

## Polymere Biomaterialien

# Das Potenzial responsiver Materialien für die künstliche Gewebezüchtung

ANNA LAPORTE<sup>1</sup>, MARIE WEINHART<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE CHEMIE UND ELEKTROCHEMIE, UNIVERSITÄT HANNOVER

<sup>2</sup> INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOCHEMIE, FU BERLIN

**Biocompatible thermoresponsive polymer coatings with tuneable properties can be used in various applications, such as the fabrication of cell sheets for tissue engineering purposes. The rolling of endothelial cell sheets into artificial vessels combined with the generation of a microvascular network inside a hydrogel is a step towards the in vitro engineering of a vascular bed and the vascularisation of tissue models.**

DOI: 10.1007/s12268-023-2047-z  
© Die Autorinnen 2023

Die Polymerchemie bietet beinahe unbegrenzte Kombinationsmöglichkeiten verschiedener Monomere und bringt dadurch stetig neue Materialien mit vielfältig einstellbaren Eigenschaften hervor. Für die biologische Forschung besonders attraktiv sind responsive Polymere, die auf Licht, elektrische oder magnetische Felder, auf Änderungen des pH-Werts oder der Temperatur mit einer Änderung ihrer Konformation und Eigenschaften reagieren. Das eröffnet diverse Einsatzmöglichkeiten u. a. im Bereich der Medikamentenapplikation, der Biosensorik, der Oberflächenbeschichtung oder des Tissue Engineerings [1].

### Thermoresponsive Polymere

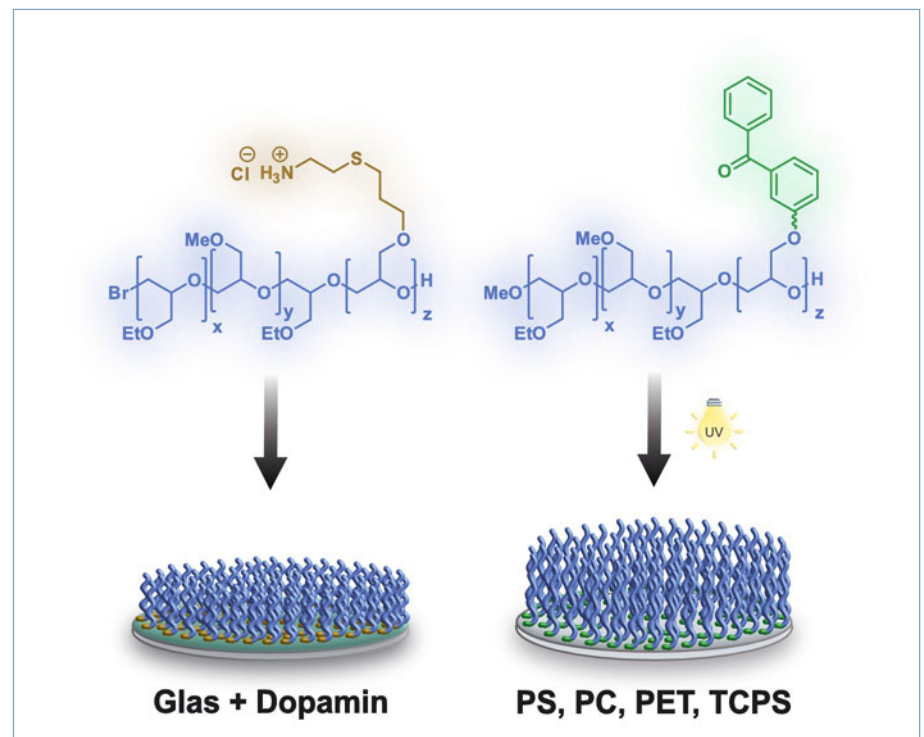
Thermoresponsive Polymere mit Mischungslücke und unterer kritischer Lösungstemperatur (LCST) in wässriger Lösung sind im biologischen Kontext besonders wertvoll. Bei diesen Polymeren ändert sich das Löslichkeitsverhalten entgegen den Erwartungen: Sie sind bei niedriger Temperatur (< LCST) gut löslich. Bei Erwärmung über die LCST hinaus durchläuft das System einen reversiblen Phasenübergang, wobei die Polymerketten unlöslich werden. Ein Paradebeispiel für ein solches Polymer mit einer thermischen Schaltbarkeit im physiologisch relevanten Bereich ist Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM), das eine LCST von 32 °C aufweist [2].

Die Schalttemperatur eines thermoresponsiven Polymers kann über das Verhältnis hydrophiler und hydrophober Einheiten justiert werden. Mit Copolymeren, die aus zwei

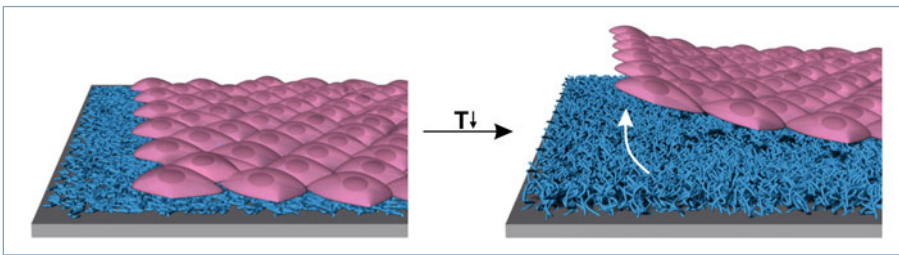
verschiedenen Monomeren synthetisiert werden, ist dies besonders einfach umzusetzen. Unsere Gruppe nutzt hierfür vorwiegend Glycerin-basierte Monomere, wie Glycidylmethylether (GME) und Ethylglycidylether (EGE). Dabei werden biokompatible statistische poly(GME)-*stat*-(EGE) (PGE) Copolymere erhalten, die in wässriger Lösung einen einstellbaren Phasenübergang mit Trübungspunkten zwischen 15 und 60 °C aufweisen [3–5].

### Thermoresponsive Oberflächenbeschichtungen

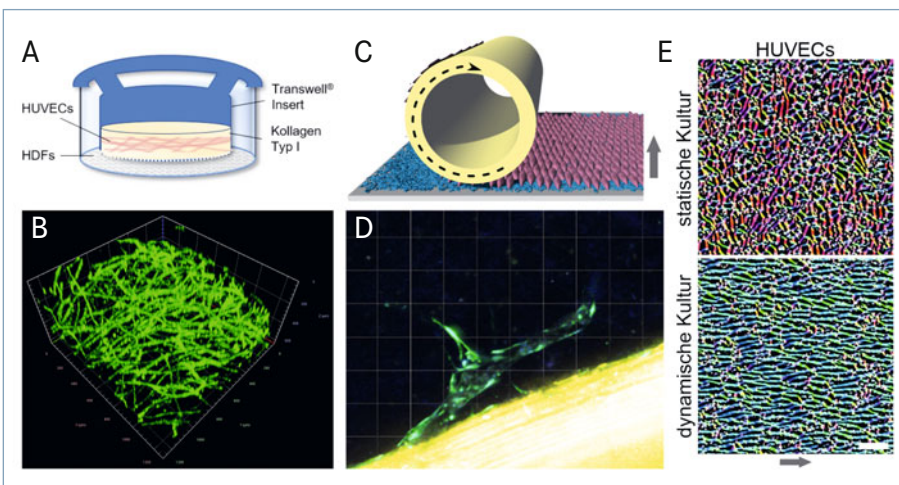
Um die Thermoresponsivität der PGE-Copolymere für die zellbiologische Forschung nutzbar zu machen, wurden sie auf Oberflächen aufgebracht und derart optimiert, dass eine thermische Schaltbarkeit der Polymerkettenhydratisierung im Bereich zwischen 20 und 37 °C gegeben ist [6]. Typische Zellkultur-



▲ **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Beschichtung der gängigsten Zellkulturmaterialien (Glas, Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC), Polyethylenterephthalat (PET) und zellkulturbehandeltes Polystyrol (TCPS)) mit thermoresponsiven Polyglycidylether-Blockcopolymeren (blau) mit Polyamin- (braun) oder Benzophenon-Anker (grün).



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung des thermisch induzierten Ablösens einer Zellschicht von thermoresponsiven Substraten. Bei 37 °C wachsen adhärenente Zellen auf der kollabierten Polymerbeschichtung zur Konfluenz. Eine Temperaturabsenkung induziert das Ablösen des Zellrasens. Adaptiert aus [9].



▲ **Abb. 3:** Schritte zum Engineering eines vaskulären Systems. **A**, schematische Darstellung eines Ko-Kultursystems zur Erzeugung eines **(B)** vaskularisierten Kollagengels (HUVECs, 21 Tage, CD31: grün, z = 600 µm). Adaptiert aus [12]. **C**, Illustration des Aufrollens einer abgelösten Zellschicht auf ein Gerüst. Adaptiert aus [9]. **D**, Aus einem künstlichen Blutgefäß herauswachsender Gefäßspröss (GFP-HUVECs: grün, Hoechst: blau). Adaptiert aus [13]. **E**, Zellausrichtung von HUVECs nach 96 h statischer oder dynamischer Kultur, dargestellt mittels Farbcodierung von Phasenkontrastbildern: Je höher die Uniformität der Farbe, desto gleichmäßiger die Ausrichtung (Maßstabsbalken 100 µm, Pfeil = Flussrichtung). Adaptiert aus [9].

substrate wie Glas, Polystyrol (PS), Polycarbonat (PC), Polyethylenterephthalat (PET) und zellkulturbehandeltes Polystyrol (TCPS) wurden adressiert. Eine kovalente Oberflächenbeschichtung konnte durch einen Selbstanordnungsprozess der Copolymere, die mit einem entsprechenden Ankerblock ausgestattet waren, realisiert werden. Ein Polyaminanker-Block bindet die Polymerketten an Dopamin-vorbehandelte Glasoberflächen, während photoreaktive Benzophenonhaltige Ankerblöcke die Assemblierung der Polymerketten auf den Kunststoffoberflächen forcieren und diese durch kurze UV-Lichtbestrahlung dort auch kovalent verankern (**Abb. 1**). Mithilfe derartiger Blockcopolymere ist es möglich, die gängigsten Zellkulturgefäße, unabhängig von ihrer Geometrie, mit einer thermoresponsiven PGE-Monolage von zwei bis acht Nanometern Dicke zu beschichten

und ihnen dadurch eine Schaltbarkeit zwischen 20 und 37 °C zu verleihen [7, 8].

### Innovative Materialien für die Zellkultur

Aber wofür sind thermoschaltbare Oberflächen in der Zellkultur einsetzbar? Ganz einfach: Um Zellen enzymfrei und mit ihrer extrazellulären Matrix (ECM) von Oberflächen abzulösen, allein durch eine Veränderung der Temperatur. Bei 37 °C ist die Polymerschicht auf der Oberfläche dehydratisiert und dadurch kollabiert, was die Adsorption von Proteinen und das Anwachsen von Zellen ermöglicht. Bei einer Temperaturabsenkung verändert sich das Substrat unterhalb der Zellen: Die Polymerschicht wird hydratisiert und quillt an, wodurch die Oberfläche sowohl protein- als auch zellabweisend wird. Befand sich vorher eine konfluente Zell-

schicht auf dem Substrat, wird diese zusammenhängend mitsamt der zelleigenen ECM abgelöst (**Abb. 2**, [7, 8]). Die so erhaltenen Zellschichten sind z. B. für den Aufbau von 3D-Geweben nutzbar und können aus Zelllinien, Primärzellen oder Stammzellen bestehen. Beispiele sind hier humane Fibroblasten (HDFs) [7] oder Blutgefäßzellen, wie Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) oder aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Endothelzellen (hiPSC-ECs) [9, 10].

### Engineering eines künstlichen Blutgefäßsystems

Unser Fokus auf Blutgefäß-bildende Zelltypen kommt nicht von ungefähr. Obwohl das Tissue Engineering in den vergangenen 25 Jahren riesige Schritte auf dem Weg hin zu funktionalen 3D-Gewebemodellen gemacht hat, die bereits Tierversuche ersetzen können, bleibt ein Faktor limitierend: Zum Erreichen einer kritischen Dicke der künstlichen Strukturen, die das Diffusionslimit von Sauerstoff von etwa 200 Mikrometern überschreitet, ist eine Vaskularisierung für eine effiziente Versorgung der Zellen im Inneren unabdingbar [11].

In einer Studie haben wir dieses Problem durch die Etablierung eines indirekten Ko-Kulturmodells von HDFs und HUVECs im Transwell®-Format adressiert (**Abb. 3A**). Dabei konnten wir die spontane Selbstanordnung der ECs im Kollagengel, mithilfe der von den umgebenden Fibroblasten sekretierten Faktoren, zu einem stabilen, lumenisierten mikrovaskulären Netzwerk zeigen (**Abb. 3B**). Dieses Modell ist zum einen für die *in vitro*-Medikamententestung interessant, zum anderen bietet es einen Ansatz für das Engineering eines künstlichen vaskulären Systems [12].

Anschließend haben wir dieses Modell mit der zuvor beschriebenen Methodik zur enzymfreien Herstellung konfluenter Zellschichten kombiniert. Dabei wurde zunächst eine HUVEC-Zellschicht auf ein perfundierbares Gerüst gerollt (**Abb. 3C**) und in ein EC-haltiges Hydrogel eingebettet. Mithilfe von HDF-konditioniertem Medium wurde analog zu dem oben beschriebenen Ko-Kultursystem die Netzwerkbildung der Zellen im Gel sowie das Sprießen neuer Gefäße aus dem gerollten Zellrasen heraus getriggert (**Abb. 3D**, [13]). Durch die apikale Applikation von physiologischem Scherstress konnten wir in einer Parallelstudie die Zellausrichtung mit dem Fluss (**Abb. 3E**) sowie den positiven Einfluss auf die Ausreifung

der endothelialen Glykokalyx zeigen. Es war möglich, konfluente Zellschichten von HUVECs und hiPSC-ECs unter Erhalt der Zellausrichtung aufzurollen [9]. In zukünftigen Studien muss sich nun zeigen, inwiefern die Zellausrichtung im 3D-Modell über die Zeit hinweg erhalten bleibt und ob es zu einer Anastomose der aus der Endothelzellrolle sprießenden Zellen mit dem umgebenden Netzwerk kommt. Die gewonnenen Erkenntnisse leisten schon jetzt einen wertvollen Beitrag zur Verbesserung von vorhandenen *in vitro*-Modellen und zum Engineering eines artifiziellen Blutgefäßsystems.

### Danksagung

Gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, FKZ:13N13523. Wir danken Florian Tondock für seine Unterstützung bei der Erstellung von **Abbildung 1**. ■

### Literatur

- [1] Wei M, Gao Y, Li X et al. (2017) Stimuli-responsive polymers and their applications. *Polym Chem* 8: 127–143
- [2] Yamada N, Okano T, Sakai H et al. (1990) Thermoresponsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells. *Makromol Chem Rapid Commun* 11: 571–576
- [3] Weinhart M, Becherer T, Haag R (2011) Switchable, biocompatible surfaces based on glycerol copolymers. *Chem Commun (Camb)* 47: 1553–1555
- [4] Becherer T, Heinen S, Wei Q et al. (2015) In-depth analysis of switchable glycerol based polymeric coatings for cell sheet engineering. *Acta Biomater* 25: 43–55
- [5] Heinen S, Rackow S, Schäfer A et al. (2017) A Perfect Match: Fast and Truly Random Copolymerization of Glycidyl Ether Monomers to Thermoresponsive Copolymers. *Macromolecules* 50: 44–53
- [6] Schweigerdt A, Heinen S, Stöbener DD et al. (2021) Grafting Density-Dependent Phase Transition Mechanism of Thermoresponsive Poly(glycidyl ether) Brushes: A Comprehensive QCM-D Study. *Langmuir* 37: 7087–7096
- [7] Heinen S, Rackow S, Cuéllar-Camacho JL et al. (2018) Transfer of functional thermoresponsive poly(glycidyl ether)

coatings for cell sheet fabrication from gold to glass surfaces. *J Mater Chem B* 6: 1489–1500

- [8] Stöbener DD, Weinhart M (2020) Thermoresponsive Poly(glycidyl ether) Brush Coatings on Various Tissue Culture Substrates – How Block Copolymer Design and Substrate Material Govern Self-Assembly and Phase Transition. *Polymers (Basel)* 12: 1899
- [9] Lindner M, Laporte A, Elomaa L et al. (2022) Flow-induced glycocalyx formation and cell alignment of HUVECs compared to iPSC-derived ECs for tissue engineering applications. *Front Cell Dev Biol* 10: 953062
- [10] Stöbener DD, Hoppensack A, Scholz J et al. (2018) Endothelial, smooth muscle and fibroblast cell sheet fabrication from self-assembled thermoresponsive poly(glycidyl ether) brushes. *Soft matter* 14: 8333
- [11] Weinhart M, Hocke A, Hippenstiel S et al. (2019) 3D organ models—Revolution in pharmacological research? *Pharmacol Res* 139: 446–451
- [12] Yavvari P, Laporte A, Elomaa L et al. (2022) 3D-Cultured Vascular-Like Networks Enable Validation of Vascular Disruption Properties of Drugs In Vitro. *Front Bioeng Biotechnol* 10: 888492
- [13] Elomaa L, Lindner M, Leben R et al. (2022) In vitro vascularization of hydrogel-based tissue constructs via a combined approach of cell sheet engineering and dynamic perfusion cell culture. *Biofabrication* 15: 015004

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Marie Weinhart  
 Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie  
 Leibniz Universität Hannover  
 Callinstr. 3A  
 D-30167 Hannover  
[marie.weinhart@pci.uni-hannover.de](mailto:marie.weinhart@pci.uni-hannover.de)  
[marie.weinhart@fu-berlin.de](mailto:marie.weinhart@fu-berlin.de)

### AUTORINNEN



#### Anna Laporte

2009–2014 Biochemiestudium an der Universität Hannover und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH). 2014–2019 Promotion an der Universität Greifswald und der MHH. Seit 2020 PostDoc an der Universität Hannover.



#### Marie Weinhart

1999–2006 Chemiestudium an der HU Berlin und der FU Berlin. 2006–2011 Promotion an der FU Berlin. 2011–2014 PostDoc an der University of British Columbia, Vancouver, Kanada. 2014–2019 Nachwuchsgruppenleiterin an der FU Berlin. Seit 2019 Professorin für Polymerchemie an der Universität Hannover.