

Poröse Cryogele aus Polyethylenglykoldiacrylat mit spezifischer
Elastizität zur Anwendung in der Prostatakrebsforschung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl. Biol. Bettina Natalie Göppert

aus

Karlsruhe

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Andrew C. B. Cato

Korreferent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2016



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung –
Nicht kommerziell – Keine Bearbeitung 4.0 International Lizenz (CC BY-NC-ND 4.0 DE):
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.de>

**Nichts ist so hoch, wonach der Starke
nicht Befugnis hat, die Leiter anzusetzen.**

(Johann Christoph Friedrich von Schiller)

Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Dr. Friederike Gruhl dafür danken, dass sie mir die Gelegenheit gab, diese spannende Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Mikrostrukturtechnik anfertigen zu dürfen. Sie war mir immer eine große Hilfe und stand mir stets mit guten Ratschlägen zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt meinem Erstreferenten Prof. Dr. Andrew Cato. Ich danke ihm für seine unermüdliche Hilfe und Unterstützung, seine Motivation und seine Art, mich immer wieder auf den richtigen Weg zu führen. Ich bin dankbar für die vielen Dinge, die ich von ihm lernen durfte.

Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer danke ich für die Übernahme des Korreferats meiner Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Labormitgliedern bedanken, die immer mit Unterstützung und hilfreichen Diskussionen an meiner Seite standen. Besonders Jutta Stober und Rebecca Seeger möchte ich für ihre guten Ratschläge und ihre Hilfe während des Laboralltags danken. Auch Anne Bäcker möchte ich für ihren Beitrag zu Beginn meiner Arbeit danken. Nane Kuznik und Laura Albrecht danke ich für die entspannten und lustigen Momente, die für die nötige Auflockerung sorgten.

Ein besonderer Dank gilt Sandra Scherer. Aus langen Jahren im Studium und in der Doktorarbeit ist eine besondere Freundschaft entstanden, ohne die ich die häufig langen Tage im Labor und im Büro nicht halb so gut überstanden hätte. Danke Sandra. Ich freue mich auf die nächsten Jahre.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Lebensgefährten, meiner Familie und meinen Freunden. Sie haben mich während dieser Zeit in jeglicher Form unterstützt und waren immer verständnisvoll. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich heute bin.

Kurzfassung

Die physikalischen und mechanischen Eigenschaften der Mikroumgebung von Tumoren sind entscheidend für das Wachstum, die Differenzierung und die Migration von Krebszellen. Eine solche Mikroumgebung ist jedoch nicht in den geometrischen Verhältnissen der zweidimensionalen Zellkultur, die in vielen Krebsstudien verwendet wird, wieder zu finden und vor allem die Prostatakrebsforschung ist noch immer durch den Mangel geeigneter *in vitro* Modelle limitiert. Um die mechanischen Eigenschaften von Prostatatumoren zu berücksichtigen, wurde in dieser Arbeit ein poröser Zellgerüstträger mit mechanisch stabiler Architektur etabliert und zur Studie des Prostatakrebszellwachstums eingesetzt. Dieser Zellgerüstträger wurde durch die Cryogelation von Polyethylenglykoldiacrylat hergestellt und auf die spezifische Elastizität von malignen Prostatageweben angepasst. Innerhalb dieses Zellgerüstträgers wurde die Prostatakrebszelllinie LNCaP über einen Zeitraum von 21 Tagen mit einer linearen Wachstumsrate kultiviert. Während dieser Zeit bildeten sich kompakte Sphäroide aus, die über unterschiedliche Kontakte mit den Porenwänden des Zellgerüstträgers in Verbindung standen. Diese LNCaP-Sphäroide wuchsen in Abhängigkeit von Androgenen und wiesen eine charakteristische Translokation des Androgenrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern nach Hormonstimulus auf. Verglichen mit der zweidimensionalen Zellkultur war die Expression androgenregulierter und prostatakrebsspezifischer Gene von LNCaP-Zellen im Zellgerüst deutlich erhöht und mit der Expression in LNCaP-Tumoren aus Xenograftmodellen vergleichbar. Dieser Zellgerüstträger wurde weiterhin dazu verwendet, um den antiproliferativen Effekt der tumorinhibierenden Substanz Thio-2 auf LNCaP-Zellen aufzuzeigen. Dadurch ist dieser Zellgerüstträger nicht nur ein geeignetes Zellkulturmodell für die Prostatakrebsforschung, sondern auch für die Analyse neuartiger Therapeutika gegen Prostatakrebs anwendbar.

Abstract

The physical and mechanical properties of the tumor microenvironment are crucial for the growth, differentiation and migration of cancer cells. However, such microenvironment is not found in the geometric conditions of two-dimensional cell culture systems used in many cancer studies. Prostate cancer research, in particular, suffers from the lack of suitable *in vitro* models. To consider mechanical conditions given by the prostate tumor, in this work a porous cell culture scaffold in mechanically stable architecture was established and used to study prostate cancer cell growth. This scaffold was formed by the cryogelation of poly(ethylene glycol)diacrylate and adjusted to the specific elasticity of malignant prostate tissues. Lymph node carcinoma of the prostate (LNCaP) cells were cultured in this scaffold and they showed a linear growth for 21 days and formed compact spheroids with divergent attachments to the pore walls. The LNCaP spheroids grew androgen-dependently and showed a characteristic translocation of the androgen receptor from the cytoplasm to the nucleus in the presence of hormone. The expression of androgen-regulated prostate cancer specific genes in LNCaP cells cultured in this scaffold was more pronounced compared to 2D cell cultures but comparable to LNCaP tumors derived from xenograft models. This scaffold was further used to demonstrate the growth repressive effect of the tumor-inhibiting substance Thio-2 on LNCaP cells. Thus, this scaffold is not only a powerful tool for prostate cancer studies but also suitable for the analysis of novel prostate cancer therapeutics.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	i
Kurzfassung	ii
Abstract	iii
1. Einleitung	1
1.1. Prostatakrebs – Erkrankungsrate und Diagnose	1
1.2. Therapieansätze zur Behandlung von Prostatakrebs	2
1.3. Die Heterogenität von Prostatakarzinomen	5
1.4. Aktuelle Zellkulturmodelle in der präklinischen Prostatakrebs-forschung.....	7
1.4.1. PDX-Modelle	8
1.4.2. Patienten-abgeleitete-Organoidkulturen	10
1.5. Zellgerüstträger in der 3D-Zellkultur	13
1.5.1. Zellgerüstträger aus natürlichen Polymeren	14
1.5.2. Zellgerüstträger aus synthetischen Polymeren	15
1.5.3. Cryogele	18
1.6. Ziel der Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Verbrauchsmaterial	22
2.1.3. Zellkulturmaterial	23
2.1.4. Geräte	23
2.1.5. Zelllinien	24
2.1.6. Versuchstiere	24
2.1.7. Primärantikörper.....	24
2.1.8. Sekundärantikörper	25
2.1.9. Primer.....	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Synthese von PEGda-Cryogelen und Hydrogelen.....	26
2.2.2. Analyse der Poreneigenschaften von Cryogelen und Hydrogelen.....	26
2.2.2.1. Quecksilberporosimetrie	26
2.2.2.2. Schwellpotential.....	27

2.2.3. Analyse der Elastizität von PEGda-Cryogelen	27
2.2.4. Aufklärung der Architektur von PEGda-Cryogelen.....	28
2.2.4.1. Synchrotron-Mikrotomographie	28
2.2.4.2. Rasterelektronenmikroskopie	28
2.2.4.3. Umgebungsrasterelektronenmikroskopie	28
2.2.4.4. Auswertung von Porenurfängen	29
2.2.5. Vorbereitung bewachsener Cryogele für morphologische, physikalische und mechanische Analyseverfahren	29
2.2.6. Zellkulturmethoden.....	30
2.2.6.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen in der 2D-Zellkultur .	30
2.2.6.2. Kultivierung von LNCaP-Zellen in PEGda-Cryogelen	30
2.2.6.3. Kultivierung von LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen	31
2.2.7. Tierexperiment	31
2.2.7.1. Tumorzellinjektion und Messung des Tumolvolumens	31
2.2.7.2. Töten der Versuchstiere und Entnahme der Tumore	31
2.2.8. Behandlung von Zellen in 2D-Zellkultur und PEGda-Cryogelen	31
2.2.8.1. Behandlung mit 5 α -Dihydrotestosteron und Enzalutamid	31
2.2.8.2. Behandlung mit Thio-2	32
2.2.9. Histologie	32
2.2.9.1. Fixieren, Prozessieren, Einbetten und Schneiden von histologischen Proben	32
2.2.9.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
2.2.9.3. Immunfluoreszenzfärbung	34
2.2.10. DNA- und RNA-Methoden.....	35
2.2.10.1. Wachstumsanalysen durch DNA-Isolation	35
2.2.10.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	35
2.2.10.3. RNA-Isolation	36
2.2.10.4. cDNA Synthese und Kontroll-PCR gegen humanes β -Aktin	36
2.2.10.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.10.6. Quantitative Echtzeit-PCR.....	38
2.2.11. Proteinmethoden	39
2.2.11.1. Expressionsanalyse transduzierter LNCaP-Zellen	39
2.2.11.2. Auftrennen von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese	39
2.2.11.3. Western Blot	40

2.2.11.4. Immunoblot.....	40
2.2.12. Statistik.....	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Etablierung von Cryogelen für die Prostatakrebisforschung	43
3.1.1. Synthese von Cryogelen durch Cryogelation	43
3.1.2. Poreneigenschaften von Cryogelen und Hydrogelen aus PEGda	44
3.1.3. Elastizität von PEGda Cryogelen	46
3.1.4. Architektur von PEGda575-Cryogelen	48
3.1.5. Reproduzierbarkeit von PEGda575-Cryogelsynthesen	50
3.2. Anwendung von PEGda575-Cryogelen in der Zellkultur	52
3.2.1. Wachstum von Prostatakrebszellen	52
3.2.2. Wachstum von LNCaP-Zellen in Cryogelen und hängenden Tropfen	55
3.2.3. Spezifität von Cryogelen für die Kultur von Prostatakrebszellen	57
3.2.4. Androgenabhängiges Wachstum von LNCaP-Zellen.....	58
3.2.5. Androgenregulierte Genexpression in PEGda575-Cryogelen	62
3.2.6. Vergleich der Genexpression in 2D-Zellkultur, Cryogelen und in vivo	63
3.2.7. Test potentieller therapeutischer Substanzen in Cryogelen.....	65
4. Diskussion	69
4.1. Etablierung eines prostatakrebspezifischen Zellkulturmodells	69
4.1.1. Cryogele mit poröser Architektur.....	69
4.1.2. Cryogele mit gewebespezifischer Elastizität	71
4.2. Zellwachstum in PEGda575-Cryogelen	73
4.3. Genexpression von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen	75
4.4. Analyse potentieller therapeutischer Substanzen in PEGda575-Cryogelen...	77
4.5. Ausblick	78
Literaturverzeichnis	79
Abkürzungsverzeichnis	93
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	97
Lebenslauf.....	99

1. Einleitung

1.1. Prostatakrebs – Erkrankungsrate und Diagnose

Prostatakrebs ist nach Lungenkrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung und fünfthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern weltweit. Im Jahr 2012 erkrankten nach einer Schätzung 1,1 Millionen Männer an dieser Krebsform, wovon letztendlich 308 Tausend Patienten verstarben (Torre et al., 2015). In einer 5-Jahres-Prävalenz wird vorausgesagt, dass die Anzahl diagnostizierter Neuerkrankungen an Prostatakrebs bis 2017 auf 3,8 Millionen ansteigen wird. Zusätzlich soll sich das bereits vermehrte Auftreten von Neuerkrankungen in den wirtschaftlich besser entwickelten, westlichen Ländern weiter erhöhen (Torre et al., 2015). Weshalb es zu einem verstärkten Auftreten von Prostatakrebs in diesen Ländern kommen soll, ist noch nicht vollständig geklärt. Angenommen wird, dass die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung mit steigendem Lebensalter, der genetischen Disposition und der Volkszugehörigkeit in diesen Ländern im Zusammenhang steht (Denmeade und Isaacs, 2002). Ebenfalls könnten Lebensstilfaktoren wie kalorienreiche Ernährung, Bewegungsmangel und Übergewicht die Möglichkeit an Prostatakrebs zu erkranken begünstigen (Sonn et al., 2005). Weiterhin ist ein erhöhtes Auftreten von Neuerkrankungen durch die in den letzten Jahren entscheidend verbesserten Diagnoseverfahren zu erwarten.

Eine zentrale Rolle in der Diagnose von Prostatakrebs spielen Methoden wie die Messung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut von Patienten. Das PSA ist ein Gewebemarker, der sowohl von benignen Prostatazellen als auch von Prostatakrebszellen produziert und in die Blutbahn abgegeben wird. Übersteigt die Menge an nachgewiesenem PSA im Blut einen Schwellenwert, der nicht mehr mit einer gutartigen Erkrankung der Prostata im Zusammenhang steht, wird meist ein transrektaler Ultraschall der Prostata mit gleichzeitiger Nadelbiopsie durchgeführt. Diese Methode wird dazu verwendet, die Schwere der Erkrankung in weiterführenden Untersuchungen beurteilen zu können (Crawford, 2003). Die histopathologische Untersuchung des Gewebes aus der Nadelbiopsie ermöglicht eine Aussage über das Stadium der Erkrankung durch den sogenannten Gleason-Wert, der neben der PSA-Messung einen weiteren wichtigen diagnostischen Marker in der Diagnose von Prostatakrebs darstellt. Durch den Gleason-Wert wird der Grad der Entdifferenzierung von Prostatakrebszellen im

Vergleich zu ihrem physiologischen Normalzustand festgestellt (Hara et al., 2008). Dabei sind Krebsgewebe mit einem niedrigen Gleason-Wert ihrem Ursprungsgewebe ähnlich, wohingegen Gewebe mit einem hohen Gleason-Wert Prostatakarzinome im fortgeschrittenen Stadium mit einem hohen Grad der Entdifferenzierung repräsentieren (Epstein et al., 2016). Bestätigt sich eine Erkrankung an Prostatakrebs, schließt sich eine Behandlung des Patienten mit mehreren Therapieoptionen an, die je nach Verlauf der Erkrankung unterschiedlich gestaltet werden kann.

1.2. Therapieansätze zur Behandlung von Prostatakrebs

Die gängigsten Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Prostatakrebs beinhalten das operative Entfernen des Tumors, die Bestrahlung, die Anti-Hormontherapie, die Chemotherapie oder eine auf das Stadium der Erkrankung angepasste Kombination der genannten Methoden (Denmeade und Isaacs, 2002).

Ist das Prostatakarzinom lokal begrenzt und sind noch keine klinisch erkennbaren Metastasen vorhanden, eignen sich Maßnahmen wie das operative Entfernen des Tumors oder die Bestrahlung um den Patienten zu behandeln. Das Ziel eines operativen Eingriffes ist es, das erkrankte Gewebe restlos zu entfernen. Dabei werden während einer radikalen Prostatektomie die Prostata mit Prostatakapsel, Samenblasen und Teilen der Harnröhre entfernt, um ein bestmögliches Beseitigen des Tumorgewebes zu gewährleisten (John und Hauri, 2000). Eine weniger invasive Methode zur Behandlung lokalisierbarer Prostatakarzinome ist die interne Strahlentherapie. Während dieser Behandlung werden dem Patienten mehrere umschlossene Strahlenquellen, meist aus Radioisotopen wie Jod-125 oder Palladium-103, in das Krebsgewebe implantiert (Grimm et al., 2001; Nag et al., 1999). Nach Implantation verbleiben diese Strahlenquellen stationär im Gewebe und ermöglichen dadurch eine gezielte und räumlich begrenzte Bestrahlung, bei der die Krebszellen durch die Teilchenstrahlung geschädigt werden, aber umliegendes gesundes Gewebe, im Gegensatz zu externen Strahlentherapien, geschont wird (Ragde et al., 2000).

Ist die Erkrankung bereits fortgeschritten und eine Streuung des Tumors in umliegendes Gewebe und Lymphknoten zu erwarten, wird nach dem Entfernen der Prostata, beziehungsweise parallel zur Bestrahlung, eine Anti-Hormontherapie durchgeführt. Das Ziel dieser Therapiemethode ist es, die Wirkung des Androgens Testosteron zu blockieren und dadurch seinen proliferationsfördernden und antiapoptotischen Effekt

auf Prostatakrebszellen zu unterbinden. Es gibt zwei Wege um dieses Ziel zu erreichen (**Abbildung 1**). Eine Methode ist die Blockade der Androgenproduktion im Hoden, die auf Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse reguliert wird. Hier wird nach Bildung und Sekretion des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) im Hypothalamus und der Bindung dieses Hormons an seinen Rezeptor (GnRHR) in der Hypophyse die Freisetzung von Gonadotropinen, wie dem luteinisierendem Hormon (LH), initiiert. Im Hoden wird durch die Bindung des LH an seinen Rezeptor (LHR) die Synthese von Testosteron aus Cholesterol stimuliert, das in den Zielzellen der Prostata durch das Enzym 5α -Reduktase in den biologisch aktiven Metaboliten 5α -Dihydrotestosteron (DHT) umgesetzt wird. Über die Bindung von DHT an den Androgenrezeptor (AR) in der Zielzelle und die daraus folgende Translokation des Komplexes aus AR und seinem Liganden in den Zellkern, wird die Expression von Genen induziert, die die Proliferation und das Überleben von Prostatakrebszellen fördern.

Um die Produktion von Testosteron und dadurch seine Wirkung am Zielgewebe zu unterbinden, besteht die Möglichkeit der Behandlung des Patienten mit sogenannten GnRH-Agonisten oder GnRHR-Antagonisten. Im Falle der Behandlung mittels GnRH-Agonisten kommt es zunächst zu einem Anstieg des Testosteronspiegels im Blut, der beim Patienten schwere Nebenwirkungen wie Knochenschmerzen hervorrufen kann (Denmeade und Isaacs, 2002). Erst eine dauerhafte Behandlung bewirkt eine negative Regulation der Testosteronproduktion durch die Reduktion von GnRH-Rezeptoren in der Hypophyse. Dadurch wird die Testosteronproduktion gehemmt. Eine schonendere Methode, die ebenfalls die Produktion von Testosteron einschränkt, aber Nebenwirkungen weitgehend vermeidet, ist die Behandlung des Patienten mit GnRHR-Antagonisten. Beide Behandlungsansätze resultieren in einer Verringerung des Testosteronspiegels im Blut des Patienten um bis zu 75 % (Denmeade und Isaacs, 2002; Tolis et al., 1982).

Zur direkten Blockade der Interaktion von Androgenen mit der Zielzelle eignet sich auch die Behandlung von Patienten mit Anti-Androgenen. Sie blockieren eine Interaktion des AR mit seinem Liganden. Dadurch wird die Translokation des AR in den Zellkern verhindert und die Expression proliferationsfördernder und antiapoptotischer Gene inhibiert. Zusätzlich wird durch diese Behandlungsmethode die Interaktion von Androgenen, die auch im geringen Maße in den Nebennieren produziert werden, mit den Zielzellen der Prostata blockiert.

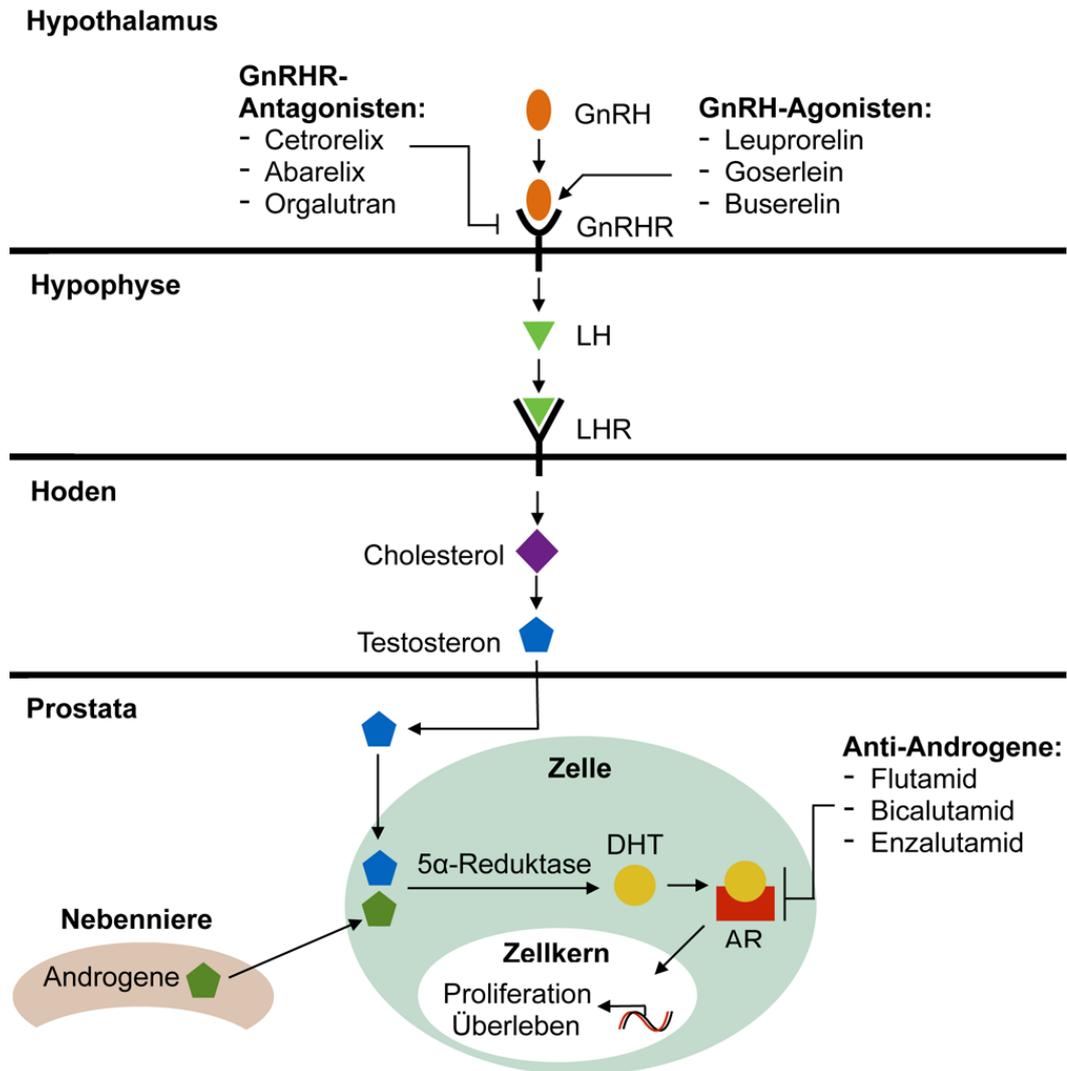


Abbildung 1. Übersicht gängiger Anti-Hormontherapien zur Behandlung von Prostatakrebs im fortgeschrittenem Stadium. Die Produktion des Hormons Testosteron im Hoden kann durch die Behandlung des Patienten mit GnRH-Agonisten oder GnRHR-Antagonisten auf Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse blockiert werden. Eine Interaktion von Testosteron und Androgenen aus der Nebenniere mit dem Zielgewebe wird durch die Behandlung des Patienten mit Anti-Androgenen inhibiert (modifiziert nach Denmeade und Isaacs, 2002).

Trotz der vielfältigen Behandlungsmöglichkeiten ist die Durchführung einer Anti-Hormontherapie in den meisten Fällen nicht ausreichend, um einen Patienten im fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung an Prostatakrebs nachhaltig zu heilen. Häufig entwickelt sich ein hormonunabhängiges Rezidiv, das als kastrationsresistentes Prostatakarzinom (castration resistant prostate cancer, CRPC) bezeichnet wird und nicht mehr auf eine Hormonblockade anspricht. Dieser letale Phänotyp des Prostatakarzinoms wird im Rahmen der Palliativmedizin durch Chemotherapie behandelt, um die

Schmerzen des Patienten zu lindern und dessen Allgemeinzustand zu verbessern (Basch et al., 2014).

Die Chemotherapie zur Behandlung des CRPC wird meist in Form einer Erst- und Zweitlinientherapie durchgeführt. Der Standard in der Erstlinientherapie ist die Behandlung des Patienten mit dem Taxan Docetaxel und dem synthetischen Glukokortikoid Prednison, das auf Grund seiner entzündungshemmenden Wirkung eingesetzt wird (de Bono et al., 2010). Das Zytostatikum Docetaxel bindet die Mikrotubuli der Zellteilungsspindel und verhindert deren Abbau (Jordan und Wilson, 2004). Dadurch wird die Zellteilung der Prostatakrebszelle während der Mitose blockiert (Jordan et al., 1996; Manfredi und Horwitz, 1984). Entwickelt der Patient eine Resistenz gegen die Behandlung mit Docetaxel, wird eine Zweitlinientherapie angeschlossen. In dieser Therapiephase können weitere Taxane wie Cabazitaxel, Steroide wie Abirateron oder Anthracendione wie Mitoxantron eingesetzt werden (de Bono et al., 2010; Fizazi et al., 2012; Freedland und Partin, 2005). Dabei inhibiert die Behandlung des Patienten mit Abirateron die Biosynthese von Androgenen (Barrie et al., 1997; Rowlands et al., 1995), wohingegen die Behandlung mit Mitoxantron die DNA-Replikation und RNA-Transkription blockiert (Chiang et al., 1998; Kapuscinski und Darzynkiewicz, 1986; Nishio und Uyeki, 1983) und, durch das Hemmen der Topoisomerase II, die Insertion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA zur Folge hat (Capranico et al., 1993).

Bis heute ist Prostatakrebs in einem frühen Stadium, also dem Stadium eines noch lokalisierbaren und begrenzten Tumors, mit guten Heilungsaussichten für den Patienten verbunden. Die Therapie von Patienten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, beziehungsweise mit einem CRPC, erlaubt allerdings nur eine schmerzlindernde Behandlung ohne kurativen Erfolg. Das Problem, dass eine Hormonblockade im fortgeschrittenem Stadium von Prostatakrebs häufig keine heilende Wirkung verspricht (Denmeade und Isaacs, 2002), ist auf die Heterogenität von Prostatakarzinomen zurückzuführen.

1.3. Die Heterogenität von Prostatakarzinomen

Die Entstehung von Prostatakrebs ist durch die Anhäufung von Mutationen in einer Prostatazelle luminalen oder basalen Ursprungs gekennzeichnet (Ma et al., 2005; Okada et al., 1992; Parsons et al., 2001). Diese entartete Zelle bildet den klonalen

Ursprung des Prostatakarzinoms (Yates und Campbell, 2012), aus dem sich in Abhängigkeit zur Zeit und mit voranschreitender Mutationsrate weitere Subklone mit unterschiedlichen Charakteristika bilden können (Greaves und Maley, 2012; Yates und Campbell, 2012). Diese Subklone sind kennzeichnend für die inhärente Heterogenität dieser Erkrankung.

Die Heterogenität von Prostatakarzinomen ist von besonderer Bedeutung, wenn in Subklonen sogenannte Driver-Gene mutiert sind, die die Progression der Erkrankung fördern können. Eine dieser Mutationen ist die Fusion des androgenregulierten Gens der transmembranen Protease Serin 2 (TMPRSS2) mit einem der drei Gene aus der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren (Rubin, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Subklone mit einer TMPRSS2-ETS-Fusion im Gegensatz zu Subklonen, die im gleichen Tumorgewebe auftreten aber keine TMPRSS2-ETS-Fusion aufweisen, ein hohes Metastasierungspotential besitzen (Kumar-Sinha et al., 2008). Einen weiteren Hinweis für die klonale Heterogenität von Prostatakarzinomen wurde anhand von humanen Prostatakrebsgeweben gezeigt, die sich aus Arealen mit unterschiedlichen zelltypspezifischen Charakteristika zusammensetzten. Diese Gewebe bestanden aus Arealen mit kleinen und runden neuroendokrinen Zellen, die keinen AR exprimieren sowie kein PSA sekretieren und daher als neuroendokrines Prostatakarzinom (neuroendocrine prostate cancer, NEPC) bezeichnet werden, und aus Arealen, in denen die Zellen die AR-Expression und PSA-Sekretion beibehielten und dadurch repräsentativ für das Prostatakarzinom sind (Beltran et al., 2011). Wie beim Prostatakarzinom ist auch in ungefähr 50 % aller Fälle des NEPC die TMPRSS2-ETS-Fusion feststellbar (Lotan et al., 2011; Mosquera et al., 2009), was darauf hindeutet, dass die Entstehung des NEPC einen klonalen Ursprung im Prostatakarzinom hat (Williamson et al., 2011).

Die Zeit bis zum Entstehen von Subklonen im Prostatakarzinom ist bei der Behandlung des Patienten von Relevanz. Man geht davon aus, dass ab dem Zeitpunkt der Krebsinitiation bis hin zur Diagnose einer Erkrankung des Patienten an Prostatakrebs etwa 10 Jahre vergehen können (Luebeck, 2010). Während dieses Zeitraums besteht die Möglichkeit, dass sich das Prostatakarzinom bereits aus heterogenen Subklonen zusammensetzt (Luebeck, 2010) und dadurch eine Therapie des Patienten erschwert wird. Zusätzlich besteht das Risiko, dass die Behandlung des Patienten durch eine Anti-Hormontherapie die subklonale Heterogenität des Prostatakarzinoms weiterhin erhöht. Dabei entwickeln sich auf der Ebene des AR adaptive Mechanismen, die es

der Krebszelle erlauben, eine Hormonblockade zu umgehen. Zu diesen Mechanismen gehören unter anderem die gesteigerte Produktion von AR-Coaktivatoren, die Überexpression oder die Mutation des AR und die Bildung von AR-Splicevarianten (Heinlein und Chang, 2004; Hu et al., 2010).

Um Patienten in Zukunft besser helfen zu können, besteht in der Prostatakrebsforschung vermehrt der Bedarf an geeigneten Zellkulturmethoden, die es erlauben, die Heterogenität von Prostatakarzinomen zu studieren. Dafür müssen diese Methoden gewährleisten können, dass sie eine ausreichende Menge an experimentell veränderbaren Zellen zur Verfügung stellen, ohne dabei deren Heterogenität zu beeinflussen. Aus diesen Zellkulturmodellen sollen schlussendlich Erkenntnisse gewonnen werden, auf deren Basis neue Therapiemöglichkeiten entwickelt werden können, die eine personalisierte Behandlung des Patienten ermöglichen.

1.4. Aktuelle Zellkulturmodelle in der präklinischen Prostatakrebsforschung

In der Prostatakrebsforschung werden zum größten Teil etablierte Zelllinien eingesetzt, die in der zweidimensionalen (2D)-Zellkultur kultiviert, oder in immunsupprimierte Mäuse implantiert werden. Beide Verfahren sind bis heute ein wesentlicher Bestandteil in der Grundlagenforschung von Prostatakrebs und der Entwicklung potentieller Therapeutika zu dessen Behandlung.

Obwohl die Anwendung etablierter Zelllinien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zur weitreichenden Aufklärung von Mechanismen des Prostatakarzinoms beigetragen haben, wird ihr Gebrauch im Bereich der Arzneimittelentwicklung kritisiert (Hidalgo et al., 2014). Hier zeigt sich häufig eine eingeschränkte Vorhersagbarkeit sowie Übertragung der Ergebnisse aus Arzneimitteltests auf die Situation im Patienten (Johnson et al., 2001). Gründe dafür sind, dass etablierte Zelllinien zu einem großen Teil aus den Metastasen fortgeschrittener Krebsstadien isoliert wurden und häufig in Form homogener Zellsuspensionen in Zellkulturmodellen eingesetzt werden (Cunningham und You, 2015). Dadurch sind diese Methoden nicht repräsentativ für die Heterogenität von Prostatakarzinomen, die bei Patienten in der Klinik beobachtet werden kann (Lin et al., 2014). Zusätzlich kommt es während der Etablierungsphase dieser Zelllinien zu gravierenden biologischen Veränderungen in der Zellphysiologie. Diese Veränderungen

bestehen meist aus dem Verlust oder dem Erhalt genetischer Informationen. Diese Variationen im Genotyp können ein verändertes Wachstumsverhalten oder Invasionspotential zur Folge haben und die Sensitivität der Zellen in Arzneimitteltests beeinflussen (Gillet et al., 2011). Aus diesem Grund werden heute anstelle etablierter Zelllinien die Primärzellen des Patienten in Form patienten-abgeleiteter Xenograftmodelle (patient-derived xenografts, PDX) *in vivo* und Organoidkulturen *in vitro* kultiviert und analysiert.

1.4.1. PDX-Modelle

Das Verfahren zur Etablierung von PDX-Modellen besteht im Allgemeinen aus der Implantation von Tumorzellen des Patienten in ein geeignetes Versuchstier. Anschließend wird das im Versuchstier heranwachsende Tumorgewebe durch die Übertragung in weitere Versuchstiere expandiert und dann, im Rahmen präklinischer Forschungsansätze und der Arzneimittelentwicklung, verändert und analysiert. Meistens werden zur Etablierung von PDX-Modellen Gewebeproben des Primärtumors oder der Metastasen des Patienten verwendet, aber auch zirkulierende Tumorzellen aus Aszites- und Pleuraflüssigkeit oder Blut eignen sich für die Durchführung dieser Methode (Hidalgo et al., 2014).

Die erfolgreiche Etablierung von PDX-Modellen ist von mehreren Faktoren abhängig. Besonders die Wahl des Modellorganismus und die Art der Implantation der Tumorzellen in das Versuchstier sind von entscheidender Bedeutung. Beide Faktoren sind bestimmend für die Aufnahmerate der zu implantierenden Tumorzellen.

Als Versuchstiere für PDX-Modelle werden ausschließlich immunsupprimierte Mäuse verwendet, die je nach Schwere ihres Immundefekts eine unterschiedliche Aufnahmerate von Primärzellen des Patienten zur Folge haben. So ist zum Beispiel der Gebrauch athymischer Nacktmäuse, die keine T-Lymphozyten besitzen, mit einer reduzierten Aufnahmerate patienten-abgeleiteter Krebszellen verbunden (Tentler et al., 2012). Im Vergleich dazu führt die Verwendung sogenannter NOD/SCID IL-2R_γ^{null} – Mäuse (non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2R_γ^{null}-Mäuse, oder auch NSG-Mäuse), die weder T- noch B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen aufweisen (Shultz et al., 2005), zu einer gesteigerten Aufnahmerate der Zellen auf Grund ihrer sehr stark reduzierten Immunabwehr (Tentler et al., 2012).

Zusätzlich zur Wahl des geeigneten Modellorganismus ist auch die Art der Implantation ausschlaggebend für die Aufnahme rate humaner Primärzellen im Versuchstier. Generell kommen drei Implantationsformen in Frage, die bereits bezüglich ihrer Effizienz in der Etablierung von Prostata-PDX-Modellen verglichen wurden (Wang et al., 2005). Am häufigsten werden subkutane Implantationen zur Etablierung von Prostata-PDX-Modellen verwendet. Diese Methode ist ohne technische Schwierigkeiten durchführbar und bietet eine hohe Aufnahmekapazität von Zellen an der Implantationsstelle an. Allerdings werden bei dieser Methode die Zellen in einer wenig durchbluteten Region platziert, was sich in einer reduzierten Aufnahme rate und einem geringen Grad der Differenzierung implantierter Prostatakrebszellen widerspiegeln kann (van Weerden und Romijn, 2000; Wang et al., 2005). Ausschließlich Primärzellen aus fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms können durch diese Methode mit einer guten Aufnahme rate appliziert werden (Klein et al., 1997). Deshalb werden Prostata-PDX-Modelle, die unter Anwendung der subkutanen Implantation etabliert wurden, als nicht repräsentativ für den heterogenen Phänotyp von Prostatakarzinomen kritisiert (Rubio-Viqueira und Hidalgo, 2009).

Um die Aufnahme rate patienten-abgeleiteter Krebszellen zu verbessern und auch die Implantation von Prostatakrebszellen aus frühen Stadien der Erkrankung und Zellen aus benignen Gewebeproben zu gewährleisten, wird immer häufiger eine subrenale Implantation der Zellen durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Stück vom Gewebe des Patienten unter die Nierenkapsel von Mäusen platziert. Diese Stelle ist gut durchblutet und daher mit einer erhöhten Aufnahme rate assoziiert, die auch bei Implantation von Geweben aus frühen Prostatakrebsstadien und benignen Prostatazellen zum Erfolg führt (Wang et al., 2005). Der Nachteil der subrenalen Implantation liegt hauptsächlich in der technischen Durchführbarkeit. Diese Methode ist aufwändiger und bietet nur eine begrenzte Aufnahmekapazität von Primärzellgeweben an der Implantationsstelle.

Auch eine orthotopische Implantation kann dazu genutzt werden, humanes Gewebe aus Prostatakarzinomen in ein Versuchstier zu applizieren. Der wesentliche Vorteil dieser Technik ist die Implantation des Gewebes an eine für den Ursprung der Primärzellen repräsentativen Stelle (Gohji et al., 1993). Im Gebiet der Etablierung von Prostata-PDX-Modellen ist die orthotopische Implantation mit einer moderaten Aufnahme rate aber mit dem besten Grad der Differenzierung verbunden (Wang et al., 2005). Die technische Durchführbarkeit einer orthotopischen Implantation in die Prostata von

Mäusen ist, im Vergleich zu den vorangegangenen Methoden, auf Grund der anatomischen Lage des Organs deutlich aufwändiger und nur mit einem operativen Eingriff zu gewährleisten. Eine vorangegangene Kastration der Versuchstiere, um das Wachstum der patienten-abgeleiteten Prostatakrebszellen unter Hormonblockade zu studieren, führt zu einer Verkleinerung der Prostata der Maus, was eine Implantation zusätzlich erschweren kann (Wang et al., 2005).

Obwohl in der Vergangenheit unterschiedliche Prostata-PDX Modelle etabliert werden konnten, ist ihr Anwendungsgebiet hauptsächlich im Bereich der Grundlagenforschung von Prostatakrebs zu finden. Im Bereich der Arzneimittelentwicklung werden PDX-Modelle im Allgemeinen weniger häufig verwendet. Das liegt daran, dass eine erfolgreiche Etablierung von PDX-Modellen viel Zeit in Anspruch nimmt. Generell kann davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme implantierter Tumorgewebe im ersten Versuchstier, auch F₀-Generation genannt, 2 bis 6 Monate in Anspruch nimmt (Morton und Houghton, 2007; Tentler et al., 2012). Erst die Expansion des Gewebes bis hin zur F₃-Generation erlaubt die Durchführung von Experimenten mit einer annähernd geeigneten Versuchsgruppengröße (Tentler et al., 2012). Für die Etablierung von Hochdurchsatzformaten in einer kürzeren Zeit werden häufiger sogenannte patienten-abgeleitete Organoidkulturen *ex vivo* verwendet.

1.4.2. Patienten-abgeleitete-Organoidkulturen

Die Etablierung patienten-abgeleiteter Organoide beruht auf dem Prinzip der dreidimensionalen (3D)-Zellkultur. Diese Zellkulturmethode steht in den letzten Jahren vermehrt im Mittelpunkt des biologischen Interesses, da sie das Potential besitzt, Limitierungen der artifiziellen 2D-Zellkultur weitgehend zu minimieren oder vollständig auszugleichen. Die Anwendung dieses Prinzips erlaubt im Allgemeinen die Erzeugung von 3D-Zellkomplexen, die als Organoide bezeichnet werden, wenn sie aus einem heterogenen Gemisch von Zellen bestehen, das aus Tumorgeweben isoliert wurde, oder Sphäroide genannt werden, wenn sie aus homogenen Zelllinien etabliert worden sind (Weiswald et al., 2015). Im Vergleich zu Einzelzellschichten in der 2D-Zellkultur besitzen diese Zellkomplexe eine höhere *in vivo* Relevanz, da ihre zellulären Eigenschaften wie Morphologie, Proliferation, Differenzierung, Genexpression, Proteinsynthese, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Migration und ihre Zellantwort auf potentielle thera-

peutische Substanzen in Arzneimitteltests mit der Situation im Organismus vergleichbar sind (Antoni et al., 2015). Zusätzlich erlaubt die Kultivierung dieser Zellkomplexe innerhalb einer künstlich erzeugten extrazellulären Matrix (EZM) die Übertragung physikalischer und biochemischer Signale der Mikroumgebung auf die Zellen und eine Zellantwort auf Gradienten physiologisch relevanter Signale aus dem Zellkulturmedium (Chen et al., 2004; Cukierman et al., 2002). Durch diese Rekonstruktion der zellulären Mikroumgebung *in vivo* wird die biologische Relevanz in 3D-Zellkulturmodellen im Vergleich zur konventionellen 2D-Zellkultur erhöht. In **Abbildung 2** werden grundlegende Prozesse dargestellt, die in 3D-Zellkulturtechniken zu einem *in vivo*-ähnlicheren Zellverhalten führen.

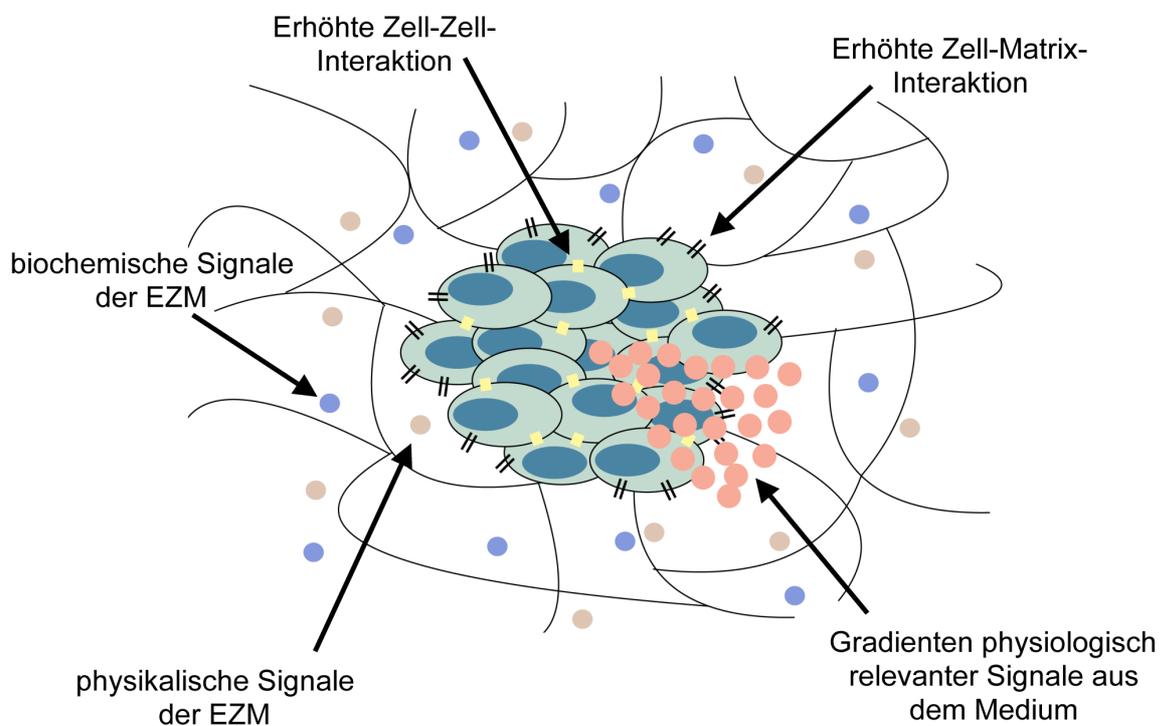


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines Sphäroids und seiner Interaktionen mit der EZM. Zellen in Sphäroiden zeichnen sich durch eine Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion aus, die der Situation im Organismus ähnlich ist. Diese Interaktionen sind essentiell, um physikalische und biochemische Signale der EZM korrekt zu interpretieren und ein physiologisches Zellverhalten zu gewährleisten. Weiterhin wird das Zellverhalten in 3D-Zellkulturmodellen durch Substanzgradienten aus dem Medium beeinflusst, was ebenfalls mit der Situation *in vivo* vergleichbar ist. (modifiziert nach Lovitt et al., 2014).

Wie auch im Fall der PDX-Modelle werden Organoide aus den unterschiedlichsten Patientenmaterialien etabliert. Dabei kommen sowohl Biopsien des Primärtumors und

der Metastasen, als auch zirkulierende Tumorzellen für die Bildung von Organoiden aus Prostatakrebszellen in Frage (Drost et al., 2016; Gao et al., 2014).

Zu Beginn der Etablierung von Prostata-Organoiden wird, in Abhängigkeit zum Ursprung der vom Patienten entnommenen Tumorzellen und Art der zu etablierenden Organoidkultur, das Verfahren der Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting, FACS) verwendet. Durch diese Methode werden zirkulierende Tumorzellen von anderen Zellen der Patientenprobe separiert, oder die Etablierung von Prostata-Organoiden aus Zelllinien luminalen oder basalen Ursprungs gewährleistet (Drost et al., 2016). Für die Etablierung heterogener Prostata-Organoide wird auf die Anwendung der FACS-Analyse verzichtet und ausschließlich ein Kollagenase-Verdau durchgeführt, um die Zellen des Tumorgewebes für das weitere Vorgehen zu vereinzeln (Drost et al., 2016). Nach dem Vereinzeln der Zellen werden diese innerhalb einer künstlich erzeugten EZM in Form von Matrigel aufgenommen. Bei Matrigel handelt es sich um ein komplexes Gemisch von EZM-Komponenten, die von der Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkomzelllinie der Maus sekretiert werden (Emonard et al., 1987). Die in dieser EZM entstehenden Prostata-Organoide werden kultiviert und durch Passagieren expandiert (Drost et al., 2016).

Für die Kultur patienten-abgeleiteter Prostata-Organoide werden Medien verwendet die, bezogen auf ihre Inhaltsstoffe, komplex zusammengesetzt sind. Diese Medien bestehen aus einem serumfreien Grundmedium, das mit definierten Konzentrationen serumfreier Vitamine, Proteine, Wachstumsfaktoren und inhibitorischen Substanzen versetzt wird (Drost et al., 2016). Einer der wichtigsten Bestandteile dieser Kulturmedien ist der Inhibitor der Rho-Kinase ROCK Y-27632. Durch die Zugabe dieser Substanz ist es möglich, die proliferative Aktivität epithelialer Prostatakarcinomzellen über eine längere Zeit aufrecht zu erhalten (Liu et al., 2012b) und ein Überwuchern dieser Zellen, durch Beimengungen benigner Zellen aus dem Stroma, zu verhindern (Drost et al., 2016; Gao et al., 2014). Zum Passagieren der Prostata-Organoide werden die Zellen durch Trypsin vereinzelt, in einer geeigneten Menge von Matrigel-Plaques aufgenommen und solange expandiert, bis eine geeignete Anzahl von Proben zur Verfügung steht, die die Durchführung von Experimenten im Hochdurchsatzformat erlaubt.

Die Erzeugung von Prostata-Organoiden ermöglicht die Herstellung patienten-abgeleiteter Zellkulturmodelle, die in ihren genetischen und phänotypischen Eigenschaften den Tumoren des Patienten ähnlich sind und diese Eigenschaften über die Zeit erhalten (Gao et al., 2014; Karthaus et al., 2014). Die Etablierung dieser Zellkulturmodelle

ist, wie bei jedem Modell das sich mit der Kultur von Primärzellen des Patienten befasst, mit Limitierungen verbunden. Häufig ist die Effizienz der Erzeugung von Prostata-Organoiden gering und verspricht, im Falle von Organoiden aus Metastasen, eine nur niedrige Erfolgswahrscheinlichkeit von 15-20 % (Gao et al., 2014). Zusätzlich kann die Inkorporation der Primärzellen des Patienten in künstlich erzeugte Mikroumgebungen wie Matrigel als kritisch bewertet werden. Durch die Isolation von Matrigel aus seinem natürlichen Ursprung können die Konzentrationen der EZM-Komponenten in unterschiedlichen Matrigel-Chargen variieren und dadurch das zelluläre Verhalten in unabhängigen experimentellen Ansätzen unterschiedlich beeinflussen (Hughes et al., 2010). Weiterhin ist bekannt, dass die Steifigkeit künstlich erzeugter Mikroumgebungen in Zellkultursystemen in der Lage ist, das Wachstum von Krebszellen zu erhöhen und die Zellsignalisierung zu verändern (Levental et al., 2009; Tilghman et al., 2010). Die Elastizität von Matrigel ist allerdings mit nur 440 ± 250 Pa sehr gering (Soofi et al., 2009) und unterscheidet sich stark von der Elastizität maligner Prostatagewebe, die in klinischen Studien auf einen Mittelwert von 88 kPa berechnet wurde (Boehm et al., 2015). Daher ist die Verwendung von Matrigel nicht dazu geeignet, die mechanischen Eigenschaften von Prostatatumoren zu rekonstruieren und kann daher das physiologische Zellverhalten von Prostatakrebszellen beeinflussen.

Für die definierte Rekonstruktion der Mikroumgebung von Tumoren wird an unterschiedlichen Zellgerüstträgern geforscht, die prinzipiell für die Etablierung präklinischer Zellkulturmodelle in Frage kommen könnten und flexibel auf die Mikroumgebung der zu untersuchenden Tumore anpassbar sind.

1.5. Zellgerüstträger in der 3D-Zellkultur

Zunächst entwickelt im Rahmen der Gewebetechnologie, wurden unterschiedliche Zellgerüstträger im Bereich der Transplantationsmedizin zum Zweck der Wundheilung und der Geweberegeneration eingesetzt (Alsberg et al., 2002; Hutmacher, 2000). Heute sind diese Systeme ein fester Bestandteil der 3D-Zellkultur und wurden für die Untersuchung biologischer Prozesse weitgehend adaptiert (Nyga et al., 2011).

Ein grundlegendes Merkmal dieser Zellgerüstträger ist, dass sie den zu kultivierenden Zellen eine Matrix liefern. Durch diese Matrix sollen die mechanischen, physikalischen und biochemischen Eigenschaften ihrer spezifischen Mikroumgebung nachgeahmt und auf sie übertragen werden. Diese Zellgerüste sind flexibel auf die gewünschten

Zellkulturbedingungen anpassbar und erlauben dadurch die Etablierung zelltypspezifischer, biomimetischer Mikroumgebungen (Nyga et al., 2011). Gerüstbasierte 3D-Zellkulturmodelle werden grundsätzlich in zwei Hauptgruppen unterteilt die, je nach Art der für ihre Produktion verwendeten Substanzen, unterschieden werden. Man unterteilt sie in Zellgerüstträger aus natürlichen und synthetischen Polymeren.

1.5.1. Zellgerüstträger aus natürlichen Polymeren

Für die Etablierung von Zellgerüstträgern aus natürlichen Polymeren werden biologische Substanzen verwendet, die äquivalent zu körpereigenen Bestandteilen der EZM sind oder eine hohe Strukturähnlichkeit mit diesen besitzen. Diese Zellgerüstträger besitzen auf Grund ihres Ursprungs eine hohe Bioaktivität (Dawson et al., 2008). Die Vernetzung natürlicher Polymere führt meist zur Bildung gelartiger Strukturen, die sich durch einen hohen Wassergehalt auszeichnen und daher als Hydrogele bezeichnet werden (Ahmed, 2015).

Zu den bekanntesten natürlichen Polymeren, die zur Produktion von Hydrogelen verwendet werden, zählen Kollagen Typ I, Gelatine, Hyaluronsäure, Fibrin, Alginate und Agarose (Drury und Mooney, 2003; Lee et al., 2008; Lee und Mooney, 2001; Nyga et al., 2011). Diese Hydrogele sind grundsätzlich für den Einsatz in der Grundlagenforschung von Krebs geeignet (**Tabelle 1**), ihre Anwendung im Bereich der präklinischen Forschung und besonders in der Arzneimittelentwicklung kann jedoch in Frage gestellt werden. Gründe dafür sind, dass Hydrogelen aus natürlichen Polymeren zelluläre Prozesse wie Viabilität, Proliferation und Differenzierung über unzählige endogene Faktoren beeinflussen können. Dadurch ist nicht eindeutig festzustellen, welches Signal der künstlich erzeugten EZM für welche zelluläre Funktion verantwortlich ist (Cushing und Anseth, 2007). Weiterhin können neben den gewünschten Reaktionen der Zellen auf das Polymer auch immunogene Reaktionen auftreten, die die Physiologie der Zellen entscheidend beeinflussen (Tibbitt und Anseth, 2009). Betrachtet man sich neben den biologischen Eigenschaften auch die mechanischen Charakteristika von Hydrogelen aus natürlichen Polymeren, in denen Zellen inkorporiert und kultiviert werden, dann sind diese meist nicht in der Lage, die mechanischen Eigenschaften einiger Tumore zu rekonstruieren (Tibbitt und Anseth, 2009). Eigenschaften wie die Elastizität der Zellmikroumgebung haben jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Zellphysiologie vieler Zelltypen (Engler et al., 2006; Engler et al., 2007; Wang et al., 2000).

Auf Grund dieser Limitierungen produziert man Hydrogele aus synthetischen und inerten Polymeren, die eine kontrollierbarere Zusammensetzung der künstlichen Mikroumgebung gewährleisten können.

Tabelle 1. Zellgerüstträger aus natürlichen Polymeren in der Krebsforschung

Polymer	Zelllinie	Krebsart	Referenz
Kollagen Typ I	MDA_MB231	Brust	(Szot et al., 2011)
Gelatine	OV-MZ-7	Ovar	(Kaemmerer et al., 2014)
Hyaluronsäure	C4-2B	Prostata	(Gurski et al., 2009)
Fibrin	B16-F1	Melanom	(Liu et al., 2012a)
Alginat	HCT116	Darm	(Ivanovska et al., 2016)
Agarose	SKOV3	Ovar	(Xu et al., 2014)

1.5.2. Zellgerüstträger aus synthetischen Polymeren

Im Vergleich zu Zellgerüstträgern aus natürlichen Polymeren ermöglicht die Verwendung synthetischer Polymere eine kontrollierbarere und maßgeschneiderte Rekonstruktion physikalischer und biochemischer Eigenschaften der EZM (Cushing und Anseth, 2007; Tibbitt und Anseth, 2009). Synthetische Zellgerüstträger können unter Verwendung der unterschiedlichsten Polymere hergestellt werden, die jedoch zunächst alle biologisch inert sind und im Verlauf ihrer Produktion mit bioaktiven Substanzen modifiziert werden müssen, um eine physiologische Mikroumgebung zu rekonstruieren (Cushing und Anseth, 2007). Durch diese Modifikationen können aus synthetischen Polymeren dreidimensionale, biomimetische Zellgerüstträger etabliert werden, die spezifisch auf die Bedingungen des zu untersuchenden Zelltyps angepasst werden und dadurch, im Vergleich zur Anwendung von Zellgerüstträgern aus natürlichen Polymeren, eine kontrollierbarere zellbiologische Analyse gewährleisten (Cushing und Anseth, 2007). Synthetische Polymere, die in der Zellkultur angewendet werden, lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen, die anhand ihrer biologischen Eigenschaften definiert werden. Man unterscheidet zwischen nicht biologisch abbaubaren, biologisch abbaubaren und bioaktiven Hydrogelen.

Nicht biologisch abbaubare Hydrogele zeichnen sich durch ihre erhöhte mechanische Stabilität aus. Um die Stabilität dieser Zellgerüstträger zu variieren, werden im Allgemeinen die Konzentration und der Vernetzungsgrad der verwendeten Polymere verändert (Okay, 2009). Zur Herstellung dieser synthetischen Hydrogele eignen sich besonders Polymere wie Polyhydroxymethacrylat (polyHEMA), Polyvinylalkohol (PVA) und Polyethylenglykol (PEG) (Drury und Mooney, 2003; Lee und Mooney, 2001; Nyga et al., 2011; Tibbitt und Anseth, 2009). Diese Polymere können ebenfalls als Grundlage für die Etablierung biologisch abbaubarer oder bioaktiver Zellgerüstträger verwendet werden.

Die Produktion biologisch abbaubarer Hydrogele aus synthetischen Polymeren bietet, gegenüber der Verwendung der bereits besprochenen natürlichen Hydrogele, einen entscheidenden Vorteil: Ihre Abbaurate und Stabilität kann über die Synthese bestimmt werden und ermöglicht den darin kultivierten Zellen die Ablagerung ihrer eigenen EZM (Cushing und Anseth, 2007). Im Gegensatz dazu unterliegen Polymere natürlichen Ursprungs einem unkontrollierten Abbau, was eine geringe mechanische Stabilität zu Folge hat. Für die Produktion biologisch abbaubarer Hydrogele eignen sich unter anderem Polylactid, Polyglykolsäure und Poly- ϵ -Caprolactam (Brandl et al., 2007; Lee et al., 2008). Diese Polymere können dazu eingesetzt werden, zuvor biologisch inerte Zellgerüstträger wie aus PEG oder PVA in ein biologisch abbaubares Zellgerüst umzuwandeln, indem sie mit den zuvor biologisch inerten Polymeren während der Synthese des Zellgerüsts verknüpft werden (Clapper et al., 2007).

Um eine zelltypspezifische Interaktion der Zellen mit ihrer synthetischen Mikroumgebung zu ermöglichen, müssen bioaktive Hydrogele erzeugt werden. Deshalb werden während oder nach der Produktion des Hydrogels bioaktive Moleküle in das synthetische Zellgerüst integriert. Dadurch können physikalische und biochemische Signale der künstlichen EZM, über die Integrin-vermittelte Signaltransduktion, auf die Zellen innerhalb des Zellgerüsts übertragen werden (Tibbitt und Anseth, 2009).

Nach ihrer Produktion können synthetische Zellgerüstträger mit EZM-Proteinen wie Laminin und Kollagen beschichtet werden. Diese Proteine sind in der Lage, die Adhäsion der Zellen im Zellgerüstträger zu erhöhen und dadurch die Zellphysiologie zu verbessern (Weber et al., 2008). Der Nachteil dieser Beschichtungen besteht im Abbau und der Aggregation der verwendeten Proteine. Dadurch kommt es zu einer ungleichmäßigen Verteilung der EZM-Komponenten innerhalb des synthetischen Zellkulturmodells.

Das bevorzugte Verfahren zur Erhöhung der Zelladhäsion innerhalb synthetischer Zellgerüstträger ist daher der Einbau der spezifischen Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D). Diese RGD-Sequenz stellt eine Bindedomäne von Fibronektin dar und ist in der Lage, die Proliferation, die Viabilität, die Migration und die Adhäsion von Zellen innerhalb synthetischer Zellgerüstträger zu verbessern (Park et al., 2005; Patel et al., 2005). Um die Bioaktivität synthetischer Zellgerüstträger weiter zu erhöhen, können auch Matrixmetalloproteinase (MMP)-Substrate in zuvor biologisch inerte Matrices integriert werden. Diese Substrate sind von besonderer Bedeutung, wenn zelluläre Prozesse studiert werden sollen, die einen Umbau der EZM voraussetzen. Durch die Integration von MMP-Substraten wird die Enzymsensitivität synthetischer Zellgerüstträger gesteigert (Tibbitt und Anseth, 2009). Neben dem Einbau von RGD-Sequenzen und MMP-Substraten können auch Wachstumsfaktoren in das synthetische Zellgerüst integriert werden, um diese Systeme einen Schritt weiter in Richtung biomimetischer Zellkulturmodelle voran zu bringen (Silva et al., 2009).

Synthetische Polymere bieten eine geeignete Grundlage für die Etablierung biomimetischer Systeme, da sie während ihrer Synthese flexibel auf die unterschiedlichsten Bedingungen angepasst werden können. Allerdings ist die Funktionalisierung synthetischer Hydrogele mit einem entscheidenden Nachteil verbunden. Dieser Nachteil ist die Komplexität ihrer Produktion, die mit steigendem Grad der Funktionalisierung zunimmt (Tibbitt und Anseth, 2009). Diese Komplexität ist meist schwer zu kontrollieren, wenig reproduzierbar und muss auf jeden zu untersuchenden Zelltyp immer neu angepasst werden. Weiterhin besitzen Hydrogele aus synthetischen Polymeren in denen Zellen eingekapselt werden, wie auch Zellgerüstträger aus natürlichen Polymeren, eine meist nur geringe mechanische Stabilität (Okay, 2009). Diese Eigenschaft muss berücksichtigt werden, wenn im Rahmen der Etablierung biomimetischer Zellkulturmodelle die mechanischen Gegebenheiten der Mikroumgebung von Tumoren rekonstruiert werden soll.

Um die mechanischen Eigenschaften der Tumornische nachzubilden, können sich ebenfalls sogenannte Cryogele eignen, die aufgrund ihres Herstellungsprozesses in der Lage sind, Systeme mit besonderen mechanischen und physikalischen Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

1.5.3. Cryogelege

Cryogelege sind Zellgerüstträger, die durch das Porogenverfahren der Cryogelation hergestellt werden. Porogenverfahren sind im Allgemeinen Herstellungsprozesse, die sich zur Synthese poröser Zellgerüstträger eignen (Johnson et al., 2010; Tran et al., 2011). Während dieser Prozesse werden den gelbildenden Polymeren porenbildende Substanzen hinzugesetzt, die für die poröse Struktur der entstehenden Zellgerüstträger verantwortlich sind. Dafür eignen sich prinzipiell Gase und Salze (Loh und Choong, 2013), aber auch, wie im Rahmen der Cryogelation, Flüssigkeiten, die bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt beginnen zu kristallisieren, während das in der Flüssigkeit gelöste Polymer in einer nicht gefrierenden Mikrophase konzentriert und vernetzt wird (Lozinsky et al., 2003; Plieva et al., 2007). Während der Cryogelation wirken die entstehenden Eiskristalle als Porogen und verleihen dem Cryogel ein interkonnektives Porennetzwerk und eine erhöhte Porosität (Lozinsky et al., 2003; Okay, 2014; Plieva et al., 2007). Die mechanischen und physikalischen Eigenschaften dieser Cryogelege, sowie die Morphologie der entstehenden Poren und des Porennetzwerkes, werden vom verwendeten Polymer, dessen Konzentration und den Bedingungen während der Cryogelation bestimmt (Plieva et al., 2007).

Aufgrund der durch die Cryogelation entstehenden porösen Struktur und der damit assoziierten mechanischen Stabilität werden Cryogelege auf vielfältige Art und Weise verwendet. Ihr Hauptanwendungsgebiet liegt bis heute noch in der Biokatalyse über im Cryogel immobilisierter Zellen (Martins et al., 2003) und in der Chromatographie zur Abtrennung von Viren (Williams et al., 2005) und Bakterien (Potter und Hilder, 2008) aus Proteinlösungen. Erst in den letzten Jahren wurde ihr Potential zur Herstellung biomimetischer 3D-Zellgerüstträger entdeckt (Bloch et al., 2005; Kumar et al., 2006). Die Etablierung von Cryogelen als 3D-Zellkulturmodell im Bereich der Prostatakrebsforschung ist bis heute nicht erfolgt. Daher konnte bisher nicht bewiesen werden, ob sich Cryogelege als präklinisches Forschungsmodell und als Analyseplattform zur Erprobung potentieller Therapeutika für die Behandlung von Prostatakrebs eignen. Der Nutzen von Cryogelen im Bereich der Prostatakrebsforschung soll anhand der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines 3D-Zellkulturmodells, das im Rahmen der Grundlagenforschung von Prostatakrebs und in der präklinischen Forschung zur Evaluierung potentieller Therapeutika eingesetzt werden kann. Als Basis für dieses 3D-Zellkulturmodell sollte ein Cryogel verwendet werden, das aus dem synthetischen Polymer Polyethylenglykoldiacrylat (PEGda) synthetisiert werden sollte. In den ersten Schritten der Arbeit war zu überprüfen, ob sich der Prozess der Cryogelation von PEGda dazu eignet, ein Zellkulturmodell zu etablieren, das den Stofftransport innerhalb des Systems durch ein ausreichendes Maß der Porosität garantiert und dadurch die Versorgung der Zellen innerhalb des Zellgerüsträgers mit Komponenten aus dem Zellkulturmedium sicherstellt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob Cryogele in der Art etabliert werden können, dass ihre mechanischen Eigenschaften der Elastizität maligner Prostatagewebe entsprechen. Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die mechanischen Eigenschaften dieser spezifischen Tumornische auf die im Zellkulturmodell kultivierten Zellen übertragen werden können. Um das Konzept eines Cryogels für die Prostatakrebsforschung zu überprüfen, sollten anhand der etablierten epithelialen Prostatakrebszelllinie LNCaP biologische Studien über das Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von Androgen, die Morphologie der Zellen und über die Expression prostatakrebsspezifischer Gene in diesem System durchgeführt werden. Die Qualität des Systems sollte durch den Vergleich mit äquivalenten Experimenten aus der 2D-Zellkultur, einem weiteren gebräuchlichen 3D-Zellkulturmodell und Xenograftmodellen *in vivo* beurteilt werden. Weiterhin war zu überprüfen, ob sich Cryogele als Analyseplattform für die Erprobung potentieller Therapeutika zur Behandlung von Prostatakarzinomen eignen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Biomol, Hamburg
5 α -Dihydrotestosteron (DHT)	Sigma Aldrich, München
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Citratsäure-Monohydrat	Carl-Roth, Karlsruhe
Triethylendiamin (DABCO)	Carl Roth, Karlsruhe
Deoxynucleotide (dNTPs)	PeqLab, Erlangen
Diethylcarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
ECL Western Blot Substrat	Thermo Scientific, Rockford, USA
Enzalutamid	Selleckchem, München
Eukitt	Sigma Aldrich, München
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, München
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Mayer's Hämatoxylin	Sigma Aldrich, München
M-MLV reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Niedrigschmelzpunkt-Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Nonident P-40 (NP40)	Carl Roth, Karlsruhe
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	Metabion, Steinkirchen
Page-Ruler Plus Proteinstandard	Thermo Scientific, Karlsruhe
peqGold RNAPure	PeqLab, Erlangen
peqGold universal Agarose	PeqLab, Erlangen
Polyethylenglykoldiacrylat, MW 575 Da	Sigma Aldrich, München

Polyethylenglykoldiacrylat, MW 3400 Da	Alfa Aesaar, Massachusetts, USA
Polyethylenglykoldiacrylat, MW 6000 Da	Sigma Aldrich, München
Proteinase-K	Sigma Aldrich, München
Protease-Inhibitor-Mix-G	Serva, Heidelberg
PVDF-Membranen	Merck, Darmstadt
RNAasin	Promega, Mannheim
Röntgenfilme Fuji Super	RXErnst Christiansen GmbH, Planegg
Rotiophorese Gel 30:	PeqLab, Erlangen
SYBER Green qPCR Mix	Promega, Mannheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Thio-2	Karlsruher Institut für Technologie
Tris base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Sigma Aldrich, München
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden in erforderlicher Reinheit von Sigma Aldrich aus München oder der Firma Carl Roth aus Karlsruhe bezogen.

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Biomatrix Perfecta 3D	Sigma Aldrich, München
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Schwerte
PCR-Platten für qPCR	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
PCR-Platten Klebefolien für qPCR	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach
Pipetten-Filterspitzen	Corning, Kaiserslautern
PVDF-Membranen	Merck Millipore, Darmstadt
Röntgenfilme Super RX	Fujifilm, Tokio
Spritzen (Füllvolumen 3 ml)	Braun, Melsungen

Sterilfilter (Porendurchmesser 0,22 µm)	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturschalen und -platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.3. Zellkulturmaterial

Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, München
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
Penizillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, München
RPMI 1640	Life Technologies, Darmstadt
RPMI 1640 (ohne Phenolrot)	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin (0,25 % EDTA)	Life Technologies, Darmstadt
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS -/-)	Life Technologies, Darmstadt

2.1.4. Geräte

FlexCycler	AnalytikJena, Überlingen
Fluoreszenzmikroskop DM5500	Leica, Wetzlar
Gewebeprozessierer TP1020	Leica, Wetzlar
Homogenisator T25 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Hybridisierungssofen OV 3	Biometra, Göttingen
Inverses Lichtmikroskop DM5000	Leica, Wetzlar
Konfokalmikroskop TCS SPE	Leica, Wetzlar
Mikrotom RM2155	Leica, Wetzlar
Nanodrop ND-1000	PeqLab, Erlangen
Paraffinausgießstation EG1160	Leica, Wetzlar
Quecksilberporosimeter Pascal 140 und 440	Porotec, Hofheim am Taunus
Rasterelektronenmikroskop Zeiss Supra 60 VP	Carls Zeiss NTS, Oberkochen
Real-Time PCR StepOnePlus	Applied Biosystems, Schwerte
Umgebungsrasterelektronenmikroskop Zeiss Evo 50	Carl Zell NTS, Oberkochen
Materialprüfmaschine Z 0.5	Zwick Roell, Ulm

2.1.5. Zelllinien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz bzw. Bezug
A-498	Nierenkarzinomzellen	(Fogh et al., 1977)
LNCaP	Prostata-Adenokarzinomzellen aus Lymphknotenmetastasen	(Horoszewicz et al., 1980)
LNCaP_wtBAG1L	LNCaP Zellen transduziert mit einem Expressionsvektor für BAG1L	Dr. Laura Cato, Dana-Farber Institut, Boston, USA
LNCaP_Kontrolle	LNCaP Zellen transduziert mit einem Leervektor	Dr. Laura Cato, Dana-Farber Institut, Boston, USA

2.1.6. Versuchstiere

Tabelle 3. Auflistung verwendeter Versuchstiere

Spezies	Stamm	Herkunft
Maus	Athymische Nacktmäuse	Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruher Institut für Technologie

2.1.7. Primärantikörper

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper. IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

Antigen	Spezies	Isotyp	Reaktivität	Anwendung	Hersteller
AR	Maus	IgG1	Human	IF: 2 µg/ml	Dianova, Hamburg
α-Tubulin	Hase	IgG	Human	IF: 200 ng/ml	Abcam, Hamburg
Flag-Tag	Maus	IgG1	Synthetisch	WB: 1 µg/ml	Sigma Aldrich, Hamburg
Vinculin	Maus	IgG	Human	WB: 1 µg/ml	Sigma Aldrich, Hamburg

2.1.8. Sekundärantikörper

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper. IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

Konjugat	Spezies	Isotyp	Reaktivität	Anwendung	Hersteller
Cy2	Ziege	IgG2a	Hase	IF: 1 µg/ml	Dianova, Hamburg
Cy3	Ziege	IgG2a	Maus	IF: 1 µg/ml	Dianova, Hamburg
HRP	Ziege	IgG	Maus	WB: 400 ng/ml	Agrisera, Vännäs, Schweden

2.1.9. Primer

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primersequenzen.

Gen	Referenz	Primersequenz (forward/reverse)	Amplikon
HPRT	NM_000194.2	5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3' 5'-GCTTGCGACCTTGACCATCT-3'	489-653
AZGP1	NM_001185.3	5'-CAGCCAACCTTCAGAAGGCCA-3' 5'-TCCCTGCAATACGTGAGACC-3'	350-449
FKBP5	NM_001145775.2	5'-AGGAGGGAAGAGTCCCAGTG-3' 5'-TGGGAAGCTACTGGTTTTGC-3'	1701-1836
KLK2	NM_001002231.2	5'-TCTCCATCGCCTTGTCTGTG-3' 5'-CTTCTCACACTCCCAGCCTC-3'	58-140
KLK3	NM_001648.2	5'-CCCGGTTGTCTTCCTCACCC-3' 5'-GCCTCCCACAATCCGAGACA-3'	50-125
TMPRSS2	NM_001135099.1	5'-GTCCCCACTGTCTACGAGGT-3' 5'-CAGACGACGGGGTTGGAAG-3'	269-369

2.2. Methoden

2.2.1. Synthese von PEGda-Cryogelen und Hydrogelen

Für die Herstellung von PEGda575 und PEGda700-Cryogelen wurde Polyethylenglykoldiacrylat (PEGda, MW 575 und 700 Da) in phosphatgepufferter Salzlösung ohne Magnesium und Kalzium (PBS -/-) gemischt (11,2 % vol.) und durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,22 μm steril filtriert. Anschließend wurde die Lösung für 8 min bei -20°C vorgekühlt und die radikalische Polymerisationsreaktion durch die Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, 5 mg/ml) und Tetramethylethyldiamin (TEMED, 0,075 % vol.) gestartet. Die Vernetzung von PEGda wurde über einen Zeitraum von 3 Stunden bei -20°C in sterilen Spritzen mit einem Füllvolumen von 3 ml durchgeführt. Die entstandenen Cryogelzylinder wurden mit einem selbst hergestellten Cryogelschneider in gleichmäßige Scheiben mit einer Dicke von 3 mm geschnitten. Der Durchmesser jeder Probe lag bei 1 cm, was dem Durchmesser der verwendeten Spritzen entsprach. Anschließend wurden die Proben für 15 min in 70 % Ethanol (EtOH) überführt und danach 3mal in PBS unter einer Reinraumbank gewaschen, bevor sie in der Zellkultur eingesetzt wurden. Cryogele aus PEGda mit dem Molekulargewicht von 3400 Da und 6000 Da wurden auf dieselbe Art und Weise hergestellt. Der einzige Unterschied bestand in der Konzentration des TEMED, die auf 0,05 % vol. pro Ansatz reduziert wurde.

Für die Herstellung von PEGda700-Hydrogelen wurde das Reaktionsgemisch für die radikalische Polymerisation identische zum Verfahren der Cryogelsynthesen vorbereitet. Die Vernetzung von PEGda erfolgte jedoch bei Raumtemperatur.

2.2.2. Analyse der Poreneigenschaften von Cryogelen und Hydrogelen

2.2.2.1. Quecksilberporosimetrie

Für die Analyse der Porosität von PEGda-Cryogelen und PEGda-Hydrogelen wurden die Proben unter Vakuum getrocknet und anschließend mit einem Quecksilberporosimeter (Pascal 140 und 440, Thermo Finnigan, Porotec, Hofheim am Taunus) analysiert. Alle Messungen wurden mit einem Benetzungswinkel für Quecksilber von 130° und einer Oberflächenspannung von $0,485 \text{ N m}^{-1}$ durchgeführt. Die Porosität der Proben wurde aus den Rohdaten, der resultierenden Intrusionskurven, mit folgender Formel berechnet:

$$\Phi = \left(1 - \frac{p}{p_0}\right) \times 100\%,$$

mit Φ für die Gesamtporosität, p die Rohdichte und p_0 die Reindichte der Proben.

2.2.2.2. Schwellpotential

Um das Schwellpotential der Cryogele und Hydrogele zu bestimmen, wurden zuvor getrocknete Proben über 5 min in PBS inkubiert. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden die Proben zu bestimmten Zeitpunkten (5, 15, 30, 60, 120 und 300 s) aus dem PBS entfernt und gewogen. Die Zunahme des Gewichtes wurde in technischen Triplikaten bestimmt und mit dem Gewicht getrockneter Cryogele und Hydrogele in Bezug gesetzt. Das Schwellpotential der unterschiedlichen Proben wurde durch folgende Formel errechnet:

$$SP. = \left[\frac{(Wg - Wt)}{Wt} \right] \times 100\%,$$

mit SP. für das Schwellpotential, Wg für das Gewicht der geschwollenen Proben und Wt für das Gewicht der getrockneten Proben.

2.2.3. Analyse der Elastizität von PEGda-Cryogelen

Für die Auswertung der Elastizität von PEGda-Cryogelen wurde eine Materialprüfmaschine (Z0.5, Zwick Roell, Ulm) verwendet. PEGda-Cryogele mit einer Schichtdicke von 3 mm wurden in geschwollener Form auf einer festen Metallunterlage platziert und von oben mit einem Druck von 1 N, unter linearem Druckaufbau von 1 mm min^{-1} , belastet. Der Eindrückweg wurde dabei gegen die Eindrückzeit, in einem sogenannten Spannungs-Dehnungs-Diagramm, aufgezeichnet. Aus dieser Spannungs-Dehnungs-Kurve wurde die Elastizität der Cryogele im linearen Bereich, gemäß der Hooke'schen Regel, unter Verwendung folgender Formel berechnet:

$$E = (F/A)(l/\Delta l),$$

mit E für die Elastizität, F für die ausgeübte Kraft, A für den Querschnitt des Cryogels, l für die initiale Länge und Δl für die Veränderung der Länge unter Krafteinwirkung.

2.2.4. Aufklärung der Architektur von PEGda-Cryogelen

2.2.4.1. Synchrotron-Mikrotomographie

Die Gestalt des Porennetzwerks in PEGda-Cryogelen wurde durch das Verfahren der Synchrotron-Mikrotomographie analysiert. Hierfür wurden nasse PEGda-Cryogele am IMAGE-Strahlenrohr der ANKA Synchrotron Einrichtung des Karlsruher Institut für Technologie (KIT) analysiert. Der experimentelle Aufbau der Synchrotron-Mikrotomographie bestand aus einem Wiggler-Undulator zur Erzeugung der Synchrotronstrahlung und einem Hochgeschwindigkeitsdetektor PCO.max CMOS, der mit einem Röntgenstrahlenmikroskop der Firma Elyas solutions kombiniert war. Dieses Mikroskop erlaubte eine 1,5-fache Auflösung des Objekts mit einer effektiven Pixelgröße von $7,3 \mu\text{m} \times 7,3 \mu\text{m}$. Für jede Tomographie wurden 3200 Einzelbilder mit einer Frequenz von 50 Bildern pro Sekunde aufgenommen. Vor Rekonstruktion wurde der Kontrast der Einzelbilder mit dem ImageJ-Plug-In ANKAphase bearbeitet. Die dreidimensionale Rekonstruktion der Aufnahmen wurde mit dem Programm PyHST, entwickelt an der europäischen Synchrotron-Strahlungsanlage (Grenoble, Frankreich) und am KIT, durchgeführt. Die Darstellung des Porennetzwerkes der PEGda-Cryogele wurde mit dem Programm Amira-3D realisiert.

2.2.4.2. Rasterelektronenmikroskopie

Für die Analyse der Architektur von PEGda-Cryogelen wurden Aufnahmen der Zellgerüstträger am Rasterelektronenmikroskop (REM, Supra 60 VP, Zeiss, Jena) angefertigt. Hierfür wurden Cryogele unter Vakuum zunächst vollständig getrocknet, vor der Analyse durch Kathodenzerstäubung mit Silber beschichtet und anschließend mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV analysiert.

2.2.4.3. Umgebungsrasterelektronenmikroskopie

Zur Beurteilung der Porenstruktur von PEGda575-Cryogelen wurden Proben im geschwollenem Zustand an einem Umgebungsrasterelektronenmikroskop (environmental scanning electron microscope, ESEM; Zeiss Supra Evo 50) analysiert. Hierfür wurden die Proben zuvor in Quader mit einer Kantenlänge von 3 mm zerteilt und anschließend ohne Kathodenzerstäubung in einem Niedrigvakuum bei einer Beschleunigungsspannung von 10 kV analysiert.

2.2.4.4. Auswertung von Porenumfängen

Eine genauere Aussage über die Porengröße von Cryogelen wurde auf Basis lichtmikroskopischer Aufnahmen getroffen. Hierfür wurden Cryogele, die zuvor dehydriert und in Paraffin eingebettet wurden, an einem Mikrotom (RM2155, Leica, Wetzlar) in Schnitte von 5 µm Dicke geschnitten. Danach wurden die Schnitte deparaffiniert, rehydriert und Aufnahmen des Porennetzwerkes an einem inversen Lichtmikroskop (DM 5000, Leica, Wetzlar) angefertigt. Anschließend konnten aus den Aufnahmen die großen und kleinen Halbachsen der Poren durch das Computerprogramm photoshop cs. 5.1. ausgemessen werden. Die elliptischen Umfänge der Poren wurden durch die Näherungsformel nach Ramanujan berechnet, die für Ellipsen mit größeren Abweichungen zwischen ihren Halbachsen geeignet ist. Die Gleichung nach Ramanujan ist wie folgt beschrieben:

$$C = \pi(a + b) \left(\frac{3\lambda^2}{10 + \sqrt{4 - 3\lambda^2}} \right),$$

mit C für den elliptischen Umfang, a die großen Halbachsen und b die kleinen Halbachsen der ausgemessenen Poren.

2.2.5. Vorbereitung bewachsener Cryogele für morphologische, physikalische und mechanische Analyseverfahren

Für die morphologische Analyse von Sphäroiden in Cryogelen durch REM wurden bewachsene Proben für 2 Stunden in Glutaraldehyd (2,5 % in H₂O) fixiert. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min in 50 %, 75 % und 100 % EtOH) dehydriert. Nach der vollständigen Trocknung der Cryogele unter Vakuum konnten diese anschließend am REM analysiert werden.

Dasselbe Prinzip wurde für Cryogele aus der Zellkultur verwendet, deren Porosität mittels Quecksilberporosimetrie ausgewertet werden sollte. Die Beurteilung der Elastizität von Cryogelen aus der Zellkultur erfolgte direkt und ohne eine vorangegangene Fixierungsmethode.

2.2.6. Zellkulturmethoden

2.2.6.1. Kultivieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen in der 2D-Zellkultur

Die Arbeit mit Zellen wurde ausschließlich unter einer Reinraumbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C, 5 % CO₂, 5 % O₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das verwendete Zellkulturmedium bestand dabei, im Falle der epithelialen Prostatakrebszellen LNCaP, aus RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10 % fetalen Kälberserum (FCS), 1 % Penizillin- und Streptomycinlösung, sowie 1% L-Glutamin. Für die Kultur der humanen Nierenkarzinomzelllinie A-498 wurde die gleiche Zusammensetzung des Mediums gewählt und zusätzlich 1 % Natrium-Pyruvat hinzugegeben. Ausgesät wurden alle Zelllinien in Zellkulturschalen aus Polystyrol. Im Falle der Kultivierung von LNCaP-Zellen war eine Beschichtung der Zellkulturschalen mit Poly-L-Lysin erforderlich, um die Zelladhäsion zu erhöhen.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit PBS +/- gewaschen, durch Trypsin (0,25 % EDTA) von ihrer Unterlage gelöst und durch Zentrifugieren (1200 UpM für 3 min) in einem Zellpellet zusammengeführt. Das Passagieren der Zellen erfolgte anschließend durch das Verteilen einer entsprechend verdünnten Zellsuspension auf weiteren Zellkulturschalen.

Um die Zellen zu lagern, wurden sie ebenfalls von ihrer Unterlage durch Trypsinieren gelöst, nach dem Zentrifugieren in Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C oder in Flüssigstickstoff zur Langzeitlagerung.

Um die zuvor eingefrorenen Zellen erneut in Kultur zu überführen, wurden die Einfrieröhrchen bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 10-fachen Volumen von Zellkulturmedium resuspendiert und dieses nach dem Zentrifugieren durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die nun DMSO-freie Zellsuspension wurde anschließend, wie bereits beschrieben, in einer geeigneten Menge von Zellkulturschalen ausgesät und kultiviert.

2.2.6.2. Kultivierung von LNCaP-Zellen in PEGda-Cryogelen

Zur Vorbereitung der Zellkultur in PEGda-Cryogelen wurden Cryogele mit einer Dicke von 3 mm in 6-Well-Platten überführt und für eine Stunde unter der Reinraumbank getrocknet. Anschließend wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 20 µl Zellkulturmedium von oben mittig auf die Cryogele pipettiert. Danach folgte eine Adhäsionsphase der Zellen für 2 Stunden im Zellkulturinkubator. Nach Adhäsion wurden die Vertiefungen der Platten,

vorsichtig über den Rand, mit je 5 ml Zellkulturmedium aufgefüllt. Dadurch sollte ein Ausspülen der Zellen aus dem Cryogel vermieden werden.

2.2.6.3. Kultivierung von LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen

Die Kultivierung von Zellen in hängenden Tropfen wurde in speziellen Platten (Perfecta 3D, Biomatrix) durchgeführt. In diesen Platten wurden 75 Zellen in einem hängenden Tropfen mit einem Volumen von 40 μ l ausgesät. Nach 4 Tagen wurden die entstandenen Sphäroide in einer 96-Well-Platte mit Rundboden und gering-adhäsiver Oberfläche gespült und bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert.

2.2.7. Tierexperiment

2.2.7.1. Tumorzellinjektion und Messung des Tumorumens

Zur Etablierung von LNCaP-Tumoren wurden LNCaP-Zellen in kaltem Matrigel resuspendiert und 10^6 Zellen /100 μ l unter Verwendung einer 26G-Kanüle (0,45 x 25 mm) in die linke und rechte Flanke athymischer Nacktmäuse injiziert. Das Volumen entstehender LNCaP-Tumore wurde zweimal wöchentlich mit einer elektrischen Schieblehre bestimmt. Dabei wurden Höhe, Breite und Tiefe der Tumore erfasst und die Versuchstiere bei Erreichen eines Tumorumens von circa 1 cm^3 getötet.

2.2.7.2. Töten der Versuchstiere und Entnahme der Tumore

Nach dem Erreichen des gewünschten Tumorumens wurden die Versuchstiere durch eine zervikale Dislokation getötet und die Tumore aus den Flankenbereichen entfernt. Anschließend wurden die Tumore sorgfältig von Geweben, die nicht mit dem Tumor assoziiert waren, gereinigt und anschließend in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Tumorproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8. Behandlung von Zellen in 2D-Zellkultur und PEGda-Cryogelen

2.2.8.1. Behandlung mit 5α -Dihydrotestosteron und Enzalutamid

Um das androgenabhängige Wachstum von Zellen in der konventionellen 2D-Zellkultur mit dem Wachstum in PEGda-Cryogelen vergleichen zu können, wurden Zellen mit 10^{-8} M 5α -Dihydrotestosteron (DHT) und parallel mit 10^{-5} M des Antiandrogens Enzalutamid behandelt. Hierfür wurden Zellen in konventionellen Zellkulturschalen bis zu

einer Konfluenz von 20 % herangezogen und anschließend für 3 Tage in Hungermedium (RPMI 1640, 10 % CCS, 1 % Penizillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin) starviert. Nach der Hungerphase wurden die Zellen täglich mit DHT, Enzalutamid oder EtOH als Kontrolle, über einen Zeitraum von 6 Tagen behandelt, ohne das Zellkulturmedium zu wechseln. Die Behandlung von Zellen in PEGda-Cryogelen erfolgte nach derselben Methode. Der einzige Unterschied bestand in einer vorangegangenen Kultivierung der Zellen in Vollmedium für einen Zeitraum von 5 Tagen, um im Vorfeld der Behandlung eine Bildung von Sphäroiden zu gewährleisten und den Kontakt der Sphäroide zum Zellgerüst sicherzustellen.

2.2.8.2. Behandlung mit Thio-2

Für die Behandlung von LNCaP-Zellen in PEGda-Cryogelen mit Thio-2 wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Cryogel, über einen Zeitraum von 5 Tagen in Vollmedium, bis zur Bildung der Sphäroide kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Vollmedium durch Medium mit Thio-2 (5 μmol) oder Medium mit der entsprechenden Konzentration an DMSO zur Kontrolle ausgetauscht. Diese Medien wurden alle 3 Tage durch frisches Medium mit der identischen Konzentration an Thio-2 oder DMSO ersetzt. Die Kultivierung unter diesen Bedingungen wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen durchgeführt.

2.2.9. Histologie

2.2.9.1. Fixieren, Prozessieren, Einbetten und Schneiden von histologischen Proben

Bewachsene Cryogele aus der Zellkultur wurden für 24 Stunden in Formalin (3,7 % vol. Formaldehyd) fixiert. Die Fixierung fand bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch statt, um das Durchdringen des Cryogels mit Formalin zu garantieren. Anschließend wurden die Cryogele in beschriftete Gewebekassetten überführt und in einem Becherglas mit 70 % EtOH bis zur Gewebeprozessierung aufbewahrt. Sphäroide, generiert in hängenden Tropfen, wurden geerntet und für 2 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend wurden die Sphäroide in Niedrigschmelzpunkt-Agarose aufgenommen und in einem Silikonförmchen zusammengeführt. Die entstandenen Agarose-Blöcke wurden, wie im Falle der fixierten Cryogele, in Gewebekassetten überführt und in 70 % EtOH bis zum Prozessieren der Proben zwischengelagert. Fixierte Proben aus der Zellkultur wurden in einem Gewebeprozessierer (TP1020, Leica) dehydriert und mit Paraffin

durchtränkt. Dabei wurde ein zehnstündiges Programm gewählt, das im Folgenden beschrieben werden soll:

Tabelle 7: Verfahren zum Prozessieren bewachsener Cryogele und Sphäroiden aus der hängenden Tropfen-Methode.

Lösung	Temperatur	Zeit
50 % EtOH	RT	15 min
70 % EtOH	RT	30 min
95 % EtOH	RT	45 min
95 % EtOH	RT	45 min
95 % EtOH	RT	45 min
100 % EtOH	RT	45 min
100 % EtOH	RT	45 min
100 % EtOH	RT	45 min
Xylol	RT	60 min
Xylol	RT	60 min
Paraffin	RT	60 min
Paraffin	RT	60 min

Nachdem die Cryogele und Proben von hängenden Tropfen prozessiert wurden, erfolgte das Einbetten der Proben in Paraffinblöcke an einer Paraffinausgießstation (EG1160, Leica, Wetzlar). Nach dem Einbetten der Proben wurden die Paraffinblöcke gekühlt und überschüssiges Paraffin sauber von den Kanten des Blocks entfernt, um ein gerades Einspannen des Blocks im Mikrotom (RM2155, Leica, Wetzlar) zu garantieren. Die eingebetteten PEGda-Cryogele wurden am Mikrotom in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und die Schnitte vorsichtig in ein warmes Wasserbad überführt. Nach dem Glätten der Schnitte wurden diese auf Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet, bevor sie gefärbt und analysiert wurden.

2.2.9.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für eine Übersichtsfärbung von Zellen kultiviert in PEGda-Cryogelen und hängenden Tropfen, wurde eine Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. In dieser Färbung wurden basophile Strukturen der Zellkerne durch das Hämatoxylin in Blau und acidophile Strukturen des Zytoplasmas in Rot dargestellt. Die Färbung wurde gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt:

Tabelle 8: Übersicht über die HE-Färbung von histologischen Schnitten.

Lösung	Temperatur	Zeit
Xylol	RT	5 min
Xylol	RT	5 min
100 % EtOH	RT	1 min
95 % EtOH	RT	1 min
95 % EtOH	RT	1 min
70 % EtOH	RT	1 min
Hämatoxylin	RT	4 min
Leitungswasser (fließend)	RT	5 min
Eosin	RT	8 min
70 % EtOH	RT	30 s
70 % EtOH	RT	30 s
95 % EtOH	RT	1 min
95 % EtOH	RT	1 min
100 % EtOH	RT	1 min
100 % EtOH	RT	1 min
Xylol	RT	1 min
Xylol	RT	1 min

2.2.9.3. Immunfluoreszenzfärbung

Histologische Schnitte mit einer Dicke von 5 µm bewachsener Cryogele oder Sphäroiden aus der hängenden Tropfen Methode wurden durch Xylol deparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung durchgeführt. Hierfür wurden 9 ml einer Citratsäure-Lösung (0,1 M) mit 41 ml einer Natrium-Citrat-Lösung (0,1 M) gemischt, mit 450 ml H₂O aufgefüllt und über NaOH (10 M) auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung bis zum Siedepunkt erhitzt und die Schnitte für eine Dauer von 30 min darin gekocht. Die Lösung wurde danach abgekühlt und die Schnitte 3mal in PBS gewaschen. Als nächstes wurden unspezifische Bindestellen im Schnitt durch die Inkubation mit Blockierlösung (10 % Ziegen Serum in PBS mit 0,1 % Tween) blockiert. Danach wurden die Schnitte mit den Primärantikörpern gegen den Androgenrezeptor (AR, Dianova, Hamburg) und bzw. oder dem zytoskelettalen Marker α -Tubulin (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte je 3mal für 5 min in PBS gewa-

schen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Schnitte mit einer Glycin-Lösung (43 % in H₂O) eingebettet und unter einem Fluoreszenzmikroskop (DM5500, Leica Wetzlar) oder Konfokalmikroskop (SPE Confocal, Leica, Wetzlar) analysiert.

2.2.10. DNA- und RNA-Methoden

2.2.10.1. Wachstumsanalysen durch DNA-Isolation

Das Wachstum von Zellen, kultiviert in PEGda-Cryogelen, hängenden Tropfen oder der konventionellen 2D-Zellkultur, wurde durch die Isolation und Quantifizierung der DNA zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. Hierfür wurden Proben in Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 % SDS) mit Proteinase K (200 µg/ml) über Nacht bei 52°C in einem Hybridisierungsofen verdaut. Am Folgetag wurde die Proteinase K bei 95°C für 10 min hitzeinaktiviert. Der Proteinase K-Verdau wurde mit Natrium-Acetat-Lösung (5 M, pH 5,2) angesäuert, um die Löslichkeit der DNA zu verbessern. Die Fällung der DNA erfolgte anschließend mittels Isopropanol bei -20°C für 3 Stunden. Nach dem Zentrifugieren bei 13000 UpM für 30 min wurde die pelletierte DNA mit 75 % EtOH gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugieren bei 13000 UpM für 15 min wurde das entstandene DNA-Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris- HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der DNA spektrophotometrisch bestimmt.

2.2.10.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren aus RNA- und DNA-Proben wurde durch die spektrophotometrische Messung an einem Nanodrop ND-1000 bestimmt. Die Messung der Nukleinsäuren wurde in einem Wellenlängenbereich von 260 nm durchgeführt. Mögliche Verunreinigungen der Proben durch Lösungsmittel oder Proteine wurden bei einer Wellenlänge 280 nm detektiert. Der Quotient zwischen OD₂₆₀ und OD₂₈₀ ist repräsentativ für die Reinheit der Nukleinsäuren, wobei RNA-Proben einen Wert von 2,0 und DNA-Proben einen Wert von 1,8 aufweisen sollten.

2.2.10.3. RNA-Isolation

Die RNA aus Zellkulturmaterial wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür wurden, im Falle bewachsener PEGda-Cryogele 2 Zellgerüstträger in 2 ml peqGold RNA pure überführt und mit einem Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde Chloroform (200 µl/ml) hinzugegeben und die Lösung auf einem Vortex gemischt, bis eine milchige Trübung zu sehen war. Nach dem Zentrifugieren bei 12000 UpM für 15 min bei 4°C wurde die obere Phase abgenommen und diese ein zweites Mal mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugieren bei 12000 UpM für 15 min und bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, zu jeder Probe 5 µl Gylkogen (1 mg/ml) pipettiert und unter Zugabe von Isopropanol die RNA bei 4°C für 15 min gefällt. Anschließend wurde die gefällt RNA bei 12000 UpM pelletiert und mit nukleasefreiem EtOH (75 % in DEPC-H₂O) gewaschen, bevor sie danach in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst wurde. Die Konzentration der RNA wurde mit einem Nanodrop ND-1000 spektrophotometrisch quantifiziert.

2.2.10.4. cDNA Synthese und Kontroll-PCR gegen humanes β-Aktin

Für die Synthese von cDNA aus zuvor isolierter RNA wurde die reverse Transkriptase aus dem murinen Maus-Leukämievirus (M-MLV, Promega) verwendet. Um die zuvor isolierte RNA auf die reverse Transkription vorzubereiten, wurden zunächst 2 µg RNA einem DNase-Verdau unterzogen und mit dem Ribonukleaseinhibitor RNAsin versetzt. Der DNase-Verdau wird in folgender Tabelle beschrieben:

Tabelle 9: Übersicht über den DNase-Verdau vor reverser Transkription.

Komponente	Konzentration	Volumen
RNA	2 µg	8 µl
DNase Puffer	5 X	2 µl
DNase	1000 U	2 µl
RNAsin	20-40 U/µl	2 µl
H₂O (nukleasefrei)		6 µl

Der DNase-Verdau wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM) und einer Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert. Danach wurden 2 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (200 ng/µl) bei einer Temperatur

von 70°C über 5 min an die RNA angehängt und die Proben für die eigentliche reverse Transkription (+RT) und für einen Kontrollansatz (-RT) aufgeteilt. Das Pipettierschema für die reverse Transkription ist in **Tabelle 11**. zu finden.

Tabelle 10: Pipettierschema für die reverse Transkription.

Reverse Transkription (+RT)		Kontrollansatz (-RT)	
Komponente (Konzentration)	Volumen	Komponente (Konzentration)	Volumen
RNA	12 µl	RNA	12 µl
M-MLV Puffer (5 X)	4 µl	M-MLV Puffer (5 X)	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl	dNTPs (10 mM)	2 µl
M-MLVT (200 U/µl)	0,4 µl	M-MLVT (200 U/µl)	-
H ₂ O (nukleasefrei)	3,6 µl	H ₂ O (nukleasefrei)	4 µl

Die reverse Transkription wurde in einem FlexCycler (AnalytikJena, Überlingen) nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Tabelle 11: Übersicht über die Inkubationsschritte der reversen Transkription.

Dauer	Temperatur
10 min	25°C
60 min	42°C
10 min	70°C
Unabhängig	4°C

Nach der reversen Transkription wurde die cDNA mit 200 µl nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und durch eine PCR gegen das humane β-Aktin kontrolliert. Dafür wurde der PCR-Ansatz wie folgt pipettiert:

Tabelle 12: Pipettierschema für der Kontroll-PCR gegen humanes β-Aktin

Komponente	Konzentration	Volumen
cDNA		4 µl
dNTPs	10 mM	0,5 µl
Primer forward	10 pmol/µl	1 µl
Primer reverse	10 pmol/µl	1 µl
GoTaq Puffer	5 X	4 µl
GoTaq Polymerase	500 U	0,25 µl
H ₂ O (nukleasefrei)		9,25 µl

Die PCR wurde nach dem folgenden Programm durchgeführt:

Tabelle 13: PCR-Programm zur Amplifikation des humanen β -Aktin

Zeit	Temperatur	Zyklus-Zahl
2 min	95°C	
2 min	95°C	30 x
40 s	55°C	30 x
45 s	72°C	30 x
10 min	72°C	
unabhängig	4°C	

Nach dem Ablauf der PCR wurden die Amplifikate aus dem +RT- und –RT-Ansatz durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.10.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in 1 %igen Agarosegelen durchgeführt. Die Agarose wurde dafür in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA pH 8,0) eingewogen und bis zum vollständigen Lösen in einer Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurden 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid der noch warmen Agaroselösung hinzugegeben und die Lösung anschließend in eine Laufkammer gegossen. Für die gewünschte Taschenanzahl und Taschengröße wurde ein entsprechender Kamm in die noch flüssige Agaroselösung eingesetzt. Nach Polymerisation der Agaroselösung wurde der Kamm entfernt und das Gel in der Laufkammer mit 1X TAE-Puffer überschichtet. Die mit Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Taschen pipettiert und ein DNA-Leitermix beim Auftrennen der Proben als Größenstandard mitgeführt. Das Auftrennen der DNA-Fragmente wurde bei 120 V durchgeführt. Die DNA-Banden im Gel wurden anschließend durch UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.10.6. Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Analyse der cDNA-Menge von Genen wurde durch die Verwendung der quantitativen Echtzeit-PCR (auch qPCR) realisiert. Die PCR-Ansätze bestanden dabei aus 10 μl SYBR Green qPCR-Mix (Promega), 4 μl cDNA, 1 μl des entsprechenden Forward Primers, 1 μl des zugehörigen Reverse Primers und 4 μl nukleasefreiem H_2O . Bei der anschließenden PCR-Reaktion wurde die initiale Denaturierung bei 95°

für 15 min durchgeführt. Darauf folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C und 30 s bei 60°C, um die Hybridisierung und Amplifikation zu gewährleisten. Die für die Primer-Paare charakteristische Schmelzkurve wurde anschließend durch das Erhitzen auf 95°C, gefolgt von einem erneuten Abkühlen auf 60°C, generiert. Dadurch war es möglich, die Spezifität der Primer zu bestätigen und ein Vorhandensein von Primer-Dimeren auszuschließen. Die Quantifizierung der cDNA-Menge spezifischer Gene erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode bei der die Expressionsstärke des Gens gegen die Expressionsstärke eines Haushaltsgens relativiert wurde, dessen Expression von sämtlichen Behandlung unbeeinflusst ist. Bei dem verwendeten Haushaltsgen handelte es sich um die kodierende Sequenz für das humane Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (hHPRT).

2.2.11. Proteinmethoden

2.2.11.1. Expressionsanalyse transduzierter LNCaP-Zellen

Für die Analyse der BAG1L-Expression in LNCaP-Zellen wurden 5×10^5 Zellen in 100 μl 1X Laemmli-Probenpuffer (5 % SDS, 25 % Glycerin, 150 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02 % Bromphenolblau) resuspendiert und homogenisiert. Anschließend wurden die Proben kurzfristig bei -20°C gelagert oder direkt 20 μl der Probe, was dem Lysat von 10^5 Zellen entspricht, in die Probenaschen eines SDS-Gels geladen, elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western Blot analysiert.

2.2.11.2. Auftrennen von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese

Durch die SDS-Gelelektrophorese ist es möglich, Proteine anhand ihrer Größe aufzutrennen. Zur Vorbereitung wurden Proteinproben mit 1/10 des Volumen 1M Dithiotreitol (DTT) vermischt, bei 95°C für 5 min aufgekocht und bei 500 UpM für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Für die Analyse BAG1L-transduzierter LNCaP-Zellen wurde ein 10 %iges Trenngel (10 % einer 30 %igen Acrylamidlösung, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) verwendet. Das Sammelgel bestand aus 5 % einer 30 %igen Acrylamidlösung, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,1 % TEMED. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinmarker als Größenstandard mitgeführt. Das Auftrennen der Proteine wurde in einem Elektrophoresepuffer (20 mM Tris-Base, 192 mM Glycerin, 0,1 % SDS) durchgeführt. Während der

Elektrophorese wurden die Proteine bis zum Trenngel bei 50 V gesammelt und anschließend bei 100 V aufgetrennt.

2.2.11.3. Western Blot

Zur Durchführung des Western Blots wurden Gele der SDS-Gelelektrophorese in Transferpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 10 % Methanol) überführt, eine geeignet große PVDF-Membran durch die Inkubation in Methanol aktiviert und im selben Transferpuffer rehydriert. Anschließend wurden in einer Blot-Kassette ein Schwamm und drei Lagen Whatman-Papier, die zuvor in Transferpuffer getränkt wurden, platziert. Danach wurde die PVDF-Membran und das SDS-Gel auf die Whatman-Papiere aufgelegt. Das Gel wurde dann, unter Vermeidung von Luftblasen, mit einer zweiten Lage aus 3 Whatman-Papieren und einem weiteren Schwamm überschichtet. Anschließend wurde die Transfer-Kassette verschlossen und in eine Blotkammer überführt, die mit Transferpuffer befüllt war. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4°C mit einer angelegten Spannung von 35 V.

2.2.11.4. Immunoblot

Nach dem Proteintransfer durch den Western Blot wurden unspezifische Bindestellen auf der PVDF-Membran durch eine Inkubation in Blockpuffer (5 % Milchpulver, 5 % FCS, 0,05 % Tween in TBS) blockiert. Anschließend folgte die Kopplung der Primärantikörper für die Flag-Markierung des BAG1L-Expressionsvektors und Vinculin als Ladekontrolle. Dafür wurden die Antikörper in definierter Konzentration in Blockpuffer gelöst (**Tabelle 4**) und die PVDF-Membranen für eine Stunde mit den Antikörperlösungen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3mal für je 5 min in Blockpuffer gespült und danach für eine Stunde mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (**Tabelle 5**), der ebenfalls in Blockpuffer gelöst wurde, inkubiert. Die Membranen wurden dann 2mal in 1X TBS-Puffer und 1mal in TBST-Puffer (0,05 % Tween in 1X TBS) gespült. Die Detektion der Proteine erfolgte durch eine verstärkte Chemilumineszenzreaktion (enhanced chemiluminescence, ECL). Dafür wurden die Membranen in einer 1:1 Mischung der ECL-Reaktionslösungen (Thermo Scientific) inkubiert und die Proteinbanden anhand eines Röntgenfilms (Super RX, Fujifilm) in einer Filmkassette belichtet und entwickelt.

2.2.12. Statistik

Alle in den Diagrammen dargestellten Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler, der aus der n-ten Wurzel der Standardabweichung berechnet wurde. Dabei entsprach „n“ der Probenanzahl. Lageunterschiede zwischen den einzelnen Probengruppen wurden mit dem zweiseitigen Student'schen T-Test ermittelt und auf Signifikanz überprüft.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung von Cryogelen für die Prostatakrebsforschung

3.1.1. Synthese von Cryogelen durch Cryogelation

Für die Synthese von Cryogelen wurde das synthetische Polymer Polyethylenglykoldiacrylat (PEGda) verwendet, das sich auf Grund seiner Löslichkeit in wässrigen Lösungsmitteln und seiner nicht-toxischen und nicht-immunogenen Eigenschaften für die Herstellung von 3D-Zellkulturmodellen eignet (Buxton et al., 2007; Yang et al., 2005). Während der Synthese von Cryogelen wurden PEGda-Monomere mit einem Molekulargewicht von 700 Da durch das Verfahren der radikalischen Polymerisation über Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) miteinander vernetzt. Die Polymerisation der PEGda-Monomere wurde in sterilen Einwegspritzen bei Raumtemperatur (RT) und bei -20°C durchgeführt. Nach Ablauf der Polymerisationsreaktion wurden die synthetisierten Zellgerüste durch die Rasterelektronenmikroskopie (REM) analysiert (**Abbildung 3A-D**). Während dieser Analyse wurde festgestellt, dass sich die Variationen der Temperatur entscheidend auf die Struktur der synthetisierten PEGda-Polymere auswirkten. Die Vernetzung der PEGda700-Monomere bei RT führte zur Bildung homogen strukturierter Hydrogele. Die Oberfläche dieser Hydrogele war von gleichmäßiger und robuster Form (**Abbildung 3A**) und wies bei stärkerer Vergrößerung wenige und kleine Poren auf (**Abbildung 3B**). Im Rahmen der Cryogelation, bei der die Polymerisation der PEGda-Monomere bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt stattfand, wurden die Monomere in einer nicht gefrierenden Mikrophase, bei gleichzeitigem Gefrieren des Lösungsmittels, vernetzt. Das Resultat dieses Prozesses waren Cryogele mit schwammartiger Struktur und poröser Oberfläche (**Abbildung 3C**) die bei stärkerer Vergrößerung, unterschiedlich große Poren erkennen ließ (**Abbildung 3D**).

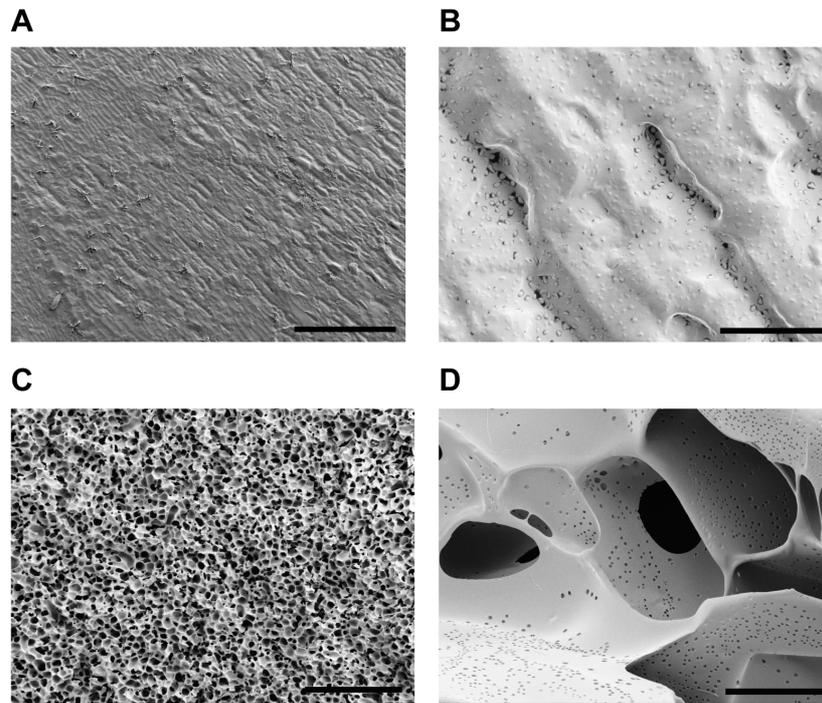


Abbildung 3. Polymerisation von PEGda bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. Die Oberflächenstruktur von Hydrogelen und Cryogelen wurde durch REM analysiert. **A)** Aufnahme der Oberfläche eines Hydrogels aus PEGda700 (Maßstab 500 µm). **B)** Detailvergrößerung der Oberfläche desselben Hydrogels aus A (Maßstab 50 µm). **C)** Poröse Struktur eines Cryogels aus PEGda700 (Maßstab 500 µm). **D)** Porengestalt des Cryogels aus C in einer Detailvergrößerung (Maßstab 50 µm).

3.1.2. Poreneigenschaften von Cryogelen und Hydrogelen aus PEGda

Um den Einfluss der Temperatur auf die Struktur der durch die radikalische Polymerisation synthetisierten Polymere aufklären zu können, wurden deren Poreneigenschaften durch das Verfahren der Quecksilberporosimetrie aufgeklärt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung quantifizierbarer Werte poröser Materialien durch das Einschleusen von Quecksilber unter linearem Druckaufbau in einen Feststoff. Während der Quecksilberporosimetrie wurden die zuvor getrockneten Polymervarianten mit einem Benetzungswinkel für Quecksilber von 130° und einer Oberflächenspannung von $0,485 \text{ (Newton) N m}^{-1}$ analysiert. Die aus der Messung resultierenden Intrusionskurven wurden dazu genutzt, die Porosität und das Porenvolumen von Cryogelen aus PEGda700 mit den korrespondierenden Werten von PEGda700-Hydrogelen zu vergleichen. Die Auswertung der Daten aus der Quecksilberporosimetrie zeigte, dass Cryogele im Vergleich zu Hydrogelen eine höhere Porosität von $74 \pm 2,9 \%$ zu $14,5 \pm 1,7 \%$ (**Abbildung 4A**) und ein höheres Porenvolumen von $81,1 \pm 7,8 \text{ mm}^3 / \text{Probe}$

verglichen zu $5,2 \pm 0,9 \text{ mm}^3 / \text{Probe}$ (**Abbildung 4B**) besitzen. Diese Eigenschaften spiegeln sich ebenfalls in der Bestimmung des Schwellpotentials von Cryogelen und Hydrogelen wider, in der die unterschiedlichen Polymere in PBS inkubiert und die Zunahme ihrer Masse gravimetrisch bestimmt wurde. Während einer Inkubationsphase von 2 min schollen zuvor getrocknete Cryogele um das 9-fache ihrer Masse an, wohingegen Hydrogele ihre Masse verdoppelten (**Abbildung 4C**). Auf Grund der analysierten Poreneigenschaften von Cryogelen wurde die Verwendung von PEGda-Hydrogelen für die Kultur von Prostatakrebszellen ausgeschlossen und nicht weiter in Betracht gezogen.

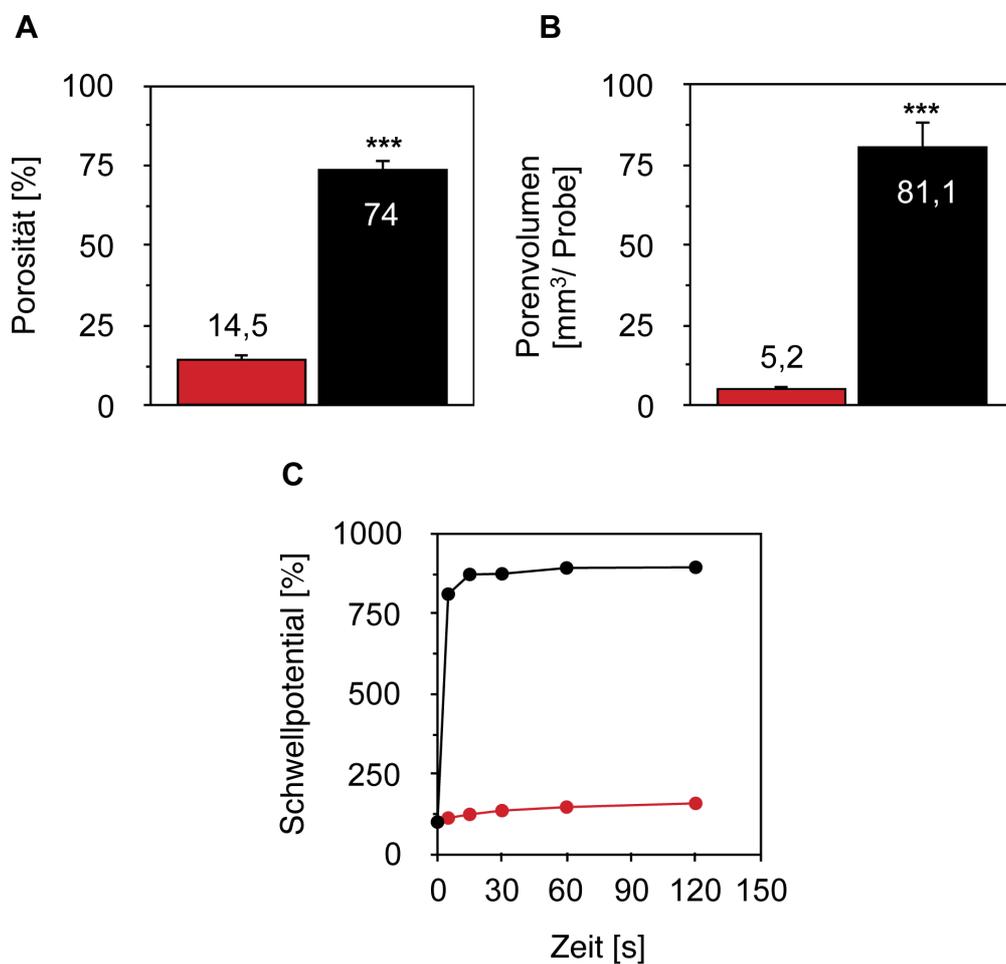


Abbildung 4. Vergleich der Porenanalyse von Hydrogelen und Cryogelen. Nach der Synthese von Hydrogelen und Cryogelen aus PEGda700 wurden die Porosität und das Porenvolumen der Proben durch Quecksilberporosimetrie bestimmt. Die Balkendiagramme in **A)** zeigen den Vergleich der Porosität und in **B)** den Vergleich des Porenvolumens zwischen Hydrogelen (rot) und Cryogelen (schwarz) (Für beide Analysen gilt $n=6$; $p^{***} \leq 0,001$, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler). Das Kurvendiagramm in **C)** zeigt den Vergleich des Schwellpotentials von Hydrogelen und Cryogelen. ($n=3$, die Standardfehler sind gering und daher nicht erkennbar; die Farbwahl entspricht den vorangegangenen Teilabbildungen).

3.1.3. Elastizität von PEGda Cryogelen

Die mechanischen Eigenschaften der Tumormikroumgebung sind von entscheidender Bedeutung für das Wachstum von Tumorzellen und es ist bekannt, dass maligne Gewebe und ihr Stroma im Allgemeinen steifer sind, als ihre benignen Formen (Krouskop et al., 1998). Um feststellen zu können, welche Steifigkeit am besten das Wachstum von Prostatakrebszellen unterstützen könnte, wurden PEGda-Cryogele mit definierter Elastizität synthetisiert. Hierfür wurden PEGda-Monomere mit unterschiedlichen Molekulargewichten zu Cryogelen polymerisiert. Die Elastizität der produzierten Cryogele wurde, im geschwollenen Zustand der Proben, an einer Zug-Prüfmaschine bestimmt. Während der Messungen wurden die hergestellten Cryogele mit einem Druck von 1 N bei einem linearen Druckaufbau von 1 mm min^{-1} belastet. Die aus dieser Messung resultierenden Spannungs-Dehnungsdiagramme von PEGda-Cryogelen aus PEGda-Monomeren mit 575, 700, 3400 und 6000 Da (**Abbildung 5A**) wurden dazu verwendet, die Elastizität der Cryogele aus dem linearen Bereich der Kurven nach der Hooke'schen Regel zu bestimmen (**Abbildung 5B**). Verglichen zu Cryogelen aus PEGda3400 und PEGda6000, die eine niedrige Elastizität von $13,1 \pm 0,9 \text{ kPa}$ und $12,2 \pm 1,2 \text{ kPa}$ besaßen, erreichten PEGda-Cryogele aus kurzkettigen PEGda-Monomeren deutlich höhere Elastizitäten. Diese lagen für Cryogele aus PEGda700 bei $73,1 \pm 5,8 \text{ kPa}$ und im Falle von PEGda575-Cryogelen bei $75,6 \pm 2,6 \text{ kPa}$ (**Abbildung 5C**). Die Elastizität von Cryogelen aus PEGda575 und PEGda700 war, im Vergleich zu den anderen Cryogelvarianten, am ehesten mit der Steifigkeit maligner Prostatagewebe zu vergleichen. Diese wurde in klinischen Studien auf ein Mittel von 88 kPa bestimmt (Boehm et al., 2015). Alle folgenden Studien wurden deshalb mit PEGda575-Cryogelen durchgeführt.

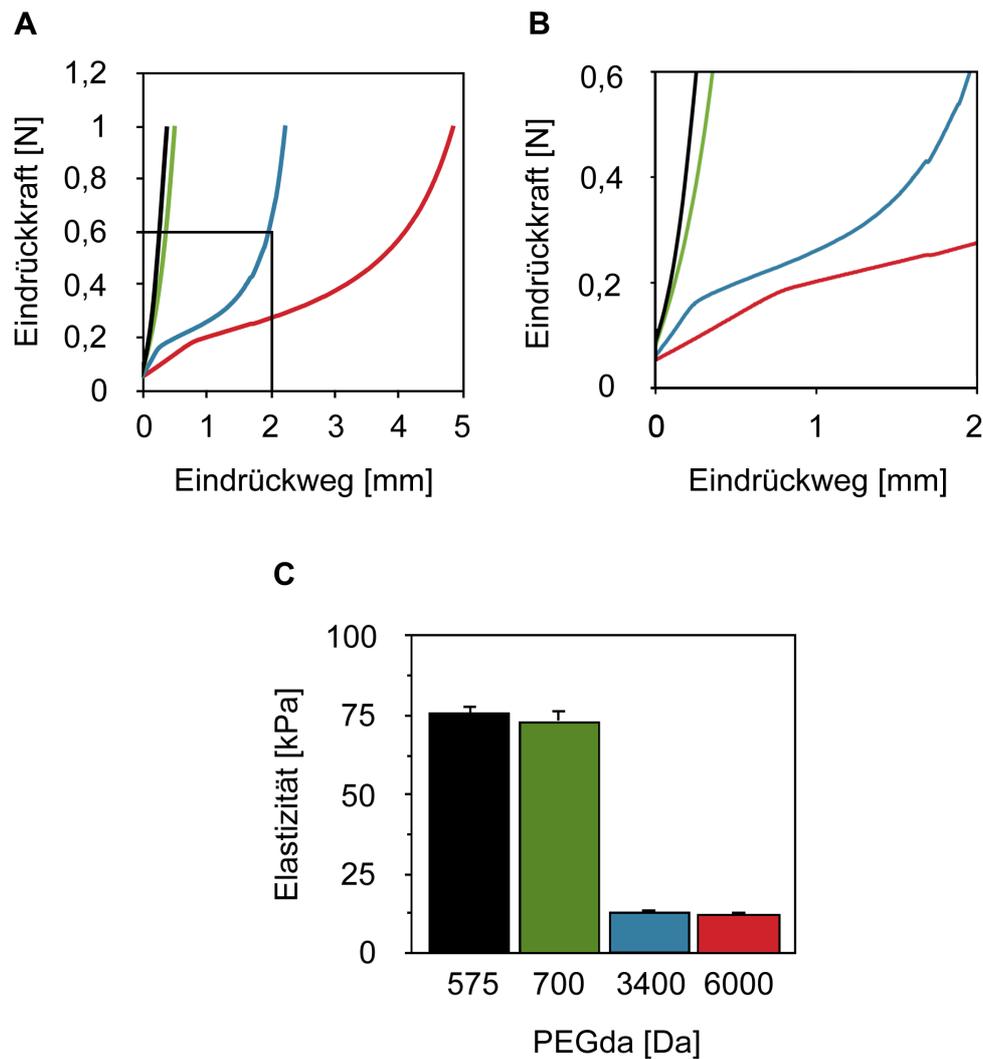


Abbildung 5. Beurteilung der Elastizität von Cryogelen aus unterschiedlichen PEGda-Monomeren. Die Elastizität von Cryogelen aus PEGda-Monomeren mit 575 (schwarz), 700 (grün), 3400 (blau) und 6000 (rot) Da, wurde an einer Zug-Prüfmaschine bestimmt. **A)** zeigt den Kurvenverlauf während der Messung der Elastizität von unterschiedlichen PEGda-Cryogelen in einem Spannungs-Dehnungsdiagramm. In **B)** wurde der Bereich aus dem Spannungs-Dehnungsdiagramm vergrößert, in dem die Elastizität der Cryogelvarianten nach der Hooke'schen Regel errechnet wurde. Das Balkendiagramm in **C)** zeigt die Elastizität der unterschiedlichen Cryogelvarianten. (PEGda575 und PEGda700 mit $n=20$, PEGda3400 und PEGda6000 mit $n=10$, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler).

3.1.4. Architektur von PEGda575-Cryogelen

Um die Struktur von PEGda575-Cryogelen zu studieren, wie sie unter Zellkulturbedingungen wiederzufinden ist, wurden Cryogelproben über unterschiedliche Analyseverfahren untersucht, die es ermöglichen, ihre Architektur im nassen Zustand feststellen zu können. Durch das Verfahren der Synchrotron-Mikrotomographie war es möglich, serielle Aufnahmen des PEGda575-Cryogels im geschwollenem Zustand der Probe zu erstellen. Das Zusammenfügen dieser Aufnahmen erlaubte die Rekonstruktion und Visualisierung des interkonnektiven Porennetzwerkes, von dem PEGda575-Cryogele durchzogen sind (**Abbildung 6A**). Die robuste Architektur der Poren wurde durch Umgebungsrastrerelektronenmikroskopie (environmental scanning electron microscopy, ESEM) aufgeklärt. Durch diese Methode war es möglich, die Porenstruktur der PEGda575-Cryogele im nassen Zustand zu erfassen, was ihrer Form unter Zellkulturbedingungen entspricht (**Abbildung 6B**). Die Größe der Poren wurde anhand rehydrierter 5 μm dicker histologischer Schnitte von zuvor in Paraffin eingebetteten PEGda575-Cryogelen bestimmt (**Abbildung 6C**). Nach dem Anfertigen lichtmikroskopischer Aufnahmen dieser Schnitte wurden die kleinen und großen Halbachsen der Poren ausgemessen und ihre Ellipsenumfänge durch die Ramanujan-Gleichung errechnet. Die statistische Auswertung der Porenumfänge zeigte, dass der Großteil der Poren von PEGda575-Cryogelen einen Ellipsenumfang von 100-200 μm hat (**Abbildung 6D**). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse über die Architektur von PEGda575-Cryogelen, dass es sich bei diesem System um einen robusten und porösen Zellgerüstträger mit interkonnektivem Porennetzwerk handelt.

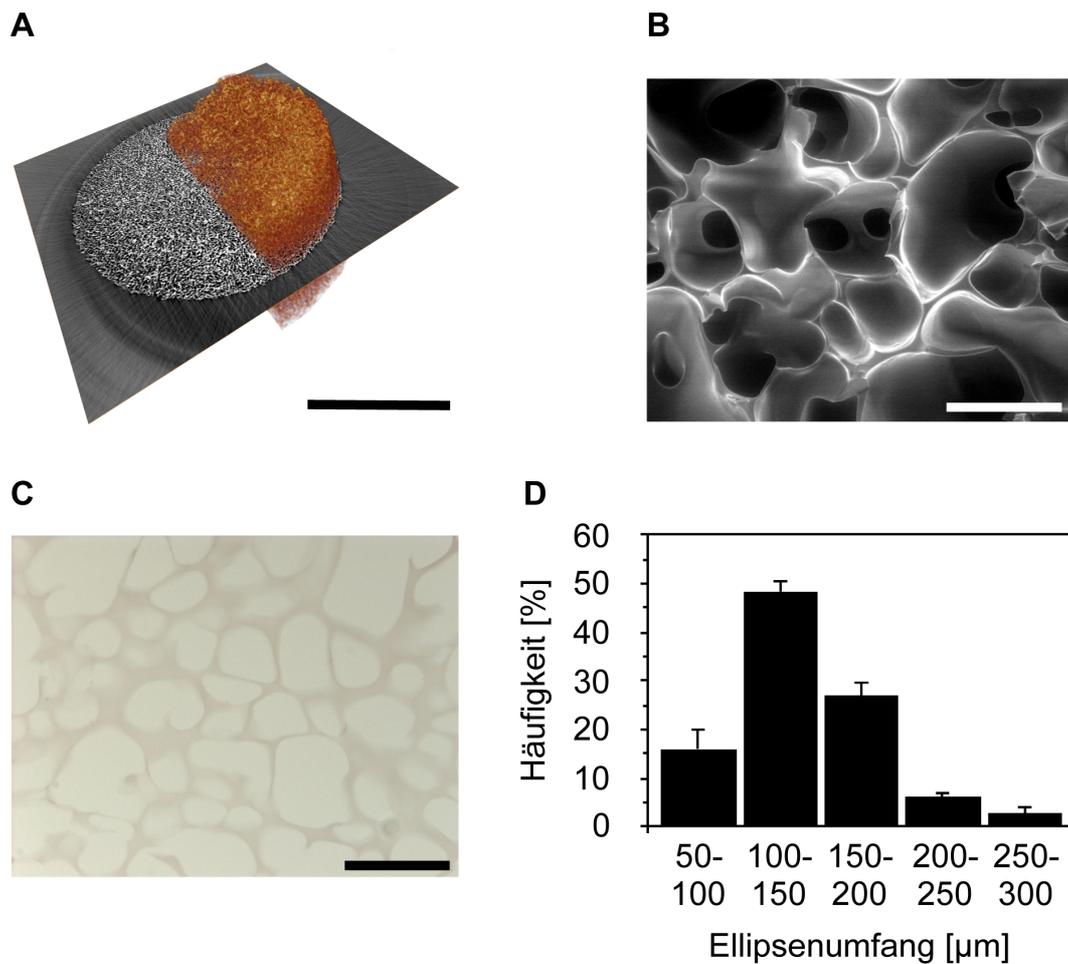


Abbildung 6. Aufklärung der Architektur von PEGda575-Cryogelen. Für die Begutachtung der Architektur von PEGda575-Cryogelen wurden ausnahmslos Proben im geschwollenem Zustand analysiert. **A)** zeigt die 3D-Rekonstruktion des Porennetzwerkes (rot) in Kombination mit einem Querschnitt (grau) durch das Cryogel, nach durchgeführter Synchrotron-Mikrotomographie (Maßstab 2,5 mm). **B)** Aufnahme der Poren eines PEGda575-Cryogels durch ESEM (Maßstab 100 μm). **C)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Poren in einem histologischen Schnitt mit einer Dicke von 5 μm durch das PEGda575-Cryogelgerüst (Maßstab 100 μm). **D)** Auswertung der Ellipsenumfänge von PEGda575-Cryogelporen in histologischen Präparaten ($n=300$; Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler).

3.1.5. Reproduzierbarkeit von PEGda575-Cryogelsynthesen

Bevor PEGda575-Cryogele zur Kultur von Prostatakrebszellen eingesetzt werden konnten, musste im Vorfeld der ersten biologischen Experimente abgesichert werden, dass die Produktion der Cryogele reproduzierbar ist und sich ihre Eigenschaften zwischen den Synthesen nicht maßgeblich voneinander unterscheiden. Um die Herstellung von PEGda575-Cryogelen mit einer einheitlichen Dicke zu ermöglichen, wurde ein spezielles Schneidegerät entwickelt. Durch das Aneinanderreihen rostfreier Stahlklingen mit einem Abstand von 3 mm in einem Stahlgehäuse konnten Cryogelzylinder, die zuvor in Spritzen mit einem Durchmesser von 1 cm produziert wurden, in gleichmäßige Proben zerteilt werden (**Abbildung 7A**). Diese Proben wurden anschließend bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften wie Elastizität, Porosität und Porenvolumen überprüft. Dafür wurden PEGda575-Cryogele erneut an der Zug-Prüfmaschine und durch die Quecksilberporosimetrie analysiert. Die Boxplot-Analyse der Daten aus den Elastizitätsbestimmungen zweier unabhängiger PEGda575-Cryogelsynthesen zeigt, dass PEGda575-Cryogele im Mittel eine Elastizität von 75,6 kPa besitzen. Dabei waren 50 % der Daten zwischen dem unteren Quantil (Q1) mit 65,5 kPa und dem oberen Quantil (Q3) mit 89,8 kPa lokalisiert (**Abbildung 7B**). Die Boxplot-Analysen zu den zugehörigen Daten aus der Quecksilberporosimetrie zeigten, dass PEGda575-Cryogele eine durchschnittliche Porosität von 79,2 % haben. In diesem Falle waren 50 % der Daten im Bereich von 74,9 % für Q1 bis 82,7 % für Q3 verteilt (**Abbildung 7C**). Im Falle der Bestimmung des Porenvolumens von PEGda575-Cryogelen wurde im Mittel ein Wert von 75 mm³ / Probe bestimmt. Die Verteilung der Daten lag dabei zwischen Q1 mit 67,1 mm³ / Probe und Q3 mit 73,1 mm³ / Probe (**Abbildung 7D**). Diese Resultate zeigen, dass PEGda575-Cryogele reproduzierbar herzustellen sind und damit der Einsatz von Cryogelen mit vergleichbaren und reproduzierbaren physikalischen Eigenschaften in den folgenden biologischen Experimenten gewährleistet werden kann.

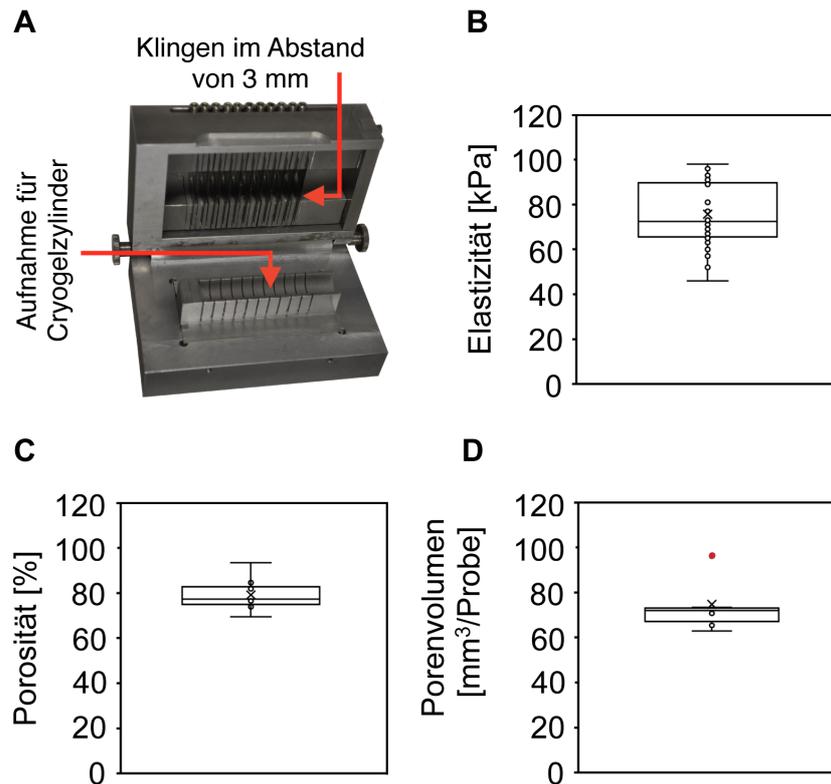


Abbildung 7. Analyse der Reproduzierbarkeit von PEGda575-Cryogelsynthesen. Proben unabhängiger Synthesen von PEGda575-Cryogelen wurden bezüglich Elastizität, Porosität und Porenvolumen auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft. **A)** zeigt einen Cryogelschneider um Cryogelzylinder nach ihrer Synthese in reproduzierbare Scheiben von je 3 mm Dicke zu schneiden. **B)** zeigt den Boxplot für die Verteilung der Elastizitätswerte von PEGda575-Cryogelen (obere Antenne und untere Antenne repräsentieren den maximalen und minimalen Wert der Analyse, die Linie innerhalb der Box zeigt den Median und X den Mittelwert der Stichprobe an, n=20). **C)** und **D)** zeigen die Boxplots der zugehörigen Porosimetrieanalyse. In C) ist die Verteilung der Porositäts-Werte und in D) die Werte der Porenvolumina je Probe dargestellt. (obere Antennen und untere Antennen repräsentieren in beiden Boxplots den maximalen und minimalen Wert der Analysen, die Linie innerhalb der Box zeigt den Median und X zeigt den jeweiligen Mittelwert der Stichproben. Der statistische Ausreißer in der Analyse des Porenvolumens ist rot gekennzeichnet. Für beide Bestimmungen gilt n=10).

3.2. Anwendung von PEGda575-Cryogelen in der Zellkultur

3.2.1. Wachstum von Prostatakrebszellen

Für alle biologischen Studien mit PEGda575-Cryogelen wurde die Zelllinie LNCaP verwendet, die ursprünglich aus den Lymphknotenmetastasen eines Prostatakarzinoms isoliert wurde (Horoszewicz et al., 1980). Zur Aufklärung des Wachstums wurden $2,5 \times 10^5$ LNCaP-Zellen in zuvor getrockneten und 3 mm dicken PEGda575-Cryogelen ausgesät und über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert. Während der Kultur der Zellen wurden sich bildende dreidimensionale Zellkomplexe, sogenannte Sphäroide, durch eine Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung von 5 μm dicken histologischen Schnitten zuvor fixierter und dehydrierter PEGda575-Cryogele gefärbt und quantifiziert. Vertikale Schnitte der bewachsenen Cryogele zeigten eine Graduierung von Sphäroiden innerhalb des Zellgerüstträgers, wobei mehr Sphäroide im oberen Bereich des Cryogels zu finden waren als in den tieferen Regionen des Systems. Zusätzlich waren im Vergleich zu 7 Tagen in Kultur, nach 21 Tagen mehr Sphäroide im PEGda575-Cryogel zu erkennen, wobei das Zellgerüst noch immer eine große Anzahl von Poren aufwies, die nicht durch Sphäroide besetzt gewesen sind (**Abbildung 8A**). Die Quantifizierung der Sphäroide nach 7, 14 und 21 Tagen in Kultur zeigte einen deutlichen Anstieg in ihrer Anzahl (**Abbildung 8B**). Das Ergebnis dieser Analyse weist darauf hin, dass PEGda575-Cryogele eine ausreichende Kapazität besitzen, um längere Kultivierungsperioden als 21 Tage gewährleisten zu können.

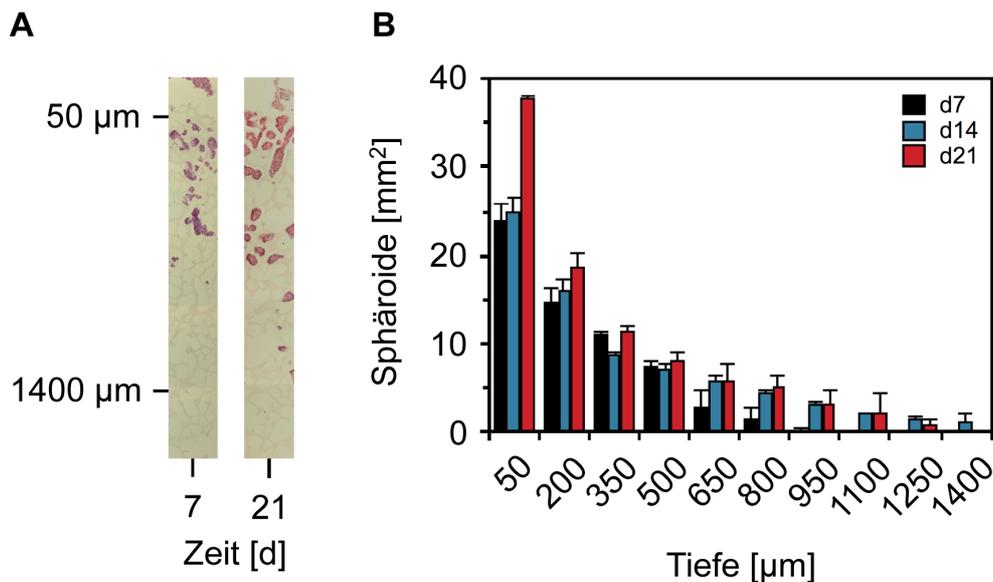


Abbildung 8. Auswertung der Verteilung von LNCaP-Sphäroiden in PEGda575-Cryogelen nach 21 Tagen in Kultur. Mit LNCaP-Zellen bewachsene Cryogele wurden nach einer Kultivierung von 7, 14 und 21 Tagen in Formalin fixiert, dehydriert und nach dem Einbetten in Paraffin in histologische Präparate mit einer Dicke von 5 μm geschnitten. Die Verteilung entstandener Sphäroide wurde in lichtmikroskopischen Aufnahmen der Proben, nach Durchführung einer H&E-Übersichtsfärbung, ausgewertet. **A)** zeigt vertikale histologische Schnitte von PEGda575-Cryogelen nach 7 und 21 Tagen Zellkultur. Gezeigt wird der Bereich von der Oberseite des Cryogels von 50 μm bis zu einer bewachsenen Cryogeltiefe von 1400 μm nach 21 Tagen in Kultur. Das Balkendiagramm in **B)** zeigt die Quantifizierung entstandener LNCaP-Sphäroide nach 7 (schwarz), 14 (blau) und 21 Tagen (rot) aus seriellen und horizontalen Schnitten bewachsener Cryogele (n=100, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler).

Eine detaillierte Untersuchung der LNCaP-Zellen innerhalb der PEGda575-Cryogele wurde mittels REM durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass sich LNCaP-Zellen zu kompakten Sphäroiden zusammenlagerten, die unterschiedlichste Kontaktformen zu den Porenwänden des Cryogels ausbilden und, ohne vorangegangene Funktionalisierung des Systems, an die Porenwände adhären (**Abbildung 9A-D**).

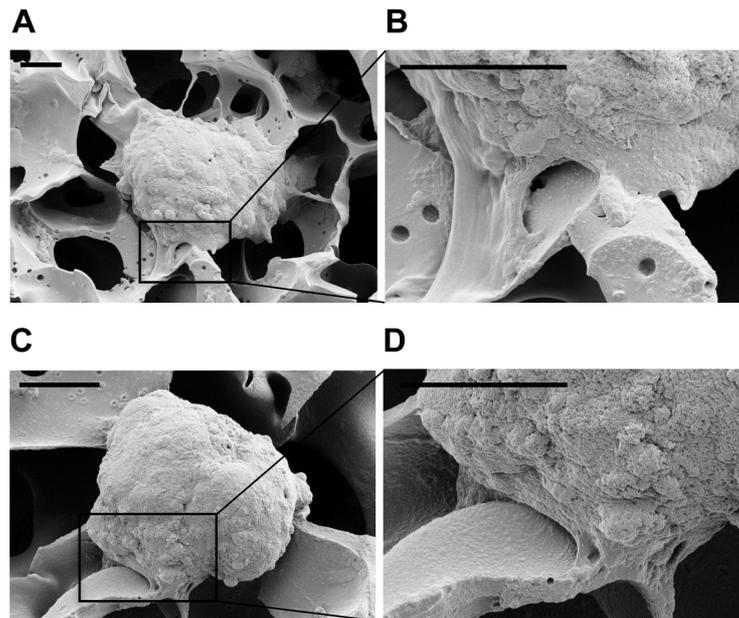


Abbildung 9. Aufklärung der Interaktion von Sphäroiden aus LNCaP-Zellen mit den Porenwänden des PEGda575-Cryogels. LNCaP-Zellen wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen in Cryogelen kultiviert, anschließend fixiert und unter Vakuum vollständig getrocknet. Die Beurteilung der Zell-Matrix-Kontakte erfolgte mittels REM. **A)** und **C)** zeigen Interaktionen der LNCaP-Sphäroide mit den Porenwänden des PEGda575-Cryogels (Maßstab 2 µm). **B)** und **D)** zeigen Abbildungen derselben Zell-Matrix-Kontakte aus A) und C) mit höherer Auflösung (Maßstab 2 µm).

Um feststellen zu können ob die Kultur von LNCaP-Zellen innerhalb der PEGda575-Cryogele einen Einfluss auf deren physikalische und mechanische Eigenschaften hat, wurden bewachsene Cryogele nach 7, 14 und 21 Tagen in Kultur mit Formalin fixiert, unter Vakuum vollständig getrocknet und anschließend bezüglich ihrer Porosität durch die Quecksilberporosimetrie analysiert. Zusätzlich wurde zu den gleichen Zeitpunkten die Elastizität bewachsener Cryogele, ohne vorangegangene Fixierung, an der Zugprüfmaschine ausgewertet. Die statistische Auswertung der physikalischen Charakterisierung zeigte, dass weder die Elastizität (**Abbildung 10A**) noch die Porosität (**Abbildung 10B**) während einer Kulturdauer von 21 Tagen, im Vergleich zu leeren PEGda575-Cryogelen, beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass PEGda575-Cryogele eine hohe Langzeitstabilität besitzen und während der Kultur von Prostatakrebszellen ihre physikalischen und mechanischen Eigenschaften beibehalten.

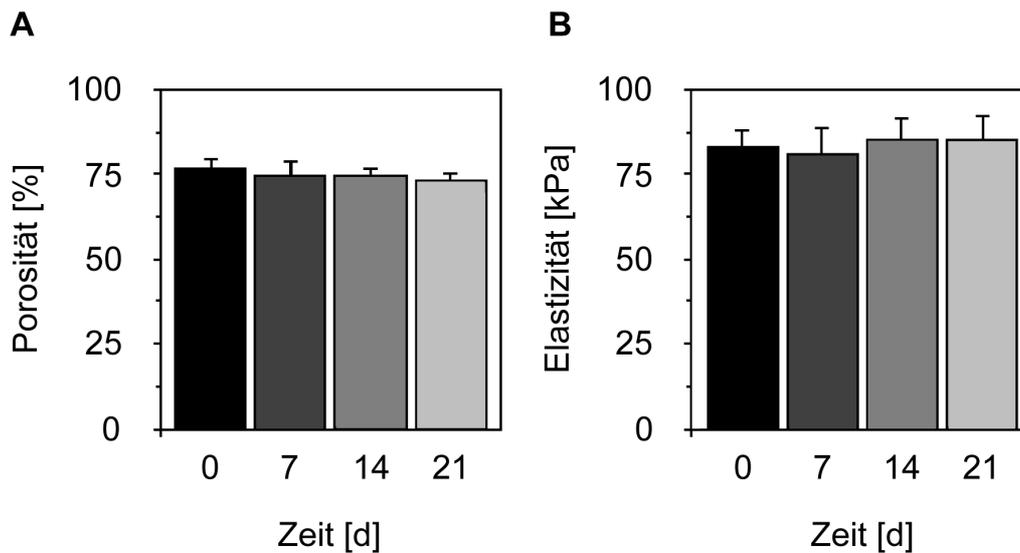


Abbildung 10. Überprüfung physikalischer und mechanischer Eigenschaften von PEGda575-Cryogelen während der Zellkultur. Mit LNCaP-Zellen bewachsene Cryogele wurden nach 7, 14 und 21 Tagen aus der Zellkultur entfernt und bezüglich ihrer Porosität und Elastizität analysiert. **A)** Balkendiagramm zur Auswertung der Porosität bewachsener PEGda575-Cryogele (n=3-5, Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler). **B)** Balkendiagramm zur Auswertung der Elastizität bewachsener PEGda575-Cryogele (n=5, Fehlerbalken repräsentiert den Standardfehler).

3.2.2. Wachstum von LNCaP-Zellen in Cryogelen und hängenden Tropfen

Eine der bekanntesten Methoden zur Erzeugung dreidimensionaler Zellkomplexe ist die sogenannte hängende Tropfen-Methode. Dieses flüssigkeitsbasierte System erlaubt die Generierung größeneinheitlicher Sphäroide mit je einem Sphäroid in den einzelnen Vertiefungen von Hochdurchsatzformaten und wird daher bevorzugt in automatisierbaren Screeningverfahren eingesetzt (Drewitz et al., 2011; Kelm und Fussenegger, 2004). Um feststellen zu können, in wieweit sich das Wachstum von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen im Vergleich zu diesem 3D-Zellkulturmodell unterscheidet, wurde die Wachstumsrate der LNCaP-Zellen im Cryogel mit der proliferativen Aktivität derselben Zellen in der hängenden Tropfen-Kultur verglichen. Zur Bildung von Sphäroiden in hängenden Tropfen wurden Perfecta3D-Platten von Sigma verwendet. Nach Erzeugung der Sphäroide, aus ursprünglich 75 LNCaP-Zellen pro Tropfen, wurden diese in 96-Well-Platten mit gering-adhäsiver Oberfläche überführt und, wie in der Kultur von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen, für 21 Tage bei regulärem Mediumwechsel kultiviert. Das Wachstum der Zellen in beiden Kultursystemen wurde durch die Isolation und Quantifizierung der DNA während der Kultivierung

analysiert. Die Auswertung der Wachstumskinetik in beiden Kulturmodellen zeigte, dass LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen für einen Zeitraum von 21 Tagen ein lineares Wachstum beibehielten, wohingegen das Wachstum von LNCaP-Zellen in der hängenden Tropfen-Methode nur für die ersten 6 Tage linear gewesen ist und in einer Plateauphase mit reduzierter proliferativer Aktivität der Zellen endete (**Abbildung 11**).

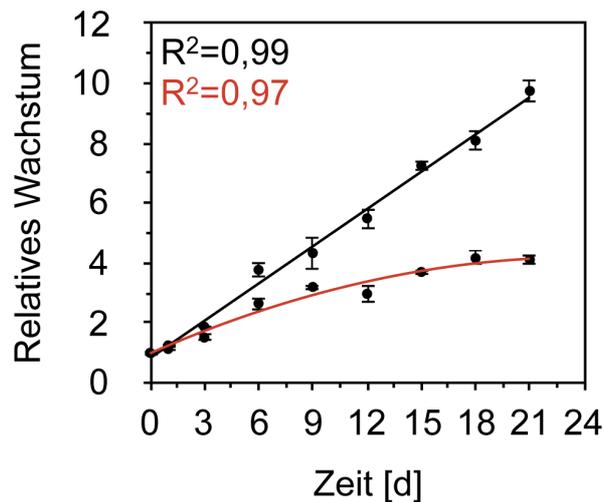


Abbildung 11. Analyse des Wachstums von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen und hängenden Tropfen. Das Wachstum von LNCaP-Zellen in Cryogelen und hängenden Tropfen wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen durch die Quantifizierung der DNA analysiert. Das Punktediagramm zeigt die Wachstumskinetiken von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen (schwarze polynomische Trendlinie mit Korrelationskoeffizienten R^2 , $n=3$, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler) und LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen (rote polynomische Trendlinie mit Korrelationskoeffizienten R^2 und $n=6$, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler).

Als nächstes wurde die Morphologie von LNCaP-Sphäroiden in PEGda575-Cryogelen und den hängenden Tropfen untereinander verglichen. Hierfür wurden LNCaP-Zellen in beiden Systemen nach 21 Tagen in Kultur fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 μm dicke histologische Präparate der beiden unterschiedlichen Zellkulturproben angefertigt und im Rahmen einer Immunfluoreszenzfärbung (IF) gegen den zytoskelettalen Marker α -Tubulin gefärbt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Die Auswertung der IF durch die Konfokalmikroskopie zeigte, dass LNCaP-Sphäroide in PEGda575-Cryogelen nach 21 Tagen von kompakter Struktur sind und in ihrem Durchmesser durch das Zellgerüst limitiert wurden, während die Sphäroide aus der hängenden Tropfen-Methode zum gleichen Zeitpunkt auf einen Durchmesser von $685,5 \pm 13,1 \mu\text{m}$ heranwuchsen und

eine zerrissene innere Zellmasse aufwies. Die unterschiedliche Morphologie der Sphäroide beider Zellkulturmodelle wurde ebenfalls durch eine H&E-Färbung bestätigt und zeigte zusätzlich eine Zone nicht vitaler Zellen im Zentrum eines Sphäroids aus der hängenden Tropfen-Methode (**Abbildung 12**). Dieser Sachverhalt könnte die reduzierte proliferative Aktivität von LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen erklären.

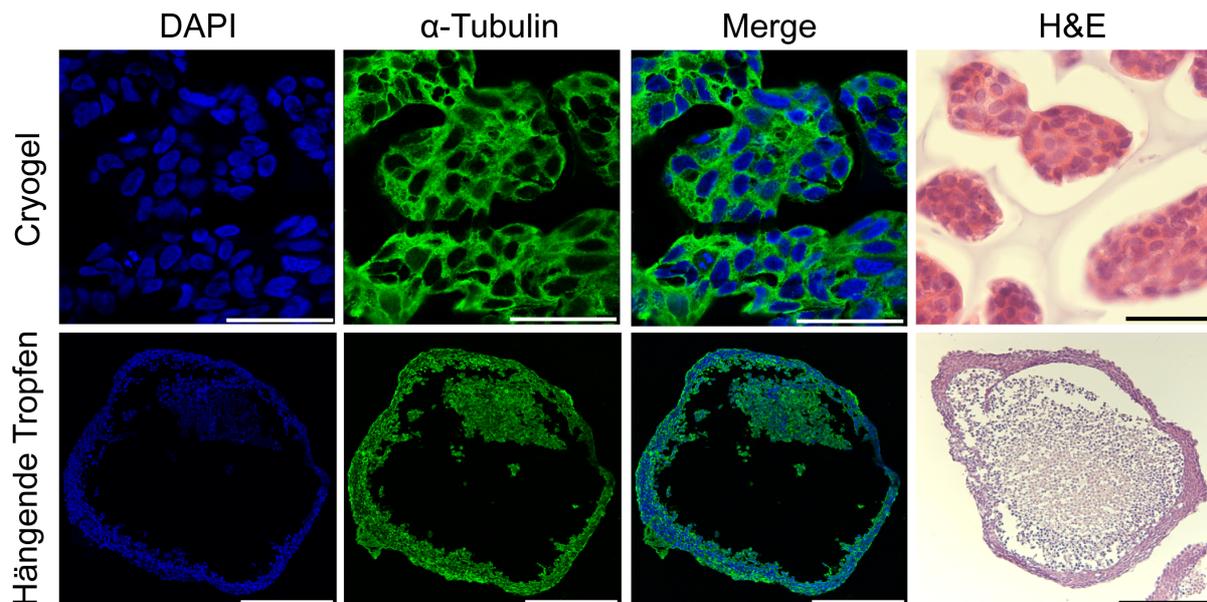


Abbildung 12. Beurteilung der Morphologie von LNCaP-Sphäroiden in Cryogelen und hängenden Tropfen. Nach einer Kultur von LNCaP-Zellen über 21 Tage in PEGda575-Cryogelen und hängenden Tropfen, wurden histologische Präparate von Proben beider Zellkulturvarianten im Rahmen einer Immunfluoreszenzfärbung gegen den zytoskelettalen Marker α -Tubulin (grün) gefärbt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Zusätzlich zur IF wurde eine H&E-Färbung der Sphäroide angefertigt. Gezeigt wird in der oberen Zeile die Morphologie von LNCaP-Sphäroiden in PEGda575-Cryogelen (Maßstab 50 μ m) und in der unteren Zeile die Morphologie eines vollständigen LNCaP-Sphäroids aus der hängenden Tropfen-Methode (Maßstab 250 μ m).

3.2.3. Spezifität von Cryogelen für die Kultur von Prostatakrebszellen

Um die Spezifität von PEGda575-Cryogelen für das Wachstum von LNCaP-Zellen zu überprüfen, wurden $2,5 \times 10^5$ humane Nierenkarzinomzellen A-498 im Cryogel kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde, identisch zu den Versuchen mit der Zelllinie LNCaP, durch die Isolation und Quantifizierung der DNA aus bewachsenen Cryogelen zu den gegebenen Zeitpunkten bestimmt. Das Ergebnis zeigte, dass A-498-Zellen nur

in den ersten Tagen der Wachstumsanalyse eine geringe proliferative Aktivität besaßen und anschließend das Wachstumspotential unter das Ursprungsniveau zurückfiel (**Abbildung 13**). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Nierenkarzinomzelllinie A-498 in PEGda575-Cryogelen nicht wachsen konnte und lässt vermuten, dass die Verwendung dieses Systems für die Kultur dieser Zelllinie nicht geeignet ist.

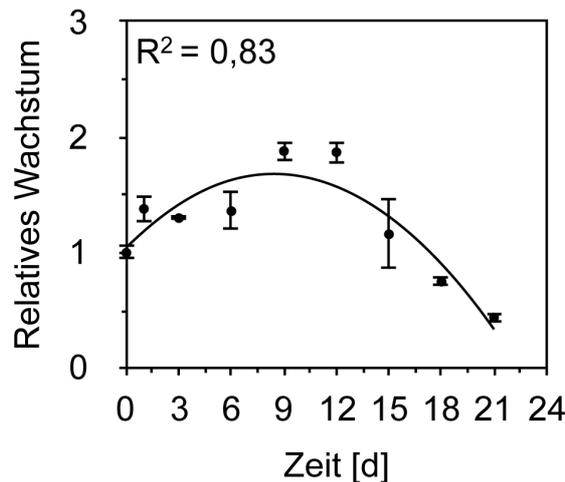


Abbildung 13. Analyse des Wachstums von A-498-Zellen in PEGda575-Cryogelen. Das Wachstumspotential der Zelllinie A-498 in PEGda575-Cryogelen wurde durch die Isolation und Quantifizierung der DNA aus bewachsenen Proben über einen Zeitraum von 21 Tagen bestimmt. Das Punktdiagramm zeigt die Wachstumskinetik von A-498-Zellen (n=3, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, gezeigt wird eine polynomische Trendlinie mit dem Korrelationskoeffizienten R^2).

3.2.4. Androgenabhängiges Wachstum von LNCaP-Zellen

Während der frühen Stadien von Prostatakrebs sind die meisten Tumore abhängig von Androgenen und der AR-Signalweg ist von großer Bedeutung für die Tumorentstehung und während der Progression der Erkrankung (Heinlein und Chang, 2004; Taplin und Balk, 2004). Auf Grund dessen wurde die proliferative Aktivität von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen in Abhängigkeit zum Androgen 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) analysiert. Im Vorfeld dieser Wachstumsanalyse wurden die Zellen im Cryogel für 5 Tage kultiviert, um die Bildung von Sphäroiden zu ermöglichen und die Adhäsion der Zellen zum Zellgerüstträger sicherzustellen. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 3 Tagen in Hungermedium mit 10 % Aktivkohle-gereinigtem Serum (charcoal stripped serum, CCS) starviert, um den intrazellulären Androgenpool zu reduzieren. Nach dem Hungern wurden LNCaP-Sphäroide über einen Zeitraum von 6

Tagen im gleichen Hungermedium bei täglicher Zugabe von 10^{-8} M DHT oder der korrespondierenden Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die statistische Auswertung des Wachstums zeigte, dass die Behandlung mit DHT zu einem signifikant erhöhten Wachstum von LNCaP-Zellen innerhalb des PEGda575-Cryogels führt (**Abbildung 14A, links**). Um zu überprüfen, ob der Anstieg der proliferativen Aktivität von LNCaP-Zellen auf die Behandlung mit DHT zurückzuführen ist, wurden die Zellen parallel zu DHT einmalig mit 10^{-5} M des Antiandrogens Enzalutamid behandelt. Durch die Behandlung mit Enzalutamid konnte der proliferationsfördernde Effekt von DHT auf die Zellen unterbunden werden (**Abbildung 14A, rechts**). Da die Interaktion von DHT mit dem AR zu einer Translokation des Hormonrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern von Prostatakrebszellen führt (Campana et al., 2016), sollte zusätzlich überprüft werden, ob dieser Effekt auch während der Kultur von LNCaP-Zellen mit DHT im Cryogel zu erkennen ist. Hierfür wurde eine IF gegen den AR und den zytoskelettalen Marker α -Tubulin durchgeführt. Die Analyse der hormonabhängigen Translokation des AR zeigt eine Lokalisation des Hormonrezeptors im Zellkern während der Behandlung mit DHT und eine hauptsächlich zytoplasmatische Lokalisation des AR in den Proben ohne Androgen (**Abbildung 14 B**).

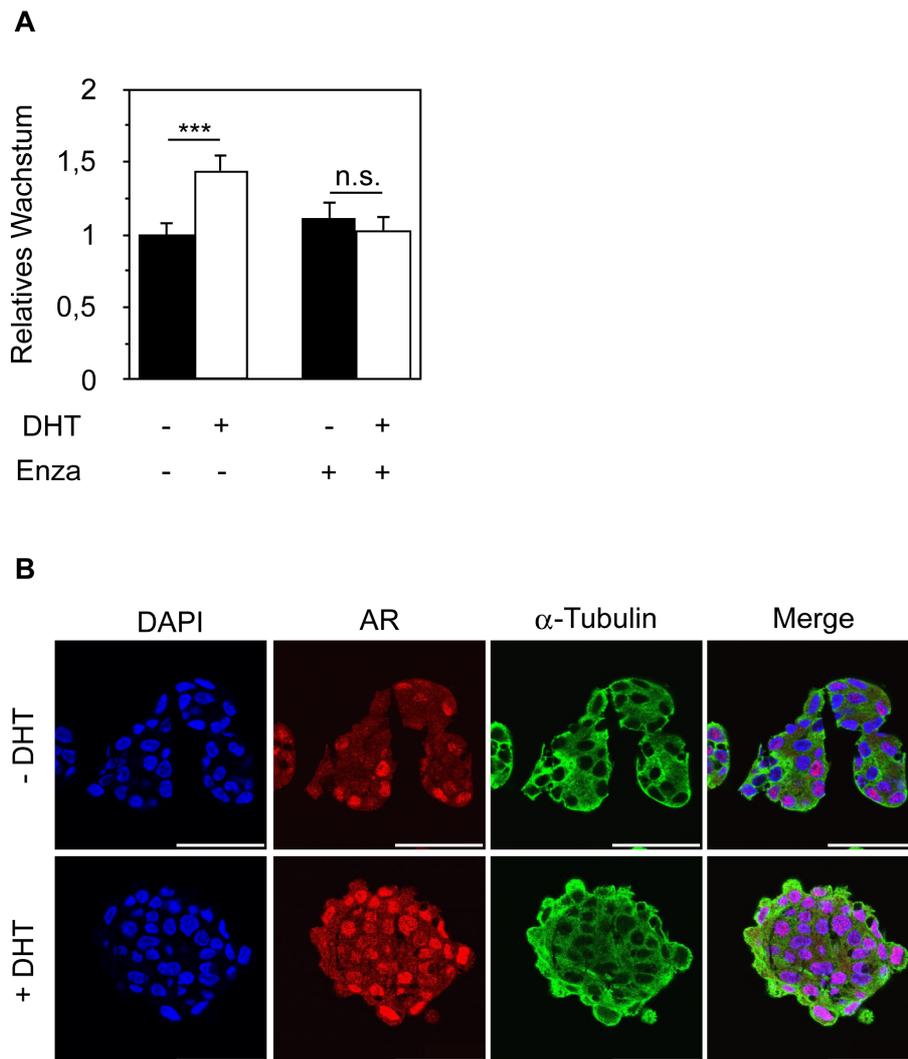


Abbildung 14. Aufklärung des androgenabhängigen Wachstums von LNCaP-Zellen in Cryogelen. Das Wachstum von LNCaP-Zellen in Cryogelen wurde täglich über einen Zeitraum von 6 Tagen mit DHT stimuliert. Zusätzlich wurden LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen zu Beginn der Wachstumsanalyse mit dem Anti-Androgen Enzalutamid (Enza), bei täglicher Gabe von DHT, behandelt. Das Balkendiagramm in **A**) zeigt das Wachstum von LNCaP-Zellen mit DHT (linke Balken) und nach einmaliger Gabe von Enza parallel zur sechstägigen Androgenstimulation (rechte Balken) ($n=6$, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $p^{***} \leq 0,001$, n.s. – nicht signifikant). **B**) IF von LNCaP-Sphäroiden nach Behandlung mit und ohne DHT. Gefärbt wurde der AR (rot), α -Tubulin (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau) (Maßstab 50 μ m).

Um zu zeigen, dass die Behandlung mit DHT auch die tieferen Regionen des Cryogels erreicht und dort zu einer Induktion des AR führt, wurden 5 μ m dicke histologische und serielle Schnitte bewachsener und mit DHT behandelter Cryogelege angefertigt. Die Schnittserie deckte den Bereich von 50 μ m unter der Oberfläche des Cryogels bis zu 1400 μ m in die Tiefe des Cryogels ab. Durch die IF gegen den AR und α -Tubulin, mit Gegenfärbung der Zellkerne durch DAPI, war es möglich die Lokalisation des AR im

Zellkern von LNCaP-Sphäroiden, die sich in tieferen Regionen des PEGda575-Cryogels befanden, nachzuweisen und zu quantifizieren (**Abbildung 15A und B**).

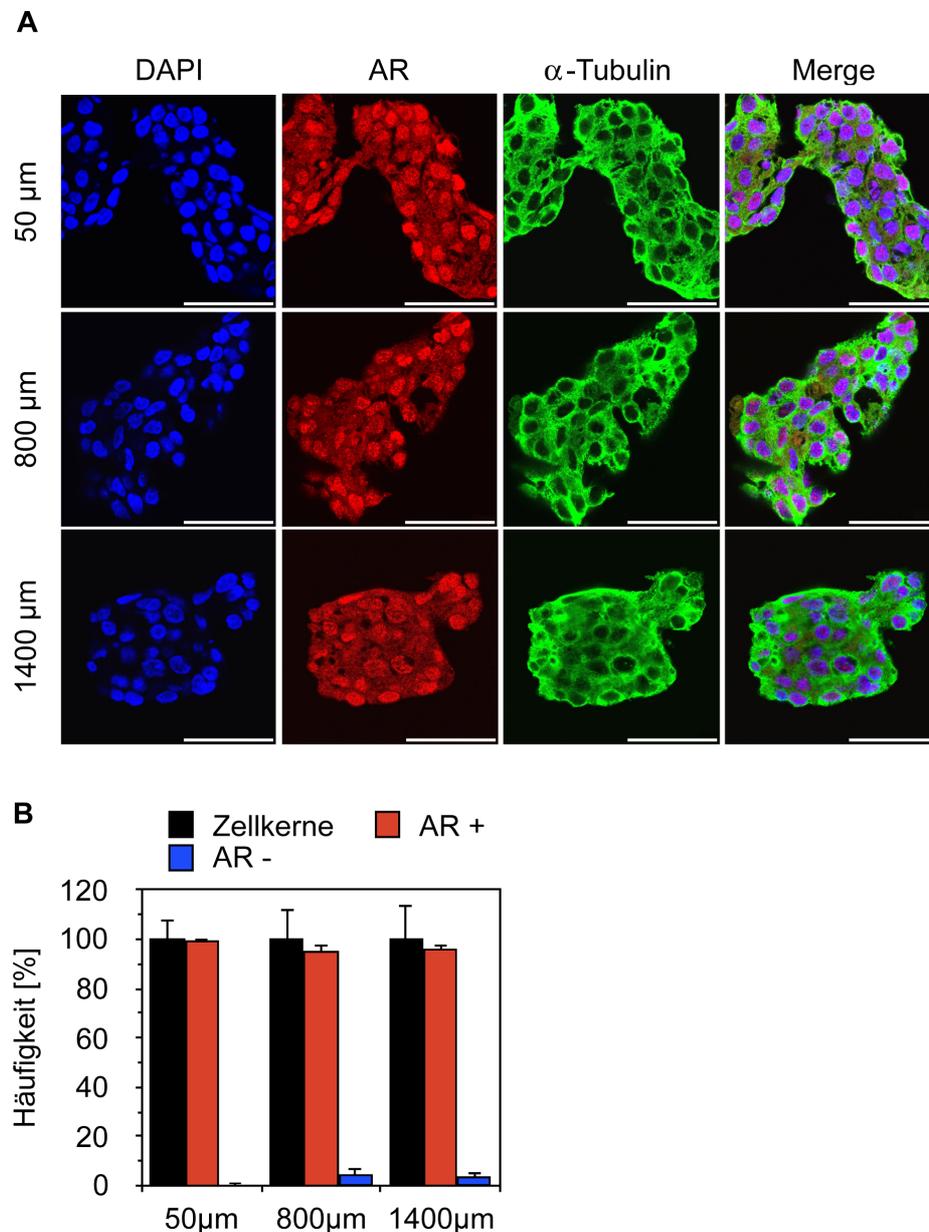


Abbildung 15. Auswertung der AR-Induktion im Cryogel nach Behandlung mit DHT. Zur Aufklärung der AR-Induktion durch DHT innerhalb des Cryogels, wurden LNCaP-Zellen über 6 Tage mit Androgen behandelt. Der Nachweis der AR-Induktion erfolgte über eine IF von 5 μm dicken histologischen Präparaten gegen den AR (rot) und α -Tubulin (grün). Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Auswertung der Schnitte wurde an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. **A**) zeigt die Lokalisation des AR von LNCaP-Sphäroiden in 50, 800 und 1400 μm Tiefe des Cryogels (Maßstab 50 μm). Das Balkendiagramm in **B**) zeigt die Quantifizierung beurteilter Zellkerne (schwarz), unterteilt in Zellkerne mit AR-Lokalisation (AR+, rot) und ohne AR-Lokalisation (AR-, blau) ($n = 15$ Sphäroide, Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler).

3.2.5. Androgenregulierte Genexpression in PEGda575-Cryogelen

Die DHT-vermittelte Translokation des AR vom Zytoplasma in den Nukleus der Prostatazelle resultiert in der gesteigerten Expression androgenregulierter Gene (Campana et al., 2016). Um diese hormonabhängige Regulation von Genen zu studieren, werden heute hauptsächlich androgenabhängige Zelllinien wie LNCaP in der 2D-Zellkultur kultiviert, mit Androgenen stimuliert und anschließend analysiert (Sieh et al., 2012). Um die Effizienz der DHT-Behandlung auf die Genexpression von LNCaP-Sphäroiden innerhalb des Cryogels feststellen zu können, wurde die Expression androgenregulierter Gene im Cryogel mit der Expression derselben Gene in LNCaP-Zellen aus der 2D-Zellkultur verglichen. Dafür wurden zunächst LNCaP-Zellen in Cryogelen und auf Zellkulturplatten kultiviert, für 3 Tage gehungert und anschließend über einen Zeitraum von 6 Tagen täglich mit 10^{-8} M DHT oder der korrespondierenden Lösungsmittelkontrolle behandelt. Anschließend wurde aus den Proben der zwei Kulturmethode die RNA extrahiert und das Expressionslevel androgenabhängiger Gene durch die quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) bestimmt und gegen die Expression des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) relativiert. Zum Vergleich wurde die Expression des androgenregulierten Gens für das FK506 Bindeprotein 5 (FKBP5) (Febbo et al., 2005) und zwei spezifischer Gene für Prostatakrebs, nämlich TMPRSS2 und PSA, bestimmt (Mize et al., 2008; Tomlins et al., 2005). Die statistische Auswertung der Genexpression zeigte, dass sich die Expression von FKBP5 zwischen der 2D-Zellkultur und der Zellkultur im Cryogel nicht signifikant unterscheidet (**Abbildung 16A**). Die Expression der prostatakrebspezifischen Gene war jedoch im Vergleich zur 2D-Zellkultur im Cryogel erhöht. Besonders im Fall der Expression des PSA war die Hormonantwort im Cryogel im Vergleich zur 2D-Zellkultur von einer 16-fachen auf eine 46-fache Induktion angestiegen (**Abbildung 16B und C**). Diese Resultate zeigen, dass die Verwendung der Cryogele von Vorteil ist, um die Androgenregulation prostatakrebspezifischer Gene zu studieren.

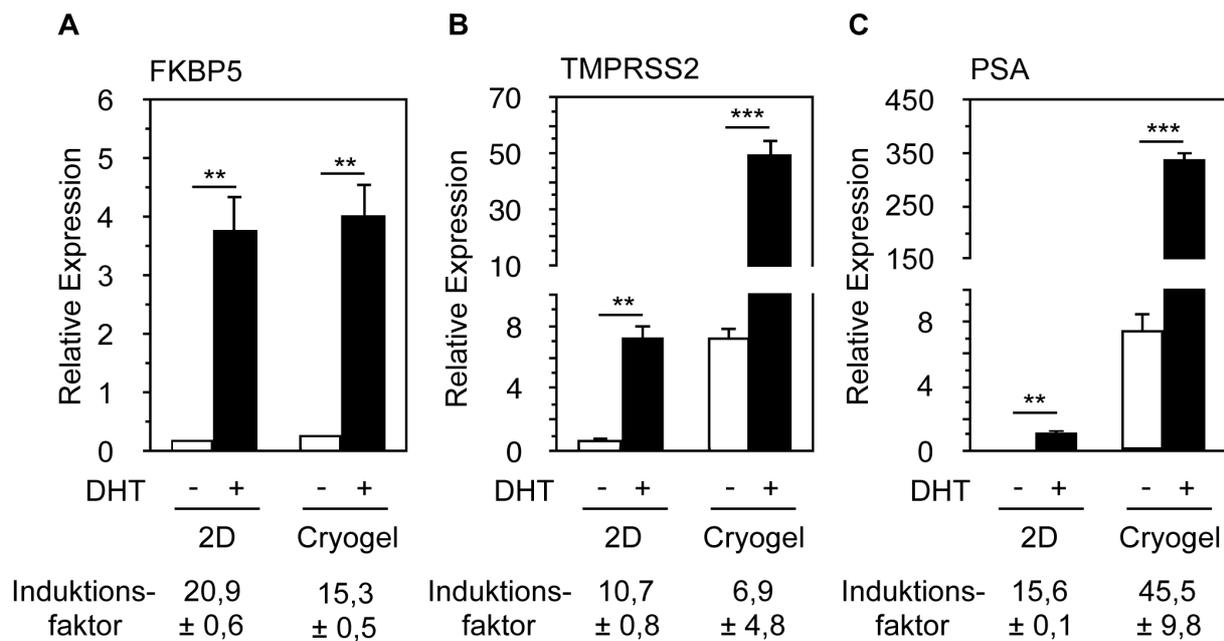


Abbildung 16. Vergleich der androgenregulierten Genexpression in der 2D-Zellkultur und im Cryogel. Zum Vergleich der Expression androgenregulierter Gene, wurden LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen und in der 2D-Zellkultur für 6 Tage mit DHT behandelt. Die Balkendiagramme zeigen die relative Expression von **A) FKBP5**, **B) TMPRSS2** und **C) PSA** nach Behandlung mit und ohne Androgen. (n=3, Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler, p** ≤ 0,03, p*** ≤ 0,001).

3.2.6. Vergleich der Genexpression in 2D-Zellkultur, Cryogelen und *in vivo*

Um die Eignung von PEGda575-Cryogelen als Zellkulturmodell mit der konventionellen 2D-Zellkultur und dem *in vivo*-Kontext vergleichen zu können, wurde die Expression einiger prostatakrebsspezifischer Gene zwischen Proben der zwei Zellkulturmethoden und LNCaP-Tumoren aus Xenograftmodellen miteinander verglichen. Dafür wurden LNCaP-Zellen in 2D bis zur Konfluenz und im Cryogel für drei Wochen kultiviert. Zur Erzeugung von LNCaP-Tumoren wurden 10⁶ Zellen, gelöst in 100 µl kaltem Matrigel, in die Flanken athymischer Nacktmäuse injiziert. Die LNCaP-Tumore wurden nach Erreichen einer ungefähren Größe von 1 cm³ aus den Versuchstieren entfernt. Anschließend wurde aus allen Proben die RNA isoliert und mittels qPCR die Expression der prostatakrebsspezifischen Gene für TMPRSS2, Kallikrein 2 (KLK2), PSA und das Zink-alpha-2-Glykoprotein (AZGP1) bestimmt. Alle vier Gene wurden auf Grund ihrer Relevanz als wichtige Marker für die Diagnose und während der Progression von Prostatakarzinomen analysiert (Lapointe et al., 2004; Saini, 2016; Shang et al., 2014; Tomlins et al., 2005). Die Expression der Gene wurde gegen das Haushaltsgen HPRT

relativiert und zwischen den unterschiedlichen Proben miteinander verglichen. Das Ergebnis der Analyse zeigt, dass die Expression aller prostatakrebspezifischen Gene in PEGda575-Cryogelen mit der Expression derselben Gene in LNCaP-Tumoren von Xenografts vergleichbar ist und sich von der 2D-Zellkultur signifikant unterscheidet (**Abbildung 17**). Durch diese Analyse konnte die *in vivo*-ähnliche Regulation prostatakrebspezifischer Gene in PEGda575-Cryogelen nachgewiesen werden.

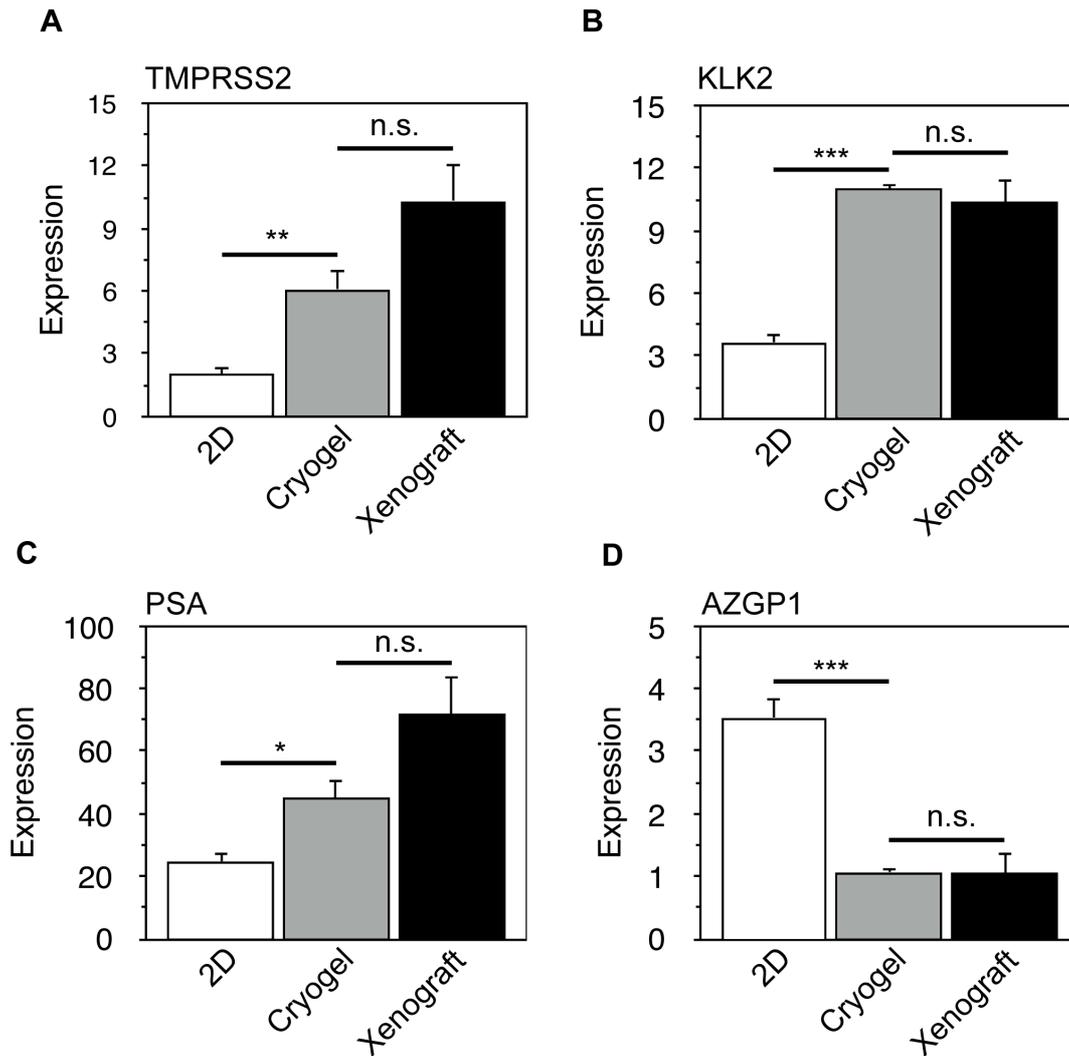


Abbildung 17. Vergleich der Genexpression prostatakrebspezifischer Gene in 2D-Zellkultur, Cryogelen und Xenografts. Zum Vergleich der Expression prostatakrebspezifischer Gene wurden LNCaP-Zellen in der 2D-Zellkultur und in Cryogelen kultiviert. Zusätzlich wurden LNCaP-Tumore in athymischen Nacktmäusen etabliert. Nach Erreichen der Konfluenz in 2D, 21 Tagen Kultur in Cryogelen und einem ungefähren Volumen der Tumore von 1 cm³, wurde die RNA aus den jeweiligen Proben isoliert und die Expression prostatakrebspezifischer Gene durch qPCR analysiert. Die Balkendiagramme zeigen die Expression von **A**) TMPRSS2, **B**) KLK2, **C**) PSA und **D**) AZGP1 im Vergleich zwischen 2D-Zellkultur, der Kultur in PEGda575-Cryogelen und dem korrespondierenden Tierversuch (n=8, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. p* ≤ 0,05, p** ≤ 0,03, p*** ≤ 0,001).

3.2.7. Test potentieller therapeutischer Substanzen in Cryogelen

Nachdem festgestellt wurde, dass die Genexpression von LNCaP-Zellen in Cryogelen der Genexpression in Xenograftmodellen gleicht, wurde die Eignung der PEGda575-Cryogele als Analyseplattform für Wirkstofftests untersucht. Um den Effekt potentieller therapeutischer Substanzen zur Behandlung von Prostatakrebs studieren zu können, wurden im Vorfeld dieser Arbeit LNCaP-Zellen mit einem Expressionsvektor für ein Protein aus der Familie der BCL-2 assoziierten Athanogene 1 (BAG1) transduziert. Dieses Protein, genauer BAG1L, ist ein Co-Regulator des AR und in der Lage, die Transaktivierung des Hormonrezeptors zu erhöhen (Shatkina et al., 2003). Zusätzlich ist bekannt, dass BAG1L in den Stadien fortgeschrittener Prostatakarzinome häufig überexprimiert ist (Maki et al., 2007). Durch die Verwendung der mit BAG1L transduzierten Zelllinie und einer entsprechenden Kontrollzelllinie, die mit einem Leervektor transduziert wurde und daher nur eine endogene Expression von BAG1L besitzt, sollte ein Modell etabliert werden, dass Aspekte fortgeschrittener Stadien von Prostatakrebs reflektiert. Dieses Modell sollte in späteren Analysen als Grundlage für den Test potentieller therapeutischer Substanzen zur Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt werden. Um den Effekt einer Überexpression von BAG1L auf die proliferative Aktivität von LNCaP-Zellen zu studieren, wurden nach Prüfung der Expression des Flag-markierten BAG1L im Western Blot (**Abbildung 18A**) die mit BAG1L transduzierte Zelllinie und die Kontrollzelllinien in PEGda575-Cryogelen ausgesät und das Wachstum beider Zelllinien über einen Zeitraum von 14 Tagen analysiert (**Abbildung 18B**). Das Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von BAG1L die proliferative Aktivität der transduzierten LNCaP-Zellen, gegenüber der Kontrollzelllinie, signifikant erhöht.

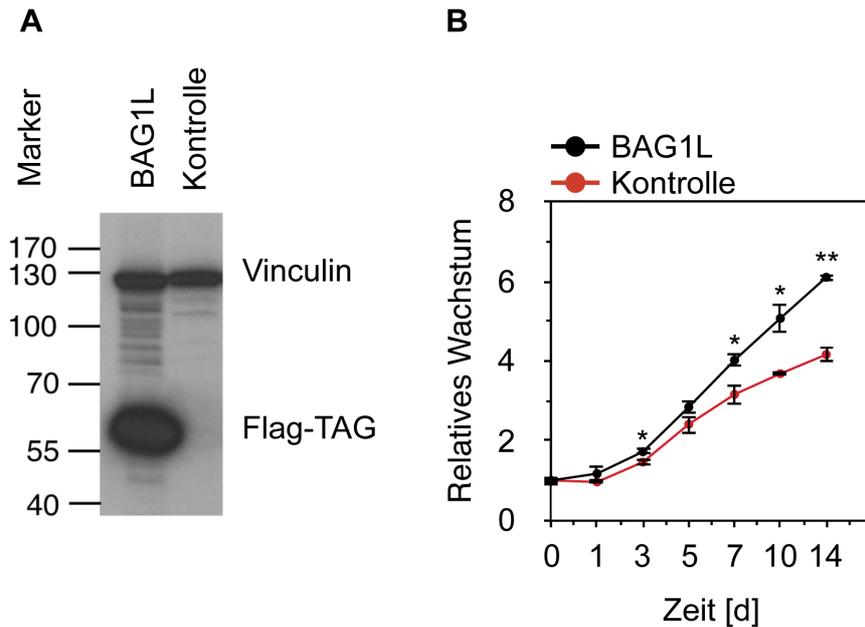


Abbildung 18. Analyse des Wachstums von BAG1L-exprimierenden Zellen in PEGda575-Cryogelen. Zur Etablierung eines Zellkulturmodells für das Spätstadium von Prostatakrebs wurden LNCaP-Zellen mit einem Expressionsvektor für BAG1L transduziert und ihre Wachstumseigenschaften in PEGda575-Cryogelen durch die Isolation und Quantifizierung der DNA aus bewachsenen Proben analysiert. **A)** zeigt den Western Blot zur Kontrolle der Expression des Flag-markierten BAG1L in transduzierten LNCaP-Zellen (BAG1L) parallel zur Kontrollzelllinie, die mit einem Leervektor ohne Flag transduziert war (Kontrolle). Als Ladekontrolle wurde Vinculin detektiert. Das Kurvendiagramm in **B)** zeigt das Wachstum BAG1L-überexprimierender LNCaP-Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie (n=3, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,03$).

Mit dem Wissen, dass BAG1L in der Lage ist, den AR zu binden und dadurch seine Transaktivierung zu erhöhen (Shatkina et al., 2003), wurde der Effekt von Thio-2, einem BAG-1-Inhibitor (Enthammer et al., 2013), auf das Wachstum BAG1L-überexprimierender LNCaP-Zellen überprüft. Dafür wurde die BAG1L-überexprimierende LNCaP-Zelllinie und die Kontrollzelllinie in PEGda575-Cryogelen für 5 Tage in Vollmedium kultiviert, um die Bildung von Sphäroiden zu gewährleisten und den Kontakt der Sphäroide zum Zellgerüst sicherzustellen.

Anschließend wurden die entstandenen Sphäroide während eines Zeitraumes von 9 Tagen alle 3 Tage mit 5 μM Thio-2 behandelt. Das Wachstum der Zellen wurde in Abhängigkeit von der Zeit durch die Quantifizierung der isolierten DNA aus bewachsenen Cryogelen analysiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Behandlung mit Thio-2 die Proliferation von BAG1L-überexprimierenden Zellen signifikant reduzierte (**Abbildung 19A**), wohingegen LNCaP-Zellen mit endogener BAG1L-Expression nur am Endpunkt

der Analyse eine Reduktion der proliferativen Aktivität aufwiesen (**Abbildung 19B**). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass der antiproliferative Effekt von Thio-2 mit steigender Expression von BAG1L zunimmt und deshalb nur ein verminderter Effekt dieser Substanz auf Zellen mit endogener BAG1L-Expression zu erkennen ist. Weiterhin deutet dieses Resultat darauf hin, dass PEGda575-Cryogele für den Test potentieller therapeutischer Substanzen zur Behandlung von Prostatakrebs prinzipiell geeignet sind.

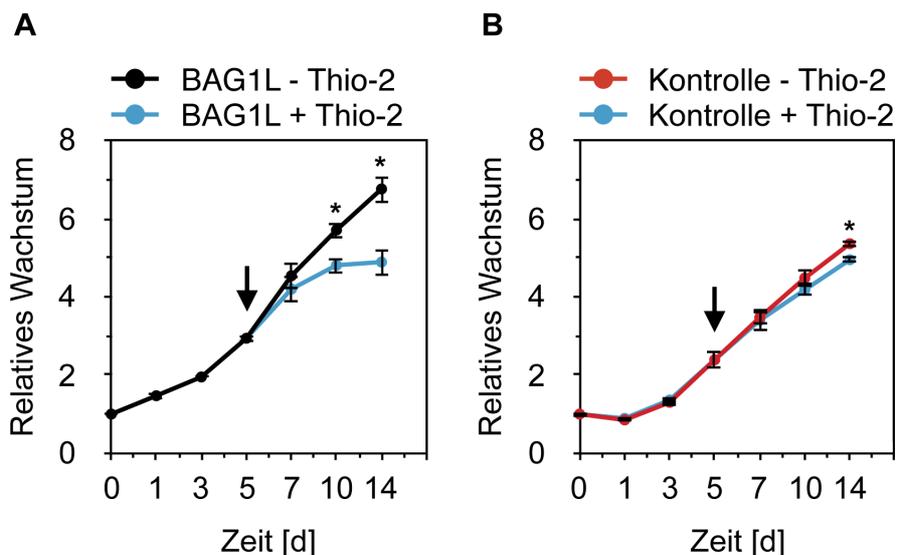


Abbildung 19. Beurteilung des Einflusses von Thio-2 auf das Wachstum von BAG1L-exprimierenden LNCaP-Zellen im PEGda575-Cryogel. Um den Effekt von Thio-2 auf die proliferative Aktivität von BAG1L-überexprimierenden Zellen zu überprüfen, wurden transduzierte LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen für einen Zeitraum von 5 Tagen kultiviert und anschließend über 9 Tage mit 5 μ M Thio-2 behandelt. Das Wachstum der Zellen wurde durch die Quantifizierung der DNA aus den Proben, in Abhängigkeit zur Zeit, bestimmt. **A)** zeigt das Wachstum von BAG1L-überexprimierenden LNCaP-Zellen (BAG1L) in PEGda575-Cryogelen mit Thio-2 (n=3, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $p^* \leq 0,05$). Das Kurvendiagramm in **B)** zeigt das Wachstum der Kontrollzelllinie mit endogener BAG1L-Expression während der Behandlung mit Thio-2 (n=3, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler, $p^* \leq 0,05$). Der Pfeil in beiden Kurvendiagrammen markiert den Start der Behandlung mit Thio-2.

4. Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurde das synthetische Polymer Polyethylenglykoldiacrylat, mit einem Molekulargewicht von 575 Da, durch das Verfahren der Cryogelation zu porösen Zellgerüstträgern mit interkonnektivem Porennetzwerk vernetzt. Diese Cryogele waren in ihren mechanischen Eigenschaften mit der Elastizität maligner Prostatagewebe vergleichbar und wurden zur Studie der epithelialen Prostatakrebszelllinie LNCaP eingesetzt. Die Kultivierung von LNCaP-Zellen innerhalb des Cryogels zeigte, dass sich die Zellen in kompakten Sphäroiden zusammenlagerten und über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen mit einer linearen Proliferation wachsen konnten. Das Wachstum der LNCaP-Sphäroide war, wie für Prostatakrebszellen typisch, durch Androgen reguliert. Die Behandlung von LNCaP-Zellen innerhalb des PEGda575-Cryogels mit dem Androgen 5 α -Dihydrotestosteron führte zur Expression prostatakrebsspezifischer Gene, die sich im Vergleich zur Expression derselben Gene in der konventionellen zweidimensionalen Zellkultur signifikant unterschieden und mit der Expression in LNCaP-Tumoren aus Xenograftmodellen vergleichbar gewesen sind. Schlussendlich war es möglich, unter Verwendung von PEGda575-Cryogelen, eine Analyseplattform für Wirkstofftests zu etablieren, was anhand der Substanz Thio-2, die in der Lage ist das Prostatakrebszellwachstum zu inhibieren, gezeigt werden konnte.

4.1. Etablierung eines prostatakrebspezifischen Zellkulturmodells

4.1.1. Cryogele mit poröser Architektur

Die Poreneigenschaften dreidimensionaler (3D)-Zellgerüstträger sind von großer Bedeutung für die Eignung dieser Systeme während der Durchführung von Zellkulturexperimenten. Besonders die Porosität, die als Summe von untereinander und mit der Umgebung in Kontakt stehenden Hohlräumen definiert ist (Panneton, 2005), und ein interkonnektives Porennetzwerk sind wichtig für die erfolgreiche Durchführung einer 3D-Zellkultur (Annabi et al., 2010; Loh und Choong, 2013). Während der Zellkultur gewährleisten diese beiden Eigenschaften im Zellgerüst die Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff, sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten und tragen dadurch zum Erhalt der Vitalität der zu kultivierenden Zellen bei (Annabi et al., 2010).

Wird allerdings die Porosität gesteigert, um einen verbesserten Stofftransport innerhalb des Zellgerüstträgers zu erreichen (Khademhosseini und Langer, 2007), dann hat das häufig eine beeinträchtigende Wirkung auf die mechanische Stabilität des 3D-Zellkultursystems (Gerecht et al., 2007). Deshalb ist es wichtig, während der Herstellung von Zellgerüstträgern auf ein ausgewogenes Verhältnis von Stofftransport und mechanischer Stabilität zu achten, um ein geeignetes Zellkulturmodell zu etablieren.

Um einen porösen und gleichzeitig mechanisch stabilen Zellgerüstträger für die Prostatakrebsforschung zu etablieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit kurzkettige PEGda-Monomere durch das Porogenverfahren der Cryogelation zu porösen Zellgerüstträgern assembliert. Diese Cryogele wurden mit den porösen Eigenschaften von Hydrogelen, bei denen die Polymerisation derselben PEGda-Monomere unter Raumtemperatur stattgefunden hat, verglichen. Während dieser Analyse wurde festgestellt, dass sich die hergestellten PEGda-Cryogele von den PEGda-Hydrogelen durch ihre hohe Porosität unterscheiden und von einem interkonnektiven Porennetzwerk durchzogen waren, das aus Poren mit stabilen Porenwänden bestand. Für den Stofftransport während der Durchführung von Zellkulturexperimenten bietet die erhöhte Porosität und das interkonnektive Porennetzwerk dieser PEGda-Cryogele, gegenüber Hydrogelen, entscheidende Vorteile. Diese Vorteile können anhand der Literatur belegt werden, in denen die Charakteristika beider Polymervarianten im Allgemeinen miteinander verglichen worden sind. In diesen Studien wird gezeigt, dass das Porennetzwerk von Cryogelen, auf Grund seiner Interkonnektivität, den Austausch löslicher Substanzen innerhalb des Polymers durch Konvektion ermöglicht (Okay, 2014). Die Konvektion in Cryogelen hat, im Vergleich zur Diffusion in Hydrogelen, einen schnelleren und effizienteren Stofftransport zur Folge (Komori T., 1989; Okay, 2014). Auf Grund dieser Tatsache kann davon ausgegangen werden, dass über das interkonnektive Porennetzwerk in PEGda-Cryogelen eine ausreichende Versorgung der in ihnen zu kultivierenden Zellen mit Nährstoffen aus dem Zellkulturmedium stattfindet. Weiterhin ist die Konvektion auch für einen verbesserten Abtransport von Stoffwechselendprodukten aus dem Inneren von Cryogelen verantwortlich (Okay, 2014), was neben der Nährstoffversorgung von einem geeigneten Zellgerüstträger gewährleistet werden muss (Annabi et al., 2010) und durch die erhöhte Porosität und das interkonnektive Porennetzwerk in PEGda-Cryogelen ermöglicht werden kann.

Neben dem verbesserten Nährstofftransport in Cryogelen hat deren poröse Struktur weitere Vorteile, die man sich während der Zellkultur zu Nutze machen kann. Diese

Struktur ermöglicht unter anderem eine schonende Inkorporation von Zellen innerhalb des Polymers. Hierfür werden Zellen in Suspension auf das Cryogel aufgetropft und anschließend durch eine schwammartige Wirkung in das Cryogel aufgesogen. Gegenüber Methoden, wie zum Beispiel der bei der Produktion von Hydrogelen gängigen Photopolymerisation, bei der die Zellen direkt während der Erzeugung des Zellgerüstträgers unter Verwendung von UV-Licht verkapselt werden und dadurch geschädigt werden können (Mironi-Harpaz et al., 2012), ist diese Methode zytokompatibel und ermöglicht eine einfache Inkorporation der Zellen nach Herstellung des Zellgerüstträgers.

Auf Grund ihrer erhöhten Porosität und ihres interkonnektiven Porennetzwerks sind PEGda-Cryogele prinzipiell für die Kultur von Prostatakrebszellen geeignet. Um ihre Spezifität für ihre Anwendung in der Prostatakrebsforschung zu erhöhen, wurde im Folgenden ihre Elastizität auf die Elastizität maligner Prostatagewebe angepasst.

4.1.2. Cryogele mit gewebespezifischer Elastizität

Im Organismus ist das Wachstum von Zellen nicht nur durch die Anwesenheit spezifischer Wachstumsfaktoren und spezifischer Signalmoleküle gesteuert, sondern auch über komplexe Interaktionen der Zellen mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix (EZM) reguliert (Christofori und Semb, 1999; Gagne et al., 2010; Moustakas und Heldin, 2007). Die mechanischen Eigenschaften der EZM wurden in letzter Zeit als ein wichtiger Faktor beschrieben der in der Lage ist, die Physiologie von Zellen *in vivo* und *in vitro* zu beeinflussen (Levental et al., 2009; Tilghman et al., 2010). Besonders die Elastizität der EZM kann die Proliferation, die Differenzierung und die Funktionalität diverser Zellentypen verändern (Engler et al., 2006; Engler et al., 2007; Wang et al., 2000). Weiterhin ist das Entstehen von Tumoren und die Progression von Tumorerkrankungen mit einer Zunahme in der Elastizität der EZM verbunden, was auf eine Akkumulation und Vernetzung von EZM-Komponenten wie Kollagen zurückzuführen ist (Huang und Ingber, 2005; Levental et al., 2009). Heute werden humane Krebszelllinien hauptsächlich unter Verwendung von zweidimensionalen (2D)-Zellkulturtechniken analysiert, oder in künstlich erzeugten Matrices wie Matrigel oder anderen Hydrogelen studiert. Die Elastizität der in diesen Methoden angewandten Substrate oder Zellgerüstträger ist jedoch oftmals nicht ausreichend um die Elastizität einiger Tumore

zu rekonstruieren (Levental et al., 2009; Tibbitt und Anseth, 2009; Tilghman et al., 2010).

Basierend auf diesen Kenntnissen wurden im Rahmen dieser Arbeit PEGda-Cryogele in der Form angepasst, dass sie unter Zellkulturbedingungen eine Elastizität besitzen, die der Elastizität maligner Prostatagewebe entspricht. Die Elastizität von malignen Prostatageweben wurde in klinischen Studien auf ein Mittel von 88 kPa bestimmt (Boehm et al., 2015). Um die Anforderung an diese spezifische Elastizität zu erfüllen, sind Cryogele im Vergleich zu Hydrogelen besser geeignet, denn die Interkonnektivität ihres Porennetzwerks trägt entscheidend zu ihrer mechanischen Stabilität bei (Okay, 2014). Die gute mechanische Stabilität von Cryogelen ist durch die erhöhte Energiezerstreuung (Dissipation) zu erklären, die durch das Porennetzwerk gewährleistet wird. Im Vergleich dazu ist die Energiezerstreuung in Netzwerken von Hydrogelen weniger effizient, was eine mechanische Instabilität der Gele zur Folge hat (Okay, 2009; Okay, 2014) und weshalb Hydrogele nicht in der Lage sind, die Elastizität einiger Tumore und insbesondere des Prostatakarzinoms zu rekonstruieren. Dieser Sachverhalt kann anhand von Analysen belegt werden, in denen die Elastizität von PEGda-Hydrogelen die Elastizität von PEGda-Cryogelen nicht erreichen konnten (Arbeitsgruppe Dr. Friederike J. Gruhl, unveröffentlichte Daten)

Die Elastizität von Cryogelen ist, wie bei anderen 3D-Zellgerüstträgern auch, von der Konzentration der verwendeten Vernetzermoleküle, den eingesetzten Monomeren und deren Molekulargewicht abhängig (Zellander, 2013; Lin et al., 2011; Okay, 2014). Aufgrund dieser Tatsache wurde das Molekulargewicht der PEGda-Monomere variiert, um die Synthese von Cryogelen mit unterschiedlichen Elastizitäten zu ermöglichen. Dieses Vorgehen basiert auf Erfahrungswerten aus der Literatur die zeigen, dass durch die Variation des Molekulargewichts der zu vernetzenden Monomere Polymere etabliert werden können, die eine große Spannweite in ihrer Elastizität abdecken. Diese Polymere können Elastizitäten von weichen gelartigen Kompositen bis hin zu Strukturen mit glasähnlicher Härte umfassen (Zellander, 2013). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Cryogelation von langkettigen und hochmolekularen PEGda-Monomeren, wie PEGda3400 und PEGda6000, in der Herstellung von weichen Cryogelen endete, die für die Studie von Prostatakrebszellen ungeeignet sind. Schlussendlich wurden kurzkettige PEGda-Monomere mit einem niedrigen Molekulargewicht von 575 Da verwendet, um Cryogele mit prostatakrebspezifischer Elastizität zu synthetisieren und diese für die Kultur von Prostatakrebszellen einzusetzen.

4.2. Zellwachstum in PEGda575-Cryogelen

Innerhalb der in dieser Arbeit etablierten PEGda575-Cryogele war es möglich, die epitheliale Prostatakrebszelllinie LNCaP über einen Zeitraum von 21 Tagen, mit linearer proliferativer Aktivität, zu kultivieren. Da die Elastizität von PEGda575-Cryogelen ideal für das Wachstum von Prostatakrebszellen ist, konnte anhand von Experimenten gezeigt werden, in denen humane Nierenkarzinomzellen innerhalb dieser Cryogele kultiviert worden sind und nur mäßig wachsen konnten. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass sich humane Nierenkarzinome mit einer Steifigkeit von 7,7 bis 47,3 kPa (Clevert et al., 2009; Grenier et al., 2013) deutlich von der Steifigkeit humaner Prostatakarzinome, die in einem Bereich von 54 bis 132 kPa liegt (Boehm et al., 2015), unterscheiden und daher PEGda575-Cryogele für die Kultur humaner Nierenkarzinomzellen nicht geeignet sind. Diese Vermutung kann durch Wachstumsanalysen gestützt werden, in denen A-498 Zellen in synthetischen Cryogelen mit einer geringeren Elastizität von $7,3 \pm 0,7$ kPa eine deutlich höhere proliferative Aktivität aufwiesen (Arbeitsgruppe Dr. Friederike Gruhl, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich wird in unterschiedliche Studien gezeigt, dass die Elastizität zellulärer Mikroumgebungen, je nach Ursprung der Zellen, unterschiedliche Effekte auf die Proliferation vermittelt (Annabi et al., 2010; Pathak, 2011; Schrader et al., 2011; Tilghman et al., 2010).

Die im PEGda575-Cryogel kultivierten LNCaP-Zellen waren in der Lage kompakte Sphäroide auszubilden, die über Zell-Matrix-Kontakte mit den Porenwänden in Verbindung standen. Diese Kontakte sind, neben den Zell-Zell-Kontakten, entscheidend für die Übertragung mechanischer Signale der Mikroumgebung auf die Zellen und die anschließende intrazelluläre Signaltransduktion, die für die Spezifität und biologische Funktion der Zellen sorgt (Chen et al., 2004). Die Beobachtung der Zell-Matrix-Kontakte von LNCaP-Sphäroiden mit den Porenwänden des Cryogels war allerdings zunächst überraschend, da PEGda als ein biologisch inertes Polymer beschrieben wird, dass ohne eine vorangegangene Funktionalisierung keine Zelladhäsion in 3D-Zellgerüstträgern ermöglicht (Clapper et al., 2007; Peppas et al., 2000). Diese Behauptung wird allerdings kontrovers diskutiert und es gibt Hinweise darauf, dass Zellkulturmodelle aus PEGda in der Lage sind, den in ihnen kultivierten Zellen die Ablagerung ihrer eigenen EZM-Komponenten zu erlauben um dadurch eine Adhäsion an den Zellgerüstträger zu ermöglichen (Bryant und Anseth, 2002). Zusätzlich wird in der Literatur gezeigt, dass auch die Porengröße von Zellgerüstträgern eine wichtige Rolle bei der

Sekretion von EZM-Komponenten spielt. So wurde gezeigt, dass eine zu kleine Porengröße die Sekretion von EZM-Komponenten in Zellkultursystemen beeinträchtigen kann, wohingegen größere Poren die Sekretion von EZM-Komponenten erlaubt (Lien et al., 2009).

Um die Qualität der PEGda575-Cryogele mit anderen 3D-Zellkulturmodellen zu vergleichen, wurde das Wachstum von LNCaP-Zellen im Cryogel mit dem Wachstum derselben Zellen in einem flüssigkeitsbasierendem 3D-Zellkulturmodell studiert. Für diesen Vergleich wurde die hängende Tropfen-Methode ausgewählt. Diese Methode ist, auf Grund der Möglichkeit der Erzeugung einheitlicher Sphäroide in Hochdurchsatzformaten und ihrem Einsatz in automatisierbaren Screeningverfahren, eine der am meisten genutzten 3D-Zellkulturmethoden in der heutigen biologischen Forschung (Drewitz et al., 2011; Frey et al., 2014; Kelm und Fussenegger, 2004; Timmins und Nielsen, 2007; Tung et al., 2011). Dadurch repräsentiert die hängende Tropfen-Methode die stärkste Konkurrenz zu den in dieser Arbeit angewandten PEGda575-Cryogelen. Die Ergebnisse der Wachstumsanalyse von LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen zeigte, dass die Zellen im Vergleich zur Kultur in Cryogelen nicht in der Lage waren, ihre proliferative Aktivität über eine Kulturperiode von 21 Tagen beizubehalten und die Sphäroide eine Größe von im Durchmesser $685,6 \pm 13,1 \mu\text{m}$ erreichten. Um Gründe für die reduzierte Wachstumsrate von LNCaP-Zellen in hängenden Tropfen aufklären zu können, wurden morphologische Studien der LNCaP-Sphäroide in beiden Zellkulturmodellen durchgeführt. Diese Analysen konnten zur Aufklärung nicht lebensfähiger Zellen im Inneren der Sphäroide aus der hängenden Tropfen-Kultur beitragen und ließen vermuten, dass die Zellen durch Apoptose oder Nekrose abgestorben sein könnten. Diese Vermutung lässt sich anhand der Literatur bestätigen, die zeigt, dass der Stofftransport innerhalb von Sphäroiden mit einem Durchmesser von mehr als $500 \mu\text{m}$ limitiert ist (Alvarez-Perez et al., 2005). Die Folge daraus ist eine reduzierte Versorgung der Zellen im Zentrum des Sphäroids mit Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumsfaktoren. Zusätzlich wird eine Akkumulation von Stoffwechselendprodukten und Kohlestoffdioxid innerhalb des Sphäroids begünstigt (Alvarez-Perez et al., 2005; Lin und Chang, 2008; Mueller-Klieser, 1984). Dieser limitierte Stofftransport führt zu einem schichtweisen Aufbau des Sphäroids, aus vitalen Zellen im äußeren Bereich, seneszenten Zellen darunter und nekrotischen Zellen im Inneren des Sphäroids (Alvarez-Perez et al., 2005).

Im Vergleich zu den Sphäroiden in der hängenden Tropfen-Methode, sind entstehende

LNCaP-Sphäroide im Cryogel durch die Porengröße, die ebenfalls durch das Molekulargewicht der vernetzten PEGda-Monomere bestimmt werden konnte, zum Großteil auf einen Umfang von 100-200 μm limitiert. Dadurch kann verhindert werden, dass die entstehenden LNCaP-Sphäroide eine Größe erreichen, die kritisch für das Auftreten von Nekrose oder Apoptose ist. Dadurch repräsentiert die spezifische Porengröße von PEGda575-Cryogelen eine weitere Eigenschaft, die neben der spezifischen Elastizität und der hohen Porosität das Wachstum von LNCaP-Sphäroiden positiv beeinflussen kann.

4.3. Genexpression von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen

Der Androgenrezeptor (AR)-Signalweg ist von großer Bedeutung für die Entstehung und die Progression von Prostatakarzinomen (Heinlein und Chang, 2004; Taplin und Balk, 2004). Während dieses Signalweges resultiert die Bindung von 5α -Dihydrotestosteron (DHT) an den AR in einer Translokation des Hormonrezeptors vom Zytoplasma in den Nukleus der Prostatazelle und führt anschließend zur gesteigerten Expression androgenregulierter Gene (Campana et al., 2016).

Das LNCaP-Sphäroide während der Kultivierung in PEGda575-Cryogelen den für Prostatakrebszellen spezifischen Phänotyp beibehalten, konnte anhand ihres androgenregulierten Wachstums und der androgenvermittelten Translokation des AR vom Zytoplasma in den Zellkern bestätigt werden (Campana et al., 2016; Wong et al., 2014). Um die Effizienz der Hormonantwort von LNCaP-Sphäroiden in Cryogelen beurteilen zu können, wurde die Expression androgenregulierter Gene in diesem System mit der in konventionellen 2D-Zellkulturexperimenten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die androgenvermittelte Induktion des Gens, das für das FK506-bindende Protein 5 (FKBP5) kodiert, in beiden Zellkulturmethoden von gleicher Stärke war. Da es sich bei FKBP5 jedoch um ein Gen handelt, das zwar androgenreguliert ist (Febbo et al., 2005), aber in den unterschiedlichsten Geweben exprimiert wird (Baughman et al., 1997) und dort diverse Funktionen vermittelt (Li et al., 2011), wurde die Effizienz der Hormonantwort von LNCaP-Sphäroide im Cryogel anhand prostatakrebsspezifischer Gene beurteilt.

Für die Analyse der Hormonantwort prostatakrebsspezifischer Gene wurde die Expression der Gene für die transmembrane Protease Serin 2 (TMPRSS2) und das pros-

tataspezifische Antigen (PSA) studiert. Bei TMPRSS2 handelt es sich um ein androgenreguliertes Gen (Lin et al., 1999), dessen Expression im Rahmen der TMPRSS2-ETS-Fusion in ungefähr 50 % aller Prostatakarzinome feststellbar ist (Tomlins et al., 2005). Das Gen für PSA ist ebenfalls androgenreguliert (Young et al., 1991) und wird in epithelialen Prostatakrebszellen exprimiert (Mize et al., 2008). PSA stellt neben TMPRSS2 einen der wichtigsten Biomarker in der Diagnose und Prognose von Prostatakrebs dar (Saini, 2016). Während der Analyse der Hormoninduktion beider Gene konnte gezeigt werden, dass die Expression von TMPRSS2 und besonders von PSA in LNCaP-Sphäroiden des Cryogels, im Vergleich zur 2D-Zellkultur, erhöht war, was darauf schließen lässt, dass die Verwendung von PEGda575-Cryogelen von Vorteil ist um die Hormonregulation wichtiger prostatakrebspezifischer Gene beurteilen zu können.

Um zu erörtern, in wieweit die Genexpression von LNCaP-Sphäroide in PEGda575-Cryogelen mit der Situation *in vivo* vergleichbar ist, wurde parallel zur Expression von TMPRSS2 und PSA die Expression von Kallikrein 2 (KLK2) und dem Zink- α 2-Glykoprotein (AZGP1) analysiert. Die Expression aller vier Gene wurde zwischen der konventionellen 2D-Zellkultur, den PEGda575-Cryogelen und LNCaP-Tumoren aus Xenograftmodellen verglichen. Dabei zeigte sich erneut, dass im Vergleich zur 2D-Zellkultur die Expression von TMPRSS2 und PSA im Cryogel erhöht und zusätzlich mit der Expression in LNCaP-Tumoren vergleichbar war. Dasselbe Expressionsmuster konnte für KLK2 beobachtet werden. Weiterhin war die Expression von AZGP1 im Cryogel und in LNCaP-Tumoren geringer als in der konventionellen 2D-Zellkultur. Wie PSA und TMPRSS2 sind auch KLK2 und AZGP1 prostatakrebspezifische Gene (Borgono et al., 2004; Sanchez et al., 1997), die als prognostische Marker immer mehr an Bedeutung gewinnen. Dabei zeigt sich im Falle von KLK2 häufig eine verstärkte Expression in fortgeschrittenen Stadien von Prostatakrebs (Shang et al., 2014). Im Vergleich dazu ist eine schwache Expression von AZGP1 in malignen Prostatageweben mit einem hohen Grad der Entdifferenzierung assoziiert (Hale et al., 2001) und wird ebenfalls als Marker für die Metastasierung von Prostatakarzinomen nach radikaler Prostatektomie eingesetzt (Lapointe et al., 2004). Durch die Analyse der Genexpression von TMPRSS2, PSA, KLK2 und AZGP1 konnte gezeigt werden, dass die Expression wichtiger prostatakrebspezifischer Gene in PEGda575-Cryogelen mit der Situation *in vivo* vergleichbar ist und diese als ein physiologisch relevantes Zellkulturmodell in der Prostatakrebsforschung eingesetzt werden können.

4.4. Analyse potentieller therapeutischer Substanzen in PEGda575-Cryogelen

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Expression prostatakrebspezifischer Gene in PEGda575-Cryogelen mit der Situation *in vivo* zu vergleichen ist, wurde auch ihre Eignung als Analyseplattform für die Studie potentieller therapeutischer Substanzen zur Behandlung von Prostatakrebs überprüft. Hierfür wurden zunächst LNCaP-Zellen mit einem Expressionsvektor für BAG1L, einem Mitglied der Familie BCL-2 assoziierter Athanogene 1 (BAG1) (Yang et al., 1998), transduziert und in PEGda575-Cryogelen kultiviert. BAG1L ist ein Protein, das in den sekretorischen Epithelzellen von Prostatakarzinomen exprimiert wird (Shatkina et al., 2003) und in späten Stadien der Erkrankung häufig überexprimiert ist (Maki et al., 2007). Das Protein BAG1L ist dabei in der Lage, über seinen C-Terminus mit dem N-Terminus des AR zu interagieren und dadurch dessen Transaktivierung, in Form eines Co-Regulators, zu erhöhen (Shatkina et al., 2003). Die BAG1L-vermittelte Transaktivierung des AR resultiert anschließend in der Transkription unterschiedlicher Gene, die in zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose involviert sind (Townsend et al., 2005).

Gemäß den beschriebenen Studien konnte in dieser Arbeit eine gesteigerte Proliferation von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen nachgewiesen werden, die in der Lage waren BAG1L zu überexprimieren. Um die Eignung von PEGda575-Cryogelen im Rahmen von Substanzanalysen schlussendlich aufklären zu können, wurde der Effekt von Thio-2, einem Derivat von Thioflavin-S (Kelenyi, 1967), auf das Wachstum BAG1L-überexprimierender LNCaP-Sphäroide im Cryogel überprüft. Studien über Thio-2 zeigten bereits, dass diese Substanz in der Lage ist, die BAG1L-vermittelte Proliferation in humanen Brustkrebszellen zu inhibieren (Enthammer et al., 2013). Damit ist Thio-2 ein potentieller Kandidat, der in der Lage sein könnte, die Interaktion von BAG1L mit dem AR zu unterbinden und dadurch seine Transaktivierung zu inhibieren. Ob diese Substanz in der Lage ist das Wachstum von Prostatakrebszellen zu blockieren und über welchen Mechanismus dieser Effekt von Thio-2 auf die proliferative Aktivität von Prostatakrebszellen zustande kommen könnte, wird jedoch noch erforscht (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrew C.B. Cato, unveröffentlichte Daten).

Bezüglich der Wirkung von Thio-2 auf BAG1L-exprimierende LNCaP-Sphäroide im PEGda575-Cryogel konnte in dieser Arbeit eine verstärkte anti-proliferative Wirkung

bei BAG1L-überexprimierenden LNCaP-Zellen und eine abgemilderte Wirkung auf LNCaP-Zellen mit endogener BAG1L-Expression ermittelt werden. Dieser Sachverhalt zeigt im Allgemeinen, dass Thio-2 in der Lage ist, das Wachstum von BAG1L-exprimierenden Prostatakrebszellen zu inhibieren und verdeutlicht im Speziellen, dass PEGda575-Cryogele für die Studie therapeutischer Substanzen geeignet sind. Während der in dieser Arbeit durchgeführten Substanzanalyse ermöglichte die Porosität des PEGda575-Cryogels das Zuleiten der zu testenden Substanz Thio-2 an bereits etablierte LNCaP-Sphäroide im Rahmen eines Interventionsversuches. Das Wachstum dieser LNCaP-Sphäroide wurde, während der Behandlung mit Thio-2, in einer für sie physiologisch relevanten Umgebung untersucht, die durch das Zusammenspiel von Porengröße und prostatakrebspezifischer Elastizität im PEGda575-Cryogel erreicht worden ist.

4.5. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PEGda575-Cryogele auf Grund ihrer Porosität, ihrer Porengröße und ihrer prostatakrebspezifischen Elastizität ein ausgezeichnetes Zellkultursystem zur Studie des Prostatakrebszellwachstums und der Analyse therapeutischer Substanzen darstellen.

Die Prostatakrebsforschung ist bis heute jedoch noch immer durch den Mangel geeigneter *in vitro* Modelle limitiert (Pienta et al., 2008; Toivanen et al., 2012). Besonders im Bereich der präklinischen Forschung geht man heute vermehrt dazu über, patienten-abgeleitete benigne Prostatazellen und Prostatakrebszellen zu studieren. Die in dieser Arbeit vorliegenden Studien über PEGda575-Cryogele und ihrer Anwendung zur Kultivierung von LNCaP-Zellen könnten dahingehend ausgeweitet werden, die Elastizität dieser Cryogele auf die Elastizität benigner Prostatagewebe anzupassen um darin ihre Zellphysiologie zu analysieren. Weiterhin wäre vorstellbar, PEGda575-Cryogele für die experimentelle Studie patienten-abgeleiteter Prostatakrebszellen vorzubereiten, was neue Möglichkeiten im Bereich der präklinischen Forschung von Prostatakrebs eröffnen würde. Im Bereich der Arzneimittelenwicklung wäre es möglich, PEGda575-Cryogele auf Hochdurchsatzformate zu binden und diese dann in Screeningverfahren für die Beurteilung potentieller therapeutischer Substanzen zur Behandlung von Prostatakrebs einzusetzen.

Literaturverzeichnis

Ahmed EM (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res* 6, 105-121.

Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Rowley JA, Mooney DJ (2002). Engineering growing tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12025-12030.

Alvarez-Perez J, Ballesteros P, Cerdan S (2005). Microscopic images of intraspheroidal pH by ¹H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *MAGMA* 18, 293-301.

Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, Dehghani F (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue engineering Part B, Reviews* 16, 371-383.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G (2015). Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International journal of molecular sciences* 16, 5517-5527.

Barrie SE, Haynes BP, Potter GA, Chan FC, Goddard PM, Dowsett M, Jarman M (1997). Biochemistry and pharmacokinetics of potent non-steroidal cytochrome P450(17 α) inhibitors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 60, 347-351.

Basch E, Loblaw DA, Oliver TK, Carducci M, Chen RC, Frame JN, Garrels K, Hotte S, Kattan MW, Raghavan D, Saad F, Taplin ME, Walker-Dilks C, Williams J, Winquist E, Bennett CL, Wootton T, Rumble RB, Dusetzina SB, Virgo KS (2014). Systemic therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: American Society of Clinical Oncology and Cancer Care Ontario clinical practice guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32, 3436-3448.

Baughman G, Wiederrecht GJ, Chang F, Martin MM, Bourgeois S (1997). Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition. *Biochemical and biophysical research communications* 232, 437-443.

Beltran H, Rickman DS, Park K, Chae SS, Sboner A, MacDonald TY, Wang Y, Sheikh KL, Terry S, Tagawa ST, Dhir R, Nelson JB, de la Taille A, Allory Y, Gerstein MB, Perner S, Pienta KJ, Chinnaiyan AM, Wang Y, Collins CC, Gleave ME, Demichelis F, Nanus DM, Rubin MA (2011). Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discov* 1, 487-495.

Bloch K, Lozinsky VI, Galaev IY, Yavriyantz K, Vorobeychik M, Azarov D, Damshkaln LG, Mattiasson B, Vardi P (2005). Functional activity of insulinoma cells (INS-1E) and pancreatic islets cultured in agarose cryogel sponges. *Journal of biomedical materials research Part A* 75, 802-809.

- Boehm K, Salomon G, Beyer B, Schiffmann J, Simonis K, Graefen M, Budaus L (2015). Shear wave elastography for localization of prostate cancer lesions and assessment of elasticity thresholds: implications for targeted biopsies and active surveillance protocols. *The Journal of urology* 193, 794-800.
- Borgono CA, Michael IP, Diamandis EP (2004). Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Molecular cancer research : MCR* 2, 257-280.
- Brandl F, Sommer F, Goepferich A (2007). Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials* 28, 134-146.
- Bryant SJ, Anseth KS (2002). Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *Journal of biomedical materials research* 59, 63-72.
- Buxton AN, Zhu J, Marchant R, West JL, Yoo JU, Johnstone B (2007). Design and characterization of poly(ethylene glycol) photopolymerizable semi-interpenetrating networks for chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering* 13, 2549-2560.
- Campana C, Rege J, Turcu AF, Pezzi V, Gomez-Sanchez CE, Robins DM, Rainey WE (2016). Development of a novel cell based androgen screening model. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 156, 17-22.
- Capranico G, De Isabella P, Tinelli S, Bigioni M, Zunino F (1993). Similar sequence specificity of mitoxantrone and VM-26 stimulation of in vitro DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II. *Biochemistry* 32, 3038-3046.
- Chen CS, Tan J, Tien J (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annual review of biomedical engineering* 6, 275-302.
- Chiang SY, Azizkhan JC, Beerman TA (1998). A comparison of DNA-binding drugs as inhibitors of E2F1- and Sp1-DNA complexes and associated gene expression. *Biochemistry* 37, 3109-3115.
- Christofori G, Semb H (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Clapper ML, Cooper HS, Chang WC (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta Pharmacol Sin* 28, 1450-1459.
- Clevert DA, Stock K, Klein B, Slotta-Huspenina J, Prantl L, Heemann U, Reiser M (2009). Evaluation of Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) imaging and contrast-enhanced ultrasound in renal tumors of unknown etiology in comparison to histological findings. *Clin Hemorheol Microcirc* 43, 95-107.
- Crawford ED (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 62, 3-12.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology* 14, 633-639.

- Cunningham D, You Z (2015). In vitro and in vivo model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods* 2.
- Cushing MC, Anseth KS (2007). Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science* 316, 1133-1134.
- Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced drug delivery reviews* 60, 215-228.
- de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, Gravis G, Bodrogi I, Mackenzie MJ, Shen L, Roessner M, Gupta S, Sartor AO, Investigators T (2010). Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 376, 1147-1154.
- Denmeade SR, Isaacs JT (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews Cancer* 2, 389-396.
- Drewitz M, Helbling M, Fried N, Bieri M, Moritz W, Lichtenberg J, Kelm JM (2011). Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues. *Biotechnology journal* 6, 1488-1496.
- Drost J, Karthaus WR, Gao D, Driehuis E, Sawyers CL, Chen Y, Clevers H (2016). Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue. *Nat Protoc* 11, 347-358.
- Drury JL, Mooney DJ (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4351.
- Emonard H, Grimaud JA, Nusgens B, Lapiere CM, Foidart JM (1987). Reconstituted basement-membrane matrix modulates fibroblast activities in vitro. *Journal of cellular physiology* 133, 95-102.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.
- Engler AJ, Sweeney HL, Discher DE, Schwarzbauer JE (2007). Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 7, 335.
- Enthammer M, Papadakis ES, Salome Gachet M, Deutsch M, Schwaiger S, Koziel K, Ashraf MI, Khalid S, Wolber G, Packham G, Cutress RI, Stuppner H, Troppmair J (2013). Isolation of a novel thioflavin S-derived compound that inhibits BAG-1-mediated protein interactions and targets BRAF inhibitor-resistant cell lines. *Molecular cancer therapeutics* 12, 2400-2414.
- Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, Grading C (2016). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *The American journal of surgical pathology* 40, 244-252.

Febbo PG, Lowenberg M, Thorner AR, Brown M, Loda M, Golub TR (2005). Androgen mediated regulation and functional implications of fkbp51 expression in prostate cancer. *The Journal of urology* 173, 1772-1777.

Fizazi K, Scher HI, Molina A, Logothetis CJ, Chi KN, Jones RJ, Staffurth JN, North S, Vogelzang NJ, Saad F, Mainwaring P, Harland S, Goodman OB, Jr., Sternberg CN, Li JH, Kheoh T, Haqq CM, de Bono JS, Investigators C-A- (2012). Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *The Lancet Oncology* 13, 983-992.

Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977). Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.

Freedland SJ, Partin AW (2005). Dawning of the age of chemotherapy for prostate cancer. *Rev Urol* 7, 110-112.

Frey O, Misun PM, Fluri DA, Hengstler JG, Hierlemann A (2014). Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nature communications* 5, 4250.

Gagne D, Groulx JF, Benoit YD, Basora N, Herring E, Vachon PH, Beaulieu JF (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *Journal of cellular physiology* 222, 387-400.

Gao D, Vela I, Sboner A, Iaquina PJ, Karthaus WR, Gopalan A, Dowling C, Wanjala JN, Undvall EA, Arora VK, Wongvipat J, Kossai M, Ramazanoglu S, Barboza LP, Di W, Cao Z, Zhang QF, Sirota I, Ran L, MacDonald TY, Beltran H, Mosquera JM, Touijer KA, Scardino PT, Laudone VP, Curtis KR, Rathkopf DE, Morris MJ, Danila DC, Slovin SF, Solomon SB, Eastham JA, Chi P, Carver B, Rubin MA, Scher HI, Clevers H, Sawyers CL, Chen Y (2014). Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 159, 176-187.

Gerecht S, Townsend SA, Pressler H, Zhu H, Nijst CL, Bruggeman JP, Nichol JW, Langer R (2007). A porous photocurable elastomer for cell encapsulation and culture. *Biomaterials* 28, 4826-4835.

Gillet JP, Calcagno AM, Varma S, Marino M, Green LJ, Vora MI, Patel C, Orina JN, Eliseeva TA, Singal V, Padmanabhan R, Davidson B, Ganapathi R, Sood AK, Rueda BR, Ambudkar SV, Gottesman MM (2011). Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 18708-18713.

Gohji K, Nakajima M, Dinney C, Fan D, Pathak S, Killion J, Voneschenbach A, Fidler I (1993). The importance of orthotopic implantation to the isolation and biological characterization of a metastatic human clear cell renal-carcinoma in nude-mice. *International journal of oncology* 2, 23-32.

Greaves M, Maley CC (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306-313.

- Grenier N, Gennisson JL, Cornelis F, Le Bras Y, Couzi L (2013). Renal ultrasound elastography. *Diagn Interv Imaging* 94, 545-550.
- Grimm PD, Blasko JC, Sylvester JE, Meier RM, Cavanagh W (2001). 10-year biochemical (prostate-specific antigen) control of prostate cancer with (125)I brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 31-40.
- Gurski LA, Jha AK, Zhang C, Jia X, Farach-Carson MC (2009). Hyaluronic acid-based hydrogels as 3D matrices for in vitro evaluation of chemotherapeutic drugs using poorly adherent prostate cancer cells. *Biomaterials* 30, 6076-6085.
- Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W, Madden JF (2001). Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7, 846-853.
- Hara R, Jo Y, Fujii T, Kondo N, Yokoyama T, Miyaji Y, Nagai A (2008). Optimal approach for prostate cancer detection as initial biopsy: prospective randomized study comparing transperineal versus transrectal systematic 12-core biopsy. *Urology* 71, 191-195.
- Heinlein CA, Chang C (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25, 276-308.
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Maelandt GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A (2014). Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 4, 998-1013.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, Sandberg AA (1980). The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in clinical and biological research* 37, 115-132.
- Hu R, Denmeade SR, Luo J (2010). Molecular processes leading to aberrant androgen receptor signaling and castration resistance in prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab* 5, 753-764.
- Huang S, Ingber DE (2005). Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer cell* 8, 175-176.
- Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* 10, 1886-1890.
- Hutmacher DW (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21, 2529-2543.
- Ivanovska J, Zehnder T, Lennert P, Sarker B, Boccaccini AR, Hartmann A, Schneider-Stock R, Detsch R (2016). Biofabrication of 3D Alginate-Based Hydrogel for Cancer Research: Comparison of Cell Spreading, Viability, and Adhesion Characteristics of Colorectal HCT116 Tumor Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 22, 708-715.

John H, Hauri D (2000). Seminal vesicle-sparing radical prostatectomy: a novel concept to restore early urinary continence. *Urology* 55, 820-824.

Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA (2001). Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British journal of cancer* 84, 1424-1431.

Johnson T, Bahrapourian R, Patel A, Mequanint K (2010). Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens. *Biomed Mater Eng* 20, 107-118.

Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research* 56, 816-825.

Jordan MA, Wilson L (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews Cancer* 4, 253-265.

Kaemmerer E, Melchels FP, Holzapfel BM, Meckel T, Hutmacher DW, Loessner D (2014). Gelatine methacrylamide-based hydrogels: an alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomater* 10, 2551-2562.

Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z (1986). Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs Ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) and their ability to condense nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6302-6306.

Karthaus WR, Iaquina PJ, Drost J, Gracanin A, van Boxtel R, Wongvipat J, Dowling CM, Gao D, Begthel H, Sachs N, Vries RG, Cuppen E, Chen Y, Sawyers CL, Clevers HC (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 159, 163-175.

Kelenyi G (1967). On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J Histochem Cytochem* 15, 172-180.

Kelm JM, Fussenegger M (2004). Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends in biotechnology* 22, 195-202.

Khademhosseini A, Langer R (2007). Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 28, 5087-5092.

Klein KA, Reiter RE, Redula J, Moradi H, Zhu XL, Brothman AR, Lamb DJ, Marcelli M, Beldegrun A, Witte ON, Sawyers CL (1997). Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. *Nat Med* 3, 402-408.

Komori T. SR (1989). On Tanaka-Fillmore's kinetics swelling of gels. *Colloid Polym Sci* 267, 179-183.

Krouskop TA, Wheeler TM, Kallel F, Garra BS, Hall T (1998). Elastic moduli of breast and prostate tissues under compression. *Ultrasonic imaging* 20, 260-274.

Kumar A, Bansal V, Nandakumar KS, Galaev IY, Roychoudhury PK, Holmdahl R, Mattiasson B (2006). Integrated bioprocess for the production and isolation of urokinase from animal cell culture using supermacroporous cryogel matrices. *Biotechnology and bioengineering* 93, 636-646.

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nature reviews Cancer* 8, 497-511.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, Tibshirani R, Botstein D, Brown PO, Brooks JD, Pollack JR (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 811-816.

Lee J, Cuddihy MJ, Kotov NA (2008). Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue engineering Part B, Reviews* 14, 61-86.

Lee KY, Mooney DJ (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews* 101, 1869-1879.

Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139, 891-906.

Li L, Lou Z, Wang L (2011). The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *British journal of cancer* 104, 19-23.

Lien SM, Ko LY, Huang TJ (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 5, 670-679.

Lin B, Ferguson C, White JT, Wang S, Vessella R, True LD, Hood L, Nelson PS (1999). Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer research* 59, 4180-4184.

Lin D, Wyatt AW, Xue H, Wang Y, Dong X, Haegert A, Wu R, Brahmabhatt S, Mo F, Jong L, Bell RH, Anderson S, Hurtado-Coll A, Fazli L, Sharma M, Beltran H, Rubin M, Cox M, Gout PW, Morris J, Goldenberg L, Volik SV, Gleave ME, Collins CC, Wang Y (2014). High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development. *Cancer research* 74, 1272-1283.

Lin RZ, Chang HY (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal* 3, 1172-1184.

Lin S, Sangaj N, Razafiarison T, Zhang C, Varghese S (2011). Influence of physical properties of biomaterials on cellular behavior. *Pharm Res* 28, 1422-1430.

Liu J, Tan Y, Zhang H, Zhang Y, Xu P, Chen J, Poh YC, Tang K, Wang N, Huang B (2012a). Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nat Mater* 11, 734-741.

- Liu X, Ory V, Chapman S, Yuan H, Albanese C, Kallakury B, Timofeeva OA, Nealon C, Dakic A, Simic V, Haddad BR, Rhim JS, Dritschilo A, Riegel A, McBride A, Schlegel R (2012b). ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology* 180, 599-607.
- Loh QL, Choong C (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue engineering Part B, Reviews* 19, 485-502.
- Lotan TL, Gupta NS, Wang W, Toubaji A, Haffner MC, Chaux A, Hicks JL, Meeker AK, Bieberich CJ, De Marzo AM, Epstein JI, Netto GJ (2011). ERG gene rearrangements are common in prostatic small cell carcinomas. *Mod Pathol* 24, 820-828.
- Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM (2014). Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology* 3, 345-367.
- Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B (2003). Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in biotechnology* 21, 445-451.
- Luebeck EG (2010). Cancer: Genomic evolution of metastasis. *Nature* 467, 1053-1055.
- Ma X, Ziel-van der Made AC, Autar B, van der Korput HA, Vermeij M, van Duijn P, Cleutjens KB, de Krijger R, Krimpenfort P, Berns A, van der Kwast TH, Trapman J (2005). Targeted biallelic inactivation of Pten in the mouse prostate leads to prostate cancer accompanied by increased epithelial cell proliferation but not by reduced apoptosis. *Cancer research* 65, 5730-5739.
- Maki HE, Saramaki OR, Shatkina L, Martikainen PM, Tammela TL, van Weerden WM, Vessella RL, Cato AC, Visakorpi T (2007). Overexpression and gene amplification of BAG-1L in hormone-refractory prostate cancer. *The Journal of pathology* 212, 395-401.
- Manfredi JJ, Horwitz SB (1984). Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther* 25, 83-125.
- Martins RF, Plieva FM, Santos A, Hatti-Kaul R (2003). Integrated immobilized cell reactor-adsorption system for beta-cyclodextrin production: a model study using PVA-cryogel entrapped *Bacillus agaradhaerens* cells. *Biotechnol Lett* 25, 1537-1543.
- Mironi-Harpaz I, Wang DY, Venkatraman S, Seliktar D (2012). Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater* 8, 1838-1848.
- Mize GJ, Wang W, Takayama TK (2008). Prostate-specific kallikreins-2 and -4 enhance the proliferation of DU-145 prostate cancer cells through protease-activated receptors-1 and -2. *Molecular cancer research : MCR* 6, 1043-1051.
- Morton CL, Houghton PJ (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2, 247-250.

Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, Bueti G, Shah RB, Gaston S, Tomlins SA, Wei JT, Kearney MC, Johnson LA, Tang JM, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Sanda MG (2009). Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 4706-4711.

Moustakas A, Heldin CH (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science* 98, 1512-1520.

Mueller-Klieser W (1984). Method for the determination of oxygen consumption rates and diffusion coefficients in multicellular spheroids. *Biophys J* 46, 343-348.

Nag S, Beyer D, Friedland J, Grimm P, Nath R (1999). American Brachytherapy Society (ABS) recommendations for transperineal permanent brachytherapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44, 789-799.

Nishio A, Uyeki EM (1983). Cellular uptake and inhibition of DNA synthesis by dihydroxyanthraquinone and two analogues. *Cancer research* 43, 1951-1956.

Nyga A, Cheema U, Loizidou M (2011). 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of cell communication and signaling* 5, 239-248.

Okada H, Tsubura A, Okamura A, Senzaki H, Naka Y, Komatz Y, Morii S (1992). Keratin profiles in normal/hyperplastic prostates and prostate carcinoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421, 157-161.

Okay O (2009). *General Properties of Hydrogels*. 6, 1-14.

Okay O (2014). Synthesis and Structure-Property Relationships of Cryogels. In *Polymeric Cryogels - Macroporous Gels with Remarkable Properties*, O. Okay, ed. (Advances in Polymer Science: Springer), p. 323.

Panneton RG, E. (2005). A Missing Mass Method to Measure the Open Porosity of Porous Solids. *Acta Acust united Ac* 91, 342-348 (347).

Park KH, Na K, Chung HM (2005). Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix. *Biotechnol Lett* 27, 227-231.

Parsons JK, Gage WR, Nelson WG, De Marzo AM (2001). p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. *Urology* 58, 619-624.

Patel PN, Gobin AS, West JL, Patrick CW, Jr. (2005). Poly(ethylene glycol) hydrogel system supports preadipocyte viability, adhesion, and proliferation. *Tissue engineering* 11, 1498-1505.

Pathak A (2011). Biophysical regulation of tumor cell invasion: moving beyond matrix stiffness. *Integr Biol*.

Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J (2000). Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual review of biomedical engineering* 2, 9-29.

Pienta KJ, Abate-Shen C, Agus DB, Attar RM, Chung LW, Greenberg NM, Hahn WC, Isaacs JT, Navone NM, Peehl DM, Simons JW, Solit DB, Soule HR, VanDyke TA, Weber MJ, Wu L, Vessella RL (2008). The current state of preclinical prostate cancer animal models. *The Prostate* 68, 629-639.

Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B (2007). Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *Journal of separation science* 30, 1657-1671.

Potter OG, Hilder EF (2008). Porous polymer monoliths for extraction: diverse applications and platforms. *Journal of separation science* 31, 1881-1906.

Ragde H, Grado GL, Nadir B, Elgamal AA (2000). Modern prostate brachytherapy. *CA Cancer J Clin* 50, 380-393.

Rowlands MG, Barrie SE, Chan F, Houghton J, Jarman M, McCague R, Potter GA (1995). Esters of 3-pyridylacetic acid that combine potent inhibition of 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase (cytochrome P45017 alpha) with resistance to esterase hydrolysis. *Journal of medicinal chemistry* 38, 4191-4197.

Rubin MA (2012). ETS rearrangements in prostate cancer. *Asian journal of andrology* 14, 393-399.

Rubio-Viqueira B, Hidalgo M (2009). Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* 85, 217-221.

Saini S (2016). PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr)* 39, 97-106.

Sanchez LM, Lopez-Otin C, Bjorkman PJ (1997). Biochemical characterization and crystalization of human Zn-alpha2-glycoprotein, a soluble class I major histocompatibility complex homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4626-4630.

Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, Forbes SJ, Wells RG, Iredale JP (2011). Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53, 1192-1205.

Shang Z, Niu Y, Cai Q, Chen J, Tian J, Yeh S, Lai KP, Chang C (2014). Human kallikrein 2 (KLK2) promotes prostate cancer cell growth via function as a modulator to promote the ARA70-enhanced androgen receptor transactivation. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 1881-1890.

Shatkina L, Mink S, Rogatsch H, Klocker H, Langer G, Nestl A, Cato AC (2003). The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor. *Molecular and cellular biology* 23, 7189-7197.

- Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *Journal of immunology* 174, 6477-6489.
- Sieh S, Taubenberger AV, Rizzi SC, Sadowski M, Lehman ML, Rockstroh A, An J, Clements JA, Nelson CC, Hutmacher DW (2012). Phenotypic characterization of prostate cancer LNCaP cells cultured within a bioengineered microenvironment. *PLoS one* 7, e40217.
- Silva AK, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW (2009). Growth factor delivery approaches in hydrogels. *Biomacromolecules* 10, 9-18.
- Sonn GA, Aronson W, Litwin MS (2005). Impact of diet on prostate cancer: a review. *Prostate cancer and prostatic diseases* 8, 304-310.
- Soofi SS, Last JA, Liliensiek SJ, Nealey PF, Murphy CJ (2009). The elastic modulus of Matrigel as determined by atomic force microscopy. *J Struct Biol* 167, 216-219.
- Szot CS, Buchanan CF, Freeman JW, Rylander MN (2011). 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials* 32, 7905-7912.
- Taplin ME, Balk SP (2004). Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *Journal of cellular biochemistry* 91, 483-490.
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews Clinical oncology* 9, 338-350.
- Tibbitt MW, Anseth KS (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering* 103, 655-663.
- Tilghman RW, Cowan CR, Mih JD, Koryakina Y, Gioeli D, Slack-Davis JK, Blackman BR, Tschumperlin DJ, Parsons JT (2010). Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype. *PLoS one* 5, e12905.
- Timmins NE, Nielsen LK (2007). Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods in molecular medicine* 140, 141-151.
- Toivanen R, Taylor RA, Pook DW, Ellem SJ, Risbridger GP (2012). Breaking through a roadblock in prostate cancer research: an update on human model systems. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 131, 122-131.
- Tolis G, Ackman D, Stellos A, Mehta A, Labrie F, Fazekas AT, Comaru-Schally AM, Schally AV (1982). Tumor growth inhibition in patients with prostatic carcinoma treated with luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 1658-1662.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-648.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87-108.

Townsend PA, Stephanou A, Packham G, Latchman DS (2005). BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 251-259.

Tran RT, Naseri E, Kolasnikov A, Bai X, Yang J (2011). A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering. *Biotechnol Appl Biochem* 58, 335-344.

Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 136, 473-478.

van Weerden WM, Romijn JC (2000). Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. *The Prostate* 43, 263-271.

Wang HB, Dembo M, Wang YL (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *American journal of physiology Cell physiology* 279, C1345-1350.

Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, Cao M, Chen WG, Goetz L, Xue H, Sadar M, Shappell SB, Cunha GR, Hayward SW (2005). Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *The Prostate* 64, 149-159.

Weber LM, Hayda KN, Anseth KS (2008). Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A* 14, 1959-1968.

Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17, 1-15.

Williams SL, Eccleston ME, Slater NK (2005). Affinity capture of a biotinylated retrovirus on macroporous monolithic adsorbents: towards a rapid single-step purification process. *Biotechnology and bioengineering* 89, 783-787.

Williamson SR, Zhang S, Yao JL, Huang J, Lopez-Beltran A, Shen S, Osunkoya AO, MacLennan GT, Montironi R, Cheng L (2011). ERG-TMPRSS2 rearrangement is shared by concurrent prostatic adenocarcinoma and prostatic small cell carcinoma and absent in small cell carcinoma of the urinary bladder: evidence supporting monoclonal origin. *Mod Pathol* 24, 1120-1127.

Wong YN, Ferraldeschi R, Attard G, de Bono J (2014). Evolution of androgen receptor targeted therapy for advanced prostate cancer. *Nature reviews Clinical oncology* 11, 365-376.

Xu G, Yin F, Wu H, Hu X, Zheng L, Zhao J (2014). In vitro ovarian cancer model based on three-dimensional agarose hydrogel. *J Tissue Eng* 5, 2041731413520438.

Yang F, Williams CG, Wang DA, Lee H, Manson PN, Elisseeff J (2005). The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 26, 5991-5998.

Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater MM, Pater A, Tang SC (1998). Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene* 17, 981-989.

Yates LR, Campbell PJ (2012). Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13, 795-806.

Young CY, Montgomery BT, Andrews PE, Qui SD, Bilhartz DL, Tindall DJ (1991). Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer research* 51, 3748-3752.

Zellander A, Mahksous M, Cho M (2013). Mechanical Diversity of Porous Poly (Ethylene Glycol) Diacrylate. *Advance in Biomedical Engineering Research* 1, 7.

Abkürzungsverzeichnis

A-498	humane Nierenkarzinomzelllinie
APS	Ammoniomperoxidsulfat
AR	Androgenrezeptor
AZGP1	Zink-alpha-2-Glykoprotein
CCS	charcoal stripped serum, Aktivkohle-gereinigtes Serum
CRPC	castration resistant prostate cancer, kastrationsresistentes Prostatakarzinom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESEM	Environmental scanning electron microscopy, Umgebungsrastrerelektronenmikroskopie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal calv serum, Fetales Kälberserum
FKBP5	FK506-bindendes Protein 5
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GnRHR	Gonadotropin-Releasing-Hormon-Rezeptor
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IF	Immunfluoreszenzfärbung
KLK2	Kallikrein 2
KLK3	Kallikrein 3
LH	Luteinisierendes Hormon
LHR	Luteinisierendes Hormon Rezeptor
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate, humane Prostatakarzinomzelllinie isoliert aus Lymphknotenmetastasen
MMP	Matrixmetalloproteinase
MW	molecular weight, Molekulargewicht
NEPC	neuroendocrine prostate cancer, neuroendokrines Prostatakarzinom

PDX	patient-derived Xenograftmodels, patienten-abgeleitete Xenograftmodelle
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEGda	Polyethylenglykoldiacrylat
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PVA	Polyvinylalkohol
Q1	Unteres Quantil
Q3	Oberes Quantil
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin (R), Glycin (G), Asparaginsäure (D)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serin 2
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.** Übersicht gängiger Anti-Hormontherapien zur Behandlung von Prostatakrebs im fortgeschrittenem Stadium. **S. 4**
- Abbildung 2.** Schematische Darstellung eines Sphäroids und seiner Interaktionen mit der EZM. **S. 11**
- Abbildung 3.** Polymerisation von PEGda bei zwei unterschiedlichen Temperaturen. **S. 44**
- Abbildung 4.** Vergleich der Porenanalyse von Hydrogelen und Cryogelen. **S. 45**
- Abbildung 5.** Beurteilung der Elastizität von Cryogelen aus unterschiedlichen PEGda-Monomeren. **S. 47**
- Abbildung 6.** Aufklärung der Architektur von PEGda575-Cryogelen. **S. 49**
- Abbildung 7.** Analyse der Reproduzierbarkeit von PEGda575-Cryogelsynthesen. **S. 51**
- Abbildung 8.** Auswertung der Verteilung von LNCaP-Sphäroiden in PEGda575-Cryogelen nach 21 Tagen in Kultur. **S. 52**
- Abbildung 9.** Aufklärung der Interaktion von Sphäroiden aus LNCaP-Zellen mit den Porenwänden des PEGda575-Cryogels. **S. 54**
- Abbildung 10.** Überprüfung physikalischer und mechanischer Eigenschaften von PEGda575-Cryogelen während der Zellkultur. **S. 55**
- Abbildung 11.** Analyse des Wachstums von LNCaP-Zellen in PEGda575-Cryogelen und hängenden Tropfen. **S. 56**
- Abbildung 12.** Beurteilung der Morphologie von LNCaP-Sphäroiden in Cryogelen und hängenden Tropfen. **S. 57**
- Abbildung 13.** Analyse des Wachstums von A-498 Zellen in PEGda575-Cryogelen. **S. 58**
- Abbildung 14.** Aufklärung des androgenabhängigen Wachstums von LNCaP-Zellen in Cryogelen. **S. 60**
- Abbildung 15.** Auswertung der AR-Induktion im Cryogel nach Behandlung mit DHT. **S. 61**
- Abbildung 16.** Vergleich der androgenregulierten Genexpression in der 2D-Zellkultur und im Cryogel. **S. 63**

- Abbildung 17.** Vergleich der Genexpression prostatakrebspezifischer Gene in 2D-Zellkultur, Cryogelen und Xenografts. **S. 64**
- Abbildung 18.** Analyse des Wachstums von BAG1L-exprimierenden Zellen in PEGda575-Cryogelen. **S. 66**
- Abbildung 19.** Beurteilung des Einflusses von Thio-2 auf das Wachstum von BAG1L-exprimierenden LNCaP-Zellen im PEGda575-Cryogel. **S. 67**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Zellgerüstträger aus natürlichen Polymeren in der Krebsforschung.	S. 15
Tabelle 2:	Auflistung der verwendeten Zelllinien.	S. 24
Tabelle 3.	Auflistung verwendeter Versuchstiere.	S. 24
Tabelle 4:	Auflistung der verwendeten Primärantikörper.	S. 24
Tabelle 5:	Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.	S. 25
Tabelle 6:	Auflistung der verwendeten Primersequenzen.	S. 25
Tabelle 7:	Verfahren zum Prozessieren bewachsener Cryogele und Sphäroiden aus der hängenden Tropfen-Methode.	S. 33
Tabelle 8:	Übersicht über die HE-Färbung von histologischen Schnitten.	S. 34
Tabelle 9:	Übersicht über den DNase-Verdau vor reverser Transkription.	S. 36
Tabelle 10:	Pipettierschema für die reverse Transkription.	S. 37
Tabelle 11:	Übersicht über die Inkubationsschritte der reversen Transkription.	S. 37
Tabelle 12:	Pipettierschema für der Kontroll-PCR gegen humanes β -Aktin.	S. 37
Tabelle 13:	PCR-Programm zur Amplifikation des humanen β -Aktin.	S. 38

Lebenslauf

Persönliche Informationen:

NAME: Göppert, Bettina Natalie
GEBURTSDATUM: 24.12.1981
GEBURTSORT: Karlsruhe

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

2013 – Heute Doktorandin seit 01. Mai 2013
Institut für Mikrostrukturtechnik
Karlsruher Institut für Technologie, Campus Nord

2007 – 2013 Studium der Biologie
Karlsruher Institut für Technologie, Campus Süd

2003 – 2006 Ausbildung zur medizinisch-technischen Laborassistentin
(MTA)
Städtisches Klinikum Karlsruhe

2002 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Helmholtz Gymnasium, Karlsruhe

Publikationen:

Patent:

2016: 3D-Zellkultursystem, dessen Herstellung und Verwendung
Publikationsnummer: WO2016020050 A1
Antragsnummer: PCT/EP2015/001586
Veröffentlichungsdatum: 11. Februar 2016
Erfinder: Dr. Friederike J. Gruhl, Dipl. Biol. **Bettina Göppert**,
Prof. Dr. Andrew C. B. Cato, Dr. Antje Neeb

Publikationen als Erstautor:

2016: Superporous Poly(ethylene glycol) Diacrylate Cryogel with a Defined Elastic Modulus for Prostate Cancer Cell Research

doi: 10.1002/smil.201600683

Autoren: Bettina Göppert, Thomas Sollich, Paul Abaffy, Jan Heckmann, Antje Neeb, Anne Bäcker, Tilo Baumbach, Friederike J. Gruhl, Andrew C. B. Cato

Cancer Treatment: Superporous Poly(ethylene glycol) Diacrylate Cryogel with a Defined Elastic Modulus for Prostate Cancer Cell Research

doi: 10.1002/smil.201670146

Autoren: Bettina Göppert, Thomas Sollich, Paul Abaffy, Jan Heckmann, Antje Neeb, Anne Bäcker, Tilo Baumbach, Friederike J. Gruhl, Andrew C. B. Cato

Publikationen als Coautor:

2016 Silk scaffolds connected with different naturally occurring biomaterials for prostate cancer cell cultivation in 3D.

Autoren: Anne Bäcker, Olga Erhardt, Lukas Wietbrock, Natalia Schel, Bettina Göppert, Marian Dirschka, Paul Abaffy, Thomas Sollich, Angelica Cecilia, Friederike J. Gruhl

doi: 10.1002/bip.22993

Impact of adjustable cryogel properties on the performance of prostate cancer cells in 3D.

Autoren: Anne Bäcker, Bettina Göppert, Sandra Sturm, Paul Abaffy, Thomas Sollich, Friederike J. Gruhl

doi: 10.1186/s40064-016-2629-z