

Elastic Polymer Matrices with Tailored Mechanical Properties for Stem Cell Culture and Tissue Engineering

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Stephanie Pieroth
aus Köln

Kurzzusammenfassung

Der Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung, Charakterisierung und Verwendung von Hydrogelen mit veränderbaren mechanischen Eigenschaften aus synthetischen und biobasierten Polymeren in der biomedizinischen Anwendung. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf der Möglichkeit zur Aufskalierung von Zellzahlen sowie der potenziellen Strukturierung von Materialien in dreidimensionale Gewebe. Dazu werden Polyacrylamid (PAAm) und Derivate nebst modifizierten Alginsäurepolymeren in verschiedenen Geometrien verwendet.

Zunächst werden PAAm Hydrogele mit variierter Vernetzungsdichte über eine freiradikalische Polymerisation hergestellt, um ein Material mit veränderbaren Quellungs- sowie mechanischen Eigenschaften zu erhalten. Die Kontrolle über die genannten Parameter hat einen direkten Einfluss auf die Anwendbarkeit des Substrats im Zellkontakt durch die Reaktion von Zellen auf Substratelastizitäten. Die Polymernetzwerke werden um Comonomer 6-Acrylamidohexansäure (6AA) ergänzt, um eine nachgeschaltete Biofunktionalisierung mit extrazellulären Matrixproteinen über eine *Steglichveresterung* zu erreichen, die eine erfolgreiche Zellbesiedelung des Hydrogels gewährleistet. Um eine Substratform für die Aufskalierung zu erreichen, wird ein evaluiertes tropfenbasiertes Mikrofluidiksystem verwendet, um über eine temperaturinduzierte radikalische Polymerisation PAAm Sphäroide zu erhalten, die in automatisierten Bioreaktoren eingesetzt werden können. Die Biofunktionalisierung der Materialien wird über Fluoreszenzmikroskopie sowie Spektrophotometrie nachgewiesen. Die erhaltenen gequollenen Polymernetzwerke werden über Rheologie und Nanoindentation auf ihre mechanischen Eigenschaften untersucht und die erhaltenen Ergebnisse über Netzwerktheorien eingeordnet. Die biofunktionalisierten Hydrogele werden dann in der Zellkultur mit humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPS) sowie weiteren Zelltypen auf ihre Anwendbarkeit getestet. Mit Nierenkrebszellen wird ein Modellsystem für die Verwendung der PAAm Sphäroide in Bioreaktoren entworfen.

Für die Realisierung eines semi-dreidimensionalen Kultursubstrats mit einer hohen internen Oberfläche werden biofunktionalisierbare PAAm Cryogele mit charakteristischen Makroporen synthetisiert. Dabei wird die Reaktionstemperatur sowie die Konzentration des Initiators der freiradikalischen Polymerisation variiert, um den Einfluss auf die Porengröße zu bestimmen. Die Porösität und Quelleigenschaften werden über Gravimetrie, Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) und Rasterelektronenmikroskopie (SEM) untersucht.

Mit dem Ziel, Zellen verkapseln zu können, werden responsive Materialien wie thermoresponsives Poly-*N*-isopropylacrylamid (PNIPAAm) sowie physikalisch vernetzbares und methacrylatgruppenfunktionalisiertes Alginsäurepolymer mit Hilfe des

Mikrofluidiksystemen in sphärischer Form hergestellt. Im Fall von PNIPAAm können durch die Unterschreitung der unteren kritischen Lösungstemperatur (LCST) die Zellen schonend vom Substrat gelöst werden. Die funktionalisierten Alginsäurepolymere ermöglichen einen Betrieb des Mikrofluidiksystems mit flüssigen Komponenten, während ein Komplexbildungsgleichgewicht nach Bildung von Tropfen das Erstarren des Polymers auslöst. Nachgeschaltet kann dann über eine photoinitierte Reaktion das Polymer zusätzlich chemisch vernetzt werden.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Herstellung von artifiziellen Geweben und Organoiden leisten.

Abstract

The subject of this thesis is the preparation, characterization and application of synthetic and biobased hydrogels with tunable mechanical properties in the biomedical field. Special focus is laid on the possibility of an upscaling of cell numbers as well as the potential structuring of the designed materials in three-dimensional tissue. For this purpose, polyacrylamide (PAAm) and derivatives besides modified, biobased alginic acid polymers in varying shapes are employed.

PAAm hydrogels with varying crosslinking densities are prepared via free radical polymerization in order to obtain materials with tunable mechanical and swelling properties. A controlled adjustment of the mentioned parameters has a direct impact on the suitability of the substrates in cell contact, as cells sense matrix elasticity and show reactions upon it. The polymer networks are copolymerized with 6-acrylamidohexanoic acid (6AA) due to enabling a subsequent biofunctionalization with extracellular matrix (ECM) proteins via a *Steglich* esterification. In this way, a preferable attachment of cells to the hydrogel surface is enhanced. For the purpose of realizing an upscaled cell culture, an evaluated flow-focusing microfluidic system is applied to synthesize PAAm hydrogel beads via a temperature induced free radical polymerization. The obtained beads are for further application in automatized tidal bioreactors. The success of the biofunctionalization is confirmed by fluorescence microscopy and spectrophotometry. Mechanical testing such as rheology and nanoindentation is employed for determination of the matrices elasticity and the obtained results are evaluated by network theories. The biofunctionalized materials are then applied in cell culture with human induced pluripotent stem cells (hiPS) and other cell types in order to investigate the suitability of the substrates. By introducing kidney cancer cells, a model system for the operation of tidal bioreactors is generated.

For the realization of a semi three-dimensional cell culture substrate with a high internal surface area, biofunctionalizable PAAm cryogels with characteristic macropores are synthesized. Therefore, the reaction temperature as well as the initiator concentration are varied in order to investigate the influence on the pore sizes. Porosity and swelling behavior is evaluated by gravimetry methods, differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM).

Aiming for the possibility of cell encapsulation and three-dimensional cultivation, responsive materials such as thermoresponsive poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) as well as physically crosslinkable and methacrylate group functionalized alginic acid polymers are prepared in spherical shape via the microfluidic system. In the case of PNIPAAm, by lowering the temperature below the lower critical solution temperature (LCST), cells can gently be detached from the substrate. The functionalized alginic acid polymer allows

the operation of the microfluidic system with liquid educts, while a complex formation equilibrium after droplet formation generates solidified beads. Subsequently, these beads can be chemically crosslinked via a photoinitiated reaction.

The present thesis aims for the contribution to the manufacturing of artificial tissue and organoids.