].

Es wurde bereits eine Autofluoreszenz von PI festgestellt, welche Fluoreszenzfärbungen von mit Zellen besiedelten Strukturen beeinträchtigen kann [6, 166]. Shrestha *et al.* druckten mit verschiedenen methacrylierten Biopolymeren, wie MAC, GM, HAM und einer 50:50-Mischung aus GM und HAM, Strukturen, um die retinale ECM nachzuahmen [166]. Sie verwendeten Methyleneblau als PI. Die Drucke wurden mit einem 25x Objektiv, einer NA von

0,8 und Immersionsöl gedruckt. Die Drucke waren am reproduzierbarsten, wenn GM in der Drucktinte enthalten war und am wenigsten verlässlich mit HAM allein.

Erben *et al.* druckten Alveolarstrukturen analog zu 3D-Daten einer dezellularisierten Mauslunge mit GM<sub>10</sub> und nutzten Rose Bengal oder LAP als PI [6]. Sie verwendeten das *Dip-in Set-up*, um höhere Strukturen bei gleichbleibender Auflösung drucken zu können (Abbildung 4a). Bei dem *Dip-in* Modus dient das Harz gleichzeitig als Immersionsmedium [169]. Durch das *Set-up* bleibt die Feuchtigkeit in der Tinte erhalten, wodurch die Tinte für einen längeren Zeitraum definiert vorliegt. Zusätzlich wurde ein Wasserreservoir benutzt, um eine anhaltende Feuchtigkeit zu gewährleisten. Durch Verwendung eines 25x Objektivs mit einer NA von 0,8 konnten Alveolarstrukturen von (222 x 222 x 104) µm in 6 min gedruckt werden. Zunächst wurden Drucke mit Rose Bengal als PI gefertigt. Es wurde allerdings eine starke Autofluoreszenz festgestellt, weshalb auf LAP gewechselt wurde. Die Strukturen wurden anschließend mit Fibronektin beschichtet und deren Zytokompatibilität mit Fibroblasten untersucht (Abbildung 4b-d) [6].

Damit ist der 2PP-Druck ein sehr interessantes Verfahren für die Erzeugung filigraner Strukturen und wird mittlerweile nicht nur im Bereich des TE sondern auch in anderen Feldern wie der Mikrorobotik [170], Mikrooptik [171, 172], für Biosensoren [173], Mikro- und Nanophotonik [174, 175], mikroelektromechanische Systeme (MEMS) [176-178] und Mikrofluidik [179, 180] eingesetzt. Bisher ist die Methode allerdings noch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden.

## 1.6 Biosensoren

### 1.6.1 Hydrogele als Komponenten für Biosensoren

Biosensoren haben hohe Relevanz in der Klinik und Lebensmittelindustrie. Mit Glucose-Biosensoren wird z. B. Diabetes Mellitus diagnostiziert, während in der Lebensmittelindustrie die Qualität von Nahrungsmitteln bestimmt wird und auch Pathogene nachgewiesen werden können [181-183]. Das generelle Wirkprinzip basiert darauf, dass Analyte vom Sensor detektiert werden und ein Signal auslösen, welches durch einen Wandler in ein elektrisches Signal umgewandelt wird [182, 184]. Abhängig von dem Detektionssystem, welches z. B. optisch oder thermisch sein kann, dem verwendeten Biorezeptor, wie ein Enzym oder Antikörper, der den Analyten erkennt, oder dem Wandler können Biosensoren in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden [182, 184]. Im Folgenden liegt der Fokus auf enzymbasierten Biosensoren. Bei enzymbasierten Biosensoren erfolgt die Erkennung und Umsetzung des Analyten bzw. Substrats durch Enzyme, die hochspezifisch für die von ihnen katalysierten Reaktionen als auch für die Substrate sind. Am häufigsten genutzte enzymbasierte Biosensoren detektieren Glucose, Laktat, Glutamat, Harnstoff oder Cholesterol [185, 186]. Oxidoreduktasen und darunter die Oxidasen und Dehydrogenasen gelten generell als die am meisten verwendeten Enzyme bei Biosensoren [185]. Das grundlegende Konzept eines Glucose-Sensors wurde bereits 1962 von Clark Jr. und Lyons beschrieben, als der Verbrauch an Sauerstoff als Co-Substrat im Blut gemessen wurde [187]. Bei Glucose-Sensoren wird in der

Regel die GOx mit Sauerstoff als Co-Substrat und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Co-Faktor verwendet. Die  $\beta$ -D-Glucose wird durch Sauerstoff zu D-Glucono-1,5-lacton oxidiert und Sauerstoff zu  $H_2O_2$  reduziert [188, 189]. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion kann mithilfe der Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden [190]. Dabei wird ein Gleichgewicht zwischen der Bindung eines Substrats an ein Enzym und dem resultierenden Produkt mit Enzym angenommen, wobei ein konstantes Zwischenprodukt im *steady state* als Enzym-Substrat-Komplex vorliegt. Die Substratkonzentration, bei welcher die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, wird in der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  wiedergegeben [191].

Es werden verschiedene Strategien genutzt, um Enzyme an Trägermaterialien zu immobilisieren. Dabei wird zwischen physikalischen und chemischen Methoden unterschieden [184, 192]. Die Enzyme können an Oberflächen adsorbiert werden durch beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen. Der Vorteil dabei ist, dass die Enzyme dafür nicht modifiziert werden müssen, wodurch die Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Allerdings ist die Methode nicht stabil gegenüber Änderungen der Umgebungsbedingungen, wie dem pH-Wert. Beim sogenannten *Entrapment* werden die Enzyme in einer Matrix verkapselt. Hierbei werden sie beispielsweise einer Monomerlösung hinzugegeben, welche polymerisiert wird. Chemische Immobilisierungsstrategien beinhalten eine direkte kovalente Anbindung oder eine kovalente Vernetzung. Die kovalente Anbindung an eine Trägersubstanz kann veränderten Umgebungsbedingungen gut standhalten, wobei für die starke Anbindung chemische Modifikationen vorgenommen werden müssen. Bei der kovalenten Vernetzung werden Enzyme miteinander oder mit anderen Proteinen quervernetzt und Aggregate gebildet, welche dann angebunden werden. Dabei besteht die Gefahr, dass die Enzymstruktur beeinträchtigt wird [184, 192]. Ebenso ist es möglich, Enzyme durch eine Affinitätsbindung, wie der Biotin-SA-Bindung, anzubinden [193]. Die Bindung von SA, welches aus vier identischen Untereinheiten besteht, und Biotin hat eine Dissoziationskonstante  $K_d$  von  $10^{-15}$  M, und entspricht damit einer der stärksten nicht kovalenten Bindungen [194, 195].

Wie bereits erwähnt, werden Hydrogele, neben ihrer Anwendung im TE und *Drug Delivery* [196-199], aufgrund ihrer Biokompatibilität und Transparenz auch als Bestandteil oder Basis von Biosensoren oder *soft robotics* verwendet [200-203]. Wegen den in den vorherigen Kapiteln aufgeführten positiven Eigenschaften von PEG, werden auch PEG-basierte Hydrogele häufig im Bereich der Biosensoren eingesetzt [10, 11, 71, 72]. Ahmad *et al.* verwendeten Peptid-vernetztes PEG als Biosensor, um das Enzym Kollagenase zu detektieren [10]. Dabei wurde die Degradation des PEG-Films durch das Enzym, welches eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie Arthritis spielt, mit einer Quarzkristallmikrowaage gemessen. Des Weiteren wurden Mikrostrukturen aus PEG-DA über Photolithographie auf Glassubstraten erzeugt [71]. Es wurden die Enzyme  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) oder GOx kombiniert mit der HRP in die Hydrogele integriert, um Analyten über die Fluoreszenzintensität zu detektieren. Dabei konnten mehrere Substrate gleichzeitig detektiert werden, indem *Microarrays* in einem zweistufigen Prozess erzeugt wurden, bei dem zuerst eine Mikrostruktur mit GOx/HRP gebildet wurde und danach eine mit  $\beta$ -Gal unter Anwendung einer Photomaske. Makhsein *et al.* erzeugten metallverkleidete Wellenleiter als optische Biosensoren [11]. Für die Wellenleiterschicht

benutzten sie PEG-Methylether-Acrylat (PEGMEA)-PEGDA kombiniert mit Acrylat-PEG-*N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und immobilisierten es auf einer Titanoberfläche. Über die Amin-Reaktivität wurden Biomoleküle wie Glycerol und BSA in der Hydrogelstruktur gebunden und detektiert. Ebenso wurde die Herstellung von Mikronadeln aus PEG-DA über Photolithographie beschrieben [72]. Dafür wurden GOx und Laktoseoxidase in die Polymer-Vorläuferlösung integriert, welche über UV-Licht vernetzt wurde. Die Glucose und die Milchsäure wurden elektrochemisch detektiert.

Die Verkapselung (*Entrapment*) von Enzymen in Hydrogelen ist nur bei geringeren Maschenweiten sinnvoll, um ein Herauswaschen der Enzyme zu vermeiden [192]. Wie oben erwähnt, bietet eine Alternative zur physikalischen Verkapselung das direkte Anbinden von Enzymen in die Polymernetzwerke über kovalente [50] oder starke nicht kovalente Bindungen, wie der SA-Biotin-Interaktion [204, 205]. Choi *et al.* erzeugten PEG-basierte Hydrogele mit unterschiedlichen MW von PEG-DA in der Vorläuferlösung und immobilisierten darin GOx und Peroxidase [50]. Bei der physikalischen Verkapselung der Enzyme in den Hydrogelen stellten die Wissenschaftler fest, dass die Enzyme herausgewaschen wurden. In einem nächsten Schritt wurden die Enzyme an Acryloyl-PEG-NHS gebunden, wobei der NHS-Ester mit den Lysinresten des Enzyms reagierte. Über die Acryloyl-Funktionalität konnte das Enzym-Konjugat während der Hydrogelherstellung kovalent in das Polymernetzwerk eingebunden werden. Damit wurde über eine Woche kein Verlust der Enzymaktivität festgestellt. Die Aktivität von GOx wurde mit einem Farb-*Assay*, basierend auf der Oxidation von *o*-Dianisidin mit dem Peroxidase-gekoppelten System untersucht, wobei sich *o*-Dianisidin und Glucose in Lösung befanden. Die Hydrogele färbten sich mit zunehmender Zeit dunkler. Es wurde außerdem festgestellt, dass die relative Enzymaktivität von GOx in den Hydrogelen mit einem höheren MW von PEG-DA anstieg, während die apparente Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  sank. Dies wurde auf eine höhere Diffusion von Glucose durch die größeren Hydrogelmaschen zurückgeführt, wodurch das Substrat das Enzym besser erreichen konnte [50]. Dehli *et al.* koppelten das Enzym HRP an GM-basierte Hydrogele und demonstrierten die Enzymfunktionalität über die spezifische Farbreaktion mit dem Substrat 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) [205]. Dafür funktionalisierten sie GM mit einem hohen Methacryloylierungsgrad (GM<sub>10</sub>) weiter, um eine Biotinylierung einzuführen. Über radikalische Vernetzung erzeugten sie geschäumte und nicht geschäumte Hydrogele. Sie nutzen die starke Affinität von Biotin zu SA und banden SA-konjugierte HRP an die vernetzten Hydrogele. Unabhängig von der Hydrogel-Morphologie war nach 30-minütiger Lagerung der Enzym-beladenen Hydrogele in ABTS-Substratlösung die Absorption des Überstandes bei den biotinylierten Hydrogelen deutlich höher als bei den unfunktionalisierten Hydrogelen. Damit zeigten die Wissenschaftler, dass die Biotingruppen noch für Biokonjugationsreaktionen verfügbar waren, eine spezifische Bindung des Enzyms über Biotin im Hydrogel möglich war und eine unspezifische Proteinadsorption vernachlässigbar war. Sie stellten fest, dass die Umsatzrate des Substrates ABTS in den geschäumten Hydrogelen 12x höher war als in den nicht geschäumten Hydrogelen der gleichen Masse. Durch den Überschuss an Biotingruppen im Vergleich zu SA-HRP in der Lösung wurde vermutet, dass das Enzym hauptsächlich nahe an der Hydrogeloberfläche gebunden hatte. Damit standen bei den geschäumten Hydrogelen

mit der größeren Oberfläche mehr einfach zugängliche Biotingruppen für eine Bindung zur Verfügung [205].

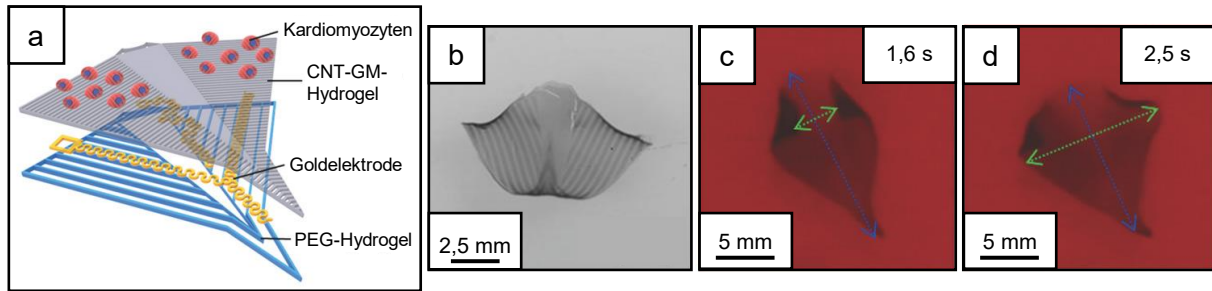


Abbildung 5: Hydrogele für soft robotics. a) Schichtweiser Aufbau eines nachgeahmten Rochens. Die Goldelektrode wurde zwischen den Hydrogelen aus PEG und GM mit Carbon Nanotubes (CNT) eingebettet. Auf dem GM-Hydrogel wurden Kardiomyozyten ausgesät. b) Eingerollte Morphologie des soft robots mit Abständen der PEG-Strukturen von  $300\ \mu\text{m}$ . c) und d) Kultivierung des soft robots für fünf Tage, Aufnahmen bei 1,6 s bzw. 2,5 s. Die gestrichelte blaue Linie zeigt die Verformung in Längsrichtung, während die grüne Linie die querverlaufende Verformung zeigt. Abbildung verändert nach [206].

Ebenso wie für Biosensoren eignen sich Hydrogele auch für *soft robotics*-Anwendungen. *Soft robots* bestehen im Gegensatz zu konventionellen Robotern aus elastischen Materialien mit ähnlichen mechanischen Eigenschaften wie denen von Lebewesen. Sie simulieren u. a. deren Muskulatur als Antrieb und beobachtende Organe in Form von Sensoren. Damit können sie sicherer mit Menschen und ihrer Umgebung interagieren [207]. Als Beispiel für *soft robotics*-Anwendungen kombinierten Shin *et al.* PEG-DA- ( $\text{MW } 1000\ \text{g mol}^{-1}$ ) und GM-Hydrogele, um einen Rochen nachzuahmen [206]. Das mikrostrukturierte PEG-basierte Hydrogel diente als Knorpelersatz. Es wurde als mechanisch stabile Struktur genutzt, welches bei Zellkontraktion und -entspannung ausreichend deformiert werden konnte. In die PEG-Schicht wurden Goldmikroelektroden eingebettet, um elektrische Stimulationen abzugeben. Darauf wurde die GM-Schicht mit integrierten Carbon Nanotubes (CNT) gebracht. GM diente als Zellsubstrat, während die CNT die Muskelanordnung nachahmen sollten. Darauf wurden Kardiomyozyten ausgesät (Abbildung 5a). Für die Hydrogelschichten wurden eine PEG-Konzentration von 20 wt% und eine GM-Konzentration von 5 wt% genutzt. Für das PEG-Hydrogel wurden Abstände der Strukturen von  $300\ \mu\text{m}$  gewählt, damit es weich genug war, um der von Kardiomyozyten induzierten Beugung zu folgen und gleichzeitig eine irreversible Faltung zu verhindern. Abstände von  $75\ \mu\text{m}$  zwischen den CNT-GM-Mustern waren am besten geeignet, um die Muskeltätigkeiten und die entsprechende Beugung aufzuzeigen (Abbildung 5b-d). Die Kardiomyozyten zeigten eine gute Organisation der Muskelfasern und der *soft robot* simulierte als Herzgewebe-Konstrukt ein einheitliches Schlagverhalten, wobei sich die Schlagraten bis zu Tag 9 nicht signifikant verringerten [206].

### 1.6.2 Biosensoren mit Tabakmosaikviren

Das TMV ist ein Virus, das viele Pflanzen, wie Tabak und Tomate, infiziert und ein Mosaikmuster auf deren Blättern verursacht. Es löst keine Krankheiten in Säugetieren aus [208]. TMV ist ein stäbchenförmiges Virus mit einer Länge von ca.  $300\ \text{nm}$ , einem äußeren Durchmesser von  $18\ \text{nm}$  und einem inneren Kanaldurchmesser von  $4\ \text{nm}$ . Es besitzt 2130



identische Hüllproteine (*coat protein*, CP) mit einem MW von 17,5 kDa und ein Ribonukleinsäure (RNA)-Genom [209-211]. Die CP sind als Helix angeordnet und schützen so die ebenfalls helikal angeordnete einsträngige RNA aus 6395 Nukleotiden [209, 210, 212]. Aufgrund ihrer strukturgebenden und vielversprechenden Eigenschaften werden TMV vielseitig eingesetzt [213-221]. Ihre Verwendung im Bereich der Biosensorik hat großes Potenzial [132, 222-229]. Bei der Cysteinmutante der TMV (TMV<sub>Cys</sub>) enthält die Virusoberfläche verfügbare Thiolgruppen [230], daher können andere Moleküle daran gebunden werden und TMV<sub>Cys</sub> eignet sich somit für die Immobilisierung von Enzymen [132, 226, 227]. Wie oben erwähnt kann eine Immobilisierung von Enzymen prinzipiell zu einem Aktivitätsverlust führen, indem Konformationsänderungen auftreten oder der Zugang zum aktiven Zentrum beeinträchtigt wird [231-234]. Bei der Verwendung von TMV als Trägermaterial besteht allerdings der Vorteil, dass die Enzyme dicht gepackt auf den Viren positioniert werden können [132, 224].

Koch *et al.* koppelten einen Maleimid-PEG-Biotin-Linker an TMV<sub>Cys</sub> (TMV<sub>Cys</sub>-Bio) und banden daran SA-konjugierte HRP und SA-konjugierte GOx [132]. Die Kombination aus beiden Enzymen konnte genutzt werden, indem GOx die Oxidation von Glucose katalysierte, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstand, welches ein Substrat der HRP ist und zu Wasser reduziert wurde. Die Aktivität der Enzyme konnte über eine von der HRP katalysierte Farbreaktion nachgewiesen werden. Eine erfolgreiche Kopplung der Enzyme wurde durch einen größeren Durchmesser der TMV-Partikel mittels TEM-Aufnahmen festgestellt. Die Immobilisierung der Enzyme auf den TMV führte zu einer 30-45x erhöhten katalytischen Aktivität im Vergleich zu adsorbierten Enzymen der gleichen Menge in einer 96-Well-Platte. Bei den Enzymen gekoppelt an biotinylierte CP-Aggregate war der Umsatz des ABTS-Substrats 15-25x höher und mit Enzymen gekoppelt an den Maleimid-PEG-Biotin-Linker wurde eine 5-7x Erhöhung erreicht (Abbildung 6). Die geringere Aktivität der adsorbierten Enzyme wurde darauf zurückgeführt, dass das zum Blocken der Oberfläche verwendete BSA mit den Enzymen um Bindestellen im Well konkurrierte und dadurch weniger Enzyme gebunden werden konnten. Außerdem wurde eine erhöhte Lagerstabilität und Wiederverwendbarkeit der Enzyme durch die Kopplung an TMV<sub>Cys</sub> festgestellt [132].

In einer weiteren Untersuchung koppelte die Arbeitsgruppe das Enzym Penicillinase (Pen) mit SA und konjugierten es an TMV<sub>Cys</sub> [226]. Pen kann wie bakterielle  $\beta$ -Lactamasen den  $\beta$ -Lactamring von Antibiotika spalten. Die Wirkungsweise des Enzyms wurde mit azidimetrischen Methoden mittels pH-Indikatoren getestet. Beim Umsatz von Penicillin bildete sich Penicillosäure unter Veränderung des pH-Wertes und Farbumschlag des Indikators. Durch die Anbindung von Pen an TMV<sub>Cys</sub> konnten eine bessere Wiederverwendbarkeit der Sensoren und höhere Analyseraten verglichen zu ungebundenen Enzymen erreicht werden. Ebenfalls wurde eine längere Halbwertszeit der Sensoren von vier bis sechs Tagen auf fünf Wochen erzielt. Des Weiteren wurden erste Versuche mit einem Elektrolyt-Isolator-Halbleiter (*electrolyte-insulator-semiconductor*, EIS)-System durchgeführt. Dieser bestand aus Al-p-Si-SiO<sub>2</sub>-Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Schichten (p-Si: Silizium-Wafer Typ p), wobei die Tantal(V)oxid (Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)-Schicht Kontakt zur Analytlösung hatte und als Wandler verwendet wurde. Mit diesem Sensor konnte die erhöhte Menge an H<sup>+</sup>-Ionen bei der Hydrolyse von Penicillin durch die pH-sensitive Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-

Schicht detektiert werden. Damit konnte die Penicillinkonzentration in der Analytlösung elektrochemisch bestimmt werden, indem sich  $H^+$ -Ionen an die  $Ta_2O_5$ -Schicht anlagerten. Erste Versuche mit dem EIS-Sensor, welcher mit  $TMV_{Cys}$ -SA-Pen-Konjugaten ausgestattet wurde, waren vielversprechend [226].

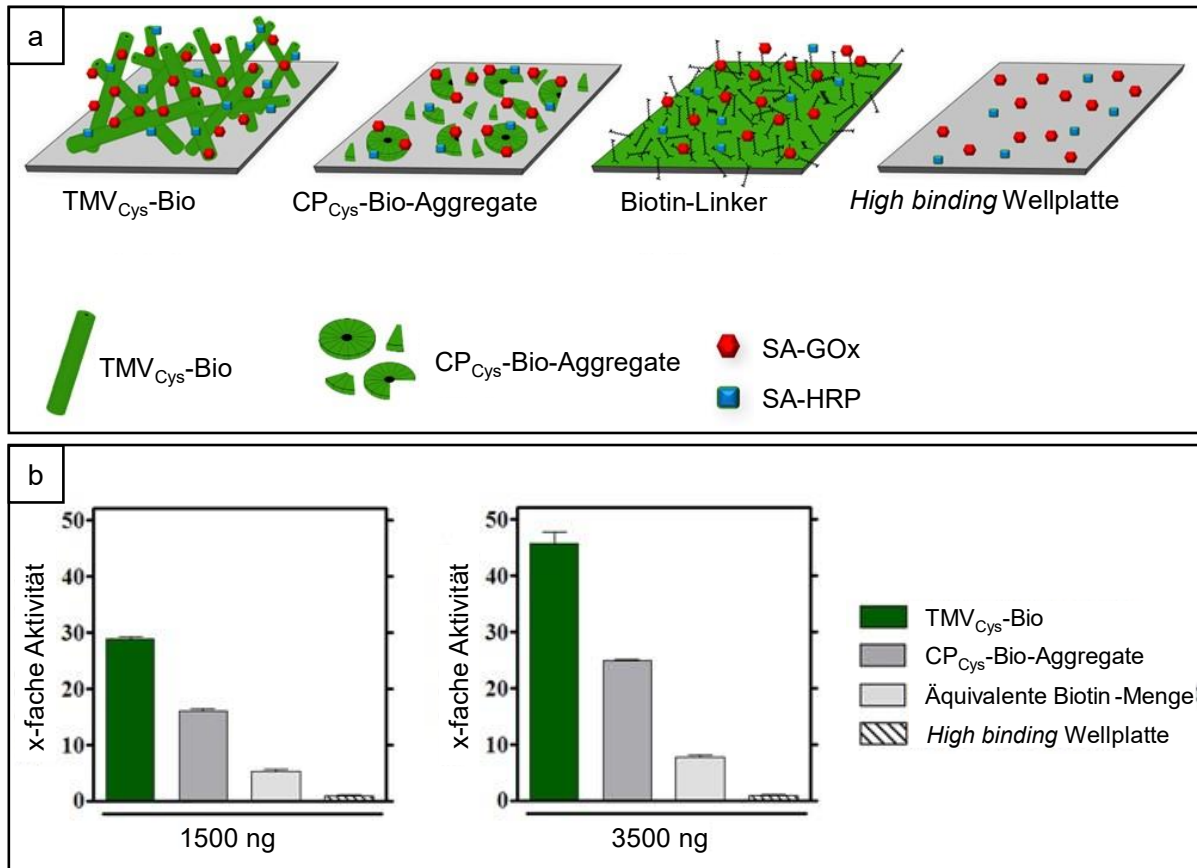


Abbildung 6: TMV als Bestandteile für Biosensoren. a) Enzymkopplungen auf verschiedenen Oberflächen:  $TMV_{Cys}$ -Bio,  $CP_{Cys}$ -Bio-Aggregate, Biotin-Linker, high binding 96-Wellplatte. Die Enzyme GOx und HRP waren an SA gekoppelt, um sie an den Biotin-enthaltenden Linker zu binden. b) Enzymaktivität der HRP. Die Umsatzraten des Substrates ABTS wurden auf den Umsatz der HRP in der 96-Wellplatte normiert. Links: 1500 ng Adapter pro Well, rechts: 3500 ng Adapter pro Well. Abbildung verändert nach [132].

Anknüpfend an diese Untersuchungen wurde die Funktion des EIS-Sensors in Kombination mit Penicillinase-bestückten TMV anhand von Milchproben demonstriert [227]. Des Weiteren wurden Platin (Pt)-Elektroden mit GOx-gekoppelten TMV für die amperometrische Detektion von Glucose bestückt [224]. Dieser Sensor bestand aus p-Si-SiO<sub>2</sub>-Ti-Pt-Schichten. Wie zuvor beschrieben [132], wurde die Aktivität von GOx über die Oxidation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektiert, da die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches bei der Oxidation von Glucose zusammen mit Gluconolacton entsteht, direkt proportional zur Glucose-Konzentration ist. Um die Bindekapazität zu bestimmen, wurden verschiedene Mengen an  $TMV_{Cys}$ -Bio auf die Pt-Elektroden geladen und die gleiche Menge an SA-GOx hinzugegeben. Wie erwartet, wurde mit höherer Glucose-Konzentration mehr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generiert, was in einer höheren anodischen Stromstärke resultierte. Der gemessene Strom stieg ebenfalls mit der Menge an immobilisierten  $TMV_{Cys}$ -Bio, wobei kein Unterschied zwischen einer Beladung von 1,0  $\mu$ g und 1,5  $\mu$ g detektiert wurde, was auf eine Sättigung der Oberfläche mit den Viren hindeutete. Zum Vergleich wurden die vier Pt-

Elektroden des Sensors unterschiedlich mit dem Enzym beladen. Entweder wurde SA-GOx an TMV<sub>Cys</sub>-Bio bzw. an CP<sub>Cys</sub>-Bio-Aggregate gebunden oder direkt mittels Glutaraldehyd auf der Oberfläche mit benachbarten Enzymen und BSA vernetzt oder auf der Oberfläche adsorbiert. Dabei wurde festgestellt, dass die gemessenen Ströme bei den TMV<sub>Cys</sub>-Bio sowie bei den CP<sub>Cys</sub>-Bio-Aggregaten höher waren und diese kürzere Reaktionszeiten, ein geringeres Detektionslimit und eine höhere Glucosesensitivität aufwiesen. Die Sensitivitäten lagen bei 4,9 nA mM<sup>-1</sup> mm<sup>-2</sup> bzw. 2,8 nA mM<sup>-1</sup> mm<sup>-2</sup> für TMV<sub>Cys</sub>-Bio bzw. den CP<sub>Cys</sub>-Bio-Aggregaten im linearen Bereich der Glucosekonzentration von 0,1-7,4 mM. Im Vergleich dazu lag die Sensitivität für die adsorbierten bzw. vernetzten Enzyme bei 1,4-1,6 nA mM<sup>-1</sup> mm<sup>-2</sup> im linearen Bereich von 0,4-3,4 mM Glucose [224]. Diese Studie zeigte damit nochmal das große Potenzial in der Anbindung von Enzymen an TMV im Vergleich zu anderen Immobilisierungsstrategien. Somit eignet sich TMV sehr gut für die Bindung von Enzymen und damit als Bestandteil eines Biosensors. Die Anbindung von Enzymen an TMV und die Verkapselung dieser Konjugate in eine Hydrogelmatrix könnten die bisher beschriebenen Limitationen der Hydrogel-basierten Biosensoren überwinden und einen Grundstein für wiederverwendbare Biosensoren schaffen, welche mehrere Enzyme enthalten.

## 2. Zielsetzung und Hypothesen der Arbeit

### 2.1 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Dissertation war es, Polyethylenglykol (PEG)-basierte Hydrogele in Kombination mit einer Beschichtung aus methacryloylierter Gelatine (GM) als potenzielle Anwendung für biosensorische Oberflächen systematisch zu charakterisieren. Dafür wurden Hydrogele auf Basis beider Polymere hergestellt, eingehend untersucht und letztendlich miteinander kombiniert. Die Kombination der beiden Polymere wurde gewählt, da PEG, bekannt als inertes Polymer, als ausreichend mechanisch stabile Sensorbasis dienen könnte, die wenig mit Enzymsubstraten interagiert und als gequollenes Hydrogel ein Austrocknen der darauf aufgetragenen GM-Hydrogele verhindern sollte. Die GM-Hydrogele in Form von *Spots* wurden als biokompatible Matrix für die Verkapselung von Enzymen gewählt. Damit gliedert sich die Zielsetzung der Arbeit in ineinander aufbauende Fragestellungen, die im Folgenden erläutert werden.

Zunächst sollten PEG-basierte Hydrogele mit Isothiuroniumgruppen funktionalisiert werden, indem PEG-Diacrylat (PEG-DA) mit dem *Surfmer* 2-(11-(Acryloyloxy)undecyl)-isothiuroniumbromid (AUITB) radikalisch vernetzt wurde. Dabei war es das Ziel, Polyelektrolyt-Hydrogele zu erzeugen, deren Ladung beispielsweise für eine verstärkte Adsorption von Molekülen genutzt werden kann. Es sollte evaluiert werden, ob die eingebrachten funktionellen Gruppen in den Hydrogelen zugänglich sind und zu Thiolen umgesetzt werden können. Damit würden Hydrogele mit verfügbaren Thiolen entstehen, die beispielsweise für Biokonjugationsreaktionen genutzt werden können. Um dies zu demonstrieren, sollte über die Thiole ein Enzym an die Hydrogele gebunden werden und die Hydrogele so als potenzielle Basis für Biosensoren getestet werden.

Als zweites sollten GM-basierte Hydrogele auf unterschiedliche Arten hergestellt und untersucht werden. Zum einen sollte überprüft werden, ob die Steifigkeit von GM-Hydrogelen durch eine Funktionalisierung mit Glykosaminoglykanen (GAG) erhöht werden könnte, da dies für eine verbesserte Stabilität von filigranen Hydrogelstrukturen hilfreich sein könnte. Zum anderen sollte die Generierung von filigranen GM-Strukturen mittels zwei Druckverfahren getestet werden. Aufgrund der hohen Auflösung wurde der Druck über 2-Photonen-Polymerisation (2PP) gewählt. Zunächst sollte untersucht werden, ob sich der Photoinitiator Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP), der bei allen in dieser Dissertation hergestellten GM-Hydrogelen verwendet wurde, für den 2PP-Druck eignet. Anschließend sollten makroskopische GM-basierte Hydrogele gedruckt werden, da deren Eigenschaften gut mit den herkömmlich über UV-Vernetzung hergestellten Hydrogelen verglichen werden konnten. Als zweite Druckmethode wurde der *Inkjet*-Druck gewählt, wobei der Druck- als auch der Vernetzungsprozess über UV-Bestrahlung von GM-Hydrogel-*Spots* etabliert werden sollte. Das finale Ziel bestand in der Kombination beider Hydrogelmaterialien für den Aufbau einer biosensorischen Schicht. Dafür sollte geprüft werden, ob die Funktionalisierung der PEG-Hydrogele ein Anhaften einer ortsauflösten GM-basierten Beschichtung fördert, welche als

Sensorkomponente dienen sollte. Zusätzlich sollten Enzyme in die GM-Beschichtung eingebracht werden und es wurde untersucht, ob diese nach einer UV-Vernetzung noch aktiv waren. Durch das Koppeln der Enzyme an Tabakmosaikvirus (TMV)-Partikel wurde angestrebt, die Enzyme effektiv im GM-Hydrogel zu verkapseln und ein Auswaschen zu verhindern. Damit sollte eine wiederverwendbare Biosensoroberfläche entstehen, die durch die orts aufgelöste Beschichtung grundsätzlich für die Detektion mehrerer Substrate geeignet ist. Die Zielsetzung der Dissertation ergab mehrere wissenschaftliche Fragestellungen, die als Hypothesen formuliert wurden, um sie eingehend untersuchen und diskutieren zu können. Die dazugehörigen Ergebnisse der drei formulierten Hypothesen sind in den Kapiteln 3, 4 und 5 dargelegt und diskutiert. Alle Ergebnisse werden in Kapitel 6 umfassend diskutiert. Mit der Schlussfolgerung in Kapitel 7 sowie dem Ausblick in Kapitel 8 wird die Arbeit abgeschlossen.

## 2.2 Hypothesen

### **Hypothese I Charakterisierung von Polyethylenglykol-basierten Hydrogelen**

Wie in der Einleitung beschrieben, werden PEG-basierte Hydrogele vielseitig für verschiedene Anwendungen genutzt. Die Integration von Monomeren, Polymeren oder Biomolekülen ist dabei eine gängige Methode, um den Hydrogelen gezielte Eigenschaften zu verleihen [30, 32, 93]. Eine bisher unzureichend untersuchte funktionelle Gruppe zur Modifizierung von makroskopischen Hydrogelen ist die Isothiuroniumgruppe. Zum einen können dadurch Polyelektrolytmaterialien erzeugt werden. Zum anderen können Isothiuroniumgruppen als Vorläufer für Thiole dienen [124-126], welche dazu genutzt werden können, Biokonjugationsreaktionen durchzuführen [131]. Über makroskopische Hydrogele mit verfügbaren Thiolgruppen wurde in der Literatur nur sehr wenig berichtet. Befinden sich die funktionellen Gruppen an der Oberfläche, können sie für eine Interaktion mit anderen Materialien genutzt werden. Es wurde folgende Hypothese aufgestellt:

*I.I PEG-DA-Hydrogele können mit dem Surfmern AUITB funktionalisiert werden. AUITB kann in PEG-DA gelöst werden und sich in Anwesenheit einer hydrophilen Oberfläche (aktivierter Silizium-Wafer) gezielt an der Grenzfläche zwischen hydrophiler Oberfläche und Polymer ausrichten und in den Vernetzungsprozess mit dem Photoinitiator Irgacure 2959 integriert werden. Das Einbringen des Surfmern hat keinen Einfluss auf den Vernetzungsprozess der Proben, weshalb der Quellgrad der Hydrogele vergleichbar ist.*

*I.II Bei funktionalisierten Hydrogelen ergibt die Messung des Zetapotenzials durch die positiv geladenen Isothiuroniumgruppen einen höheren isoelektrischen Punkt (IEP) im Vergleich zu unfunktionalisierten Hydrogelen. Für unfunktionalisierte Hydrogele wird ein IEP bei einem pH-Wert von 4 erwartet.*

*I.III Die Funktionalisierung der Hydrogele mit Isothiuroniumgruppen ist anhand der Messung des Wasserkontaktwinkels, der Oberflächenenergie, einer antimikrobiellen Aktivität und der Adsorption von Diclofenac nachweisbar.*

*I.IV Bei funktionalisierten Hydrogelen können die Isothiuroniumgruppen zu Thiolen reduziert und diese nachgewiesen werden. Die Thiole eignen sich, um über Biokonjugationsreaktionen Enzyme unter Erhaltung ihrer Aktivität an den Hydrogelen zu immobilisieren.*

In diesem Kontext wurde PEG-DA in verschiedenen Verhältnissen mit AUITB co-vernetzt, um unterschiedliche Funktionalisierungsgrade der Proben zu erhalten. Der Quellgrad und die Gelausbeute der Hydrogele wurde bestimmt, um einen möglichen Einfluss von AUITB auf den Vernetzungsgrad festzustellen. Die Hydrogele wurden eingehend untersucht und auf eine erfolgreiche Funktionalisierung überprüft. Die Oberflächeneigenschaften wurden durch die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Hydrogele, der Wasserkontaktwinkel, der Oberflächenenergie und einer potenziellen antimikrobiellen Wirkung untersucht. Des Weiteren wurde das Adsorptionsverhalten von Diclofenac evaluiert. Die erzeugten Thiolgruppen wurden anhand einer Fluoreszenzfärbung und einer Enzymanbindung überprüft. Diese Studie wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Scientific Reports* mit dem Titel „*Preparation of multifunctional hydrogels with accessible isothiuronium groups via radical cross-linking copolymerization*“ veröffentlicht [48].

### **Hypothese II Charakterisierung von Hydrogelen aus methacryloylierter Gelatine**

Hydrogele werden vielseitig für eine Anwendung im *Tissue Engineering* oder bei Biosensoren untersucht. Dabei ist es wichtig, dass die Eigenschaften der Hydrogele den Anforderungen entsprechen. Daher gibt es auch viele Strategien, biobasierte Hydrogele mit weiteren Komponenten zu funktionalisieren [5, 87, 93]. Zusätzlich spielen Druckverfahren eine wichtige Rolle, um komplexe und filigrane Strukturen erzeugen zu können [6, 139]. Es wurde die folgende zweite Hypothese formuliert:

*II.I GM<sub>10</sub>-basierte Hydrogele werden mit Chondroitinsulfat oder biotechnologisch hergestelltem nicht sulfatiertem Chondroitin funktionalisiert, indem die Glykosaminoglykane vor der Photovernetzung in die Hydrogelvorläuferlösung integriert werden. Durch die Funktionalisierung verringert sich der Quellgrad der Hydrogele und die Speicher- und Verlustmoduln nehmen zu.*

*II.II Der Photoinitiator LAP ist geeignet für die 2-Photonen-Polymerisation von GM<sub>10</sub>-Lösungen. Durch geeignete Einstellungen der Parameter, wie Scan-Geschwindigkeit und Laser-Leistung werden vergleichbare Quellgrade, Gelausbeuten und Speichermoduln der Hydrogele erzielt wie bei UV-vernetzten Hydrogelen.*

*II.III Es können geeignete Parameter ermittelt werden, um eine GM<sub>10</sub>-Lösung mittels Inkjet-Druck reproduzierbar zu drucken und Oberflächen damit ortsaufgelöst zu beschichten. Die GM<sub>10</sub>-Spots, aufgebracht über Drucken oder Pipettieren, können in einer sauerstoffarmen Umgebung ausreichend vernetzt werden.*

Es wurden GM-basierte Hydrogele mit Chondroitinsulfat oder biotechnologisch hergestelltem Chondroitin funktionalisiert und deren Quellgrade, Gelausbeute und rheologischen

Eigenschaften untersucht. Dabei begleitete ich die hier genannten Versuche von Valentina Vassallo (*Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"*) während ihres Aufenthalts am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP und konnte bei ihrem in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Journal of Biomedical Materials Research Part A* veröffentlichten Paper „*Evaluation of novel biomaterials for cartilage regeneration based on gelatin methacryloyl interpenetrated with extractive chondroitin sulfate or unsulfated biotechnological chondroitin*“ als Co-Autorin mitwirken [235]. Da diese Versuche nur einen kleinen Teil der Veröffentlichung ausmachen und sich in der Diskussion in Kapitel 6.2 nur auf Zahlenwerte bezogen wird, wird die Veröffentlichung im Rahmen dieser Doktorarbeit nur zitiert.

Des Weiteren wurden zwei verschiedene Druckverfahren genutzt, um GM-basierte Hydrogele herzustellen. Es wurde überprüft, ob LAP als Initiator für die Vernetzung von GM-Lösungen mittels 2PP geeignet ist. Makroskopische GM-Hydrogele wurden mit verschiedenen Parametern gedruckt und deren Eigenschaften mit denen von herkömmlich UV-vernetzten Hydrogelen verglichen. Diese Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation durchgeführt und waren Teil einer Studie, die für eine Veröffentlichung in einer *peer-reviewed* Fachzeitschrift mit den gleichgestellten Erstautoren Alexander Peter (Institut für Strahlwerkzeuge IFSW, Universität Stuttgart) und Kai Hirzel (Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme IBBS, Universität Stuttgart) vorbereitet wird [236].

Außerdem wurde GM-Lösung in Form von *Spots* mittels *Inkjet*-Druck gedruckt und diese auf eine ausreichende Vernetzung untersucht. Dabei handelte es sich um Vorversuche der in Hypothese III beschriebenen Versuche und sind Teil des im folgenden Abschnitt erwähnten Manuskripts [237].

### **Hypothese III Kombination der Hydrogele aus Polyethylenglykol und methacryloylierter Gelatine für die Entwicklung einer biosensorischen Oberfläche**

Durch ihre vorteilhaften Eigenschaften sind Hydrogele attraktive Komponenten von Biosensoren [200, 201]. Bei der Kombination aus Hydrogelen und Enzymen besteht allerdings die Herausforderung, dass verkapselte Enzyme aus der Hydrogelmatrix herausgewaschen werden können [192] und die Sensorkomponente somit nur einmal verwendet werden kann. Zudem wäre ein Biosensor-*Setup*, das anstatt eines Substrates mehrere Substrate detektieren kann, vorteilhaft. Es wurde folgende Hypothese formuliert:

*III.I Die Thiole bzw. die Isothiuroniumgruppen auf der PEG-basierten Hydrogeloberfläche fördern ein Anhaften der GM<sub>10</sub>-Spots über eine kovalente Bindung mittels Thiol-Michael-Reaktion bzw. elektrostatischer Wechselwirkung im Vergleich zu unfunktionalisierten Hydrogelen. Die orts aufgelöste Beschichtung ist 21 Tage stabil gegenüber Delamination.*

*III.II In die GM<sub>10</sub>-Lösung können über TMV als Trägerstruktur verschiedene Enzyme eingebracht und in den vernetzten Spots verankert werden. Das Ankoppeln der Enzyme an die TMV-Partikel verhindert ein Auswaschen der Enzyme aus den GM<sub>10</sub>-Spots.*

In diesem Zusammenhang wurden PEG-basierte Hydrogele orts aufgelöst mit GM-*Spots* beschichtet, wobei die Flächeninhalte der *Spots* auf den drei verschiedenen PEG-basierten Oberflächen – unfunktionalisiert, mit Isothiuroniumgruppen funktionalisiert und mit Thiolen funktionalisiert – miteinander verglichen wurden. Des Weiteren wurden Enzyme an TMV-Partikel gebunden und in die GM-*Spots* integriert. Es wurde die Aktivität der Enzyme und deren erfolgreiche Verkapselung in der GM-Hydrogelmatrix evaluiert. Diese Studie wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Macromolecular Bioscience* mit dem Titel „*Soft sub-structured multi-material biosensor hydrogels with enzymes retained by plant viral scaffolds*“ veröffentlicht [237].



### 3. Polyethylenglykol-basierte Hydrogele mit verfügbaren Isothiuroniumgruppen

Die Ergebnisse und die Diskussion zu den Hypothesen I.I bis I.IV sind in diesem Kapitel als Manuskript mit dem Titel „*Preparation of multifunctional hydrogels with accessible isothiuronium groups via radical cross-linking copolymerization*“ dargestellt. Dieses Manuskript wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Scientific Reports* veröffentlicht [48]. Darüber hinaus wird die Hypothese I in Kapitel 6.1 diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Dissertationsschrift angepasst. Die dadurch entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt der Veröffentlichung nicht verändert.

#### 3.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

Ich habe diese Studie zum größten Teil eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem habe ich den Großteil der praktischen Arbeiten durchgeführt oder angeleitet. Dies beinhaltet konkret:

- Die Synthesen des *Surfmers* AUITB wurden von mir und zu späteren Zeitpunkten in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Anastasia Tsianaka durchgeführt und die NMR-Spektren ausgewertet. Die Synthese wurde ursprünglich von meiner Kollegin Vanessa L. Albernaz etabliert.
- Die Herstellung der PEG-basierten Proben und deren Behandlung zur Erzeugung von Thiolgruppen wurde von mir etabliert und von mir oder von Silia Quirin, im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit, bzw. Corinna O. Jauch, im Rahmen ihrer von mir betreuten Masterarbeit, bzw. Daniela Urban, im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit, unter meiner Anleitung durchgeführt.
- Die Charakterisierung der PEG-basierten Hydrogele, wie dem Quellgrad und der Gelaubeute wurde von mir oder von Silia Quirin, Corinna O. Jauch oder Daniela Urban durchgeführt.
- Die Messung des Zetapotenzials und des isoelektrischen Punktes der PEG-basierten Hydrogele wurde von mir etabliert und unter meiner Anleitung von Silia Quirin und Corinna O. Jauch durchgeführt.
- Die Kontaktwinkelmessungen wurden von Silia Quirin und Corinna O. Jauch unter meiner Anleitung durchgeführt.
- Die Fluoreszenzfärbungen der Hydrogele wurden von mir durchgeführt und gemeinsam mit Friederike Dehli vom Institut für Physikalische Chemie der Universität Stuttgart am *Laserscanning*-Mikroskop aufgenommen.
- Die Anbindung des Enzyms Meerrettichperoxidase an die PEG-basierten Hydrogele wurde von mir etabliert und durchgeführt.

Alle für das Manuskript erhobenen Daten, außer die Adsorptionsmessungen mit Diclofenac, wurden von mir ausgewertet. Diese Versuche sowie die Messung der Ramanspektren wurden von meiner Kollegin Anastasia Tsianaka durchgeführt. Zur Auswertung genutzte Python-Skripte wurden von Dr. Alexander Southan geschrieben. Der weitaus größte Teil des *peer-reviewed* Fachartikels wurde von mir verfasst, dabei habe ich konkret den Original-Entwurf des Manuskripts konzipiert und geschrieben und federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren harmonisiert und eingearbeitet.

### 3.2 Preparation of multifunctional hydrogels with accessible isothiuronium groups via radical cross-linking copolymerization

Jana Grübel<sup>1</sup>, Vanessa L. Albernaz<sup>1</sup>, Anastasia Tsianaka<sup>1</sup>, Corinna O. Jauch<sup>1</sup>, Silia Quirin<sup>1</sup>, Christian Kerger<sup>2</sup>, Christina G. Kohl<sup>2</sup>, Anke Burger-Kentischer<sup>2</sup>, Günter E. M. Tovar<sup>1,2\*</sup> & Alexander Southan<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>2</sup>Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>3</sup>Present address: Max Planck Institute for Intelligent Systems, Heisenbergstr. 3, 70569 Stuttgart, Germany.

\*email: guenter.tovar@igb.fraunhofer.de; southan@is.mpg.de

Published in the peer-reviewed journal *Scientific Reports*

Publisher: Nature Portfolio, Springer Nature

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36956-x>

Volume: 13, Article number 10361

© The Author(s) 2023

Received: 13 February 2023

Accepted: 13 June 2023

Published online: 26 June 2023

### 3.2.1 Abstract

Hydrogels can be equipped with functional groups for specific purposes. Isothiuronium groups can enhance adsorptivity, or allow coupling of other functional groups through mild reactions after transformation to thiol groups. Here we present a method to prepare multifunctional hydrogels by introducing isothiuronium groups into poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) hydrogels, and convert them into thiol-functionalized hydrogels by the reduction of the isothiuronium groups. For this purpose, the amphiphilic monomer 2-(11-(acryloyloxy)-undecyl)isothiuronium bromide (AUITB), containing an isothiuronium group, was synthesized and copolymerized with PEGDA. In this convenient way, it was possible to incorporate up to 3 wt% AUITB into the hydrogels without changing their equilibrium swelling degree. The successful functionalization was demonstrated by surface analysis of the hydrogels with water contact angle measurements and increased isoelectric points of the hydrogel surfaces from 4.5 to 9.0 due to the presence of the isothiuronium groups. The hydrogels showed a suitability as an adsorbent, as exemplified by the pronounced adsorption of the anionic drug diclofenac. The potential of the functionalization for (bio)conjugation reactions was demonstrated by the reduction of isothiuronium groups to thiols and subsequent immobilization of the functional enzyme horseradish peroxidase on the hydrogels. The results show that fully accessible isothiuronium groups can be introduced into radically cross-linked hydrogels.

### 3.2.2 Introduction

Hydrogels are extensively examined in the fields of tissue engineering [31, 238, 239], drug delivery [9, 39, 54] or for (bio)sensors [10, 240, 241]. They are composed of an insoluble polymer network that is swollen in an aqueous medium [1]. Hydrogel functionality, like its swelling behavior, generally results from an interplay of polymer network and swelling medium [2-4]. However, an elegant way to tailor hydrogel properties is by changing the polymer network composition or cross-link density and architecture.

One prominent class of hydrogels is based on poly(ethylene glycol) (PEG), often prepared by photocuring of PEG diacrylate (PEGDA) [32, 33, 39, 40]. The resulting hydrogels are bioinert and inhibit protein adsorption [57, 58] as well as cell adhesion [60, 61]. Based on the requirements on the hydrogel properties, the polymer network formation can be influenced by the molar mass or concentration of PEGDA in the hydrogel precursor solutions, *i.e.* before cross-linking [45-47]. Additionally, a functionalization of PEG-based hydrogels can be achieved by adding other molecules or monomers to the hydrogel precursor solutions. This was done successfully before, for example by including monomers generating a polyelectrolyte hydrogel [32, 33, 94]. The positively charged monomer 2-(methacryloyloxy) ethyl trimethylammonium chloride (MAETAC) was incorporated into PEGDA hydrogels by copolymerization [32]. In a similar study the negatively charged monomer sodium methallyl sulfonate (SMAS) was used to functionalize PEGDA hydrogels [33]. In both studies, increased protein adsorption, cell adhesion, and proliferation were observed on the functionalized hydrogels compared with the non-functionalized hydrogels. Besides enhancing cell

compatibility, such polyelectrolyte hydrogels have other advantages and possible applications. Polyelectrolyte materials can be used to adsorb molecules of the opposite charge by electrostatic interaction or ion exchange and can be applied, *e.g.*, in water purification [95]. The choice of the monomer and its functional group is crucial for the possible application field of the hydrogel.

One particularly interesting ionic moiety, which has to our knowledge so far been neglected for the preparation of macroscopic hydrogels, is the isothiuronium group. Remarkable properties of low molar mass isothiuronium salts or isothiuronium-containing nanoparticles, like anti-tumor activity [119] or anti-bacterial effects [112], were reported before. Isothiuronium-functional particles are commercially available as adsorbers for heavy metal ions [120-123]. The isothiuronium group is stable in acidic to neutral aqueous environments and in contact with air and might therefore be suitable to be added directly to hydrogel precursor solutions.

Apart from the direct effects of isothiuronium groups, their chemical properties facilitate another possibility: They hydrolyze efficiently to yield thiols under the action of sodium hydroxide or sodium metabisulfite [125, 126]. Therefore, isothiuronium groups can be considered as synthetic thiol precursors. This is of particular relevance because it often proves difficult to introduce thiols directly into hydrogels because they interfere with typical cross-linking reactions, *e.g.* radical polymerization [127, 128] or are a reactant in the cross-linking reaction by which they are consumed, *e.g.* in polymer cross-linking by thiol-yne or Michael-type addition reactions [129, 130]. Thus, the path using isothiuronium groups as protected thiols during cross-linking might offer an elegant opportunity to liberate thiols by post-polymerization reactions after curing.

The high reactivity of thiols offers the opportunity to covalently bind other molecules and even use it for bioconjugation reactions in aqueous environment [132]. However, only a few studies report an availability of thiols in hydrogels. The group of Sajeesh *et al.* prepared hydrogel micro particles based on polymethacrylic acid, polyethylene glycol and chitosan with a thiol functionality for the oral delivery of insulin [133]. Southan *et al.* synthesized polymers with a PEG backbone and copolymerized poly(glycidylthiol) with PEGDA to generate PEG-based hydrogels with thiol functionality, which increased the cell adhesiveness of the hydrogels to fibroblasts compared to unmodified PEGDA hydrogels [60]. In another study, PEG-based hydrogels were coated with gold nanoparticles via reactive micro-contact printing [134]. Due to the interactions of thiols and gold, the gold nanoparticles were transferred on thiol-functionalized PEG hydrogels more easily and murine fibroblast L929 cells preferred to adhere on the nanoparticle layer. Cai *et al.* prepared PEG hydrogels via nucleophilic thiol-yne addition with 4-arm PEG-alkynes and PEG-thiols [129]. They determined residual thiols in the cross-linked hydrogels, hence there must have been free alkynes. And they used the free alkynes to bind a thiol-containing dye as well as an antimicrobial peptide but did not use the thiols in the hydrogel.

In this paper, we address the hypothesis of whether the newly synthesized isothiuronium-functional group-bearing monomer 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)isothiuronium bromide (AUITB) can be used in the formation of polymer networks by radical cross-linking of PEGDA, and thereby generate isothiuronium-functional hydrogels. We then aim to investigate the

surface and bulk properties of the isothiuronium-functional hydrogels that can hypothetically be generated in this process, including testing their usefulness as adsorbents or antimicrobial materials. In addition, we would like to pursue the hypothesis that isothiuronium-functional hydrogels can be used to generate accessible thiol groups in the hydrogels that exhibit reactivity in the thiol-Michael reaction. Finally, we would investigate whether the thiols thus introduced can be used to covalently immobilize an enzyme in the hydrogels while maintaining its activity.

### 3.2.3 Experimental Section

#### *Chemicals*

Following chemicals were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany): 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) liquid substrate solution, ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) ~ 28–30 % NH<sub>3</sub> basis, acryloyl chloride ≥ 97 %, deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) 99.8 %, diiodomethane 99 %, ethanol (EtOH) absolute for analysis, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 %, hydroquinone, 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959), poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) Mn ~ 700 g mol<sup>-1</sup>, sodium hydroxide (NaOH), sodium metabisulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), potassium chloride (KCl) for analysis, triethylamine (TEA) ≥ 99.5 %, and trifluoroacetic acid (TFA), for HPLC ≥ 99 %. Chloroform ≥ 99.8 % and dichloromethane (DCM) ≥ 99.8 % were purchased from Honeywell (Offenbach, Germany). Technical acetone and isopropanol were purchased from Brenntag GmbH (Essen, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO) for synthesis and tetrahydrofuran (THF) for HPLC were purchased from ChemSolute® (Th.Geyer, Renningen, Germany). 11-bromo-1-undecanol and diclofenac sodium salt (DSS) ≥ 98.0 % were purchased from TCI GmbH (Eschborn, Germany). Acetonitrile, ROTISOLV® HPLC gradient grade, sodium bicarbonate, sodium chloride and tryptone were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). Ethylene glycol 99 % and thiourea were purchased from Alfa Aesar (Kandel, Germany). EZ-Link™ maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin and yeast extract (Gibco) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany). Other reagents were purchased from the following companies (given in parentheses): Atto488 maleimide (Atto-TEC GmbH, Siegen, Germany), BD Bacto agar (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany), deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d<sub>6</sub>) 99.8 % (Deutero, Kastellaun, Germany), ethyl acetate for HPLC (VWR Chemicals, Darmstadt, Germany), hydrochloric acid (HCl) 37 % (Häberle Labortechnik GmbH & Co, Lonsee-Ettlenschieß, Germany), magnesium sulfate 99 % anhydrous (abcr GmbH, Karlsruhe, Germany), nitrogen gas (Air Liquide, Düsseldorf, Germany), potassium hydroxide (KOH) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), streptavidin-coupled poly horseradish peroxidase (SA-HRP, SDT reagents, Baesweiler, Germany). Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) was freshly prepared with 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O in deionized water. Acryloyl chloride was distilled before use. Lysogeny broth (LB) agar was prepared with 10 g L<sup>-1</sup> tryptone, 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl and 15 g L<sup>-1</sup> agar. The pH was adjusted to 7.0 with 1 N NaOH and the LB agar was subsequently sterilized by autoclaving. LB medium was prepared with 10 g L<sup>-1</sup> tryptone, 5 g L<sup>-1</sup> yeast extract and 10 g L<sup>-1</sup> NaCl. The pH was adjusted to 7.0 with 1 N NaOH and the LB medium was subsequently sterilized by autoclaving.

*Synthesis of 11-bromoundecyl acrylate*

5.00 g (19.9 mmol, 1.0 eq.) of 11-bromo-1-undecanol were dissolved in 70 mL tetrahydrofuran (THF) and cooled in an ice bath. 3.33 mL (23.9 mmol, 1.2 eq.) triethylamine were added. Under argon atmosphere, 1.93 mL (23.9 mmol, 1.2 eq.) acryloyl chloride were dissolved in 30 mL THF and added dropwise to the flask (approx. 1 drop/3 s). The reaction mixture turned opaque and was stirred at room temperature for 40 h. The mixture was filtrated and THF was removed under reduced pressure at 160 mbar and 25 °C. 50 mL dichloromethane (DCM) were added and the organic phase was extracted with 50 mL of a 2% w/v sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) solution. The organic phase was dried with magnesium sulfate and the solvent was removed under reduced pressure of 400 mbar at 25 °C. The product (beige to yellow paste) was dried under vacuum for 2.5 h. Other than 11-bromoundecyl acrylate, also 11-hydroxylundecyl acrylate was generated. Since the latter cannot react in the second step, no further purification was performed. 82 % of the product mixture (2.85 g) consisted of 11-bromoundecyl acrylate in 38 % yield.

<sup>1</sup>H NMR of 11-bromoundecyl acrylate (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.35 (m, 14 H), 1.62–1.70 (m, 2 H), 1.80–1.89 (m, 2 H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 4.14 (t, *J* = 6.8 Hz, 2 H), 5.81 (dd, *J* = 10.4, 1.4 Hz, 1 H), 6.12 (dd, *J* = 17.3, 10.4 Hz, 1 H), 6.39 (dd, *J* = 17.3, 1.4 Hz, 1 H). The <sup>1</sup>H NMR spectrum is shown in Figure SI 1.

*Synthesis of 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)isothiouronium bromide (AUITB)*

2.71 g of the product mixture from the previous reaction, containing 2.22 g (7.3 mmol, 1.0 eq.) 11-bromoundecyl acrylate, were dissolved in 44 mL EtOH. A solution of 0.024 g (0.2 mmol, 0.03 eq.) hydroquinone in 11 mL ethanol and a solution of 0.75 g (9.8 mmol, 1.35 eq.) thiourea in 123 mL ethanol were added. The mixture was stirred under reflux for 6 h. EtOH was removed under reduced pressure at 100 mbar and 40 °C. The mixture was washed with chloroform (CHCl<sub>3</sub>) and filtrated. CHCl<sub>3</sub> was removed under reduced pressure of 370 mbar at 40 °C, and the residue was dried under vacuum. Ethyl acetate was added to precipitate the product (white solid) and removed by filtration. AUITB was dried under vacuum overnight and was obtained in 36 % yield.

<sup>1</sup>H NMR of AUITB (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 1.13–1.43 (m, 14 H), 1.50–1.65 (m, 4 H), 3.13 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 4.09 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H), 5.93 (dd, *J* = 10.3, 1.6 Hz, 1 H), 6.16 (dd, *J* = 17.3, 10.3 Hz, 1 H), 6.31 (dd, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1 H), 8.99 (s, 4 H).

<sup>13</sup>C NMR of AUITB (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 25.35, 27.77, 28.08, 28.34, 28.37, 28.62, 28.83, 28.86, 28.87, 30.11, 64.07, 128.41, 131.36, 165.52, 169.93. The NMR spectra are shown in Figure SI 2 and Figure SI 3.

Elemental analysis (%) calculated for AUITB: C 47.24, H 7.66, N 7.35, S 8.41, Br 20.95, O 8.39; found C 47.37, H 7.69, N 7.43, S 8.34, Br 20.75.

Raman spectra of AUITB:  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 2846 (C-H), 1714 ( $\alpha,\beta$ -unsaturated ester), 1637 (NH<sub>2</sub> or C = C).

*Preparation of functionalized poly(ethylene glycol) diacrylate samples*

Poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) samples were prepared by radical cross-linking with the photoinitiator Irgacure 2959. For PEGDA samples without AUITB (PEGDA-0), a precursor solution of 0.5 wt% Irgacure 2959 and 99.5 wt% PEGDA was prepared and mixed overnight

under the protection of light. For functionalized samples, between 0.1 wt% and 3 wt% AUITB were dissolved in PEGDA and, if needed to facilitate dissolution, additional heating at 80 °C was performed, followed by cooling to room temperature. This resulted in a molar ratio of AUITB and PEGDA between 0.18 % and 5.7 %. Afterwards, Irgacure 2959 was added to a final concentration of 0.5 wt% and dissolved overnight under the protection of light. The composition of all hydrogel precursor solutions is listed in Table SI 1. AUITB containing samples are referred to as PEGDA-0.1, PEGDA-0.5, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3 further on, the number meaning the AUITB mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  in the precursor solutions. Silicon wafers were cleaned with acetone, isopropanol and deionized water and dried with nitrogen gas after each cleaning step. Afterwards, the clean wafers were activated with hydrogen peroxide and ammonium hydroxide in a volume ratio of 2:3 at 70 °C for 40 min. After cooling down to room temperature (RT), the wafers were rinsed with deionized water and dried with nitrogen gas. Quartz glass panes were rinsed with acetone and deionized water. The activated silicon wafers were transferred to aluminum molds for better stability and silicone frames (height 500  $\mu\text{m}$ ) were placed on top. The PEGDA solution was poured inside the frame and the mold was closed with the quartz glass pane. The solution was cross-linked with UV-light for 7.5 min after a waiting period of 5 h under the protection of light (radiation intensity of 50  $\text{mW cm}^{-2}$ , spectral range > 300 nm, with an emission maximum around approx. 365 nm, sol2, Dr. Hönle AG). For surface analysis, the hydrogel surface orientated towards the activated silicon wafers was always investigated. For adsorption measurements, precursor solutions were prepared as described before with 0.5 wt% Irgacure 2959,  $\beta_{\text{AUITB}}$  between 1 wt% and 3 wt%, and between 98.5 wt% and 96.5 wt% PEGDA (Table SI 1). After mixing, the PEGDA solution was poured into a cylindrical aluminum mold (diameter 30 mm, height 1 mm), covered with a quartz glass pane and subsequently cross-linked with UV irradiation for 7.5 min. Before subsequent experiments with the samples, they were washed excessively and swollen as explained in the respective sections below.

#### *Raman spectroscopy*

Raman spectra (inVia™ Raman microscope, Qontor®, Renishaw plc) were recorded of AUITB, non-reacted PEGDA, a PEGDA-0 sample and a PEGDA-3 sample to evaluate if the monomer interfered with the cross-linking process of PEGDA and if it was possible to detect the isothiuronium groups of AUITB. Samples were measured after swelling in water for 72 h and drying under reduced pressure of approx. 50 mbar for 24 h at 60 °C (VDL 53, Binder GmbH). For recording the spectra, a 532 nm laser and the objective lens Leica 50x/0.5/8.2 mm were used. Baseline corrections of the spectra were performed with a self-implemented version of a modified polynomial fitting algorithm according to Lieber & Mahadevan-Jansen in the wavenumber range from 700 to 3700  $\text{cm}^{-1}$  (Python 3.8, Anaconda 3) [242]. All spectra were normalized and maxima of the bands were identified with OriginPro 2019b from OriginLab.

#### *Equilibrium degree of swelling, gel yield and mesh size*

To determine the equilibrium degree of swelling (*EDS*) and the gel yield ( $Y_g$ ), rectangular samples were punched out in the size of 1 cm  $\times$  2 cm after cross-linking. The *EDS* was calculated with the following equation:



$$EDS = \frac{m_{\text{swollen}} - m_{\text{dry}}}{m_{\text{dry}}} \quad (1)$$

$m_{\text{swollen}}$  is the mass of the hydrogels after swelling in water for 72 h, replacing the water every 24 h, and  $m_{\text{dry}}$  is the mass of the samples after drying under reduced pressure of approx. 50 mbar at 60 °C for 24 h (VDL 53, Binder GmbH).

The gel yield ( $Y_g$ ) was determined as follows:

$$Y_g = \frac{m_{\text{dry}}}{m_{\text{pol}}} \quad (2)$$

Here,  $m_{\text{pol}}$  is the mass of the samples directly after cross-linking.

For the estimation of the mesh size of PEGDA-0 samples, first the equilibrium polymer volume fraction  $\phi$  of the hydrogels was calculated by:

$$\phi = \frac{V_{\text{dry}}}{V_{\text{swollen}}} = \frac{m_{\text{dry}}/\rho_{\text{PEGDA}}}{(m_{\text{swollen}} - m_{\text{dry}})/\rho_{\text{H}_2\text{O}} + m_{\text{dry}}/\rho_{\text{PEGDA}}} \quad (3)$$

In this equation,  $V_{\text{dry}}$  is the volume of the dried hydrogel,  $V_{\text{swollen}}$  is the volume of the swollen hydrogel,  $\rho_{\text{PEGDA}}$  is the density of PEGDA (1.12 g cm<sup>-3</sup>) [53] and  $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$  is the density of water which was assumed to be 1.0 g cm<sup>-3</sup>.

From  $\phi$ , the molar mass  $M_c$  between cross-links of the hydrogel networks was estimated using the Flory-Rehner equation [243, 244]:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\frac{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}{\rho_{\text{PEGDA}}} \cdot [\ln(1 - \phi) + \phi + \chi \cdot \phi^2]}{M_1 \phi_0 \cdot \left[ \left( \frac{\phi}{\phi_0} \right)^{1/3} - \frac{\phi}{2 \cdot \phi_0} \right]} \quad (4)$$

Here,  $M_n$  is the number average molar mass of the PEGDA polymers before cross-linking,  $\chi = 0.426$  is the Flory–Huggins interaction parameter of PEGDA with water [245],  $M_1 = 18.01 \text{ g mol}^{-1}$  is the molar mass of water, and  $\phi_0$  is the polymer volume fraction in the hydrogels before swelling. For samples prepared in this study, no additional solvent was used during cross-linking and  $\phi_0$  was 1. For estimation of the mesh size of hydrogels prepared by Tan *et al.*, their reported  $\phi_0$  of 0.2 with an  $EDS$  of 9.27 was used [32].

#### *Measurement of the isoelectric point*

The pH-dependent curves of the zeta potential of the hydrogel surfaces were measured with an electrokinetic analyzer (Surpass™, Anton Paar GmbH). All samples were punched out in the size of 1 cm × 2 cm and were washed and swollen in 1 mM KCl for 72 h to equilibrate. After removing remaining solution with a filter paper, they were affixed on sample holders with double-sided tape (tesafix® 4965 original) and redundant hydrogel material was discarded. The sample holders were mounted in the adjustable gap cell, which was assembled in the electrokinetic analyzer. The freshly prepared electrolyte solution consisting of 1 mM KCl was purged with nitrogen gas as suggested by the manufacturer. The pH-dependent zeta potential was determined by measuring the streaming current in the pH-range of approximately 2.5 to 10.4 using 0.1 M HCl and 0.1 M KOH, measuring from acidic to basic pH, with a sample gap between 100 μm and 120 μm. The pH-value where the zeta potential was 0 mV was taken as

the isoelectric point of the sample. Deionized water with a conductivity of  $0.055 \mu\text{S cm}^{-1}$  (arium® pro, Sartorius AG) was used.

#### *Water contact angle and free surface energy*

The water contact angles (WCA) and free surface energy (SE) were measured with video analysis (DataPhysics Instruments GmbH, OCA 40). Samples were punched out in the size of  $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$  and WCA were measured with four drops of  $2 \mu\text{L}$  deionized water with the sessile drop (SD) method. The videos were analyzed afterwards and the time point of 1 s was chosen for comparison. The same procedure was performed for hydrogels which were swollen in deionized water for 72 h.

The SE of the samples was determined by contact angle measurement with the three liquids deionized water (according to Ström *et al.*:  $\text{SE} = 72.8 \text{ mN m}^{-1}$ , polar portion ( $\sigma_p$ ) =  $51.0 \text{ mN m}^{-1}$ , disperse portion ( $\sigma_d$ ) =  $21.8 \text{ mN m}^{-1}$ ) [246], diiodomethane (according to Ström *et al.*:  $\text{SE} = 50.8 \text{ mN m}^{-1}$ ,  $\sigma_p = 0.0 \text{ mN m}^{-1}$ ,  $\sigma_d = 50.8 \text{ mN m}^{-1}$ ) [246] and ethylene glycol (according to Gebhardt:  $\text{SE} = 47.7 \text{ mN m}^{-1}$ ,  $\sigma_p = 21.3 \text{ mN m}^{-1}$ ,  $\sigma_d = 26.4 \text{ mN m}^{-1}$ ) [247]. As before, a video was recorded and the values after 1 s were analyzed. The drop volume was also  $2 \mu\text{L}$  and four drops were measured per sample. The SE was then determined with the Owens–Wendt–Rabel–Kälble (OWRK) model [248-250].

For captive bubble (CB) measurements, hydrogels were swollen in deionized water for 72 h. Remaining water was removed with a filter paper, hydrogels were affixed on cover slips with double-sided tape (tesafix® 4965 original) and placed in a bowl filled with deionized water. The contact angle of an air bubble ( $10 \mu\text{L}$ ) released by a J-shaped cannula was measured and the respective WCA was determined. Three bubbles were measured per sample.

#### *Antibacterial assay of the hydrogels*

Potential antibacterial properties of the hydrogels were assessed according to ISO 22,196 with *Escherichia coli* (*E. coli*) DSM 1576. PEGDA-0 and PEGDA-2 samples, both  $n = 2$ , in the size of  $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ , as well as plastic films in the appropriate size, were sterilized by UV treatment (Bio-Link BLX-312, Vilber) with  $254 \text{ nm}$  and  $0.48 \text{ mW cm}^{-2}$  for 20 min or 3 h, respectively. The bacteria were inoculated on LB agar overnight at  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  and the pre-culture was grown overnight in LB medium at  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . The bacteria suspensions were diluted to a concentration of  $6 \times 10^5$  colony forming units (CFU)  $\text{mL}^{-1}$ .  $300 \mu\text{L}$  of the suspension were added on the sample surfaces and the plastic films were placed on top. The bacteria were washed off the surfaces and the films with  $10 \text{ mL}$  PBS either directly (0 h) or after 24 h incubation (24 h) at  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . The bacteria suspension was diluted in PBS in two concentrations and each was plated on LB agar ( $n = 3$ ). The agar plates were incubated for 24 h at  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  and the CFU were counted.

#### *Adsorption isotherms and kinetics of diclofenac in the hydrogels*

Directly after preparation, samples with a diameter of 8 mm were punched out and weighed ( $m_{\text{pol}}$ ). The hydrogels were washed and swollen in deionized water for 24 h. The swollen hydrogels were immersed in 4 mL of aqueous diclofenac sodium salt (DSS) solution with initial concentrations  $c_0$  between 0 and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  for the determination of the adsorption isotherms and in 4 mL of DSS solution with a concentration  $c_0 = 0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  for the adsorption kinetics.

The hydrogels in DSS solution were kept under agitation at 45 rpm and 20 °C for 72 h for the adsorption isotherms and for a specific time for the adsorption kinetics. After this time, part of the supernatant was transferred into HPLC vials. The diclofenac concentrations  $c_e$  were determined by means of HPLC (Shimadzu Deutschland GmbH) using an isocratic flow of 1 mL min<sup>-1</sup> of a solvent mixture consisting of 55 % deionized water (with 0.05 % TFA) and 45 % acetonitrile. A volume of 10 µL was injected. All measurements were conducted at 40 °C. A reversed phase ReproSil™ XR C18 5 µm column (Dr. Maisch GmbH) was used for the separation. Calibration measurements were performed using twelve standard solutions of DSS with concentrations between 0 and 1 mg mL<sup>-1</sup>. Evaluation of the chromatograms was carried out by measuring the UV absorption at 275 nm. In order to determine the diclofenac concentration of each sample, the diclofenac peaks were integrated between a retention time of 9.1 min and 10.3 min. The amount  $a_e$  of diclofenac contained per mass of hydrogel was determined through the measured concentration  $c_e$  in the supernatant as

$$a_e = \frac{(c_0 - c_e) \cdot V}{m_{\text{pol}} \cdot M_d} \quad (5)$$

$M_d$  is the molar mass of DSS (318.13 g mol<sup>-1</sup>). The resulting adsorption data were described with common adsorption models. With the Langmuir adsorption model, the concentration  $q_e$  of diclofenac adsorbed on the hydrogel polymer network is described by:

$$q_e = q_m \frac{K_s \cdot c_e}{1 + K_s \cdot c_e} \quad (6)$$

$q_m$  is the maximum adsorption capacity of the hydrogel polymer network,  $K_s$  is the ratio of the adsorption and desorption rate constants. Additionally, diclofenac is also present in the water that is the swelling medium of the hydrogel network, so the total concentration of diclofenac in the hydrogel is described by [251]:

$$a_e = \frac{c_e \cdot \varphi_{\text{H}_2\text{O}}}{\rho_{\text{H}}} + q_e \quad (7)$$

$\varphi_{\text{H}_2\text{O}}$  is the water volume fraction ( $\varphi_{\text{H}_2\text{O}} = 1 - \phi$ ) and  $\rho_{\text{H}}$  the density of the hydrogel. The partition coefficient  $k$  is defined as the ratio of adsorbate concentration in the hydrogel and of the equilibrium concentration in the supernatant:

$$k = \frac{a_e \cdot \rho_{\text{H}}}{c_e} \quad (8)$$

Enhancement factors can be calculated as the ratio of the real measured partition coefficients and the ideal partition coefficients which equal the water volume fraction of the gels [252].

$$E = \frac{k}{\varphi_{\text{H}_2\text{O}}} \quad (9)$$

#### *Reduction of isothiuronium groups to thiols and their detection*

Hydrogels were swollen in deionized water for at least 16 h. To reduce the isothiuronium groups to thiols, hydrogels were punched in the size of 1 cm × 2 cm and transferred into 5 mL 1 M sodium metabisulfite solution (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) and the solution was heated up to 60 °C for 5 h. These treated hydrogels are further called PEGDA-T hydrogels. Non-treated control samples were swollen in 5 mL fresh deionized water at RT for 5 h (PEGDA-NT hydrogels). After

cooling down to RT, the supernatants were discarded and samples were shortly washed with 5 mL PBS. From this moment on all hydrogels were washed with PBS at least  $5 \times$  for 30 min until the pH-value of the washing solution was approx. 7.2.

Fluorescence staining with a maleimide dye was carried out after the hydrogels were kept in fresh PBS overnight. The hydrogels were punched out in discs with a diameter of 8 mm. After another washing step with PBS, the hydrogels were stained with the maleimide fluorophore Atto488 by immersing them in 2 mL of a 25  $\mu$ M staining solution (obtained by diluting a 1 mM stock solution in DMSO 1:40 with deionized water) for 2 h at RT under the protection of light. Afterwards, hydrogels were shortly washed in PBS and then washed  $7 \times$  in PBS for 30 min and kept in PBS further on. All washing steps were conducted under the protection of light. A confocal laser scanning microscope (LSM) (LSM 710, AxioObserver, Carl Zeiss) was used to investigate the hydrogels with the objective Zeiss EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Microscope settings were kept identical for every sample and z-stacks were generated using the Argon 488 nm laser. The data was converted into a 2D maximum intensity projection (MIP) and the mean fluorescence intensity of the MIP was determined with Fiji (2.1.0) [253].

#### *Conjugation of horseradish peroxidase*

After the washing steps with PBS, the PEGDA-0NT, PEGDA-0T, PEGDA-2NT and PEGDA-2T hydrogels were punched out in the size of 8 mm and placed in a 24 well plate. A maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker in a 250 mM stock solution in DMSO was further diluted to a concentration of 5  $\mu$ M by addition of PBS. 500  $\mu$ L of the solution were added to one half of the hydrogels, the other half was immersed in PBS. The hydrogels were agitated for 5 h at RT. Afterwards, they were shortly washed in PBS and then washed  $7 \times$  in PBS for 30 min and kept at 4 °C overnight. A solution of 2.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptavidin-coupled horseradish peroxidase (SA-HRP) in PBS in a volume of 500  $\mu$ L was added to each of the hydrogels for 5 h at 4 °C. The hydrogels were shortly washed in PBS and washed again  $7 \times$  for 30 min at 4 °C. 500  $\mu$ L ABTS solution were added to each well and the absorption was measured at 405 nm for approx. 30 min. PEGDA-0NT hydrogels without the addition of the linker served as blank.

#### *Statistical analysis*

One- or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc test were used for statistical analysis with OriginPro 2019b (OriginLab). For p-values < 0.05, mean values were considered to be significantly different. Each experiment, except for the antibacterial assay, was repeated independently for at least three times with independent sample preparations.

### 3.2.4 Results and Discussion

#### *Synthesis and characterization of isothiuronium-functional monomer AUITB*

The synthesis of the monomer AUITB is based on a two-step reaction (Figure 1a). In the first step, 11-bromoundecyl acrylate was synthesized by the acrylation of 11-bromo-1-undecanol with acryloyl chloride. As a by-product, 11-hydroxyundecyl acrylate was formed. However, this by-product, lacking the electrophilic bromoalkane moiety, was unreactive in the reaction conditions used in the second step of the reaction, therefore no further purification was performed. In the second step, AUITB was synthesized by a nucleophilic substitution with

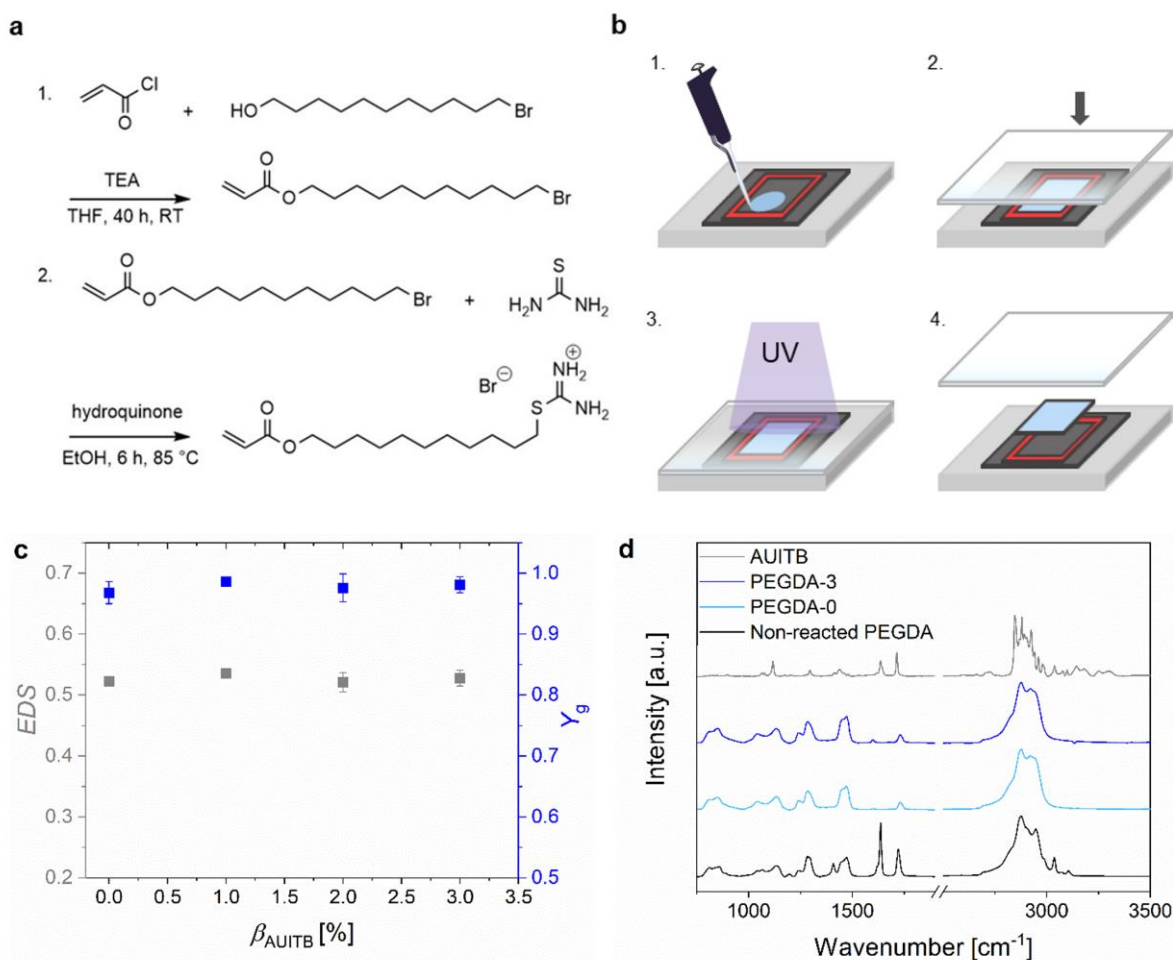
thiourea. The spectral data indicated a successful synthesis of the monomer AUITB. The  $^1\text{H}$  NMR signals of the isothiuronium group at 8.99 ppm were in accordance with previous reports [254-257]. The Raman spectrum showed the typical stretching vibration of the C-H bond in the alkyl chain between 2800 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 1d). The band at 1714  $\text{cm}^{-1}$  was associated with the  $\alpha,\beta$ -unsaturated ester in the molecule. The band at 1637  $\text{cm}^{-1}$  was related to the stretching vibration of the C = C double bond. In the same wavenumber range also the band of the N-H bond is localized [258]. AUITB was soluble in chloroform, dimethyl sulfoxide, ethanol and also in neat PEGDA, however was insoluble in water. Solutions of AUITB in PEGDA were therefore used for subsequent hydrogel preparation.

#### *Preparation and characterization of isothiuronium-functional hydrogels*

PEGDA samples with and without the monomer AUITB were prepared by radical cross-linking in molds (Figure 1b). First, it was evaluated if the integration of AUITB interfered with the cross-linking process of PEGDA. For this purpose, the equilibrium degrees of swelling (*EDS*) and the gel yields ( $Y_g$ ) were examined. Figure 1c shows the  $Y_g$  and *EDS* as a function of the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during sample preparation for the samples PEGDA-0, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3. The  $Y_g$  as well as the *EDS* were comparable for the different hydrogel compositions. The mean values of  $Y_g$  ranged between 0.97 and 0.99, indicating an almost quantitative integration of all starting materials into the polymer network for all samples. The *EDS* was between 0.52 and 0.54, very similar to the *EDS* of 0.49 reported by Mellott *et al.* for spheres prepared with PEGDA ( $M_n = 575 \text{ g mol}^{-1}$ ) [40].

It is interesting to note that the introduction of the charged monomer AUITB did not alter the swelling properties significantly, in contrast to our expectations and to previous studies with monomers carrying ionic groups. For example, Tan *et al.* prepared PEGDA ( $M_n = 4000 \text{ g mol}^{-1}$ ) hydrogels with the monomer 2-(methacryloyloxy)ethyltrimethylammonium chloride (MAETAC) having a quaternary ammonium group [32]. Their solutions before curing contained 20 % w/v PEGDA leading to an *EDS* of 9.3 without MAETAC and to an *EDS* of 15.6 with approx. 20.8 wt% MAETAC relative to the mass of PEGDA. However, there are important differences between our experiments and the data described by Tan *et al.* With up to 3 wt% AUITB in our precursor solution, the fraction of the functional monomer is much lower. The molar ratio of AUITB and PEGDA was therefore up to 5.7 %. Taking into account the two polymerizable groups per PEGDA molecule, this results in a theoretical fraction of isothiuronium-functionalized repeating units in the polyacrylate backbone of 2.8 %. Also, in contrast to MAETAC, AUITB has a hydrophobic alkyl chain which will probably rather decrease the *EDS*. Additionally, we consider one of the key differences the cross-link density of the pure PEGDA hydrogels. Using Equation 4 to estimate the molar mass between cross-links, one obtains a value of 48  $\text{g mol}^{-1}$  for our samples, which is close to one repeating unit of the PEG backbone, in contrast to a value of 1145  $\text{g mol}^{-1}$  for the samples of Tan *et al.* Thus, our hydrogels contain densely cross-linked polymer networks which offer only very limited possibilities for the network to expand, also after addition of AUITB. Therefore, the *EDS* data in combination with the  $Y_g$  data suggest that AUITB did not interfere with the cross-linking process of PEGDA for the tested concentrations.

In order to confirm this finding, Raman spectra were recorded of AUITB, unreacted PEGDA, a PEGDA-0 sample and a PEGDA-3 sample. The spectra are depicted in Figure 1d.



**Figure 1:** Hydrogel preparation and evaluation of the cross-linking process. *a)* Synthesis of 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)isothiuronium bromide (AUITB). First step: Synthesis of 11-bromoundecyl acrylate by acrylation of 11-bromo-1-undecanol with acryloyl chloride. Second step: Synthesis of AUITB by nucleophilic substitution with thiourea. TEA: triethylamine, THF: tetrahydrofuran, RT: room temperature, EtOH: ethanol. *b)* Preparation of samples: 1. Pipetting the precursor solution on an activated silicon wafer. 2. Closing the mold with a quartz glass pane. 3. Cross-linking of the sample by UV-irradiation. 4. Removing the sample from the mold. *c)* Equilibrium degree of swelling (EDS) in grey and gel yield ( $Y_g$ ) in blue of PEG-based hydrogels depending on the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during sample preparation. Hydrogels were swollen in deionized water for 72 h. Results are shown for PEGDA-0 (EDS:  $n = 10$ ,  $Y_g$ :  $n = 8$ ), PEGDA-1 (EDS:  $n = 5$ ,  $Y_g$ :  $n = 3$ ), PEGDA-2 (EDS:  $n = 6$ ,  $Y_g$ :  $n = 4$ ) and PEGDA-3 (EDS:  $n = 5$ ,  $Y_g$ :  $n = 4$ ) hydrogels. *d)* Raman spectra of AUITB, unreacted PEGDA, a PEGDA-0 sample and a PEGDA-3 sample. Hydrogel samples were washed and dried before recording the spectra.

All spectra had the characteristic bands of the stretching vibrations of the C-H bond between 2600 and 3000  $\text{cm}^{-1}$ . The band  $> 3000 \text{ cm}^{-1}$  in the spectrum of the non-reacted PEGDA results from the C-H stretching vibration at the double bond. This spectrum also had a strong band with a peak at 1637  $\text{cm}^{-1}$ , which can be assigned to the C = C double bond. The spectra of the cross-linked PEGDA-0 and PEGDA-3 samples were comparable and showed a nearly disappeared band around 1600  $\text{cm}^{-1}$ . This indicates that the cross-linking of the samples was successful, including the consumption of the C = C double bond, and that the integration of the

monomer in the precursor solution did not interfere with the cross-linking process. Unfortunately, in the PEGDA-3 spectrum, no direct evidence was visible that proves the successful integration of AUITB, probably due to the rather small  $\beta_{\text{AUITB}}$ . Summarizing, the Raman spectra also point out that cross-linking of PEGDA hydrogels was not hampered by AUITB addition.

#### *Functionalities of isothiuronium-containing hydrogels*

In order to further evaluate if the functionalization of the PEGDA hydrogels with AUITB was detectable and successful, their isoelectric points (IEP), *i.e.* the pH-value where the net charge is zero, were examined by measuring the zeta potential as a function of pH value (Figure SI 4). In Figure 2a ('original'), the IEPs of samples with  $\beta_{\text{AUITB}}$  between 0 wt% and 3 wt% are shown. The hydrogels were swollen in 1 mM KCl after cross-linking for three days to facilitate the measurements, but apart from that received no chemical treatment. Generally, the IEP of the hydrogels increased with increasing  $\beta_{\text{AUITB}}$ . Their IEPs ranged between  $4.5 \pm 0.1$  (PEGDA-0) and  $9.0 \pm 0.1$  (PEGDA-2). For the non-functionalized surface of the PEGDA-0 samples, an IEP of approx. 4 was expected [114]. It has been reported before that PEG-based hydrogels have their IEP in this pH-range [259-261] probably caused by the adsorption of hydroxide ions on the surface [260, 262, 263]. With increasing  $\beta_{\text{AUITB}}$ , the IEP shifted to values in the basic pH-range. If a solid surface only has one functional group, the IEP of this surface is reported to be strongly related to the  $pK_a$ -value of this group [114]. The  $pK_a$ -value of isothiuronium groups is expected to be in the basic region [264-266]. For isothiuronium-functionalized nanoparticles, an IEP of 10.2 has been reported [112]. These findings are in accordance with the IEP measured for the higher  $\beta_{\text{AUITB}}$  of 2 wt% and 3 wt%. Hence the results suggest that the functionalization of the PEGDA hydrogels led to a surface charge and that the amount of isothiuronium groups within the samples correlated with  $\beta_{\text{AUITB}}$  used during preparation.

In order to evaluate the effect of AUITB addition to the hydrogels further, contact angle measurements were performed. It is conceivable that due to the amphiphilic structure of AUITB, either more hydrophilic or more hydrophobic surface properties are generated upon AUITB integration. Therefore, first the water contact angles (WCA) of dry and swollen samples in contact with air were measured with the sessile drop (SD) method (Figure 2b). For dry PEGDA-0 samples, a WCA of  $48.4^\circ \pm 1.8^\circ$  was measured whereas the PEGDA-3 samples had a WCA of  $56.2^\circ \pm 0.4^\circ$ . Additionally, swollen PEGDA-0 hydrogels had a WCA of  $44.7^\circ \pm 2.4^\circ$  and swollen PEGDA-3 hydrogels a WCA of  $49.9^\circ \pm 3.0^\circ$ . Thus, there was a tendency towards increasing WCAs with increasing  $\beta_{\text{AUITB}}$ , implying more hydrophobic surfaces, probably caused by the hydrophobic alkyl chain of AUITB. This result was supported by measuring the surface energies (SE) of the dry samples (Figure SI 5). All samples had a comparable SE between  $51$  and  $53 \text{ mN m}^{-1}$ , enabling the comparison of the polar and disperse portions. A tendency towards decreasing polar portions was detected with increasing  $\beta_{\text{AUITB}}$ . PEGDA-3 samples had polar portions of  $12.7 \text{ mN m}^{-1} \pm 0.2 \text{ mN m}^{-1}$  compared to PEGDA-0 samples with  $15.6 \text{ mN m}^{-1} \pm 0.6 \text{ mN m}^{-1}$ .

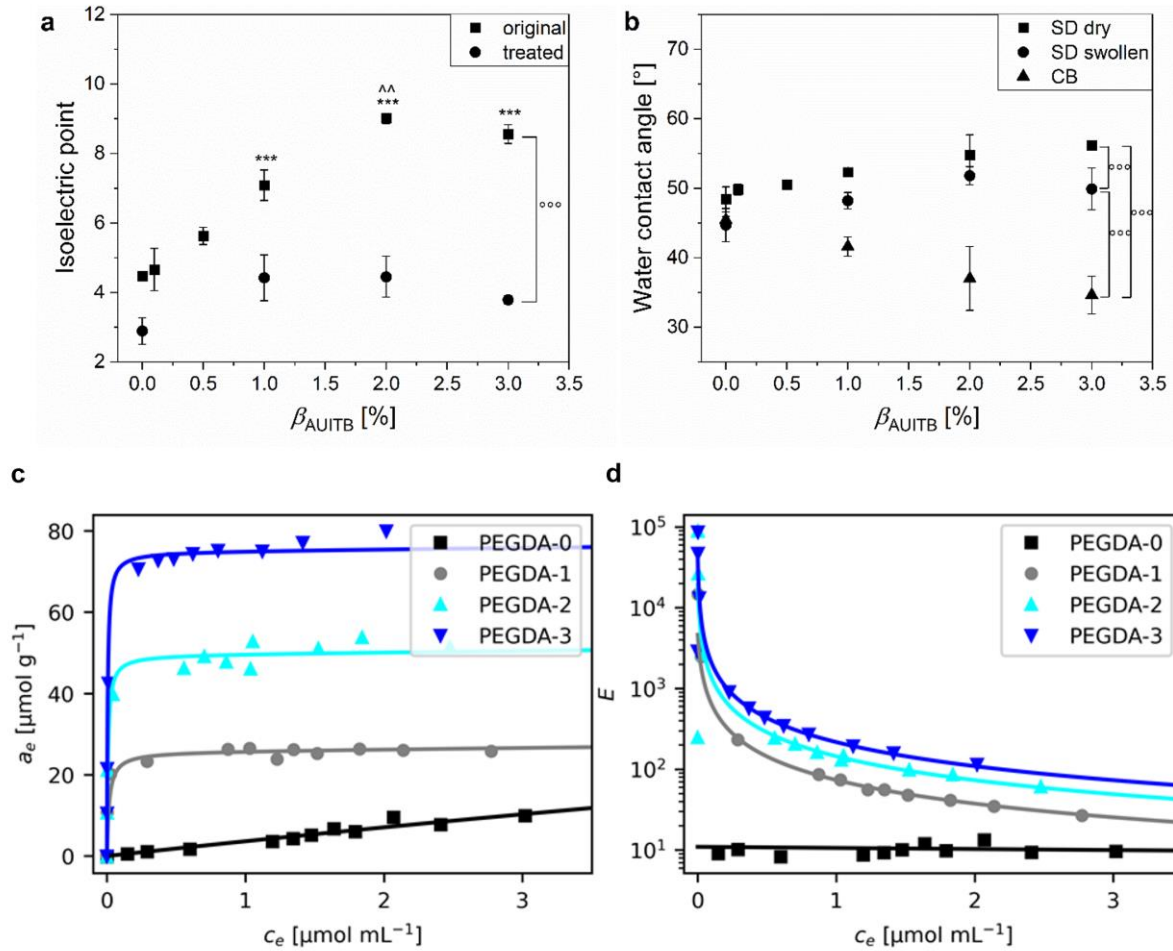


Figure 2: Characterization of the isothiuronium-functional hydrogels. a) Isoelectric points (IEP) depending on the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during sample preparation. Results are shown for PEGDA-0, PEGDA-0.1, PEGDA-0.5, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3 hydrogels ( $n = 3$ ). Hydrogels were either swollen in 1 mM KCl after cross-linking (original) or treated with 1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  and kept in 1 mM KCl afterwards (treated). Explanation of symbols: \*\*\* significantly different to PEGDA-0 hydrogels ( $p < 0.001$ ); ^^ significantly different to PEGDA-1 hydrogels ( $p < 0.01$ ), °°° significant differences between sample treatments ( $p < 0.001$ ). b) Water contact angles depending on  $\beta_{\text{AUITB}}$  of dry and swollen samples, measured by the sessile drop (SD) or captive bubble (CB) method ( $n = 3$ , SD method PEGDA-2  $n = 4$ ). Explanation of symbols: °°° significant differences between methods ( $p < 0.001$ ). c) and d) Diclofenac adsorption in isothiuronium-functional hydrogels. c) Diclofenac concentrations  $a_e$  adsorbed within hydrogels PEGDA-0, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3, determined for different equilibrium supernatant concentrations  $c_e$  of diclofenac. The experimental data points were fitted with a modified Langmuir model according to Eq. 7 (solid lines). d) Enhancement factors  $E$  of diclofenac within the tested samples. The data points were calculated using Eq. 9 with the experimental values of  $a_e$  and  $c_e$ , and the solid lines were calculated with the same equation by expressing  $a_e$  with the fit results shown in Table 1.

However, interestingly a different result was obtained when measuring the WCAs with the captive bubble (CB) method during which the samples are submerged in water. The CB measurements resulted in similar contact angles of the PEGDA-0 hydrogels compared to the SD measurements of swollen PEGDA-0 hydrogels with  $45.4^\circ \pm 0.5^\circ$ . In contrast to the SD data, the WCA decreased with increasing  $\beta_{\text{AUITB}}$ , so that PEGDA-3 hydrogels had a WCA of  $34.6^\circ \pm 2.7^\circ$ . We ascribe this observation to a changed orientation of the isothiuronium groups in



samples submerged in water. This is possible due to the isothiuronium groups being linked to the flexible alkyl chain which can change conformation depending on the surrounding medium. In contact with the non-polar air, the alkyl chain is exposed to the sample surface, whereas in contact with water the ionic isothiuronium group is presented. A similar effect of the reorientation of side chains induced by the surrounding medium was reported before by Yokoyama *et al.* [267]. They mixed a block copolymer of deuterated polystyrene (dPS) and 2-[2-(2-methoxyethoxy)-ethoxy]ethyl methacrylate (PME3MA) with polystyrene (PS) and measured decreased advancing and receding contact angles and higher hysteresis with increasing concentration of dPS-PME3MA in PS. They hypothesized this effect is due to the surface reconstruction of the hydrophilic parts of PME3MA, which can form a brush layer on PS. When exposed to air the methyl termini were located at the surface [267]. These reorganizations of the surface probably take place to lower the interfacial free energy [267-269].

In fact, our method used to prepare the samples involved contact of the analyzed surface to a hydrophilic silicon surface. The reasoning behind this was to allow the isothiuronium groups to be present on the sample surfaces. The WCA measurements now confirm this approach. A similar method was previously described by Bongiovanni *et al.* who prepared acrylic films and added acrylic monomers with different lengths of alkyl chains to an epoxyacrylic resin [270]. While cross-linking those films, one side was exposed to an inert atmosphere and the other one to a glass substrate. They reported an asymmetric distribution of the monomers, depending on the alkyl chain length and monomer concentration, and found increasing advancing contact angles on the film side orientated towards the inert atmosphere. Thus, we conclude that the combination of our sample preparation procedure and a polar surrounding medium like water makes the isothiuronium groups accessible on the sample surfaces, as also suggested by the IEP data described above. Moreover, the results also indicate a comparable surface density of isothiuronium groups for PEGDA-2 and PEGDA-3 hydrogels.

Additionally, potential antibacterial properties of the hydrogel surfaces were assessed for PEGDA-2 and PEGDA-0 hydrogels with the bacterial reference strain *E. coli* DSM 1576 according to ISO 22,196 under static conditions (Figure SI 6). Comparable CFU mL<sup>-1</sup> of *E. coli* were seeded on the hydrogel surfaces with (185 ± 41) CFU mL<sup>-1</sup> for PEGDA-0 and (177 ± 22) CFU mL<sup>-1</sup> for PEGDA-2 hydrogels. After 24 h of contact time with the samples (520 ± 117) CFU mL<sup>-1</sup> were counted on PEGDA-0 hydrogels and (395 ± 49) CFU mL<sup>-1</sup> on PEGDA-2 hydrogels, showing a slight tendency of less bacteria on PEGDA-2 hydrogels. The effect of isothiuronium groups on bacteria was investigated before by Cohen *et al.* using a procedure under dynamic conditions [112]. They added polyisothiuronium methylstyrene nanoparticles to bacteria suspensions, including *E. coli*, and demonstrated antibacterial properties of the nanoparticles. Our data do not suggest a distinct antibacterial effect. Since the bacteria needed to be washed off the sample and film surfaces before they were counted, bigger errors were expected and also determined. Additionally the number of available isothiuronium groups on the hydrogel surfaces is unknown and probably lower compared to the functionalized nanoparticles.

Table 1: Adsorption capacity  $q_m$  and equilibrium constant  $K_s$  describing the adsorption of diclofenac on PEGDA hydrogels with and without isothiuronium functionalization. The values were obtained by nonlinear regression of the adsorption isotherms (Fig. 2c and d) with Eq. 7.

Sample	$q_m$ [ $\mu\text{mol g}^{-1}$ ]	$K_s$ [ $\text{mL } \mu\text{mol}^{-1}$ ]
PEGDA-0	$102 \pm 246$	$0.03 \pm 0.09$
PEGDA-1	$25.7 \pm 1.3$	$63 \pm 23$
PEGDA-2	$49.6 \pm 1.9$	$131 \pm 49$
PEGDA-3	$74.9 \pm 1.4$	$192 \pm 35$

As mentioned above, isothiuronium-functionalized materials may be used as adsorbers for heavy metal ions. In this contribution, we wanted to evaluate the potential of the isothiuronium-functionalized hydrogels for the adsorption of pharmaceuticals like diclofenac, which was offered in its ionic form of DSS. For this purpose, adsorption isotherms, *i.e.* the concentration  $a_e$  of diclofenac inside the hydrogels as a function of the equilibrium concentration  $c_e$  in the supernatant (Equation 7), were measured for PEGDA-0, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3, as shown in Figure 2c. The adsorption time to reach equilibrium conditions was found to be 72 h, as shown in Figure SI 7. The overall shapes of the isotherms of isothiuronium-functionalized samples were similar. The results show steep increases of  $a_e$  with increasing  $c_e$  for all AUITB-containing hydrogels at low  $c_e$ . At higher  $c_e$  values, the isotherms flattened out and approached a plateau. It was also evident that the maximum  $a_e$  values increased with AUITB concentration. For a quantitative understanding, the isotherms were fitted using Equation 7 and the adsorption capacities  $q_m$ , *i.e.* the level of the plateau, and the equilibrium constants  $K_s$  were obtained (Table 1). The values for  $q_m$  ranged between 25.7 and 74.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$ , increasing proportionally with  $\beta_{\text{AUITB}}$ . This observation is consistent with the assumption that indeed the isothiuronium groups cause the adsorption of diclofenac within the samples, probably by means of an ion exchange. This conclusion is further supported by the adsorption isotherm of PEGDA-0 which is almost linear without showing any plateau. This is indicative of unspecific adsorption due to the absence of isothiuronium groups. Also, the maximum  $a_e$  value was 9.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  for the unfunctionalized samples, thus being much lower than for all AUITB containing samples. Note that the fit results for PEGDA-0 in Table 1 were included for the sake of completeness, but are not meaningful due to the large standard errors. A similar picture is found by looking at the enhancement factors  $E$  of diclofenac in the hydrogels, *i.e.* the ratio of diclofenac concentrations inside the hydrogel and the supernatant (Figure 2d). For PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3 hydrogels, maximum enhancement factors of 14,911, 89,923 and 85,461 were achieved, whereas for the non-functionalized PEGDA-0 hydrogels a maximum value of 239 was determined. In fact, the large enhancement factors give rise to the conclusion that the isothiuronium functionalization results in a strong interaction with the diclofenac anion while the adsorption capacity of the hydrogels can be tuned by varying the amount of AUITB monomer. The strong affinity of the isothiuronium groups to diclofenac is also evident when comparing the  $q_m$  and  $K_s$  values from Table 1 with results reported before for diclofenac adsorption. Concerning  $q_m$ , a higher value of 344.8  $\text{mg g}^{-1}$  (1083  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) was found for example by Liu *et al.* with polymeric nanoparticles prepared

with the positively charged monomer MAETAC [95], or of 129.42 mg g<sup>-1</sup> (406 μmol g<sup>-1</sup>) by Mahmoodi *et al.* with melamine-functionalized graphene oxide-chitosan hydrogels [271]. This can simply be explained by the different concentration of adsorption sites, as also evident from the proportional increase of  $q_m$  with  $\beta_{\text{AUITB}}$ . A higher affinity is connected to a higher  $K_s$  value. Indeed, the value for PEGDA-3 samples of 192 mL μmol<sup>-1</sup> surpasses the values of 0.1663 L mg<sup>-1</sup> (52.9 mL μmol<sup>-1</sup>) and 0.336 ppm<sup>-1</sup> (107.0 mL μmol<sup>-1</sup>) reported before by Liu *et al.* [95] and Mahmoodi *et al.* [271]. The isothiuronium groups present in the hydrogels in our study therefore show a higher affinity to diclofenac than the functional groups in the previous reports.

#### *Functionalities of thiol-containing hydrogels*

Isothiuronium groups are synthetic precursors of thiols, as explained in the introduction. Therefore, we treated the isothiuronium-functionalized samples with sodium metabisulfite to reduce them to thiols. The thus treated samples are denoted with a “T” in their sample names. Control samples which underwent the same washing steps, but omitting sodium metabisulfite in the solutions, are denoted with a “NT” in their sample names. The effect of the treatment was first assessed by measuring the IEP of the samples (Figure 2a). Indeed, the IEPs decreased drastically for the treated and functionalized samples to a similar level like the PEGDA-0 samples. This demonstrates that the isothiuronium groups were converted to neutral moieties during the reaction, consistent with the presence of thiols.

In a second step, the reactivity of the treated samples was assessed by fluorescence staining of the hydrogels. Thiols were stained via a thiol-Michael reaction with the fluorescence dye Atto488 maleimide. In Figure 3a, the fluorescence intensity of the treated and control samples is depicted. Figure 3b and c show representative fluorescence images after staining of the PEGDA-0T and PEGDA-3T hydrogels. Representative images after staining of all other tested hydrogel compositions are listed in Figure SI 8.

Generally, the fluorescence intensity after staining of treated samples increased with the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used for sample preparation (Figure 3a), whereas the non-treated samples still containing the isothiuronium groups were stained to a much smaller extent. This was also visually observed by a color change of the hydrogels (Figure SI 9). Also, both the treated and non-treated PEGDA-0 samples showed no staining. We explain this with the reactivity of the formed thiols in the treated, formerly isothiuronium-functionalized samples towards the fluorescence dye, resulting in covalent attachment, which is possible neither for the non-treated nor the treated PEGDA-0 samples. The small fluorescence intensity of the non-treated samples is ascribed to electrostatic interaction of the negatively charged dye and the isothiuronium groups. Taken together, the observations are a strong indication that indeed thiols were formed that were fully accessible and reactive, thus making them suitable to be used in further bioconjugation reactions. Also, the amount of available thiols for coupling increases with  $\beta_{\text{AUITB}}$ . Indeed, it was reported before that isothiuronium groups can be reduced successfully to thiols with sodium metabisulfite [125].

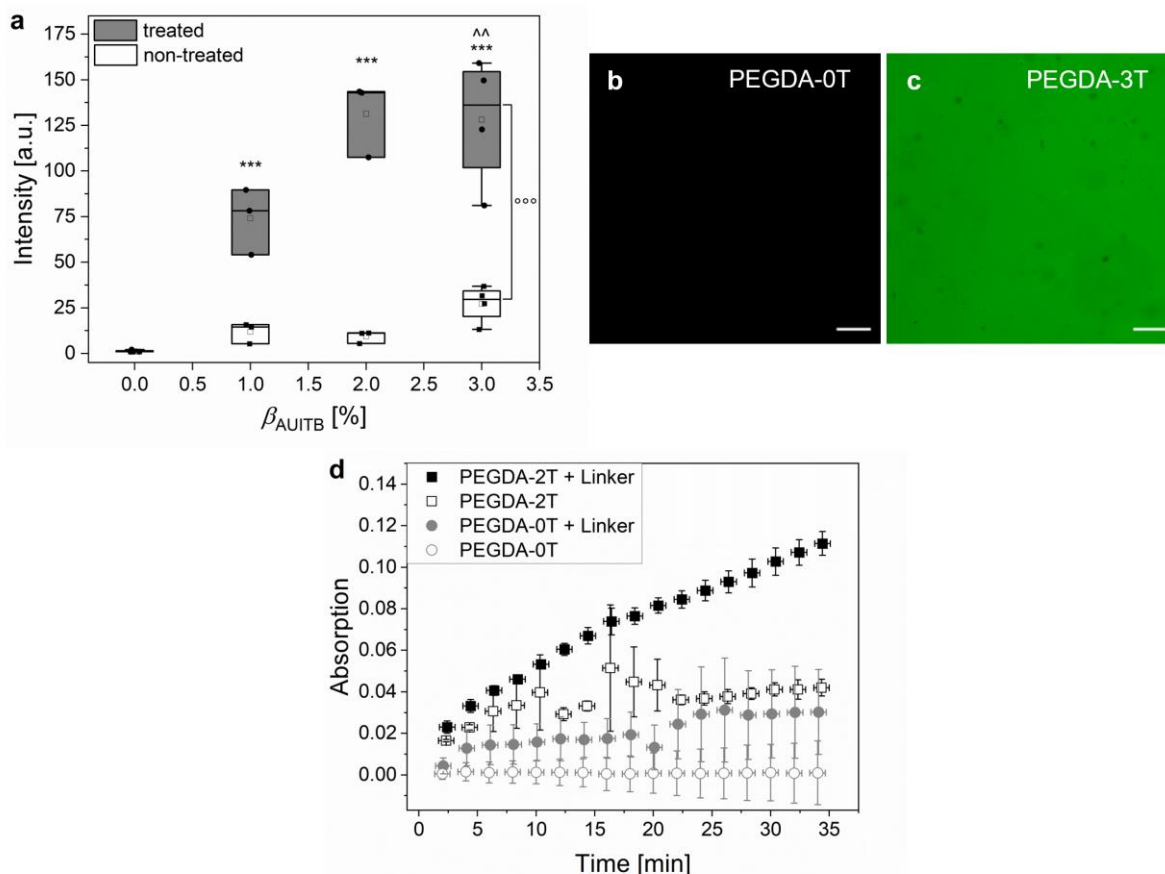


Figure 3: Functionalities of thiol-containing PEG-based hydrogels. a) Fluorescence intensity measured for hydrogels with isothiuronium (non-treated) and thiol functionalization (treated) after staining with Atto488 maleimide as a function of the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during hydrogel preparation. Treated samples were chemically reduced with sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) and non-treated were kept in water. The boxes show the 25th and 75th percentiles. The horizontal line in the boxes is the median and the square is the mean. (PEGDA-0, PEGDA-3:  $n = 4$ , PEGDA-1, PEGDA-2:  $n = 3$ ). Explanation of symbols: \*\*\* significantly different to PEGDA-0 hydrogels ( $p < 0.001$ ); ^^ significantly different to PEGDA-1 hydrogels ( $p < 0.01$ ), °°° significant differences between sample treatments ( $p < 0.001$ ). b, c) Exemplary fluorescence images of stained hydrogels. b) PEGDA-0T hydrogel. c) PEGDA-3T hydrogel. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . d) Time dependent absorption measurements of the conversion of ABTS substrate to the green ABTS<sup>+</sup> by horseradish peroxidase linked to the hydrogels. PEGDA-0NT hydrogels without the addition of the linker served as blank. Significant effects were found for the means in sample composition and time, the interaction of sample composition and time was significant as well.

In a next step, the thiol-functionalized hydrogels were used to conjugate the enzyme horseradish peroxidase (HRP). This was achieved in a two-step process by first coupling a biotin-functional linker via a thiol-Michael reaction to the samples, and subsequently using the biotin-streptavidin interaction to bind a streptavidin-HRP conjugate (SA-HRP), a strategy similar to a report by Koch *et al.* [132]. In order to distinguish between unspecific adsorption of SA-HRP on the hydrogels and the desired bioconjugation reaction, control experiments without the linker were performed. The success of the reaction was assessed by conversion of ABTS to the green ABTS<sup>+</sup> radical cation which was measured photometrically (Figure 3d). The PEGDA-2T hydrogels, which were first agitated in linker solution and afterwards in enzyme solution (PEGDA-2T + Linker), had the highest absorption of 0.111 after 34 min in ABTS substrate solution. The PEGDA-2T hydrogels without the linker had a lower absorption of 0.042 at the

same time point. The PEGDA-0T hydrogels had an absorption of 0.030 with and 0.001 without the linker at 34 min. As expected, the PEGDA-2T + Linker hydrogels had the highest absorption. Due to their thiols, the maleimide linker was covalently bound to the hydrogels, which was used in the next step to bind the streptavidin-coupled enzyme with biotin. Without the linker, the PEGDA-2T hydrogels could only unspecifically bind the SA-HRP and therefore the absorption was lower. The PEGDA-0T hydrogels had the lowest absorption, demonstrating the low unspecific protein adsorption on PEGDA hydrogels. The PEGDA-2NT hydrogels, containing isothiuronium groups, reached absorption values of 0.081 with and 0.070 without the linker, showing again an interaction between the isothiuronium groups and the maleimides and also an effect of the groups regarding protein adsorption (data shown in Figure SI 10). Summarizing, it was demonstrated that the thiol-functionalized hydrogels can serve as an anchor for further functionalization and in this case for bioconjugation reactions.

### 3.2.5 Conclusions

We successfully demonstrated that isothiuronium groups can be introduced into hydrogels by simple radical copolymerization of the isothiuronium-functional monomer AUITB with PEGDA. The isothiuronium groups are fully accessible on the sample surface, especially in polar media, while they orientate themselves towards the sample bulk in contact with air. Furthermore, the isothiuronium groups are also fully accessible within the sample bulk, making the samples highly effective in the adsorption of diclofenac. Generally, the sample properties changed monotonically with the mass fraction of AUITB used during sample preparation, allowing a precise control of material properties. Finally, the isothiuronium groups can be easily reduced to thiols, thus harnessing the full potential of the versatile thiol reactivity for bioconjugation reactions, such as enzyme immobilization. In conclusion, the results show that isothiuronium functionalization offers an attractive and simple way to introduce chemical functionality into hydrogels.

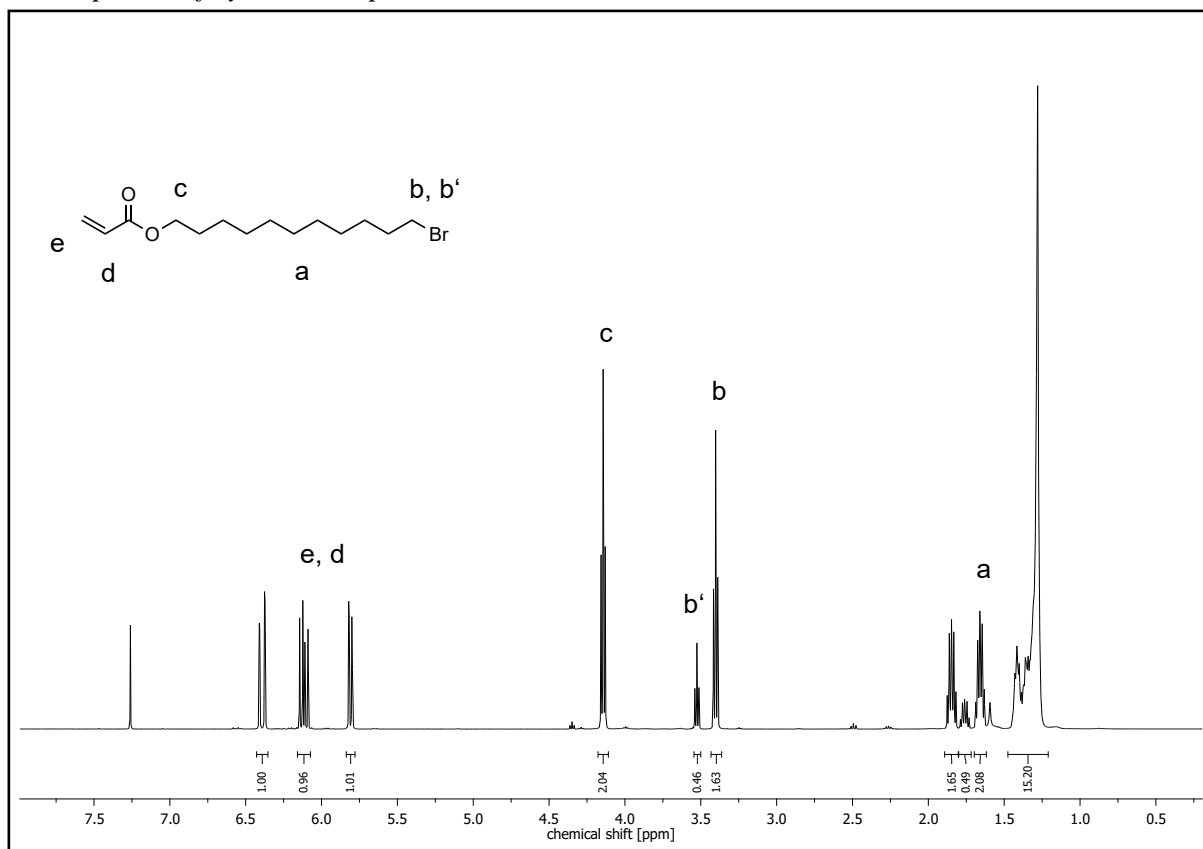
### 3.2.6 Acknowledgements

J.G. thanks the PhD scholarship of the Evonik Foundation (Essen, Germany) for funding. A.S. and G.E.M.T. thank the University of Stuttgart as well as the Ministry of Science, Research and Arts of the Federal State of Baden-Württemberg (Germany) for funding within the Leistungszentrum Mass Personalization ([https:// www.masspersonalization. de/](https://www.masspersonalization.de/)). J.G. kindly thanks Friederike Dehli (Institute of Physical Chemistry, University of Stuttgart) and the Technology Platform “Cellular Analytics” of the Stuttgart Research Center Systems Biology for the support and assistance with the LSM measurements. J.G. thanks Daniela Urban (Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart) for the help with the  $EDS$  and  $Y_g$  measurements. J.G. also thanks Prof. Dr. Christina Wege (Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems, University of Stuttgart) for helpful discussions and support. The authors thank Dr. Birgit Claaßen (Institute of Organic Chemistry, University of Stuttgart) and her group for NMR measurements. The authors thank the University of Stuttgart (Stuttgart) and the Fraunhofer-Gesellschaft (Munich) for providing the infrastructure.

### 3.2.7 Author Contributions

J.G.: Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal Analysis, Visualization, Writing - original draft. V.A.: Methodology, Writing - review and editing. A.T.: Methodology, Investigation, Writing - original draft. C.O.J.: Investigation, Writing - review and editing. S.Q.: Investigation, Writing - review and editing. C.K.: Methodology, Investigation, Writing - review and editing, C.G.K.: Methodology, Writing - review and editing, A.B.-K.: Writing - review and editing, G.E.M.T.: Writing - review & editing, Supervision. A.S.: Conceptualization, Methodology, Visualization, Writing - review & editing, Supervision.

## 3.2.8 Supporting Information

*NMR spectra of synthesized products**Figure SI 1:  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 11-bromoundecyl acrylate.*

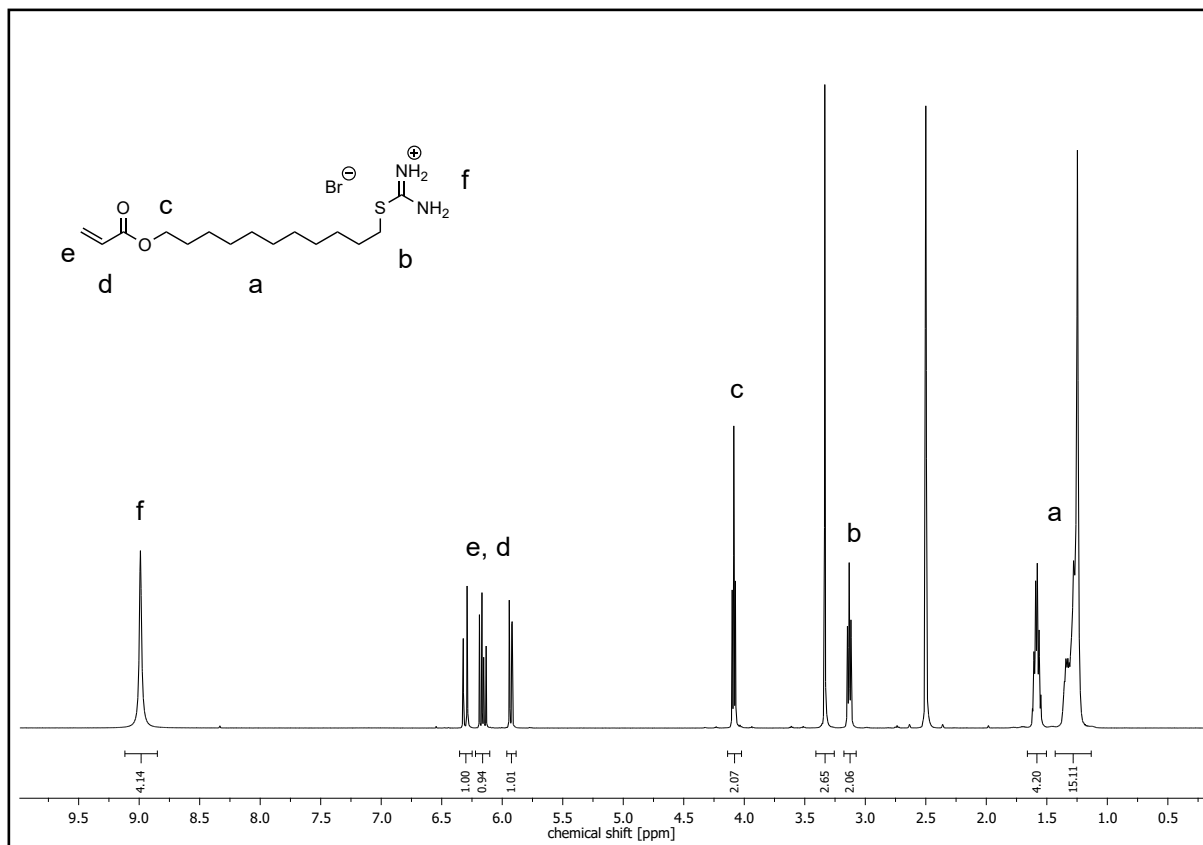


Figure SI 2: <sup>1</sup>H NMR spectrum of AUITB.

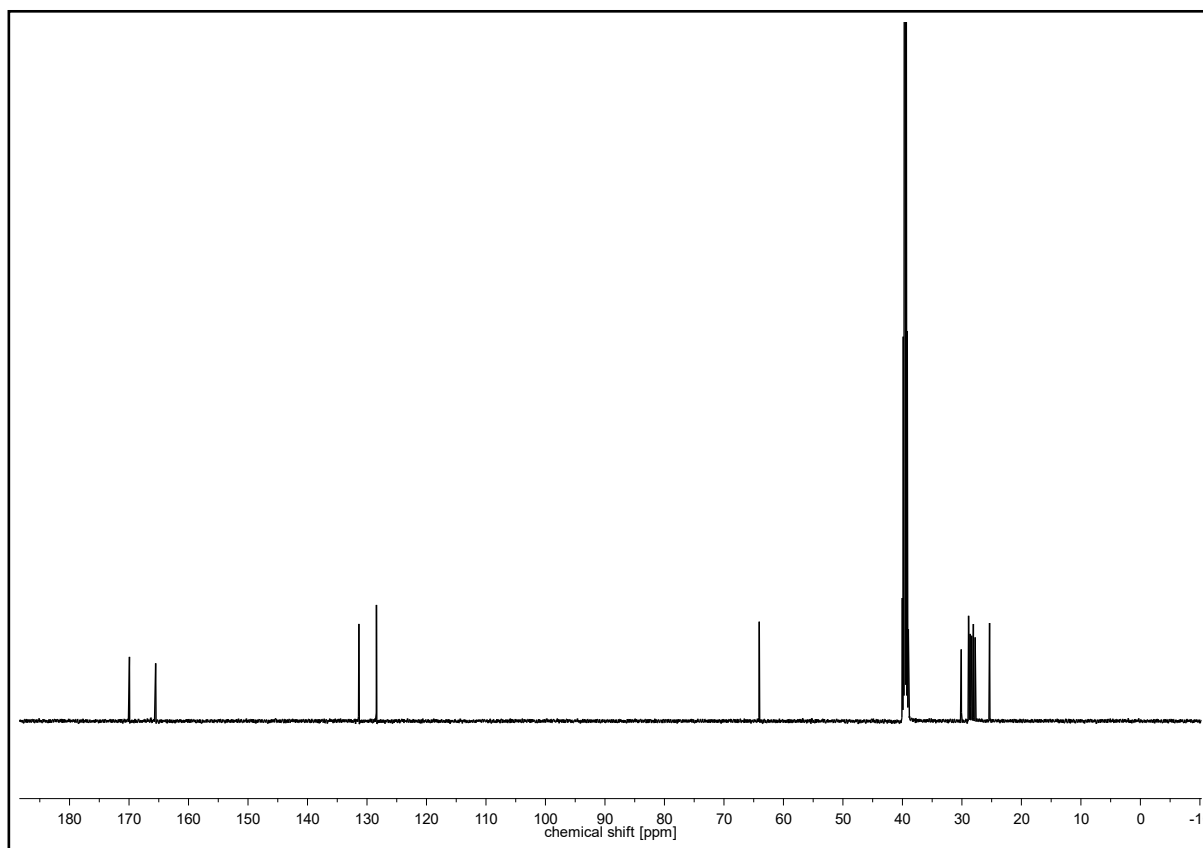


Figure SI 3: <sup>13</sup>C NMR spectrum of AUITB.



*Hydrogel preparation*

*Table SI 1: Composition of the hydrogel precursor solution for sample preparation, given in mass fractions of PEGDA ( $\beta_{\text{PEGDA}}$ ), AUITB ( $\beta_{\text{AUITB}}$ ) and the photoinitiator Irgacure 2959 ( $\beta_{\text{PI}}$ ).*

$\beta_{\text{PEGDA}}$ [wt%]	$\beta_{\text{AUITB}}$ [wt%]	$\beta_{\text{PI}}$ [wt%]
99.5	0.0	0.5
99.4	0.1	0.5
99.0	0.5	0.5
98.5	1.0	0.5
97.5	2.0	0.5
96.5	3.0	0.5

Zeta potential measurements of isothiuronium-functional hydrogels

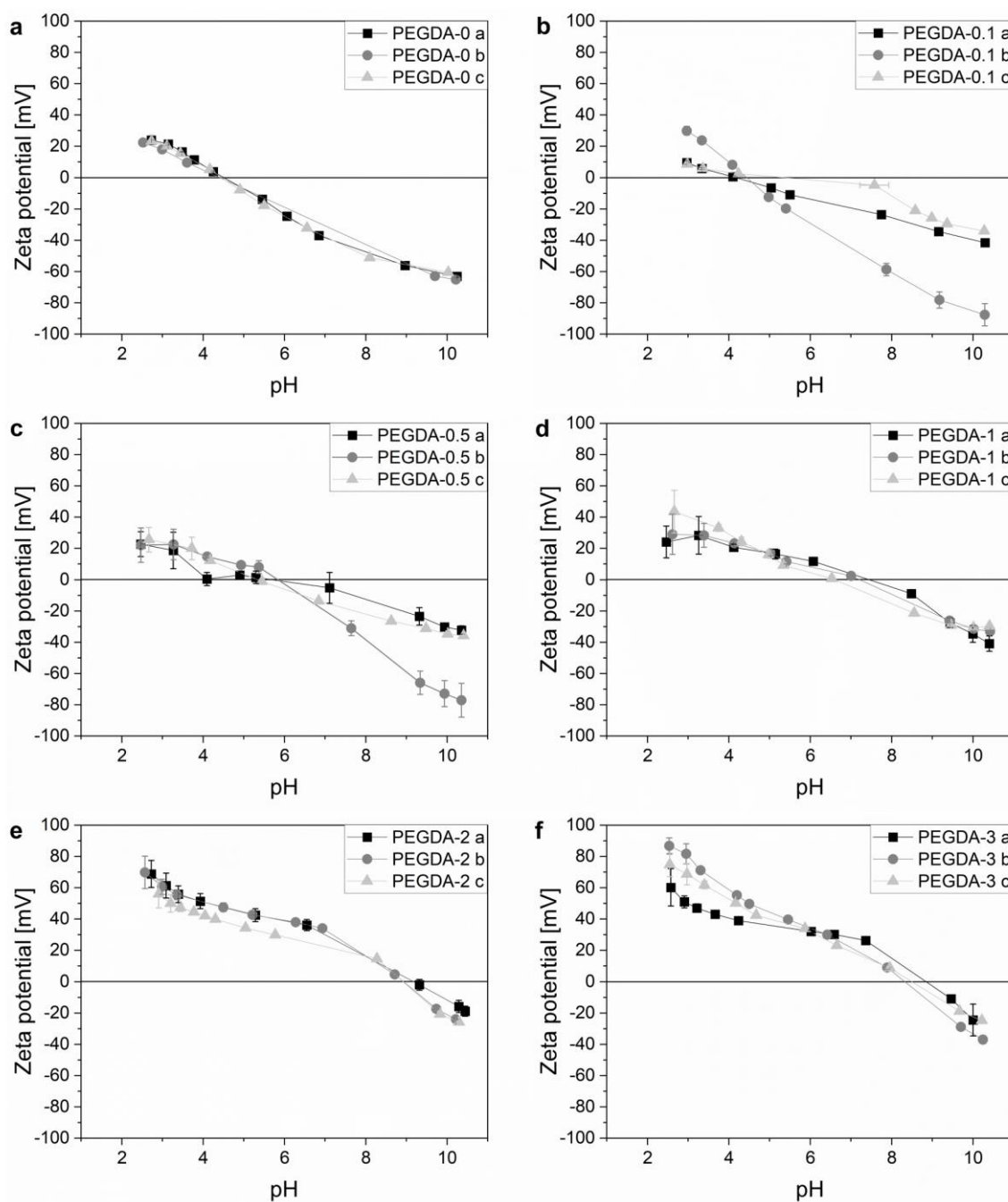


Figure SI 4: Zeta potential measurements of isothiuronium-functional hydrogels. The zeta potential as a function of the pH value is shown. a) PEGDA-0 hydrogels. b) PEGDA-0.1 hydrogels. c) PEGDA-0.5 hydrogels. d) PEGDA-1 hydrogels. e) PEGDA-2 hydrogels. f) PEGDA-3 hydrogels.

Surface energy of isothiuronium-functional hydrogels

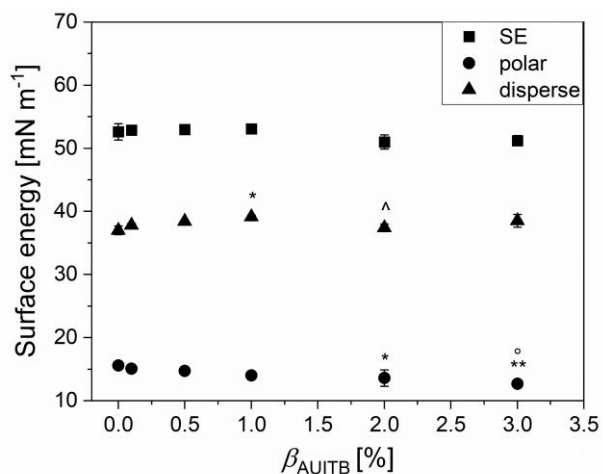


Figure SI 5: Surface energy of dry samples with its polar and disperse portions, measured with the sessile drop method ( $n = 3$ , PEGDA-2  $n = 4$ ). Explanation of symbols: \*\*/\* significantly different to PEGDA-0 ( $p < 0.01/0.05$ ), ° significantly different to PEGDA-0.1 ( $p < 0.05$ ), ^ significantly different to PEGDA-1 ( $p < 0.05$ ).

Evaluation of an antibacterial effect of isothiuronium-functional hydrogels

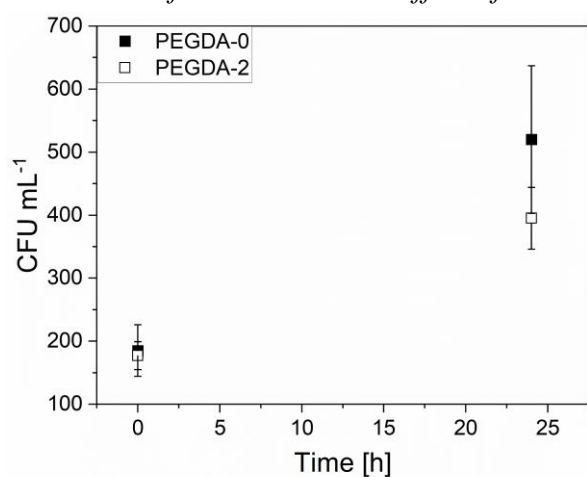


Figure SI 6: Colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of *E. coli* on PEGDA-0 and PEGDA-2 hydrogels after 0 h and 24 h sample contact ( $n = 2$ ).

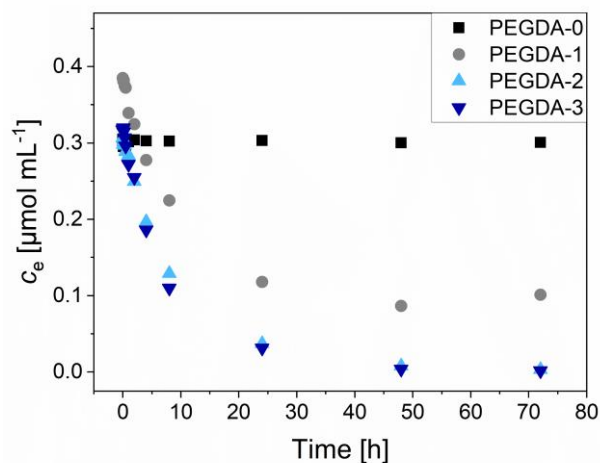
*Adsorption kinetics of diclofenac in isothiuronium-functional hydrogels*

Figure SI 7: Kinetics of diclofenac adsorption within isothiuronium-functional hydrogels. The diclofenac concentration  $c_e$  in the supernatant was measured at specific time points. After 72 h, equilibrium conditions were reached.

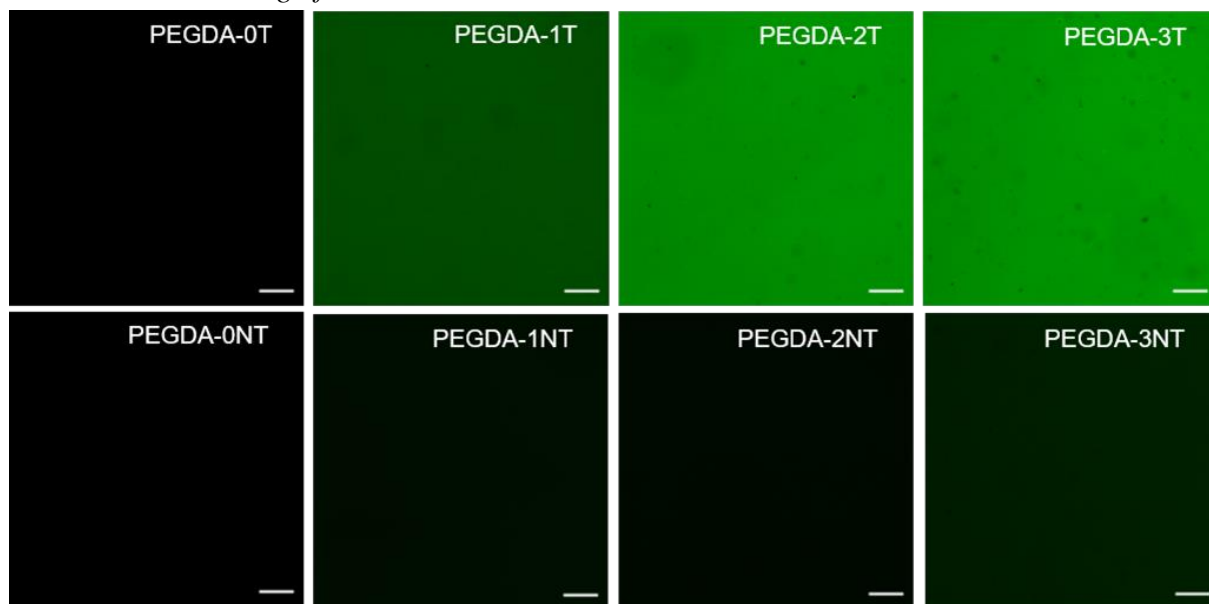
*Fluorescence staining of thiols*

Figure SI 8: Maximum intensity projections (MIP) of image stacks (z-stacks) recorded for fluorescence labelled hydrogels. Upper row: PEGDA-T hydrogels, samples treated with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Lower row: PEGDA-NT hydrogels, controls in water. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ .

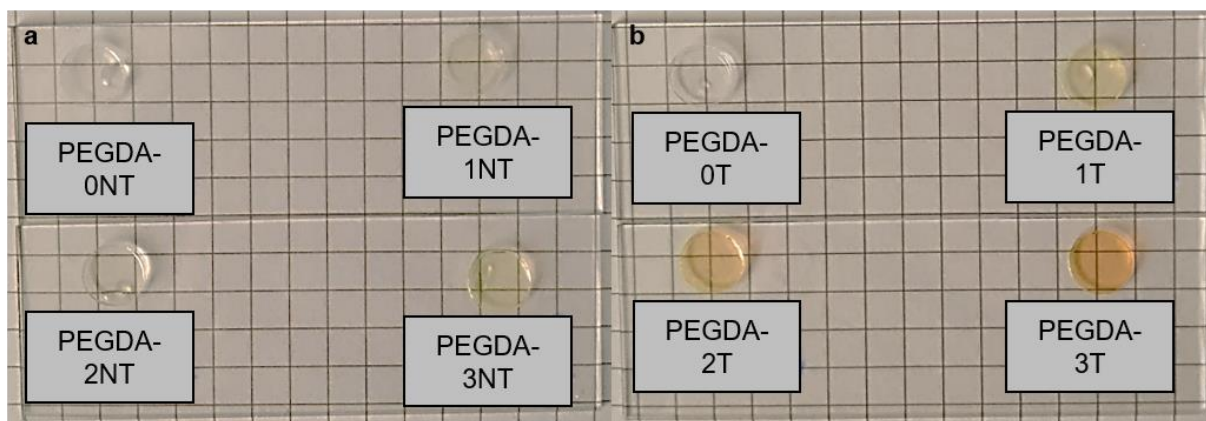


Figure SI 9: Photos of hydrogels after fluorescence staining. a) Non-treated PEGDA-NT hydrogels: PEGDA-0NT, PEGDA-1NT, PEGDA-2NT and PEGDA-3NT from upper left to lower right corner. b) Treated PEGDA-T hydrogels: PEGDA-0T, PEGDA-1T, PEGDA-2T and PEGDA-3T from upper left to lower right corner.

#### Substrate conversion on isothiuronium-functional hydrogels

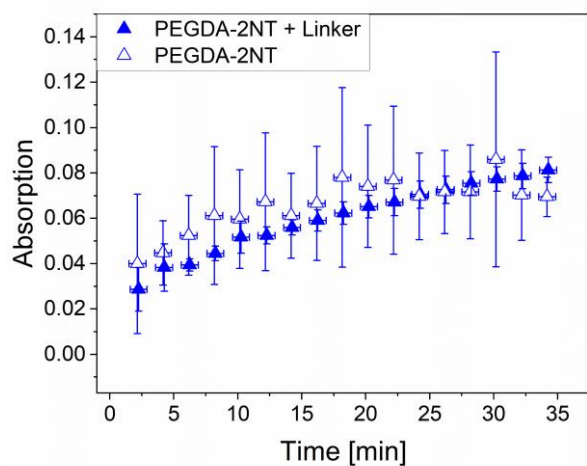


Figure SI 10: Absorption measurements of the ABTS substrate conversion on isothiuronium-functional hydrogels. Non-treated PEGDA-2NT hydrogels were agitated in a solution either with or without a maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker, and afterwards in a solution with streptavidin-coupled horseradish peroxidase.

## 4. Vernetzung von Hydrogelen aus methacryloylierter Gelatine mit 2-Photonen-Polymerisation

Die Ergebnisse und die Diskussion zu der Hypothese II.II sind in diesem Kapitel als Manuskript mit dem Titel „*Two-photon printing of arbitrary hydrogel structures using 3D beam shaping with high throughput rates*“ dargestellt. Dieses Manuskript wurde für eine Veröffentlichung in einer *peer-reviewed* Fachzeitschrift vorbereitet [236]. Darüber hinaus wird die Hypothese II.II in Kapitel 6.2 diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Arbeit angepasst. Die dadurch entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt des Manuskripts nicht verändert.

### 4.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

Ich habe diese Studie gemeinsam mit meinen Kollegen Alexander Peter vom Institut für Strahlwerkzeuge IFSW und Kai Hirzel vom Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme IBBS der Universität Stuttgart zum größten Teil eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem haben wir die praktischen Arbeiten durchgeführt. Beim letzten Versuchsdurchgang war ich an der Durchführung der Experimente nicht beteiligt. Mein Beitrag beinhaltet konkret (den letzten Versuchsdurchgang ausgenommen):

- Ich habe in der Regel die Drucklösungen aus methacryloylierter Gelatine (GM) hergestellt. Ich habe die Experimente am IFSW gemeinsam mit Alexander Peter durchgeführt und habe die Proben vor Ort vor- und nachbereitet.
- Die verwendete GM wurde von meiner Kollegin Anastasia Tsianaka gemeinsam mit mir synthetisiert und die NMR-Spektren ausgewertet.
- Ich habe Formen für die Vernetzung der GM-Drucklösung konzipiert.
- Die Versuche zum Quellgrad und der Gelausbeute der makroskopischen Hydrogele vom ersten Versuchsdurchgang wurden von mir durchgeführt.
- Ich habe Färbungen der gedruckten Hydrogele mit Methylenblau durchgeführt und habe die Aufnahmen am *Laserscanning*-Mikroskop von Kai Hirzel größtenteils begleitet.

Alle ermittelten Daten wurden von uns drei ausgewertet. Der weitaus größte Teil des Manuskripts wurde von uns geschrieben; konkret haben wir den Original-Entwurf des Manuskripts konzipiert und verfasst. Da ich beim letzten Versuchsdurchgang nicht teilgenommen und die dabei ermittelten Daten nicht ausgewertet habe, habe ich den Hauptteil der Einleitung und der Diskussion verfasst und federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren aufeinander abgestimmt und eingearbeitet.

## 4.2 Two-photon printing of arbitrary hydrogel structures using 3D beam shaping with high throughput rates

Alexander Peter<sup>1\*</sup>, Jana Grübel<sup>2\*</sup>, Kai Hirzel<sup>3\*</sup>, Stella Asmanidou<sup>4</sup>, Volkher Onuseit<sup>1</sup>, Günter E. M. Tovar<sup>2,5</sup>, Alexander Southan<sup>2,6</sup>, Andreas Michalowski<sup>1</sup>, Michael Heymann<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut für Strahlwerkzeuge IFSW, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 43, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>2</sup>Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>3</sup>Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems IBBS, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Germany. email: michael.hey mann@bio.uni-stuttgart.de.

<sup>4</sup>Institute of Cell Biology and Immunology IZI, University of Stuttgart, Allmandring 31, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>5</sup>Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>6</sup>Max Planck Institute for Intelligent Systems, Heisenbergstr. 3, 70569 Stuttgart, Germany. email: southan@is.mpg.de.

\*contributed equally

Vorbereitet für die Veröffentlichung in einer *peer-reviewed* Fachzeitschrift

#### 4.2.1 Abstract

2-photon polymerization (2PP) printing allows to generate structures with a below-micron resolution and finds many applications. However, achieving high-precision structures comes along with a major drawback by an extensive printing time, therefore limiting the economic utility of 2PP printing. Here, we present a method of 3D beam shape printing (3DBSP) resulting in higher printing rates than conventional direct laser writing (DLW). Using the same printing formulation, containing the biopolymer derivative gelatin methacryloyl (GM) and the photo initiator lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP), we compare the two approaches by printing a mouse lung tissue structure as complex and non-periodic target structure. For 3DBSP the intensity distribution in the GM solution was controlled with a spatial light modulator (SLM). With the 3D Iterative Fourier Transform Algorithm (3D-IFTA), 25 phase masks for the same target were optimized with different initial phases and were used sequentially. The chosen setup allowed a printing rate of  $19 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $1.5 \times 10^6 \text{ voxel s}^{-1}$ ) at 119 mW resulting in a printing time of 5 s for a  $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}^3$  tissue structure. Compared to this, with the DLW a printing rate of  $3.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $2.8 \times 10^3 \text{ voxel s}^{-1}$ ) at 60 mW was achieved. Although the printed pattern was not as precise as with the DLW, 3DBSP is a very promising approach for achieving high printing rates.

#### 4.2.2 Introduction

With 3D printing via 2-photon polymerization (2PP), resolutions of approx. 100 nm can be achieved [160]. This is why it is widely applied in many sectors, such as microrobotics [170], microoptics [171, 172], biosensing [173], micro/nanophotonics [174, 175], micro-electromechanical systems (MEMS) [176-178], microfluidics [179, 180] and tissue engineering (TE) [6, 166]. 2PP is a second order optical process in terms of intensity and therefore the process energy is supplied in the form of very short laser pulses in the femtosecond range and high intensities [160]. 2PP bases on the 2-photon-absorption mechanism that was first described theoretically by Göppert-Mayer in 1931 [272] and demonstrated experimentally later in 1961 by Kaiser and Garrett [273].

Using 2PP with the direct laser writing (DLW) method even enables to generate complex high-resolution printing of tissue analogues. As described in [274] and [6], a high-precision architecture of an *in vivo* mouse lung parenchymal alveolar structure using 2-photon stereolithography and a customized DLW dip-in printing setup could be generated from an aqueous protein-based printing solution marking today's state of the art in high-precision TE. In that study, the printed alveolar architecture reflected the complex, non-periodic microstructure of an *in vivo* mouse lung tissue structure and was used to evaluate the cellular behavior of primary human lung fibroblasts in a 3D architecture [6]. Hydrogel networks based on natural or synthetic polymers can serve as adequate 3D scaffolds to mimic the extracellular matrix (ECM) for cell cultivation [275-277]. Gelatin, obtained by the hydrolysis of collagen [73, 74], the main component of the ECM, is considered to be biocompatible and biodegradable and therefore used for various applications [28, 73]. It is agreed that gelatin still has the amino acid sequence arginine-glycine-aspartic acid (RGD) to promote cell adhesion [77-79]. By methacryl



modification of gelatin, generating gelatin methacryloyl (GM) [81, 82], it is possible to prepare chemically cross-linked hydrogels [9, 22, 23]. In this way, GM-based solutions can be radically cross-linked by UV light with a photo initiator and are therefore popular materials for bioprinting [5, 83]. Erben *et al.* already demonstrated the use of GM in combination with the photo initiator lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) for 2PP printing [6]. However, 2-photon lithography has a major drawback by the serious time-consuming printing process and therefore limits its use for economically deployed 3D printing in biomedical engineering. A significant increase in the printing rate is desirable in this case. Various approaches are currently being pursued to increase the printing rate and are based on spatial distribution of the energy by means of beam shaping. These include splitting the pulse energy into multi-spots [278-280] or the use of non-defracting beams [281]. However, both approaches are limited in terms of beam shape and are unsuitable for printing non-periodic and complex structures. Another approach covers a wide range of applications by allowing the intensity distribution to be shaped arbitrarily in two dimensions and is scanned one-dimensionally [282]. In this contribution, we use a 2PP printing process by means of 3D beam shaping, hereinafter referred to as “3D beam shape printing” (3DBSP), as a possible approach to print 3D structures faster than the conventional DLW method. A mouse lung tissue structure [6, 274] was printed with both methods as we want to compare the printing rate, its deviation to the predetermined structure and the adhesion of adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells on the printed structures. In our biocompatible printing formulation, GM was used as biopolymer and cross-linked with LAP as photo initiator.

#### 4.2.3 Materials and Methods

##### *Materials*

The following chemicals were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany): 3-(trimethoxysilyl) propylmethacrylate, 4',6-diamidino-2-phenyl-indol (DAPI), lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP), methacrylic anhydride, paraformaldehyde (PFA), poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA), phosphate buffered saline (PBS), sodium hydroxide. Following chemicals were purchased from Thermo Fisher Scientific (Dreieich, Germany): Culture-medium RPMI1640, penicillin/streptomycin, Invitrogen™ Alexa Fluor™ 633 Phalloidin. Other chemicals were purchased by following companies, given in parentheses: methylene blue (S3 Chemicals, Bad Oeynhausen, Germany), ethanol and acetone (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), fetal calf serum (FCS, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany). Gelatin (type B, lamed bovine bone, 232 Bloom) was kindly provided by GELITA GmbH (Eberbach, Germany). A549 cells (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) were kindly provided by the Institute of Cell Biology and Immunology (IZI, University of Stuttgart).

##### *Synthesis of gelatin methacryloyl and preparation of the printing formulation*

Gelatin methacryloyl (GM) was synthesized based on a protocol described before [283]. In short, 25.0 g gelatin were dissolved in 250 mL deionized water at 40 °C. The pH was adjusted to 7.25 using an automatic titration device. 13.5 g methacrylic anhydride were added slowly, corresponding to a 10-fold molar excess relative to free amino groups in gelatin [82], leading

to a GM with a high degree of methacrylation (DM). The reaction mixture was stirred for 5 h and the pH was adjusted to 9.5 afterwards. The mixture was filtrated, kept at 4 °C for two days and the pH was adjusted to 9.5 again. The mixture was filtrated with a bottle top filter and dialyzed with deionized water for four days at room temperature. Afterwards, the pH was adjusted to 8.5 and the solution was lyophilized. The DM was determined with  $^1\text{H}$  NMR according to Claaßen *et al.* [283]. GM batches with a DM of  $(0.797 \pm 0.015)$  mmol g $^{-1}$ ,  $(0.869 \pm 0.034)$  mmol g $^{-1}$  and  $(1.137 \pm 0.023)$  mmol g $^{-1}$  were used. A representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum of GM is shown in Figure SI 11.

GM and the photo initiator LAP were dissolved in PBS at mass fractions of 25 wt% and 2 wt% to prepare a printing formulation. The printing formulations were kept under the protection of light before experiments and prepared freshly for each experiment.

#### *Measurement of LAP cleavage*

For the characterization of the laser-induced cleavage of LAP, the initial reaction rate  $r_0$  of LAP cleavage was measured as a function of the incident light intensity  $I_i$ , and was defined as:

$$r_0 = -\frac{1}{[LAP]_0} \cdot \left( \frac{d[LAP]}{dt} \right)_{t=0} \quad (10)$$

Here,  $[LAP]$  is the LAP concentration,  $[LAP]_0$  is the initial LAP concentration and  $t$  is the irradiation time. For a cleavage induced by 2-photon absorption, the cleavage reaction should follow a pseudo-first order reaction kinetics defined by the 2-photon reaction cross-section  $\Omega_{LAP}$  and the light intensity  $I_i$ :

$$[LAP](t) = [LAP]_0 \cdot e^{-\Omega_{LAP} \cdot I_i^2 \cdot t} \quad (11)$$

With equation 10, the initial reaction rate  $r_0$  then is:

$$r_0 = \Omega_{LAP} \cdot I_i^2 \quad (12)$$

For a 2-photon induced LAP cleavage,  $r_0$  therefore must be proportional to  $I_i^2$ .

The values for  $r_0$  were measured by irradiation of 1 mL of LAP solutions in PBS with  $[LAP]_0$  of 20 mg mL $^{-1}$  in Quartz glass cuvettes (path length 1 cm) with different laser intensities  $I_i$ . Irradiation times were chosen so that the overall LAP conversion was below 5 %. The change of  $[LAP]$  was measured by high performance liquid chromatography (HPLC). The laser spot had a Gaussian intensity distribution with a full width at half maximum of 3.2 mm. The irradiated volume therefore was 80  $\mu\text{L}$ , being a fraction of 8 % of the solution volume. In order to ensure a homogenous  $[LAP]$  throughout the experiment, the solution was stirred with a magnetic stirrer bar.

#### *Curing of macroscopic hydrogels and their characterization*

Macroscopic hydrogels were irradiated with a TopHat beam shape of 0.5 x 3 mm $^2$ . The experimental setup is shown in Figure SI 12. The TopHat was moved with an offset of 100  $\mu\text{m}$  to the next scanning line. Three different theoretical irradiation doses were realized by using different laser powers and scan speeds to print the hydrogels (Table SI 2). For reference purposes, samples were also cured by one-photon polymerization in a UV cabinet (sol2, Dr. Hönle AG, spectral range > 300 nm) for 5 minutes with an intensity of 50 mW cm $^{-2}$ . After irradiation, cured hydrogels with a diameter of 10 mm and a thickness of 1 mm were obtained. Cured hydrogels were weighed directly after their preparation for their initial mass  $m_0$ . Cured

hydrogels were stored in water between 48 h and 72 h before further characterization. After this time, the surfaces of the swollen hydrogels were blotted dry with filter paper and the hydrogels were weighed for their swollen mass  $m_s$ . Then, the hydrogels were dried under reduced pressure (50 mbar) for 72 h and weighed again for their dry mass  $m_d$ . Gel yield  $Y$  and equilibrium degree of swelling  $EDS$  were calculated as follows with  $\beta_0$  as the mass fraction of polymerizable compounds in the printing formulation:

$$Y = \frac{m_d}{m_0 \cdot \beta_0} \quad (13)$$

$$EDS = \frac{m_s}{m_d} \quad (14)$$

The polymer volume fraction  $\phi$  in the hydrogels was calculated assuming additivity of volumes with the densities  $\rho_{H_2O} = 1 \text{ g mL}^{-1}$  and  $\rho_{GM} = 1.3 \text{ g mL}^{-1}$  of water and GM, respectively:

$$\phi = \frac{\frac{m_d}{\rho_{GM}}}{\frac{m_s - m_d}{\rho_{H_2O}} + \frac{m_d}{\rho_{GM}}} \quad (15)$$

Hydrogel stiffness was assessed by rheology. For this purpose, cylindrical samples with a diameter of 8 mm were punched out of the hydrogels. The resulting specimens were subjected to a strain sweep in an Anton Paar MCR 301 rheometer in a plate-plate configuration. Strains were varied between 0.01 % and 10 % with a constant normal force of 0.16 N. Storage moduli  $G'$  and loss moduli  $G''$  were obtained by averaging over the low strain data between 0.01 % and 0.1 %.

#### *Optical setups and printing procedures*

Figure 4 shows two setups which were used to print the mouse lung tissue structure with both methods for comparison. The left-hand side shows the basic operating principle of a conventional DLW process. The reference structures were fabricated with the commercially available “Photonic Professional GT2” (Nanoscribe GmbH) using 3D STL files of reference structures and lung tissue alveolar section [6, 274]. The virtual model of this mouse lung tissue structure was sliced horizontally to generate a 60  $\mu\text{m}$  thick structure slice to decrease printing duration. A numerical aperture (NA) of 0.8 using an immersed 25x objective, typical laser scan speed ranges from 1,000  $\mu\text{m s}^{-1}$  to 30,000  $\mu\text{m s}^{-1}$ , center wavelength around 780 nm, average output power < 180 mW, pulse duration of 100 fs and repetition rate of 80 MHz were applied. The lung tissue structure was printed with 60 mW average power and a scan speed of 12,500  $\mu\text{m s}^{-1}$ . Prior to the printing process, the cover glasses were coated with the silane 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate to ensure proper attachment of printed structures on the glass surface. Cover glasses were immersed in 60 mL ethanol with 300  $\mu\text{L}$  silane for at least 10 min and washed afterwards with acetone. In order to print the mouse lung tissue structure on the silanized cover glass, 20  $\mu\text{L}$  of the printing formulation were pipetted directly on top of the objective and 20  $\mu\text{L}$  on top of the cover glass. In dip-in mode both volumes connected and built a single printing formulation phase. Resulting structures were extensively rinsed with deionized water post-printing.

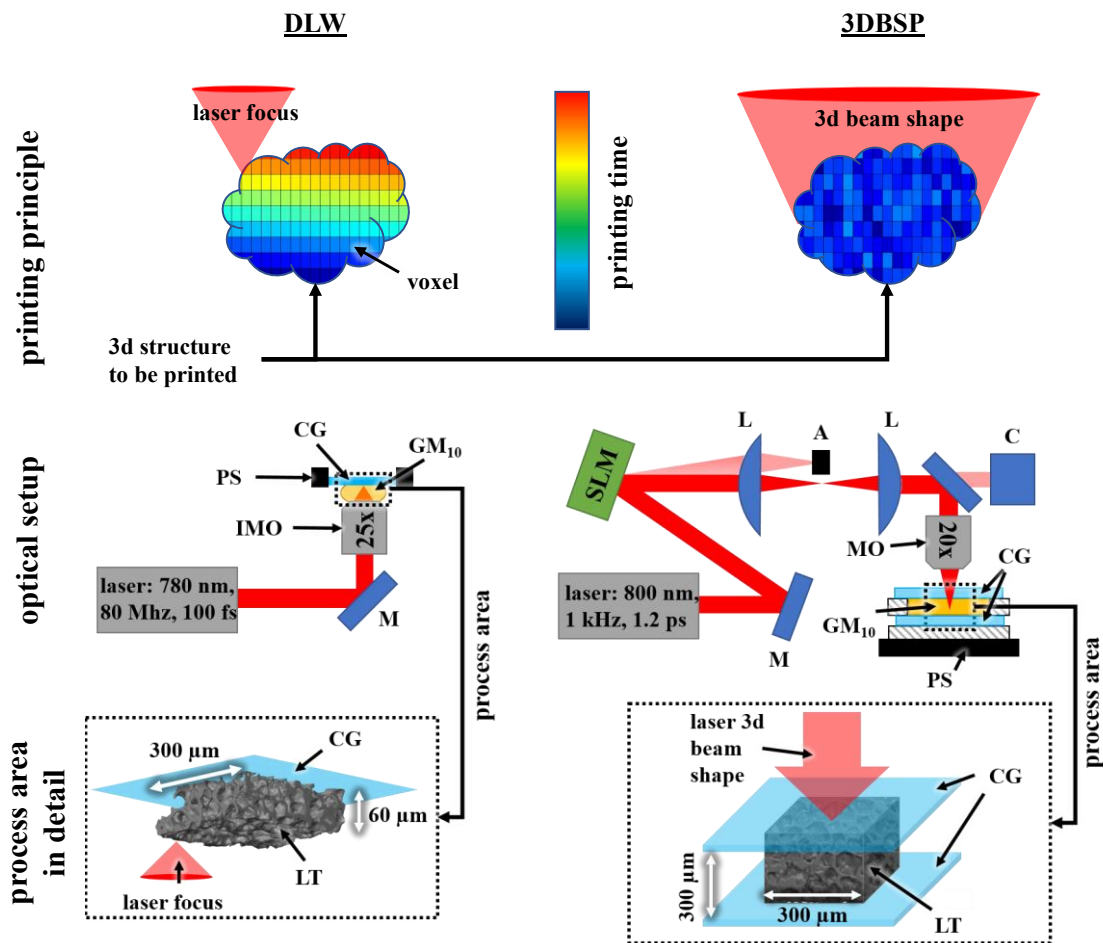


Figure 4: Illustration of the printing principle, used optical setup and process details for the two 2PP procedures, the DLW and 3DBSP. CG: cover glass, PS: piezo stage, IMO: immersed microscope objective, MO: microscope objective, M: mirror, L: lens, A: aperture, C: camera, LT: lung tissue to be printed.

The basic functional principle of the experimental setup for the 3DBSP process is shown in Figure 4 (right). The central component here is a spatial light modulator (SLM) which makes it possible to flexibly adjust the intensity distribution of the focused beam within certain limits. The laser used was the “Spitfire” (Spectra Physics), the parameters for the experiments were a repetition rate of 1 kHz, a wavelength of 800 nm, a pulse duration of 1.2 ps (FWHM), a beam quality factor of  $M^2 = 1.2$  and an output beam diameter of 10 mm. The SLM used for the experiments was the X13139-02 reflective phase modulator from Hamamatsu with 1024x1280 pixels and a pixel pitch of 12.5 μm. To generate the spatial intensity distribution, the SLM was imaged with a 4f configuration using a 5:3 telescope (focal lengths 500 mm and 300 mm) and this image plane was focused within the hydrogel using a microscope objective (Nikon LU Plan ELWD 20x/0.4 A EPI) in a 2f configuration. An aperture in the focal plane between the lenses of the telescope was used to block the zeroth order in such a way that only the desired phase modulated part of the laser radiation was used. The 3D intensity distribution in the area of the focus resulting from the phase modulation was checked with a movable camera in the axial direction, as shown in the figure. With the used optical setup, a numerical aperture of  $NA = 0.32$  was achieved, resulting in a theoretical voxel size of about 1.2 μm in lateral and 9 μm in axial direction. More details on the experimental setup and the optimization procedure are described

in [284]. A volume with the dimensions  $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}^3$  containing the GM hydrogel could be irradiated with a single pulse which was limited by two cover glasses with a distance of  $300 \mu\text{m}$ . To preserve the adhesion of the cured GM hydrogel structures the lower cover glass was silanized the same way as for the DLW experiments.

The phase masks for the SLM to obtain the desired intensity distribution were calculated using the 3D-IFTA algorithm [285]. In order to minimize the speckle effect caused by the coherent illumination of the SLM, which leads to deviations in the generated intensity distribution, the multi-exposure technique [286] with 25 phase masks was used.

### *Cell colonization of the lung tissue structures*

Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial A549 cells were cultivated in growth media supplemented with 10 % FCS in a humidified cell culture incubator at  $37^\circ\text{C}$  and 5 %  $\text{CO}_2$ . Colonization of A549 cells on GM lung tissue structures printed on glass coverslips were performed by adding a 5 mL cell suspension of  $500,000 \text{ cells mL}^{-1}$  in growth medium containing 1 % penicillin/streptomycin on top of the structures inside a 35 mm petri dish. Prior to cell seeding, the well plates were coated with polyHEMA solution to prevent cell adhesion around printed structures. Three or seven days after cell seeding, A549 cells colonizing the lung tissue structure, were fixed with 4 % PFA, permeabilized with 0.1 % Triton-X100, and subsequently stained with Phalloidin-AF546 and DAPI.

### *Imaging using confocal laser scanning microscopy*

Lung tissue structures and A549 cells were imaged using a confocal laser scanning microscope (20x/0.45 air / 63x/1.40 oil DIC objective, LSM710, Zeiss) according to a method described by Dehli *et al.* [85]. Confocal images and z-stack images including transmitted-light, and 405 / 546 / 633 nm channels were processed and rendered using the software ZEN-blue (Zeiss).

## 4.2.4 Results

### *Determination of the parameters for the printing process*

Before printing with 3DBSP, the irradiation parameters necessary to obtain cured hydrogels from the liquid printing formulations by a 2PP process were investigated. In a first step, the photocleavage of the initiator LAP was analyzed using the same laser source as for the 3DBSP experiments described below in order to verify its decomposition by a two-photon absorption process. For this purpose, LAP solutions were irradiated with different laser intensities. Figure SI 13 shows the initial reaction rate  $r_0$  against the laser power  $P$ . A slope of the linear regression of the double logarithmic plot of 2.02 was found.

In a second step, macroscopic hydrogels were prepared to test different irradiation doses between  $1.3 \times 10^{13} \text{ W}^2 \text{ s cm}^{-4}$  and  $2.9 \times 10^{13} \text{ W}^2 \text{ s cm}^{-4}$  for curing of the printing formulations (Table SI 2 and Figure SI 12). Generally, at all tested irradiation doses, macroscopic hydrogels were obtained by 2PP induced curing, see photos depicted in Figure SI 14. Higher irradiation doses resulted in lower  $EDS$ , higher  $Y$  and higher  $G'$  values (Figure SI 15), as can be expected for a progressing cross-linking reaction. Compared to reference hydrogels prepared by 1PP induced curing, all hydrogels prepared by 2PP induced curing had higher  $EDS$ , lower  $Y$  and

lower  $G'$ . However, a clear correlation between  $G'$  and  $\phi$  was observed for all hydrogels, including the 1PP reference (Figure SI 15).

### 3D beam shape

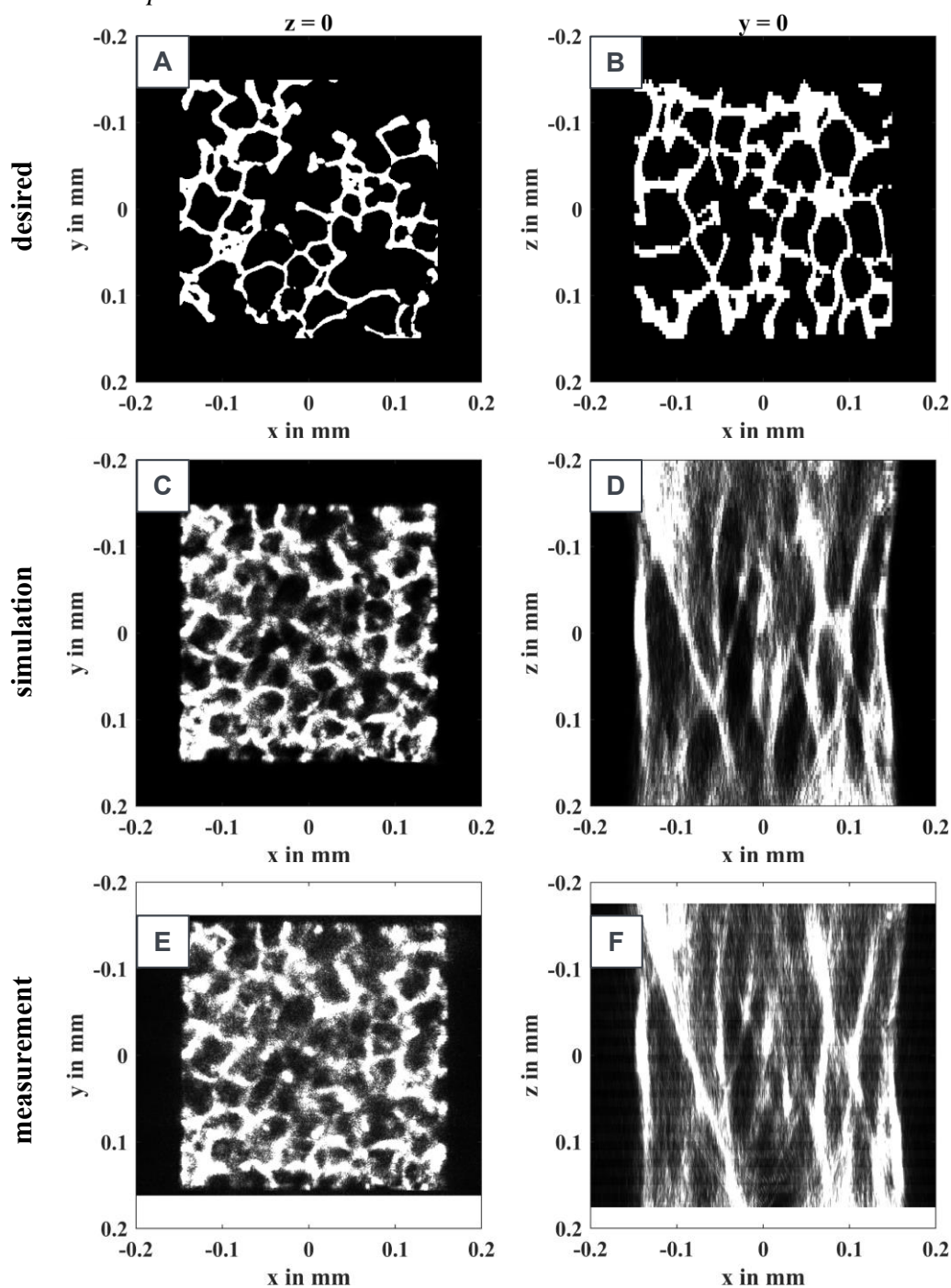


Figure 5: Comparison of target lung tissue structure, simulated and measured exposure dose distribution of the 3DBSP. The beam propagates in  $z$  direction. A) cross section of the target at  $z = 0$ . B) cross section of the target at  $y = 0$ . C) cross section of the simulated exposure dose at  $z = 0$ . D) cross section of the simulated exposure dose distribution at  $y = 0$ . E) cross section of the measured exposure dose at  $z = 0$ . F) cross section of the measured exposure dose distribution at  $y = 0$ . Scale is limited to  $3 \times 10^{13} \text{ W}^2 \text{ s cm}^{-4}$ , corresponds to the maximal degree of cross-linking. Dose distribution corresponds to 119 mW laser power.

In order to estimate the printed structure by exposing with the 25 intensity distributions, the exposure dose distribution was calculated. The 2PP exposure dose distribution  $E_e(x, y, z)$  consists of the summation of the 25 radiation beam shapes, each of them being exposed with a duration of  $t_e$ . The beam shapes are described as three-dimensional intensity distributions  $I_i(x, y, z, t)$ , which depend on the time  $t$  corresponding to the ultrashort pulses:

$$E_e(x, y, z) = \sum_{i=1}^{25} \int_{t_i}^{t_i+t_e} I_i^2(x, y, z, t) dt \quad (16)$$

The intensities have a quadratic influence in the process and are numbered consecutively with the index  $i$ .  $t_i$  stands for the start time of each beam shape.

Figure 5 shows the comparison of the target tissue structure, the calculated and the measured exposure dose distribution applied in the printing formulation with 3DBSP. With an exposure dose of  $3 \times 10^{13} \text{ W}^2 \text{ s cm}^{-4}$ , the maximal degree of cure was achieved in the exposure study (see Supplementary). Despite some kind of background light, the measured dose distribution is in clearly good agreement with the simulations.

However, the simulated and actual dose distributions differ considerably from the target distribution, with the difference along the propagation direction  $z$  being particularly obvious. Despite this large difference in the expected printing result, structures were produced to investigate how they behave in terms of cell adhesion.

### *3D visualization of printed structures and adhesion of human adenocarcinoma lung cells*

By different combinations of laser intensity and exposure times from 50 ms to 200 ms per phase mask, structures with different degrees of cross-linking could be generated by 3DBSP. With this method an array was generated which displayed well the variety of structures from being cured too less or too much with structures having sufficient resolution in  $z$ -direction in between (Figure 6, top left). Structures with low curing degree were too fragile to be stained and evaluated with the LSM. Structures that were cured too much almost showed no variation in  $z$ -direction. This is most likely due to the large voxel size in the propagation direction.

The best results of the manufactured structures were obtained at an average power of 119 mW, an exposure time of 150 ms for each of the 25 phase masks with a pause for switching of 50 ms. With these settings the printing procedure of one  $300 \times 300 \times 300 \mu\text{m}^3$  tissue took about 5 seconds.

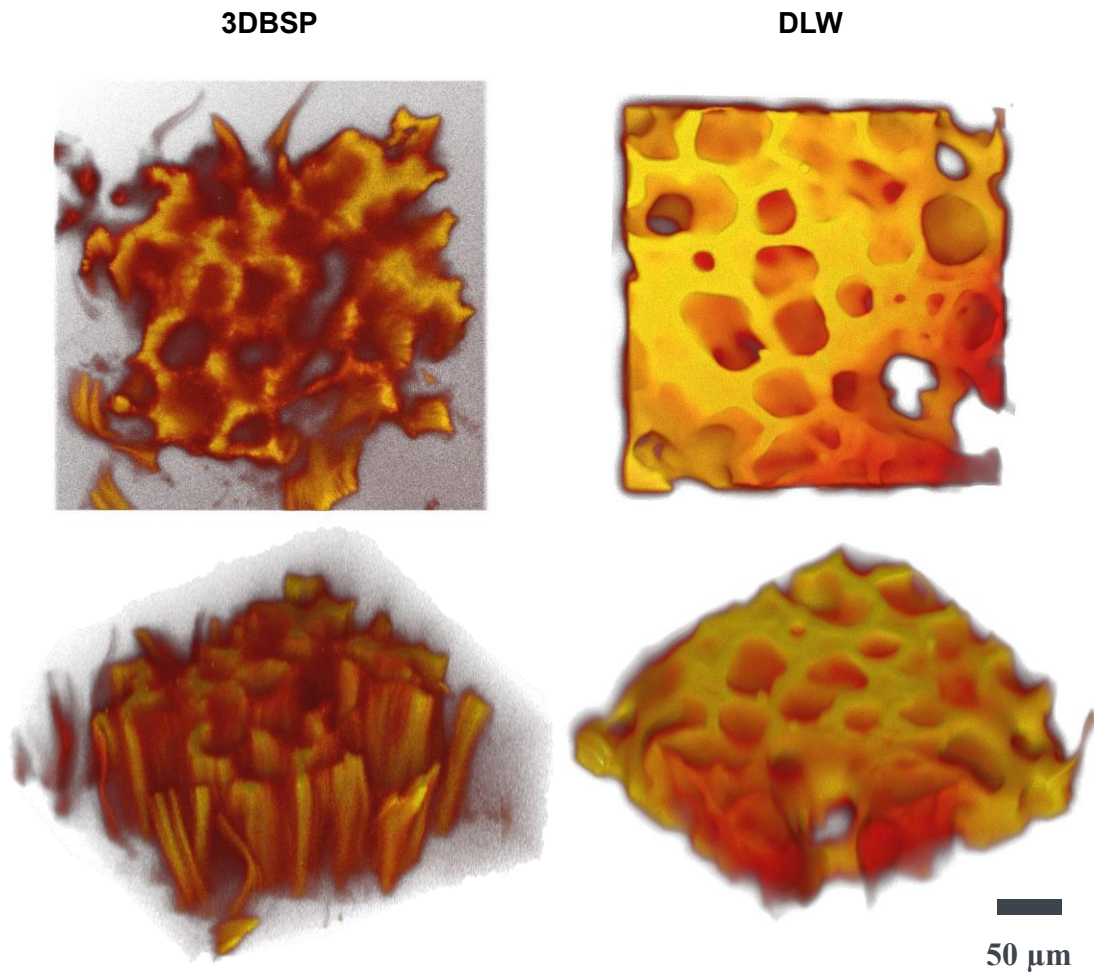


Figure 6: 3D visualization of the printed structures with both methods stained with methylene blue post-printing (633 nm).

For proof of principle experiments A549 cells were seeded on DLW and 3DBSP printed structures. After seven days of colonization, they were fixed and stained. For DLW printed structures a uniform distribution of the cells in the 3D structure of approx. 80  $\mu\text{m}$  depth was determined by staining the cell nuclei with DAPI. As shown by immunofluorescence staining for DAPI and phalloidin, A549 cells evenly colonized the structure surface as well as penetrating and colonizing the alveolar channel inlets showing a spreaded cell morphology. For 3DBSP structures printed with 119 mW laser power the resolution was good enough for the structure to be also colonized by the cells in z direction (Figure 7).



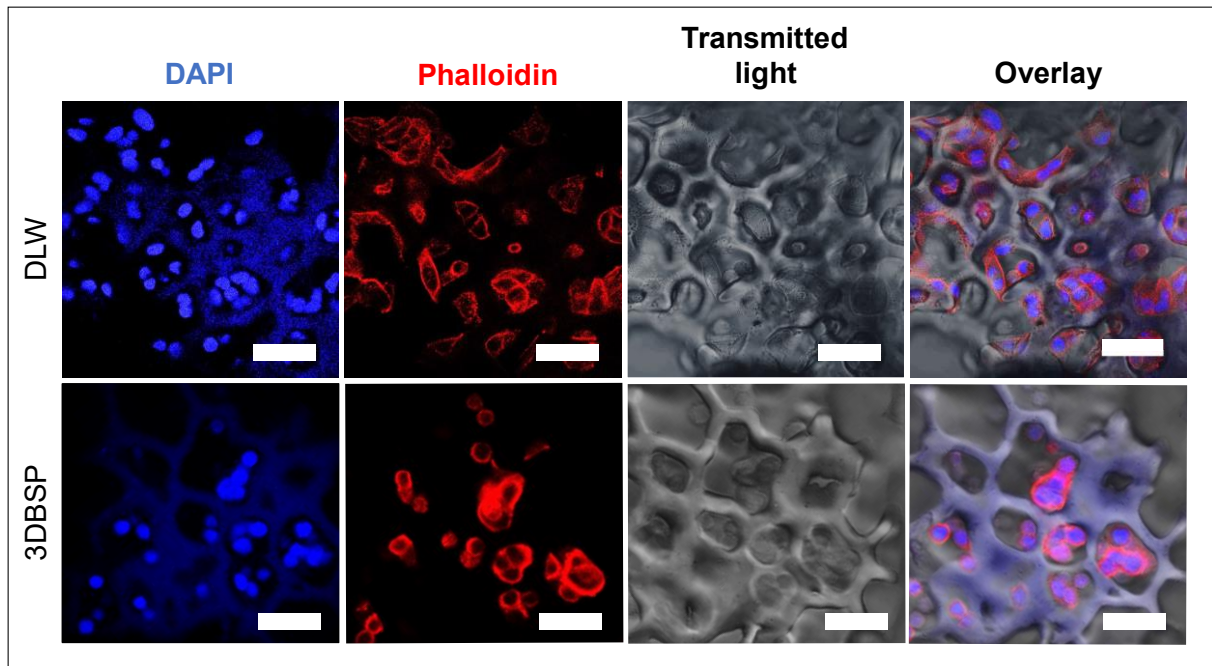


Figure 7: Visualization of the 2PP printed lung tissue structures with subsequent colonization with A549 cells. Cells were fixed and stained 7 days after cell colonization. Cell nuclei were visualized using DAPI staining. Visualization of the actin cytoskeleton using phalloidin staining. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.5 Discussion

In this work, we have introduced a printing-rate scaled printing method for fast curing rates in two-photon printing using aqueous-based biological solutions. Concerning the printing process, according to equation 12 a linear regression of  $\log(r_0)$  against  $\log(I_i)$  should result in a line with a slope of 2 and a y-intercept of  $\log(\Omega_{\text{LAP}})$ . The slope of the linear regression in Figure SI 13 therefore confirms a 2-photon induced cleavage of the photo initiator LAP. Additionally, the characterization data of the macroscopic hydrogels demonstrate that by adjusting the irradiation dose, hydrogel properties can be adjusted by 2PP induced curing in a similar way as for 1PP induced curing. To assess the quality of the 3DBSP process the same lung tissue structure was also printed with commercially available DLW. In contrast to the DLW, with the 3DBSP the whole depth of the printing formulation was exposed to the laser. Due to the multiple exposure of the simultaneously irradiated volume, it can be assumed that the wavefront will be disturbed by already cured areas, which will lead to deviations in the produced structure. With the 3DBSP method, a printing speed three orders of magnitude higher than with the DLW method was achieved (DLW:  $3.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $2.8 \times 10^3 \text{ voxel s}^{-1}$ ) at 60 mW; 3DBSP:  $19 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $1.5 \times 10^6 \text{ voxel s}^{-1}$ )). If the structures actually achieved with 3DBSP ultimately meet the requirements despite the deviations from the target geometry, it may represent an interesting option in the production of tissue structures.

One of the critical steps in modern TE applications is the translation of a 3D-printed biocompatible scaffold architecture to a 3D-colonized one. Hence, a bio-based printing formulation should be favored over a typical photo resist. It was reported before that GM solution can be applied in 2PP and that the printed microstructures are suitable for cell cultivation [164, 167, 168]. In order to evaluate the beforehand described printing formulation

used as well as the complex lung tissue structure for cell compatibility, resulting structures were colonized with A549 cells post-printing. A549 cells have similarities to type II pulmonary epithelial cells in morphology as well as in metabolic properties [287]. Similar to our approach Shrestha *et al.* printed microstructures via 2PP with the methacrylated biopolymers collagen, gelatin, hyaluronic acid (HA) and a mixture of gelatin and HA [166]. Using a printing formulation based on a biopolymer derived from the extracellular matrix is a promising approach since it was reported before that printed scaffolds based on bovine serum albumin were coated with fibronectin to enhance cell adhesion [6, 165]. We used a similar printing formulation as Erben *et al.* with 25 wt% GM [6]. In their case a printing formulation with rose bengal (RB) as a photo initiator was tested and they found a strong auto-fluorescence of the structures and that the cell adhesion of primary human lung fibroblasts (phLFs) on the scaffolds increased after a coating with fibronectin. In order to avoid the strong auto-fluorescence they substituted RB by LAP and assessed the biocompatibility of the printed scaffolds after a fibronectin coating with different cell types. In our experiments, an additional coating of the 3D printed structures did not seem to be necessary since a good cell adhesion and a distribution inside the structure was observed. It can be assumed that the lung tissue structures were washed sufficiently after the printing to remove residual photo initiator. Since RB was not in the printing formulation, an interference with the fluorescence staining of the cells could be excluded.

### 4.2.6 Conclusion

In this contribution, we investigated the possibilities of using 3DBSP to increase printing rates of 2PP printing. We compared this method with the conventional DLW method and printed a lung tissue structure with the biopolymer derivative GM. With 3DBSP a printing rate of  $19 \times 10^6 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $1.5 \times 10^6 \text{ voxel s}^{-1}$ ) could be achieved, which is three orders of magnitude more than with conventional DLW with a printing rate of  $3.2 \times 10^3 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$  ( $2.8 \times 10^3 \text{ voxel s}^{-1}$ ). Despite the considerable deviation of the printed geometry from the desired geometry, the cell tests yielded comparable results. This means that the structures printed with 3DBSP can fulfill the requirements for cell matrices.

### Acknowledgements

Part of this research was funded by the Ministry of Science, Research and Arts of the Federal State of Baden-Württemberg and the University of Stuttgart within the High-Performance Center for Mass Personalization in Stuttgart. The considered laser source was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation) – INST 41/1031-1 FUGG. J.G. thanks the PhD scholarship of the Evonik Foundation (Essen, Germany) for funding. The authors kindly thank Prof. Monilola Olayioye (Institute of Cell Biology and Immunology IZI, University of Stuttgart) for the possibility to perform cell experiments. The authors thank Dr. Birgit Claaßen (Institute of Organic Chemistry, University of Stuttgart) and her group for NMR measurements. The authors thank the mechanical workshop (Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart) for the construction of several molds. The authors kindly thank Pinar Koca (IGVP, University of Stuttgart) for support and supply of one GM batch and Anastasia Tsianaka (IGVP, University of Stuttgart) for the collaboration with the GM synthesis. The authors thank Maria Zyrianova

(IGVP, University of Stuttgart) for her support with cell experiments. The authors kindly thank Amelie Erben (Center for Applied Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Munich University of Applied Sciences) for the stl-file of the mouse lung tissue structure. The authors thank the University of Stuttgart (Stuttgart) and the Fraunhofer Gesellschaft (Munich) for providing the infrastructure. The work was partially funded by the Max Planck Society.

#### 4.2.7 Author Contributions

Conceptualization: A.S., M.H., A.P., J.G., K.H., V.O. Methodology: A.P., J.G., K.H., A.S., M.H. Investigation: A.P., K.H., J.G., S.A. Visualization: A.P., K.H., J.G. Writing – original draft: A.P., J.G., K.H. Writing – review & editing: A.S., G.E.M.T., M.H., S.A., V.O., A.M. Supervision: A.S., G.E.M.T., A.M., M.H.

## 4.2.8 Supporting Information

### $^1\text{H}$ NMR of gelatin methacryloyl

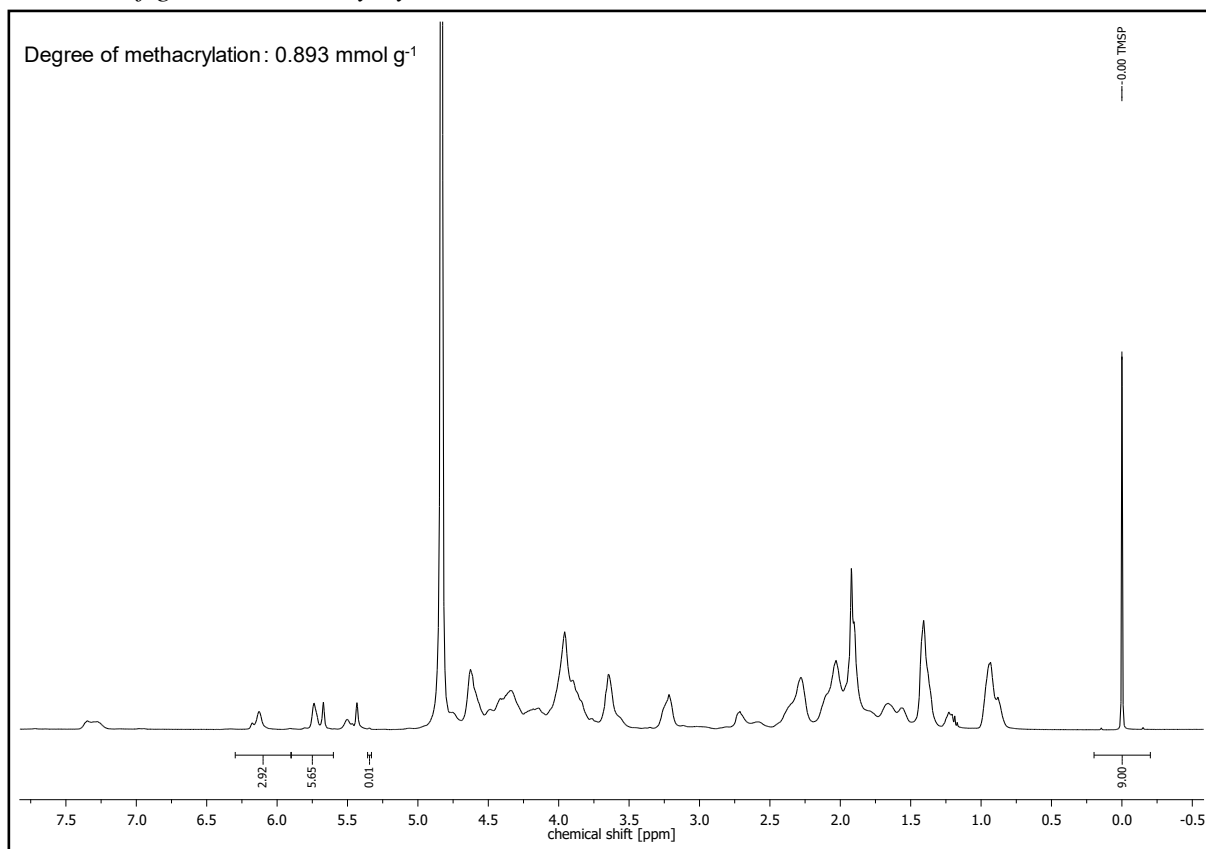


Figure SI 11: Representative  $^1\text{H}$  NMR spectrum of gelatin methacryloyl (GM) used in this study.

### Irradiation setup and parameters for curing of macroscopic hydrogels

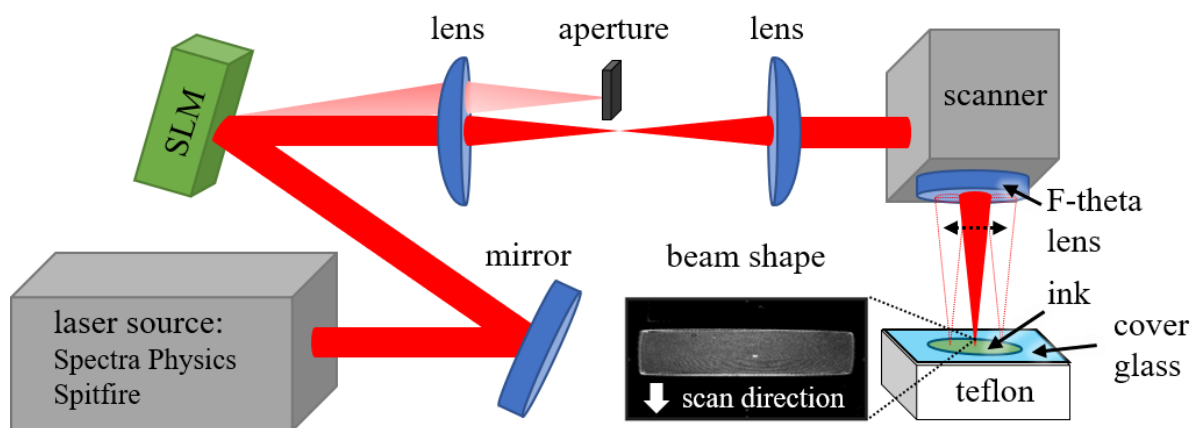


Figure SI 12: Printing setup for printing macroscopic hydrogels. The GM solution in a teflon mold was irradiated by a 800 nm laser with a TopHat beam shape.

Table SI 2: Theoretical irradiation doses by variation of laser power  $P$  and scan speed  $v$ .

Laser power $P$ [W]	Scan speed $v$ [mm s <sup>-1</sup> ]	Irradiation dose [W <sup>2</sup> s cm <sup>-4</sup> ]
1.7	3	1.3x10 <sup>13</sup>
2.38	5.9	1.3x10 <sup>13</sup>
3.06	9.75	1.3x10 <sup>13</sup>
1.7	1.9	2.1x10 <sup>13</sup>
2.38	3.7	2.1x10 <sup>13</sup>
3.06	6	2.1x10 <sup>13</sup>
1.7	1.4	2.9x10 <sup>13</sup>
2.38	2.7	2.9x10 <sup>13</sup>
3.06	4.4	2.9x10 <sup>13</sup>

Measurement of LAP cleavage

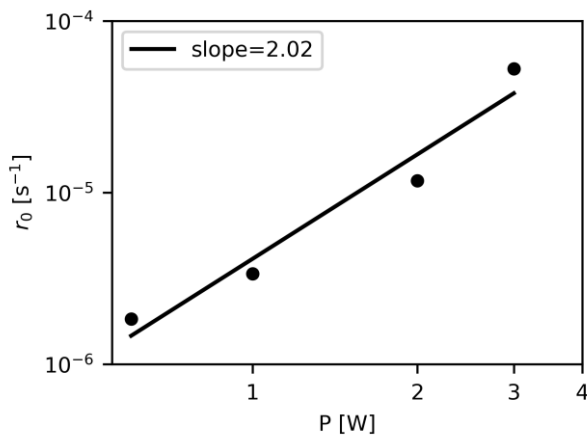


Figure SI 13: Double logarithmic plot of initial reaction rate  $r_0$  of LAP cleavage against the average laser power  $P$ . The slope of the linear regression line of 2.02 indicates a 2-photon induced LAP cleavage.

Characterization of macroscopic hydrogels



Figure SI 14: Representative photos of hydrogels prepared by 2PP curing and after swelling to equilibrium.

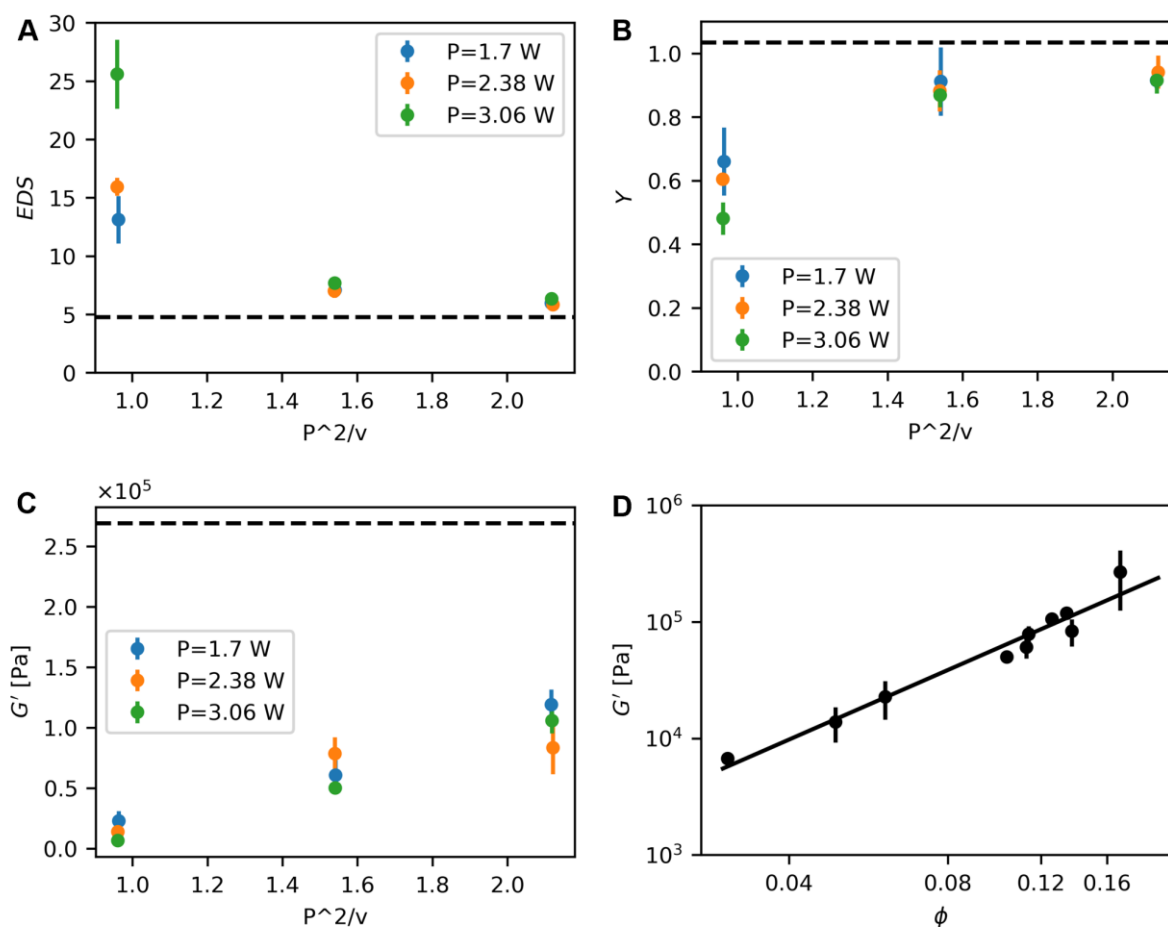


Figure SI 15: Characterization of 2PP cured macroscopic hydrogels. A) Equilibrium degree of swelling (EDS) at different combinations of  $I^2 \times t$  obtained by combining different laser powers  $P$  with different scan speeds  $v$ . The dashed line is the reference for EDS of hydrogels resulting from one-photon induced curing. The rather clear grouping of the data indicated that cross-linking is mainly influenced by the total irradiation dose. B) Gel yields  $Y$  at different combinations of  $I^2 \times t$  obtained by combining different laser powers  $P$  with different scan speeds  $v$ . The dashed line is the reference for  $Y$  of hydrogels resulting from one-photon induced curing. Higher irradiation doses lead to higher  $Y$ . C) Stiffness  $G'$  at different combinations of  $I^2 \times t$  obtained by combining different laser powers  $P$  with different scan speeds  $v$ . The dashed line is the reference for  $G'$  of hydrogels resulting from one-photon induced curing. D)  $G'$  against  $\phi$  for all hydrogels tested. The clear correlation indicates that differences in the hydrogel properties can be attributed to different cross-linking densities in the hydrogels.

## 5. Hydrogel-basierte biosensorische Oberflächen in Kombination mit Tabakmosaikviren

Die Ergebnisse und die Diskussion zu der Hypothese II.III, III.I und III.II werden in diesem Kapitel als Manuskript mit dem Titel „*Soft sub-structured multi-material biosensor hydrogels with enzymes retained by plant viral scaffolds*“ behandelt. Dieses Manuskript wurde in der *peer-reviewed* Fachzeitschrift *Macromolecular Bioscience* veröffentlicht [237]. Darüber hinaus werden die Hypothese II.III in Kapitel 6.2 und die Hypothese III in Kapitel 6.3 diskutiert.

Hinweis: Das Layout des Manuskripts wurde an das Layout dieser Abhandlung angepasst. Die entstandenen Überarbeitungen haben den Inhalt der Veröffentlichung nicht verändert.

### 5.1 Erklärung meiner eigenständigen Leistung

Ich habe diese Studie zum größten Teil eigenständig konzipiert und ihre wissenschaftliche Methodik ausgearbeitet. Außerdem habe ich den Großteil der praktischen Arbeiten durchgeführt oder angeleitet. Dies beinhaltete konkret:

- Die Herstellung der PEG-basierten Proben und deren Behandlung zur Erzeugung von Thiolgruppen wurde von mir etabliert und von mir oder von Corinna O. Jauch, im Rahmen ihrer von mir betreuten Masterarbeit, bzw. Daniela Urban, im Rahmen ihrer von mir betreuten Bachelorarbeit, unter meiner Anleitung durchgeführt.
- Das für die funktionalisierten Proben verwendete *Surfmer* AUITB habe ich selbst oder gemeinsam mit meiner Kollegin Anastasia Tsianaka synthetisiert und die NMR-Spektren ausgewertet.
- Den Großteil der verwendeten GM habe ich gemeinsam mit Anastasia Tsianaka synthetisiert und die NMR-Spektren ausgewertet. Weitere GM wurde von meiner Kollegin Dr. Lisa Rebers zur Verfügung gestellt und entweder von ihr oder unter ihrer Anleitung synthetisiert.
- Die Kontaktwinkelmessungen und die Bestimmung der Viskosität sowie der Oberflächenspannung der GM-Lösungen wurden von Corinna O. Jauch unter meiner Anleitung durchgeführt.
- Das *Inkjet*-Drucken mit GM-Lösung auf PEG-basierten Hydrogelen wurde von mir oder von Corinna O. Jauch bzw. Daniela Urban unter meiner Anleitung durchgeführt. Der Vernetzungsprozess der GM-*Spots* unter Argon wurde von mir etabliert und von Daniela Urban oder mir durchgeführt.
- Die Experimente zur Verwendung der mit GM-beschichteten PEG-basierten Hydrogele als biosensorische Oberflächen wurden von mir durchgeführt. Dabei unterstützte Dr. Tim Wendlandt vom Institut für Biomaterialien und biomolekulare Systeme IBBS der Universität Stuttgart die Kopplung des Enzyms Meerrettichperoxidase an die Tabakmosaikviren.

Die Daten zu den Flächeninhalten der *Spots* wurden unter meiner Anleitung ausgewertet. Die Kopplung der Penicillinase an die Tabakmosaikviren wurde von Dr. Tim Wendlandt durchgeführt. Die Ramanspektren wurden von meiner Kollegin Anastasia Tsianaka gemessen. Die Intensitäten der Fotos zur Enzymaktivität wurden von Dr. Alexander Southan ausgewertet und geplottet. Von ihm wurden ebenfalls die zur Auswertung benötigten Python-Skripte geschrieben. Alle anderen ermittelten Daten wurden von mir ausgewertet. Der weitaus größte Teil des Manuskripts wurde von mir geschrieben; konkret habe ich den Original-Entwurf des Manuskripts konzipiert und verfasst und federführend die Änderungsvorschläge meiner Co-Autoren aufeinander abgestimmt und eingearbeitet.



## 5.2 Soft sub-structured multi-material biosensor hydrogels with enzymes retained by plant viral scaffolds

Jana Grübel<sup>1</sup>, Tim Wendlandt<sup>2</sup>, Daniela Urban<sup>1</sup>, Corinna O. Jauch<sup>1</sup>, Christina Wege<sup>2</sup>, Günter E. M. Tovar<sup>1,3\*</sup>, and Alexander Southan<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>2</sup>Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems, University of Stuttgart, Pfaffenwaldring 57, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>3</sup>Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB, Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart, Germany.

<sup>4</sup>Max Planck Institute for Intelligent Systems, Heisenbergstr. 3, 70569 Stuttgart, Germany.

\*email: guenter.tovar@igvp.uni-stuttgart.de; southan@is.mpg.de

Published in the peer-reviewed journal *Macromolecular Bioscience*

Publisher: Wiley-VCH GmbH

DOI: 10.1002/mabi.202300311

Volume: 24, Issue 3, Page 2300311

© 2023 The Authors

Received: July 4, 2023

Revised: October 13, 2023

Published online: November 3, 2023

### 5.2.1 Abstract

An all-soft multi-material combination consisting of a hydrogel based on poly(ethylene glycol) (PEG) coated with spatially defined spots of gelatin methacryloyl (GM) containing selectively addressable viral nanorods is presented, and its basic application as a qualitative biosensor with reporter enzymes displayed on the tobacco mosaic virus (TMV) bioscaffolds within the GM is demonstrated. Biologically inert PEG supports are equipped with GM spots serving as biological matrix for enzymes clustered on TMV particles preventing diffusion out of the gel. For this multi-material combination, i) the PEG-based hydrogel surface is modified to achieve a clear boundary between coated and non-coated regions by introducing either isothiuronium or thiol groups. ii) Cross-linking of the GM spots is studied to achieve anchoring to the hydrogel surface. iii) The enzymes horseradish peroxidase or penicillinase (Pen) are conjugated to TMV and integrated into the GM matrix. In contrast to free enzymes, enzyme-decorated TMVs persist in GM spots and show sustained enzyme activity as evidenced by specific color reaction after 7 days of washing, and for Pen after 22 months after dry storage. Therefore, the integration of enzyme-coupled TMV into hydrogel matrices is a promising and versatile approach to obtaining reusable and analyte-specific sensor components.

### 5.2.2 Introduction

Hydrogels, typically used in the fields of tissue engineering and drug delivery [196-199], are also suitable as components in bioprinting, soft robotics, or biosensors due to their advantageous properties like biocompatibility, transparency, and ion conductivity [200-203]. Two common polymers to prepare hydrophilic polymer networks are poly(ethylene glycol) (PEG) and gelatin methacryloyl (GM). PEG is well known for its non-adhesive and protein-repellent properties [57, 58, 60, 61], and is widely used, for example, as a shell in core-shell structures for long-circulating drug delivery systems and in the large-scale precipitation of proteins, for example, for antibody preparations [7, 8, 56, 288-292]. Apart from this, PEG is also applied for various biosensor applications [10, 11, 71, 72]. GM is often used in the fields of tissue engineering and bioprinting as it is derived from collagen, the main component of the extracellular matrix [5, 6, 83], and the properties of cross-linked GM hydrogels also make them an appropriate material for soft sensor applications. However, cross-linking of thin GM hydrogels in contact with the atmosphere is challenging due to oxygen inhibition and fast drying [293]. GM and PEG can be combined, which is typically used to tailor the mechanical properties of hydrogels by varying the ratio of PEG and GM [36-38]. In a more advanced example from the field of soft robotics, Shin *et al.* demonstrated that a combination of micropatterned PEG diacrylate (PEGDA) and GM hydrogels with embedded carbon nanotubes and a gold microelectrode can be used for a design inspired by a stingray [206].

For sensing applications, hydrogels can interact with enzymes. For example, Ahmad *et al.* used peptide-cross-linked PEG as a biosensor compound to detect collagenase, which plays an important role in diseases like arthritis [10]. They measured the degradation of a PEG film by the enzyme with a quartz crystal microbalance. In another study, microstructures of PEGDA with a high aspect ratio were prepared on glass substrates via photolithography [71]. The

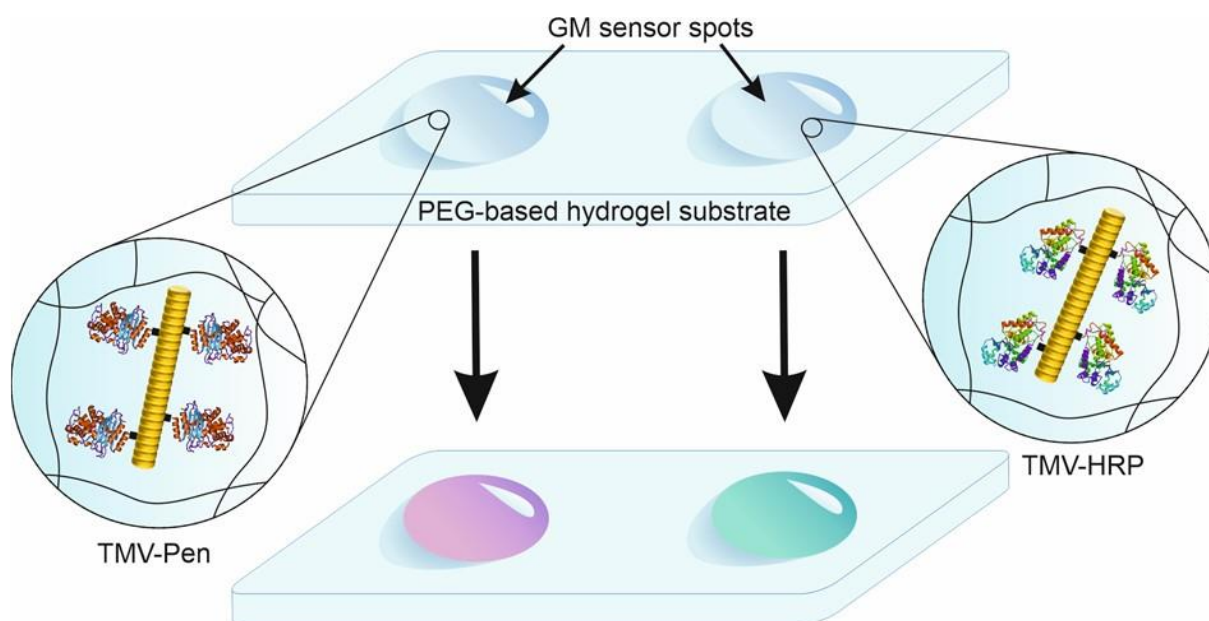
hydrogels contained either  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) or glucose-oxidase (GOx) combined with horseradish peroxidase (HRP) to detect analytes by fluorescence. The authors were able to detect multiple substrates simultaneously after preparing microarrays in a two-step process, in which a first microstructure containing GOx/HRP was generated and afterward a microstructure including  $\beta$ -Gal by applying a photomask. Elsewhere, the preparation of microneedles based on PEGDA generated by photolithography was reported [72]. GOx and lactose oxidase (LOx) were incorporated in the pre-polymeric solution which was cross-linked with UV light. Glucose and lactic acid were detected electrochemically by collecting electrons generated by an enzyme reaction. These are all promising examples of using PEG for enzyme-driven sensor applications, but they suffer from certain limitations such as low reusability or leaching. In the case of a degradation of the sensor by the analyte enzyme, its reusability is restricted. Additionally, enzyme encapsulation directly into the PEG hydrogel matrix is only possible for very small mesh sizes in order to prevent the leaching of the enzymes. Hence, the immobilization of enzymes in hydrogels can be challenging due to the risk of enzyme loss and, in addition, a decrease in their activity [234].

An alternative to the physical entrapment of enzymes is their direct coupling to the hydrogel polymer network by covalent or strong non-covalent bonds like the biotin-streptavidin interaction. In this context, stable enzyme encapsulation in GM-based hydrogels was demonstrated by Dehli and co-workers by modifying GM via biotinylation followed by specific binding of streptavidin-enzyme conjugates [205]. In this way, streptavidin-conjugated HRP was bound to GM-based foams. Makhsin *et al.* prepared a metal-clad leaky waveguide as an optical biosensor with a low refraction index waveguide layer [11]. For the latter, they used a PEG-based hydrogel containing N-hydroxy succinimide (NHS) groups immobilized on a silanized titanium oxide surface. The amine-reactivity of the NHS moieties was used to bind and detect analytes such as glycerol and bovine serum albumin. Although the direct coupling of enzymes to the hydrogel matrix can prevent enzyme leaching, it can be challenging and laborious to introduce the necessary functional groups into the hydrogels.

An attractive and versatile alternative approach would be a combination of physical entrapment and chemical coupling. This can be realized by conjugation of the enzymes on particles that are large enough to be engaged in virtually all hydrogels. An auspicious candidate is the nanorod-shaped tobacco mosaic virus (TMV). TMV has a length of 300 nm and an outer diameter of 18 nm with 2130 identical coat proteins (CP) assembled helically on a ribonucleic acid genome [209-211]. Cysteine-modified TMV (TMV<sub>Cys</sub>) provides a protein surface with a reactive thiol group displayed on every CP subunit [230]. TMV<sub>Cys</sub> was used in various applications [132, 226, 227, 294, 295] including biosensing where it served as an advantageous carrier for enzymes [132, 226, 227]. It was demonstrated that through the binding of the enzymes to the plant virus particles, an increased enzyme loading and prolonged reusability of the sensors was achieved, compared to conventional immobilization routes [132, 226]. TMV has also been applied in hydrogels in several laboratories before, mainly in the context of 3D tissue culture in combination with cell adhesion studies with the use of peptides [296], as it is richly available from plant resources and non-pathogenic or toxic to mammals. Southan *et al.* have incorporated

wildtype TMV and TMV<sub>Cys</sub> in PEGDA hydrogels before and demonstrated that TMV<sub>Cys</sub> can be covalently coupled into the hydrogel via the binding of thiols to acrylates [294].

In this contribution we therefore aimed to construct a multi-material setup consisting only of the appropriately functionalized hydrogel materials PEG and GM, supplemented with immobilized TMV as enzyme carrier (Scheme 1), thus decoupling the choice of the hydrogel material and the enzyme immobilization method. A bioinert, swollen PEG-based hydrogel acted as a humidified substrate for a spot-shaped, spatially defined GM coating, thereby preventing dehydration of the GM spots or unspecific interaction with enzyme substrates. GM hydrogels, known to be an appropriate host for enzymes [204, 205], were anchored to the PEG-based hydrogel surface. The spots were supposed to serve as biocompatible entrapment for a biosensing component, the enzyme-loaded TMV<sub>Cys</sub>. Additionally, the spatially defined coating should enable to incorporate two different enzymes into selectively reactive spots within a single sensor array in a straight-forward way, to detect multiple analytes. In this configuration, coupling of the enzymes to TMV was expected to reduce their washout from the gel and thereby yield a reusable biosensor with a high amount of stably incorporated enzyme, as analyzed in proof-of-concept experiments as follows.



*Scheme 1: Schematic drawing of the all-soft multi-material combination in this study and its basic application as a qualitative biosensor. A substrate based on a humid PEG hydrogel is partially coated with surface-anchored spots of cross-linked GM hydrogels. The GM hydrogel spots contain either the enzyme penicillinase (left, TMV-Pen) or the enzyme horseradish peroxidase (right, TMV-HRP). Both enzymes are coupled to TMV particles and thus are physically entrapped in the GM hydrogel spots. When exposed to the corresponding substrates of the enzymes, the spots change color (bottom).*

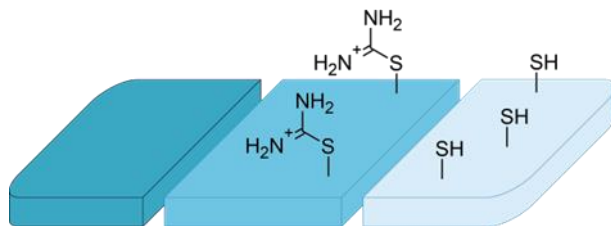
### 5.2.3 Results and Discussion

#### *Surface chemistry requirements of the hydrogel substrate*

In a first step toward creating a multi-material combination as the basis of an all-soft biosensor, we aimed to prepare spatially defined GM hydrogel coatings on a PEGDA hydrogel carrier (Scheme 1). PEGDA substrate layers were chosen due to their advantageous properties

described in the introduction. GM spots were applied onto their surface as drops of a non-cross-linked GM solution which was cross-linked by UV irradiation afterward. Therefore, the hydrogel substrate had to fulfil three requirements: First, it should not be wetted too well by the GM solution so that well-defined spots can be formed. Second, it must be possible to cross-link the GM on the hydrogel substrate while preventing dehydration of the spots. Third, the GM spots have to adhere to the PEGDA surface after cross-linking and should remain anchored during prolonged submersion and washing periods. Consequently, PEGDA hydrogels with two alternative functionalities introduced into their surfaces were compared to a third plain (unmodified) preparation. The different surfaces displayed 1) non-functionalized PEGDA, 2) isothiuronium groups, or 3) thiol groups (Scheme 2). The isothiuronium groups were introduced by copolymerization of PEGDA with the monomer 2-(11-(acryloyloxy)-undecyl)isothiuronium bromide (AUITB) (Figure SI 16), thiols were generated by subsequent reduction of the isothiuronium groups, as described in our previous report (see also Experimental Section) [48]. Isothiuronium groups may interact with GM by ionic interactions, similar to the isothiuronium-functional dye alcian blue that is well known to stain GM-based materials [25]. Thiol groups may react with methacrylate and methacrylamide groups in GM via a thiol-Michael reaction to form covalent bonds between the hydrogel surface and the GM spots [297].

Properties of the distinct PEGDA substrates with regard to their wetting behavior, spot cross-linking, and surface adhesion will be described and discussed in the following two sections.



*Scheme 2: Schematic drawing of the different surface chemistries of the hydrogel substrates based on PEG. Left: Unmodified, non-functionalized PEGDA. Middle: PEGDA functionalized with isothiuronium groups. Right: PEGDA functionalized with thiol groups.*

#### *Wetting of the hydrogel surfaces by gelatin methacryloyl solution*

The wetting behavior by GM solution on the surfaces of swollen PEG-based hydrogels with the three different functionalities (Scheme 2) was first assessed by contact angle (CA) measurements with the sessile drop method, the results are shown in Figure 8a. The composition of the GM solution was identical for all experiments, it contained 7.5 wt% GM with photo initiator in phosphate-buffered saline (PBS).

The CA of the GM solution was relatively low ( $21.4^\circ \pm 2.3^\circ$ ) for non-functionalized hydrogels, while it was higher for both functionalized surfaces ( $34.4^\circ \pm 3.1^\circ$  for isothiuronium-functionalized and  $36.9^\circ \pm 3.0^\circ$  for thiol-functionalized hydrogels). The difference between non-functionalized and the two functionalized hydrogels was highly significant ( $p < 0.001$ ). The trend is similar to our previous report on water CA on non-functionalized and isothiuronium-functionalized PEGDA hydrogels and can be explained by the hydrophobic hydrocarbon chain of the AUITB monomer used for functionalization [48]. However, the CA

of the GM solutions was generally lower than that of water, presumably because of the presence of both salts and GM.

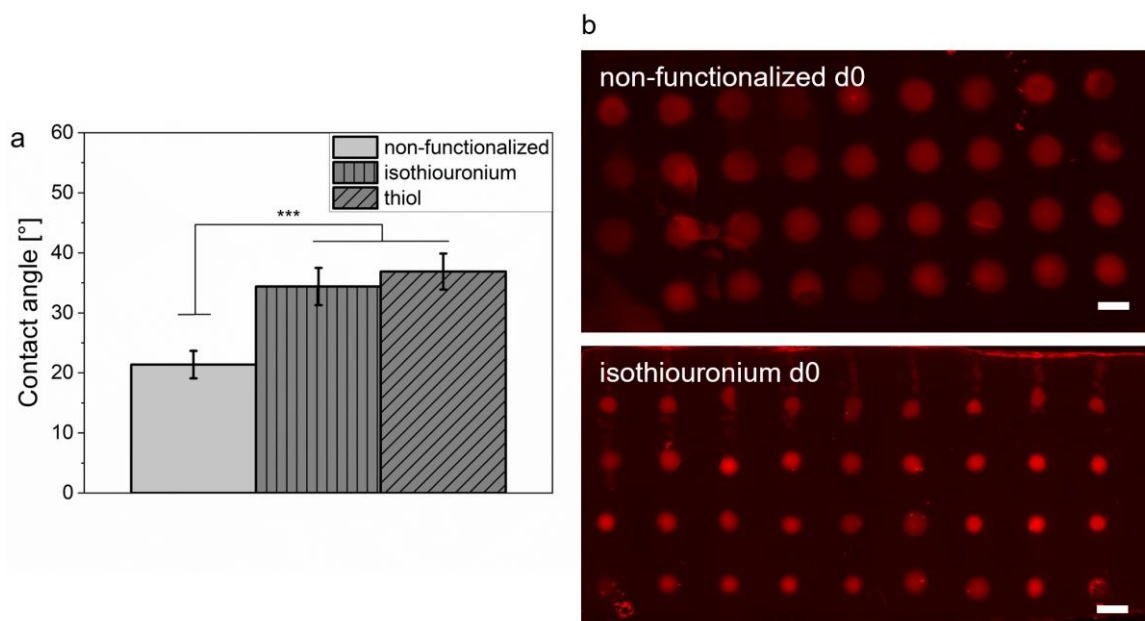


Figure 8: Investigation of the wetting behavior of the GM solution on differently functionalized surfaces of swollen PEG-based hydrogels. a) Contact angle measurements of the GM solution on PEG-based hydrogels. Hydrogels were either non-functionalized, functionalized with isothiuronium groups, or functionalized with thiols ( $n = 3$ ). Explanation of symbols: \*\*\* significant difference between non-functionalized and functionalized hydrogels ( $p < 0.001$ ). b) Exemplary fluorescence images on day 0 (d0) of GM spots on a non-functionalized PEGDA hydrogel and an isothiuronium-functionalized hydrogel (scale bar 1 mm). The spots were stained with fluorescent particles and cross-linked before analysis with the method described in the next section.

In order to further analyze the wetting behavior, arrays of GM spots on the PEGDA surfaces were generated by inkjet printing. This method was chosen because it allows to produce a high number of homogeneous spots in an automated and fast way for analysis. Inkjet printing appeared appropriate to generate spatially defined GM spot coatings on the hydrogels, as tested with a 10 pL drop volume and a predetermined spot diameter of 250  $\mu\text{m}$ , as defined by the printing pattern. Both viscosity and surface tension of the GM solution at the printing temperature of 28  $^{\circ}\text{C}$  (Figure SI 18) are in the range of other liquids that can be processed by inkjet printing, although the surface tension is slightly higher than typical for most inks [83, 153, 298]. At the given temperature, the least nozzle clogging caused by solvent evaporation occurred, and drop formation was relatively stable. At lower GM concentrations, solutions were not viscous enough, and higher GM concentrations caused nozzle clogging. The number  $Z$ , a measure for inkjet printability, was determined by equation 1, giving  $11.96 \pm 2.31$ . According to Fromm, usually satellite drops occur for a  $Z$  value  $> 10$ , which can influence the printing accuracy [156]. Satellite drops were indeed observed during printing, however, they coalesced with the main drop in most cases so that a deterioration of the printed pattern was not recognized with the bare eye. Our results are in good agreement with the report by Hoch *et al.* who processed solutions of a similar GM by inkjet printing [83]. They reported a reproducible printing process of an ink containing 5 % GM at 25 and 37  $^{\circ}\text{C}$ . For 10 % and 15 % GM the

printing process at 37 °C could not be restarted after a printing pause due to clogging of the nozzle [83]. It should be noted that to investigate the GM spots after printing visually, they needed to be stained. To this end, fluorescent nanoparticles were mixed into the GM solution. No influence of the staining on the printability was observed.

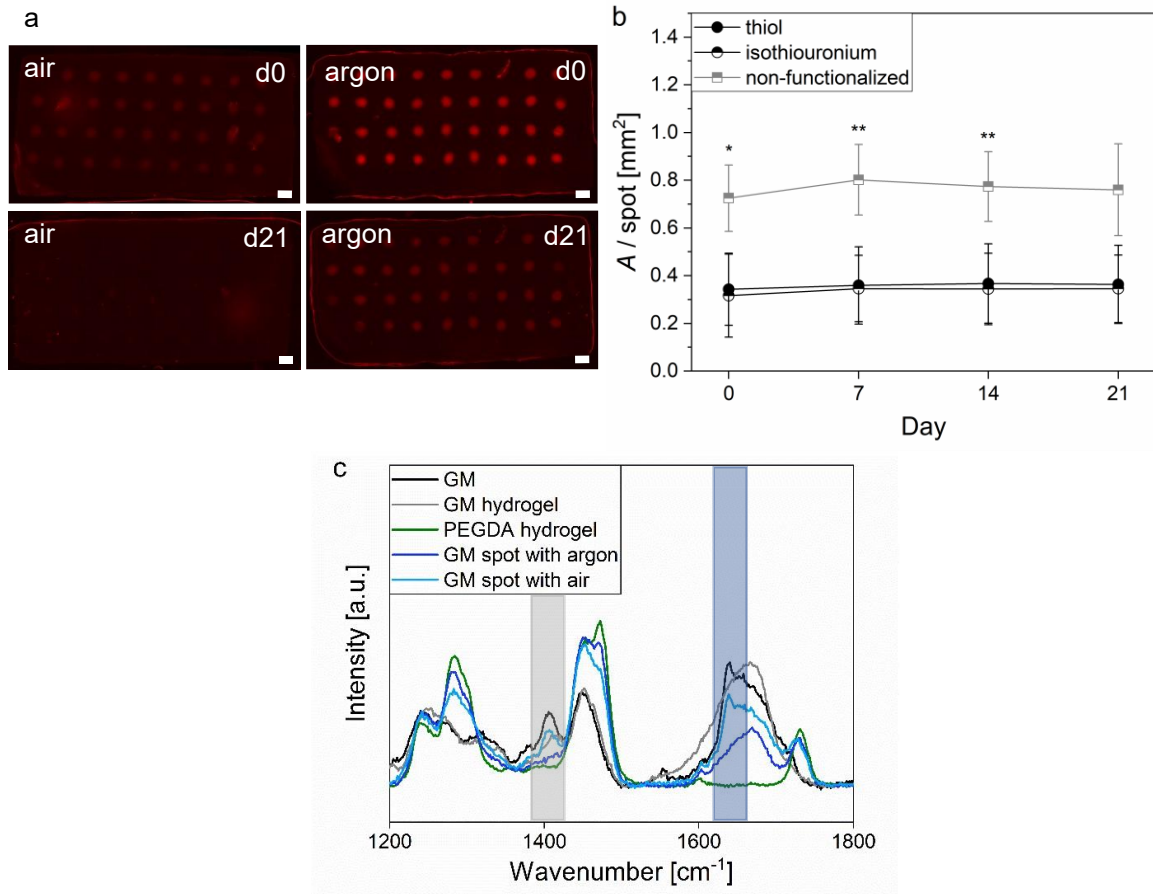
For inkjet-printed GM spot arrays on non-functionalized PEGDA hydrogels (Figure 8b, upper row), an average surface area  $A$  per spot of  $0.725 \text{ mm}^2 \pm 0.139 \text{ mm}^2$  was found. Due to the low CA (Figure 8a), the printed solution spread rather well on the PEGDA surface before curing, resulting in rather blurry spots. The CA suggested that the GM solution would spread less on the functionalized hydrogels, and thus these were expected to better support spatially well-defined spots. Indeed, on isothiuronium-functional hydrogels (Figure 8b, lower row) an average  $A$  of  $0.316 \text{ mm}^2 \pm 0.174 \text{ mm}^2$  was observed, and on thiol-functional hydrogels of  $0.343 \text{ mm}^2 \pm 0.151 \text{ mm}^2$ . Statistically, the  $A$  values between non-functionalized and functionalized hydrogels were different ( $p < 0.05$ ), in agreement with the CA results discussed before.

The combined results show that the functionalized hydrogels are more appropriate surfaces for a precisely defined GM coating pattern with a smaller surface area of the spots, and hence for a biosensing platform. Between the two functionalized surfaces, no difference was found, so both should be equally suitable as sensor substrates.

#### *Cross-linking and stability of gelatin methacryloyl spots*

Apart from appropriate wetting of the hydrogel substrate surface, the dispensed GM solution has to be sufficiently cross-linked in order to physically entrap the TMV-coupled sensing component (Scheme 1) stably over prolonged submersion and washing times. Cross-linking efficiency was assessed by the integration of fluorescent polystyrene nanoparticles with an average diameter of 100 nm, which would be physically entrapped inside a properly cross-linked GM hydrogel due to its estimated smaller mesh size, and as a consequence cannot be washed out [204]. The spot-coated hydrogels were immersed in water after UV illumination and evaluated by fluorescence microscopy once a week over a period of 21 days. In preliminary experiments, we faced severe problems with successful cross-linking with UV light when irradiating the liquid GM spots on the swollen hydrogel substrates in contact with the ambient atmosphere. When immersed in water and agitated gently after illumination, the GM spots were washed away over time so that only a diffuse nanoparticle fluorescence was detectable after 21 days (Figure 9a, left panel). This suggested that the 100 nm particles were washed out because the spots were not cross-linked sufficiently. By contrast, GM solution with the same composition could be cured without issues in the same mold covered with a quartz glass pane but purged with humidified argon (Figure 9a, right panel). We hypothesized that the difference in curing behavior was either caused by premature drying of the spots or oxygen inhibition of the free radical cross-linking process due to the low thickness of the spots. Indeed, photopolymerization with initiators like the used lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) is known to be sensitive to oxygen [299-302]. Accordingly, the GM spots cross-linked in the humidified argon atmosphere remained stable over at least 3 weeks, as also evidenced by analyzing the surface area  $A$  of the spots. In fact,  $A$  remained virtually unchanged for all three tested surface variations of the PEGDA hydrogel

substrates over the complete period of the experiments, showing that the combination of humidification and oxygen reduction promotes cross-linking (Figure 9b). The analysis of *A* demonstrates that the main effect of surface functionalization is adapting the surface wetting. The bond between the cross-linked GM spots and the hydrogel substrate surface was thus strong enough for all PEGDA hydrogel variants including the non-functionalized one.



**Figure 9:** Evaluation of the cross-linking efficiency of GM spots. *a*) Exemplary fluorescence images of GM spots were either cross-linked under ambient conditions, left panel, or in a humidified argon atmosphere, right panel, on a thiol-functionalized hydrogel monitored over 21 days, scale bar 1 mm. *b*) Determined surface areas *A* of the GM spots, which were cross-linked under argon atmosphere, on days 0, 7, 14, and 21 ( $n = 3$ ; non-functionalized hydrogels day 21  $n = 2$ ). Explanation of symbols: \* or \*\* significant difference between non-functionalized and functionalized hydrogels ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). *c*) Raman spectra of pure GM, a GM hydrogel, a PEGDA hydrogel, a GM spot that was cross-linked under argon atmosphere, and a GM spot cross-linked under ambient conditions. The gray area highlights the band of the C=C in-plane scissoring vibration and the blue area highlights the band of the C=C stretching vibration. Due to the low thickness of the GM spots ( $\approx 2 \mu\text{m}$ , estimated from the Raman microscopic data), it was not possible to record pure spectra without bands of the PEGDA support. Therefore, a PEGDA hydrogel was measured as a reference.

Apart from the indirect evidence of cross-linking by way of nanoparticle entrapment, as described above, the cross-linking was directly studied by observing the double bond-related signals in Raman spectra of acrylic groups in GM. Raman spectra were measured of pure GM, a GM hydrogel cross-linked in a quartz glass-covered mold (*i.e.*, without air contact), a cross-linked PEGDA hydrogel, GM spots cross-linked under argon atmosphere, and GM spots cross-linked in contact with ambient air during the irradiation, respectively. As shown in Figure 9c,



the typical band of the C=C stretching vibration between 1620 and 1680  $\text{cm}^{-1}$  as well as the band of the C=C in-plane scissoring vibration between 1390 and 1420  $\text{cm}^{-1}$  was present when the GM spots were irradiated under ambient conditions, that is, in the absence of an argon atmosphere, similar to the spectrum of the pure GM [303, 304]. In the presence of argon, the double bond-related bands were similarly low like for the reference GM hydrogel cross-linked in a mold. These observations are in accordance with no success in cross-linking via free radical cross-linking chemistry involved during GM spot irradiation in contact with air (see Scheme SI 1 for schematic representation of cross-linking chemistry), while under argon atmosphere, the acrylic double bonds of the methacryl-modified gelatin GM were converted to cross-links.

The exact mechanism of GM spot surface anchoring remains speculative because it is not possible to extract chemical information specifically for the interface between PEG-based hydrogel and GM spots from the Raman spectra; however, we attribute the successful surface anchoring to sufficient entanglements between the polymer chains, and to hydrogen bonds between GM and the PEG backbone. Another possibility is the participation of remaining acrylate groups within the PEG-based hydrogels in the cross-linking of GM since it was reported that not all acrylate groups are consumed during radical cross-linking of PEGDA [40, 305]. In conclusion, the two types of PEGDA surface modifications promote precise spatial arrangements of small GM spots but are not essential for their stable anchoring.

Taken together, the Raman spectra and the fluorescence images consistently revealed that the cross-linking of the GM spots was successful in a humidified argon atmosphere on all three tested PEGDA surfaces, and also, GM spot anchoring worked in all cases. However, spots were smaller and more defined on the two types of chemically functionalized surfaces, without a difference between isothiuronium and thiol modification. Therefore, the isothiuronium-functionalized surfaces were used further as a hydrogel substrate due to the smaller effort for sample preparation.

#### *Synthesis of enzyme-loaded TMV<sub>Cys</sub>*

After successful preparation of the GM spots on the PEG-based hydrogel, the analyte receptor/detector component of the biosensor was prepared, that is, the enzyme-loaded TMV nanoparticles enabling colorimetric read-out (Scheme 1). We chose to integrate HRP or penicillinase (Pen) into our spatially defined coatings in order to detect the enzyme-catalyzed reactions either of hydrogen peroxide or  $\beta$ -lactam antibiotics, respectively, with appropriate chromogenic substrates. TMV-conjugated and free enzymes were applied in parallel tests. HRP was used as its conjugate with streptavidin (SA-HRP) and was bound to TMV<sub>Cys</sub> via a biotin linker, which was covalently coupled to the virus via its maleimide functionality (Figure 10a), as described by Koch *et al.* [132]. A coupling efficiency of TMV<sub>Cys</sub> to the biotin linker of 93 % was determined (Figure SI 19). SA-HRP was coupled to TMV nanocarrier rods by bioaffinity binding via biotin-streptavidin interaction. Offering 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) substrate solution to this reaction product resulted in the development of a green stain in the solution (results not shown), indicating the successful formation of the TMV-HRP conjugate and that the enzyme functionality was retained. Pen was conjugated to TMV<sub>Cys</sub> by first reacting the enzyme with the NHS ester of a heterobifunctional linker via accessible lysine amino groups of the enzymes. Subsequently, the maleimide-functional other

end of the linker was reacted with  $TMV_{Cys}$  via a thiol-Michael reaction, yielding the TMV-Pen conjugate (Figure 10b). For Pen, the enzyme activity was verified by the yellowish nitrocefin substrate turning red upon hydrolysis of its  $\beta$ -lactam ring.

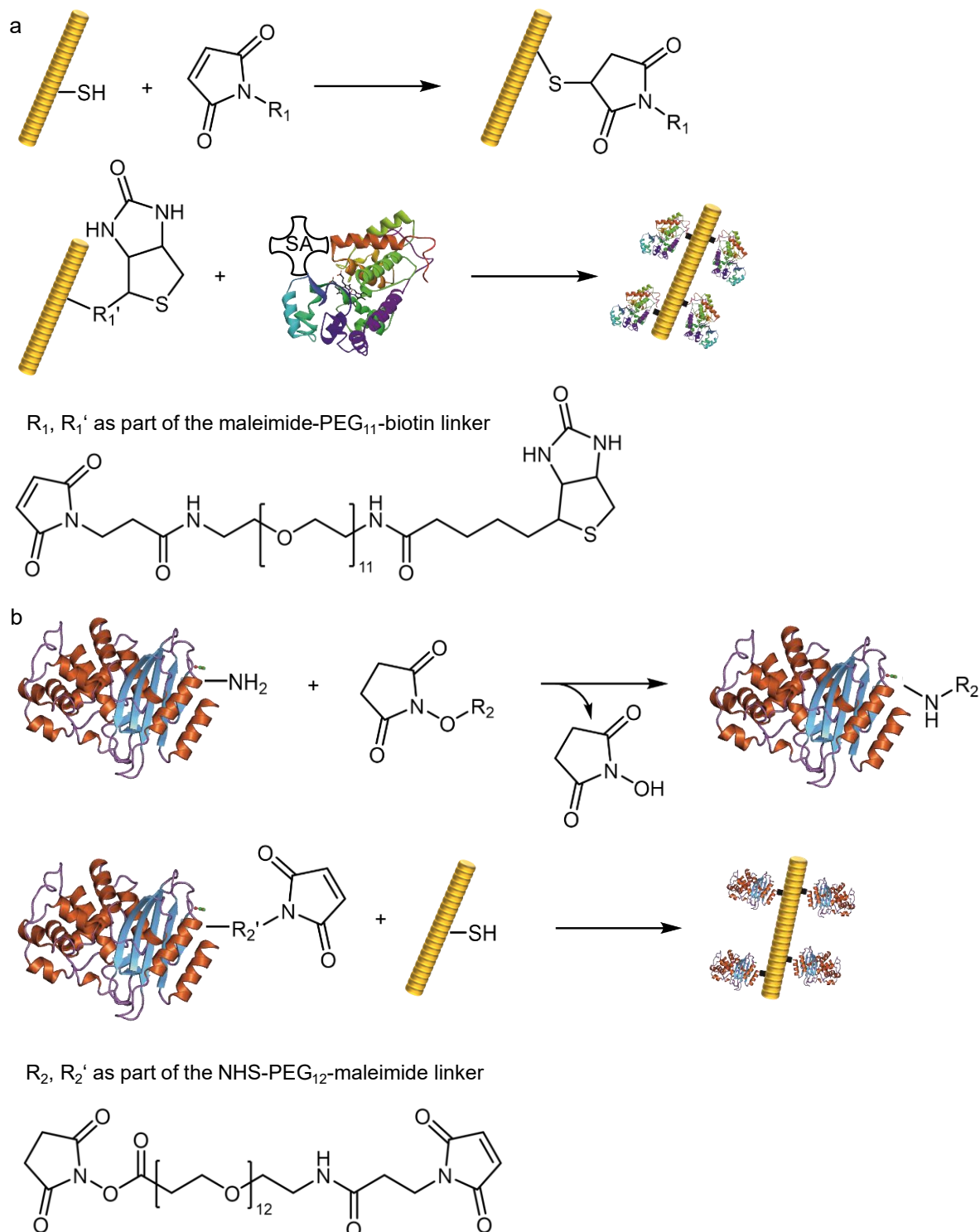


Figure 10: Coupling of cysteine-modified TMV nanorods to linkers and enzymes, visualized for a single or few out of around 2,000 docking sites only for reasons of clarity. a)  $TMV_{Cys}$  (yellow rod) was coupled to the maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker via its thiol groups (SH). In the next step, SA-HRP was bound to the linkers due to the strong affinity for biotin. b) The enzyme penicillinase was coupled to NHS-PEG<sub>12</sub>-maleimide linkers via its surface-exposed primary amine groups ( $NH_2$ ), generating NHS leaving groups. Subsequently,  $TMV_{Cys}$  was bound to the maleimide functionality of the enzyme-coupled linker via the thiol groups exposed to the CP subunits.

Apart from the successful coupling of the enzymes, it was equally important to us that the TMV particle structure remained intact after the synthetic procedures so that they would be physically entrapped when integrated into GM hydrogel spots (see also the following section). Therefore, the TMV-HRP and TMV-Pen conjugates were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Although under the conditions applied the enzyme decoration could not be detected around TMV-HRP or TMV-Pen, respectively, as visualized by Koch *et al.* earlier [132, 226], the rod-like structure of TMV with its typical 300 nm length, elongated oligomeric head-to-tail aggregates and a few shortened particles confirmed the structural integrity of TMV-nano-adaptors, rendering them suitable for entrapment within a cross-linked hydrogel matrix (Figure SI 19).

#### *Assembly of the all-soft biosensor*

In the final step, the three soft material components, that is, the inert, humidified PEGDA hydrogel support substrate, the biobased GM spots, and the enzyme-loaded TMV particles were combined in a single assembly to demonstrate a biosensor functionality. For this purpose, TMV-HRP was suspended in the GM solution and the suspension was pipetted on the PEG-based hydrogels manually to obtain larger spots, simplifying the detection of a color reaction. As a control, free SA-HRP devoid of TMV was added to the solution instead of TMV-HRP before cross-linking. After cross-linking of the enzyme-containing GM spots, the hydrogels were immersed in substrate solution either immediately (without prior washing), or after washing them for 1 week under agitation. Color formation was evaluated after a reaction time of 20 min (see Figure 11). After an additional 5 min, the substrate solution was removed and used for absorption measurements indicative of the HRP-catalyzed reaction of hydrogen-peroxide with ABTS (see Table 2 and corresponding discussion below).

We found that the GM spots containing the TMV-HRP conjugate started colorless and developed a dark green color after adding the ABTS substrate solution to the hydrogels (see photos in Figure 11c, for comparison see photos after 0 min reaction time in Figure SI 20). This was the case for both unwashed and washed samples. For non-washed hydrogels, the solution surrounding the spots turned green as well. Higher green intensities of the spots were detected for the non-washed samples compared to the washed ones, as evident when evaluating the color intensity profiles (Figure 11a, b). By contrast, for GM spots containing unbound SA-HRP, the spots and surrounding solution turned green only when no washing procedure was applied. The spots, as well as the solution, remained completely colorless if the hydrogels were washed, as also shown by the corresponding intensity profiles (Figure 11a, b, Figure SI 20). The application of TMV<sub>Cys</sub>-bound SA-HRP therefore retained the enzymatic activity within the GM hydrogel by preventing wash-out of the bioactive molecules. Enzyme-loaded TMV carrier rods obviously did not diffuse out of the GM hydrogel with its estimated mesh size of  $\approx 10\text{-}30$  nm [204] to a significant extent. This is in line with the findings of Claaßen *et al.* [204] who showed that SA-HRP may diffuse into a GM hydrogel and bind a biotin-functional linker coupled to the hydrogel. In conclusion, loss of free SA-HRP from GM spots through diffusion into the surrounding solution needs to be prevented by immobilizing the enzyme, for which its coupling to TMV carrier scaffolds retained inside the hydrogel pores due to its dimensions appears as an efficient and versatile strategy.

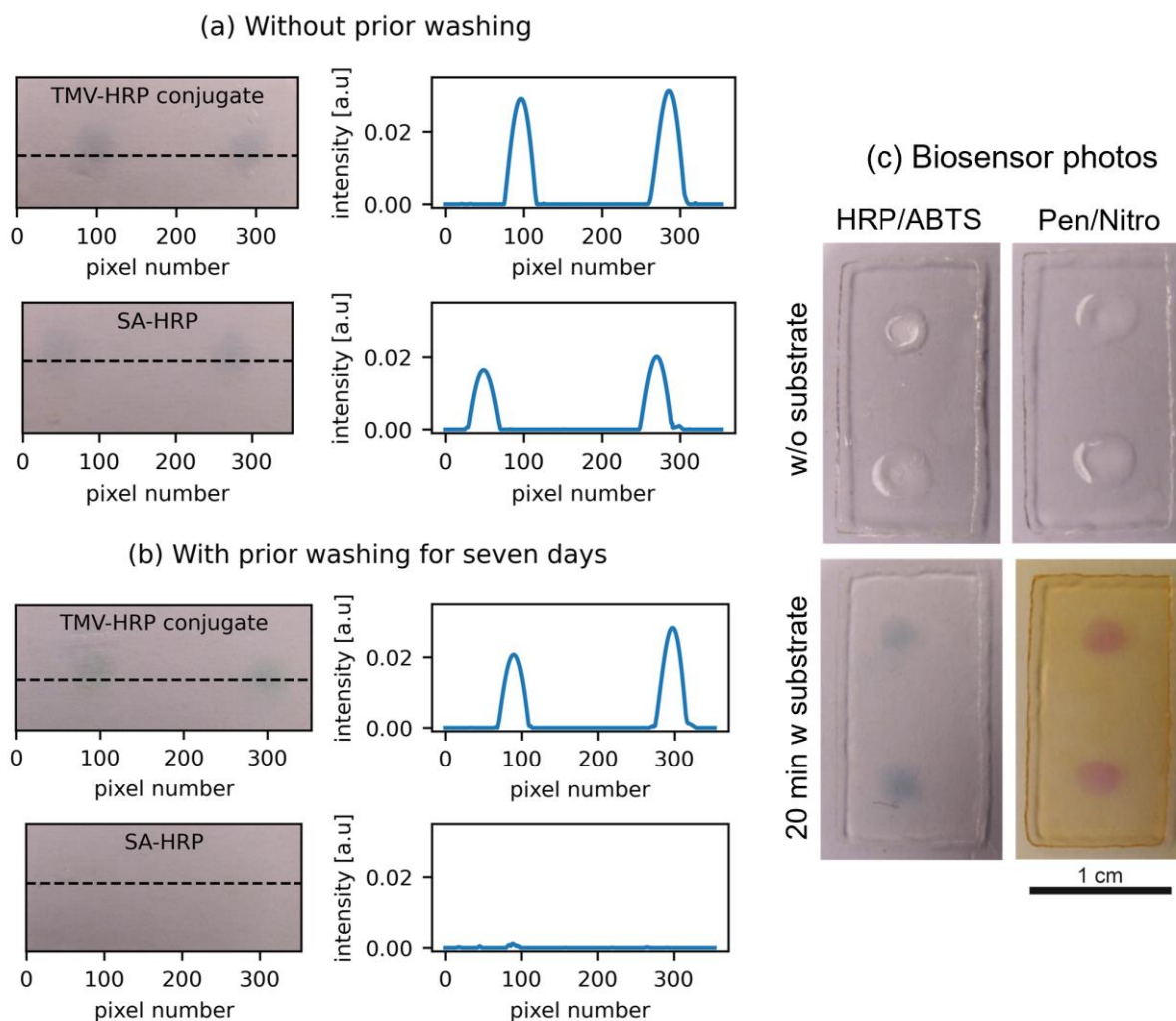


Figure 11: Analysis of the sensor enzyme activities in GM spots anchored on a hydrogel substrate. a) When offering ABTS for 20 min directly after sensor preparation, that is, without any washing steps, the enzymatic activity of HRP was found both for TMV-conjugated HRP (top left) and unconjugated SA-HRP (bottom left), as evidenced by the green color of the spots. Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. b) After extended washing of the samples, only the samples containing the TMV-conjugated HRP showed enzyme activity, indicating a stable immobilization of the TMV-displayed enzyme in the GM spots. Unbound SA-HRP was removed completely from the samples due to diffusion through the hydrogel meshes. c) Representative photos of GM spots on PEG-based hydrogels without (w/o) the substrate solution (top row), and after 20 min with (w) substrate solution (bottom row). Left: GM spots with TMV-conjugated HRP and the addition of ABTS solution (HRP/ABTS), which turned the spots green. Right: GM spots with TMV-conjugated Pen and addition of yellow nitrocefin solution (Pen/Nitro), which turned the spots red and the PEG-based hydrogel yellow. Scale bar 1 cm.

In order to compare the loss of enzyme activity within spots with or without TMV carrier rods upon washing in more detail, absorption measurements at 405 nm were carried out with the ABTS solution that was in contact with the hydrogels, and with non-used (fresh) solution as reference. In case of an enzymatic activity outside the GM hydrogel spots, the chromogenic reaction would increase the absorbance resulting in ratios above 1, while in the case of no color reaction outside the spots, the ratio should stay equal to 1. The ratios of the two absorption values are collected in Table 2 (numeric absorption values are displayed in Table SI 4). The

results were in accordance with the visual impression described above: An absorption increase was detected for non-washed samples directly after their preparation both for TMV-HRP- and SA-HRP-containing samples. This indicates that some SA-HRP has leached out of the GM hydrogel spots in both cases, moving enzyme activity into the solution. Nevertheless, according to the change in absorbance ratios, leaching from unwashed spots was considerably less if SA-HRP was immobilized on TMV. For TMV-HRP samples, we interpret the leaching enzyme activity as a result of incomplete binding of SA-HRP to TMV. Since the diffusion of TMV-HRP out of the gel matrix is very unlikely due to the size of the complexes compared to the mesh size of the gel, and the SA-biotin-binding affinity is very high, we conclude that some unbound SA-HRP existed as a by-product in the TMV-enzyme preparation. The wash-out of such free SA-HRP from GM spots most likely resulted in the signal drop observed in the corresponding spots after 7 days of washing (Figure 11). After extensive washing, none of the biosensors showed any color reaction outside the GM hydrogel spots (Table 2, absorbance ratios of incubated substrate solution vs. non-incubated solution close to 1). Biosensors with GM hydrogel spots harboring free SA-HRP lost their signals completely, both within the spots and in the surroundings after washing. In comparison, washed biosensors with TMV-HRP conjugates showed a color reaction limited exclusively to the GM hydrogel spot (see Figure 11). On the one hand, this highlights the need for properly washing the biosensors presented here prior to operation, in order to remove potentially unbound enzyme from the spots; on the other hand, and most importantly, this demonstrates the capability of TMV to retain enzyme activity within GM hydrogels.

*Table 2: Ratio of absorption values of ABTS solution after reaction for 25 min with samples and absorption values of non-used solution. Samples were the fully assembled soft sensor, that is, PEG-based hydrogels with GM spots containing either TMV-HRP conjugate or unbound SA-HRP. Samples were non-washed or washed before the reaction. Values are displayed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).*

<b>Sample</b>	<b>non-washed</b>	<b>washed</b>
TMV-HRP	1.311 $\pm$ 0.076	1.022 $\pm$ 0.010
SA-HRP	1.500 $\pm$ 0.057	0.994 $\pm$ 0.006

Another finding is that the enzyme HRP, coupled to the virus particles or not, maintained activity after UV irradiation. Our group reported earlier that the protein vascular endothelial growth factor (VEGF) incorporated into GM hydrogels was impaired by the free radical cross-linking process [9]. Hence, it is not foreseeable if proteins maintain their function if integrated in a hydrogel precursor solution before photo cross-linking. Wang *et al.* also showed that HRP in the buffer was less active or completely inactivated after pulsed light treatment due to aggregation and changes in the protein structure [306]. It is thus likely that the specific process conditions applied did not affect HRP functionality to a considerable extent, although our analyses would not detect a minor impairment of the activity of the enzyme.

After demonstrating that the soft biosensor worked with TMV-HRP, Pen was used to test a second enzyme in the same hydrogel layout, and concomitantly also an alternative coupling method on the viral nanocarrier. Pen has a molecular weight of  $\approx$  28 kDa and is commercially available as a mixture of two  $\beta$ -lactamases [226]. Since SA-HRP has a molecular weight of at

least 90 kDa and is therefore much bigger than Pen, it was assumed that uncoupled Pen would have even higher mobility in GM hydrogel spots, resulting in its wash-out during 1 week as well. Therefore, only TMV-exposed Pen was analyzed for both its antibiotics detection capability and reusability inside GM spots. Different from earlier applications in TMV-assisted biosensors [226], the enzyme was bound covalently to TMV via PEG<sub>12</sub>-linkers before its incorporation into the GM spots as described above. When these hydrogels were immersed in yellow nitrocefin substrate solution, the spots on both washed and non-washed samples turned red without any such color change of the surrounding solution. The transparent hydrogel supports soaked by the substrate solution adopted the yellow educt color (Figure 11c right).

These results collectively show that GM spots on PEG-based hydrogels were well-suited to encapsulate and host enzymes installed on TMV. Nanocarrier retention inside the gel was in accordance with results from a previous study on TMV incorporated into PEG hydrogels [294], and contrasted with our findings for the diffusion of free enzymes into the surrounding solution. HRP and Pen both retained their activity after incorporation into the hydrogel as indicated by the chromogenic conversion of their substrates. Hence, the combination of the two different types of enzyme-containing GM spots in a single sensor array was tested. PEG-based hydrogels were coated with one spot containing TMV-Pen conjugate and a second one with TMV-HRP conjugate. Following the addition of nitrocefin solution, the TMV-Pen spot stained red indicating Pen activity. After replacing the nitrocefin with ABTS solution, a slightly green stain developed in the TMV-HRP spot, which, however, appeared much less intense than in the case of ABTS addition without prior application of nitrocefin. Presumably, the color reaction was less visible due to the yellow stain of the PEG support, or the activity of HRP was impaired by residual nitrocefin. If the chromogenic substrates were applied in inverted order or simultaneously, that is, ABTS first and nitrocefin second, or in a mixture, both colors developed as well, with, however, red stain also forming on the HRP-loaded spot after nitrocefin addition. This side reaction masked the green color either after its occurrence or obviated its reliable detection (results not shown). A different read-out system will thus be necessary for real applications.

The enzyme HRP was chosen due to its good commercial availability and easy detection of its activity via a color reaction. The application of Pen demonstrated that the system is appropriate to work in biomedically relevant biosensors and that this sensor layout could be transferred to other enzymes which may enable environmental and food monitoring as well. Since the enzymes remained active and were stably immobilized on TMV particles in the sensor matrix for at least 1 week, the system showed potential to be reused with consecutive samples after the wash-out of the preceding analyte solution. The storage stability and shelf-life of the specimens were assayed after keeping the air-dried biosensors after the initial tests in a refrigerator for  $\approx$  22 months. They were re-hydrated and extensively washed before fresh substrate solutions were added. Whereas for TMV-HRP-containing biosensors, no enzyme activity was detectable anymore, TMV-Pen-equipped ones still induced a visible color reaction in the GM hydrogel spots, indicating preserved Pen activity and thus antibiotics sensing capacity (see Figure SI 23). With the spatially well-defined GM spot array and a known number of docking sites exposed on the TMV nanocarriers, it will be feasible to integrate a defined number of enzyme molecules

per spot and to combine distinct enzymes on one biosensor platform via GM formulations with different nanoparticle-enzyme conjugates. TMV has already been successfully applied in various sensor layouts [132, 222-229, 307-309] and was shown to stabilize distinct enzymes including penicillinase in label-free electrochemical field-effect biosensors that retained their performance for at least a year of repetitive use [227]. This points to the future potential of the combination of plant viral bioscaffolds with hydrogel soft biosensors, for example, as sensor domains in 3D cell cultures grown for tissue replacement, in implanted online sensors, or for in situ detection purposes for process monitoring in biotechnological or food fabrication fermenters. In this study, the functionality of the all-soft qualitative biosensor made of a PEG hydrogel as a substrate and GM spots as sensor component was successfully demonstrated with the two enzymes HRP and Pen.

#### 5.2.4 Conclusions

In this contribution, we show that GM spots bound to a PEG-based hydrogel surface can serve as a versatile, qualitative soft biosensor array. Contact angle measurements and inkjet printing of GM solution on PEG hydrogels revealed that both isothiuronium and thiol functionalization of the PEG reduce the spreading of the GM solution on the surface and thereby help to obtain more precisely defined spot patterns than on unmodified PEG. The GM spots were successfully UV-cross-linked under a humidified argon atmosphere. Groups of the enzymes HRP or Pen were immobilized on cysteine-exposing engineered TMV carrier rods, which enabled to stably incorporate and capture the active enzymes in the GM hydrogel matrix for at least 1 week, whereas free enzymes were washed out. In the case of Pen, the reusability of the detector array was even demonstrated after almost 2 years of dry storage in the cold followed by rehydration. In conclusion, the hierarchically constructed soft biosensor made of a functionalized PEG-based hydrogel coated with GM spots containing virus-scaffolded enzymes is a promising approach for the detection of various substrates and might allow the fabrication of reusable sensors with high storage stability. Moreover, spatially defined spot array coatings on a hydrogel platform could allow the simultaneous use of multiple enzymes for the detection of multiple analytes. The sensitivity and repeated use of the biosensor may be further evaluated and the combination of different TMV-nano-scaffolded enzymes in selectively reactive GM spots may be developed into bi- or multifunctional arrays for sensing distinct analytes in complex mixtures or serially applied samples in future work.

#### 5.2.5 Experimental Section

##### *Chemicals and materials*

The following chemicals were purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany): ABTS liquid substrate system, ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH)  $\approx$  28-30 % (m/m), acryloyl chloride  $\geq$  97 %, deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>) 99.8 %, dimethylformamide (DMF), ethanol (EtOH) absolute for analysis, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % (m/m), hydroquinone, 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (Irgacure 2959), lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP), methacrylic anhydride (MAAnh), nitrocefin, penicillinase

from *Bacillus cereus* ((1500–3000) units mg<sup>-1</sup> protein), PEGDA  $M_n \approx 700$  g mol<sup>-1</sup>, potassium chloride (KCl) for analysis, sodium hydroxide (NaOH), sodium metabisulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), sodium phosphate monobasic monohydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O), sodium phosphate dibasic dihydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O), and triethylamine  $\geq 99.5$  %. Chloroform  $\geq 99.8$  % and dichloromethane (DCM)  $\geq 99.8$  % were purchased from Honeywell (Offenbach, Germany). Technical acetone and isopropanol were purchased from Brenntag GmbH (Essen, Germany). Dimethyl sulfoxide (DMSO) for synthesis and tetrahydrofuran (THF) for HPLC were purchased from ChemSolute® (Th.Geyer, Renningen, Germany). 11-bromo-1-undecanol was purchased from TCI GmbH (Eschborn, Germany). Ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA), sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>), sodium chloride (NaCl), disodium hydrogen phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), potassium dihydrogenphosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), chemicals for SDS-PAGEs, thiomersal, and tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), were purchased from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). Maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin, Pierce SM(PEG)<sub>12</sub> (maleimide-PEG<sub>12</sub>-NHS) and PageRuler Prestained were purchased from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany). Other reagents were purchased from the following companies (given in parentheses): deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-d<sub>6</sub>) 99.8 % (Deutero, Kastellaun, Germany), ethyl acetate for HPLC (VWR Chemicals, Darmstadt, Germany), fluorescence-labeled particles micromer-redF, plain, 100 nm (micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock, Germany), hydrochloric acid (HCl) 37 % (m/m) (Häberle Labortechnik GmbH & Co, Lonsee-Ettlenschieß, Germany), GE low molecular weight Marker (Amersham, Buckinghamshire, UK), magnesium sulfate 99 % anhydrous (abcr GmbH, Karlsruhe, Germany), nitrogen gas (Air Liquide, Düsseldorf, Germany), potassium hydroxide (KOH) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany), streptavidin-coupled horseradish peroxidase (SA-HRP, 1 mg mL<sup>-1</sup>, SDT GmbH, Baesweiler, Germany), and thiourea (Alpha Aesar, Kandel, Germany). Gelatin (type B, limed, bovine bone, 232 bloom) was kindly provided by Gelita, Eberbach, Germany.

Acryloyl chloride was distilled before use. PBS pH 7.4 was freshly prepared with 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O in deionized water. 0.1 M Phosphate buffer pH 7 was freshly prepared with 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O and 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O.

10 mM sodium-potassium-phosphate buffer (SPP) pH 7.2 was freshly prepared from autoclaved 0.5 M SPP stock solution which was prepared by adjusting the pH of 400 mL 0.5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution by adding 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution to a final pH-value of 7. After diluting the SPP-stock 1:50 with deionized water, the resulting 10 mM SPP was autoclaved.

Silicon wafers, type p/bor, were purchased from Si-Mat Silicon Materials (Kaufering, Germany).



*Preparation of PEG-based hydrogels*

The synthesis of the monomer AUITB containing an isothiuronium group was performed as described earlier [48]. AUITB was synthesized in a two-step reaction. In brief, 11-bromoundecyl acrylate was synthesized by acrylation of 11-bromo-1-undecanol with acryloyl chloride. In the second step, AUITB was obtained by a nucleophilic substitution with thiourea. PEG-based hydrogels were prepared as described before [48]. Non-functionalized hydrogels were prepared by dissolving Irgacure 2959 at a concentration of 0.5 wt% in PEGDA under the protection of light. For a functionalization of the hydrogels, first AUITB was dissolved in PEGDA by heating, followed by dissolution of Irgacure 2959 under the protection of light, so that concentrations of 2 wt% (AUITB) and 0.5 wt% (Irgacure 2959) were reached. Silicon wafers were cleaned and activated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub>OH in a volume ratio of 2:3 at 70 °C. The hydrogel precursor solution was poured inside a silicone frame (500 µm height) on the silicon wafers. The mold was closed with a quartz glass pane and left at room temperature for 5 h under the protection of light. Afterward, the solution was polymerized by UV-irradiation for 7.5 min (radiation intensity of 50 mW cm<sup>-2</sup>, spectral range > 300 nm, with an emission maximum around ≈ 365 nm, sol2, Dr. Hönle AG). The hydrogel surface orientated toward the activated silicon wafer was used further on.

Hydrogels were treated with sodium metabisulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) to reduce the isothiuronium groups to thiols, generating the third hydrogel surface. For this purpose, the non-functionalized and isothiuronium-functionalized PEGDA hydrogels were swollen in deionized water for at least 16 h and were punched in the size of 1 cm x 2 cm. Non-treated and non-functionalized samples were immersed in 5 mL of deionized water at room temperature. Non-functionalized control samples and isothiuronium-functionalized samples were treated with 5 mL 1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> for 5 h at 60 °C. After several washing steps with PBS, all hydrogels were washed with deionized water and were kept in water until further use.

*Synthesis of gelatin methacryloyl (GM<sub>10</sub>)*

GM was synthesized as described before [283]. In brief, 25.06 g gelatin were dissolved in 250 mL deionized water at 40 °C and the pH was adjusted to 7.25 with an automatic titration device. 13.52 g methacrylic anhydride (MAAnh), corresponding to a tenfold molar excess relative to the free amino groups in gelatin [82], were added slowly. The reaction mixture was stirred for 5 h. Afterward, the pH was adjusted to 9.5 and the mixture was filtrated and kept at 4 °C for 2 days. After adjusting the pH to 9.5 again, the mixture was filtrated with a bottle top filter and dialyzed with deionized water for 4 days at room temperature. The pH was adjusted to 8.5 and the solution was lyophilized. The degree of methacrylation (DM) was determined with <sup>1</sup>H NMR, as described by Claaßen *et al.* [283]. GM<sub>10</sub> batches with a DM of (0.809 ± 0.015), (0.869 ± 0.034), (0.965 ± 0.003), 1.014, (1.043 ± 0.061), (1.072 ± 0.116), and (1.137 ± 0.023) mmol g<sup>-1</sup> were used (NMR spectrum in Figure SI 17). Since GM<sub>10</sub> was the only GM derivative used, it is otherwise called GM.

*Preparation of the GM solution and its characterization*

GM and the photo initiator LAP were dissolved in PBS to prepare a solution with 7.5 wt% GM and 0.7 wt% LAP, relative to the biopolymer mass. The GM solution was protected from light. The wetting behavior of the GM solution was investigated by CA measurements on swollen non-functionalized and functionalized PEGDA hydrogels with a Teflon-lined cannula. For this purpose, the sessile drop method was used and the CA of a 2  $\mu\text{L}$  drop was determined at  $t = 1$  s with video analysis (DataPhysics Instruments GmbH, OCA 40). The viscosity of the GM solution was examined with a rheometer (MCR 301, Anton Paar GmbH) with the measuring cone CP40. The measuring plate and cone were heated up to 28  $^{\circ}\text{C}$  because this temperature was used for inkjet printing. 1.2 mL of the solution was poured in the measuring gap and the viscosity was measured at a shear rate between 1 and 3000  $\text{s}^{-1}$ . The surface tension of the GM solution was determined with a bubble pressure tensiometer (BP50, Krüss GmbH). The solution was analyzed at 28  $^{\circ}\text{C}$  and the surface age was determined between 15 and 16000 ms. To characterize the drop formation during the inkjet printing process, the number  $Z$  [156] was calculated with the following equations

$$Z = \frac{1}{Oh} = \frac{Re}{\sqrt{We}} = \frac{\sqrt{\sigma\rho d}}{\eta} \quad (17)$$

with  $Oh$  being the Ohnesorge number,  $Re$  the Reynolds number, and  $We$  the Weber number.  $d$  is the diameter of the print heads with 21.5  $\mu\text{m}$ , the viscosity  $\eta$  was used at a shear rate of 208  $\text{s}^{-1}$  and the surface tension  $\sigma$  at the smallest surface age of 15 ms. For the density  $\rho$  of the GM solution, an average value of 1.01  $\text{g mL}^{-1}$  was used.

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} \quad (18)$$

$$We = \frac{\rho v^2 d}{\sigma} \quad (19)$$

*Inkjet printing and analysis of fluorescence-labelled GM spots*

Spatially defined bioactive coatings on the hydrogel surfaces were generated either by pipetting or with an inkjet printer (Dimatix DMP 2850, Fujifilm), depending on the desired quantity and volume of the spots. For printing, a print head (DMC-11610) with a drop volume of 10 pL was used. A pattern with 4 x 9 spots was chosen to investigate the spot size and shape on the different hydrogel surfaces by printing with a labelled GM solution at a frequency of 2 kHz. For this purpose, 30 wt% of a solution containing 10  $\text{mg mL}^{-1}$  fluorescence-labelled polystyrene particles in water (redF, 100 nm) was added, leading to a concentration of 0.3 wt% of the particles in the solution. The amount of PBS was adjusted, respectively. The printer was protected from light to avoid polymerization and bleaching of the GM solution during the printing process. The spots with a predefined diameter of 250  $\mu\text{m}$  and 5080 dpi were printed on the swollen hydrogels. The nozzle was heated up to 28  $^{\circ}\text{C}$  to avoid clogging. After printing, the coated hydrogels were UV-irradiated (Hartmann.gs, UV-H 225, Light Box Nr. 0191, 10.4  $\text{mW cm}^{-2}$ ) for 2.5 min under argon atmosphere to reduce the oxygen concentration. For this purpose, an aluminum mold was constructed, which was purged with humidified argon, and the samples were put inside. Afterward, the hydrogels were kept in deionized water under

the protection of light. At specific time points, the printed pattern was observed with a fluorescence microscope (BZ-9000, Keyence) with 2x magnification by using the merge function. The determination of the surface area ( $A$ ) of the spots was performed with self-implemented Python scripts and Fiji [253]. To distinguish between the back- and foreground, a threshold for the intensity was used with the Otsu method. The results for the treated non-functionalized control samples are displayed in Table SI 3. The surface area  $A$  of the spots was calculated with the following equation, with  $34,596 \text{ px mm}^{-2}$  being the scaling of the images

$$A \text{ per spot [mm}^2\text{]} = \frac{\text{Number of pixels per spot [px]}}{34,596 \left[\frac{\text{px}}{\text{mm}^2}\right]} \quad (20)$$

#### *Raman spectroscopy*

PEGDA hydrogels with printed 4 x 9 GM spots without the addition of the redF nanoparticles were evaluated with Raman microscopy (inViaTM Raman microscope, Qontor®, Renishaw plc) to validate the cross-linking of the GM spots. Raman spectra were recorded with a 100x microscope lens (Leica N PLAN EPI, WD 0.27 mm, NA 0.85) and a laser power of 100 % with the 532 nm laser. After printing and washing in deionized water, the imprinted gels were dried under reduced pressure at 60 °C for 24 h (VDL 53, Binder GmbH). As a reference, a conventional prepared GM hydrogel was measured. It was made of the same solution, which was poured into an aluminum mold (1 mm height, 30 mm diameter). The mold was closed with a quartz glass pane and the solution was cross-linked by UV-irradiation for 2.5 min with the same intensity. All spectra were normalized before analysis.

#### *Coupling of TMV<sub>Cys</sub> to a maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker*

The cysteine-mutant of the tobacco mosaic virus (TMV<sub>Cys</sub>) [230] was obtained from plants as described [132, 230]. To bind streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (SA-HRP) to TMV<sub>Cys</sub> via biotin, the procedure of Koch *et al.* was adopted [132]. 1 mL of a TMV<sub>Cys</sub> suspension with a concentration of  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  in coupling buffer (25 mM MOPS, 5 mM EDTA, 5 mM TCEP, pH 7.0 with 0.01 % thiomersal) was supplemented with 6.83  $\mu\text{L}$  of a 250 mM solution of maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker (Bio) dissolved in DMF. TMV<sub>Cys</sub> and linker were coupled at 26 °C for 3 h under 800 rpm orbital agitation to yield TMV<sub>Cys</sub>-Bio. The unbound linker was removed, and buffer was exchanged to 10 mM SPP by five subsequent cycles of ultrafiltration and retentate resuspension in 10 mM SPP (Amicon Ultra-0.5 mL, 10 kDa MWCO, 13,000 g in 5430 R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany).

In order to verify the coupling efficiency of TMV<sub>Cys</sub> to the linker, a 15 % Mini-SDS-PAGE [310] was conducted (Hofer Vertical Mini Unit, 25 mA per gel). Samples were mixed with loading buffer [310] and heated for 5 min at 90 °C. A sample volume corresponding to 1  $\mu\text{g}$  of uncoupled TMV<sub>Cys</sub> was loaded per lane, non-coupled TMV<sub>Cys</sub> served as positive control (P) and 10 mM SPP buffer as negative control (N). PageRuler Prestained Protein Marker (M1) and GE low molecular weight protein marker (M2) were used as markers. The gel was stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) and the coupling efficiency was determined by comparing the intensity of the bands corresponding to the apparent molecular weights of coupled and uncoupled coat proteins of TMV<sub>Cys</sub> with GelAnalyzer 19.1 [311].

### *Coupling of TMV<sub>Cys</sub> to enzymes*

Two different enzymes, SA-HRP and penicillinase (Pen), were bound to the virus particles. For coupling SA-HRP, the protocol specified by Koch *et al.* was followed [132]. 353  $\mu\text{L}$  of a 14  $\text{mg mL}^{-1}$  TMV<sub>Cys</sub>-Bio suspension were mixed with 326  $\mu\text{L}$  of SA-HRP solution (1  $\text{mg mL}^{-1}$ ) with 321  $\mu\text{L}$  SPP buffer overnight at 4 °C and 800 rpm (TMV-HRP conjugate). The unbound enzyme was removed by ultracentrifugation (Optima L90K, 45Ti rotor, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany, with Microfuge adapter, Beranek, Nußloch, Germany) at 35,000 rpm corresponding to 142,000 g and 4 °C for 1.5 h. As a control to evaluate the unspecific binding of the enzyme to TMV<sub>Cys</sub>, the SA-HRP was also mixed with TMV<sub>Cys</sub> following the aforementioned procedure but without the coupling step to the linker (TMV and SA-HRP).

To bind the enzyme Pen covalently to TMV<sub>Cys</sub>, Pen was first solubilized and washed three times via ultrafiltration in 10 mM SPP buffer (Amicon Ultra-0.5 mL, 10 kDa MWCO, 13,000 g). Afterward, it was mixed with a tenfold molar excess of a 12.5 mM maleimide-PEG<sub>12</sub>-NHS linker solution in DMSO for 30 min at RT. After removing the unbound linker via centrifugal filter units at 13,000 g, TMV<sub>Cys</sub> was added, and the suspension was kept at 4 °C for 3 days (TMV-Pen conjugate). Finally, ultracentrifugation was used as above, to separate Pen-loaded TMV species from free Pen.

In order to investigate the coupling of the TMV<sub>Cys</sub>-Bio to the enzyme SA-HRP, TEM images were recorded. For this purpose, TMV<sub>Cys</sub> and TMV-HRP solutions with a concentration of 0.05  $\text{mg mL}^{-1}$  were prepared in PBS and adsorbed on Formvar-coated and carbon-sputtered 400 mesh copper grids. They were washed three times with H<sub>2</sub>O and negatively stained with 2 % uranyl acetate for 1 min. TEM used a ZEISS EM 10A operated at 60 kV and a 1-megapixel camera (TRS Slowsan, Albert Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Moorenweis, Germany).

### *Coated PEG-based hydrogels as biosensors*

TMV-HRP and TMV-Pen conjugates were incorporated in the GM solution with a concentration of 0.02 wt%. The solution was pipetted on isothiuronium-functionalized PEGDA hydrogels, which had been swollen before (overnight) in deionized water. Two spots with a volume of 1  $\mu\text{L}$  were placed on the hydrogel and cross-linked as described before. The substrate solution for the enzyme was added either directly to the samples (no washing step) or after keeping them at 4 °C overnight and washing them for 1 week in PBS at 4 °C by changing the PBS twice a day. ABTS solution was used for the enzyme SA-HRP and Pen 95  $\mu\text{M}$  nitrocefin in 0.1 M phosphate buffer (stock solution 19 mM in DMSO) was used as a specific substrate. After removing residual water from the hydrogels, 3 mL substrate solution was added. For documentation, a picture of the hydrogels was taken directly afterward and after 20 min. After a total time of 25 min, the substrate solution was removed and the ABTS solution was used for absorption measurements at 405 nm, the unused ABTS solution served as a reference. The same experiment was performed for TMV and SA-HRP with 0.02 wt% and SA-HRP alone with 0.00006 wt%. Self-implemented Python scripts were used to visualize the intensities of the green channel of the spots after adding ABTS. For this purpose, the photos of the spots were smoothed with a Gaussian filter, and the background was subtracted with a black

top hat filter. The signal intensity was then extracted as the profile along the line of maximum intensity.

#### *Statistical analysis*

OriginPro 2019b (OriginLab) was used to perform a two-way analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-hoc test. Mean values were considered significantly different for  $p$ -values  $< 0.05$ . All experiments were performed three times with independent samples and GM solution preparations.

#### 5.2.6 Acknowledgements

J.G. thanks the PhD scholarship of the Evonik Foundation (Essen, Germany) for funding. G.E.M.T. and A.S. thank the University of Stuttgart, as well as the Ministry of Science, Research and Arts of the Federal State of Baden-Württemberg (Germany) for funding within the Leistungszentrum Mass Personalization (<https://www.masspersonalization.de/>). T.W. and C.W. thank the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, WE 4220/7–1, project 446507449) for subsidiary funding, but did not receive any specific grant from any funding agency for the project.

The authors thank Dr. Birgit Claaßen (Institute of Organic Chemistry, University of Stuttgart) and her group for NMR measurements. The authors kindly thank Anastasia Tsianaka (Institute of Interfacial Process Engineering and Plasma Technology IGVP, University of Stuttgart) for the measurements of Raman spectra and collaboration with the GM synthesis. The authors thank Dr. Lisa Rebers and co-workers (Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB) for providing additional GM. The authors are grateful to the gardeners Nadja Beuttenmüller and Annika Allinger for taking care of the TMV source plants, and to Rebecca Hummel, Michael Schweikert, and Tatjana Kleinow for infrastructural and further support at the Institute of Biomaterials and Biomolecular Systems (IBBS, University of Stuttgart). The authors kindly thank Dr. Fania Geiger (Max Planck Institute for Medical Research) for her support. The authors thank the mechanical workshop (IGVP, University of Stuttgart) for the construction of several molds and Christopher Hänel (Fraunhofer IGB) for his help and support. The authors thank the University of Stuttgart (Stuttgart) and the Fraunhofer Gesellschaft (Munich) for providing the infrastructure. The work was partially funded by the Max Planck Society.

#### 5.2.7 Author Contributions

Conceptualization: J.G. and A.S.; Methodology: J.G., A.S., and T.W.; Investigation: J.G., T.W., C.O.J., and D.U.; Visualization: J.G. and A.S.; Writing – original draft: J.G. and T.W.; Writing – review & editing: C.O.J., D.U., C.W., G.E.M.T., and A.S.; Supervision: A.S. and G.E.M.T.

## 5.2.8 Supporting Information

Chemical structure of 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)isothiuronium bromide (AUITB)

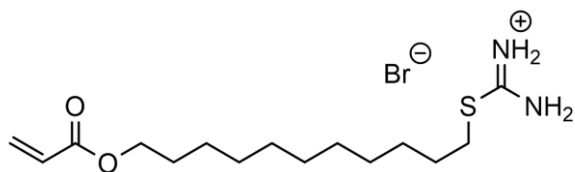


Figure SI 16: Structural formula of the monomer AUITB. The monomer was copolymerized with poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) to introduce isothiuronium groups into the samples.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of gelatin methacryloyl (GM<sub>10</sub>)

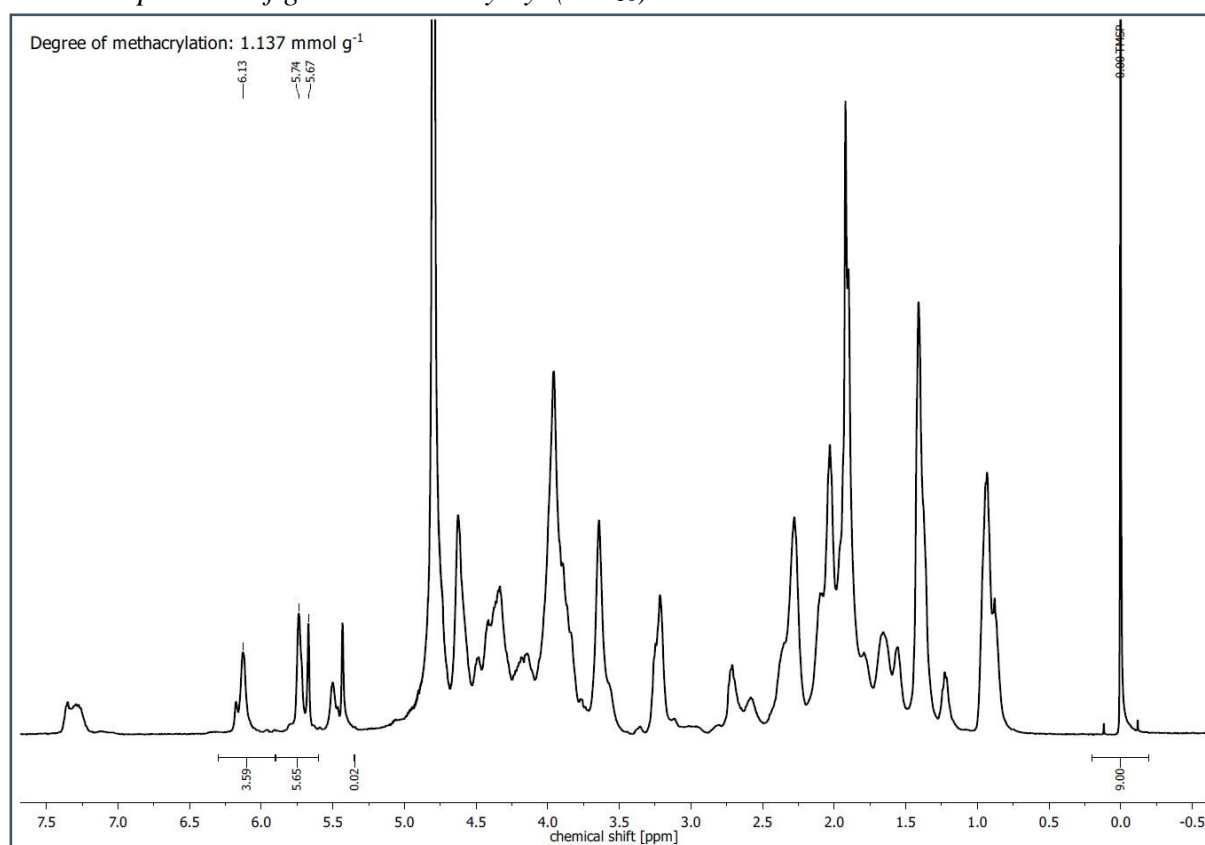


Figure SI 17: <sup>1</sup>H NMR spectrum of GM<sub>10</sub>.

### Viscosity and surface tension of the gelatin methacryloyl solution

The viscosity and the surface tension of the GM solution were examined since they are important parameters for the inkjet printing process. The viscosity of the GM solution was almost constant at shear rates between  $10 \text{ s}^{-1}$  and  $1000 \text{ s}^{-1}$  with an average viscosity of  $3.20 \text{ mPa s} \pm 0.83 \text{ mPa s}$ . The surface tension of the first stable bubble at  $15 \text{ ms}$  was  $58.03 \text{ mN m}^{-1} \pm 0.38 \text{ mN m}^{-1}$  (Figure SI 18).

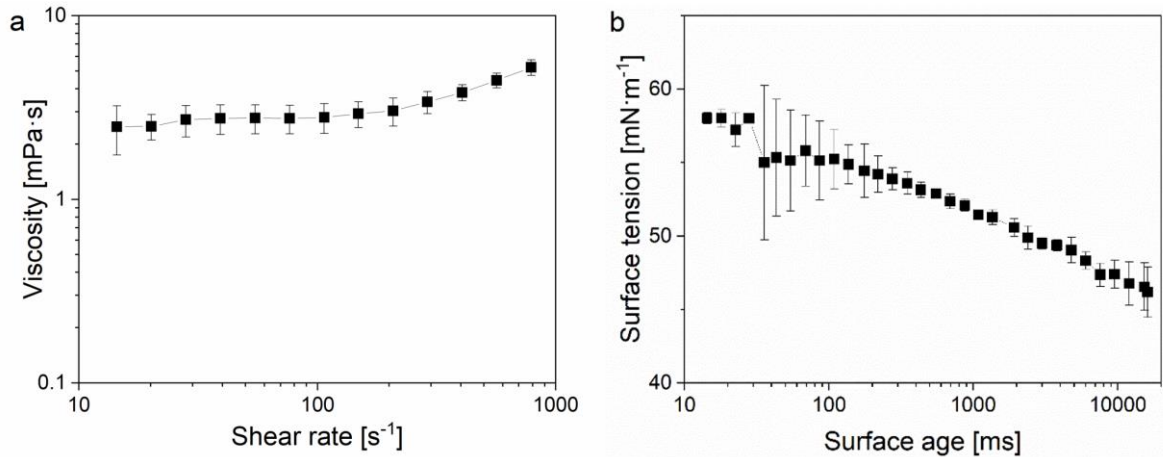


Figure SI 18: Characterization of the GM solution. The solution consisted of 7.5 wt% GM with 0.7 wt% lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) relative to the biopolymer mass in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ( $n = 3$ ). a) Viscosity of the solution against the shear rate. b) Surface tension of the solution as a function of the surface age of the bubbles.

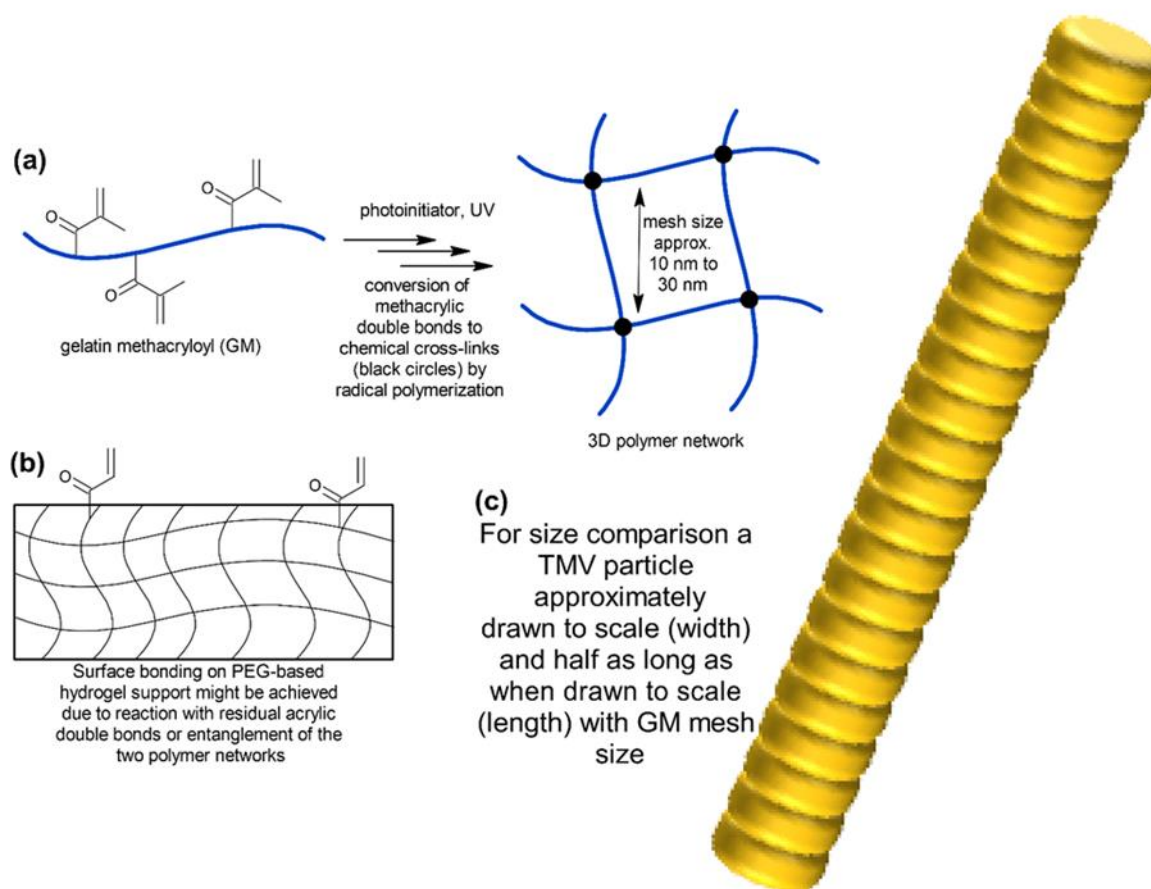
### Contact angle and cross-linking of gelatin methacryloyl solution on control samples

Non-functionalized PEG-based hydrogels, which were treated with sodium metabisulfite served as controls. The contact angle of the GM solution on those hydrogels was  $24.1^\circ \pm 2.6^\circ$  ( $n = 3$ ). The surface area  $A$  of the cross-linked GM spots on those hydrogels is shown in Table SI 3.

Table SI 3: Determined surface areas  $A$  of the GM spots, which were cross-linked under argon atmosphere, on day 0, 7, 14 and 21 on treated, non-functionalized PEG-based hydrogels ( $n = 3$ ).

Day	Surface area $A$ [ $\text{mm}^2$ ]
0	$0.725 \pm 0.315$
7	$0.757 \pm 0.304$
14	$0.714 \pm 0.290$
21	$0.674 \pm 0.328$

*Cross-linking and multi-material combination chemistry*



*Scheme SI 1: a) Schematic representation of cross-linking chemistry during GM hydrogel curing. During curing, the methacrylic double bonds are converted to chemical cross-links so that a three-dimensional polymer network is formed. b) Surface anchoring of GM hydrogel spots on the PEG-based hydrogel support may be achieved by reaction with residual acrylic groups or entanglement. However, the exact mechanism is unclear. c) A TMV particle approximately drawn to scale (width) and half as long as when drawn to scale (length) with the GM mesh size. It becomes evident that the TMV particle cannot escape a fully cross-linked three-dimensional GM network by diffusion.*

*Coupling of cysteine-modified tobacco mosaic viruses (TMV<sub>Cys</sub>) to enzymes*

The coupling of the maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin (Bio) linker to TMV<sub>Cys</sub> was verified by SDS-PAGE and a shift of the band of the coat protein from TMV<sub>Cys</sub> (17.6 kDa) was observed due to the conjugation of the linker (922 Da, Figure SI 19 lower right corner). A coupling efficiency of approx. 93 % was determined. After bioaffinity coupling of the streptavidin-coupled horseradish peroxidase (SA-HRP) to the TMV<sub>Cys</sub>-Bio particles, transmission electron microscopy (TEM) images were comparable with the ones before coupling, suggesting that the structure of the virus particles remained intact.



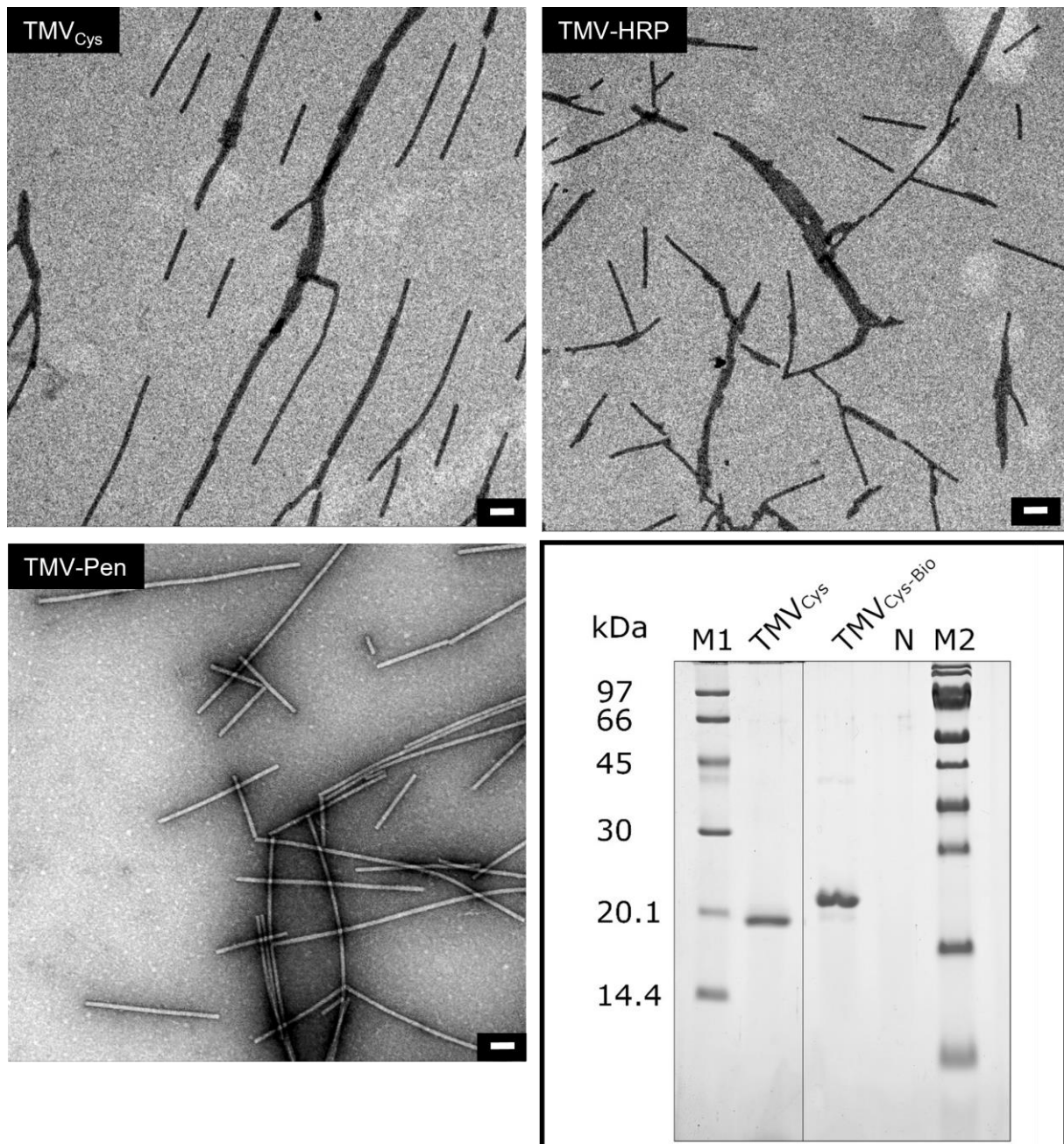


Figure SI 19: Coupling of the coat protein (CP) subunits of  $TMV_{Cys}$  to enzymes. TEM images after UAc negative staining of  $TMV_{Cys}$ ,  $TMV_{Cys}$  coupled to penicillinase ( $TMV-Pen$ ) and  $TMV_{Cys}$  coupled to horseradish peroxidase ( $TMV-HRP$ ), scale bars 100 nm. Lower right corner: 15 % SDS-PAGE to determine the coupling efficiency of  $TMV_{Cys}$  CPs to the linker (Bio). Coupling efficiencies of 93 % (CPs with biotin-terminated linkers) were obtained ( $TMV_{Cys-Bio}$ ). M1 / M2: molecular mass markers, positive control ( $TMV_{Cys}$ ), N: negative control: sodium-potassium-phosphate (SPP) buffer.

*Enzyme activity in gelatin methacryloyl spots*

In Figure SI 20, photos of the hydrogel samples and the respective color intensity directly after adding the substrate solution (0 min) are depicted.

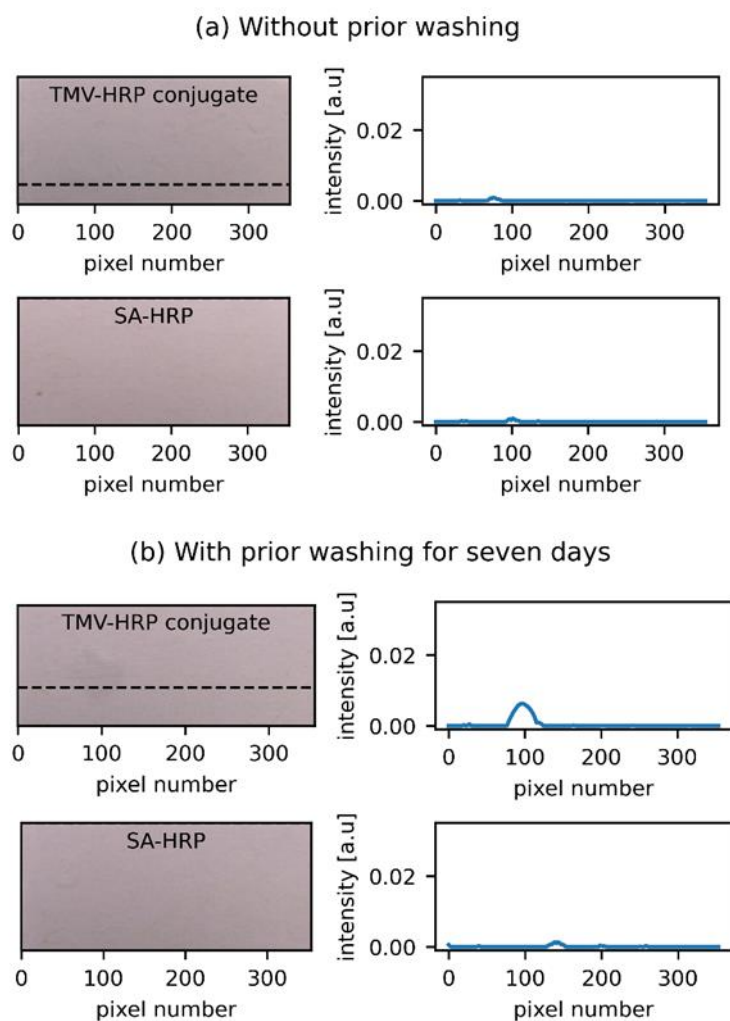


Figure SI 20: Analysis of the enzyme activity in GM spots anchored on a hydrogel substrate directly after adding substrate solution (0 min). Either tobacco mosaic virus - horseradish peroxidase (TMV-HRP) conjugate or SA-HRP was integrated in the GM spot. Photos of hydrogels were taken directly after adding 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) substrate solution (0 min). Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added. For TMV-HRP conjugate an intensity was already detected in the 0 min photo for one spot. The enzyme reaction already started probably due to time delay at capturing the image.

As a control to verify the specific binding of the linker-exposed biotin to SA-HRP, TMV<sub>Cys</sub> was mixed with SA-HRP without prior addition of a biotin-linker (TMV and SA-HRP). After purification, this solution was also integrated in the GM spots to evaluate remaining enzyme activity (Figure SI 21 and Figure SI 22).

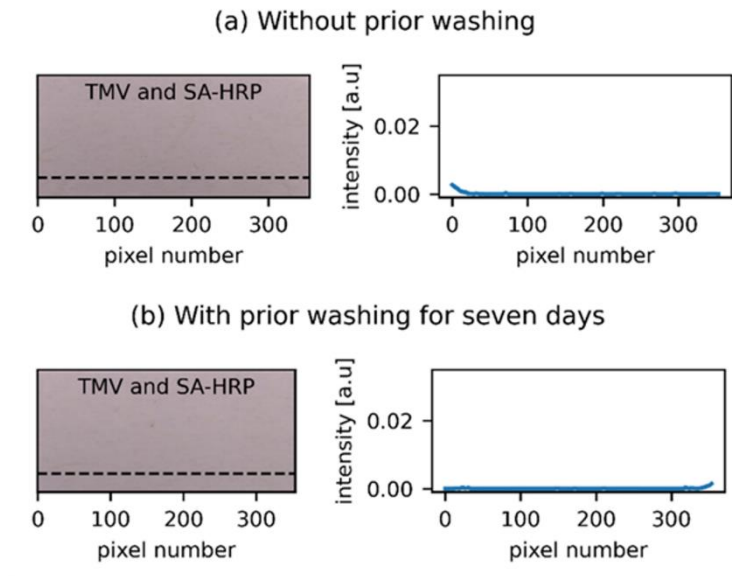


Figure SI 21: Analysis of the enzyme activity in control GM spots anchored on a hydrogel substrate directly after adding ABTS substrate solution (0 min). Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added. As expected, no intensity was detected.

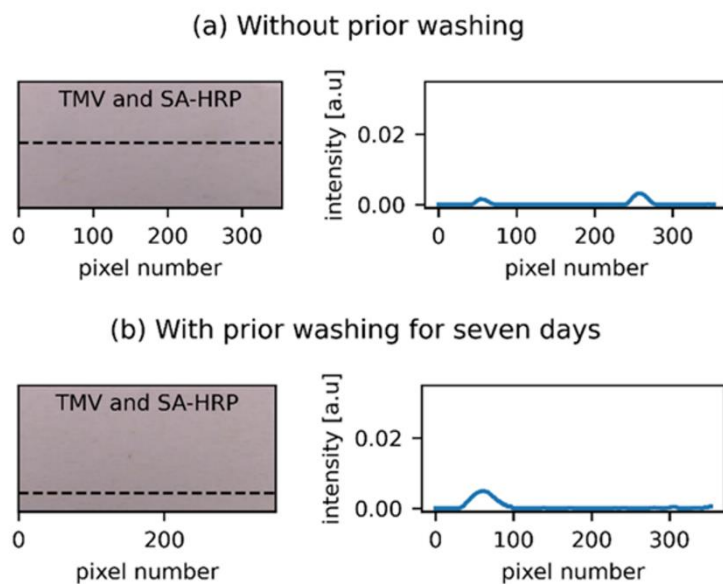


Figure SI 22: Analysis of the enzyme activity in control GM spots anchored on a hydrogel substrate after offering ABTS substrate solution for 20 min. Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. A slight intensity was detected indicating an unspecific binding of some enzyme molecules to the TMV particles. The color reaction was not clearly seen with the bare eye. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added.

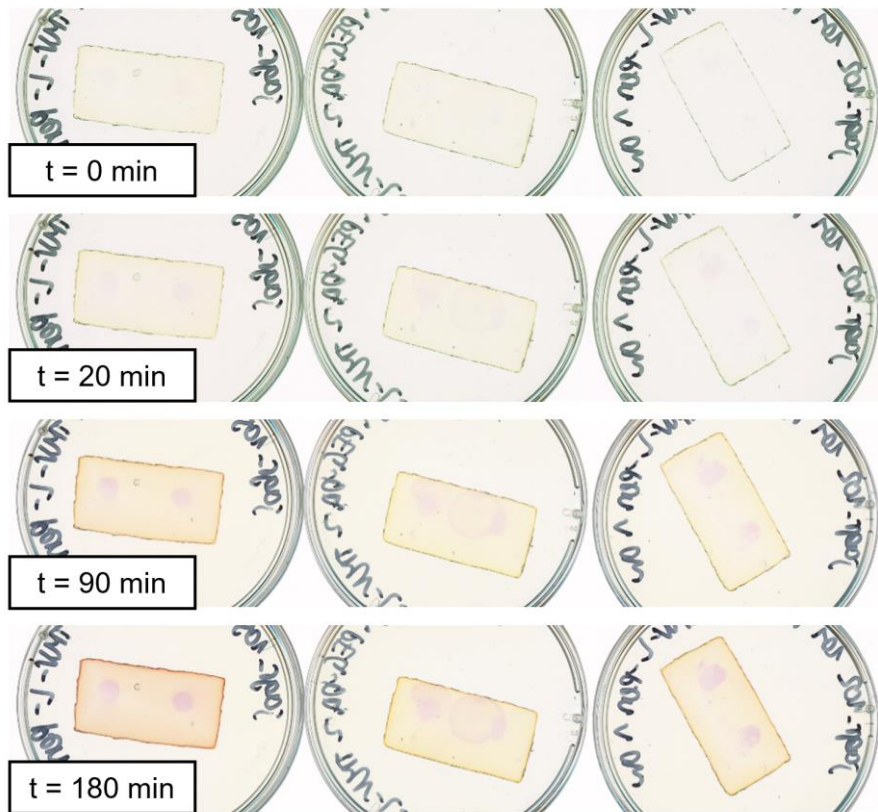
In Table SI 4 the absorption values of the ABTS solution after 25 min contact to the samples are displayed compared to the absorption values of fresh ABTS solution.

*Table SI 4: Absorption values of ABTS solution after 25 min. Hydrogels with GM spots incorporating TMV-HRP conjugate, TMV and SA-HRP or SA-HRP, either non-washed or washed, were kept in the substrate solution for 25 min. The corresponding absorption values of non-used ABTS solution are displayed. Values are listed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).*

<b>Sample</b>	<b>Non-washed</b>	<b>washed</b>
TMV-HRP	$0.077 \pm 0.004$	$0.063 \pm 0.004$
ABTS	$0.059 \pm 0.000$	$0.061 \pm 0.004$
TMV and SA-HRP	$0.062 \pm 0.001$	$0.065 \pm 0.004$
ABTS	$0.059 \pm 0.000$	$0.065 \pm 0.005$
SA-HRP	$0.088 \pm 0.003$	$0.059 \pm 0.001$
ABTS	$0.059 \pm 0.000$	$0.059 \pm 0.000$

For the control GM spots incorporating TMV and unbound SA-HRP, the ratio of absorption values of the ABTS solution after reaction for 25 min to fresh ABTS solution was  $1.055 \pm 0.020$  for non-washed samples and  $1.002 \pm 0.008$  for washed samples. This suggests that the absorption values for used and non-used ABTS solution were similar showing no distinct color reaction.

*Penicillinase (Pen) long-term shelf-life and reusability: activity of pre-used Pen in gelatin methacryloyl (GM) spots after 22 months of dry storage*



*Figure SI 23: Enzyme activity of hydrogel sensor with penicillinase (Pen) after 22 months of dry storage, following its preparation and initial application. Remaining enzyme activity of TMV-Pen conjugates was tested after drying, cold storage and rehydration of the hydrogel samples. After thorough washing of the re-swollen gels, nitrocefin substrate solution was added and pictures were taken at specific time points indicated at the left. Enzyme activity resulted in a red color reaction in the GM spots.*

## 6. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden in den vorangegangenen Kapiteln 3, 4 und 5 in Form von zwei *peer-reviewed* Veröffentlichungen und eines zur Veröffentlichung vorbereiteten Manuskripts dargestellt und diskutiert. In diesem Kapitel werden die formulierten Hypothesen zusammenfassend diskutiert.

### 6.1 Diskussion zu Hypothese I

Polyethylenglykol (PEG) bzw. PEG-Diacrylat (PEG-DA) ist ein synthetisches Polymer, welches vielseitig für die Herstellung von Hydrogelen verwendet wird [32, 33, 45, 47]. Durch die inerten Eigenschaften der dadurch entstehenden Hydrogele ist PEG ein Ausgangsmaterial für viele Funktionalisierungen, um den Hydrogelen gezielte Eigenschaften zu verleihen [30-33, 59, 93, 94, 135]. Makroskopische Polymernetzwerke mit verfügbaren Isothiuroniumgruppen, welche als Polyelektrolytmaterialien dienen können, sind allerdings nicht gängig. Hierzu wurde die erste Hypothese formuliert:

*I.I PEG-DA-Hydrogele können mit dem Surfmere 2-(11-(Acryloyloxy)-undecyl)isothiuroniumbromid (AUITB) funktionalisiert werden. AUITB kann in PEG-DA gelöst werden und sich in Anwesenheit einer hydrophilen Oberfläche (aktivierter Silizium-Wafer) gezielt an der Grenzfläche zwischen hydrophiler Oberfläche und Polymer ausrichten und in den Vernetzungsprozess mit dem Photoinitiator Irgacure 2959 integriert werden. Das Einbringen des Surfmers hat keinen Einfluss auf den Vernetzungsprozess der Proben, weshalb der Quellgrad der Hydrogele vergleichbar ist.*

*I.II Bei funktionalisierten Hydrogelen ergibt die Messung des Zetapotenzials durch die positiv geladenen Isothiuroniumgruppen einen höheren isoelektrischen Punkt (IEP) im Vergleich zu unfunktionalisierten Hydrogelen. Für unfunktionalisierte Hydrogele wird ein IEP bei einem pH-Wert von 4 erwartet.*

*I.III Die Funktionalisierung der Hydrogele mit Isothiuroniumgruppen ist anhand der Messung des Wasserkontaktwinkels, der Oberflächenenergie, einer antimikrobiellen Aktivität und der Adsorption von Diclofenac nachweisbar.*

*I.IV Bei funktionalisierten Hydrogelen können die Isothiuroniumgruppen zu Thiolen reduziert und diese nachgewiesen werden. Die Thiole eignen sich, um über Biokonjugationsreaktionen Enzyme unter Erhaltung ihrer Aktivität an den Hydrogelen zu immobilisieren.*

Die Ergebnisse für die Diskussion dieser Hypothese sind in Kapitel 3 in der Publikation Grübel *et al.*, 2023 dargestellt, welcher detaillierte Informationen entnommen werden können [48].

Die Integration von Isothiuroniumgruppen in Polymernetzwerke ist sehr vielversprechend, da sie durch ihre Ladung potenziell die Wechselwirkung mit Molekülen verstärken können. Andererseits können Isothiuroniumgruppen zu Thiolen reduziert [124-126] und für weitere

Reaktionen, wie dem Binden von Biomolekülen, genutzt werden. Bisher wurde eine Funktionalisierung von makroskopischen Hydrogelen mit Isothiuroniumgruppen unzureichend untersucht. PEG ist ein klassisches Ausgangsmaterial für die Herstellung von Hydrogelen und wird aufgrund seiner positiven Eigenschaften auch für Biosensor-Anwendungen eingesetzt [10, 11, 50, 71, 72]. In dieser Dissertation wurde das *Surfmer* AUITB synthetisiert und mit PEG-DA co-vernetzt, um in einem einfachen Schritt PEG-basierte Polymernetzwerke mit Isothiuroniumgruppen zu funktionalisieren. Damit sollte ein Polyelektrolytmaterial erzeugt werden, welches als Basis für eine Hydrogel-Sensorkomponente beschichtet werden kann. Für die funktionalisierten Proben wurde AUITB in Massenanteilen  $\beta_{\text{AUITB}}$  von 0,1 wt% (PEG-DA-0,1), 0,5 wt% (PEG-DA-0,5), 1,0 wt% (PEG-DA-1), 2,0 wt% (PEG-DA-2) und 3,0 wt% (PEG-DA-3) direkt in PEG-DA gelöst und die Proben UV-vernetzt. Zuerst wurde ein möglicher Einfluss von AUITB auf den Vernetzungsmechanismus der Proben untersucht. Dabei wurde für die Hydrogele PEG-DA-0 (nicht funktionalisiert), PEG-DA-1, PEG-DA-2 und PEG-DA-3 ein vergleichbarer Quellgrad ( $EDS$ ) und eine vergleichbare Gelaubeute ( $Y_g$ ) festgestellt (Figure 1c). Der  $EDS$  war damit ähnlich wie ein zuvor beschriebener  $EDS$  von PEG-DA-Sphären mit 0,49 [40]. Es wurde ein Molekulargewicht zwischen den Vernetzungspunkten ( $M_c$ ) von  $48 \text{ g mol}^{-1}$  für die hier hergestellten Proben bestimmt. Wie beim  $EDS$  ist auch das hier berechnete  $M_c$  in derselben Größenordnung wie bei Mellot *et al.* mit  $62,4 \text{ g mol}^{-1}$  [40]. Zusätzlich bestimmten diese eine Maschenweite ( $\zeta$ ) von 0,98 nm, womit davon ausgegangen werden kann, dass auch die hier hergestellten PEG-DA-Hydrogele eine  $\zeta$  von ca. 1 nm hatten. Ramanspektren einer PEG-DA-0-Probe und einer PEG-DA-3-Probe im Vergleich zu einem Spektrum von unvernetztem PEG-DA implizierten ebenfalls, dass die Vernetzung der Proben ausreichend war (Figure 1d). Ein direkter Beweis der erfolgreichen Integration von AUITB in die Proben konnte anhand der Spektren nicht ausgemacht werden, vermutlich durch den geringen Massenanteil  $\beta_{\text{AUITB}}$ .

Für den Nachweis der Funktionalisierung der Hydrogele wurden zunächst die IEP der Oberflächen bestimmt. Der IEP variierte zwischen  $4,5 \pm 0,1$  (PEG-DA-0) und  $9,0 \pm 0,1$  (PEG-DA-2) und nahm damit bei steigendem  $\beta_{\text{AUITB}}$  signifikant höhere Werte an (Figure 2a original). Für die nicht funktionalisierten PEG-DA-0-Proben war der IEP im erwarteten Bereich [114]. Für PEG-basierte Hydrogele wurde bereits ein isoelektrischer Punkt von ca. 4 gezeigt [259-261]. Bei Oberflächen mit funktionellen Gruppen hat deren  $pK_s$ -Wert, in diesem Fall von Isothiuroniumgruppen, einen großen Einfluss auf den IEP. Bei Isothiuroniumgruppen wird ein  $pK_s$ -Wert im alkalischen pH-Bereich erwartet [264-266]. So wurde beispielweise bei Isothiuronium-funktionalisierten Nanopartikeln, ein IEP von 10,2 bestimmt [112].

Die Ergebnisse legen nahe, dass die Funktionalisierung zu einer Oberflächenladung der zuvor inerten Hydrogele geführt hat und dass die Menge der Isothiuroniumgruppen auf der Oberfläche mit  $\beta_{\text{AUITB}}$  korrelierte. Vorversuche im Rahmen einer Bachelorarbeit hatten zudem gezeigt, dass die gemessenen IEP der funktionalisierten Hydrogele stark schwankten, wenn die Proben direkt oder nach 1 h vernetzt wurden [312]. Im Gegensatz dazu wurden nach einer 5 h Wartezeit mit Kontakt zum aktivierten Silizium-Wafer einheitliche Ergebnisse erzielt, was darauf hindeutet, dass sich das *Surfmer* gleichmäßig in Richtung der Wafer-Oberfläche ausgerichtet hatte.

Zur weiteren Untersuchung der Oberfläche wurden Wasserkontaktwinkelmessungen durchgeführt (Figure 2b). Gemessen mit der *sessile drop*-Methode auf den gequollenen Proben stiegen die Wasserkontaktwinkel (WCA) mit zunehmender Funktionalisierung an. Dabei wurden auf PEG-DA-0-Hydrogelen ein WCA von  $44,7^\circ \pm 2,4^\circ$  und auf PEG-DA-2- bzw. PEG-DA-3-Hydrogelen ein WCA von  $51,8^\circ \pm 1,3^\circ$  bzw.  $49,9^\circ \pm 3,0^\circ$  bestimmt. Die Ergebnisse wurden durch die Bestimmung der Oberflächenenergie (SE) von trockenen PEG-basierten Proben bestärkt, welche für alle Proben vergleichbar war, während die polaren Anteile tendenziell abnahmen. Die steigenden WCA und verringerten polaren Anteile der SE könnten durch die hydrophobe Alkylkette von AUITB zustande kommen. Da die Messung der IEP in wässriger Umgebung auf eine geladene Oberfläche bei zunehmender AUITB-Konzentration hindeutete, wurden die WCA zusätzlich mit der *captive bubble*-Methode bestimmt. Dabei wurde mit  $45,4^\circ \pm 0,5^\circ$  der WCA von gequollenen PEG-DA-0-Hydrogelen, gemessen mit der *sessile drop*-Methode, bestätigt. Für die weiteren Hydrogele zeigte sich allerdings ein gegensätzlicher Verlauf, wobei die berechneten WCA mit zunehmendem  $\beta_{\text{AUITB}}$  sanken und für PEG-DA-3-Hydrogele einen Wert von  $34,6^\circ \pm 2,7^\circ$  annahmen. Diese Ergebnisse bestätigten die Zetapotenzialmessungen, was die Schlussfolgerung zuließ, dass sich die Isothiuroniumgruppen unterschiedlich ausrichten konnten. Gebunden an die flexible Alkylkette des *Surfmers*, konnten sie, abhängig vom sie umgebenden Medium, die Konformation ändern. Dies lässt vermuten, dass bei Kontakt mit unpolare Luft, wie bei einer trockenen Probe, die Alkylkette an der Oberfläche präsentiert wurde, während bei Kontakt mit hydrophilem Wasser die Isothiuroniumgruppen nach außen zeigten. Ähnlich zu den hier durchgeführten Versuchen stellten Bongiovanni *et al.* Acrylfilme her und fügten dabei Acrylmonomere mit unterschiedlich langen Alkylketten zu einem Epoxyacrylharz hinzu [270]. Dabei war eine Seite zu einem Glassubstrat orientiert und die andere zu einer inerten Atmosphäre. Es wurde von einer asymmetrischen Verteilung der Monomere, abhängig von der Länge der Alkylkette und der Monomerkonzentration berichtet. Und es wurden steigende Vorrückwinkel auf der Filmoberfläche festgestellt, wenn diese in Richtung der inerten Atmosphäre orientiert war [270]. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die Art der Probenherstellung mit aktivierten Silizium-Wafern die Isothiuroniumgruppen auf der Oberfläche der PEG-basierten Proben präsent waren. Ebenfalls deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich die Oberfläche der PEG-DA-2-Proben nicht signifikant von den PEG-DA-3-Proben unterschied. Womöglich war die Oberfläche mit 2 wt% AUITB bereits mit Isothiuroniumgruppen gesättigt.

Da Isothiuroniumgruppen eine antibakterielle Aktivität zugeschrieben wird [112], wurden PEG-DA-0- und PEG-DA-2-Proben anhand der Norm ISO 22196 mit *Escherichia coli* (*E. coli*) DSM 1576 bewertet (Figure SI 6). Es zeigte sich eine leichte Tendenz zu weniger Bakterien auf den PEG-DA-2-Proben im Vergleich zu den PEG-DA-0-Proben, allerdings aber keine eindeutige antimikrobielle Aktivität.

Für eine potenzielle Anwendung des neu generierten Polyelektrolytmaterials wurde die Adsorption des gängigen Medikaments Diclofenac in der ionischen Form als Diclofenac-Natriumsalz untersucht. Die Isothermen der mit Isothiuroniumgruppen funktionalisierten PEG-DA-1-, PEG-DA-2- und PEG-DA-3-Hydrogele zeigten einen ähnlichen Verlauf und



erreichten ein Plateau (Figure 2c). Die Adsorptionskapazität  $q_m$  nahm dabei Werte bis zu  $74,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  an und stieg proportional zu  $\beta_{\text{AUITB}}$  (Table 1). Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass die Isothiuroniumgruppen in den Hydrogelen die Adsorption von Diclofenac vermutlich durch Ionenaustausch bedingten. Bei den PEG-DA-0-Hydrogelen dahingegen war die Adsorptionsisotherme nahezu linear ohne das Erreichen eines Plateaus, was auf eine unspezifische Adsorption hindeutete. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die These, dass die eingebrachten Isothiuroniumgruppen stark mit dem Diclofenac-Anion wechselwirkten und dass die Adsorptionskapazität  $q_m$  durch  $\beta_{\text{AUITB}}$  eingestellt werden konnte. Für die PEG-DA-3-Hydrogele wurde eine Gleichgewichtskonstante  $K_s$  von  $192 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1}$  bestimmt und war damit höher als bei funktionalisierten Ethylenglykol-Dimethacrylat (EGDMA)-NP mit  $0,1663 \text{ L mg}^{-1}$  ( $53 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1}$ ) als auch bei Graphenoxid-Chitosan-Hydrogelen mit  $0,336 \text{ ppm}^{-1}$  ( $107 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1}$ ) [95, 271].

Nachdem die Funktionalisierung der PEG-basierten Hydrogele mit Isothiuroniumgruppen bestätigt werden konnte, wurde untersucht, ob diese noch frei zugänglich in der Hydrogelmatrix vorlagen. Isothiuroniumgruppen können als Vorläufer für Thiole dienen [124-126], welche für weitere Reaktionen, wie Biokonjugationen, genutzt werden können. Deshalb wurden die Proben mit Natriummetabisulfit behandelt, um die Isothiuroniumgruppen zu Thiolen zu reduzieren. Die behandelten Proben werden im Folgenden durch den Zusatz „T“ (*treated*) beschrieben. Kontrollproben, die die gleichen Waschschrte durchlaufen haben, sind mit dem Zusatz „NT“ (*non-treated*) gekennzeichnet. Zunächst wurde die erfolgreiche Behandlung anhand der Zetapotenzial-Messung überprüft (Figure 2a *treated*), wobei für die IEP der funktionalisierten PEG-DA-T-Hydrogele vergleichbare Werte wie für die unbehandelten PEG-DA-0-Hydrogele gemessen wurden. Dies lässt darauf schließen, dass der IEP vorrangig durch die Adsorption von Hydroxidionen aus der Elektrolytlösung zustande kam [260, 262, 263].

Um die Thiolgruppen weiter nachzuweisen, wurde eine Fluoreszenzfärbung mit einem Maleimid-gekoppelten Farbstoff durchgeführt, da dieser über eine Thiol-Michael-Reaktion kovalent an die Thiole im Hydrogel binden kann. Für die funktionalisierten behandelten Proben wurden steigende Fluoreszenzintensitäten mit höherem  $\beta_{\text{AUITB}}$  festgestellt (Figure 3a), während die nicht behandelten Proben, welche Isothiuroniumgruppen enthielten, weniger angefärbt wurden und die nicht funktionalisierten PEG-DA-0-NT- und die PEG-DA-0-T-Proben nahezu keine Fluoreszenz zeigten. Bei den funktionalisierten NT-Proben, welche Isothiuroniumgruppen enthielten, kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene Fluoreszenz durch eine elektrostatische Interaktion des negativ geladenen Farbstoffs mit den Isothiuroniumgruppen zustande kam. Derselbe Farbstoff wurde schon verwendet, um die Cysteinmutanten des Tabakmosaikvirus ( $\text{TMV}_{\text{Cys}}$ ) sichtbar zu machen, indem der Farbstoff an die Thiole des  $\text{TMV}_{\text{Cys}}$  band [230]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Isothiuroniumgruppen erfolgreich zu Thiolen reduziert wurden und damit noch intakt und zugänglich in den Proben vorlagen. Außerdem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Menge an verfügbaren Isothiuroniumgruppen und damit Thiolen mit zunehmendem  $\beta_{\text{AUITB}}$  anstieg. Daher wurde auch in diesem Fall eine kontrollierbare Funktionalisierung der Proben gezeigt.

Um die Anbindung von Biomolekülen an die Hydrogele über die Thiole zu demonstrieren, wurde das Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) an die Proben

gebunden. Dafür wurde ein Biotin-funktionaler Linker mit einer Maleimidgruppe genutzt, der durch die starke Biotin-Streptavidin (SA)-Interaktion, die SA-gekoppelte HRP an die Hydrogele binden konnte. Dabei wurde einem ähnlichem Protokoll gefolgt wie bei Koch *et al.* [132]. Die Aktivität der SA-HRP wurde über die Farbreaktion ermittelt, bei welcher 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid zum grünen ABTS<sup>+</sup> oxidiert wird, welches photometrisch gemessen werden kann (Figure 3d) [313, 314]. Wie erwartet zeigten die PEG-DA-2T-Proben mit Linker die höchste Absorption, da durch die Thiole der Linker kovalent gebunden werden konnte, über welchen das Enzym gekoppelt wurde. Ohne Linker konnte das Enzym nur unspezifisch an die PEG-DA-2T-Proben gebunden werden, weshalb die Absorption geringer war. Ähnlich zur Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs, konnte auch hier für die Isothiuronium-funktionalisierten Proben (PEG-DA-2NT) eine Enzymbindung festgestellt werden. Dies deutet wieder auf eine Wechselwirkung zwischen den Isothiuroniumgruppen und dem Maleimid hin und ebenfalls auf einen Effekt der Gruppen bezüglich einer unspezifischen Proteinadsorption (Figure SI 10). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Thiole als Ausgangspunkt für weitere Reaktionen wie Biokonjugationsreaktionen genutzt werden können und auch, dass sich die PEG-basierten Hydrogele als biosensorische Oberfläche eignen.

Folglich kann die erste Hypothese der Dissertation hauptsächlich bestätigt werden. Die Funktionalisierung der PEG-basierten Proben mit Isothiuroniumgruppen war über die IEP und die WCA messbar. Zudem konnte eine Reorientierung der funktionellen Gruppen in Abhängigkeit des umgebenden Mediums festgestellt werden. Durch die Funktionalisierung konnten keine eindeutigen antimikrobiellen Eigenschaften der Proben festgestellt werden. Dennoch können sie Anwendung als Adsorbermaterial für anionische Medikamente, gezeigt am Beispiel von Diclofenac, finden. Die erfolgreiche Reduktion der Isothiuroniumgruppen zu Thiolen wurde ebenfalls gezeigt, was auch die bestehende Funktionalität und Verfügbarkeit der Isothiuroniumgruppen bestätigte. Die Thiole konnten sowohl nachgewiesen als auch für eine Biokonjugationsreaktion genutzt werden. Da die Oberflächen der PEG-DA-2-Proben vergleichbar zu denen der PEG-DA-3-Proben waren, wurden in folgenden Versuchen PEG-DA-2-Proben verwendet. Somit wurden multifunktionale Hydrogele auf PEG-Basis erstellt, welche in weiteren Schritten als Biosensorkomponente untersucht werden konnten.

### 6.2 Diskussion zu Hypothese II

Biobasierte Hydrogele werden vielseitig für Anwendungen im Bereich Biosensoren, *Drug Delivery* oder *Tissue Engineering* (TE) untersucht [6, 25, 166, 205, 206, 315]. Grundlegende Eigenschaften wie der *EDS* und die  $Y_g$  geben Aufschluss über den Vernetzungsgrad der Hydrogele. Der *EDS* kann durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise die Konzentration an Vernetzer oder Polymer, Integration weiterer Bestandteile in das Polymernetzwerk oder dem Quellmedium beeinflusst werden [2-4, 22, 32, 33, 316, 317]. In dieser Dissertation wurden Hydrogele auf Basis von methacryloylierter Gelatine (GM) auf verschiedene Arten hergestellt und charakterisiert, um sie später als Matrix für eine Verkapselung von Enzymen zu nutzen. Das GM-Hydrogel sollte dabei als orts aufgelöste Beschichtung auf die PEG-basierten

Hydrogele aus Hypothese I aufgebracht werden. Als Vorversuche wurden zum einen GM<sub>10</sub>-Hydrogele gegossen und mit Glykosaminoglykanen (GAG) funktionalisiert. Zum anderen wurden GM<sub>10</sub>-Hydrogele über 3D-oder *Inkjet*-Druck erzeugt. Es wurde folgende zweite Hypothese formuliert:

*II.I GM<sub>10</sub>-basierte Hydrogele werden mit Chondroitinsulfat oder biotechnologisch hergestelltem nicht sulfatiertem Chondroitin funktionalisiert, indem die Glykosaminoglykane vor der Photovernetzung in die Hydrogelvorläuferlösung integriert werden. Durch die Funktionalisierung verringert sich der Quellgrad der Hydrogele und die Speicher- und Verlustmoduln nehmen zu.*

*II.II Der Photoinitiator Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) ist geeignet für die 2-Photonen-Polymerisation von GM<sub>10</sub>-Lösungen. Durch geeignete Einstellungen der Parameter, wie Scan-Geschwindigkeit und Laser-Leistung werden vergleichbare Quellgrade, Gelaubeuten und Speichermoduln der Hydrogele erzielt wie bei UV-vernetzten Hydrogelen.*

*II.III Es können geeignete Parameter ermittelt werden, um eine GM<sub>10</sub>-Lösung mittels Inkjet-Druck reproduzierbar zu drucken und Oberflächen damit orts aufgelöst zu beschichten. Die GM<sub>10</sub>-Spots, aufgebracht über Drucken oder Pipettieren, können in einer sauerstoffarmen Umgebung ausreichend vernetzt werden.*

Die hier diskutierten Ergebnisse zu Hypothese II.I und daran anknüpfende Ergebnisse sind der Veröffentlichung von Vassallo *et al.*, 2022 zu entnehmen [235]. Die Ergebnisse für die Diskussion der Hypothese II.II sind in Kapitel 4 dargestellt [236]. Die Ergebnisse für die Diskussion der Hypothese II.III sind in Kapitel 5 in der Publikation Grübel *et al.*, 2023 gezeigt [237].

Für die Bearbeitung dieser Hypothese wurden GM-Hydrogele mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der Hydrogelvorläuferlösungen erzeugt. Als PI diente jeweils LAP. Durch den Zusatz von (Bio-)Molekülen in Polymernetzwerke können die Eigenschaften von Hydrogelen stark beeinflusst werden. Dies wurde anhand von GM-Hydrogelen, funktionalisiert mit GAG, im ersten Teil der Hypothese II untersucht. Die Funktionalisierung sollte zu einer höheren Steifigkeit der GM-Hydrogele führen, womit filigrane Strukturen stabiler wären. In diesem Fall wurde Chondroitinsulfat verwendet, welches auch im Knorpel-TE eingesetzt wird [318, 319]. Beim Chondroitinsulfat (CS) stehen marine und terrestrische tierische Quellen zur Verfügung, welche sich in ihren MW und Sulfatierungsmustern unterscheiden [320-322]. CS gilt als antiinflammatorisch und kann das Zellwachstum unterstützen [320, 321]. Das nicht sulfatierte biotechnologisch hergestellte Chondroitin (BC) wird über einen biofermentativen Herstellungsprozess erzeugt [323]. Es wurde gezeigt, dass es im Vergleich zu CS *in vitro* effektiver beim Entgegenwirken von Osteoarthritis bezogenen Entzündungsreaktionen ist [324, 325] und konnte *in vitro* den Phenotyp von humanen nasalen Chondrozyten länger erhalten als CS [325]. Da BC ähnlicher zum marinen CS als zum terrestrischen CS ist, wurden die beiden ersten in den hier dargestellten Untersuchungen miteinander verglichen. Es wurden nicht funktionalisierte 10 wt% GM<sub>10</sub>-Hydrogele mit funktionalisierten Hydrogelen mit entweder

10 wt% GM<sub>10</sub> und 2,5 wt% BC (GM<sub>10</sub> + BC) oder 10 wt% GM<sub>10</sub> und 2,5 wt% CS (GM<sub>10</sub> + CS) verglichen. Die unfunktionalisierten GM<sub>10</sub>-Hydrogele waren transparent, während die funktionalisierten trüb waren. Bei den unfunktionalisierten Hydrogelen war der mittlere *EDS* 1476,2 % in PBS und 1393,3 % in H<sub>2</sub>O (s. Vassallo *et al.*, 2022 Figure 1B [235]). Durch den Zusatz von BC oder CS wurde der *EDS* der Hydrogele bei beiden Quellmedien signifikant reduziert. Nach dem Quellen in H<sub>2</sub>O hatten die GM<sub>10</sub> + BC-Hydrogele einen mittleren *EDS* von 949,5 %, während für die GM<sub>10</sub> + CS-Hydrogele ein mittlerer *EDS* von 1002,9 % bestimmt wurde. Dies deutete auf ein dichteres Netzwerk mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der GM<sub>10</sub> und den GAG hin. Durch die semi-interpenetrierenden Strukturen könnte es zu einer Reduktion des ionischen osmotischen Drucks gekommen sein, wie zuvor beschrieben für Gelatine-Hyaluronsäure (HA)- oder Gelatine-HA-BC-Hydrogele [326].

Für die rheologische Charakterisierung wurden von den in PBS gequollenen Hydrogelen oszillatorische Deformationsamplitudentests (*strain amplitude sweeps*) bei gleichbleibender Frequenz gemessen. Zudem wurden der Speicher- und Verlustmodul ( $G'$  bzw.  $G''$ ) als Funktion der Frequenz bei einer definierten Deformation  $\gamma$  bestimmt. Bei geringeren Amplituden war  $G'$  signifikant höher als  $G''$ . Das Verhältnis aus  $G''/G'$  ( $\tan \delta$ ) war damit immer deutlich  $< 1$  und zeigte das Verhalten eines viskoelastischen Festkörpers [327]. Außerdem wurde  $G'$  durch Hinzufügen der GAGs zu den Hydrogelen signifikant erhöht. Die unfunktionalisierten GM<sub>10</sub>-Hydrogele hatten einen  $G'$  von ca. 10,5 kPa, während er bei den funktionalisierten Hydrogelen ungefähr verdoppelt wurde. Bei den GM<sub>10</sub> + BC-Hydrogelen und GM<sub>10</sub> + CS-Hydrogelen nahm  $G'$  Werte von ca. 26,9 kPa bzw. ca. 20,5 kPa an (s. Vassallo *et al.*, 2022 Figure 2 [235]). Damit wurde bei den funktionalisierten Hydrogelen durch die GAGs die Steifigkeit erhöht. Dies war für die GM<sub>10</sub> + BC-Hydrogele noch etwas verstärkt. Die hier ermittelten Daten bestätigen aus unserer Arbeitsgruppe bereits berichtete  $G'$  von 10 wt% GM<sub>10</sub>-Hydrogelen bei einem ähnlichen Messaufbau bei 37 °C im linear-viskoelastischen Bereich [23]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich eine Funktionalisierung der GM-Hydrogele mit BC besonders dafür eignet, um Hydrogele mit einer erhöhten Steifigkeit zu erzeugen. Dies kann sehr relevant sein, um die Stabilität filigraner Hydrogelstrukturen ausreichend zu erhöhen. Daher stellen diese Versuche wichtige Voruntersuchungen dar.

Der zweite Teil der Hypothese II widmet sich der Herstellung von GM<sub>10</sub>-Hydrogelen, bei welchen die Vernetzung über eine 2-Photonen-Polymerisation (2PP) unter Verwendung eines 800 nm *Lasers* stattfand [236]. Der 2PP-Druck ist bekannt für seine hohe Auflösung und ist dadurch besonders geeignet, um filigrane Strukturen zu erzeugen und könnte daher ein relevantes Verfahren sein, um strukturierte Hydrogel-basierte Sensorschichten zu generieren. Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass für den 2PP-Druck oft genutzte Photoinitiatoren (PI), wie beispielsweise Rose Bengal, fluoreszieren und deshalb Fluoreszenzfärbungen von mit Zellen besiedelten Strukturen beeinträchtigen können [6, 166], sollte in diesem Fall getestet werden, ob sich der in dieser Dissertation verwendete PI LAP auch für den 2PP-Druck eignet. Diese Versuche wurden in einer Kooperation am Institut für Strahlformung IFSW mit einem dort entwickelten optischen Aufbau durchgeführt. Zunächst wurde eine LAP-Lösung in PBS-Puffer mit unterschiedlichen *Laser*-Intensitäten ( $I$ ) und Belichtungszeiten bestrahlt, um die Spaltung von LAP über die Veränderung der LAP-Konzentration [ $LAP$ ] zu untersuchen. Es

wurde angenommen, dass die Spaltung der LAP-Moleküle einer Reaktionskinetik pseudoerster Ordnung folgt. Die initiale Reaktionsrate  $r_0$  muss proportional zu  $I^2$  sein, definiert durch die *Laser*-Leistung  $P$  und *Scan*-Geschwindigkeit  $v$  (Equation 12). Beim Auftragen der Daten in einen doppellogarithmischen Plot von  $r_0$  gegen die  $P$  wurde wie erwartet eine Steigung der linearen Regression mit einem Wert von 2,02 bestimmt (Figure SI 13). Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Spaltung von LAP nach einer Zweiphotonenabsorption erfolgte, womit sich der PI für die geplanten Versuche eignete.

Im Anschluss wurden makroskopische GM<sub>10</sub>-Hydrogele mittels 2PP erzeugt, indem verschiedene Druckparameter für die Vernetzung getestet wurden. Die Eigenschaften der Hydrogele wurden mit welchen, die über UV-Strahlung vernetzt wurden, verglichen. Für die Bestrahlung der Hydrogele wurde ein *TopHat*-Aufbau von 0,5 x 3 mm<sup>2</sup> mit homogener Intensitätsverteilung verwendet (Figure SI 12). Dabei wurde in die 3 mm Richtung mit einem Überlapp von 100 µm gescannt, während der Überlapp in der 0,5 mm Richtung von den verwendeten Geschwindigkeiten  $v$  abhängig war. Hierbei war der Überlapp definiert als  $v/1000$  Hz, da der *Laser* jede Millisekunde pulste. Die sich daraus ergebenden theoretischen Bestrahlungsdosen bei den verschiedenen  $v$  und  $P$  sind Table SI 2 zu entnehmen. Es wurden jeweils  $P$  von 1,7 W, 2,38 W und 3,06 W eingestellt, um Hydrogele zu drucken und deren Eigenschaften mit GM<sub>10</sub>-Hydrogelen aus derselben Vorläuferlösung aber mit UV-Vernetzung verglichen. Daraus ergaben sich für  $P^2 v^{-1}$  Werte von 0,96 W<sup>2</sup> s mm<sup>-1</sup>, 1,54 W<sup>2</sup> s mm<sup>-1</sup> und 2,12 W<sup>2</sup> s mm<sup>-1</sup>. Über den 2PP-Druck war es möglich, Hydrogele mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Höhe von 1 mm innerhalb weniger Minuten zu vernetzen. Die  $EDS$  und  $Y_g$  ergaben, dass nur bei den beiden höheren Werten für  $P^2 v^{-1}$  über 2PP vergleichbare Hydrogele wie über UV-Vernetzung hergestellt werden konnten. Bei geringeren Werten für  $P^2 v^{-1}$  von 0,96 W<sup>2</sup> s mm<sup>-1</sup> war der  $EDS$  deutlich höher bzw. die  $Y_g$  deutlich geringer mit 25,6 bzw. 0,5 bei 3,06 W im Vergleich zu einem  $EDS$  von 4,8 und einer  $Y_g$  von 1,0 der Referenzhydrogele (Figure SI 15A, B). Dies war auf eine unzureichende Vernetzung zurückzuführen. Die rheologischen Messungen ergaben, dass die  $G'$  der 2PP-ernetzten Hydrogele mit  $P^2 v^{-1}$  von 2,12 W<sup>2</sup> s mm<sup>-1</sup> trotz nahezu vergleichbaren  $EDS$  und  $Y_g$  deutlich geringer waren als die der Referenzhydrogele. Letztere hatten einen  $G'$  von  $2,7 \times 10^5$  Pa, während die 2PP-Hydrogele höchstens einen  $G'$  von  $1,2 \times 10^5$  Pa erreichten (Figure SI 15C). Damit war die Herstellung von 2PP-ernetzten Hydrogelen zwar erfolgreich aber die Hydrogele besaßen eine geringere Steifigkeit. Dies könnte damit begründet sein, dass die UV-bestrahlten Hydrogele flächiger und damit gleichmäßiger vernetzt wurden. Durch die höhere GM-Konzentration von 25 wt% anstatt 10 wt% wurden deutlich größere  $G'$  als bei den GM-Hydrogelen aus Hypothese II.I erreicht. Mit einer zusätzlichen Funktionalisierung mit CS oder BC könnten demnach wahrscheinlich noch höhere  $G'$  erzielt werden. Diese Versuche machten deutlich, dass der 2PP-Druck grundsätzlich ein geeignetes Verfahren ist, um GM-Lösungen mit LAP zu vernetzen. Dies eröffnet die Möglichkeit, filigrane GM-Hydrogele zu drucken. Außerdem erlaubte der optische Aufbau am IFSW die Druckparameter vielseitig einzustellen und die Strukturen in kurzer Zeit zu drucken. Dementsprechend können andere Einstellungen das Druckergebnis von filigranen Strukturen ermöglichen, wie im Manuskript [236] beschrieben.

Der dritte Teil dieser Hypothese beschäftigt sich ebenfalls mit dem Druck von GM<sub>10</sub>-Lösung, wobei der *Inkjet*-Druck verwendet wurde. Dieser sollte als weitere Methode untersucht werden, um filigrane GM-Strukturen, in diesem Fall in Form von *Spots* zu generieren. Somit war es möglich, mit einem vorgegebenen Muster eine Vielzahl von *Spots* in kurzer Zeit zu erhalten, die analysiert werden konnten. Es wurden verschiedene Konzentrationen der GM<sub>10</sub>-Lösung getestet, wobei 7,5 wt% am geeignetsten waren. Eine geringere Konzentration von 5 wt% führte zu einem Spritzen der Tinte während des Druckes, während eine höhere Konzentration von 10 wt% die Druckdüsen verstopfte und das *Spot*-Muster nicht vollständig erzeugt werden konnte [328]. Die LAP-Konzentration wurde mit 0,7 wt% bezogen auf die GM-Masse hoch angesetzt, um einer möglichen Sauerstoffinhibition entgegenzuwirken, da die *Spots* frei auf eine Oberfläche (Glasobjektträger oder PEG-basierte Hydrogele) gedruckt wurden. Als Substrate wurden final gequollene PEG-basierte Hydrogele gewählt (s. Diskussion zu Hypothese III), da Vorversuche gezeigt hatten, dass die *Spots* auf trockenen PEG-DA-Proben kleiner und unförmiger waren [328].

Es wurden verschiedene Drucktemperaturen getestet. Bei 37 °C wurde ein Verkleben der Druckdüsen beobachtet, vermutlich weil der PBS-Puffer in der Drucktinte zu schnell verdampfte [83]. Der Druck bei niedrigeren Temperaturen war dabei verlässlicher. Final wurde eine Drucktemperatur von 28 °C gewählt, da dies die niedrigste Temperatur war, die am Drucker eingestellt werden konnte. Hoch *et al.* berichteten, dass mit 10 wt% und 15 wt% GM-Tinten mit ähnlichem Methacryloylierungsgrad bei 37 °C der *Inkjet*-Druck nach einer 3 min Pause nicht mehr fortgesetzt werden konnte [83]. Temperaturen unter 37 °C können zudem vorteilhaft sein, wenn Zellen in die Drucktinte integriert werden. Geringere Temperaturen können biologische Systeme stabilisieren, da u. a. die Zellviabilität weniger stark von Scherkräften beeinträchtigt wird [329]. Dies könnte auch für den Druck von Enzymen relevant sein. Der Druckkopf besaß 16 Düsen, die einen Abstand von 254 µm voneinander hatten. Dies ermöglichte einen minimalen Tropfenabstand von 5 µm, was ca. 5080 dpi entsprach. Um denselben Druckkopf mehrmals verwenden zu können, wurde die Kartusche modifiziert und eine 1 mL Spritze angebracht, die über eine 3D gedruckte Halterung, die im Druckkopf verankert werden konnte, fixiert wurde [330]. Damit war es einfach möglich, verschiedene Tinten zu verwenden, indem die Spritze ausgewechselt wurde. Für den Druck wurde eine Wellenformlänge von 26,88 µs, eine *Jet*-Frequenz von 2 kHz und einen Meniskus von 5 Zoll Wassersäule gewählt. Die Spannung, welche der Amplitude der Wellenform entspricht, wurde in der Regel auf 29 V eingestellt, da dies einer geeigneten Geschwindigkeit der Tropfen entsprach, und wurde bei Bedarf variiert, beispielweise wenn der Druckkopf schon mehrmals verwendet wurde. Das Druckmuster mit einer Auflösung von 5080 dpi bestand aus neun mal vier *Spots* mit einem Durchmesser von je 0,25 mm und einem Abstand von 2 mm zueinander. Zunächst wurde die Drucktinte anhand der Viskosität und der Oberflächenspannung charakterisiert (Figure SI 18). Die Viskosität war in einem Scherraten-Bereich von 10 s<sup>-1</sup> bis 1000 s<sup>-1</sup> nahezu konstant und nahm einen Wert von (3,20 ± 0,83) mPa s an. Sie war ähnlich zu einer zuvor beschriebenen Viskosität einer 10 wt% GM<sub>10</sub>-Lösung bei 25 °C [83]. Die Oberflächenspannung war mit (58,03 ± 0,38) mN m<sup>-1</sup> beim kleinsten Blasenalter von (14,33 ± 0,58) ms etwas höher als bei typischen Tinten für den *Inkjet*-Druck [298]. Ebenso

wurde die Zahl  $Z$  bestimmt, welche sich als Reziproke der Ohnesorge ( $Oh$ )-Zahl aus der Weber ( $We$ )- und Reynolds ( $Re$ )-Zahl ergibt und die Stabilität der Tropfenbildung beschreibt. Werte  $1 < Z < 10$  entsprechen einer stabilen Tropfenbildung. Für geringere  $Z$ -Werte ist die Viskosität der Tinte zu hoch für den Druck, während bei höheren  $Z$ -Werten Satellitentropfen entstehen [156, 157]. Der für die hier genutzte Tinte berechnete  $Z$ -Wert lag bei  $11,96 \pm 2,31$ . Zur Berechnung der  $We$ - und  $Re$ -Zahl wird die Geschwindigkeit benötigt, mit welcher die Tropfen aus der Düse treten. Diese konnte hier nur abgeschätzt werden. Schuster *et al.* nutzten das *reactive Inkjet Printing* mit mehreren Tinten, um Polyurethan-Strukturen zu erzeugen [331]. Dafür wurde ein ähnlicher Dimatix-Drucker, die gleichen Druckköpfe und eine Frequenz von 2 kHz genutzt. Für die verschiedenen Tinten wurde eine Tropfengeschwindigkeit von  $4 \text{ m s}^{-1}$  bis  $5 \text{ m s}^{-1}$  bei Amplituden von 20,0 V bis 22,5 V bestimmt. Daher kann angenommen werden, dass die Tropfengeschwindigkeit der hier verwendeten GM<sub>10</sub>-Tinte in einem ähnlichen Bereich lag. Wie erwartet, haben sich bei dem Druck Satellitentropfen gebildet. Allerdings haben diese sich in der Regel mit dem Haupttropfen verbunden und damit keine Abweichung des Druckmusters hervorgerufen. Im Endeffekt wurde ein Abstand von Druckkopf zu Substrat von 500  $\mu\text{m}$  gewählt, sodass der Abstand groß genug war, damit sich die Satellitentropfen mit dem Haupttropfen verbinden konnten. Bei geringeren Abständen wurde eine Beeinträchtigung des Druckmusters anhand von zusätzlichen, kleineren Tropfen festgestellt.

Nachdem sichergestellt war, dass die GM<sub>10</sub>-Spots reproduzierbar gedruckt werden konnten, wurden sie UV-vernetzt. Eine ausreichende Vernetzung war notwendig, um in einem späteren Schritt für Hypothese III Enzyme bzw. TMV-Enzym-Konjugate darin zu verkapseln. Der Drucker, die Tinte und die Proben wurden vor Licht geschützt, um eine vorzeitige Vernetzung der Tinte zu verhindern. Darauf wurde besonders geachtet, da LAP auch bei Wellenlängen im sichtbaren Bereich bis 420 nm angeregt wird [332]. Dies hat den Vorteil, dass Hydrogele, die Zellen oder Proteine beinhalten, mit einer geeigneten Lichtquelle schonender vernetzt werden können, um sie vor einer möglichen Beschädigung bei Bestrahlung mit reinem UV-Licht zu schützen [333].

Die Vernetzung der Spots wurde auf zwei Arten untersucht: zum einen über eine Analyse der Spots mittels Raman-Mikroskopie und zum anderen über die Integration von fluoreszierenden Partikeln in die Drucktinte und Untersuchung der Proben am Mikroskop. In ersten Versuchen wurden die bedruckten Proben in eine befeuchtete Petrischale gegeben und vernetzt [328]. Es wurde beobachtet, dass nach einer Lagerung der Proben in Wasser die Spots kleiner wurden oder teilweise verschwunden waren. Es wurden Raman-Spektren der getrockneten Hydrogele aufgenommen und festgestellt, dass die typische Bande der C=C-Streckschwingung bei  $1680\text{-}1620 \text{ cm}^{-1}$  noch vorhanden und damit vergleichbar zu nicht vernetzter GM<sub>10</sub> war (Figure 9c). Daraus konnte geschlossen werden, dass die GM<sub>10</sub>-Spots nicht oder nur unzureichend vernetzt wurden. Aus diesem Grund wurde eine Aluminiumform mit einer ovalen Vertiefung gefertigt, in welche die bedruckten Hydrogele hineingelegt und mit befeuchtetem Argon während der UV-Bestrahlung gespült wurden. Das Argon wurde befeuchtet, da in Vorversuchen der Kaffeeing-Effekt durch eine Verdunstung der Flüssigkeit beobachtet wurde [154, 334]. Dabei ist die Verdunstung am Rand des Tropfens am größten. Es liegt ein sogenanntes *Pinning* vor, wobei die Kontaktlinie zwischen Tropfen und Substrat fixiert ist. Der kontinuierliche Fluss der

Lösung und der darin enthaltenen Partikel von der Mitte zum Rand des Tropfens führt zu einer erhöhten Partikelkonzentration am Rand des Tropfens [154, 334]. Die Proben, die unter Argonfluss und damit bei einer geringeren Sauerstoffkonzentration vernetzt wurden, wurden ebenfalls mittels Raman-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Bande der C=C-Streckschwingung bei  $1680\text{ cm}^{-1}$  bis  $1620\text{ cm}^{-1}$  vergleichbar minimiert war wie bei einem herkömmlich in einer Form hergestellten GM<sub>10</sub>-Hydrogel, welches bei gleicher Intensität vernetzt wurde. Um die Vernetzung auch visuell beurteilen zu können, wurden fluoreszierende NP in die Drucktinte integriert. Die NP hatten einen Durchmesser von 100 nm und waren damit größer als die erwartete Maschenweite  $\xi$  des GM<sub>10</sub>-Hydrogels [38, 204]. Außerdem überstieg der Durchmesser der NP, wie in Hypothese I diskutiert, auch deutlich die  $\xi$  des darunter liegenden PEG-basierten Hydrogels und konnten daher nicht hinein diffundieren [40, 335, 336]. Nach 21 Tagen waren nur die *Spots*, die mit Argon vernetzt wurden, noch intakt und sichtbar rot angefärbt (Figure 9a). Die Ergebnisse der Ramanspektren als auch der Fluoreszenzbilder zeigten, dass der befeuchtete Argonfluss notwendig war, um die *Spots* ausreichend zu vernetzen. Es wurde bereits berichtet, dass die radikalische Polymerisation mit PI sauerstoffempfindlich ist und nicht vollständig ablaufen kann [299-302, 337], weshalb Inertgase verwendet werden, um die inhibierende Wirkung von Sauerstoff zu minimieren [85, 338]. Demnach wurde durch den Argonfluss die Sauerstoffkonzentration ausreichend verringert, sodass der Mechanismus der radikalischen Vernetzung nicht beeinträchtigt wurde. Somit kann die zweite Hypothese dieser Dissertation größtenteils bestätigt werden. Durch die Integration der GAG in makroskopische GM-Hydrogele nahmen  $G'$  und  $G''$  zu, während sich der *EDS* verringerte. Damit stellt dies eine gute Möglichkeit dar, um die Stabilität von GM-Hydrogelen zu erhöhen, wenn dies benötigt wird. Der für alle hier hergestellten GM-Hydrogele verwendete PI LAP war auch für die Vernetzung von GM-Hydrogelen mittels 2PP geeignet und eröffnet die Möglichkeit, auch filigrane GM-Strukturen 3D zu drucken. Makroskopische GM-Hydrogele wurden erfolgreich gedruckt, wobei die  $G'$  allerdings geringer waren als bei den UV-vernetzten Hydrogelen. Ebenfalls war es möglich, GM-Hydrogele über den *Inkjet*-Druck zu erzeugen. Hier wurden Parameter bestimmt, mit welchen die *Spots* reproduzierbar gedruckt werden konnten. Außerdem wurde eine Methode entwickelt, um die *Spots* ausreichend zu vernetzen. Somit wurden zwei Druckverfahren ermittelt, welche die Herstellung von strukturierten biosensorischen Hydrogelschichten grundsätzlich ermöglichten.

### 6.3 Diskussion zu Hypothese III

Die Ergebnisse zur Bearbeitung von Hypothese I haben gezeigt, dass die PEG-basierten Hydrogele erfolgreich mit Isothiuroniumgruppen funktionalisiert wurden und die Funktionalisierung einstellbar war. Außerdem konnten die Isothiuroniumgruppen zu Thiolen reduziert werden, welche genutzt wurden, um Enzyme direkt an die Hydrogele zu binden. Durch die Ergebnisse in Hypothese II.III war bekannt, dass GM-*Spots* unter Argonatmosphäre ausreichend vernetzt werden können. Im nächsten Schritt sollte die Kombination beider Hydrogele als Basis für Biosensoren untersucht werden. Von den funktionalisierten Hydrogelen wurden nur noch PEG-DA-2-Hydrogele verwendet, da diese vergleichbare



Oberflächeneigenschaften wie die Hydrogele mit 3 wt% AUITB hatten (s. Hypothese I). Es wurde folgende dritte Hypothese formuliert:

*III.I Die Thiole bzw. die Isothiuroniumgruppen auf der PEG-basierten Hydrogeloberfläche fördern ein Anhaften der GM<sub>10</sub>-Spots über eine kovalente Bindung mittels Thiol-Michael-Reaktion bzw. elektrostatischer Wechselwirkung im Vergleich zu unfunktionalisierten Hydrogelen. Die orts aufgelöste Beschichtung ist 21 Tage stabil gegenüber Delamination.*

*III.II In die GM<sub>10</sub>-Lösung können über TMV als Trägerstruktur verschiedene Enzyme eingebracht und in den vernetzten Spots verankert werden. Das Ankoppeln der Enzyme an die TMV-Partikel verhindert ein Auswaschen der Enzyme aus den GM<sub>10</sub>-Spots.*

Die Ergebnisse zu dieser Hypothese sind in Kapitel 5 in der Publikation Grübel *et al.*, 2023 aufgeführt [237]. Daraus können detailliertere Informationen entnommen werden.

Für eine potenzielle Anwendung der PEG-basierten Hydrogele als Basis für Biosensoren sollten die Hydrogele orts aufgelöst mit einer GM-Lösung beschichtet werden. Zunächst wurde der *Inkjet*-Druck zum Aufbringen der GM<sub>10</sub>-Spots gewählt, da damit viele Spots in geringer Größe in kurzer Zeit erzeugt werden können. Es wurde überprüft, ob die Funktionalisierung der PEG-basierten Hydrogele ein Anhaften der GM<sub>10</sub>-Spots fördert, weshalb die GM<sub>10</sub>-Lösung auf unfunktionalisierte PEG-DA-Hydrogele (PEG-DA-0NT und PEG-DA-0T), mit Isothiuroniumgruppen funktionalisierte PEG-basierte Hydrogele (PEG-DA-2NT) und mit Thiolen funktionalisierte PEG-basierte Hydrogele (PEG-DA-2T) aufgebracht wurde.

Der Flächeninhalt *A* der Spots war auf den funktionalisierten PEG-DA-2-Hydrogelen mit Isothiuroniumgruppen oder Thiolen signifikant geringer als auf den nicht funktionalisierten Hydrogelen. Über 21 Tage blieben die Größen der Spots jeweils vergleichbar, was darauf hindeutete, dass die Spots über die Zeit nicht abgewaschen oder bemerkbar mechanisch abgetragen wurden. Wenn die GM<sub>10</sub>-Tinte in die PEG-DA-Hydrogele einquoll, konnten sich die Polymerketten wahrscheinlich ausreichend ineinander verwickeln. Die Bindung zwischen den vernetzten GM<sub>10</sub>-Spots und dem PEG-basierten Hydrogel war stark genug, dass die Spots auch auf den nicht funktionalisierten Hydrogelen hafteten, weshalb der Flächeninhalt *A* der Spots über den beobachteten Zeitraum konstant blieb. Grundsätzlich wäre es auch möglich, dass die Methacryl- und Methacrylamidgruppen der GM<sub>10</sub> mit noch frei verfügbaren Acrylatgruppen von PEG-DA vernetzten [40, 305]. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den hier hergestellten Proben nicht alle Acrylatgruppen vollständig umgesetzt waren. Da die GM<sub>10</sub>-Lösung weniger auf den funktionalisierten Hydrogelen spreitete, was auch mit Kontaktwinkelmessungen gezeigt wurde (Figure 8a), und die gedruckten Spots kleiner und präziser waren als auf den unfunktionalisierten Hydrogelen, wurde geschlussfolgert, dass die funktionalisierten Hydrogele besser als Basis für die GM<sub>10</sub>-Spots geeignet waren. Ebenfalls wurde kein Unterschied zwischen den Thiol-funktionalisierten und Isothiuronium-funktionalisierten Hydrogelen festgestellt. Da letztere schneller hergestellt werden konnten, wurden sie für die weiteren Versuche verwendet.

Im letzten Schritt sollte das Potenzial der Kombination aus den zwei Hydrogelmaterialien als biosensorische Oberfläche beurteilt werden. Dafür wurden Enzyme bzw. Enzyme, gekoppelt an  $TMV_{Cys}$ , in die  $GM_{10}$ -Spots integriert. TMV-Partikel wurden bereits vielseitig für sensorische Anwendungen verwendet, da die Cysteinmutante durch die Thiole auf der Oberfläche eine Vielzahl von Enzymen binden kann [132, 224, 226, 227, 230]. Hier wurde nun die Kombination aus  $TMV_{Cys}$  mit Hydrogelen untersucht. Zunächst wurde, wie bei den Versuchen mit Enzymen aus Hypothese I.IV, das Modellenzym HRP verwendet, da es eine Substrat-spezifische Farbreaktion mit ABTS aufweist. Es wurde untersucht, ob die Kopplung der HRP an die  $TMV_{Cys}$ -Partikel ein Auswaschen des Enzyms aus den  $GM_{10}$ -Spots verhindert und sich dadurch potenziell für wiederverwendbare Biosensor-Setups eignen kann. Dabei wurde derselbe Maleimid-PEG-Biotin-Linker wie in den vorherigen Versuchen verwendet, um die SA-HRP an die  $TMV_{Cys}$  zu binden. Um die Farbreaktion besser sichtbar zu machen, wurde die GM-Lösung für diese Versuche pipettiert, um größere Spots zu erhalten. Bei den Spots, bei denen die SA-HRP über den Linker an die  $TMV_{Cys}$  gebunden war, als *TMV-HRP conjugate* bezeichnet, wurde ohne und mit vorherigem Waschen der Proben eine Grünfärbung der Spots festgestellt (Figure 11a und b). Bei den Proben, bei denen nur die SA-HRP in die  $GM_{10}$ -Spots integriert wurde, konnte ohne Waschen ebenfalls eine Grünfärbung der Spots beobachtet werden. Nachdem die Proben für eine Woche gewaschen wurden, konnte hingegen keine Grünfärbung mehr festgestellt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die SA-HRP aus der GM-Hydrogelmatrix herausgewaschen wurde. Abgesehen von den Fotos der Proben wurde die ABTS-Substratlösung nach 25 min entnommen und die Absorption im Vergleich zu frischer ABTS-Lösung gemessen (Table 2, Table SI 4). Bei den ungewaschenen *TMV-HRP conjugates* und den SA-HRP-Proben war das Verhältnis der benutzten zur frischen ABTS-Lösung  $>1$ , während es bei den gewaschenen Proben bei ca. 1 lag. Dies bestätigte, dass nach dem Waschen entweder kein Substratumsatz außerhalb der Spots (*TMV-HRP conjugate*) oder überhaupt kein Substratumsatz stattfand (SA-HRP). Diese Ergebnisse zeigten, dass es über die Anbindung des Enzyms SA-HRP an die  $TMV_{Cys}$ -Partikel möglich war, die Enzyme in den  $GM_{10}$ -Spots zu verkapseln. Wie erwartet wurden die gebundenen Enzyme nicht ausgewaschen, da die Konjugate die angenommene Maschenweite  $\zeta$  der  $GM_{10}$ -Spots von 10 nm bis 30 nm überstiegen [204]. Es wurde bereits gezeigt, dass SA-HRP durch ein  $GM_{10}$ -Hydrogel diffundieren kann, um einen im Hydrogel gebundenen Linker über Biotin zu koppeln [204], daher ist es auch naheliegend, dass das Enzym wieder ausgewaschen werden kann.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich das hier untersuchte System durch Zusatz der  $TMV_{Cys}$  als Biosensor-Schicht eignete. Als nächstes wurde das Enzym Penicillinase (Pen), welches ebenfalls eine spezifische rote Farbreaktion bei Substratumsatz von Nitrocefin auslöst, verwendet (Figure 11c). Ziel war es, die orts aufgelöste  $GM_{10}$ -Beschichtung auf den PEG-basierten Hydrogelen zu nutzen, um verschiedene Enzyme in die Spots einzubringen, damit mehrere Substrate detektiert werden können. Da bereits gezeigt wurde, dass die  $TMV_{Cys}$  für die Einbindung in das  $GM_{10}$ -Hydrogel nötig waren, wurde nur an  $TMV_{Cys}$  gekoppelte Pen verwendet und Pen kovalent an die  $TMV_{Cys}$  gebunden. Wie für die HRP konnte auch für die Pen gezeigt werden, dass die Enzymaktivität nach der Bindung an  $TMV_{Cys}$  und der UV-Vernetzung im  $GM_{10}$ -Hydrogel noch erhalten war. Schließlich wurde auf derselben Probe ein

GM-Spot mit TMV-HRP *conjugate* und einer mit TMV-Pen *conjugate* aufgebracht. Für die kombinierte Anwendung der Enzyme waren die Farbreaktionen allerdings nicht geeignet. Die zusätzliche Anwendung des Enzyms Pen zeigte aber, dass das System auf andere Enzyme abgesehen von HRP übertragbar und auch geeignet ist für biomedizinisch relevante Enzyme. Es konnte gezeigt werden, dass die Enzyme für mindestens eine Woche nach der Verkapselung noch aktiv waren. Dies legt nahe, dass die Sensorsysteme wiederverwendbar sind, wenn sie nach der Anwendung gewaschen werden. Ebenso konnte für die TMV-gekoppelte Pen eine verbleibende Enzymaktivität nach 22 Monaten kühler und trockener Lagerung festgestellt werden. TMV wurden bereits vielseitig für Biosensor-Anwendungen genutzt [132, 222-229], und es wurde auch gezeigt, dass Pen-basierte Sensoren für mindestens ein Jahr nach wiederholter Anwendung noch aktiv waren [227]. Daher ist eine Kombination aus TMV und Hydrogelen als Biosensor-Materialien sehr vielversprechend.

Damit kann die dritte Hypothese der Dissertation zum Großteil bestätigt werden. Durch die Funktionalisierung der Hydrogele mit Isothiouroniumgruppen oder Thiolen spreitete die GM<sub>10</sub>-Lösung weniger, wodurch kleinere *Spots* und ein präziseres Druckmuster erhalten wurden. Damit eigneten sich die funktionalisierten Hydrogele als Basis für das Biosensor-*Setup*. Über die Kopplung der Enzyme an TMV-Partikel wurde ein Herauswaschen der Enzyme aus den GM<sub>10</sub>-*Spots* stark vermindert. Damit war es möglich, die biosensorischen Oberflächen für mindestens eine Woche zu lagern. Somit ist die Materialkombination aus PEG- und GM-Hydrogelen gemeinsam mit TMV-Partikeln sehr vielversprechend für zukünftige Anwendungen.

### 7. Schlussfolgerungen

In dieser Dissertation wurden Hydrogele auf Basis von Polyethylenglykol (PEG) und methacryloylierter Gelatine (GM) ausführlich charakterisiert und letztendlich durch die Kombination beider Hydrogele, zusammen mit Enzym-beladenen Tabakmosaikviren (TMV), eine biosensorische Oberfläche entwickelt. Im ersten Teil wurden PEG-basierte Hydrogele mit dem *Surfmer* 2-(11-(Acryloyloxy)undecyl)isothiuroniumbromid (AUITB) funktionalisiert, welches eine Isothiuroniumgruppe enthält. Es wurden bis zu 3 wt% des *Surfmers* eingesetzt und festgestellt, dass die Vernetzung der Polymernetzwerke nicht beeinträchtigt wurde. Die isoelektrischen Punkte (IEP) der Hydrogeloberflächen stiegen von ca. 4,5 auf ca. 9,0 an und implizierten damit die Präsenz von geladenen Gruppen auf der Oberfläche. Die Wasserkontaktwinkel (WCA), gemessen sowohl mit der *sessile drop*, auch als auch mit der *captive bubble* Methode, ergaben gegenteilige Ergebnisse. Über die erste Methode gemessen, stiegen die WCA mit zunehmender Funktionalisierung, während sie, gemessen über die zweite Methode, sanken und die Ergebnisse der IEP bestätigten. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Isothiuroniumgruppen auf der Hydrogeloberfläche ihre Orientierung abhängig vom Umgebungsmedium ändern konnten, da sie mit der flexiblen Alkylkette des *Surfmers* verbunden waren. Adsorptionsmessungen mit dem negativ geladenen Medikament Diclofenac ergaben, dass die Adsorptionskapazität der Hydrogele mit zunehmendem AUITB-Gehalt stieg, womit sie sich für die Abwasserreinigung eignen können. Untersuchungen mit *Escherichia coli* auf nicht funktionalisierten und funktionalisierten Oberflächen deuteten auf keine eindeutige antibakterielle Aktivität der Isothiuroniumgruppen auf den Proben hin.

Ein *Surfmer* mit einer Isothiuroniumgruppe wurde gewählt, da diese funktionelle Gruppe auch zu einem Thiol reduziert werden kann. Demnach wurden die Hydrogele behandelt und anhand von Fluoreszenzfärbungen mit einem Maleimidfarbstoff, der spezifisch an Thiole binden kann, die zugänglichen Thiole im Hydrogel bestätigt. Diese wurden genutzt, um das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) an die Hydrogele zu binden und die Aktivität der HRP wurde über die spezifische Farbreaktion sichtbar gemacht. Somit konnten multifunktionale Hydrogele hergestellt werden, die durch das Einbringen von AUITB entweder über Isothiuroniumgruppen oder Thiole verfügten und vielseitige neue Eigenschaften mit sich brachten.

Im zweiten Teil der Dissertation wurden GM-basierte Hydrogele untersucht, welche als biobasierte Matrix für TMV-gebundene Enzyme in der sensorischen Schicht dienen sollten. Dafür wurde jeweils das GM-Derivat GM<sub>10</sub> mit einem hohen Methacryloylierungsgrad von ca. 1 mmol g<sup>-1</sup> verwendet, um Polymerlösungen zu erhalten, die bei Raumtemperatur gut verarbeitbar waren, und um einen hohen Vernetzungsgrad der Hydrogele zu erzielen. Zunächst wurden GM-basierte Hydrogele ebenfalls funktionalisiert, um deren Festigkeit zu erhöhen, was bei filigranen Strukturen entscheidend sein kann. Es wurde untersucht, inwiefern die Vernetzung der Hydrogele und die rheologischen Eigenschaften durch die Integration von Chondroitinsulfat oder biotechnologisch hergestelltem Chondroitin beeinflusst wurden. Wie erwartet, nahm der Quellgrad (*EDS*), vermutlich durch ein kompakteres Hydrogel mit mehr

Wasserstoffbrücken, ab während der Speichermodul  $G'$  zunahm, was auf steifere Hydrogele schließen ließ. Somit erzielte die Funktionalisierung den gewünschten Effekt und könnte bei Bedarf angewendet werden.

Des Weiteren wurden zwei unterschiedliche Druckverfahren getestet, um strukturierte Hydrogeloberflächen für die Biosensoren-*Setups* erzeugen zu können. Zum einen wurden als Vorversuche makroskopische GM-basierte Hydrogele mittels 2-Photonen-Polymerisation (2PP) gedruckt und deren Eigenschaften mit UV-vernetzten GM-basierten Hydrogelen verglichen. Zunächst konnte durch anfängliche Untersuchungen bestätigt werden, dass sich Lithium-Phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinat (LAP) als Photoinitiator für den 2PP-Druck eignete. Mit einem konzipierten optischen Aufbau konnten die Hydrogele mit einem Durchmesser von 1 cm in wenigen Minuten gedruckt werden. Es wurde festgestellt, dass mit bestimmten Einstellungen vergleichbare *EDS* der Hydrogele wie bei den UV-vernetzten Hydrogelen erzielt wurden, die  $G'$  aber immer geringer waren und die Steifigkeit der Hydrogele vermutlich durch die punktuelle Aushärtung nicht an die der flächig über UV-Strahlung vernetzten Hydrogele herankam. Dennoch erwies sich dieses Verfahren aufgrund der Auflösung und der vielseitigen Parametereinstellungen als sehr vielversprechend für weitere Untersuchungen.

Zum anderen wurden GM-basierte Lösungen über den *Inkjet*-Druck verarbeitet und *Spots* erzeugt. Hierfür wurden Parameter ermittelt, um die Lösung reproduzierbar zu drucken, ohne dass das Druckmuster durch Satellitentropfen merkbar beeinträchtigt wurde. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der GM, unterschiedliche Drucktemperaturen und Spannungen des piezoelektrisch-basierten Systems getestet. Es wurde festgestellt, dass über die herkömmliche Methode die UV-Vernetzung nicht ausreichend war, was vermutlich auf die Empfindlichkeit der radikalischen Vernetzung gegenüber Sauerstoff zurückzuführen ist, die bei der im Verhältnis zum Volumen großen Hydrogeloberfläche zum Tragen kam. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von befeuchtetem Argon gelöst werden, welches den Sauerstoff möglichst verdrängte.

Im letzten Teil der Dissertation wurden die PEG-basierten Hydrogele mit den GM-Hydrogelen kombiniert, um eine Hydrogel-basierte biosensorische Oberfläche zu erzeugen. Es wurde zunächst überprüft, ob die Funktionalisierung der PEG-basierten Hydrogele ein Anhaften von GM-*Spots* förderte. Um viele *Spots* auf einmal analysieren zu können, wurden diese mittels *Inkjet*-Druck aufgebracht. Bei den funktionalisierten Hydrogeloberflächen, sowohl mit Isothiouoniumgruppen als auch Thiolen, wurden geringere Flächeninhalte und damit ein präziseres *Spot*-Muster bestimmt. Die *Spots* waren jedoch auf allen Oberflächen vergleichbar verankert. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass auch bei den unfunktionalisierten Hydrogelen die Polymerketten ausreichend miteinander interagierten oder die GM mit verbleibenden Acrylatgruppen von PEG-DA vernetzen konnte und damit auch kovalent gebunden wurde.

Um ein Auswaschen der Enzyme aus der Hydrogelmatrix zu verhindern, wurde die Cysteinmutante der TMV verwendet, welche aufgrund ihrer Thiolgruppen auf der Oberfläche für Biokonjugationsreaktionen verwendet werden und Enzyme binden kann. Wie bei den vorherigen Versuchen wurde die HRP genutzt, die über Streptavidin (SA) und einen Biotin-

haltigen Linker an die TMV gebunden wurde. Die TMV-HRP-Konjugate wurden in pipettierte GM-*Spots* verkapselt und es wurde festgestellt, dass das Auswaschen der Enzyme aus den GM-Hydrogelen durch das Binden an die TMV stark vermindert wurde. Im Gegensatz dazu war die verkapselte SA-HRP bei der ersten Anwendung zwar wirksam, aber nicht bei Proben, die vor der Anwendung eine Woche gewaschen wurden. Durch das Aufbringen der GM-Beschichtung als *Spots* wurde es ermöglicht, mehrere Enzyme auf dasselbe PEG-Hydrogel aufzubringen, womit eine Sensorschicht entstand, welche für verschiedene Substrate spezifisch sein könnte. Dies wurde mit dem Enzym Penicillinase (Pen), gebunden an TMV und verkapselt in die GM-*Spots*, demonstriert. Außerdem wurden anhand der Pen-Aktivität erste Hinweise auf eine Langzeitstabilität des Sensor-*Setups* gewonnen.

Zusammenfassend wurden im Rahmen der Dissertation erfolgreich funktionalisierte PEG-basierte als auch GM-basierte Hydrogele mit gewünschten Eigenschaften erzeugt. Funktionalisierte PEG-basierte Hydrogele können durch zugängliche Isothiouoniumgruppen oder Thiole Anwendung in der Adsorption von Medikamenten oder für Biokonjugationsreaktionen finden. Durch die Kombination von GM- und PEG-Hydrogelen wurde eine biosensorische Oberfläche generiert, welche durch die TMV mehrfach und potenziell für die zeitgleiche Analyse mehrerer Substrate genutzt werden kann.

## 8. Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation ermöglichen fortführende oder aufklärende Experimente, auf welche im Folgenden eingegangen wird.

Um eine mögliche antibakterielle Wirkung der Isothiouonium-funktionalisierten Hydrogele zu analysieren, wurden Versuche mit den Bakterienstämmen *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Für die Versuche mit *E. coli* wurde eine leichte Tendenz für eine antibakterielle Wirkung der Hydrogeloberflächen festgestellt. Jedoch entstanden durch die Art des Versuches mit einem nötigen Abwaschen der adhärenierten Bakterien und erneutem Ausplattieren wie erwartet hohe Standardabweichungen. Ebenso war die Probenzahl für die Versuche stark limitiert. Diese Untersuchungen könnten erneut mit einer höheren Probenzahl durchgeführt werden, um den Einfluss des Fehlers zu verringern.

Polyethylenglykol (PEG)-basierte Hydrogele wurden als Sensorsubstrat gewählt, da sie für ihre inerten Eigenschaften bekannt sind und daher eine unspezifische Interaktion mit möglichen Enzymsubstraten minimieren können. Untersuchungen über die Adsorption von bovinem Serumalbumin (BSA) auf den PEG-Hydrogelen und anschließendem Bicinchoninsäure-Assay oder die Verwendung von fluoreszenzgekoppeltem BSA könnten wie in [339] beschrieben, Aufklärung darüber geben, ob durch die Isothiouoniumgruppen oder Thiole auf der Oberfläche eine Wechselwirkung mit Proteinen im Vergleich zu unfunktionalisierten PEG-Hydrogelen verstärkt ist. Hydrogele aus methacryloylierter Gelatine (GM), die die *Spots* repräsentieren, könnten hierbei als geeignete Kontrollen dienen.

Des Weiteren könnte die Funktionalität des Biosensor-*Setups* weiter überprüft werden. Bisher wurde im Rahmen der Doktorarbeit immer jeweils dieselbe Substratlösung verwendet, um die farbspezifische Enzymreaktion zu testen. Hier könnten verdünnte Lösungen Aufschluss über die Sensitivität der sensorischen Oberflächen geben. Ebenso könnten die GM-*Spots* mit einem höheren Anteil an Tabakmosaikvirus (TMV)-Enzym-Konjugaten versehen werden oder die TMV-Partikel mit mehr Enzymen beladen werden, um auf diese Weise die Reaktivität, falls notwendig, zu stärken.

Die aufeinanderfolgende oder gleichzeitige Zugabe der Substratlösungen für die beiden Enzyme Penicillinase (Pen) und Meerrettichperoxidase (HRP) hatte in den bisherigen Versuchen nicht vollständig funktioniert bzw. konnte der Erfolg des Experiments durch die sich beeinflussenden Farbreaktionen nicht gänzlich beurteilt werden. Hier sollte versucht werden, nach Abnahme der ersten Substratlösung die Hydrogele zu waschen, um die Lösung vollständig zu entfernen, bevor die zweite Substratlösung hinzugegeben wird. Damit sollte besser beurteilt werden können, ob die zweite Farbreaktion ablaufen konnte.

Bisher wurde die Funktionalität der biosensorischen Oberflächen über einen Zeitraum von einer Woche überprüft, indem die Proben gewaschen wurden. Hierbei wurde festgestellt, dass die ungebundene Streptavidin (SA)-HRP nach diesem Zeitraum aus den GM-*Spots* ausgewaschen wurde, es ist aber nicht bekannt, wie schnell sie ausgewaschen wird. Hierfür könnten die Proben täglich untersucht werden, um den Zeitpunkt zu ermitteln. Erste Langzeitversuche ergaben, dass die Pen nach ca. 22 Monaten der Probenpräparation noch aktiv war und die spezifische

Farbreaktion aufzeigte. Für das bisher ausgiebiger untersuchte Enzym SA-HRP sollte ebenso ermittelt werden, wie lange die Enzymaktivität, wenn gebunden an die TMV-Partikel und in der Hydrogelmatrix verkapselt, bestehen bleibt. In Langzeitversuchen könnte zu regelmäßigen Zeitpunkten getestet werden, wie lange die beiden Enzyme noch aktiv sind, wenn sie entweder gewaschen oder auch trocken und kühl gelagert werden. Dabei wäre es aufschlussreich, bereits benutzte *Sensor-Setups* wieder zu waschen, um umgesetztes Substrat möglichst aus den *Spots* zu entfernen, sodass die Proben erneut genutzt werden können und diese mit unbenutzten zum jeweiligen Zeitpunkt zu vergleichen. Auch in diesem Fall könnte die verbleibende Enzymaktivität anhand von Farbintensitätsauswertungen mit vorangegangenen Versuchen verglichen werden, um die Wiederverwendbarkeit und Haltbarkeit des *Sensor-Setups* zu testen. Natürlich müsste für diese Versuche ein reproduzierbares Auswertesystem verwendet werden. Damit eine biosensorische Oberfläche mit einer großen Anzahl von GM-*Spots* oder einer anderen Oberflächenstrukturierung in kurzer Zeit generiert werden kann, könnte, anstatt zu pipettieren, auf den *Inkjet*-Druck zurückgegriffen werden. Erste *Inkjet*-Druckversuche mit GM-Lösungen in Kombination mit Enzymen gekoppelt an TMV haben gezeigt, dass die Druckdüsen im Gegensatz zu reiner GM-Lösung schneller verstopften, vermutlich durch die geringe Tropfengröße von 10 pL. In einfachen Versuchen könnte zunächst überprüft werden, ob durch die Verwendung von anderen Druckköpfen mit größerem Tropfenvolumen dieses Problem verringert werden kann. Alternativ könnte auf ein *Inkjet*-Drucker mit einer *Nano-Tip* Mikropipette wie bei Hoch *et al.* umgestiegen werden, mit welchem durch ein Tropfenvolumen von 350-400 pL auch Zellen gedruckt werden können [83]. Mittels *Inkjet*-Druck könnten auf einfache Weise GM-*Spots* mit unterschiedliche Enzymen aufgebracht werden, indem mehrere Druckmuster vorgegeben und nacheinander gedruckt werden. Hierbei sollte die Größe der *Spots* von der Sichtbarkeit der Farbreaktion abhängig gemacht werden. Über die Verwendung von Photomasken könnte bei mehrmaliger UV-Belichtung der Proben ein wiederholtes Bestrahlen der vorangegangenen *Spots* und eine mögliche Schädigung verhindert werden. Außerdem könnte eine potenzielle Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch die UV-Bestrahlung untersucht werden, indem Enzymlösungen mehrmals bestrahlt werden und die Intensität der Farbreaktionen miteinander verglichen werden. In den hier durchgeführten Versuchen konnte eine ausreichende Enzymaktivität nach UV-Bestrahlung gezeigt werden aber eine Verringerung der Aktivität konnte nicht ausgeschlossen werden.

Als weitere Methode, um die GM-*Spots* inklusive TMV-Enzym-Konjugate strukturiert auf die PEG-Hydrogele aufzubringen, sollte der Druck über 2-Photonen-Polymerisation (2PP) getestet werden. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden in Vorversuchen bereits erfolgreich auch makroskopische GM-Hydrogele mit diesem Druckverfahren erzeugt. Die PEG-Hydrogele könnten, wie beim *Inkjet*-Druck, direkt mit der GM-Lösung bedruckt werden, wobei durch das geschlossene System in einer Form ein Austrocknen der Hydrogele und eine Beeinträchtigung der Vernetzungsreaktion durch Sauerstoff verhindert werden sollte. Mit diesem Verfahren könnten komplexere Strukturen einfach erzeugt und mit unterschiedlichen Drucktinten nacheinander verschiedene Enzyme verkapselt werden. Durch die lokale Bestrahlung sollte ebenfalls eine Schädigung bereits gedruckter Strukturen ausgeschlossen werden. Es wurde schon anhand des *Digital Light Processing*-Drucks gezeigt, wie vorteilhaft Druckverfahren für



die Verkapselung von Enzymen und Generierung komplexer Hydrogelstrukturen sein können [139]. Mit dem 2PP-Druck müssten aufgrund der hohen Auflösung noch filigranere Strukturen möglich sein. Dies wäre ebenfalls relevant für eine potenzielle Anwendung der TMV-Enzym-Konjugate in filigranen Hydrogelstrukturen für das Überwachen des Metabolismus von verkapselten Zellen [340].

Abgesehen von einer erzeugten Farbreaktion wäre es erstrebenswert, die Enzymaktivität bzw. den Substratumsatz messen zu können. Das hier schon angewendete Enzym Pen ist sowohl für die Klinik als auch für die Lebensmittelindustrie höchst relevant. Angelehnt an Poghossian *et al.* [227], sollte basierend auf einem Elektrolyt-Isolator-Halbleiter (EIS)-System untersucht werden, ob die Hydrolyse von Penicillin durch die Pen über die Veränderung des pH-Wertes detektiert werden kann, wenn die TMV-Enzym-Konjugate in GM-*Spots* verankert sind. Dabei würde ebenfalls ein mehrschichtiges EIS-System verwendet werden, wobei über die obere pH-sensible Tantal(V)oxid-Schicht, auf welche die sensorische Hydrogel-Schicht ortsaufgelöst aufgebracht werden würde, die Veränderung der Wasserstoffionen in Lösung detektiert werden könnte.



## I. Anhang

### I.I Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich, Jana Grübel, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

„Hydrogele aus Polyethylenglykol und methacryloylierter Gelatine für biosensorische Oberflächen“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Angaben, die wörtlich oder sinngemäß fremden Quellen entnommen wurden, sind unter Angabe des Ursprungs kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde zu keiner Zeit in derselben oder einer substantiell ähnlichen Version bei einem anderen Prüfungsamt eingereicht.

---

Ort, Datum, Unterschrift

## I.II Lebenslauf

### **Jana Grübel**

Geboren am 04.10.1990 in Stuttgart

#### **Akademische Ausbildung**

- 01/2018 - 12/2021      Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Universität Stuttgart, Stipendiatin des Promotionsstipendiums der Evonik Stiftung (06/2018 – 05/2021)
- 04/2016 - 11/2017      Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart  
Spezialisierungen: Biomaterialien und Nanotechnologie, Molekulare Tumorzellbiologie und Neurobiologie  
*Master of Science*
- 10/2012 - 03/2016      Studium der Technischen Biologie, Universität Stuttgart  
*Bachelor of Science*  
Projektarbeit und Bachelorthesis am Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York (03 - 09/2015)
- 09/2010 - 08/2011      Studium der Molekularen und Technischen Medizin, Hochschule Furtwangen University
- 09/2001 - 06/2010      Gymnasium an der Jörg-Ratgeb-Schule in Stgt.-Neugereut

#### **Berufserfahrung**

- Seit 03/2022              Senior Expert Polymer Technology, Acandis GmbH, Pforzheim
- 09/2017 - 12/2017      Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Universität Stuttgart
- 10/2011 - 06/2012      Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin am Universitätsklinikum Mannheim
- 02/2011 - 03/2011      Praktikum in der Radiologie im Marienhospital Stuttgart

## II. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Strukturformel von PEG-DA. PEG-DA wird über die beiden Acrylatgruppen am Kettenende, beispielsweise mittels eines Photoinitiators bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, vernetzt..... 2
- Abbildung 2: Modifizierung von Gelatine mit MAAnh zu methacryloylierter Gelatine. Bei der Reaktion werden Amino- und Hydroxylgruppen zu Methacrylamiden und Methacrylaten umgesetzt..... 5
- Abbildung 3: Funktionsweise und Anwendung des Inkjet-Drucks. a) DOD Inkjet-Druck mit thermischer (links) oder piezoelektrischer Funktionsweise (rechts). b) Druckbarer Bereich von Tinten in Abhängigkeit der Weber- und Reynolds-Zahl. Für Z-Zahlen ( $1/\text{Oh}$ -Zahl)  $< 1$  gelten Tinten als zu viskos. Bei Werten  $> 10$  bilden sich Satellitentropfen aus, die das Druckbild beeinträchtigen können. c) Erzeugte Tropfen mit dem DOD-Druck an drei unterschiedlichen Stadien der Tropfenbildung. Der Tropfen bildet sich aus einer Flüssigkeitssäule, woraus sich ein Haupttropfen und ein verlängerter Schweif bildet. Der Schweif zerbricht in einzelne Satellitentropfen hinter dem Haupttropfen. a), b) und c) verändert nach [154]. d) Tropfenbildung einer Tinte mit 10 wt% GM<sub>10</sub> bei 25 °C. e) Verklebung der Druckdüse mit einer 10 wt% GM<sub>10</sub>-Tinte bei 37 °C. f) Gedrucktes Muster mit derselben Tinte bei 25 °C. g) Morphologie von gedruckten porzinen Chondrozyten in der GM<sub>10</sub>-Tinte nach 72 h. Zellen wurden mit Fluoresceindiacetat gefärbt. d) bis g) verändert nach [83]..... 13
- Abbildung 4: 3D-Druck mit 2-Photonen-Polymerisation. a) Beim Dip-in Modus dient die Drucktinte als Immersionsmedium, indem die Tinte direkt auf das Objektiv aufgebracht wird. b) 3D-Struktur des Alveolargewebes, das durch Schnitte in z-Richtung in einzelnen Ebenen dargestellt werden kann. c) Ansicht einer 4x4 222x222x104 µm Gerüststruktur. Am oberen und linken Rand ist die 3D-Verteilung der primären humanen Lungenfibroblasten gezeigt. d) 3D Darstellung von einem z-Stack aus c). Abbildung verändert nach [6]..... 16
- Abbildung 5: Hydrogele für soft robotics. a) Schichtweiser Aufbau eines nachgeahmten Rochens. Die Goldelektrode wurde zwischen den Hydrogelen aus PEG und GM mit Carbon Nanotubes (CNT) eingebettet. Auf dem GM-Hydrogel wurden Kardiomyozyten ausgesät. b) Eingerollte Morphologie des soft robots mit Abständen der PEG-Strukturen von 300 µm. c) und d) Kultivierung des soft robots für fünf Tage, Aufnahmen bei 1,6 s bzw. 2,5 s. Die gestrichelte blaue Linie zeigt die Verformung in Längsrichtung, während die grüne Linie die querverlaufende Verformung zeigt. Abbildung verändert nach [206]. ..... 20
- Abbildung 6: TMV als Bestandteile für Biosensoren. a) Enzymkopplungen auf verschiedenen Oberflächen: TMV<sub>Cys</sub>-Bio, CP<sub>Cys</sub>-Bio-Aggregate, Biotin-Linker, high binding 96-Wellplatte. Die Enzyme GOx und HRP waren an SA gekoppelt, um sie an den Biotin-enthaltenden Linker zu binden. b) Enzymaktivität der HRP. Die Umsatzraten des Substrates ABTS wurden auf den Umsatz der HRP in der 96-Wellplatte normiert. Links: 1500 ng Adapter pro Well, rechts: 3500 ng Adapter pro Well. Abbildung verändert nach [132]..... 22

Figure 1: Hydrogel preparation and evaluation of the cross-linking process. a) Synthesis of 2-(11-(acryloyloxy)undecyl)isothiuronium bromide (AUITB). First step: Synthesis of 11-bromoundecyl acrylate by acrylation of 11-bromo-1-undecanol with acryloyl chloride. Second step: Synthesis of AUITB by nucleophilic substitution with thiourea. TEA: triethylamine, THF: tetrahydrofuran, RT: room temperature, EtOH: ethanol. b) Preparation of samples: 1. Pipetting the precursor solution on an activated silicon wafer. 2. Closing the mold with a quartz glass pane. 3. Cross-linking of the sample by UV-irradiation. 4. Removing the sample from the mold. c) Equilibrium degree of swelling (EDS) in grey and gel yield ( $Y_g$ ) in blue of PEG-based hydrogels depending on the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during sample preparation. Hydrogels were swollen in deionized water for 72 h. Results are shown for PEGDA-0 (EDS:  $n = 10$ ,  $Y_g$ :  $n = 8$ ), PEGDA-1 (EDS:  $n = 5$ ,  $Y_g$ :  $n = 3$ ), PEGDA-2 (EDS:  $n = 6$ ,  $Y_g$ :  $n = 4$ ) and PEGDA-3 (EDS:  $n = 5$ ,  $Y_g$ :  $n = 4$ ) hydrogels. d) Raman spectra of AUITB, unreacted PEGDA, a PEGDA-0 sample and a PEGDA-3 sample. Hydrogel samples were washed and dried before recording the spectra. .... 42

Figure 2: Characterization of the isothiuronium-functional hydrogels. a) Isoelectric points (IEP) depending on the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during sample preparation. Results are shown for PEGDA-0, PEGDA-0.1, PEGDA-0.5, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3 hydrogels ( $n = 3$ ). Hydrogels were either swollen in 1 mM KCl after cross-linking (original) or treated with 1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  and kept in 1 mM KCl afterwards (treated). Explanation of symbols: \*\*\* significantly different to PEGDA-0 hydrogels ( $p < 0.001$ ); ^^ significantly different to PEGDA-1 hydrogels ( $p < 0.01$ ),  $^{\circ\circ}$  significant differences between sample treatments ( $p < 0.001$ ). b) Water contact angles depending on  $\beta_{\text{AUITB}}$  of dry and swollen samples, measured by the sessile drop (SD) or captive bubble (CB) method ( $n = 3$ , SD method PEGDA-2  $n = 4$ ). Explanation of symbols:  $^{\circ\circ}$  significant differences between methods ( $p < 0.001$ ). c) and d) Diclofenac adsorption in isothiuronium-functional hydrogels. c) Diclofenac concentrations  $a_e$  adsorbed within hydrogels PEGDA-0, PEGDA-1, PEGDA-2 and PEGDA-3, determined for different equilibrium supernatant concentrations  $c_e$  of diclofenac. The experimental data points were fitted with a modified Langmuir model according to Eq. 7 (solid lines). d) Enhancement factors  $E$  of diclofenac within the tested samples. The data points were calculated using Eq. 9 with the experimental values of  $a_e$  and  $c_e$ , and the solid lines were calculated with the same equation by expressing  $a_e$  with the fit results shown in Table 1. .... 44

Figure 3: Functionalities of thiol-containing PEG-based hydrogels. a) Fluorescence intensity measured for hydrogels with isothiuronium (non-treated) and thiol functionalization (treated) after staining with Atto488 maleimide as a function of the mass fraction  $\beta_{\text{AUITB}}$  of AUITB used during hydrogel preparation. Treated samples were chemically reduced with sodium metabisulfite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) and non-treated were kept in water. The boxes show the 25th and 75th percentiles. The horizontal line in the boxes is the median and the square is the mean. (PEGDA-0, PEGDA-3:  $n = 4$ , PEGDA-1, PEGDA-2:  $n = 3$ ). Explanation of symbols: \*\*\* significantly different to PEGDA-0 hydrogels ( $p < 0.001$ ); ^^ significantly different to PEGDA-1 hydrogels ( $p < 0.01$ ),  $^{\circ\circ}$  significant differences between sample treatments ( $p < 0.001$ ). b, c) Exemplary fluorescence images of stained hydrogels. b) PEGDA-0T hydrogel. c) PEGDA-3T hydrogel. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . d) Time dependent absorption measurements of the conversion of ABTS

substrate to the green ABTS+ by horseradish peroxidase linked to the hydrogels. PEGDA-0NT hydrogels without the addition of the linker served as blank. Significant effects were found for the means in sample composition and time, the interaction of sample composition and time was significant as well..... 48

Figure 4: Illustration of the printing principle, used optical setup and process details for the two 2PP procedures, the DLW and 3DBSP. CG: cover glass, PS: piezo stage, IMO: immersed microscope objective, MO: microscope objective, M: mirror, L: lens, A: aperture, C: camera, LT: lung tissue to be printed. .... 64

Figure 5: Comparison of target lung tissue structure, simulated and measured exposure dose distribution of the 3DBSP. The beam propagates in z direction. A) cross section of the target at  $z = 0$ . B) cross section of the target at  $y = 0$ . C) cross section of the simulated exposure dose at  $z = 0$ . D) cross section of the simulated exposure dose distribution at  $y = 0$ . E) cross section of the measured exposure dose at  $z = 0$ . F) cross section of the measured exposure dose distribution at  $y = 0$   $\mu\text{m}$ . Scale is limited to  $3 \times 10^{13} \text{ W}^2 \text{ s cm}^{-4}$ , corresponds to the maximal degree of cross-linking. Dose distribution corresponds to 119 mW laser power. .... 66

Figure 6: 3D visualization of the printed structures with both methods stained with methylene blue post-printing (633 nm)..... 68

Figure 7: Visualization of the 2PP printed lung tissue structures with subsequent colonization with A549 cells. Cells were fixed and stained 7 days after cell colonization. Cell nuclei were visualized using DAPI staining. Visualization of the actin cytoskeleton using phalloidin staining. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . .... 69

Figure 8: Investigation of the wetting behavior of the GM solution on differently functionalized surfaces of swollen PEG-based hydrogels. a) Contact angle measurements of the GM solution on PEG-based hydrogels. Hydrogels were either non-functionalized, functionalized with isothiuronium groups, or functionalized with thiols ( $n = 3$ ). Explanation of symbols: \*\*\* significant difference between non-functionalized and functionalized hydrogels ( $p < 0.001$ ). b) Exemplary fluorescence images on day 0 (d0) of GM spots on a non-functionalized PEGDA hydrogel and an isothiuronium-functionalized hydrogel (scale bar 1 mm). The spots were stained with fluorescent particles and cross-linked before analysis with the method described in the next section..... 82

Figure 9: Evaluation of the cross-linking efficiency of GM spots. a) Exemplary fluorescence images of GM spots were either cross-linked under ambient conditions, left panel, or in a humidified argon atmosphere, right panel, on a thiol-functionalized hydrogel monitored over 21 days, scale bar 1 mm. b) Determined surface areas  $A$  of the GM spots, which were cross-linked under argon atmosphere, on days 0, 7, 14, and 21 ( $n = 3$ ; non-functionalized hydrogels day 21  $n = 2$ ). Explanation of symbols: \* or \*\* significant difference between non-functionalized and functionalized hydrogels ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ ). c) Raman spectra of pure GM, a GM hydrogel, a PEGDA hydrogel, a GM spot that was cross-linked under argon atmosphere, and a GM spot cross-linked under ambient conditions. The gray area highlights the band of the C=C in-plane scissoring vibration and the blue area highlights the band of the C=C

stretching vibration. Due to the low thickness of the GM spots ( $\approx 2 \mu\text{m}$ , estimated from the Raman microscopic data), it was not possible to record pure spectra without bands of the PEGDA support. Therefore, a PEGDA hydrogel was measured as a reference. .... 84

Figure 10: Coupling of cysteine-modified TMV nanorods to linkers and enzymes, visualized for a single or few out of around 2,000 docking sites only for reasons of clarity. a)  $\text{TMV}_{\text{Cys}}$  (yellow rod) was coupled to the maleimide-PEG<sub>11</sub>-biotin linker via its thiol groups (SH). In the next step, SA-HRP was bound to the linkers due to the strong affinity for biotin. b) The enzyme penicillinase was coupled to NHS-PEG<sub>12</sub>-maleimide linkers via its surface-exposed primary amine groups (NH<sub>2</sub>), generating NHS leaving groups. Subsequently,  $\text{TMV}_{\text{Cys}}$  was bound to the maleimide functionality of the enzyme-coupled linker via the thiol groups exposed to the CP subunits. .... 86

Figure 11: Analysis of the sensor enzyme activities in GM spots anchored on a hydrogel substrate. a) When offering ABTS for 20 min directly after sensor preparation, that is, without any washing steps, the enzymatic activity of HRP was found both for TMV-conjugated HRP (top left) and unconjugated SA-HRP (bottom left), as evidenced by the green color of the spots. Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. b) After extended washing of the samples, only the samples containing the TMV-conjugated HRP showed enzyme activity, indicating a stable immobilization of the TMV-displayed enzyme in the GM spots. Unbound SA-HRP was removed completely from the samples due to diffusion through the hydrogel meshes. c) Representative photos of GM spots on PEG-based hydrogels without (w/o) the substrate solution (top row), and after 20 min with (w) substrate solution (bottom row). Left: GM spots with TMV-conjugated HRP and the addition of ABTS solution (HRP/ABTS), which turned the spots green. Right: GM spots with TMV-conjugated Pen and addition of yellow nitrocefin solution (Pen/Nitro), which turned the spots red and the PEG-based hydrogel yellow. Scale bar 1 cm. .... 88

Figure SI 1: <sup>1</sup>H NMR spectrum of 11-bromoundecyl acrylate. .... 51

Figure SI 2: <sup>1</sup>H NMR spectrum of AUITB. .... 52

Figure SI 3: <sup>13</sup>C NMR spectrum of AUITB. .... 52

Figure SI 4: Zeta potential measurements of isothiuronium-functional hydrogels. The zeta potential as a function of the pH value is shown. a) PEGDA-0 hydrogels. b) PEGDA-0.1 hydrogels. c) PEGDA-0.5 hydrogels. d) PEGDA-1 hydrogels. e) PEGDA-2 hydrogels. f) PEGDA-3 hydrogels. .... 54

Figure SI 5: Surface energy of dry samples with its polar and disperse portions, measured with the sessile drop method (n = 3, PEGDA-2 n = 4). Explanation of symbols: \*\*/\* significantly different to PEGDA-0 (p < 0.01/0.05), ° significantly different to PEGDA-0.1 (p < 0.05), ^ significantly different to PEGDA-1 (p < 0.05). .... 55

Figure SI 6: Colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup> of E. coli on PEGDA-0 and PEGDA-2 hydrogels after 0 h and 24 h sample contact (n = 2). .... 55



Figure SI 7: Kinetics of diclofenac adsorption within isothiuronium-functional hydrogels. The diclofenac concentration $c_e$ in the supernatant was measured at specific time points. After 72 h, equilibrium conditions were reached. ....	56
Figure SI 8: Maximum intensity projections (MIP) of image stacks (z-stacks) recorded for fluorescence labelled hydrogels. Upper row: PEGDA-T hydrogels, samples treated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ . Lower row: PEGDA-NT hydrogels, controls in water. Scale bar 100 $\mu\text{m}$ .....	56
Figure SI 9: Photos of hydrogels after fluorescence staining. a) Non-treated PEGDA-NT hydrogels: PEGDA-0NT, PEGDA-1NT, PEGDA-2NT and PEGDA-3NT from upper left to lower right corner. b) Treated PEGDA-T hydrogels: PEGDA-0T, PEGDA-1T, PEGDA-2T and PEGDA-3T from upper left to lower right corner.....	57
Figure SI 10: Absorption measurements of the ABTS substrate conversion on isothiuronium-functional hydrogels. Non-treated PEGDA-2NT hydrogels were agitated in a solution either with or without a maleimide-PEG <sub>11</sub> -biotin linker, and afterwards in a solution with streptavidin-coupled horseradish peroxidase.....	57
Figure SI 11: Representative $^1\text{H}$ NMR spectrum of gelatin methacryloyl (GM) used in this study. ....	72
Figure SI 12: Printing setup for printing macroscopic hydrogels. The GM solution in a teflon mold was irradiated by a 800 nm laser with a TopHat beam shape.....	72
Figure SI 13: Double logarithmic plot of initial reaction rate $r_0$ of LAP cleavage against the average laser power $P$ . The slope of the linear regression line of 2.02 indicates a 2-photon induced LAP cleavage.....	73
Figure SI 14: Representative photos of hydrogels prepared by 2PP curing and after swelling to equilibrium. ....	73
Figure SI 15: Characterization of 2PP cured macroscopic hydrogels. A) Equilibrium degree of swelling (EDS) at different combinations of $I^2 \times t$ obtained by combining different laser powers $P$ with different scan speeds $v$ . The dashed line is the reference for EDS of hydrogels resulting from one-photon induced curing. The rather clear grouping of the data indicated that cross-linking is mainly influenced by the total irradiation dose. B) Gel yields $Y$ at different combinations of $I^2 \times t$ obtained by combining different laser powers $P$ with different scan speeds $v$ . The dashed line is the reference for $Y$ of hydrogels resulting from one-photon induced curing. Higher irradiation doses lead to higher $Y$ . C) Stiffness $G'$ at different combinations of $I^2 \times t$ obtained by combining different laser powers $P$ with different scan speeds $v$ . The dashed line is the reference for $G'$ of hydrogels resulting from one-photon induced curing. D) $G'$ against $\phi$ for all hydrogels tested. The clear correlation indicates that differences in the hydrogel properties can be attributed to different cross-linking densities in the hydrogels.....	74
Figure SI 16: Structural formula of the monomer AUITB. The monomer was copolymerized with poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) to introduce isothiuronium groups into the samples. ....	98
Figure SI 17: $^1\text{H}$ NMR spectrum of GM <sub>10</sub> . ....	98

Figure SI 18: Characterization of the GM solution. The solution consisted of 7.5 wt% GM with 0.7 wt% lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) relative to the biopolymer mass in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 ( $n = 3$ ). a) Viscosity of the solution against the shear rate. b) Surface tension of the solution as a function of the surface age of the bubbles. 99

Figure SI 19: Coupling of the coat protein (CP) subunits of TMV<sub>Cys</sub> to enzymes. TEM images after UAc negative staining of TMV<sub>Cys</sub>, TMV<sub>Cys</sub> coupled to penicillinase (TMV-Pen) and TMV<sub>Cys</sub> coupled to horseradish peroxidase (TMV-HRP), scale bars 100 nm. Lower right corner: 15 % SDS-PAGE to determine the coupling efficiency of TMV<sub>Cys</sub> CPs to the linker (Bio). Coupling efficiencies of 93 % (CPs with biotin-terminated linkers) were obtained (TMV<sub>Cys</sub>-Bio). M1 / M2: molecular mass markers, positive control (TMV<sub>Cys</sub>), N: negative control: sodium-potassium-phosphate (SPP) buffer. .... 101

Figure SI 20: Analysis of the enzyme activity in GM spots anchored on a hydrogel substrate directly after adding substrate solution (0 min). Either tobacco mosaic virus - horseradish peroxidase (TMV-HRP) conjugate or SA-HRP was integrated in the GM spot. Photos of hydrogels were taken directly after adding 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) substrate solution (0 min). Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added. For TMV-HRP conjugate an intensity was already detected in the 0 min photo for one spot. The enzyme reaction already started probably due to time delay at capturing the image. .... 102

Figure SI 21: Analysis of the enzyme activity in control GM spots anchored on a hydrogel substrate directly after adding ABTS substrate solution (0 min). Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added. As expected, no intensity was detected. .... 103

Figure SI 22: Analysis of the enzyme activity in control GM spots anchored on a hydrogel substrate after offering ABTS substrate solution for 20 min. Right next to the photos, the respective color intensity along the dashed line in the photos is plotted. A slight intensity was detected indicating an unspecific binding of some enzyme molecules to the TMV particles. The color reaction was not clearly seen with the bare eye. a) ABTS was added directly after sample preparation, i.e. without any washing steps. b) After extended washing of the samples, ABTS was added. .... 103

Figure SI 23: Enzyme activity of hydrogel sensor with penicillinase (Pen) after 22 months of dry storage, following its preparation and initial application. Remaining enzyme activity of TMV-Pen conjugates was tested after drying, cold storage and rehydration of the hydrogel samples. After thorough washing of the re-swollen gels, nitrocefin substrate solution was added and pictures were taken at specific time points indicated at the left. Enzyme activity resulted in a red color reaction in the GM spots. .... 105

Scheme 1: Schematic drawing of the all-soft multi-material combination in this study and its basic application as a qualitative biosensor. A substrate based on a humid PEG hydrogel is partially coated with surface-anchored spots of cross-linked GM hydrogels. The GM hydrogel spots contain either the enzyme penicillinase (left, TMV-Pen) or the enzyme horseradish peroxidase (right, TMV-HRP). Both enzymes are coupled to TMV particles and thus are physically entrapped in the GM hydrogel spots. When exposed to the corresponding substrates of the enzymes, the spots change color (bottom). ..... 80

Scheme 2: Schematic drawing of the different surface chemistries of the hydrogel substrates based on PEG. Left: Unmodified, non-functionalized PEGDA. Middle: PEGDA functionalized with isothiuronium groups. Right: PEGDA functionalized with thiol groups. .... 81

Scheme SI 1: a) Schematic representation of cross-linking chemistry during GM hydrogel curing. During curing, the methacrylic double bonds are converted to chemical cross-links so that a three-dimensional polymer network is formed. b) Surface anchoring of GM hydrogel spots on the PEG-based hydrogel support may be achieved by reaction with residual acrylic groups or entanglement. However, the exact mechanism is unclear. c) A TMV particle approximately drawn to scale (width) and half as long as when drawn to scale (length) with the GM mesh size. It becomes evident that the TMV particle cannot escape a fully cross-linked three-dimensional GM network by diffusion. .... 100

### III. Tabellenverzeichnis

Table 1: Adsorption capacity  $q_m$  and equilibrium constant  $K_s$  describing the adsorption of diclofenac on PEGDA hydrogels with and without isothiuronium functionalization. The values were obtained by nonlinear regression of the adsorption isotherms (Fig. 2c and d) with Eq. 7. .... 46

Table 2: Ratio of absorption values of ABTS solution after reaction for 25 min with samples and absorption values of non-used solution. Samples were the fully assembled soft sensor, that is, PEG-based hydrogels with GM spots containing either TMV-HRP conjugate or unbound SA-HRP. Samples were non-washed or washed before the reaction. Values are displayed as mean  $\pm$  SD (n = 3). .... 89

Table SI 1: Composition of the hydrogel precursor solution for sample preparation, given in mass fractions of PEGDA ( $\beta_{\text{PEGDA}}$ ), AUITB ( $\beta_{\text{AUITB}}$ ) and the photoinitiator Irgacure 2959 ( $\beta_{\text{PI}}$ ). .... 53

Table SI 2: Theoretical irradiation doses by variation of laser power P and scan speed v. .... 73

Table SI 3: Determined surface areas A of the GM spots, which were cross-linked under argon atmosphere, on day 0, 7, 14 and 21 on treated, non-functionalized PEG-based hydrogels (n = 3). .... 99

Table SI 4: Absorption values of ABTS solution after 25 min. Hydrogels with GM spots incorporating TMV-HRP conjugate, TMV and SA-HRP or SA-HRP, either non-washed or washed, were kept in the substrate solution for 25 min. The corresponding absorption values of non-used ABTS solution are displayed. Values are listed as mean  $\pm$  SD (n = 3). .... 104

## IV. Literaturverzeichnis

- [1] A. D. McNaught, Wilkinson, A., "Hydrogel", in *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [2] A. R. Khare, N. A. Peppas, *Biomaterials* **1995**, *16*, 559.
- [3] Y. Zhao, J. Kang, T. Tan, *Polymer* **2006**, *47*, 7702.
- [4] J. Jovanovic, B. Adnađević, A. Kostić, *Journal of Applied Polymer Science* **2009**, *116*, 1036.
- [5] A. Wenz, K. Borchers, G. E. M. Tovar, P. J. Kluger, *Biofabrication* **2017**, *9*, 044103.
- [6] A. Erben, M. Hörning, B. Hartmann, T. Becke, S. A. Eisler, A. Southan, S. Cranz, O. Hayden, N. Kneidinger, M. Königshoff, M. Lindner, G. E. M. Tovar, G. Burgstaller, H. Clausen-Schaumann, S. Sudhop, M. Heymann, *Advanced Healthcare Materials* **2020**, *9*, 2000918.
- [7] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6288.
- [8] S. Parveen, S. K. Sahoo, *European Journal of Pharmacology* **2011**, *670*, 372.
- [9] C. Claassen, A. Southan, J. Grubel, G. E. M. Tovar, K. Borchers, *Biomedical Materials* **2018**, *13*, 16.
- [10] N. Ahmad, B. Colak, D.-W. Zhang, M. J. Gibbs, M. Watkinson, C. R. Becer, J. E. Gautrot, S. Krause, *Sensors* **2019**, *19*, 9.
- [11] S. R. Makhsin, N. J. Goddard, R. Gupta, P. Gardner, P. J. Scully, *Analytical Chemistry* **2020**, *92*, 14907.
- [12] P. C. Nicolson, J. Vogt, *Biomaterials* **2001**, *22*, 3273.
- [13] T. Goda, K. Ishihara, *Expert Review of Medical Devices* **2006**, *3*, 167.
- [14] K. Kabiri, H. Omidian, M. J. Zohuriaan-Mehr, S. Doroudiani, *Polymer Composites* **2011**, *32*, 277.
- [15] G. Kakonke, T. Tesfaye, B. B. Sithole, M. Ntunka, *International Journal of Chemical Sciences* **2019**.
- [16] W. E. Hennink, C. F. van Nostrum, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 13.
- [17] M. F. Akhtar, M. Hanif, N. M. Ranjha, *Saudi Pharmaceutical Journal* **2016**, *24*, 554.
- [18] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, J. Wang, *Biomaterials Science* **2019**, *7*, 843.
- [19] G. Odian, "Chapter 3: Radical Chain polymerization", in *Principles of Polymerization*, 4 edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2004, p. 198.
- [20] J. Xia, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7692.
- [21] W. Wang, Z. Dong, P. Xia, D. Yan, Q. Zhang, *Macromolecular Rapid Communications* **1998**, *19*, 647.
- [22] E. Hoch, C. Schuh, T. Hirth, G. E. Tovar, K. Borchers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2012**, *23*, 2607.
- [23] L. Sewald, C. Claaßen, T. Götz, M. H. Claaßen, V. Truffault, G. E. M. Tovar, A. Southan, K. Borchers, *Macromolecular Bioscience* **2018**, *18*, 1800168.
- [24] M. Sutter, J. Siepmann, W. E. Hennink, W. Jiskoot, *Journal of Controlled Release* **2007**, *119*, 301.
- [25] C. Claaßen, M. Dannecker, J. Grubel, M.-E. Kotzampasi, G. E. M. Tovar, B. V. Stanzel, K. Borchers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2020**, *31*, 93.
- [26] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337.
- [27] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nature Biotechnology* **2005**, *23*, 47.
- [28] R. P. Babu, K. O'Connor, R. Seeram, *Progress in Biomaterials* **2013**, *2*, 8.
- [29] B.-S. Kim, D. J. Mooney, *Trends in Biotechnology* **1998**, *16*, 224.
- [30] D. L. Hern, J. A. Hubbell, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *39*, 266.
- [31] J. A. Burdick, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2002**, *23*, 4315.

- [32] F. Tan, X. Xu, T. Deng, M. Yin, X. Zhang, J. Wang, *Biomedical Materials* **2012**, 7, 11.
- [33] H. Li, T. Ma, M. Zhang, J. Zhu, J. Liu, F. Tan, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2018**, 29, 11.
- [34] U. S. K. Madduma-Bandarage, S. V. Madihally, *Journal of Applied Polymer Science* **2021**, 138, 50376.
- [35] G. Chen, T. Sato, T. Ushida, N. Ochiai, T. Tateishi, *Tissue Engineering* **2004**, 10, 323.
- [36] P. Kim, A. Yuan, K. H. Nam, A. Jiao, D. H. Kim, *Biofabrication* **2014**, 6, 024112.
- [37] J. Liang, Z. Guo, A. Timmerman, D. Grijpma, A. Poot, *Biomedical Materials* **2019**, 14, 024102.
- [38] A. Vila, N. Torras, A. G. Castaño, M. García-Díaz, J. Comelles, T. Pérez-Berezo, C. Corregidor, Ó. Castaño, E. Engel, V. Fernández-Majada, E. Martínez, *Biofabrication* **2020**, 12, 025008.
- [39] K. McAvoy, D. Jones, R. R. S. Thakur, *Pharmaceutical Research* **2018**, 35, 17.
- [40] M. Mellott, K. Searcy, M. Pishko, *Biomaterials* **2001**, 22, 929.
- [41] A. T. Metters, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Polymer* **2000**, 41, 3993.
- [42] S. J. Bryant, K. S. Anseth, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2003**, 64, 70.
- [43] B. Reid, M. Gibson, A. Singh, J. Taube, C. Furlong, M. Murcia, J. Elisseeff, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2015**, 9, 315.
- [44] M. B. Browning, S. N. Cereceres, P. T. Luong, E. M. Cosgriff-Hernandez, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, 102, 4244.
- [45] J. P. Mazzocchi, D. L. Feke, H. Baskaran, P. N. Pintauro, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **2010**, 93, 558.
- [46] M. B. Browning, E. Cosgriff-Hernandez, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 779.
- [47] Q. T. Nguyen, Y. Hwang, A. C. Chen, S. Varghese, R. L. Sah, *Biomaterials* **2012**, 33, 6682.
- [48] J. Grübel, V. L. Albernaz, A. Tsianaka, C. O. Jauch, S. Quirin, C. Kerger, C. G. Kohl, A. Burger-Kentischer, G. E. M. Tovar, A. Southan, *Scientific Reports* **2023**, 13, 10361.
- [49] J. S. Temenoff, K. A. Athanasiou, R. G. LeBaron, A. G. Mikos, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 59, 429.
- [50] D. Choi, W. Lee, J. Park, W. Koh, *Biomedical Materials and Engineering* **2008**, 18, 345.
- [51] S. J. Bryant, K. S. Anseth, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 59, 63.
- [52] S. J. Bryant, T. T. Chowdhury, D. A. Lee, D. L. Bader, K. S. Anseth, *Annals of Biomedical Engineering* **2004**, 32, 407.
- [53] G. M. Cruise, D. S. Scharp, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1998**, 19, 1287.
- [54] K. Engberg, C. W. Frank, *Biomedical Materials* **2011**, 6, 10.
- [55] T. Bal, B. Kepsutlu, S. Kizilel, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, 102, 487.
- [56] L. Shi, J. Zhang, M. Zhao, S. Tang, X. Cheng, W. Zhang, W. Li, X. Liu, H. Peng, Q. Wang, *Nanoscale* **2021**, 13, 10748.
- [57] N. A. Alcantar, E. S. Aydil, J. N. Israelachvili, *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, 51, 343.
- [58] E. K. U. Larsen, M. B. L. Mikkelsen, N. B. Larsen, *Biomicrofluidics* **2014**, 8, 11.
- [59] C. R. Nuttelman, M. C. Tripodi, K. S. Anseth, *Matrix Biology* **2005**, 24, 208.
- [60] A. Southan, E. Hoch, V. Schönhaar, K. Borchers, C. Schuh, M. Müller, M. Bach, G. E. M. Tovar, *Polymer Chemistry* **2014**, 5, 5350.
- [61] W. Yang, H. Yu, G. Li, Y. Wang, L. Liu, *Biomedical Microdevices* **2016**, 18, 9.
- [62] D. Leckband, S. Sheth, A. Halperin, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1999**, 10, 1125.
- [63] H. Chen, Z. Zhang, Y. Chen, M. A. Brook, H. Sheardown, *Biomaterials* **2005**, 26, 2391.
- [64] S. Lee, J. Vörös, *Langmuir* **2005**, 21, 11957.

- [65] L. D. Unsworth, H. Sheardown, J. L. Brash, *Langmuir* **2005**, *21*, 1036.
- [66] J. Hoffmann, J. Groll, J. Heuts, H. Rong, D. Klee, G. Ziemer, M. Moeller, H. P. Wendel, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2006**, *17*, 985.
- [67] S. Sugiura, J.-i. Eda Hiro, K. Sumaru, T. Kanamori, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *63*, 301.
- [68] A. P. Kuo, N. Bhattacharjee, Y.-S. Lee, K. Castro, Y. T. Kim, A. Folch, *Advanced materials technologies* **2019**, *4*, 1800395.
- [69] A. Urrios, C. Parra-Cabrera, N. Bhattacharjee, A. M. Gonzalez-Suarez, L. G. Rigat-Brugarolas, U. Nallapatti, J. Samitier, C. A. DeForest, F. Posas, J. L. Garcia-Cordero, A. Folch, *Lab on a Chip* **2016**, *16*, 2287.
- [70] B. Grigoryan, S. J. Paulsen, D. C. Corbett, D. W. Sazer, C. L. Fortin, A. J. Zaita, P. T. Greenfield, N. J. Calafat, J. P. Gounley, A. H. Ta, F. Johansson, A. Randles, J. E. Rosenkrantz, J. D. Louis-Rosenberg, P. A. Galie, K. R. Stevens, J. S. Miller, *Science* **2019**, *364*, 458.
- [71] T. J. Baek, N. H. Kim, J. Choo, E. K. Lee, G. H. Seong, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *17*, 1826.
- [72] A. Calìò, P. Dardano, V. Di Palma, M. F. Bevilacqua, A. Di Matteo, H. Iuele, L. De Stefano, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2016**, *236*, 343.
- [73] Y. Tabata, Y. Ikada, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, *31*, 287.
- [74] R. Schrieber, H. Gareis, "Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice", Wiley-VCH GmbH Weinheim, Germany, 2007.
- [75] G. Murphy, C. G. McAlpine, C. T. Poll, J. J. Reynolds, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1985**, *831*, 49.
- [76] P. E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, P. M. Rudd, R. A. Dwek, G. Opdenakker, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *37*, 375.
- [77] L. Yang, M. Yaseen, X. Zhao, P. Coffey, F. Pan, Y. Wang, H. Xu, J. Webster, J. R. Lu, *Biomedical Materials* **2015**, *10*, 025003.
- [78] K. Su, C. Wang, *Biotechnology Letters* **2015**, *37*, 2139.
- [79] N. Davidenko, C. F. Schuster, D. V. Bax, R. W. Farndale, S. Hamaia, S. M. Best, R. E. Cameron, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2016**, *27*, 148.
- [80] H. B. Bohidar, S. S. Jena, *The Journal of Chemical Physics* **1994**, *100*, 6888.
- [81] O. V. Nazarova, E. F. Panarin, L. L. Kuznetsov, P. M. Zavlin, *Russian Journal of Applied Chemistry* **1994**, *67*, 623.
- [82] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31.
- [83] E. Hoch, T. Hirth, G. E. M. Tovar, K. Borchers, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 5675.
- [84] L. Rebers, T. Granse, G. E. M. Tovar, A. Southan, K. Borchers, *Gels* **2019**, *5*, 4.
- [85] F. Dehli, A. Southan, W. Drenckhan, C. Stubenrauch, *Journal of Colloid and Interface Science* **2021**, 588, 326.
- [86] W. Schuurman, P. A. Levett, M. W. Pot, P. R. van Weeren, W. J. Dhert, D. W. Hutmacher, F. P. Melchels, T. J. Klein, J. Malda, *Macromolecular Bioscience* **2013**, *13*, 551.
- [87] L. Gu, T. Li, X. Song, X. Yang, S. Li, L. Chen, P. Liu, X. Gong, C. Chen, L. Sun, *Regenerative Biomaterials* **2019**, *7*, 195.
- [88] J. W. Nichol, S. T. Koshy, H. Bae, C. M. Hwang, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5536.
- [89] W. Xiao, J. He, J. W. Nichol, L. Wang, C. B. Hutson, B. Wang, Y. Du, H. Fan, A. Khademhosseini, *Acta Biomaterialia* **2011**, *7*, 2384.
- [90] S. H. Hsu, S. W. Whu, S. C. Hsieh, C. L. Tsai, D. C. Chen, T. S. Tan, *Artificial Organs* **2004**, *28*, 693.
- [91] W. C. Hayes, A. J. Bodine, *Journal of Biomechanics* **1978**, *11*, 407.

- [92] L. Rebers, R. Reichsöllner, S. Regett, G. E. M. Tovar, K. Borchers, S. Baudis, A. Southan, *Scientific Reports* **2021**, *11*, 3256.
- [93] Y. Wang, M. Ma, J. Wang, W. Zhang, W. Lu, Y. Gao, B. Zhang, Y. Guo, *Materials* **2018**, *11*, 1345.
- [94] F. Tan, J. Liu, K. Song, M. Liu, J. Wang, *Journal of Materials Science* **2018**, *53*, 908.
- [95] T. Liu, Z. Xie, Y. Zhang, J. Fan, Q. Liu, *RSC Advances* **2017**, *7*, 38279.
- [96] A. Schneider, C. Vodouhê, L. Richert, G. Francius, E. Le Guen, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Frisch, C. Picart, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 139.
- [97] P. W. Atkins, J. de Paula, J. J. Keeler, "19.2 Adsorption und Desorption", in *Physikalische Chemie*, 6 edition, Wiley-VCH GmbH, Weinheim, 2022, p. 1078.
- [98] H. K. Agbovi, L. D. Wilson, "1 - Adsorption processes in biopolymer systems: fundamentals to practical applications", in *Natural Polymers-Based Green Adsorbents for Water Treatment*, S. Kalia, Ed., Elsevier, Chennai, Indien, 2021, p. 1.
- [99] S. K. Lagergren, *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* **1898**, *24*, 1.
- [100] Y. S. Ho, G. McKay, *Chemical Engineering Journal* **1998**, *70*, 115.
- [101] Y. S. Ho, G. McKay, *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **1999**, *34*, 1179.
- [102] Y. S. Ho, G. McKay, *Process Biochemistry* **1999**, *34*, 451.
- [103] F.-C. Wu, R.-L. Tseng, S.-C. Huang, R.-S. Juang, *Chemical Engineering Journal* **2009**, *151*, 1.
- [104] J.-P. Simonin, *Chemical Engineering Journal* **2016**, *300*, 254.
- [105] M. Kaczorowski, G. Rokicki, *Polimery* **2016**, *61*, 747.
- [106] M. Herold, M. Håkanson, H. Brunner, G. E. M. Tovar, "Modular surfmers with activated ester function — A colloidal tool for the preparation of bioconjugative nanoparticles", in *Smart Colloidal Materials*, W. Richtering, Ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006, p. 30.
- [107] V. L. Albernaz, M. Bach, A. Weber, A. Southan, G. E. M. Tovar, *Polymers* **2018**, *10*, 408.
- [108] P. Hartmann, A. Pienaar, H. Pasch, R. Sanderson, *Macromolecular Symposia* **2004**, *214*, 217.
- [109] T. Friedrich, B. Tieke, M. Meyer, W. Pyckhout-Hintzen, V. Pipich, *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 5666.
- [110] T. Friedrich, B. Tieke, F. J. Stadler, C. Bailly, *Soft Matter* **2011**, *7*, 6590.
- [111] W. Li, H. An, Y. Tan, C. Lu, C. Liu, P. Li, K. Xu, P. Wang, *Soft Matter* **2012**, *8*, 5078.
- [112] S. Cohen, C. Gelber, M. Natan, E. Banin, E. Corem-Salkmon, S. Margel, *Journal of Nanobiotechnology* **2016**, *14*, 56.
- [113] T. Luxbacher, "3. The zeta potential", in *The Zeta Guide - Principles of the streaming potential technique*, 1st edition, Anton Paar GmbH, Graz, Austria, 2014, p. 12
- [114] T. Luxbacher, "6.1 pH value", in *The Zeta Guide - Principles of the streaming potential technique*, 1st edition, Anton Paar GmbH, Graz, Austria, 2014, p. 42
- [115] Z. Kazimierczuk, M. Chalimoniuk, A. E. Laudy, R. Moo-Puc, R. Cedillo-Rivera, B. J. Starosciak, S. J. Chrapusta, *Archives of Pharmacal Research* **2010**, *33*, 821.
- [116] T. Ikeda, H. Yamaguchi, S. Tazuke, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1984**, *26*, 139.
- [117] B. Gottenbos, H. C. van der Mei, F. Klatter, P. Nieuwenhuis, H. J. Busscher, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1417.
- [118] M. Koronkiewicz, Z. Chilmonczyk, Z. Kazimierczuk, *Medicinal Chemistry Research* **2012**, *21*, 3111.
- [119] M. Ferreira, L. S. Assunção, A. H. Silva, F. B. Filippin-Monteiro, T. B. Creczynski-Pasa, M. M. Sá, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *129*, 151.



- [120] A. Warshawsky, M. M. B. Fieberg, P. Mihalik, T. G. Murphy, Y. B., *Separation and Purification Methods* **1980**, 9, 209.
- [121] P. J. Lloyd-Jones, J. R. Rangel-Mendez, M. Streat, *Process Safety and Environmental Protection* **2004**, 82, 301.
- [122] Z. Hubicki, M. Leszczyńska, B. Łodyga, A. Łodyga, *Desalination* **2007**, 207, 80.
- [123] S. A. Egorov, A. A. Blokhin, Y. V. Murashkin, *Russian Journal of Applied Chemistry* **2020**, 93, 1359.
- [124] N. Mureau, F. Guittard, S. Géribaldi, *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, 2885.
- [125] Z. Yu, M. Cui, J. Yan, Y. You, *Science China Chemistry* **2010**, 53, 1663.
- [126] L. Garamszegi, C. Donzel, G. Carrot, T. Q. Nguyen, J. Hilborn, *Reactive and Functional Polymers* **2003**, 55, 179.
- [127] V. V. Krongauz, C. P. Chawla, *Polymer* **2003**, 44, 3871.
- [128] C. Henriquez, C. Bueno, E. A. Lissi, M. V. Encinas, *Polymer* **2003**, 44, 5559.
- [129] X. Y. Cai, J. Z. Li, N. N. Li, J. C. Chen, E.-T. Kang, L. Q. Xu, *Biomaterials Science* **2016**, 4, 1663.
- [130] A. Metters, J. Hubbell, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 290.
- [131] M. H. Stenzel, *ACS Macro Letters* **2013**, 2, 14.
- [132] C. Koch, K. Wabbel, F. J. Eber, P. Krolla-Sidenstein, C. Azucena, H. Gliemann, S. Eiben, F. Geiger, C. Wege, *Frontiers in Plant Science* **2015**, 6, 17.
- [133] S. Sajeesh, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, C. P. Sharma, *Acta Biomaterialia* **2010**, 6, 3072.
- [134] C. Yesildag, Z. Ouyang, Z. Zhang, M. C. Lensen, *Frontiers in Chemistry* **2019**, 6, 10.
- [135] R. Ravichandran, M. M. Islam, E. I. Alarcon, A. Samanta, S. Wang, P. Lundström, J. Hilborn, M. Griffith, J. Phopase, *Journal of Materials Chemistry B* **2016**, 4, 318.
- [136] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chemistry of Materials* **2014**, 26, 724.
- [137] Y. Sun, H. Liu, L. Cheng, S. Zhu, C. Cai, T. Yang, L. Yang, P. Ding, *Polymer International* **2018**, 67, 25.
- [138] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, 30, 493.
- [139] C. A. Mandon, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Analytical Chemistry* **2016**, 88, 10767.
- [140] K. Dubbin, Z. Dong, D. M. Park, J. Alvarado, J. Su, E. Wasson, C. Robertson, J. Jackson, A. Bose, M. L. Moya, Y. Jiao, W. F. Hynes, *Nano Letters* **2021**, 21, 1352.
- [141] W. Zhu, X. Ma, M. Gou, D. Mei, K. Zhang, S. Chen, *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, 40, 103.
- [142] C. Mandrycky, Z. Wang, K. Kim, D. H. Kim, *Biotechnology Advances* **2016**, 34, 422.
- [143] P. Fiedor, J. Ortyl, *Materials* **2020**, 13, 2951.
- [144] L. S. S. M. Magalhães, F. E. P. Santos, C. d. M. V. Elias, S. Afewerki, G. F. Sousa, A. S. A. Furtado, F. R. Marciano, A. O. Lobo, *Journal of Functional Biomaterials* **2020**, 11, 12.
- [145] V. B. Morris, S. Nimbalkar, M. Younesi, P. McClellan, O. Akkus, *Annals of Biomedical Engineering* **2017**, 45, 286.
- [146] H. Suo, J. Zhang, M. Xu, L. Wang, *Materials Science and Engineering: C* **2021**, 123, 111963.
- [147] Y. Wang, Y. Chen, J. Zheng, L. Liu, Q. Zhang, *ACS Omega* **2022**, 7, 12076.
- [148] Y. Chen, X. Xiong, X. Liu, R. Cui, C. Wang, G. Zhao, W. Zhi, M. Lu, K. Duan, J. Weng, S. Qu, J. Ge, *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, 8, 5500.
- [149] J. L. Dávila, M. A. d'Ávila, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **2019**, 101, 675.
- [150] Z. Wang, R. Abdulla, B. Parker, R. Samanipour, S. Ghosh, K. Kim, *Biofabrication* **2015**, 7, 10.

- [151] V. H. Mouser, F. P. Melchels, J. Visser, W. J. Dhert, D. Gawlitta, J. Malda, *Biofabrication* **2016**, 8, 035003.
- [152] B.-J. de Gans, U. S. Schubert, *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, 24, 659.
- [153] B.-J. de Gans, P. C. Duineveld, U. S. Schubert, *Advanced Materials* **2004**, 16, 203.
- [154] B. Derby, *Annual Review of Materials Research* **2010**, 40, 395.
- [155] Y. Zhang, H. Liu, "Physics of multiphase microflows and microdroplets", in *Microdroplet technology: principles and emerging applications in biology and chemistry*, P. Day, A. Manz, and Y. Zhang, Eds., Springer, New York, 2012, p. 1
- [156] J. E. Fromm, *IBM Journal of Research and Development* **1984**, 28, 322.
- [157] N. Reis, B. Derby, *MRS Online Proceedings Library* **2000**, 624, 65.
- [158] A. K. Miri, I. Mirzaee, S. Hassan, S. Mesbah Oskui, D. Nieto, A. Khademhosseini, Y. S. Zhang, *Lab Chip* **2019**, 19, 2019.
- [159] F. P. W. Melchels, J. Feijen, D. W. Grijpma, *Biomaterials* **2010**, 31, 6121.
- [160] K.-S. Lee, R. H. Kim, D.-Y. Yang, S. H. Park, *Progress in Polymer Science* **2008**, 33, 631.
- [161] S. D. Gittard, A. Koroleva, A. Nguyen, E. Fadeeva, A. Gaidukeviciute, S. Schlie, R. J. Narayan, B. Chichkov, *Frontiers in Bioscience-Elite* **2013**, 5, 602.
- [162] A. Ovsianikov, M. Malinauskas, S. Schlie, B. Chichkov, S. Gittard, R. Narayan, M. Löbner, K. Sternberg, K. P. Schmitz, A. Haverich, *Acta Biomaterialia* **2011**, 7, 967.
- [163] A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, L. Möller, G. Dräger, B. Chichkov, *Biomacromolecules* **2011**, 12, 851.
- [164] S. Engelhardt, E. Hoch, K. Borchers, W. Meyer, H. Krüger, G. E. M. Tovar, A. Gillner, *Biofabrication* **2011**, 3, 025003.
- [165] D. Serien, S. Takeuchi, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2017**, 3, 487.
- [166] A. Shrestha, B. N. Allen, L. A. Wiley, B. A. Tucker, K. S. Worthington, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **2020**, 36, 42.
- [167] Y. Yuan, L. Chen, Z. Shi, J. Chen, *Nanomaterials* **2022**, 12, 391.
- [168] L. Brigo, A. Urciuolo, S. Giulitti, G. Della Giustina, M. Tromayer, R. Liska, N. Elvassore, G. Brusatin, *Acta Biomaterialia* **2017**, 55, 373.
- [169] T. Bückmann, N. Stenger, M. Kadic, J. Kaschke, A. Frölich, T. Kennerknecht, C. Eberl, M. Thiel, M. Wegener, *Advanced Materials* **2012**, 24, 2710.
- [170] A.-I. Bunea, D. Martella, S. Nocentini, C. Parmeggiani, R. Taboryski, D. S. Wiersma, *Advanced Intelligent Systems* **2021**, 3, 2000256.
- [171] J. Li, P. Fejes, D. Lorensen, B. C. Quirk, P. B. Noble, R. W. Kirk, A. Orth, F. M. Wood, B. C. Gibson, D. D. Sampson, R. A. McLaughlin, *Scientific Reports* **2018**, 8, 14789.
- [172] K. Weber, D. Werdehausen, P. König, S. Thiele, M. Schmid, M. Decker, P. W. De Oliveira, A. Herkommer, H. Giessen, *Optical Materials Express* **2020**, 10, 2345.
- [173] J. A. Kim, D. J. Wales, A. J. Thompson, G.-Z. Yang, *Advanced Optical Materials* **2020**, 8, 1901934.
- [174] H.-B. Sun, S. Matsuo, H. Misawa, *Applied Physics Letters* **1999**, 74, 786.
- [175] J. Scrimgeour, D. N. Sharp, C. F. Blanford, O. M. Roche, R. G. Denning, A. J. Turberfield, *Advanced Materials* **2006**, 18, 1557.
- [176] Z.-B. Sun, X.-Z. Dong, W.-Q. Chen, S. Nakanishi, X.-M. Duan, S. Kawata, *Advanced Materials* **2008**, 20, 914.
- [177] W.-K. Wang, Z.-B. Sun, M.-L. Zheng, X.-Z. Dong, Z.-S. Zhao, X.-M. Duan, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115, 11275.
- [178] R. K. Jayne, T. J. Stark, J. B. Reeves, D. J. Bishop, A. E. White, *Advanced materials technologies* **2018**, 3, 1700293.
- [179] D. Wu, Q.-D. Chen, L.-G. Niu, J.-N. Wang, J. Wang, R. Wang, H. Xia, H.-B. Sun, *Lab on a Chip* **2009**, 9, 2391.

- [180] D. Mandt, P. Gruber, M. Markovic, M. Tromayer, M. Rothbauer, S. R. A. Kratz, S. F. Ali, J. V. Hoorick, W. Holnthoner, S. Mühleder, P. Dubruel, S. V. Vlierberghe, P. Ertl, R. Liska, A. Ovsianikov, *International Journal of Bioprinting* **2018**, *4*, 144.
- [181] L. A. Terry, S. F. White, L. J. Tigwell, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1309.
- [182] P. Mehrotra, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **2016**, *6*, 153.
- [183] P. Martinkova, M. Pohanka, *Analytical Letters* **2015**, *48*, 2509.
- [184] V. Naresh, N. Lee, *Sensors* **2021**, *21*, 1109.
- [185] G. S. Wilson, Y. Hu, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2693.
- [186] C. R. Ispas, G. Crivat, S. Andreescu, *Analytical Letters* **2012**, *45*, 168.
- [187] L. C. Clark Jr., C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29.
- [188] H. J. Hecht, D. Schomburg, H. Kalisz, R. D. Schmid, *Biosensors and Bioelectronics* **1993**, *8*, 197.
- [189] S. Ferri, K. Kojima, K. Sode, *Journal of Diabetes Science and Technology* **2011**, *5*, 1068.
- [190] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochemische Zeitung* **1913**, *49*, 333.
- [191] A. Liese, L. Hilterhaus, M. Howaldt, H. Chmiel, "Enzymkinetik", in *Bioprozesstechnik*, 3 edition, H. Chmiel, Ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011, p. 67.
- [192] H. T. Imam, P. C. Marr, A. C. Marr, *Green Chemistry* **2021**, *23*, 4980.
- [193] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. Rajaram, *3 Biotech* **2013**, *3*, 1.
- [194] L. Chaiet, F. J. Wolf, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1964**, *106*, 1.
- [195] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science* **1989**, *243*, 85.
- [196] S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan, Y. Wang, Y. Yuan, H. Bae, B. Dixon, P. Chen, *Biotechnology Advances* **2017**, *35*, 530.
- [197] C. D. Spicer, *Polymer Chemistry* **2020**, *11*, 184.
- [198] J. Li, D. J. Mooney, *Nature Reviews Materials* **2016**, *1*, 16071.
- [199] Z. Sun, C. Song, C. Wang, Y. Hu, J. Wu, *Molecular Pharmaceutics* **2020**, *17*, 373.
- [200] J. Tavakoli, Y. Tang, *Polymers* **2017**, *9*, 364.
- [201] I. Y. Jung, J. S. Kim, B. R. Choi, K. Lee, H. Lee, *Advanced Healthcare Materials* **2017**, *6*, 1601475.
- [202] Y. Lee, W. J. Song, J. Y. Sun, *Materials Today Physics* **2020**, *15*, 100258.
- [203] Z. Shen, Z. Zhang, N. Zhang, J. Li, P. Zhou, F. Hu, Y. Rong, B. Lu, G. Gu, *Advanced Materials* **2022**, *34*, 2203650.
- [204] C. Claaßen, M. H. Claaßen, F. Gohl, G. E. M. Tovar, K. Borchers, A. Southan, *Macromolecular Bioscience* **2018**, *18*, 1800104.
- [205] F. Dehli, C. Stubenrauch, A. Southan, *Macromolecular Bioscience* **2022**, *22*, 2200139.
- [206] S. R. Shin, B. Migliori, B. Miccoli, Y.-C. Li, P. Mostafalu, J. Seo, S. Mandla, A. Enrico, S. Antona, R. Sabarish, T. Zheng, L. Pirrami, K. Zhang, Y. S. Zhang, K.-t. Wan, D. Demarchi, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1704189.
- [207] C. Lee, M. Kim, Y. J. Kim, N. Hong, S. Ryu, H. J. Kim, S. Kim, *International Journal of Control, Automation and Systems* **2017**, *15*, 3.
- [208] A. Calò, S. Eiben, M. Okuda, A. M. Bittner, *Japanese Journal of Applied Physics* **2016**, *55*, 03DA01.
- [209] P. Goelet, G. P. Lomonosoff, P. J. Butler, M. E. Akam, M. J. Gait, J. Karn, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1982**, *79*, 5818.
- [210] K. Namba, R. Pattanayek, G. Stubbs, *Journal of Molecular Biology* **1989**, *208*, 307.
- [211] X. Z. Fan, E. Pomerantseva, M. Gnerlich, A. Brown, K. Gerasopoulos, M. McCarthy, J. Culver, R. Ghodssi, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **2013**, *31*, 050815.
- [212] B. D. Harrison, T. M. A. Wilson, Y. Okada, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **1999**, *354*, 569.
- [213] W. Shenton, T. Douglas, M. Young, G. Stubbs, S. Mann, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 253.

- [214] M. Knez, M. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, T. P. Martin, K. Kern, *Advanced Functional Materials* **2004**, *14*, 116.
- [215] A. Kadri, E. Maiß, N. Amsharov, A. M. Bittner, S. Balci, K. Kern, H. Jeske, C. Wege, *Virus Research* **2011**, *157*, 35.
- [216] A. M. Wen, Y. Wang, K. Jiang, G. C. Hsu, H. Gao, K. L. Lee, A. C. Yang, X. Yu, D. I. Simon, N. F. Steinmetz, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 6037.
- [217] D. Vilona, R. Di Lorenzo, M. Carraro, G. Licini, L. Trainotti, M. Bonchio, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 6718.
- [218] K. Altintoprak, A. Seidenstücker, A. Welle, S. Eiben, P. Atanasova, N. Stitz, A. Plettl, J. Bill, H. Gliemann, H. Jeske, D. Rothenstein, F. Geiger, C. Wege, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2015**, *6*, 1399.
- [219] S. Shukla, F. J. Eber, A. S. Nagarajan, N. A. DiFranco, N. Schmidt, A. M. Wen, S. Eiben, R. M. Twyman, C. Wege, N. F. Steinmetz, *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 874.
- [220] P. Atanasova, N. Stitz, S. Sanctis, J. H. M. Maurer, R. C. Hoffmann, S. Eiben, H. Jeske, J. J. Schneider, J. Bill, *Langmuir* **2015**, *31*, 3897.
- [221] A. Niehl, F. Appaix, S. Boscá, B. van der Sanden, J.-F. Nicoud, F. Bolze, M. Heinlein, *Frontiers in Plant Science* **2016**, *6*.
- [222] M. A. Bruckman, J. Liu, G. Koley, Y. Li, B. Benicewicz, Z. Niu, Q. Wang, *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 5715.
- [223] X. Z. Fan, L. Naves, N. P. Siwak, A. Brown, J. Culver, R. Ghodssi, *Nanotechnology* **2015**, *26*, 205501.
- [224] M. Bäcker, C. Koch, S. Eiben, F. Geiger, F. Eber, H. Gliemann, A. Poghossian, C. Wege, M. J. Schöning, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, *238*, 716.
- [225] F. Zang, K. Gerasopoulos, A. D. Brown, J. N. Culver, R. Ghodssi, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 8471.
- [226] C. Koch, A. Poghossian, M. J. Schöning, C. Wege, *Nanotheranostics* **2018**, *2*, 184.
- [227] A. Poghossian, M. Jablonski, C. Koch, T. S. Bronder, D. Rolka, C. Wege, M. J. Schöning, *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *110*, 168.
- [228] M. Welden, A. Poghossian, F. Vahidpour, T. Wendlandt, M. Keusgen, C. Wege, M. J. Schöning, *Biosensors* **2022**, *12*, 43.
- [229] M. Welden, R. Severins, A. Poghossian, C. Wege, J. Bongaerts, P. Siegert, M. Keusgen, M. J. Schöning, *Chemosensors* **2022**, *10*, 218.
- [230] F. C. Geiger, F. J. Eber, S. Eiben, A. Mueller, H. Jeske, J. P. Spatz, C. Wege, *Nanoscale* **2013**, *5*, 3808.
- [231] T. Cha, A. Guo, X.-Y. Zhu, *PROTEOMICS* **2005**, *5*, 416.
- [232] M. Friedel, A. Baumketner, J.-E. Shea, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 8396.
- [233] A. Liese, L. Hilterhaus, *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6236.
- [234] X. Lyu, R. Gonzalez, A. Horton, T. Li, *Catalysts* **2021**, *11*, 1211.
- [235] V. Vassallo, A. Tsianaka, N. Alessio, J. Grübel, M. Cammarota, G. E. M. Tovar, A. Southan, C. Schiraldi, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2022**, *110*, 1210.
- [236] A. Peter, J. Grübel, K. Hirzel, S. Asmanidou, G. E. M. Tovar, A. Southan, M. Heymann, "Two-photon printing of arbitrary hydrogel structures using 3D beam shaping with high throughput rates ", prepared for publication, 2024.
- [237] J. Grübel, T. Wendlandt, D. Urban, C. O. Jauch, C. Wege, G. E. M. Tovar, A. Southan, *Macromolecular Bioscience* **2023**, 2300311.
- [238] R. Chapla, M. A. Abed, J. West, *Polymers* **2020**, *12*, 16.
- [239] A. R. Osi, H. Zhang, J. Chen, Y. Zhou, R. Wang, J. Fu, P. Müller-Buschbaum, Q. Zhong, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2021**, *13*, 22902.
- [240] M. L. Torres-Mapa, M. Singh, O. Simon, J. L. Mapa, M. Machida, A. Günther, B. Roth, D. Heinemann, M. Terakawa, A. Heisterkamp, *Sensors* **2019**, *19*, 15.

- [241] J. Erfkamp, M. Guenther, G. Gerlach, *Sensors* **2019**, *19*, 15.
- [242] C. A. Lieber, A. Mahadevan-Jansen, *Applied Spectroscopy* **2003**, *57*, 1363.
- [243] P. J. Flory, "*Principles of Polymer Chemistry*", Cornell University Press, Ithaca and London, 1953.
- [244] J. C. Bray, E. W. Merrill, *Journal of Applied Polymer Science* **1973**, *17*, 3779.
- [245] E. W. Merrill, K. A. Dennison, C. Sung, *Biomaterials* **1993**, *14*, 1117.
- [246] G. Ström, M. Fredriksson, P. Stenius, *Journal of Colloid and Interface Science* **1987**, *119*, 352.
- [247] K. Gebhardt, "Grundlagen der physikalischen Chemie von Grenzflächen und Methoden zur Bestimmung grenzflächenenergetischer Größen", in *Fraunhofer-Institut für Grenzflächentechnik IGB*, Stuttgart, 1982.
- [248] D. K. Owens, R. C. Wendt, *Journal of Applied Polymer Science* **1969**, *13*, 1741.
- [249] D. H. Kaelble, *The Journal of Adhesion* **1970**, *2*, 66.
- [250] W. Rabel, *Farbe und Lack* **1971**, *77*, 997.
- [251] D. Gulsen, A. Chauhan, *Journal of Membrane Science* **2006**, *269*, 35.
- [252] T. J. Dursch, N. O. Taylor, D. E. Liu, R. Y. Wu, J. M. Prausnitz, C. J. Radke, *Biomaterials* **2014**, *35*, 620.
- [253] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, *Nature Methods* **2012**, *9*, 676.
- [254] M. B. Foreiter, H. Q. N. Gunaratne, P. Nockemann, K. R. Seddon, P. J. Stevenson, D. F. Wassell, *New Journal of Chemistry* **2013**, *37*, 515.
- [255] O. B. Joseph, A. T. Sholagbade, J. O. Olubunmi, *Journal of Applied Chemical Science International* **2016**, *7*, 90.
- [256] M. Sá, M. Ferreira, A. Bortoluzzi, L. Fernandes, S. Cunha, *Arkivoc* **2009**, *2010*, 303.
- [257] M. S. Sorokin, V. A. Lopyrev, N. N. Chipanina, L. V. Sherstyannikova, M. G. Voronkov, *Russian Journal of General Chemistry* **2004**, *74*, 551.
- [258] P. Hemalatha, V. Veeravazhuthi, J. Mallika, S. K. Narayandass, D. Mangalaraj, *Crystal Research and Technology* **2006**, *41*, 775.
- [259] A. C. Sagle, E. M. Van Wagner, H. Ju, B. D. McCloskey, B. D. Freeman, M. M. Sharma, *Journal of Membrane Science* **2009**, *340*, 92.
- [260] Y.-H. M. Chan, R. Schweiss, C. Werner, M. Grunze, *Langmuir* **2003**, *19*, 7380.
- [261] S. Loganathan, S. Sankaran, *Colloid and Surface Science* **2017**, *2*, 6.
- [262] H. J. Kreuzer, R. L. C. Wang, M. Grunze, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8384.
- [263] T. Luxbacher, "3.1 Surface charge formation", in *The Zeta Guide - Principles of the streaming potential technique*, 1st edition, Anton Paar GmbH, Graz, Austria, 2014, p. 14
- [264] K. N. Dalby, Jencks, William P., *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1997**, 1555.
- [265] S. Hoving, M. Bar-Shimon, J. J. Tijmes, R. Goldshleger, D. M. Tal, S. J. Karlish, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 29788.
- [266] N. A. Lange, "8.21 Proton-transfer reactions. Table 8.8: pKa values of organic materials in water at 25 °C", in *Lange's Handbook of Chemistry*, 15th Edition edition, J.A. Dean, Ed., McGraw-Hill, Inc., New York, USA, 1999, p. 1169.
- [267] H. Yokoyama, T. Miyamae, S. Han, T. Ishizone, K. Tanaka, A. Takahara, N. Torikai, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5180.
- [268] F. J. Holly, M. F. Refojo, *Journal of Biomedical Materials Research* **1975**, *9*, 315.
- [269] C. Maldonado-Codina, P. B. Morgan, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *83A*, 496.
- [270] R. Bongiovanni, G. Malucelli, A. Priola, *Journal of Colloid and Interface Science* **1995**, *171*, 283.

- [271] H. Mahmoodi, M. Fattahi, M. Motevassel, *RSC Advances* **2021**, *11*, 36289.
- [272] M. Göppert-Mayer, *Annalen der Physik* **1931**, *401*, 273.
- [273] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Physical Review Letters* **1961**, *7*, 229.
- [274] G. Burgstaller, A. Sengupta, S. Vierkotten, G. Preissler, M. Lindner, J. Behr, M. Königshoff, O. Eickelberg, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **2018**, *314*, L708.
- [275] J. Torgersen, X.-H. Qin, Z. Li, A. Ovsianikov, R. Liska, J. Stampfl, *Advanced Functional Materials* **2013**, *23*, 4542.
- [276] S. Mantha, S. Pillai, P. Khayambashi, A. Upadhyay, Y. Zhang, O. Tao, H. M. Pham, S. D. Tran, *Materials* **2019**, *12*, 3323.
- [277] C. R. Lynch, P. P. D. Kondiah, Y. E. Choonara, *Molecules* **2021**, *26*, 2518.
- [278] V. Hahn, P. Kiefer, T. Frenzel, J. Qu, E. Blasco, C. Barner-Kowollik, M. Wegener, *Advanced Functional Materials* **2020**, *30*, 1907795.
- [279] G. Vizsnyiczai, L. Kelemen, P. Ormos, *Optics Express* **2014**, *22*, 24217.
- [280] L. Yang, A. El-Tamer, U. Hinze, J. Li, Y. Hu, W. Huang, J. Chu, B. N. Chichkov, *Optics and Lasers in Engineering* **2015**, *70*, 26.
- [281] S. Ji, L. Yang, Y. Hu, J. Ni, W. Du, J. Li, G. Zhao, D. Wu, J. Chu, *Small* **2017**, *13*, 1701190.
- [282] D. Yang, L. Liu, Q. Gong, Y. Li, *Macromolecular Rapid Communications* **2019**, *40*, 1900041.
- [283] C. Claaßen, M. H. Claaßen, V. Truffault, L. Sewald, G. E. M. Tovar, K. Borchers, A. Southan, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 42.
- [284] A. Peter, V. Onuseit, T. Graf, *Procedia CIRP* **2022**, *111*, 261.
- [285] G. Shabtay, *Optics Communications* **2003**, *226*, 33.
- [286] C. Zhang, Y. Hu, J. Li, Z. Lao, J. Ni, J. Chu, W. Huang, D. Wu, *Applied Physics Letters* **2014**, *105*.
- [287] K. A. Foster, C. G. Oster, M. M. Mayer, M. L. Avery, K. L. Audus, *Experimental Cell Research* **1998**, *243*, 359.
- [288] W. Höinig, M.-R. Kula, *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 502.
- [289] D. H. Atha, K. C. Ingham, *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 12108.
- [290] M. Kuczewski, E. Schirmer, B. Lain, G. Zarbis-Papastoitsis, *Biotechnology Journal* **2011**, *6*, 56.
- [291] N. Hammerschmidt, S. Hobiger, A. Jungbauer, *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 325.
- [292] R. Wälchli, F. Fanizzi, J. Massant, P. Arosio, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2020**, *151*, 53.
- [293] K. S. Lim, B. S. Schon, N. V. Mekhileri, G. C. J. Brown, C. M. Chia, S. Prabakar, G. J. Hooper, T. B. F. Woodfield, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2016**, *2*, 1752.
- [294] A. Southan, T. Lang, M. Schweikert, G. E. M. Tovar, C. Wege, S. Eiben, *RSC Advances* **2018**, *8*, 4686.
- [295] P. Atanasova, V. Atanasov, L. Wittum, A. Southan, E. Choi, C. Wege, J. Kerres, S. Eiben, J. Bill, *Nanomaterials* **2019**, *9*, 800.
- [296] C. Dickmeis, L. Kauth, U. Commandeur, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2021**, *13*, e1662.
- [297] X. Zheng Shu, Y. Liu, F. S. Palumbo, Y. Luo, G. D. Prestwich, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1339.
- [298] J. S. R. Wheeler, S. G. Yeates, "5.8 Printability of Polymer-Containing Inkjet Fluids", in *Fundamentals of Inkjet Printing: The Science of Inkjet and Droplets*, 1 edition, S.D. Hoath, Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2016, p. 126.
- [299] C. Decker, A. D. Jenkins, *Macromolecules* **1985**, *18*, 1241.
- [300] L. Gou, B. Opheim, C. N. Coretsopoulos, A. B. Scranton, *Chemical Engineering Communications* **2006**, *193*, 620.

- [301] M. Höfer, N. Moszner, R. Liska, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2008**, *46*, 6916.
- [302] D. Debroy, J. Oakey, D. Li, *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *510*, 334.
- [303] P. Carmona, J. Moreno, *Journal of Molecular Structure* **1982**, *82*, 177.
- [304] R. P. Witte, A. J. Blake, C. Palmer, W. J. Kao, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *71A*, 508.
- [305] F. Markus, F. Dreher, S. Laschat, S. Baudis, G. E. M. Tovar, A. Southan, *Polymer* **2017**, *108*, 21.
- [306] B. Wang, Y. Zhang, C. Venkitasamy, B. Wu, Z. Pan, H. Ma, *Food Chemistry* **2017**, *234*, 20.
- [307] F. Zang, K. Gerasopoulos, X. Z. Fan, A. D. Brown, J. N. Culver, R. Ghodssi, *Chemical Communications* **2014**, *50*, 12977.
- [308] M. Jablonski, A. Poghossian, M. Keusgen, C. Wege, M. J. Schöning, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2021**, *413*, 5669.
- [309] M. Welden, A. Poghossian, F. Vahidpour, T. Wendlandt, M. Keusgen, W. Christina, M. J. Schöning, *Bioelectrochemistry* **2023**, *151*, 108397.
- [310] U. K. Laemmler, *Nature* **1970**, *227*, 680.
- [311] I. J. Lazar, PhD and Lazar, Istvan Sr., PhD, CSc, "GelAnalyzer 19. ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com))".
- [312] S. Quirin, "Integration eines *Surfmers* in den Herstellungsprozess von Polyethylenglykol-Diacrylat-Körpern zur gezielten Oberflächenfunktionalisierung", Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Universität Stuttgart, 2019.
- [313] D. W. Laight, P. T. Gunnarsson, A. V. Kaw, E. E. Anggård, M. J. Carrier, *Environmental Toxicology and Pharmacology* **1999**, *7*, 27.
- [314] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. Prazeres, V. Vojinović, J. M. Cabral, L. P. Fonseca, *Biotechnology Annual Review* **2003**, *9*, 199.
- [315] L. M. Spindler, A. Feuerhake, S. Ladel, C. Günday, J. Flamm, N. Günday-Türelı, E. Türelı, G. E. M. Tovar, K. Schindowski, C. Gruber-Traub, *Frontiers in Pharmacology* **2021**, *12*.
- [316] T. Canal, N. A. Peppas, *Journal of Biomedical Materials Research* **1989**, *23*, 1183.
- [317] A. Michele, P. Paschkowski, C. Hänel, G. E. M. Tovar, T. Schiestel, A. Southan, *Journal of Applied Polymer Science* **2022**, *139*, 51606.
- [318] L. H. Nguyen, A. K. Kudva, N. S. Saxena, K. Roy, *Biomaterials* **2011**, *32*, 6946.
- [319] P. A. Levett, F. P. Melchels, K. Schrobback, D. W. Hutmacher, J. Malda, T. J. Klein, *Acta Biomaterialia* **2014**, *10*, 214.
- [320] J. Valcarcel, R. Novoa-Carballal, R. I. Pérez-Martín, R. L. Reis, J. A. Vázquez, *Biotechnology Advances* **2017**, *35*, 711.
- [321] V. H. Pomin, W. P. Vignovich, A. V. Gonzales, A. A. Vasconcelos, B. Mulloy, *Molecules* **2019**, *24*, 2803.
- [322] N. Volpi, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2009**, *61*, 1271.
- [323] C. Schiraldi, A. Alfano, D. Cimini, M. D. Rosa, A. Panariello, O. F. Restaino, M. D. Rosa, *Biotechnology Progress* **2012**, *28*, 1012.
- [324] R. Russo, V. Vassallo, A. Stellavato, M. Valletta, D. Cimini, P. V. Pedone, C. Schiraldi, A. Chambery, *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*.
- [325] A. Stellavato, V. Tirino, F. de Novellis, A. Della Vecchia, F. Cinquegrani, M. De Rosa, G. Papaccio, C. Schiraldi, *Journal of Cellular Biochemistry* **2016**, *117*, 2158.
- [326] A. La Gatta, V. Tirino, M. Cammarota, M. La Noce, A. Stellavato, A. V. A. Pirozzi, M. Portaccio, N. Diano, L. Laino, G. Papaccio, C. Schiraldi, *Regenerative Biomaterials* **2021**, *8*, rbaa052.
- [327] T. G. Mezger, "14. Oszillationsversuche", in *Angewandte Rheologie - Mit Joe Flow auf der Rheologie-Straße*, Anton Paar, Graz, 2014.

- [328] C. O. Jauch, "Grenzflächencharakterisierung von mit einem Isothiouonium-Surfmer funktionalisierten Polyethylenglykol-Diacrylat-Hydrogelen", Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie IGVP, Universität Stuttgart, 2020.
- [329] A. Ludwig, J. Tomczkowski, G. Kretzmer, *Applied Microbiology and Biotechnology* **1992**, 38, 323.
- [330] T. Granse, J. Braun, "Interne Ergebnisse Fraunhofer-Institut für Produktionstechnik und Automatisierung IPA, Abteilung Additive Fertigung, Stuttgart", 2019.
- [331] F. Schuster, T. Hirth, A. Weber, *Journal of Applied Polymer Science* **2019**, 136, 46977.
- [332] B. D. Fairbanks, M. P. Schwartz, C. N. Bowman, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2009**, 30, 6702.
- [333] U. P. Kappes, D. Luo, M. Potter, K. Schulmeister, T. M. Rüniger, *Journal of Investigative Dermatology* **2006**, 126, 667.
- [334] R. Deegan, O. Bakajin, T. Dupont, G. Huber, S. Nagel, T. Witten, *Nature* **1997**, 389, 827.
- [335] D. L. Kurdikar, N. A. Peppas, *Polymer* **1995**, 36, 2249.
- [336] G. Majer, A. Southan, *The Journal of Chemical Physics* **2017**, 146.
- [337] J. S. Chong, *Journal of Applied Polymer Science* **1969**, 13, 241.
- [338] V. V. Krongauz, C. P. Chawla, J. Dupre, "Oxygen and Radical Photopolymerization in Films", in *Photoinitiated Polymerization*, K.D. Belfield and J.V. Crivello, Eds., American Chemical Society, Washington, D. C., 2003, p. 165.
- [339] F. Sarvi, Z. Yue, K. Hourigan, M. C. Thompson, P. P. Y. Chan, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1, 987.
- [340] A. Fedi, C. Vitale, P. Giannoni, G. Caluori, A. Marrella, *Sensors* **2022**, 22, 1517.