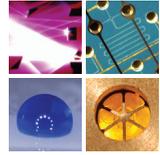


SCHRIFTEN DES INSTITUTS FÜR MIKROSTRUKTURTECHNIK
AM KARLSRUHER INSTITUT FÜR TECHNOLOGIE (KIT)



Band 35

ANNE BÄCKER

Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Cryogelbasis zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen

Anne Bäcker

**Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Cryogelbasis
zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen**

Schriften des Instituts für Mikrostrukturtechnik
am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Band 35

Hrsg. Institut für Mikrostrukturtechnik

Eine Übersicht aller bisher in dieser Schriftenreihe
erschienenen Bände finden Sie am Ende des Buchs.

Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Cryogelbasis zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen

von
Anne Bäcker

Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie
KIT-Fakultät für Maschinenbau

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2017
Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Guber
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Korvink
Dritter Gutachter: Prof. Dr. B. Wolf (TUM)

Impressum



Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
KIT Scientific Publishing
Straße am Forum 2
D-76131 Karlsruhe

KIT Scientific Publishing is a registered trademark
of Karlsruhe Institute of Technology.
Reprint using the book cover is not allowed.

www.ksp.kit.edu



*This document – excluding the cover, pictures and graphs – is licensed
under a Creative Commons Attribution-Share Alike 4.0 International License
(CC BY-SA 4.0): <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/deed.en>*



*The cover page is licensed under a Creative Commons
Attribution-No Derivatives 4.0 International License (CC BY-ND 4.0):
<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0/deed.en>*

Print on Demand 2017 – Gedruckt auf FSC-zertifiziertem Papier

ISSN 1869-5183
ISBN 978-3-7315-0676-8
DOI 10.5445/KSP/1000069956

Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Basis von Cryogelen zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Ingenieurwissenschaften

von der Fakultät für Maschinenbau
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. Anne Bäcker

aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2017

Erster Gutachter: Prof. Dr. A. Guber

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Korvink

Dritter Gutachter: Prof. Dr. B. Wolf (TUM)

*„Schreibe entweder etwas Lesenswertes oder tue etwas,
worüber es sich lohnt zu schreiben.“*
-Benjamin Franklin-

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Guber danke ich nicht nur für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Mikrostrukturtechnik am KIT-CN anfertigen zu können, sondern auch für das immer wieder gezeigte Interesse an den biologischen Themengebieten und die vielfältige Unterstützung. Außerdem bedanke ich mich für die Übernahme des Erstreferats.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jan G. Korvink und Prof. Dr. Bernhard Wolf für die Übernahme der Korreferate meiner Dissertation und dem damit entgegengebrachten Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Friederike J. Gruhl für die Betreuung im Laboralltag sowie der engagierten Auseinandersetzung mit neuen Themengebieten und wissenschaftlichen Fragestellungen. Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Kollegin Dipl.-Biol. Bettina Göppert für ihre Anleitung im Zellkulturlabor und der sehr angenehmen Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Andrew Cato und Dr. Antje Neeb vom Institut für Toxikologie und Genetik am KIT-CN danke ich für ihre Expertise im Bereich der Prostatakrebsforschung und für die zahlreichen Materialien und Hilfsmittel, ohne die eine erfolgreiche Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. Angelica Cecilia vom Institut für Photonik und Synchrotronstrahlung am KIT-CN für die harmonische Zusammenarbeit und ihrem stetigen Interesse an meiner Arbeit sowie dem gesamten Kollegium des IMT, im speziellen Herrn Paul Abaffy für die unzähligen Stunden am Rasterelektronenmikroskop.

Zuletzt gilt mein ganz persönlicher Dank meinem Lebensgefährten und meiner Familie, ohne deren liebevolle Unterstützung und unermüdliche Geduld, das wissenschaftliche Voranschreiten nicht möglich gewesen wäre.

Kurzfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden dreidimensionale (3D) Zellgerüstträger auf Basis von Cryogelen aus unterschiedlichen Polymeren entwickelt und anschließend zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen verwendet. Auf Grundlage des natürlich vorkommenden Seidenstrukturproteins, Fibroin, wurden außerdem verschieden zusammengesetzte Gerüststrukturen hergestellt, welche ebenfalls als Kultivierungsumgebung etablierter Prostatakrebszellen dienen.

Grundlage eines 3D Modellsystems gegenüber herkömmlichen Kultivierungsbedingungen ist eine Organismen-ähnliche Umgebung, in welcher die Zellen ein *in vivo*-nahes Verhalten inklusive zelltypischer Merkmale aufweisen. Dabei wird im Bereich der Krebsforschung zwischen Gerüst-freien bzw. Suspensions-basierten und Gerüst-basierten Modellen unterschieden. In beiden Fällen kommt es zur Bildung von multizellulären Aggregaten, sogenannten Sphäroiden, welche bezüglich ihrer Eigenschaften und Aussehen dem eines festen Tumors *in vivo* nahe kommen. Cryogele bestehen aus einer hochporösen Polymerstruktur und zählen aufgrund dessen zu den Gerüst-basierten Modellsystemen. Basierend auf ihrer Herstellungsweise ist es möglich die charakteristischen Merkmale, wie Porengröße und -form sowie die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften individuell zu verändern. Auf diese Weise ist eine spezifische Anwendung und Anpassung des Porensystems realisierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Etablierung eines geeigneten Herstellungsprotokolls auch die Auswirkungen der strukturtypischen Merkmale auf die kultivierten Prostatakrebszellen LNCaP und PC3 untersucht.

Ausgangspunkt der Cryogelsynthese bildeten die natürliche Polymere Natriumalginat und Gelatine sowie das synthetische Polymer Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), welche zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen und anschließend zu verschiedenen Gefrierzeiten und -temperaturen Cryogelproben formten. Die in diesem Zusammenhang veränderten struktu-

rellen Eigenschaften übten einen besonderen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen, die Zellmorphologie sowie die Sphäroidbildung bzw. -größe aus. Auf diese Weise konnte ein geeignetes und sehr vielversprechendes 3D Zellgerüst zur Kultivierung epithelialer Prostatakrebszellen (LNCaP und PC3) entwickelt und die Auswirkungen der umgebenden Matrix demonstriert werden.

Weiterhin wurde auf Basis des extrahierten Strukturproteins (Fibroin) des Seidenspinners *B.mori* und mit Hilfe der natürlichen Komponenten Kollagen, Gelatine, Chitosan, dem Seidenfibroin des Seidenspinners *A.pernyi* und dem rekombinanten Protein Spidroin (Spinnenseide) unterschiedlich zusammengesetzte Gerüststrukturen gebildet, welche sowohl die mechanischen Merkmale beeinflussen als auch die zelladhärenten Eigenschaften der reinen Seidenfibroingerüste verbessern sollten. Auf Grundlage der Cryogeltechnik konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass allein die Kombination verschiedener natürlicher Materialien mit dem Seidenfibroin des Seidenspinners *B.mori* eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung strukturspezifischer Merkmale spielt. Die erzeugten Gerüstvariationen dienten ebenfalls als Kultivierungsumgebung für die Prostatakrebszelllinie LNCaP, welche generell ein positives Wachstumsverhalten aufzeigte.

Anhand der synthetisierten Gerüststrukturen ist es gelungen zum einen über Parameterveränderungen die Variabilität des Porensystems und der Materialelastizität darzustellen und zum anderen die Wirkung der entsprechenden Eigenschaften auf die kultivierten Zellen nachzuweisen.

Abstract

In this work, three-dimensional (3D) cell scaffolds based on cryogels of different polymers were developed and subsequently used for the cultivation of prostate carcinoma cells. Moreover, different scaffolds on the basis of the silk protein, fibroin, were synthesized and also served as cultivation environment for established prostate cancer cells.

In contrast to conventional cultivation method the starting point of every 3D model system is an organism-like surrounding where the cells exhibit an *in vivo*-related behavior including cell specific properties. In the field of cancer research a distinction is made between scaffold-free and scaffold-based models. In both cases, the formation of multicellular aggregates, so-called spheroids, occur which have a similar appearance and properties like solid tumors *in vivo*. Cryogels consist of a highly porous polymer structure and therefore belong to the scaffold-based model systems. With regard to the production method, it is possible to individually change the characteristic features such as pore size and shape as well as the mechanical properties resulting therefrom. In this manner, a specific application and adaptation of the pore system can be realized. Next to the establishment of a suitable production protocol, the influence of the characteristic features on the cultured prostate cancer cells LNCaP and PC3 was investigated.

The natural polymers sodium alginate and gelatin as well as the synthetic polymer hydroxyethylmethacrylate (HEMA) were the initial point of the cryogel synthesis. At first the cryogel samples were prepared at different polymer concentrations and then at various freezing times and temperatures. Consequently the structural characteristics changed and affected the cell growth behavior, the cell morphology as well as the spheroid formation and size. Hereby, a suitable and very promising 3D cell scaffold for the cultivation of epithelial prostate cancer cells (LNCaP and PC3) could be developed and the effects of the surrounding matrix could be demonstrated.

In addition, different scaffolds on the basis of the extracted structural protein (fibroin) of the *B.mori* silk and the natural components collagen, gelatin, chitosan, silk fibroin of *A.pernyi* as well as the recombinant protein spiderin (from spider silk) were formed. The mechanical characteristics as well as the cell-adherent properties of the pure silk fibrous scaffolds should be improved. Based on the cryogelation technique, it was shown work that the combination of different natural materials with the silk fibroin of *B.mori* plays a critical role in the development of specific structural and mechanical properties. The generated scaffold variations were also used as cultivation surrounding for the prostate cancer cell line LNCaP, which generally revealed a positive growth behavior.

Referred to the synthesized scaffolds, the variability of the pore system and the material elasticity as well as the corresponding influence on the cultured cells could be successfully demonstrated.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Danksagung | i |
| Kurzfassung | iii |
| Abstract | v |
| Abbildungsverzeichnis | xi |
| Tabellenverzeichnis | xv |
| Abkürzungsverzeichnis | xvii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Prinzipielle Unterschiede zwischen 2D und 3D Zellkultivierung..... | 1 |
| 1.2 3D Modellsysteme | 4 |
| 1.2.1 Konventionelle und erweiterte Fertigungsprozesse | 4 |
| 1.2.2 Materialien und Anwendung von 3D porösen Festkörpergerüsten | 10 |
| 1.3 Cryogele als makroporöse Polymergerüste | 14 |
| 1.3.1 Cryogelsynthese und Einflussfaktoren | 14 |
| 1.3.2 Anwendungsgebiete und Forschungsschwerpunkte | 19 |
| 1.4 Seide als natürliches Biomaterial | 25 |
| 1.4.1 Struktur und Aufbau von Seidenfibroin | 25 |
| 1.4.2 Anwendung Seidenfibroin basierter Gerüste | 28 |
| 1.4.3 Spinnenseide als neuer Wirkstoff | 31 |
| 1.5 Sphäroidbildung | 36 |
| 1.5.1 <i>In vitro</i> Tumormodelle – ohne und mit Gerüst | 36 |
| 1.6 Modellsysteme für die Prostatakrebsforschung | 42 |
| 1.6.1 Grundlagen der Prostatakrebsforschung | 42 |
| 1.6.2 3D Ansätze in der Prostatakrebsforschung | 45 |
| 1.7 Zielsetzung der Arbeit | 48 |
| 2 Material und Methoden | 53 |
| 2.1 Herstellung makroporöser Cryogele aus verschiedenen Polymeren | 53 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.2 | Herstellung von Seidenfibroingerüsten..... | 55 |
| 2.2.1 | Extraktion von Seidenfibroin aus <i>B.mori</i> und <i>A.pernyi</i> | 55 |
| 2.2.2 | Synthese unterschiedlicher Seidenfibroingerüste | 58 |
| 2.3 | Physikalische Charakterisierung der 3D Porensysteme..... | 60 |
| 2.3.1 | Messmethoden zur Beurteilung der porösen Eigenschaften..... | 60 |
| 2.4 | Auswertung Zellkulturexperimente | 70 |
| 2.4.1 | Zellkultivierungsmethodik | 70 |
| 2.4.2 | Proteinanalytik..... | 72 |
| 2.4.3 | Sphäroidformation- und verteilung | 80 |
| 3 | Ergebnisse | 87 |
| 3.1 | Veränderung verschiedener Prozessparameter und Wirkung auf die Cryogelstruktur | 87 |
| 3.1.1 | Einfluss materialspezifischer Eigenschaften | 88 |
| 3.1.2 | Einfluss von Syntheseparametern..... | 111 |
| 3.2 | Eignung modifizierter Cryogelstrukturen zur Kultivierung von Prostatakrebszellen..... | 132 |
| 3.2.1 | Einfluss der Cryogelzusammensetzung auf das Verhalten der Prostatakrebszellen | 133 |
| 3.2.2 | Einfluss von Syntheseparametern auf das Verhalten von Prostatakrebszellen | 152 |
| 3.2.3 | Verhalten unterschiedlicher Prostatakrebszellen innerhalb ausgewählter Cryogele | 166 |
| 3.3 | Charakterisierung und Vergleich von Seidenfibroingerüsten | 176 |
| 3.3.1 | Einfluss verschiedener Mischungskomponenten auf die Matriceigenschaften von Seidenfibroingerüsten | 176 |
| 3.3.2 | Eignung unterschiedlicher Seidenfibroingerüste zur Kultivierung von Prostatakrebszellen..... | 192 |
| 4 | Diskussion..... | 201 |
| 4.1 | Einfluss der Porenstruktur | 201 |
| 4.1.1 | Monomerkonzentration und Synthesetemperatur | 202 |
| 4.2 | Einfluss der Elastizität | 205 |
| 4.3 | Einfluss der RGD-Sequenz..... | 209 |
| 4.4 | Einfluss der Materialzusammensetzung | 211 |

| | |
|--|------------|
| 5 Zusammenfassung | 215 |
| 6 Offene Fragen und Ausblick..... | 221 |
| 7 Materialien und Geräte..... | 225 |
| Pubikationen | 231 |
| Literaturverzeichnis..... | 235 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Abb. 1-1: | Schematische Darstellung der Cryogelsynthese.. | 17 |
| Abb. 1-2: | Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen | 22 |
| Abb. 1-3: | Struktureller Aufbau des Seidenfadens | 26 |
| Abb. 1-4: | Schematische Illustration des Sol-Gel Übergangs | 30 |
| Abb. 1-5: | Zonale Einteilung eines multizellulären Tumorsphäroid.. | 39 |
| Abb. 1-6: | Schematische Darstellung. | 43 |
| Abb. 1-7: | Androgenrezeptor (AR)-Aktivierung | 44 |
| Abb. 2-1: | Schneidegerät. | 55 |
| Abb. 2-2: | Seidenkokons und entbastete Seide | 56 |
| Abb. 2-3: | Experimenteller Aufbau | 58 |
| Abb. 2-4: | Verwendetes REM und Sputteranlage | 63 |
| Abb. 2-5: | Aufbau des Elektron-Synchrotron Speicherring | 65 |
| Abb. 2-6: | Experimenteller Aufbau an der TOPO-TOMO Beamline. | 66 |
| Abb. 2-7: | Experimenteller Aufbau zum Druckversuch | 69 |
| Abb. 2-8: | Arbeitsschritte für den Proteinnachweis. | 78 |
| Abb. 2-9: | Prinzip des ELISA-Nachweisverfahrens | 80 |
| Abb. 2-10: | Apparaturen zur HE-Färbung | 82 |
| Abb. 3-1: | Untersuchung der Porenstruktur. | 92 |
| Abb. 3-2: | Röntgen-Mikrocomputertomographie | 93 |
| Abb. 3-3: | Quantitative Charakterisierung des Porensystems | 94 |
| Abb. 3-4: | Auswertung des Schwellverhaltens | 96 |
| Abb. 3-5: | Bestimmung des E-Moduls | 98 |
| Abb. 3-6: | Bewertung der Streckgrenze | 99 |
| Abb. 3-7: | Untersuchung der Porenstruktur. | 103 |
| Abb. 3-8: | Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen | 105 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Abb. 3-9: | Quantitative Charakterisierung des Porensystems | 106 |
| Abb. 3-10: | Auswertung des Schwellverhalten | 107 |
| Abb. 3-11: | Bestimmung des E-Moduls..... | 109 |
| Abb. 3-12: | Bewertung der Streckgrenze..... | 111 |
| Abb. 3-13: | Untersuchung der Porenstruktur | 113 |
| Abb. 3-14: | Quantitative Charakterisierung des Porensystems | 115 |
| Abb. 3-15: | Auswertung des Schwellverhalten in Nährmedium..... | 116 |
| Abb. 3-16: | Bestimmung des E-Moduls..... | 117 |
| Abb. 3-17: | Bewertung der Streckgrenze | 118 |
| Abb. 3-18: | Untersuchung der Porenstruktur | 120 |
| Abb. 3-19: | Quantitative Charakterisierung des Porensystems..... | 121 |
| Abb. 3-20: | Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen | 122 |
| Abb. 3-21: | Bestimmung E-Moduls und Porenwanddicke..... | 124 |
| Abb. 3-22: | Bewertung der Streckgrenze..... | 125 |
| Abb. 3-23: | Vergleich der Längenänderung..... | 126 |
| Abb. 3-24: | Untersuchung der Porenstruktur | 128 |
| Abb. 3-25: | Auswertung des Schwellverhalten | 129 |
| Abb. 3-27: | Bewertung der Streckgrenze | 131 |
| Abb. 3-28: | Mikroskopische Betrachtung der LNCaP | 136 |
| Abb. 3-29: | REM-Aufnahmen kultivierter LNCaP | 138 |
| Abb. 3-30: | Auswertung der Zellzahlentwicklung | 139 |
| Abb. 3-31: | Bestimmung der Sphäroidanzahl | 141 |
| Abb. 3-33: | Mikroskopische Betrachtung der LNCaP | 146 |
| Abb. 3-34: | Auswertung der Zellzahlentwicklung | 147 |
| Abb. 3-35: | Nachweis der DHT Sensitivität..... | 148 |
| Abb. 3-36: | Bestimmung der Sphäroidanzahl | 150 |
| Abb. 3-37: | Nachweis von Sphäroiden | 151 |
| Abb. 3-38: | Mikroskopische Betrachtung | 155 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Abb. 3-39: | Auswertung der Zellzahleentwicklung | 156 |
| Abb. 3-40: | Auswertung der Western Blot-Analyse | 157 |
| Abb. 3-41: | Bestimmung der Sphäroidanzahl | 159 |
| Abb. 3-42: | Mikroskopische Betrachtung der Sphäroidstrukturen | 161 |
| Abb. 3-43: | Auswertung der Zellzahleentwicklung | 163 |
| Abb. 3-44: | Auswertung der Western Blot-Analyse | 164 |
| Abb. 3-45: | Bestimmung der LNCaP-Sphäroidanzahl | 165 |
| Abb. 3-46: | Untersuchung der Sphäroidstruktur | 170 |
| Abb. 3-47: | REM-Aufnahme fixierter LNCaP-Zellen | 171 |
| Abb. 3-48: | Auswertung der Zellzahleentwicklung | 172 |
| Abb. 3-49: | Untersuchung der Sphäroidstruktur | 174 |
| Abb. 3-50: | Auswertung der Zellzahleentwicklung | 175 |
| Abb. 3-51: | Untersuchung der Porenstruktur | 179 |
| Abb. 3-52: | REM-Aufnahmen der blättrigen Porenstruktur | 180 |
| Abb. 3-53: | Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen | 183 |
| Abb. 3-54: | Quantitative Charakterisierung des Porensystems | 185 |
| Abb. 3-55: | Auswertung und Häufigkeitsverteilung | 186 |
| Abb. 3-56: | Nachweis des Schwellverhaltens | 187 |
| Abb. 3-57: | Bestimmung des E-Moduls | 189 |
| Abb. 3-58: | Nachweis der Streckgrenze | 191 |
| Abb. 3-59: | Mikroskopische Betrachtung der Sphäroidstrukturen | 194 |
| Abb. 3-60: | HE-Färbungen der Seidenfibringerüste | 196 |
| Abb. 3-61: | Auswertung der Zellzahleentwicklung | 197 |
| Abb. 3-62: | Bestimmung der LNCaP-Sphäroidanzahl | 198 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tab. 1-1: | Übersicht zum abweichenden Verhalten..... | 3 |
| Tab. 1-2: | Übersicht zu Rapid Prototyping Technologien | 8 |
| Tab. 1-3: | Unterschiede zwischen Hydrogelen und Cryogelen. | 24 |
| Tab. 1-4: | Übersicht zu möglichen Herstellungstechniken..... | 28 |
| Tab. 1-5: | Übersicht zu unterschiedlichen Anwendungen. | 31 |
| Tab. 1-6: | Überblick zu den Seiden-produzierenden Drüsen..... | 33 |
| Tab. 1-7: | Übersicht zu Merkmalen und Eigenschaften. | 35 |
| Tab. 1-8: | Übersicht zu verschiedenen Sphäroid-Techniken | 40 |
| Tab. 1-9: | Übersicht zu AR ⁺ / ₋ Zelllinien. | 47 |
| Tab. 2-1: | Einteilung der Porengröße. | 61 |
| Tab. 2-2: | Zusammensetzung der verwendeten Puffer | 74 |
| Tab. 2-3: | Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele. | 76 |
| Tab. 2-4: | Zusammensetzung der verwendeten Puffer. | 77 |
| Tab. 2-5: | Zusammensetzung verwendeter Puffer | 84 |
| Tab. 3-1: | Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4..... | 89 |
| Tab. 3-2: | Gewichtsentwicklung und Vergleich. | 96 |
| Tab. 3-3: | Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C3 _{-A} bis C3 _{-H} | 100 |
| Tab. 3-4: | Gewichtsentwicklung und Vergleich. | 108 |
| Tab. 3-5: | Zusammensetzung der Cryogelproben C3 _{250µl} bis C3 _{1ml} | 127 |
| Tab. 3-6: | Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4..... | 134 |
| Tab. 3-7: | Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C3 _{-A} bis C3 _{-H} | 144 |
| Tab. 3-8: | Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4..... | 167 |
| Tab. 3-9 | Gewichtsentwicklung und Vergleich | 188 |
| Tab. 7-1: | Übersicht verwendeter Materialien. | 225 |
| Tab. 7-2: | Verwendete Materialien für die Zellkulturexperimente..... | 226 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tab. 7-3: | Verwendete Primär- und Sekundärantikörper..... | 228 |
| Tab. 7-4: | Überblick verwendeter Geräte | 228 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|---------|
| Extrazelluläre Matrix | EZM |
| Tissue Engineering | TE |
| High-Troughput-Screening | HTS |
| Hydroxyethylmethacrylat | HEMA |
| Polyethylenglycoldiacrylat | PEGda |
| Ammoniumperoxidsulfat | APS |
| Tetramethylethylendiamin | TEMED |
| Glutaraldehyd | GA |
| Androgenrezeptor | AR |
| Prostata-spezifische saure Phosphatase | PAP |
| Prostata-spezifische Antigen | PSA |
| Rasterelektronenmikroskop | REM |
| Elastizitätsmodul | E-Modul |
| Raumtemperatur | RT |
| Phosphatpuffer | PBS |
| Fetales Kälberserum | FCS |
| Hämatoxylin-Eosin | HE |
| Seidenfibroin | SF |

1 Einleitung

1.1 Prinzipielle Unterschiede zwischen 2D und 3D Zellkultivierung

Zellbiologische Forschungen hängen generell von herkömmlichen Gewebekulturen ab, welche Zellen dazu zwingen auf einer flachen und starren Oberfläche aus Plastik oder Glas zu adhären und zu wachsen. Aufgrund dieser verzerrten Kultivierungsbedingungen kommt es zur Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens (*engl.* Monolayer), welcher in keinerlei Relation zur dreidimensionalen, dynamischen und komplexen Umgebung im Organismus steht. Auf Grundlage von adhären und in Suspension wachsenden Zelllinien findet eine Vielzahl an *in vitro*-Studien statt, welche auf zahlreiche etablierte Methoden zurückgreifen können. Dazu zählen Untersuchung des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie, Tests zum Nachweis von Apoptose und Nekrose oder Zellmigrations- und Proliferationstests, wie zum Beispiel der MTT-Test sind klassische Vorgehensweisen in der traditionellen Zellkultur [Rav2012]. Dennoch resultiert das Fehlen der physischen Mikroumgebung, inklusive extrazellulärer Matrix (EZM)-Komponenten in ein verändertes Zellverhalten. Letzteres betrifft zum einen die abweichende Zellmorphologie aufgrund der veränderten Wachstumsoberfläche, die beschleunigte Proliferation durch ein Überangebot an Nährstoffen und zum anderen eine zelluntypische Genexpression infolge fehlender Zell-Zell-Kontakte und dem Verlust essentieller Signalwege (Tab. 1-1) [Bre2013].

Bereits im Jahr 1972 untersuchten Elsdale und Bard [Els1972] das Verhalten von humanen Fibroblasten auf einem faserigen Netzwerk aus Kollagen I und konnten dabei Veränderungen bezüglich des Wachstumsverhaltens feststellen. Die Nachahmung vieler komplexer Vorgänge kann durch die Kultivierung von Zellen in einer Organismus-fernen Umgebung nicht realisiert werden. Ziel der 3D Zellkultivierung ist die Schaffung von *in vivo*-ähnlichen Kultivierungsbedingungen, wobei der Fokus auf das Gewebe als funktionelle

Einheit gegenüber der Einzelzelle liegt. Die Erschaffung einer näherungsweise realistischen Wachstumsumgebung, welche von Zelltyp zu Zelltyp verschieden ist, kann zur Beantwortung vielerlei Fragestellungen hilfreich herangezogen werden. Ausgehend vom zellulären Verhalten, werden 3D Modellsysteme zur Untersuchung der Zellregeneration, Differentiation, Gen- und Proteinexpression sowie im Bereich der Gewebezüchtung (*engl.* Tissue Engineering, TE) und der Krebsforschung verwendet [Loh2013]. Studien legen nahe, dass Zellen in einer 3D Umgebung eine verlangsamte Proliferation, eine verringerte Sensitivität gegenüber Zytostatika, veränderte Stoffwechseleigenschaften sowie Genexpressionsprofile aufweisen [Wan2014]. Insbesondere die veränderte Zellmorphologie von Krebszellen kann durch deren dreidimensionale Kultivierung beobachtet werden. Aufgrund umfassender Zell-Zell-Kontakte treten multizelluläre Aggregate (Sphäroide) auf, deren Erscheinung und Eigenschaften an feste Tumore *in vivo* ähnelt.

Bis heute steht dem Anwender eine Vielzahl an Modellsystemen inklusive Herstellungsverfahren zur Verfügung. Mit Hilfe von natürlichen bzw. synthetischen Gerüststrukturen, Suspensionssystemen oder technisch hergestellten Mikroapparaturen können ungeklärte Fragen zur komplexen Zellphysiologie oder Migrationsverhalten untersucht werden. Im Folgenden Kapitel werden einiger dieser Fertigungsverfahren, deren Vor- bzw. Nachteile beschrieben und auf die zur Verfügung stehenden Materialien eingegangen.

Tab. 1-1: Übersicht zum abweichenden Verhalten von Zellen in 2D und 3D Umgebung (nach Yamada et al. [Yam2007]).

| Merkmal | 2D Zellkultivierung | 3D Zellkultivierung |
|----------------------|--|---|
| Zellmorphologie | physiologisch abweichende Zellmorphologie (Verlust von Zellpolarität, veränderte Epithel und Fibroblasten Morphologie) | <i>in vivo</i> -ähnliche Zellmorphologie (Multilayer, vorhandene Zellpolarität) |
| Wachstumsverhalten | erhöhte Proliferationsrate | verminderte Wachstums-, Stoffwechsel- und Proliferationsaktivität |
| Zell-Zell-Kontakte | einseitige Zell-Zell-Kontakte | Ausbildung 3D Zell-Zell-Kontakten |
| Zell-Matrix-Kontakte | fehlende Zell-Matrix Kontakte und Signalaustausch | Zell-Matrix Kontakte über Trägermatrix (z.B. Kollagen I) |
| Genexpressionsprofil | verändertes Gen- und Proteinexpressionsprofil | <i>in vivo</i> -ähnliches Gen- und Proteinexpressionsprofil |
| Sensitivität | verringerte Sensitivität gegenüber Zytostatika | erhöhte Sensitivität gegenüber Zytostatika |
| Ko-Kultivierung | keine Ko-Kultivierung möglich | Kultivierung von mehr als einer Zelllinie möglich |
| Langzeitkultivierung | keine Langzeitkultivierung (Einschränkung durch Kontaktinhibition) | Langzeitkultivierung über mehrere Wochen möglich |

1.2 3D Modellsysteme

1.2.1 Konventionelle und erweiterte Fertigungsprozesse

Bei der Herstellung eines 3D Modellsystems zur Kultivierung von Zellen sollte an grundlegende Aspekte gedacht werden. Durch die Konstruktion einer geeigneten Matrix oder Gerüstsubstanz kann die gewebetypische Morphologie und Funktion bestimmter Zelltypen *in vitro* nachgeahmt oder erhalten werden. Dabei spielen sowohl mechanische als auch chemische Eigenschaften eine besondere Rolle. Poröse Trägermaterialien sind erfolgreich eingesetzte Modellsysteme, welche die notwendigen Voraussetzungen auf Basis ihres strukturellen Aufbaus erfüllen können. Neben der erforderlichen Biokompatibilität der verwendeten Materialien, bietet die poröse Struktur den Zellen die nötige Stabilität und Stütze. Durch das offene und vernetzte Porensystem können Nährstoffe und Sauerstoff ungehindert diffundieren und zu den Zellen gelangen. Auf diese Weise wird eine ausreichende Versorgung der Zellen und damit einhergehend Wachstum und Proliferation gewährleistet. Weiterhin können Stoffwechselabbauprodukte mühelos entfernt und freigesetzte Proteine oder andere Biofaktoren gewonnen werden [Dut2009].

Im Allgemeinen kann zwischen zwei Formen der Gerüstbildung unterschieden werden. Zum einen gibt es die Möglichkeit durch mechanische und/oder chemische Einflüsse bzw. Reaktionen das Porensystem zu erzeugen. In diesem Fall können sogenannte „Porogens“ eingesetzt werden, welche die Aufgabe der Porenbildung übernehmen. Als Porenbildner können z.B. Salze, wie Natriumchlorid (NaCl) oder aber auch Eiskristalle dienen. Zum anderen stehen dem Anwender einige automatisierte Techniken zur Verfügung, welche mit Hilfe besonderen Equipments die Gerüststruktur entwickeln. In Abhängigkeit von der Herstellungsart erfolgt anschließend die Zellaussaat, welche entweder nach Anfertigung der Gerüststruktur oder währenddessen durchgeführt wird. Im Folgenden werden die einzelnen

Fertigungsprozesse näher betrachtet und sowohl deren Vorzüge als auch die Defizite bzw. Mängel aufgezeigt.

Salt Leaching

Zunächst wird Salz (z.B. NaCl) in kleinste Partikel gemahlen und in eine gewünschte Form gegeben. Ein Polymergemisch wird anschließend auf die mit Salzpartikeln gefüllten Formen verteilt und erstarrt kurze Zeit später. Nachdem das Lösungsmittel verdunstet ist, kann das Salz mit Hilfe von Wasser oder Alkohol aufgelöst und entfernt werden [Ma2004]. Zurück bleibt eine poröse Polymerstruktur, deren Gesamtporosität durch das Mengenverhältnis von Salz zu Polymergemisch sowie deren Porengröße durch Größenvariation der Salzpartikel beeinflusst werden kann. Aufgrund der geringen Menge an Polymer und Abfallprodukten, zählt diese Methode zu einen der unkomplizierten Verfahren. Allerdings lässt sich sowohl die Poreninterkonnektivität als auch die Form bzw. Größe der Poren schwer kontrollieren [Loh2013].

Gas formen (engl. Gas forming)

Grundlage dieses Herstellungsverfahren besteht in der Verwendung von Gas, z.B. CO₂ und Stickstoff, Wasser oder Chloroform, als Porogen. Zusammen mit dem verwendeten Gas werden bioabbaubare Polymere, wie Polyglycolsäure (PGA) oder Polylactide (PLA), hohen Drücken ausgesetzt, bis eine Sättigung erreicht ist. Die anschließende Druckverringerung führt zur Keimbildung und zum Wachstum von Gasblasen mit einer Größe zwischen 100 bis 500 µm [Zhu2013]. Im Vergleich zur Salt leaching Methode ist das Entfernen des Porogens nicht erforderlich und es kann auf die Verwendung organischer Lösungsmittel verzichtet werden [Kes2009]. Dagegen liegen auch hier eine erschwerte Kontrolle der Porengröße sowie deren Interkonnektivität vor, was eine nicht-poröse Oberfläche zur Folge haben kann [Loh2013].

Phasenseparation (engl. Phase separation)

Mit dem Begriff Phasenseparation wird die räumliche Entmischung in Gebiete mit unterschiedlicher Phase bezeichnet. Dabei wird zwischen ther-

misch-induzierter, fest-flüssig und flüssig-flüssig auftretender Phasenseparation unterschieden [Nam1999; Sch1996; Sch1996]. Im Allgemeinen führt eine thermische Instabilität zur Auftrennung der Polymerlösung in eine polymerreiche feste und in eine polymerarme flüssige Phase. Anschließend wird das Lösungsmittel, entspricht der Polymer-armen Phase, entfernt und es verbleibt ein hochporöses Polymernetzwerk. Die Gerüststruktur kann durch Variation verschiedener Prozessparameter, wie z.B. der Polymerkonzentration, beeinflusst werden. Dennoch können nur Poren mit einem Durchmesser im unteren Mikrometerbereich ($< 10 \mu\text{m}$) erzeugt werden

Gefriertrocknung (engl. Freeze-drying)

Durch den Prozess der Gefriertrocknung kommt es zur Sublimation des gefrorenen Lösungsmittels, welches unmittelbar vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand übergeht. Vorab wurde die Polymerlösung bis zu einer bestimmten Temperatur abgekühlt, bei welcher sich alle Materialien im gefrorenen Zustand befinden. Das Lösungsmittel bildet Eiskristalle und drängt die gelösten Partikel in einen Zwischenraum, wo es zur Aggregation oder Polymerisation kommt. Ergebnis der Gefriertrocknung ist ein hochporöses Polymergerüst, dessen strukturelle Eigenschaften durch Variation der Polymerkonzentration und Gefriertemperatur verändert werden kann [Loh2013].

Zellverkapselung (engl. Cell encapsulation, Gel embedding)

Der Begriff Zellverkapselung beschreibt die physikalische Isolierung einer Zellmasse von seiner Außenumgebung, während die zelluläre Physiologie innerhalb des gewünschten Permeabilitätsbereiches aufrechterhalten wird. Die Techniken werden im Allgemeinen als Mikro- und Makroverkapselung klassifiziert [Ulu2000]. Grundsätzlich wird die Zellsuspension zusammen mit der Polymerlösung vermischt, bevor die eigentliche Gelierung stattfindet. Dabei können sowohl einzelne Zellen bzw. Zellaggregate oder auch Fasern eingebunden werden [Loh2013]. Die entstehenden kugelförmigen Matrices in

Form von Hydrogelen¹ ermöglichen die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff und verhindern gleichzeitig das Austreten der Zellen aus der Polymerkapsel. Aufgrund der gemeinsamen Ausgangslösung von Zellen und Reaktionskomponenten, beschränkt sich die Wahl auf wasserlösliche Polymere. Letztere beeinflussen ebenfalls die Art und Weise des Mechanismus, welcher sich auf die radikalische Polymerisation und chemische Vernetzung begrenzt. In beiden Fällen müssen die verwendete Initiatoren und/oder Quervernetzer (*engl.* Cross-Linker) auf Zytokompatibilität untersucht und Synthesebedingungen (z.B. veränderte Temperatur als Auslöser für Polymerisation) mit schädigenden Auswirkungen ausgeschlossen werden [Nic2008].

Elektrospinnen (engl. Electrospinning)

Elektrospinnen ist ein Herstellungsverfahren zur Erzeugung von Fasern bis in den Nanometerbereich. Ein typischer Aufbau besteht aus einer Spritzenpumpe, welche die Polymerlösung beinhaltet und als Elektrode fungiert, einer Stromquelle zur Erzeugung des elektrischen Feldes und einem Kollektor um die gebildeten Fasern aufzufangen [Pha2006]. In Folge des Spannungsfeldes bewegt sich die Polymerlösung von der Spritze (Elektrode) zur Gegenelektrode. Währenddessen verdunstet das Lösungsmittel und auf der Fasermatte (Kollektor) treffen feste Fasern mit hoher Geschwindigkeit auf. Zahlreiche Parameter bestimmen die Form und Abmessung der Fasern, z.B. Viskosität, Molekulargewicht und Leitfähigkeit der Polymerlösung, Flussrate und Stromstärke sowie relative Luftfeuchte und Umgebungstemperatur [Gre2007]. Auf diese Weise können Faserdicke und Porosität gezielt gesteuert werden.

Rapid Prototyping Technik

Rapid Prototyping umfasst mehrere Fertigungsprozesse zur schnellen Herstellung von Bauteilen, d.h. vorhandene CAD-Dateien² sollen direkt und zeitnah umgesetzt werden. Basierend auf verschiedenen Polymerbeschaffen-

¹ Hydrogel ist ein Wasser enthaltendes, aber wasserunlösliches Polymer.

² CAD, Konstruktion eines Produktes mittels EDV.

heiten wird zwischen Flüssig-, Fest- und Pulversystemen unterschieden. Zu den grundlegenden Prozessen zählt *Fused Deposition Modeling* (FDM, deutsch: Schmelzschtichtung), *Stereolitografie* (STL), *Selektives Lasersintern* (SLS) sowie *3D-Drucken* [Zhu2013]. Grundlegend erfolgt bei allen Fertigungsverfahren der schichtweise Aufbau des Werkstückes beruhend auf der zuvor erstellten Geometrie aus 3D-Daten (Tab. 1-2).

Tab. 1-2: Übersicht zu Rapid Prototyping Technologien zur Herstellung von Werkstücken bzw. porösen Gerüsten für biomedizinische Anwendungen [Kum2010].

| Rapid Prototyping Technik | Fertigungsprinzipien | Besonderheiten |
|----------------------------------|--|--|
| Fused Deposition Modeling | Schichtweise Herstellung eines 3D Objektes aus einem schmelzfähigen Kunststoff | Durch Erhitzung des Kunststoffes wird dessen flüssiger Aggregatzustand erreicht und kann anschließend durch feine Düsen gepresst werden. |
| Stereolitographie | Aushärtung lichtempfindlicher Kunststoffe (Photopolymere) mittels Laser | Stützstrukturen ermöglichen die Laser induzierte Aushärtung des lichtempfindlichen Polymers in einem Kunststoffbad aus Basismonomeren. Nach der Aushärtung einer Schicht wird diese in das Kunststoffbad abgesenkt, woraufhin die nächste Schicht gedruckt wird. |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| Selektives Lasersintern | Herstellung von räumlichen Strukturen aus pulverförmigen Ausgangsstoffen | Das polymere Ausgangsmaterial liegt in Pulverschicht vor. Entlang der Kontur des gewünschten Werkstückes werden die Pulverpartikel mit Hilfe eines Lasers geschmolzen. Durch Auftragung einer neuen Pulverschicht, kann sich diese mit den geschmolzenen Partikeln verbinden. |
| 3D-Drucken | Pulverförmiges Ausgangsmaterial wird schichtweise aufgetragen und mit Hilfe eines Binders verbunden | Abwechselnd erfolgt der Auftrag von Pulver und Binder zur Vermischung und Entstehung einer neuen Schicht. Der Binder vermischt sich mit dem Pulver und es kommt zur Verhärtung. |

Eine sehr spezielle Form des 3D-Druckens stellt das sogenannte *Bioprinting* dar. Ziel ist es computergesteuert und mit Hilfe von Techniken TE-Strukturen aus zuvor gezüchteten Zellen herzustellen. Auf Basis sogenannter Biotinte (*engl.* BioInks), einer Prä-Gel-Lösung aus Zellen und biokompatiblen Materialien, welche auf eine Oberfläche gedruckt werden, entstehen Gewebe- bis Organ-ähnliche Strukturen. Das entstehende Gerüst polymerisiert nach dem Druck mittels Cross-Linker oder Photoinduktion [Sta2015]. Entsprechend der gängigen Zellverkapselung, spielen die zytotoxischen Eigenschaften der verwendeten Komponenten und die schädigenden Einflüsse der Prozessschritte eine vergleichbare Rolle. Die Materialien

werden entsprechend des Zielgewebes ausgewählt und sollten keinerlei Gefährdung auf die Zellviabilität ausüben.

1.2.2 Materialien und Anwendung von 3D porösen Festkörpergerüsten

Die in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Methoden schildern eine Vielzahl an möglichen Techniken zur Herstellung von hochporösen Zellgerüsten. Ein Großteil der Techniken beruht auf dem Einsatz der 3D Trägermatrices für das breite Feld der künstlichen Gewebezüchtung. Ziel ist es, die Regeneration, Erhaltung und Verbesserung von geschädigtem bzw. zerstörtem Gewebe durch Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien zu unterstützen. Die Gerüststruktur dient der Stabilisierung und Vorgabe des zu ersetzenden Gewebes sowie der Förderung von Zellwachstum und Migration. Darüber hinaus können 3D Zellgerüste die Grundlage für zellbasierte Testverfahren zur Toxizitätseinschätzung und Effizienz von Wirkstoffen bilden oder als biologisch abbaubarer Ausgangsstoff zur Wirkstofffreisetzung eingesetzt werden. Des Weiteren können sie als zellbasierte Sensoren für chemische und biologische Analyten (z.B. Krankheitserreger, Lebensmittelüberwachung), als Mikrocarrier zum unterstützenden Wachstum von adhären Zellen im Bioreaktor oder im Bereich des Hochdurchsatzscreenings (*engl.* High-Throughput-Screening, HTS) für pharmakologische Testreihen zum Einsatz kommen, um nur einige Beispiele zu nennen [Bra2009].

Polymere zählen zu den primär verarbeiteten Materialien und je nach Fertigungsprozess können unterschiedliche Stoffe, synthetischen und/oder natürlichen Ursprungs, verwendet werden. Zum einen verfügen natürliche Ausgangsstoffe, wie Proteine bzw. Polysaccharide, über die nötige Biokompatibilität und charakteristische Zelladhäsionsmerkmale. Zum anderen finden synthetische Materialien aufgrund ihrer Verfügbarkeit, einfachen Verarbeitung und mechanischen Eigenschaften (z.B. Festigkeit) Gebrauch. Im Folgenden wird auf die grundlegenden Charakteristiken und Anwendungsgebiete von synthetischen und natürlichen Polymeren eingegangen.

Polymere

Polymere sind Makromoleküle bestehend aus aneinandergereihten gleichen oder gleichartigen Struktureinheiten, den sogenannten Monomeren. Während der Polymerisation kommt es zum Kettenwachstum der Monomereinheiten. Zu den gängigen Polyreaktionen zählen sowohl die radikalische Polymerisation als auch die Polykondensation und Polyaddition. Art, Anzahl und Abfolge der Monomere sowie die Form der chemischen Verknüpfung als auch die Kettenarchitektur bestimmen die Eigenschaften des entstehenden Polymers. Oftmals unterscheiden sich dabei die Eigenschaften der Monomere von denen des Polymers (z.B. Wasserlöslichkeit, Lösungsmittel/Wasser Absorption) [Kol2013]. Die Polymere können in natürliche (Biopolymere) und synthetische Polymere, bezogen auf den Syntheseursprung oder gemäß der Anzahl an Monomeren in Homopolymere, Co-Polymere oder Polymerblends eingeteilt werden. Co-Polymere unterscheiden sich gegenüber Polymerblends durch den Strukturaufbau aus verschiedenen Monomereinheiten, was zugleich auf die meisten Biopolymere zutrifft, wohingegen Polymerblends durch das Mischen verschiedener Homopolymere/Co-Polymere entstehen [Boa2009].

Synthetische Polymere

Unter synthetischen Polymeren zählen industriell oder im Labormaßstab hergestellte Stoffe, welche zusätzlich in organische und anorganische Polymere eingeteilt werden. Für den erfolgreichen Einsatz im Bereich des TE zählen Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und ausreichend mechanische Festigkeit zur Stabilisierung des neugebildeten Gewebes als wichtigste Anforderungen an die verwendeten Polymere. Die biologische Abbaurate sollte dabei mit der Regenerierung und Neubildung des Gewebes einhergehen. Zu den bekanntesten bioabbaubaren, synthetischen Polymeren gehören Polyglycolide (PGA) und Polylactide (PLA) sowie das Co-Polymer Polylactid-co-Glycolid (PLGA), welche aufgrund ihrer charakteristischen Merkmale auch als chirurgisches Nahtmaterial Verwendung finden. Trägermatrices aus Polycaprolactone (PCL) und Polyhydroxybuttersäure (PHB) zeichnen sich durch eine verlangsamte Abbaurate aus, sodass der Einsatz als

Material für Langzeitimplantate geeigneter ist [Ma2004]. Ein weiterer Vorteil ist die erleichterte Verarbeitung der synthetischen Polymere, wodurch sowohl die Herstellung von gesponnenen Fasern (Elektrospinnen) als auch eine Technik im Bereich Rapid Prototyping in Frage kommt. Eine Reihe von hydrophilen Polymeren, wie z.B. Poly(hydroxyethylmethacrylat) (PHEMA), Polyvinylalkohol (PVCl) und Polyethylenglycol (PEG), werden vielfach zur Herstellung von Hydrogelen verwendet. Durch Quervernetzung entstehen wasserunlösliche 3D Trägermatrices, die aufgrund der thermodynamischen Kompatibilität zu Wasser sehr weich und elastisch sind. Hydrogele auf Basis von synthetischen Homopolymeren oder Co-Polymeren finden neben der 3D Kultivierung von Zellen auch Anwendung im biomedizinischen Bereich, als Bestandteil von Kontaktlinsen (PHEMA), in der Mikrobiologie zur Enzym-einschlussimmobilisierung (PVCL) oder in der Pharmaindustrie zur Wirkstofffreisetzung (PEG). Aufgrund fehlender Peptidbindungsstellen können die Polymere mit bioaktiven Molekülen modifiziert werden oder mit Biopolymeren einen Polymerblend eingehen. Beides dient der Verbesserung der zelladhäsiven Eigenschaften [Bra2009]. Photopolymerisierte Hydrogele bestehend aus PEG-Acrylat oder PEG-Methacrylat sowie Polyvinylalkohol-Derivaten sind Beispiele für potentielle Wirkstoffträger zur lokalen Arzneimittelabgabe. Während der Photopolymerisation erfolgt eine Interaktion zwischen UV-Licht und licht-sensitiven Verbindungen, sogenannten Photoinitiatoren, woraufhin eine radikalische Polymerisation induziert wird. Infolgedessen härten die flüssigen Monomere/Makromere zu einem Hydrogel aus [Ngu2002]. Rahmenbedingungen dieser Herstellung ermöglichen eine Hydrogelsynthese *in situ*, wodurch eine präzise Anpassung an das Zielgewebe zugelassen wird [Dec1987]. Vorzüge dieses Verfahrens werden schon seit langer Zeit zur Aushärtung von Füllungsmaterial in der Zahnmedizin angewandt [Maf1994]. Anorganische Polymere, wie z.B. Calciumphosphat basierte Keramiken, inklusive β -Tricalciumphosphat (β -TCP) oder Hydroxylapatite (HAP), werden in der Knochenchirurgie als synthetische Ersatzmaterialien zur Förderung des natürlichen Knochenwachstums (osteo-konduktiv) und der Knochenneubildung (osteoinduktiv) verwendet [Rah2011].

Natürliche Polymere

Als natürliche Polymere oder auch Biopolymere werden in Zellen eines Lebewesens synthetisierte Polymere, wie z.B. Polysaccharide, Proteine, Nucleinsäuren etc., bezeichnet. Vorzugsweise werden dabei Bestandteile der Extrazellulären Matrix (EZM), wie Glykoproteine und Polysaccharide, aber auch Polysaccharide aus Pflanzen (z.B. Alginat) und Tieren (z.B. Chitosan) zur Herstellung von 3D Gerüstträgern verwendet. In beiden Fällen wird vom chemisch strukturellen Aufbau profitiert und gleichzeitig die Nachahmung der natürlichen Umgebung verstärkt. Einige der Materialien finden seit langer Zeit in den unterschiedlichsten Bereichen, wie in der Lebensmittelindustrie als Geliermittel, in der Kosmetikbranche als Zusatz von Pflegeprodukten oder in der Pharmazie zur Freisetzung von Wirkstoffen, ihre Verwendung. Darüber hinaus kommt es auch zum Einsatz von Biopolymeren im Bereich des TE, wobei von der biologischen Abbaubarkeit der natürlichen Materialien profitiert wird. Zum Beispiel wird Gelatine, als Derivat des Kollagens, und Alginat zur Zellimmobilisierung und als BioInk bei der Herstellung von Trägermatrices durch Bioprinting (siehe Kapitel 1.2.1) häufig verwendet [Hwa2010]. Nicht selten dienen synthetische Polymere (z.B. Polycaprolactan) in Form von Hydrogelen als Stabilisator für das gedruckte und entstehende Konstrukt.

Abseits der Anwendung von porösen natürlichen und/oder synthetischen Trägermatrices zur Erzeugung von Geweben oder Organen zielt die 3D Zellkultivierung ebenfalls auf die Untersuchung grundlegender zellulärer Fragestellungen, welche von der räumlichen Anordnung der Zellen und dessen veränderten Verhaltensweisen in 3D Gebrauch macht. Letzteres wird unter anderem durch die Verwendung von EZM-Bestandteilen erreicht. Ein sehr bekanntes Beispiel für die Verwendung extrahierter EZM aus lebenden Zellen stellt die Basalmembranartige Matrix unter dem Markennamen Matrigel dar. Matrigel ist ein Gemisch aus EZM-Proteinen, welches aus dem Englebret-Holm-Swarm Tumor in Mäusen extrahiert wurde und im Wesentlichen aus Laminin, Kollagen IV und Entaktin besteht [Ork1977; Kle1982]. Neben EZM-Bestandteilen zählen auch Wachstumsfaktoren und Zytokine zu den Komponenten und ermöglichen unter anderem die Kultivierung von

embryonalen Stammzellen, welche aus bisher ungeklärten Gründen in ihrem undifferenzierten Zustand verbleiben. Ein entscheidender Einflussfaktor ist jedoch die ungewisse Matrigel-Komposition, welche sich von Batch zu Batch stark unterscheidet und zu variierenden Ergebnissen innerhalb eines Experimentes führen kann. Im Rahmen einer Studie von Hughes *et al.* [Hug2010] wurden insgesamt 1851 Proteine in einer umfassenden Proteomanalyse detektiert. Innerhalb dieser komplexen Mischung aus Strukturproteinen und Wachstumsfaktoren wurden unzählige Proteine mit ungewisser Funktion während der Zellkultivierung erfasst. Aufgrund der Batch zu Batch-Variation und mangelnder Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird vermehrt auf die Kombination aus natürlichen und synthetischen Polymeren zurückgegriffen. Eine Vielzahl der beschriebenen Materialien kann ebenfalls zur Synthese sogenannter Cryogele verwendet werden. Als eine besondere Form der polymeren Gele bietet diese Matrix eine hervorragende Grundlage zur 3D Zellkultivierung. Eine detaillierte Übersicht zu den Besonderheiten und Eigenschaften sowie Anwendungsbereiche der Cryogele ist Bestandteil der nachfolgenden Kapitel.

1.3 Cryogele als makroporöse Polymergerüste

1.3.1 Cryogelsynthese und Einflussfaktoren

Polymere Gele werden in vielen Bereichen der Biotechnologie, z.B. als Material in der Chromatographie, zur Immobilisierung von Molekülen und Zellen, Matrices für die Elektrophorese und Immunodiffusion verwendet. Sogenannte Cryogele, welche den Hydrogelen zugeordnet werden, weisen aufgrund eines besonderen Syntheseablaufes außergewöhnliche Eigenschaften auf. Aus diesem Grund wurde ihr Potential für biomedizinische und biotechnologische Anwendungsbereiche schnell erkannt. Die Bezeichnung Cryogel setzt sich aus dem griechischen Wort ‚*kryos*‘, mit der Bedeutung Frost oder Eis und dem bekannten Wort Gel, als Ausdruck für ein disperses System, zusammen [Loz2003]. Ein disperses System besteht aus mindestens

zwei Komponenten, wobei die feste Einheit ein schwammartiges, dreidimensionales Netzwerk formt, dessen Poren durch eine Flüssigkeit (Lyogel) oder Gas (Xerogel) ausgefüllt sind. Auf diese Weise ist die flüssige Einheit in dem Netzwerk immobilisiert, woraus folgt, dass diese Gele einerseits sehr leicht und deformierbar sind, aber dennoch formstabile Eigenschaften besitzen [Sep2008].

Die Morphologie des 3D Netzwerkes wird primär durch die chemischen Bindungen und durch die Art und Weise der Synthese bestimmt. Die am häufigsten verwendete Methode ist die Gelsynthese in einem flüssigen System. Innerhalb dessen besteht die Lösung entweder aus Monomeren, deren Gelierung ein Ergebnis verzweigter Polymerisation ist, oder Polymeren, welche durch chemisches Vernetzen, Selbstgelierung oder Phasenübergang ein Gel bilden. Das verwendete Lösungsmittel wird während der Synthese innerhalb des Polymernetzwerkes eingeschlossen und dient sogleich der Stabilisierung. Weiterhin erlaubt es die Diffusion von gelösten Stoffen in und aus dem Gel [Loz2002]. Unter Berücksichtigung der intermolekularen Bindungen innerhalb des gebildeten Netzwerkes kann zwischen chemischen und physikalischen Gelen unterschieden werden. Grundlage von Cryogelen können sowohl ionische als auch kovalente oder nicht-kovalente Bindungsarten sein, wodurch eine deutliche Abgrenzung zu den anderen Gelarten entsteht. Aufgrund der sanften und druckreduzierten Entfernung des Lösungsmittels (LM) lässt sich prinzipiell jede Form (z.B. Scheiben, Röhren, Blöcke und Zylinder) mittels Cryogelierungsprozess herstellen, welcher im folgenden Abschnitt nochmals detaillierter beschrieben wird.

Cryogelsynthese

Die Bildung von Eiskristallen ist das ausschlaggebende Merkmal der Cryogelsynthese, wodurch sich diese von der Kälte-induzierten Gelbildung abgrenzt. Letzteres erfolgt bei verminderter Temperatur ohne Phasenübergang des LM, z.B. Gelierung von Gelatine oder Agar-Agar. Grundsätzlich gilt, dass das charakteristische Porensystem in Folge der Lösungsmittelerstarung, der daraus resultierenden Kristallbildung und anschließender Entfernung des LM durch Auftauen erzeugt wird (Abb. 1-1). Vorwiegend wird Wasser als LM verwendet, wodurch die Entfernung mittels organischer

Substanzen entfällt und negative Auswirkungen auf die kultivierten Zellen ausbleiben [Pli2011].

Der natürliche Gefrierprozess von Meereswasser als wässrige Salzlösung entspricht im Grunde der Synthese von Cryogelen. Im Zuge der Eiskristallbildung kommt es zur Verdrängung jegliche Art von gelösten Substanzen oder Verunreinigungen, was die Ausbildung eines heterogenen Zweiphasensystems zur Folge hat. Das gefrorene Wasser bzw. die reinen Eiskristalle bilden die feste Phase, wohingegen die konzentrierte Salzlösung der nicht-gefrorenen Phase entspricht [Kir2011]. Dieser Prozess wird während der Cryogelherstellung nachgeahmt, indem gelöste Monomere und/oder Polymere den gelösten Stoffen entsprechen, welche sich in der nicht-gefrorenen Phase konzentrieren. Studien ließen vermuten, dass in mäßig gefrorenen Lösungen ein Teil des LM noch ungefroren ist, innerhalb dessen durch Konzentrierung der gelösten Substanzen der Ablauf von chemischen Reaktionen (Polymerisation) ermöglicht wird [Bru1964; Pin1969]. Die nicht-gefrorene Phase nimmt nur einen Bruchteil des Gesamtvolumens ein, wodurch die Konzentration der gelösten Stoffe proportional steigt und gleichzeitig zu einer Beschleunigung der chemischen Reaktionen führt. Im Vergleich zu gewöhnlichen Gelen können Cryogele trotz Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes bei einer signifikant geringeren Konzentration an Monomeren/ Polymeren und Cross-Linker gebildet werden. Mit anderen Worten, die Verringerung der kritischen Konzentration, bei welcher es noch zu einer Gelbildung kommt, ist ein typisches Merkmal der Cryogelsynthese [Loz2002]. In einer Studie von Lozinsky et al. [Loz1982] wurde die Gelbildung von Chitosan vernetzt mit Glutaraldehyd anhand unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse bei 25 °C und -8 °C (Cryogel) verglichen. Bereits bei einer geringeren Chitosankonzentration erfolgte die Bildung von Cryogelen, wohingegen eine doppelte Menge zur Bildung der gleichen Gele bei Raumtemperatur notwendig war (entspricht Hydrogele).

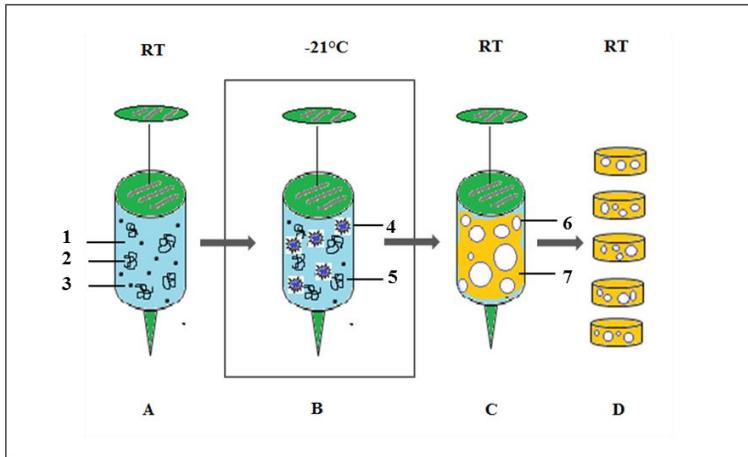


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Cryogelsynthese. **A)** Ausgangsreaktionsgemisch. Das Reaktionsgemisch mit allen in Wasser (1) gelösten Komponenten, Monomere/Polymere und Initiatoren (2,3), wird in eine 3 ml Einwegspritze gefüllt. **B)** Gefrorenes System. Unmittelbar im Anschluss werden die Proben bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Währenddessen kommt es zur Ausbildung eines 2-Phasensystems, welches einerseits aus den sich bildenden Eiskristallen (4) und andererseits aus einer nicht-gefrorenen Phase (5) besteht. Letzteres entsteht durch die Verdrängung der gelösten Stoffe, welche sich in der nicht-gefrorenen Phase konzentrieren und dort chemisch reagieren. **C)** Auftauesystem. Lagerung bei RT lässt die Eiskristalle schmelzen und die entstehenden Poren sind mit LM gefüllt (6). Die Oberflächenspannung zwischen LM und dem umgebenden Polymer (7) verursacht die runde Form der Poren inklusive glatter Oberfläche. **D)** Gebrauchsfertige Cryogele. Aus dem zylinderförmigen Cryogelstück der Spritze werden gleich große Proben geschnitten ($d = 8\text{ mm}$, $h = 3\text{ mm}$). Alle Proben verfügen über ein zusammenhängendes Porennetzwerk, welches durch die wachsenden und verzweigten Eiskristalle geformt wurde.

Einfluss des Gefrierschrittes und der Gefriertemperatur

Für eine erfolgreiche Cryogelsynthese ist es dringend erforderlich, dass der Gefrierprozess und die damit verbundene Entstehung der Eiskristalle vor der eigentlichen Gelbildung stattfinden. Fehlt der Verbund wachsender Eiskristalle zu einem Netzwerk, verursacht dies den Verlust des charakteristischen Porensystems. Am Beispiel von Polyacrylamid (PAAm) Cryogelen wurde

der Einfluss der Temperatur auf die Polymerisationsrate, d.h. Erreichen bis zum Gelierpunkt, untersucht. Im Vergleich zu gewöhnlichen Gelen, deren Polymerisationsrate mit zunehmender Temperatur (zwischen 10 und 30 °C) anstieg, kam es bei der Synthese von CryoPAAm zu einer beschleunigten Polymerisation zwischen -10 und -20 °C. Bei einer Temperatur von -20 °C erfolgte die Gelierung innerhalb von 15 Minuten, sechs Mal schneller als die Gelierung bei 20 °C [Loz1989a]. In Abhängigkeit von der Gefriertemperatur kommt es zu einem Wettbewerb zwischen der Polymerisation innerhalb der nicht-gefrorenen Phase und Faktoren, die diesen Prozess verzögern. Je geringer die Gefriertemperatur desto schneller verläuft der Gefrierprozess, d.h., eine beschleunigte Eis-Nukleation führt zu vielen kleinen Eiskristallen und resultiert in einer verminderten Konzentration an gelösten Ausgangsstoffen in der nicht-gefrorenen Phase. Infolgedessen entstehen Cryogele mit kleineren Poren und dünneren Porenwänden, was einen merklichen Einfluss auf die Stabilität und mechanische Festigkeit der Gerüste ausübt. Eine weiter abfallende Gefriertemperatur entschleunigt die Polymerisationsrate und hemmt die Gelierung des Cryogels [Kir2009]. Die Größe der Eiskristalle und somit der Poren ist abhängig von der Gefriertemperatur und kann zu Porengrößen im Bereich von 1 bis 300 µm führen. Bezüglich der Porenklassifikation zählen Cryogele zu den mikro- und makroporösen Materialien, deren Poren im Bereich von 0.1 bis 100 µm und größer liegen [Gre1982]. Neben der Gefriertemperatur beeinflussen Syntheseparameter, wie z.B. Wassermenge, Ionenstärke, pH-Wert sowie Konzentration und Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, die strukturellen Eigenschaften der Cryogele [Gun2012].

Einfluss der Monomer/Polymer Ausgangskonzentration

Kirsebom et al. [Kir2009] untersuchte am Beispiel von Dimethylacrylamid (DMAAm) vernetzt mit Polyethylenglycoldiacrylat (PEGda) den Einfluss unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen bei gleichbleibenden Monomer/Cross-Linker Verhältnis. Ziel war es, bei ansteigender Konzentration die Zeit bis zur Polymerisation und die anschließende Reaktionszeit sowie die Porengröße und Elastizität zu erfassen. Während des Experimentes wurde mit einer konstanten Gefriertemperatur von -10 °C gearbeitet. Fazit der Untersu-

chung: Mit ansteigender Konzentration der gelösten Substanzen verringerte sich die Zeit bis zur Polymerisation und gleichzeitig erfolgte eine beschleunigte Polymerisationsrate. Infolgedessen verringerte sich die durchschnittliche Porengröße um mehr als die Hälfte bei einer vervierfachen Stoffmengenkonzentration, woraufhin die mechanische Festigkeit der Cryogele zunahm. Entgegengesetzt dazu wurden bei einer geringeren Ausgangskonzentration größere Poren in einem entsprechend instabileren Cryogel gemessen. Parallel verlängerte sich der Zeitraum bis zur Reaktion, welche ebenfalls sehr verlangsamt stattfand. Eine erhöhte Konzentration an gelösten Stoffen im Reaktionsgemisch überträgt sich gemäß der Cryogelherstellung auf die nicht-gefrorene Phase, woraufhin die Polymerisationsrate steigt und eine kompaktere Porenstruktur entsteht. In Gegenwart einer sehr geringen Menge an Reaktionskomponenten kann es trotz charakteristischer Cryokonzentration zu einer stark verzögerten Polymerisation kommen. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die Konzentration der gelösten Stoffe ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die Cryogeleigenschaften nehmen.

1.3.2 Anwendungsgebiete und Forschungsschwerpunkte

Cryogele als chromatographische Materialien

Im Bereich Downstream Processing, das im Allgemeinen die Abtrennung und Aufreinigung von Produkten umfasst, zählen chromatographische Verfahren zu den vorherrschenden Technologien. Generell steht der Begriff Chromatographie für die Trennung von Gemischen mit Hilfe einer festen (stationären) und einer flüssigen (mobilen) Phase, wobei die einzelnen Verfahren nach Art des Trägers, der mobilen Phase oder dem zu Grunde liegenden physikalischen Prozess klassifiziert werden. Die einzelnen Trennverfahren werden sowohl in der Laboranalytik als auch im präparativen Maßstab eingesetzt. Nichtsdestotrotz stellen Verfahren zur Trennung und Reinigung von biologischen Partikeln (z.B. Plasmide, Viren, Zeltorganellen und intakte Zellen) eine Herausforderung dar. Die Auftrennung von partikelhaltigen Lösungen, insbesondere Zellsuspensionen, wird durch zu

kleine Poren (Nano- und unterer Mikrometerbereich) in bisher verfügbaren Matrices erschwert. Partikelgrößen zwischen 20 - 300 nm, geringe Diffusionsraten und komplexe molekulare Oberflächen unterscheiden solche Objekte von gewöhnlichen Makromolekülen (< 10 nm). Makroporöse Cryogele verfügen über variable und anpassbare Porengrößen im Mikrometerbereich, sind zudem mechanisch stabil und weisen geringe Strömungswiderstände auf. Folglich wären Flussraten im Bereich Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) möglich [Loz2003]. Darüber hinaus können Rohextrakte ohne vorangegangene Filtration oder Zentrifugation aufgetragen werden, ohne eine Blockierung der Säule zu riskieren. Arvidsson *et al.* stellte eine auf Cryopolymerisation basierende Trennsäule direkt in der später verwendeten Apparatur her. Die Matrix wurde durch radikalische Polymerisation in einer wässrigen Lösung und Zugabe einer Kryoflüssigkeit (z.B. flüssiger Stickstoff) erzeugt. Nach Erhitzen der Säule wird die Flüssigkeit über die Poren ausgewaschen. Die kovalente Kopplung eines Liganden ermöglichte anschließend die Aufreinigung eines von *Escherichia coli* (*E.coli*) expremierten rekombinanten Proteins [Arv2003]. Die spezifische Wechselwirkung eines Rezeptors mit einem Liganden bildet die Grundlage der Affinitätschromatographie, welche neben der Aufreinigung von rekombinanten Proteinen auch bei Nukleinsäuren oder Antikörper aus Blutseren angewandt wird. Jedoch besteht nach der chromatographischen Trennung von Zellen das Problem der erfolgreichen Desorption von der Affinitätsfläche. Aufgrund der schwammartigen und elastischen Morphologie der Cryogele können die gebundenen Zellen durch mechanische Kompression effizient herausgelöst werden. Diese sanfte Methode ermöglicht die höchste Produktausbeute bei gleichzeitiger Zellviabilität [Dai2007].

Cryogele zur Immobilisierung von Zellen und Biopolymeren

Grundlage der Affinitätschromatographie, aber auch zahlreicher Immunotests sind Träger mit reaktiven funktionellen Gruppen zur Immobilisierung kleiner Moleküle oder Biopolymere bis zu großen Biomaterialien, wie Zellorganellen oder ganzen Zellen. Innerhalb dessen kann zwischen kovalenter Kopplung und physikalischem Einschluss des Zielmaterials unterschieden werden. Die kovalente Kopplung gilt als problemlosere Methode und kann auf zwei

Wegen realisiert werden. Zum einen kann das hergestellte Cryogel nachfolgend mit einer Lösung modifiziert werden, wodurch die spezifische Bindung des Zielmoleküls zugelassen wird und zum anderen können Liganden bereits während der Gelherstellung zugefügt werden. Letzteres führt zu einer kovalenten Bindung des Liganden zum Cryogel [Loz2002]. Im speziellen Fall der Zellimmobilisierung stellt die Kopplung über reaktive funktionelle Gruppen die mildere Methode dar. Darüber hinaus können immobilisierte Zellen in makroporösen Gelen in Bioreaktoren eingesetzt werden. Dank struktureller Stabilität kann eine erneute Verwendung auch nach Trocknung und Lagerung gewährleistet werden, wobei es nur zu geringfügigen Einbußen der Zellviabilität kommt [Pli2008].

Cryogele als 3D Zellgerüstträger

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits mehrfach über die Verwendung von Hydrogelen im Zusammenhang mit TE und anderen biomedizinischen Anwendungsbereichen berichtet. Grundlage der Hydrogelsynthese bilden hydrophile Polymere, welche ein verzweigtes 3D Netzwerk bilden und auf diese Weise das Anschwellen in wässriger Umgebung unter starker Volumenzunahme zulassen. Gleichzeitig verhindert die Quervernetzung der Polymerketten die Gelauflösung in Wasser [Ahm2015]. Im Allgemeinen können Cryogele und Hydrogele zur gleichen Gruppierung gezählt werden, jedoch unterscheiden sie sich in einem wesentlichen Rektionsschritt, welcher die Verwendung des einzelnen Gels entscheidend beeinflusst. Im Bereich der 3D Zellkultivierung auf Basis eines Gerüstträgers wurden im Laufe der Zeit die Vorteile von Cryogelen gegenüber Hydrogelen erkannt und Unterschiede in verschiedenen Studien erfasst [Sri2007; Hwa2010]. Angesichts der Tatsache, dass die zu Grunde liegenden Polyreaktionen identisch sind, basieren eine Vielzahl an Cryogelen auf den gleichen Materialien. Synthetische und natürliche Polymere, wie PAAm, PHEMA, PVA oder PVCl sowie Gelatine, Agarose, Alginat und Chitosan, und die Kombinationen aus beiden Polymergruppen zählen zu den gängigen Materialien für die Cryogelherstellung [Bha2011; Sin2013; Web2013]. Ausschlaggebend für die spezifischen Merkmale der Cryogele und die visuellen Unterschiede zu Hydrogelen ist die Synthese unterhalb des Gefrierpunktes. Die Ausbildung eines Zweiphasen-

systems infolge der Eiskristallbildung führt zur Konzentration der Reaktionskomponenten in einer nicht-gefrorenen Phase, wohingegen bei RT eine homogene Verteilung der Komponenten stattfindet. Als Ergebnis liegt eine kompakte Porenstruktur vor, welche sich auffallend von dem hochporösen System des Cryogels unterscheidet (Abb. 2-2).

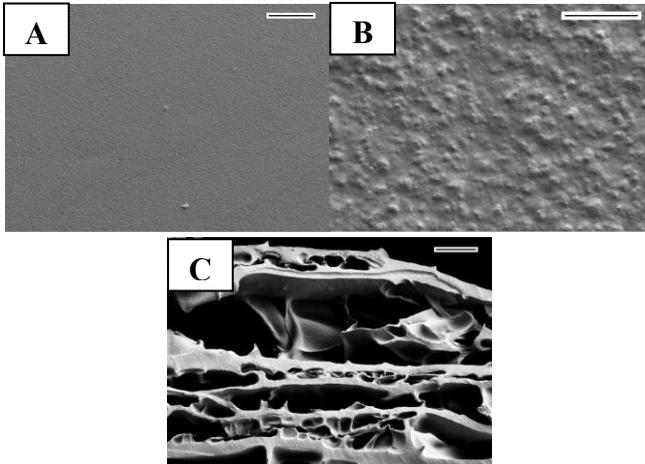


Abb. 1-2: Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahmen zweier polymeren Gele synthetisiert bei unterschiedlichen Temperaturen. Hydrogel, synthetisiert bei RT in 150fachen (A) Maßstabsbalken 100 μm und 5.000fachen Vergrößerung (B) Maßstabsbalken 5 μm . (C) Cryogel, synthetisiert bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 150fachen Vergrößerung, Maßstabsbalken 100 μm . Ausgehend von den gleichen Ausgangsstoffen wurden im Fall des Hydrogels keine eindeutig sichtbare Porenstruktur ausgebildet. Bei gleicher Vergrößerung (A, C) kann im Fall der Cryogelstruktur eindeutig zwischen Poren und Porenwänden unterschieden werden.

Ausgehend von dem makroporösen Netzwerk der Cryogele ergeben sich zahlreiche Eigenschaften, welche im Kontrast zu herkömmlichen Hydrogelen stehen. Charakteristisch große Poren umgeben von dichten Porenwänden resultieren in einer schwammartigen Morphologie mit einer außergewöhnlichen mechanischen Festigkeit. Auf diese Weise können Cryogele, verglichen zu gewöhnlichen Gelen, starken Kompressionen ausgesetzt, ohne mechanisch zerstört zu werden. Auftretende Deformationen rufen eine elastische Stau-

chung der Porenwände hervor, welche zum Austreten von Porenflüssigkeit führt. Erst bei vollständigem Verlust der Flüssigkeit kommt es bei einer weiteren Materialverdichtung zur Annäherung der Porenwände und zur plastischen Verformung [Wel2012]. Die Stabilität und Festigkeit der Cryogelstruktur steigt mit zunehmender Konzentration der Reaktionskomponenten durch verstärkte Porenwände und kleinere Poren. Wesentlich intensiver wirkt sich solch eine Konzentrationserhöhung auf die Polymervernetzung und zugleich Festigkeit der Hydrogelstruktur aus [Sav2007]. Dank der erhöhten Porosität und makroporösen Strukturquellen Cryogele in wässriger Lösung sehr schnell. Dabei werden Wassermoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindung) an polare Gruppen gebunden und der Abstand zwischen den Polymerketten nimmt zu. Dies hat zur Folge, dass Cryogele binnen kürzester Zeit ein Vielfaches ihres Eigengewichtes an Flüssigkeit aufnehmen können, ohne an stofflichem Zusammenhalt zu verlieren. Des Weiteren verweist diese Reaktion auf eine ungehinderte Diffusion der gelösten Stoffe durch die Poren [Cey2006]. Letzteres ist ein entscheidendes Kriterium und spielt während der Zellkultivierung eine besondere Rolle. Der reibungslose Transport von essentiellen Nährstoffen und Sauerstoff durch das vernetzte Porensystem sichern das Überleben der Zellen und gewährleisten darüber hinaus auch in tieferen Bereichen eine ausreichende Versorgung. Im Vergleich zu gewöhnlichen Hydrogelen, ermöglicht die makroporöse Struktur ebenfalls eine homogene Verteilung der Zellen, ohne Blockierung einzelner Poren und einem damit verbundenen Versorgungsengpass. Tabelle 1-3 fasst noch einmal die primären Eigenschaften und Vorteile von Cryogelen als Zellgerüstträger gegenüber Hydrogelen zusammen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Verwendung von Cryogelen, als 3D Zellgerüstträger, auch eine rein natürliche Matrix eingesetzt, welche aus dem Strukturprotein (Fibroin) des Seidenspinners *B.mori* aufgebaut ist und ebenfalls die nötigen Voraussetzungen zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellen bietet. Nachfolgend werden die strukturellen Merkmale des Seidenfibroins sowie dessen Einsatz als Biomaterial erläutert.

Tab. 1-3: Unterschiede zwischen Hydrogelen und Cryogelen hervorgerufen durch verschiedene Syntheseabläufe [Loz2002; Kir2009].

| Merkmal | Cryogel | Hydrogel |
|--------------------------------|--|--|
| Synthese | Unterhalb des Gefrierpunktes | Raumtemperatur |
| Polymerstruktur | Poröse Struktur aufgrund wachsender Eiskristalle während der Synthese umgeben von verzweigten Polymerketten | Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes aus verzweigten Polymerketten |
| Porengröße | Porengrößen zwischen 10 und 300 μm | Porengrößen $< 10 \mu\text{m}$ |
| Variabilität der Eigenschaften | Variabilität der spezifischen Eigenschaften durch Änderung von Syntheseparametern (z.B. Gefrierzeit, Gefriertemperatur) | Variabilität der Eigenschaften ausschließlich über Art der Ausgangsstoffe und Konzentration |
| Schwellverhalten | schnelle Quellrate in wässriger Umgebung | langsame Quellrate in flüssiger Umgebung |
| Diffusion | hohe Diffusionsgeschwindigkeit ($< D$) | geringe Diffusionsgeschwindigkeit ($> D$) |
| Festigkeit | mechanische Festigkeit mit hoher elastischer Verformbarkeit (schwammartige Morphologie) $>$ präzise Nachahmung gewebeähnlicher Eigenschaften | mechanische Festigkeit mit kleinerem elastischen Bereich $>$ ungenaue Nachahmung gewebeähnlicher Eigenschaften |

1.4 Seide als natürliches Biomaterial

1.4.1 Struktur und Aufbau von Seidenfibroin

Seide ist eine Naturfaser und wird von mehr als 30.000 bekannten Spezies synthetisiert, jedoch vorrangig aus den Kokons der Seidenraupe, Larve des Seidenspinners gewonnen. Als einzige in der Natur vorkommende Endlos-Faser wurde sie hauptsächlich in der Textilindustrie verwendet und gilt bis heute als edelster und wertvollster Naturstoff [Web2013]. In spezialisierten Drüsen wird die Seide von Epithelzellen synthetisiert und anschließend ins Lumen der Drüse sekretiert, wo die Seidenproteine bis zum Spinnvorgang gelagert werden [Kim2004]. Der gesponnene Seidenfaden dient zur Herstellung des Kokons, welcher die Seidenraupen vor Angriffen von Raubtieren, Parasiten und anderen Umwelteinflüssen schützt. Je nach Seidenraupenspezies und Vorkommen variieren die Kokons in Gewicht, Dicke, Farbe und Festigkeit [Zha2013]. Bei näherer Betrachtung kann der Seidenkokon als mehrlagiges Material geformt aus einem Doppelseidenfaden beschrieben werden (Abb. 1-3A).

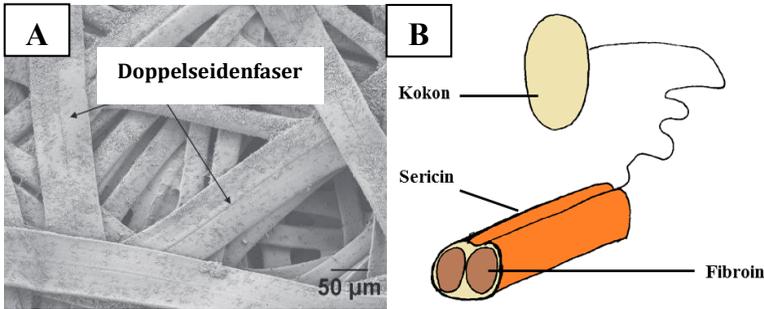


Abb. 1-3: Struktureller Aufbau des Seidenfadens. **(A)** REM-Aufnahme eines Seidenkokons. Die doppelte Seidenfaser (Seidenprotein: Fibroin) wird von einem kleberartigen Protein (Sericin) umhüllt, welches die Fasern zusammenhält [Zha2013]. **(B)** Schematische Darstellung des Verbundes von Sericin und Fibroin.

Verschiedene Schmetterlingsarten, welche als Seidenspinner bezeichnet werden, dienen der Gewinnung von Seide. Der bekannteste Seidenspinner *Bombyx mori* (*B.mori*) oder auch Maulbeerspinner genannt, ist eine von Menschen gezüchtete Art, dessen Kokon sich bezüglich seiner Form, Farbe und mechanischen Eigenschaften von den Wildformen unterscheidet. Im Vergleich zu den gezüchteten Seidenraupen des *B.mori*, zeigen die Kokons der Wildformen, z.B. des chinesischen Eichenspinners *Antheraea pernyi* (*A.pernyi*), eine an die Umwelt angepasste Färbung und höhere Festigkeit [Che2012]. *B.mori* zählt zu den am besten untersuchten Seidenspinnern und findet seit langer Zeit in der Textilbranche sowie als Nahtmaterial Verwendung. Die Proteine Fibroin und Sericin bilden die Hauptbestandteile des Doppelfadens und bestimmen gleichzeitig die artspezifischen Eigenschaften der Seide. Das natürliche Struktur- und Faserprotein Fibroin, welches der Seide seine Strapazierbarkeit und Festigkeit verdankt, wird durch die kleberartige Wirkung des Sericins zusammengehalten (Abb. 1-3B). Als adhäsiver Binder sichert es den strukturellen Zusammenhalt der Fasern und auf diese Weise des gesamten Kokons [Yan2012]. Im Gegensatz zum Fibroin, welches aus geordneten (kristallinen) und ungeordneten (amorphen) Bereichen besteht, sind die amorphen Regionen des Strukturproteins Sericin für die Löslichkeit in Wasser sowie in den meisten sauren und alkalischen Lösungs-

mitteln verantwortlich. Diese Eigenschaft ermöglicht die thermisch-chemische Lösung des Sericins (Entbasten) und anschließende Gewinnung des Fibroins [Rat2013]. Die außergewöhnlichen Eigenschaften der Seidenfasern beruhen auf der Zusammensetzung und dem Aufbau des Seidenproteins Fibroin, wobei es unter den verschiedenen Seidenraupen zu signifikanten Unterschieden kommt [Wan2006]. In der amorphen Region, welche ein Drittel des Moleküls ausmacht, kommen alle 18 im Fibroin auftretenden Aminosäuren vor, wohingegen der kristalline Teil aus einer alternierenden Abfolge von Aminosäuren mit kurzen Seitenketten (Glycin, Alanin und Serin) besteht. Die kristallinen hydrophoben Blöcke sind innerhalb der amorphen hydrophilen Bereiche eingebettet. Die Polypeptidketten aus den wiederholenden Aminosäureabfolgen bilden anti-parallel verlaufende β -Faltblattstrukturen, welche durch starke Wasserstoffbrückenbindungen (H-Bindungen) zusammengehalten werden. Die Kombination aus hoher Festigkeit und Duktilität³ resultiert vorwiegend aus den Wechselwirkungen zwischen und innerhalb dieser hydrophoben und hydrophilen Blockstruktur [Che2014]. Grundsätzlich kann zwischen zwei Konformationen des Fibroins unterschieden werden: Seide I und II. Die wasserlösliche Gestalt nimmt Fibroin in der Seidenraupendrüse an und wird als Seide I beschrieben, während als Seide II die unlösliche Form nach der β -Faltblatt Transformation außerhalb der Drüse bezeichnet wird [Mot2002].

Das Interesse an der Verarbeitung von regeneriertem Fibroin resultiert nicht zuletzt aus den hervorragenden Eigenschaften, welche es zu einem vielseitigen Biomaterial machen. Neben der hohen Zugfestigkeit, Flexibilität und Beständigkeit gegenüber Druckkräften stehen die Biokompatibilität, eine geringe Immunogenität⁴ und eine verlangsamte biologische Abbaurate. Die Verwendung von Seidenfibroinlösung setzt die Entfernung von Sericin als Prozessschritt voraus und ermöglicht auf diese Weise die Konstruktion von verschiedenartigen Gerüststrukturen, wie z.B. Filme, Schäume, Hydrogele,

³ .Duktilität, Eigenschaft eines Werkstoffes sich unter Belastung zunächst plastisch zu verformen.

⁴ .Immunogenität, Eigenschaft eines Stoffes im Tier oder Mensch eine Immunantwort auszulösen

Mikropartikel oder Nanofasern. Weiterhin können chemische Modifizierungen oder die Herstellung von Polymerblends zur Verbesserung bestehender Eigenschaften (physikalisch oder biochemisch) oder als Erweiterung potentieller Funktionalitäten durchgeführt werden [Kun2014]. In Tabelle 1-4 werden die möglichen Materialformen aus Seidenfibroin bezogen auf die Herstellungstechnik zusammengefasst. Die ausführliche Beschreibung zu den einzelnen Fertigungsprozessen kann in Kapitel 1.2.1 nachgelesen werden.

Tab. 1-4: Übersicht zu möglichen Herstellungstechniken aus Seidenfibroin und die daraus hervorgehenden Materialformen. Detaillierte Zusammenfassung der Fertigungsprozesse siehe Kapitel 1.2.1.

| Herstellungstechnik | Architektur | Referenz |
|--|--------------------|-----------------------|
| Selbstaufbau (<i>engl. Self-assembly</i>) | Nanofaser, Filme | [Par2006] |
| Gießen, Formen | Membrane/Matten | [Zha2015] |
| Elektrospinnen | Faser, Matten | [Cai2010] |
| Gefriertrocknen Gefrieren und Auftauen Salt leaching | poröse Schwämme | [Naz2004] |
| <i>In situ</i> Polymerisation | Faser, Hydrogele | [Xia2008; Mat2006] |

1.4.2 Anwendung Seidenfibroin basierter Gerüste

Nach Entfernung des Proteins Sericin wird die entbastete Seide gelöst und auf diese Weise eine konzentrierte Seidenfibroinlösung hergestellt. Untersuchungen mit Hilfe des Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometers⁵ (FTIR-Spektrometer) oder der Röntgendiffraktion⁶ konnten einen erhöhten Anteil an Random-Coil Struktur in wässrigen Fibroinlösungen nachweisen [Can1989].

⁵ FTIR-Spektrometer, physikalisches Analyseverfahren, welches mit Infrarotstrahlung arbeitet.

⁶ Röntgendiffraktion, Beugung von Röntgenstrahlen an geordneten Strukturen.

Random-Coil-Strukturen sind im Gegensatz zu den geordneten α -Helices oder β -Faltblattstrukturen ‚beliebig‘ angeordnete Bereiche der Sekundärstruktur eines Proteins. Der erhöhte Anteil an Random-Coil-Strukturen ist für den löslichen Zustand des Fibroins verantwortlich, welcher jedoch nach einer gewissen Zeit in den Gelzustand übergeht. Der Sol-Gel Übergang des gelösten Seidenfibroins wird zunächst durch schwache, gefolgt von stärkeren inter- und intramolekularen Wechselwirkungen hervorgerufen, die zur irreversiblen Bildung von β -Faltblattstrukturen führen (Abb. 1-4). Ausschlaggebend hierfür ist die regelmäßige Abfolge von Aminosäuren (Ala-Gly-Ser) der Primärstruktur, welche dazu neigen, kristalline Strukturen zu bilden. Diese selbstständig ablaufende physikalische Vernetzung wird zur Bildung unterschiedlicher Strukturen basierend auf Seidenfibroin genutzt. Prozessparameter, wie z.B. Proteinkonzentration, Temperatur und pH-Wert beeinflussen die Geschwindigkeit der Gelierung und auf diese Weise die Eigenschaften des entstehenden Konstruktes [Mat2006]. Je nach Anwendung und Seidenart kann auf verschiedene Lösungsmittel zur Herstellung regenerierter Seidenfibroinlösung zurückgegriffen werden. Das am häufigsten verwendete Lösungsmittel ist Lithiumbromid (LiBr) in Wasser/Ethanol gelöst oder aber auch Calciumchlorid- (CaCl_2) und Calciumnitratlösungen ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) in Verbindung mit Methanol oder Ethanol. Letztere führen zur Induktion von β -Faltblattstrukturen, um die Wasserstabilität zu erhöhen und gleichzeitig die Wasserlöslichkeit zu verringern [Che2001].

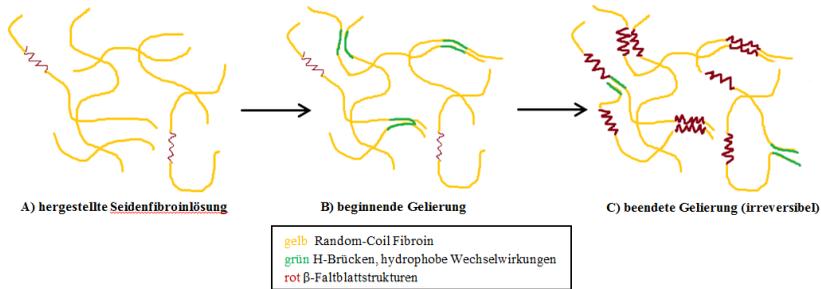


Abb. 1-4: Schematische Illustration des Sol-Gel Übergangs von regeneriertem Seidenfibroin. **A)** Die Ausgangslösung verfügt über einen vernachlässigbar kleinen Anteil an β-Faltblattstrukturen und intermolekularen Bindungen. **B)** Die Gelierung wird durch anfänglich schwache Interaktionen (H-Brückenbindung, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen) induziert. **C)** Am Ende resultieren diese in stabilen β-Faltblattstrukturen und ergeben ein stabiles Gerüst. (Abbildung verändert nach Matsumoto *et al.* [Mat2006]).

Seit Jahrhunderten wurde Seide als Nahtmaterial zum Verschließen von Wunden eingesetzt. Jedoch führte der native Seidenfaden zur Hypersensitivität bei Patienten, was auf die Anwesenheit des Proteins Sericin zurückgeführt werden konnte. Als sehr weiches und geschmeidiges Material wird Seide heute vorzugsweise im sensiblen Mundbereich verwendet. Neben der Verwendung als Nahtmaterial und Ausgangsstoff in der Textilbranche stellt der Bereich des TE ebenfalls ein breit gefächertes Einsatzgebiet dar. Die hervorragenden mechanischen Eigenschaften der von Seidenfibroin basierten Materialien erfüllen ohne weiteres die gestellten Anforderungen an Gerüste für die Geweberegeneration [Koh2015]. Grundsätzlich kann dabei zwischen vier Morphologietypen unterschieden werden: poröse Schwämme, Hydrogele, Filme (dünne Schichten) und Matten (gewebte Strukturen), welche durch verschiedene Fertigungsprozesse entstehen können (siehe Kapitel 1.4.1; Tab. 1-4). Elektrogessponnene Seidenfibroin-Materialien verfügen über sehr gute mechanische Eigenschaften und können für Enzym-Immobilisierung und Wirkstofffreisetzung sowie zur Wundversorgung als antibakterielle Materialien verwendet werden [Chu2013]. Außerdem können die elektrogessponnenen Nanofasern mit Hilfe von Walzen in röhrenartige

Konstrukte mit kleinem Durchmesser (< 6 mm) geformt werden und als Gefäßtransplantate dienen [Ayt2014]. Basierend auf der Formvariabilität von Seidenfibroin wurde mit Hilfe kugelförmiger poröser Mikropartikel die Freisetzung von Wirkstoffen *in vitro* untersucht. Aufgrund ihrer thermischen Stabilität und Partikelgrößenvariation erwiesen sich die Mikropartikel aus Seidenfibroin als potentielle Wirkstoffträger [Bha2015]. Zusammengesetzte Gerüststrukturen basierend auf Seidenfibroin können als stabile Vorlage für Knochen- und Knorpelrekonstruktionen oder Hautersatz verwendet werden. Je nach Art und Anwendung stehen verschiedenste natürliche und synthetische Polymere als zusätzliche Komponente zur Verfügung [Tei2015]. Tabelle 1-5 zeigt eine Übersicht zu weiteren Zell- und Gewebeanwendungen für Seidenfibroingerüste.

Tab. 1-5: Übersicht zu unterschiedlichen Anwendungen für Fibroingerüste im Bereich TE (nach Vepari et al. [Vep2007]).

| Anwendung | Materialform | Referenz |
|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| Wundauflagen | Filme, Schwämme | [Sug2000; Yeo2000] |
| Knochenrekonstruktion | Schwämme, Filme, Hydrogele, Faser | [Kim2005; Kim2006; Mot2004; Kim2005] |
| Knorpelrekonstruktion | Poröse Schwämme, Hydrogele | [Wan2006; Aok2003] |
| Leberrekonstruktion | Filme | [Hu2006] |
| Endothelial- und Blutgefäße | Faser | [Fuc2006; Ung2004] |

Neben dem Seidenprotein Fibroin, welches aus dem Faden der Seidenspinner-Kokons extrahiert wird, weist die Spinnenseide ebenfalls hochinteressante mechanische Eigenschaften auf. Basierend auf deren Strukturproteine wird Festigkeit und Elastizität in einer einzigartigen Weise verbunden. Im nach-

folgenden Kapitel wird genauer auf die Vorzüge des Materials und die Unterschiede zum Seidenfibroin eingegangen.

1.4.3 Spinnenseide als neuer Wirkstoff

Zum Stamm der Gliederfüßler (*Arthropoda*) zählen neben Insekten (z.B. Seidenspinner), Tausendfüßlern und Krebstieren auch Spinnentiere, wie z.B. Spinnen, Skorpione und Milben [Aka2000]. Im Vergleich zu den genannten Arten, im Speziellen dem Seidenspinner (z.B. *B.mori*), produzieren Spinnen mehr als einen Seidentyp mit abweichenden funktionalen Eigenschaften. Webspinnen (*Araneae*) gehören zur bekanntesten Ordnung der Spinnen und umfassen weitere drei Unterordnungen (Gliederspinnen, Vogelspinnenartige, Echte Webspinnen) und über 37.000 Arten, welche alle die Fähigkeit besitzen Seide zu synthetisieren - die Schlüsselsubstanz zum Überleben der Tiere [Hu2006]. *Araneus diadematus* (gewöhnliche Gartenkreuzspinne) und *Nephila clavipes* (Goldene Seidenspinne) werden den Radnetzspinnen (Echte Webspinnen) zugeordnet, zurückzuführen auf die Form des Spinnennetzes. Beide Arten besitzen bis zu sieben verschiedene Drüsen, wovon jede eine spezialisierte und an die vorgegebenen Anforderungen angepasste Seidenart sezerniert [Sar2006; Sch2011]. Basierend auf exzellenten mechanischen Eigenschaften, wie eine hohe Reißfestigkeit in Kombination mit guter Dehnbarkeit, werden diese zum Aufbau des Netzes, Einfangen von Beute und Nahrung sowie dem Umhüllen der Spinneneier verwendet [Röm2008]. In Tabelle 6 werden die verschiedenen Seidendrüsen und deren synthetisierten Faserproteine zusammengefasst.

Die große ampullate Drüse exprimiert die Komponenten des Sicherheitsfadens, auch Dragline-Seide genannt, welche außerdem eine Rolle als Baumaterial für den Rahmen und Radien des Netzes spielt (Tab. 1-6). Die physikalischen und mechanischen Eigenschaften übertreffen oft künstlich hergestellte Materialien und sind für die Entwicklung neuer Biomaterialien von großem Interesse. Zum Vergleich ist Dragline-Seide fünfmal stärker als Stahl (unter Berücksichtigung des geringen Gewichtes der Spinnenseide) und dreimal härter als die synthetische Faser Kevlar, verbaut im Körperpanzer [Gos1999]. Die Dragline-Seide besteht aus zwei großen Proteinen, welche im Fall von

N.clavipes, eine der meist untersuchtesten Spinnenart, als Major Dragline Seidenprotein 1 und 2 (MaSp1/2, kurz Spidroin 1/2) bezeichnet werden. In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz und Geschwindigkeit während der Faserbildung verändern sich die Merkmale der Seide in Richtung festerer und steiferer Struktur oder erhöhter Dehnfähigkeit. Die beiden Kernproteine, MaSp1/2, setzen sich aus hochrepetitiven Blöcken der Aminosäuren Glycin (Gly) und Alanin (Ala) zusammen.

Tab. 1-6: Überblick zu den Seiden-produzierenden Drüsen inklusive Seidenproteinen. Spinnen besitzen die Fähigkeit drüsenpezifische Seidenproteine mit unterschiedlichen Sequenzen zu exprimieren. Auf diese Weise können verschiedene Fasertypen mit abweichenden funktionalen Eigenschaften gebildet werden [nach Hsia *et al.* [Hsi2011]. *Dragline Seide wird paarweise mit zwei Fäden der kleinen ampullaten Drüse versponnen. **Nur in Radnetzspinnen identifiziert.

| Seidendrüse | Verwendung | Faserproteine |
|------------------------|---|---------------------|
| große ampullate Drüse | Faden zur Rahmenkonstruktion, Abseilfaden/Sicherheitsfaden (Dragline Seide) | MaSp1, MaSp2 |
| kleine ampullate Drüse | Netzverstärkung, Sicherheitsfaden* | MiSp1 |
| Flagelliform | Fangspirale | Flag** |
| Aciniform | Umhüllungsfaden (Spinneneier, kleiner Durchmesser), Umschließung von Beute | AcSp1 |
| Tubuliform | Umhüllungsfaden (Spinneneier, großer Durchmesser) | TuSp1, ECP-1, ECP-2 |
| große ampullate Drüse | Faden zur Rahmenkonstruktion, Abseilfaden/Sicherheitsfaden (Dragline) | MaSp1, MaSp2 |

Poly-Ala- und Poly-Gly-Ala-Bereiche sind für die Bildung von β -Faltblattstrukturen verantwortlich und bestimmen auf diese Weise die außerordentliche Reißfestigkeit der Spinnenseide. Die geformten kristallinen Bereiche werden von Gly-reichen Abschnitten unterbrochen (entsprechen amorphe Regionen), welche die Elastizität der Fasern beeinflussen. Spidroin 2 (entspricht MaSp2) enthält in den Gly-Wiederholungssequenzen zusätzlich die Aminosäure Prolin, worauf die Dehnbarkeit der Seide ebenfalls zurückgeführt wird [Hu2006]. Anhand des Prolin-Gehaltes konnten Studien die Zusammensetzung von *N.clavipes* ermitteln und kamen zu dem Ergebnis, dass das Proteinlevel von MaSp1 mit 81 % höher ist als von MaSp2 (19 %). Das Verhältnis der Strukturproteine schwankt innerhalb der Spezies und legt somit die Funktion der Fasern fest [Bro2005].

Bezüglich der außergewöhnlichen mechanischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften von Spinnenseide ist eine Vielzahl an industriellen und biomedizinischen Einsatzgebieten denkbar. Aufgrund der erschwerten Züchtung, resultierend aus der kannibalistischen Lebensweise der Spinnen, sind bisher noch keine Produkte aus Spinnenseide kommerziell erhältlich. Weiterhin behindert die zeitaufwendige und kostspielige Ernte der Seide die Produktion im Großmaßstab. Alternativ können rekombinante Proteine der Spinnenseide unter Verwendung von gentechnisch veränderten Wirtsorganismen hergestellt werden [Slo2012]. Die Synthese von rekombinanten Seidenproteinen ermöglicht die Verarbeitung zu diversen Materialformen, wie Hydrogele, Schwämme, Fasern, Kugeln und Kapseln. Ähnlich der Anwendungsbereiche von regenerierten Seidenfibroin (*B.mori*) können Filme aus rekombinanten Seidenpidroin zur Modifizierung von Oberflächen und Implantaten, Kapseln zur Freisetzung von Wirkstoffen oder anderen Inhaltsstoffen sowie Hydrogele als Zellgerüstträger im Bereich TE verwendet werden [Har2009]. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen der Seide der Seidenraupe und Spinnenseide werden in Tabelle 1-7 zusammengefasst.

Tab. 1-7: Übersicht zu Merkmalen und Eigenschaften der Seidenfaser am Beispiel von *B.mori* (Art: Seidenspinner) und *N.clavipes* (Art: Goldene Seidenspinne).

| Merkmal | Seidenspinner (am Beispiel von <i>B.mori</i>) | Radnetzspinne (am Beispiel von <i>N.clavipes</i>) |
|--------------------|---|--|
| Züchtung | Herstellung von Seide im Großmaßstab durch Züchtung des Seidenspinners <i>B.mori</i> (zusätzlich Verwendung von Wildformen z.B. <i>A.pernyi</i>) | Züchtung aufgrund von kannibalistischer Lebensweise nicht möglich |
| Seidenfaden | Gesponnener Seidenfaden (Raupe) als Grundsubstanz für Seidenkokons (Aufgabe: Schutz der Raupe vor äußeren Einflüssen und Bedrohungen) | Bis zu sieben verschiedene Seidenarten mit unterschiedlichen funktionalen Eigenschaften entsprechend der zu erfüllenden Aufgaben (Netzbau, Aufhangseil, Beutefang, Schutz der Spinneier) |
| Aufbau Seidenfaser | Seidenfaser besteht aus zwei Strukturproteinen: Fibroin und Sericin (Kleberartiges Protein für den Zusammenhalt der Fibroinfilamente) | Verschiedene Seidenarten mit entsprechenden Strukturproteinen: MaSp1 und MaSp2 des Sicherheitsfadens/DrageLine Seide von besonderem Interesse (ohne Sericin [Sar2006]) |
| Seidenprotein | Fibroin: physikalisch vernetzte Blockpolymer-Struktur aus kristallinen | MaSp1/2: physikalisch vernetzte Blockpolymer-Struktur mit |

| | | |
|----------------------------|--|---|
| | (Ala und Gly > β -Faltblatt) und amorphen Bereichen (18 verschiedene AS) | kristallinen Bereichen (Poly-Ala und Poly-Ala-Gly) und unterbrochen von Gly- und Gly-Prolin-reichen Abschnitten |
| Verarbeitung Seidenprotein | Verarbeitung von regenerierten Seidenfibroin zu Hydrogelen, poröse Schwämme, Faser, Filme und Membrane | Verarbeitung von rekombinanten Proteinen (hergestellt in Hefen und Bakterien) des Abseilfadens [Wid2010; Moi2010] |

1.5 Sphäroidbildung

1.5.1 *In vitro* Tumormodelle – ohne und mit Gerüst

Chirurgische Eingriffe, Chemo- und Strahlentherapie gehören zu den häufigsten Behandlungsmethoden von Krebserkrankungen. Dennoch ist das Streben nach neuen Target-Molekülen und Biopharmazeutika für die klinische Anwendung ununterbrochen. Dabei werden beträchtliche Anstrengungen unternommen, die Wirksamkeit von Arzneimitteln zu optimieren und Nebenwirkungen zu minimieren. Dies beinhaltet die intensive Forschungsarbeit im Bereich der personalisierten Medizin und prädiktiver Biomarker sowie der Entwicklung präklinischer Modellsysteme. Im Regelfall stützen sich *in vitro*-Wirkstoffscreenings auf Zytotoxizitätstest, welche mit etablierten Krebszelllinien, kultiviert unter herkömmlichen 2D Bedingungen, arbeiten [Zan2016]. Unumstritten lieferte dieser Ansatz vielfältige Kenntnisse zur Tumorbiologie und trieb auf diese Weise die Wirkstoffforschung voran. Jedoch zeichneten sich gleichzeitig wesentliche Einschränkungen ab, welche zu einer hohen Rate an klinischen Ausfällen trotz hervorragender Anti-Tumor-Eigenschaften führte [Edw2015].

In vivo- und *in vitro*-Tiermodelle zählen deshalb zu wichtigen Werkzeugen in der Krebsforschung und dienen der Identifikation von Karzinogenen⁷, zur Entwicklung neuer Krebstherapien, Medikamenten-Screenings und ermöglichen Studien zu molekularen Mechanismen des Tumorwachstums und Metastasierung. Das gebräuchlichste Tiermodell im Bereich Wirkstoff-Screening und Wirksamkeitsstudien ist das Tumor-*Xenograft*-Modell, welches komplexe Tumor-Stroma-Interaktionen sowie Tumorbildung und -entwicklung erlaubt [Wan2014]. *Xenograft* (*griech.* xénos (Fremder), *engl.* graft (Transplantat)) umfasst die Übertragung von lebenden- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden (inkl. ganzer Organe oder Körperteile) zwischen verschiedenen Spezies. Die Nacktmaus dient als ausgezeichnete Wirt für sogenannte xenogene Transplantationen, da ein zugrundeliegender Gendefekt ein stark eingeschränktes Immunsystem verursacht und auf diese Weise eine Abstoßungsreaktion verhindert wird. Durch die subkutane Injektion von Zellen wird schließlich die Tumorentwicklung induziert [Kun2006]. Nichtsdestotrotz steht der Einsatz von Maus-/Tiermodellen aufgrund ihrer Komplexität, Unvorhersehbarkeit und lückenhafter Anwendung sowie ethischen Grundsätzen in der Kritik [Wan2014].

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, gibt es für 3D Modellsysteme zahlreiche Anwendungsbereiche und zur Verfügung stehende Fertigungsprozesse sowie Materialien unterschiedlichen Ursprungs. Ein ideales 3D *in vitro* Krebsmodell sollte die Tumor-Stroma-Interaktionen sowie das invasive Verhalten von Tumoren nachahmen können. Humane Tumore umfassen verschiedene Zelltypen, deren Funktion und Schicksal durch eine Vielzahl an chemischen, physikalischen und biologischen Faktoren beeinflusst wird. Letztere sind in der Mikroumgebung⁸ lokalisiert und spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiation, Progression und Metastasierung von Tumoren [P2011]. Das Tumorwachstum wird durch eine ununterbrochene Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie eine Reihe von wachstumsfördernden Faktoren angetrieben. Ein erhöhtes Tumolvolumen und eine zunehmende

⁷ .Karzinogen, Substanz, ein Organismus oder eine Strahlung, die Krebs erzeugen oder die Krebserzeugung fördern kann.

⁸ .Tumormikroumgebung, bezeichnet das unmittelbare Umfeld eines bösartigen Tumors.

Entfernung von den Blutgefäßen führen zu einer mangelnden Sauerstoffversorgung, der sogenannten Hypoxie. In kleinen Tumoren gar abwesend, verursacht diese in großen Tumoren grundlegende Veränderungen zellulärer Prozesse, vermittelt durch den Hypoxie induzierenden Faktor (HIF) [Ber2008].

Tumorsphäroidmodelle

In Abwesenheit einer möglichen Bindungsfläche oder eines Gerüsts neigen insbesondere Krebszellen zum Zusammenschluss und zur Selbstorganisation. Im Vergleich zu herkömmlichen 2D Zellkulturen ahmen diese sogenannten multizellulären Sphäroide das natürliche Tumorverhalten wirkungsvoller nach. Vor allem die Komplexität und Heterogenität sowie die spezifische Organisation und Architektur von in vivo Tumoren können Zellen wachsend als Monolayer nicht wiedergeben. Das dreidimensionale Wachstum von etablierten Krebszelllinien oder primären Zellkulturen gilt als repräsentativeres Modell zur Durchführung von in vitro Wirkstoff-Screenings. Des Weiteren weisen diese 3D Kulturen Tumoreigenschaften, wie z.B. Hypoxie, Wirkstoffpenetration und -reaktion, auf [Kim2013]. Tumorsphäroide gehören zu den häufigsten Verfahren und werden entweder in Suspension erzeugt (gerüstfreie Modelle) oder in Gerüststrukturen gebildet und können je nach Anwendung in jeglichen Dimensionen kultiviert werden [Tho2014]. Im speziellen zeigen große Sphäroide (> 500 µm Durchmesser) eine typische Zonierung mit Zellen in unterschiedlichen Proliferations- und Stoffwechszuständen auf, wie sie normalerweise in festen Tumoren in vivo auftreten. In Abbildung 1-5 wird diese typische Gliederung nochmals schematisch dargestellt und zeigt einen äußeren Bereich mit proliferierenden Zellen, eine darunterliegende Ruhe-Zone und einen nekrotischen Kern aufgrund eingeschränkter Sauerstoff- und Nährstoffversorgung [Vin2012].

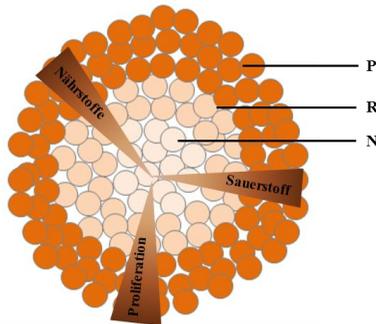
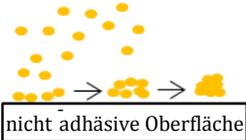
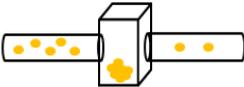


Abb. 1-5: Zonale Einteilung eines multizellulären Tumorsphäroid. Während des Zellwachstums kommt es zu einem zonalen Aufbau des Sphäroids. Proliferierende (**P**) Zellen befinden sich in den äußeren Schichten, während ruhende (**R**) Zellen eher zentral angeordnet sind. Bei zunehmendem Defizit an Sauerstoff treten Zelltod und Nekrose (**N**) auf. Diese Heterogenität entspricht näherungsweise dem nicht-vaskulären Mikrobereich eines Tumors *in vivo*.

Tumorsphäroidmodelle werden vorwiegend im Bereich Wirkstoffscreening, zur Untersuchung des Tumorwachstums, Proliferation, Immunreaktion und Angiogenese eingesetzt [Kat2016]. Generell kann zwischen vier Methoden der Kultivierung von multizellulären Sphäroiden ohne Gerüststruktur unterschieden werden: Suspension, nicht-adhärende Oberflächen, Hanging-Drop und Mikrofluidik (Tab. 1-8).

Tab. 1-8: Übersicht zu verschiedenen Sphäroid-Techniken und Anwendungsbereichen (Abbildungen nach Achilli et al [Ach2012]).

| Modell | Methode |
|---|--|
| Suspension | <p>Konstante Bewegung oder erhöhte Viskosität des Mediums fördern die spontane Interaktion und Aggregation der Zellen in Suspension (z.B. Verwendung von rotierenden Gefäßen [Wan2005] oder Spinner-Flaschen [Wan2012]).</p>  |
| Nicht-adhären-te Oberflächen (engl. Liquid Overlay-Technik) | <p>Nicht adhären-te Oberflächen fördern Sphäroid-Formation (z.B. Agar, Agarose oder PHEMA [Bal1999] in Microarrays oder 96-Well-Platten [Cha2014]).</p>  |
| Hanging-Drop | <p>Durch Schwerkraft wird die Zellaggregatsbildung in einem hängenden Tropfen in speziellen Well-Platten induziert [Oku2010].</p>  |
| Mikrofluidik | <p>Zellen werden durch ein Mikrokanalsystem in einzelne Kammern befördert und Rotationströmungen führen zur Bildung von Sphäroiden [Hsi2010].</p>  |

Bei der Auswahl eines geeigneten Verfahrens sollten die resultierenden Vor- und Nachteile der in Tabelle 1-8 beschriebenen Methoden betrachtet werden. Die Bildung von multizellulären Sphäroiden in Suspension ist eine sehr einfache und unkomplizierte Technik, welche eine effektive Lösung für Massenproduktion in Bioreaktoren darstellt [Wan2012]. Jedoch ist die

Methode für empfindliche Zellen, aufgrund auftretender Scherkräfte, ungeeignet und erschwert die Kontrolle über die Sphäroidgröße und deren Homogenität [Ach2012]. Im Vergleich dazu ermöglicht die Liquid Overlay-Technik, durch Verwendung von Mikroarrays oder Well-Platten, die direkte Beobachtung der Zellaggregation sowie die Kontrolle über die Sphäroidgröße [Fen2013]. Allerdings wird der Einfluss über die Oberfläche vernachlässigt, da ein direkter Kontakt zwischen den Zellen und dem Substrat ausgeschlossen ist. Eine Gerüst-freie Umgebung wird auch über die Hanging-Drop-Methode gegeben, welche die Beobachtung der Sphäroidbildung zwar erleichtert, aber die Kultivierungsdauer aufgrund der entstehenden Sphäroidgrößen einschränkt und demnach einen Einsatz im Bereich HTS nur bedingt zulässt [Kat2016]. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Methoden erfordert die Anwendung von mikrofluidischen Systemen technisches Equipment. Mit dessen Hilfe kann die Scherkraft gesteuert und die Konzentration an gelösten Stoffen geregelt werden [Wu2008]. Nichtsdestotrotz wird der Einfluss der Mikroumgebung, dessen Elastizität und Festigkeit sowie die stetigen Wechselwirkungen zwischen Zelle und Matrix nicht miteinbezogen.

Mit Hilfe der 3D Kulturen können unterschiedliche Komplexitätsstufen modelliert werden, welche von einfachen Monokulturen in flüssiger/fester Umgebung mit Sauerstoff- und Nährstoffgradienten sowie Zell-Zell-Interaktionen bis hin zu fortgeschrittenen Modellsystemen reichen, welche die Ko-Kultivierung mit anderen Zelltypen (z.B. Immunzellen) einbeziehen [Tho2014]. Gegenüber der Suspensionskultur (z.B. Hanging-Drop) bieten Gerüst-basierte Modelle den Zellen ein System, innerhalb dessen Sphäroide gebildet werden können und gleichzeitig der Einfluss von externen Größen auf das zelluläre Verhalten, wie Wachstum und Signalübertragung untersucht wird [Gre2012]. Eine Vielzahl an 3D Gerüsten erlaubt die Kontrolle und Anpassung von Porosität, Porengröße, Dichte und Festigkeit, um auf diese Weise der natürlichen Tumormikroumgebung näher zu kommen (siehe Kapitel 1.3 und 1.4). Im Gegensatz zu Flüssigkeits-basierenden Modellsystemen verbessert die Berücksichtigung von physikalischen Faktoren, wie Steifheit/Festigkeit der umgebenden Matrix, die Vielfalt an Anwendungsbereichen. Darüber hinaus können diese entsprechend der verwendeten Krebszelllinien angepasst werden [Bak2012].

1.6 Modellsysteme für die Prostatakrebsforschung

1.6.1 Grundlagen der Prostatakrebsforschung

Die Prostata ist eine exokrine Drüse, welche für die Herstellung von Zusätzen im Ejakulat verantwortlich ist. Neben der Benigne Prostata-Hyperplasie (BPH)⁹ und der Prostatitis (Prostataentzündung) zählt Prostatakrebs zu den am häufigsten diagnostizierten Krebsformen und steht an dritter Stelle der krebsbedingten Todesursachen bei Männern (Deutschland) [Rob2015]. Nach McNeal *et al.* kann die Prostata anatomisch in verschiedene Zonen unterteilt werden. Die periphere Zone nimmt den größten Teil der Prostata ein und besteht aus lockerem Stroma und Drüsengewebe [McN1988]. 80–90 % aller Prostatatumore sind Adenokarzinome und entstehen in der peripheren Zone (im Drüsenepithel) der Prostata [Sch2008]. Auf zellulärer Ebene bestehen Prostatadrüsen aus zwei verschiedenen Zelltypen: einer innen liegenden Epithelschicht aus sekretorischen Zellen und einer angrenzenden Basalzellschicht. Die Basalmembran trennt die Zellschichten vom Stroma, welches aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten sowie einer kollagenreichen EZM besteht (Abb. 1-6). Zusätzlich bestimmen Endothelzellen, Nervenfasern und Immunzellen das Bild des umliegenden Stromas [Bar2012].

⁹ .Benigne Prostata-Hyperplasie, gutartige Vergrößerung der Prostata.

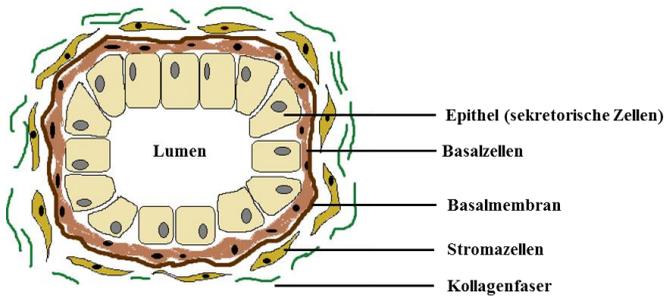


Abb. 1-6: Schematische Darstellung des zellulären Aufbaus im prostatistischen Drüsengewebe. Anordnung der Zellen in der peripheren Zone nach Frank et al.. Die innen liegende Epithelschicht (sekretorische Zellen) wird von einer direkt angrenzenden Basalzellschicht umgeben. Die Basalmembran trennt diese vom Stroma, welches u.a. aus einer kollagenreichen EZM besteht [Fra2013]. Während der Entstehung des Prostatakarzinoms kommt es zum Verlust von Basalzellen und der EZM Vielfältigkeit.

Immunhistochemisch exprimieren die sekretorischen Zellen die prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) und das prostataspezifische Antigen (PSA). Des Weiteren wird der charakteristische Androgenrezeptor¹⁰ (AR) vom Drüsenepithel sezerniert, wohingegen Östrogen- und Progesteronrezeptoren nicht nachweisbar sind [Hei1998]. Androgene agieren über den AR und sind Voraussetzung für die Entwicklung der Prostata und deren Funktion [Hei2004]. Das testikulär synthetisierte Testosteron ist das wichtigste männliche Androgen und wird nach der Synthese im Zielgewebe durch 5 α -Reduktase in das biologisch aktivere 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Auf zellulärer Ebene hat DHT einen wachstumsfördernden Effekt und ist essentiell für die Geschlechtsentwicklung des Mannes. Beide Hormone üben ihre biologische Wirkung durch Bindung an den AR aus und induzieren auf diese Weise dessen Transkriptionsaktivität (Abb. 1-7) [Hei2004]. Der AR zählt zur Familie Steroidhormonrezeptoren, welche ihre Liganden im Zytosol durch eine Konformationsänderung der α -Helixposition aufnehmen.

¹⁰ Androgene, Bezeichnung für synthetische oder natürliche Hormone, die die Entwicklung der männlichen Geschlechtsmerkmale steuern.

Gleichzeitig ermöglicht die Ablösung von anhängenden Chaperonen (z.B. Hitzeschockproteine, *engl.* Heat shock protein (HSP)) die Dimerisation des Rezeptors und den Transport in den Zellkern, wo es zur Bindung an spezifische Sequenzen der genomischen DNA kommt (Abb. 1-7) [Nie2009].

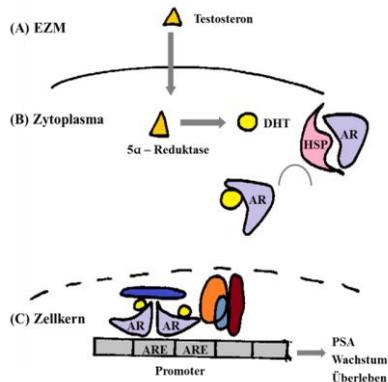


Abb. 1-7: Androgenrezeptor (AR)-Aktivierung durch Testosteron/DHT im Zytoplasma von Prostatazellen. **(A)** EZM. Das testikulär synthetisierte Testosteron wird über ein Protein gebunden und zu seinen Zielorganen transportiert. **(B)** Zytoplasma. In der Zelle des Zielorgans (Prostata) realisiert das Enzym 5α-Reduktase die Umwandlung von Testosteron in seine aktivste Metabolitenform, DHT. Anschließend bindet DHT an die Liganden-Bindungsdomäne des AR und löst auf diese Weise die Dissoziation von Hitzeschockproteinen (HSP) vom Rezeptor aus (Konformationsänderung). **(C)** Zellkern. Der AR-DHT-Komplex wandert in den Zellkern, dimerisiert und bindet an spezifische DNA Sequenzen (Androgen response element, ARE). Im Zellkern interagiert der AR mit zahlreichen anderen Proteinen, welche zusätzlich die Expression der Zielgene regulieren (vereinfacht nach Tan *et al.* [Tan2015]).

Androgene spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Entstehung von Prostatakrebs. Folglich zählt die Androgenentzugstherapie bei einem fortgeschrittenen Prostatakarzinom zu den grundlegenden und effektivsten endokrinologischen Behandlungsmethoden. Trotz anfänglicher Wirksamkeit in über 80 % der Fälle kommt es unweigerlich zum erneuten Wachstum des Tumors nach 12-18 Monaten erfolgreicher Therapie und zur Entstehung der

Kastration-resistenten Krankheit [Nam2012]. Eine Vielzahl an Wirkstoffen wurde entwickelt, welche entweder den AR anvisieren oder gezielt in dessen Syntheseweg eingreifen. Zum Beispiel bindet Enzalutamide direkt an den AR, wodurch eine nukleare Translokation und Rekrutierung von Co-Aktivatoren an den Liganden-Rezeptor-Komplex verhindert wird [Sch2012].

Neben dem AR und dessen spezifische Liganden spielt die EZM sowie Wachstumsfaktoren im Stroma eine zentrale Rolle für die funktionale und morphologische Differenzierung des Prostata-Epithels. Im Zuge dieser Differenzierung bewirkt ein komplexes Wechselspiel zwischen Stroma und Epithel ein Gleichgewicht von Proliferation, Differenzierung und Apoptose [Lon2005]. Im Zuge der Karzinogenese konnten histologische und biochemische Veränderungen im Tumor-Stroma beobachtet werden, welche allgemein als Desmoplasie bezeichnet werden und zur Ausbildung einer kollagenreichen Gewebeumgebung mit erhöhter Zellmigration (z.B. Einwanderung von Entzündungszellen), Proliferation und Angiogenese führen. Diese charakteristischen Merkmale unterscheiden die Mikroumgebung von Karzinomzellen von normalen Geweben [Tux2001]. Das Fehlen geeigneter Modellsysteme zur gezielten Untersuchung der genetischen Veränderungen von Prostataepithelzellen, der Tumor-Stroma-Wechselwirkungen und Progression von Kastration-resistentem Prostatakrebs hemmt das Fortschreiten der Entwicklung neuer Wirkstoffziele und Therapieansätze.

1.6.2 3D Ansätze in der Prostatakrebsforschung

Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, ermöglicht die Kultivierung von Tumorzellen als multizelluläre Aggregate eine komplexere Wiedergabe der *in vivo* Bedingungen. Die Aufrechterhaltung der 3D Struktur einschließlich der Zell-Zell-Interaktion und im Fall der Gerüst-basierenden Systeme der Zell-Matrix-Wechselwirkung sind nur eine von vielen Vorzügen, welche gegenüber der herkömmlichen 2D Monolayerkultur aufgezeigt werden können [Tak2007]. Dennoch konnte mit Hilfe der 2D Kultur und etablierten Prostatakrebszelllinien (Tab. 1-9) ein grundlegendes Verständnis bezüglich der biologischen Ursprünge erzielt werden. Mit zunehmender Bedeutung der Tumor-Mikroumgebung und dem Wissen über ausgehende chemische und

mechanische Signale stieg der Bedarf nach umfassenderen Modellen [Cuk2002]. Aufgrund abnormaler Modellierungen der EZM unterscheidet sich im Allgemeinen die Festigkeit von Krebsgewebe und dessen umliegenden Stroma von gutartigem Gewebe. Diese Gewebsversteifung kann mit speziellen bildgebenden Verfahren, wie z.B. der Sonographie, nachgewiesen werden und dient als wertvoller Marker zur Krebsdetektion [Hoy2008]. Darüber hinaus konnten *in vitro*- und *in vivo*-Studien den Einfluss der Festigkeit auf Krebszellwachstum, Signalwege und Zellinvasion bestätigen [Til2010]. Wenngleich der Schwerpunkt der chemotherapeutischen Arzneimittelwirkung auf den Tumorzellen lag, wird heute auf Basis neuer Erkenntnisse sowohl auf den lokalen Tumor als auch auf das angrenzende Stroma gezielt [Yam2007].

Zelllinien in der Prostatakrebsforschung

Die ersten humanen Prostata-Epithelzelllinien entstammten aus Metastasen der Lymphknoten (LNCaP), der Knochen (PC3) und des Gehirns (DU145) und gelten als die am häufigsten verwendeten Prostatakrebszelllinien [Bas1996]. Im Gegensatz zu den etablierten Zelllinien PC3 und DU145 ist die Epithelzelllinie LNCaP Androgenrezeptor positiv (AR^+) und wird somit in zahlreichen Studien zur Untersuchung des AR-Signalweges verwendet. Obgleich LNCaP-Zellen Androgen sensitiv sind, wird ein mutierter AR exprimiert, was der Grund für eine veränderte Signalübertragung ist [Vel1990]. Neben LNCaP-Zellen wurden im Laufe der Zeit weitere AR^+ -Zelllinien etabliert, welche in gleicherweise zum Einsatz kommen (Tab. 1-9) [Nav1997]. Aufgrund ihrer Androgenabhängigkeit stellen diese Zelllinien hervorragende Modellsysteme zur Untersuchung des Kastration-resistenten Prostatakrebs dar.

Tab. 1-9: Übersicht zu AR[±] Zelllinien und deren Eigenschaften (nach Sampson et al. [Sam2013]).

| Bezeichnung | Ursprung | Eigenschaften | Referenz |
|-------------|--|---|-----------|
| DUCaP | Gehirnmetastase | Wild Typ AR, Androgen sensitiv | [Lee2001] |
| LNCaP | Lymphknotenmetastase | mutierter AR, PSA Produktion, Androgen sensitiv | [Vel1990] |
| PC346 | transurethrale Resektion eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms | Wild Typ, abgewandelte Zelllinien verfügbar | [Mar2006] |
| 22Rv1 | Humanes Prostatakarzinom Xenotransplantat | mutierter AR, geringe Mengen an AR und PSA | [Att2004] |
| VCaP | Knochenmetastase | Wild Typ AR, Androgen sensitiv | [Kor2001] |
| DU145 | Gehirnmetastase | AR ⁻ , keine Reaktion auf Androgene | [Sto1978] |
| PC3 | Knochenmetastase | AR ⁻ , keine Reaktion auf Androgene | [Kai1978] |

Modellsysteme in der Prostatakrebsforschung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche 3D Modellsysteme zur Untersuchung prostataspezifischer Fragestellungen herangezogen und mit den Ergebnissen herkömmlicher 2D Zellkultivierung verglichen. Dabei konzentrieren sich einige Studien auf die Entwicklung von 3D Strukturen für die Zellkultivierung und wiederum andere auf die Verhaltensweisen von 3D-kultivierten gegenüber 2D-kultivierten Zellen. Jedoch erschweren die unterschiedlichen

Methodenansätze den Vergleich zwischen den verschiedenen Kultursystemen, was eine Anwendung im Bereich Wirkstoff-Screening oder Etablierung zellbiologischer Studien behindert. Besondere Faktoren wie Reproduzierbarkeit, Kosten- und Zeitverbrauch sowie Kompatibilität mit verfügbaren Zellviabilitäts- und HTS-Tests spielen dabei eine besondere Rolle. Derzeit werden verschiedene Ansätze verwendet um Sphäroide mit und ohne einer unterstützenden Matrix zu bilden. Mit Hilfe Basalmembrantartigen Matrices (z.B. Matrigel, Cultrex) [Tam2012], Hydrogelen aus synthetischen Polymeren (z.B. Polyethylenglycol (PEG)) [Kno1994], nicht-adhärenenten Oberflächen [Bon1993], rotierenden Gefäßen [Mur1997] oder der Hanging-Drop-Methode [Lan2012] ist es möglich die unterschiedlichen Prostatakarzinomzellen zu kultivieren (Tab.1-9) und sogleich den Einfluss auf die proliferative Kapazität, die Morphologie der Zellsphäroide sowie die Reaktionen auf Chemotherapeutika zu untersuchen. Die Bedeutung der elastischen Eigenschaften der umliegenden Gerüststruktur kann nur zum Teil überprüft und in Verbindung mit der Expression bestimmter Proteine gebracht werden. Im Speziellen wird der Wirkung von Androgenen wie DHT nachgegangen, welche eine stimulierende Wirkung auf den AR und in dem Zusammenhang auf das Zellverhalten hervorrufen (siehe Kapitel 1.6.1) [Wan2000]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt existieren nur wenige Modellsysteme, welche die Kultivierung von Primärzellen (Prostatakarzinomzellen) oder eine Ko-Kultivierung verschiedener prostataspezifischer Zelltypen zulassen und gleichzeitig die Tumor-Stroma-Wechselwirkungen untersuchen können [Ama2014].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Etablierung eines 3D Zellgerüstträgers basierend auf der Cryogeltechnik zur Kultivierung von Prostatakrebszellen. Basierend auf den natürlichen Bestandteilen Alginat (*hier*: Natriumalginat), Gelatine und Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) soll ein geeignetes Protokoll erstellt werden, welches die Anforderungen an ein effizientes 3D Modellsystems erfüllt. Auf Grundlage der Cryogelsynthese ist es möglich eine hochvernetzte poröse Struktur zu erzeugen, deren charakteristische Eigenschaften die Voraussetzung für eine 3D Kultivierungsumge-

bung bilden. Darüber hinaus soll durch das Zusammenspiel der drei unterschiedlichen Komponenten und der variablen Syntheseparameter (Reaktionszeit und Temperatur) der Einfluss auf das gesamte Porensystem, inklusive der Porengröße und -form sowie der elastischen Merkmale, untersucht werden. Außerdem sollen die Auswirkungen der herbeigeführten strukturellen Veränderungen auf das zelluläre Verhalten analysiert werden.

Die Auswahl der entsprechenden Substanzen erfolgte hinsichtlich ihrer spezifischen Eigenschaften. Alginate sind Polysaccharide und Salze der Alginsäure, welche von Braunalgen bzw. einigen Bakterien gebildet werden und ein strukturgebendes Element der Zellwände darstellen. Aufgrund ihrer Monomeren Bausteine, β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure, neigen sie zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes mit eingeschlossenen Wassermolekülen. Angesichts der Instabilität und schlechten zelladhäsiven Eigenschaften polymerer Gele aus Alginat, wird eine Verbindung mit Gelatine eingegangen, welche zu einer Verbesserung der Zellanheftung führen soll [Pet2011]. Gelatine als denaturierte Form des Kollagens besitzt ebenfalls hervorragende Geliereigenschaften, welche auf die physikalische Vernetzung der Triple-Helix-Formation zurückgeführt werden kann [Vli2011]. Über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen kommt es zur Aggregation der Gelatine-Monomere und zum Übergang von einzelnen Helices zu Triple-Helices [Par2012]. Im Gegensatz zu Alginat weist Gelatine eine besondere Aminosäuresequenz (RGD, Arg-Gly-Asp) innerhalb ihrer Proteinstruktur auf, welche als Adhäsionsmotiv zur Förderung der Zellanheftung bekannt ist. Diese wird über Oberflächenrezeptoren (Integrine) erkannt und verhilft der Verankerung in der Matrixstruktur. Durch die Verbindung der natürlichen Komponenten sollen die mechanischen Schwächen verringert und die zellwachstumsfördernden Eigenschaften verbessert werden. Mit Hilfe von HEMA soll ein synthetisches Polymer, mit ausgezeichneten Elastizitäts- und Quelleigenschaften, als zusätzliche Einflussgröße eingeführt werden. Auf diese Weise wird es ermöglicht durch verschiedenste Zusammensetzungen die optimalste Materialkomposition zu entwickeln und gleichzeitig die Auswirkungen auf die Cryogelstruktur zu untersuchen. Schwerpunkte werden dabei auf die Veränderungen des Porensystems inklusive der elastischen Eigenschaften gelegt. Nach der Etablierung eines geeigneten Protokolls soll

ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit die Kultivierung der Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 sein. LNCaP ist eine humane, Androgenrezeptor-abhängige Zelllinie, welche aus einer Lymphknotenmetastase entnommen wurde und zudem das Prostata-spezifische Antigen (PSA) sezerniert [Hor1983]. Im Vergleich dazu weist die Prostatakrebszelllinie PC3 ein hohes metastatisches Potential (Aggressivität) und eine geringe Menge an expri- mierten AR auf [Pul2005; Ali2006]. Diese Zelllinie entstammte der Kno- chenmetastase eines Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom. Sequenzierungen der DNA zeigten einen normalen AR, jedoch kam es nur zu einer unbedeutenden Reaktion auf Androgene. Dagegen verfügt der mutierte AR der LNCaP-Zellen auch über eine erhöhte Bindungsaffinität zu Östroge- nen (z.B. Estradiol) und Gestagenen (z.B. Progesteron) [Cul1993]. Im Rahmen dieser Arbeit soll neben dem Wachstumsverhalten der Zellen, auch die Bildung und Verteilung der Sphäroide innerhalb der Porenstruktur, unter Berücksichtigung der Porengröße und der elastischen Merkmale, überprüft werden. Dabei spielen sowohl der Einfluss als auch die Wirkung der einzelnen Reaktionskomponenten eine bedeutende Rolle.

Des Weiteren soll auf Basis des vorkommenden Strukturproteins Fibroin, extrahiert aus dem Seidenfaden des Seidenspinners *B.mori*, eine rein natürliche Gerüststruktur entwickelt werden. Diese Matrix soll nicht nur aus dem reinen Seidenfibroin aufgebaut sein, sondern mit unterschiedlichen Substanzen kombiniert werden. Auf diese Weise sollen die mäßigen zellad- häsiven Eigenschaften reiner Seidenfibroingerüste verbessert und umgekehrt dessen sehr gute mechanische Merkmale einen positiven Effekt auf die zusammengesetzten Gerüste ausüben. Zu den eingesetzten Komponenten zählen Kollagen, Gelatine, Chitosan, Seidenfibroin des Seidenspinners *A.pernyi* und das rekombinante Protein Spidroin. Im Rahmen dieser Arbeit gliederte sich der Prozess in zwei Abschnitte: Seidenfibroingewinnung und Geürstherstellung. Die Etablierung der Einzelschritte wurde durch studentische Abschlussarbeiten unterstützt [Fom2015; Ben2015; Sch2015; Ngo2014]. Die Synthese und die nachfolgenden Untersuchungen der reinen bzw. zusammengesetzten Seidenfibroingerüste basieren auf dem Herstel- lungsablauf sowie den Charakterisierungsmethoden der Cryogele. Ziel ist es sowohl die Auswirkungen der natürlichen Komponenten auf die ursprüngli-

che Seidenfibroinstruktur als auch das Verhalten der LNCaP-Zellen innerhalb der reinen bzw. zusammengesetzten Gerüste zu untersuchen. Dabei soll stets ein Vergleich zu den Cryogelen geschaffen sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten analysiert werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden Kapitel wird die Herstellung der verwendeten Cryogelstrukturen und Seidenfibroingerüste beschrieben sowie die Methoden zur physikalischen Charakterisierung und biologischen Bewertung näher erläutert. Es wurden verschiedene Methoden zur Einschätzung und Analyse von 3D Krebsmodellen entwickelt. Dabei wird zwischen Verfahren, welche der Beurteilung der strukturellen Eigenschaften dienen und denen der biologischen Eignung unterschieden.

2.1 Herstellung makroporöser Cryogele aus verschiedenen Polymeren

Die Synthese der verwendeten Cryogelstrukturen erfolgte in Anlehnung an die Publikation von Singh *et al.* und unterliegt den Fertigungsschritten, wie sie in Kapitel 1.3.1 beschrieben wurden [Sin2013]. Gemäß dem gewünschten Endvolumen wurde die relevante Menge an Reaktionskomponenten berechnet und falls erforderlich abgewogen. In einem mit bidestilliertem (bidest.) Wasser gefüllten Becherglas wurden zunächst die natürlichen Synthesebestandteile Natriumalginat und Gelatine gelöst. Während der Cryogelherstellung sollte beachtet werden, dass in wässriger Umgebung und in Abhängigkeit von der Alginatkonzentration kleine bis größere Klumpen entstehen, welche die Zeit bis zur vollständigen Auflösung verzögern.

In die homogene Lösung wurde schließlich Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Polyethylenglycoldiacrylat (PEGda) pipettiert. Unmittelbar daran anschließend erfolgte die Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS), Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Glutaraldehyd (GA). APS ist ein starker Radikalbildner und wird vorwiegend als Polymerisationsinitiator für Acrylverbindungen (z.B. Polyacrylmidgel für Gelelektrophorese) eingesetzt. Die feuchte Umgebung führt zur Aufspaltung des APS und Bildung von freien Radikalen, welche auf diese Weise die radikalische Polymerisation

induzieren. Eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Anwesenheit von TEMED erzeugt [Sav2011]. Infolge der radikalischen Polymerisation kommt es zum Kettenwachstum von HEMA und PEGda, wobei letzteres für die Quervernetzung der ansonsten linearen Polymerketten von HEMA verantwortlich ist [Sin2010].

Nach kurzer Rührzeit wird das Reaktionsgemisch unverzüglich in 3 ml Einwegspritzen gefüllt und bei -21 °C für 24 h tiefgefroren. Das Abfüllen bzw. Einfrieren des Polymergemisches sollte unmittelbar nach Zugabe der Initiatoren und Cross-Linker stattfinden, da es andernfalls zur Ausbildung der Netzwerkstruktur bei Raumtemperatur kommt ($t = 5\text{ min}$). Die Polymerisationsgeschwindigkeit verzögert sich aufgrund der tiefen Temperaturen und es erfolgt die Ausbildung eines Zweiphasensystems (Abb. 1-1, siehe Kapitel 1.3.1). In der nicht-gefrorenen Flüssigkeitsphase finden die radikalische Polymerisation von HEMA und PEGda sowie die Gelierung von Gelatine und Alginat basierend auf physikalischen Bindungen (z.B. H-Brücken) statt. Mit Hilfe von GA entstehen Verknüpfungen der Gelatineketten über deren freien Aminogruppen. Auf diese Weise kommt es zur Bildung eines Netzwerkes, innerhalb dessen die Polymerketten von Alginat eingeschlossen sind [Tri2013]. Zur gleichen Zeit wachsen die Eiskristalle außerhalb der nicht-gefrorenen Phase zu einem Geflecht heran. Nachdem bei Raumtemperatur (RT) das System aufgetaut ist, können die zylinderförmigen Strukturen vorsichtig aus den Spritzen entfernt werden. Mittels eines eigens dafür konstruierten Schneidegerätes wurden anschließend gleich große Probenstücke ($h = 3.5\text{ mm}$, $d = 8-9\text{ mm}$) angefertigt und bis zur weiteren Verwendung in bidest. Wasser bei 4 °C gelagert (Abb. 2-1).

Aufgrund der abweichenden Monomerkonzentration in den einzelnen Experimenten, werden diese an gegebener Stelle separat aufgeführt.

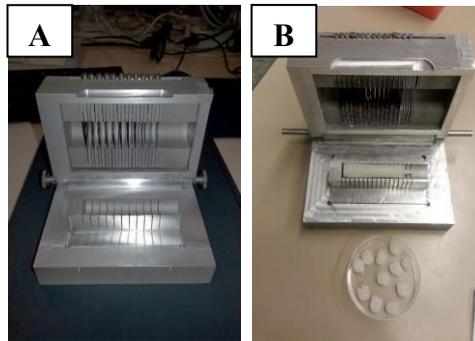


Abb. 2-1: Schneidegerät zur Anfertigung homogener Cryogelproben. (A) Cryogelschneider mit einem Klingeabstand von 5 mm (B) Cryogelschneider mit einem Klingeabstand von 3 mm. Die Probenschnitte erwiesen sich in den ersten Experimenten als zu groß und wurden durch den Klingeabstand von 3 mm ersetzt.

2.2 Herstellung von Seidenfibroingerüsten

2.2.1 Extraktion von Seidenfibroin aus *B.mori* und *A.pernyi*

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Seidenfibroingerüste dienen die Kokons der Seidenspinnerarten *B.mori* und *A.pernyi*. Noch bevor mit der Synthese der Gerüststrukturen begonnen werden kann, ist es erforderlich, die kleberartige Substanz Sericin vom Seidenprotein Fibroin zu entfernen und nachfolgend das Protein zu extrahieren.

Fibroin aus *B.mori*

Zunächst wurden die Kokons der Seidenspinner in kleine Stücke zerschnitten, gewogen und anschließend die entsprechende Menge an nötigem Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) berechnet. Die Kokonstücke wurden nach und nach in die kochende NaHCO_3 -Lösung gegeben und für 30 min gekocht. Mit der Zeit war es möglich, die Seidenfaser von der festen Struktur zu entfernen, d.h., die Sericinschicht löste sich vom Fibroin. Im Anschluss

wurden die Seidenfasern mehrfach gewaschen und über Nacht getrocknet. Im Fall einer notwendigen Unterbrechung des Experimentes sei an dieser Stelle erwähnt, dass die entbastete Seide für eine unbestimmte Zeit aufbewahrt werden kann (Abb. 2-2A).



Abb. 2-2: Seidenkokons und entbastete Seide der Seidenspinnerarten *B.mori* und *A.pernyi*. **(A)** Kokons der domestizierten Seidenspinnerart *B.mori* (l.) und entbastete Seide (trocken) nach Entfernen von Sericin (r.). **(B)** Kokons der Wildform *A.pernyi* (l.) und entbastete Seide (trocken) nach Entfernen von Sericin (r.).

Basierend auf der Menge an getrockneten Seidenfasern wurde eine 9.3 M Lithiumbromid (LiBr)-Lösung angesetzt, welche im Verhältnis 1:4 (1 g Seide zu 4 ml LiBr) verwendet wurde. Die Seidenfasern wurden unter konstantem Rühren in der LiBr-Lösung bei 60 °C gelöst, bis eine transparent-viskose Flüssigkeit mit gelblichem Farbton entstand. Diese sollte zügig in die dafür vorgesehenen Dialysekassetten überführt und gegen zweifach destilliertes Wasser für 48 h gereinigt werden. Während des Dialysevorganges wurde das Wasser dreimal täglich gewechselt. Anschließend wurde die Fibroinkonzentration mittels Spektrophotometer (Nanodrop ND1000, Firma peQLab) gemessen und in vierprozentige Lösungen aliquotiert (nach Rockwood *et al.* [Roc2011]). Der reine Extraktionsprozess erstreckt sich über vier Tage,

hinzukommen mindestens drei Tage für die Herstellung der Matrices und deren Gefriertrocknung.

Fibroin aus *A. pernyi*

A. pernyi zählt zu den bekanntesten Seidenraupen unter den Wildformen und unterscheidet sich nicht nur äußerlich, sondern auch auf molekularer Ebene von der domestizierten Form. Im Gegensatz zu *B. mori*, konnten vermehrt die Aminosäuren Ala, Asp und Arg sowie geringe Mengen an Gly bestimmt werden. Der Fülle an basischen Aminosäuren (Arg und His) und die Anwesenheit der Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp, auch bekannt als RGD-Sequenz, wurde ein positiver Effekt auf die Zellanheftung zugeschrieben [Min1995]. Zahlreiche Studien untersuchten die mechanische und strukturelle Beschaffenheit verschiedener Seidenkokons, insbesondere der Morphologie, Dichte und Schichtdicke (Sericinschicht). Letzteres war beim Vergleich der Kokons von *B. mori* und *A. pernyi* neben den visuellen Abweichungen (Farbe) besonders auffällig [Che2010; Che2012]. Die Stärke der Sericinschicht erschwerte das Entbasten der Seidenfaser und erforderte eine intensivere Recherche nach einem geeigneten Protokoll.

Zu Beginn wurden die Kokons zerkleinert und im Verhältnis 1:100 in einer Lösung aus 0.05 % w/v Natriumdodecylsulfat (SDS) und 0.25 % w/v Natriumcarbonat (Na_2CO_3) bei 100 °C für ungefähr eine Stunde gelöst. Zur Entfernung der alkalischen Lösung wurden die Seidenfasern nachfolgend bei 100 °C gespült (nach Gobin et al. [Gob2005]). Im Gegensatz zur Herstellung der Seidenfibröinlösung aus *B. mori* erfolgte die Lösung der getrockneten Seidenfaser von *A. pernyi* in einem beheizten Ölbad unter Verwendung eines Rückflusskühlers. Zu diesem Zweck wurde Calciumnitrat Tetrahydrat ($\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) in einem separaten Becherglas unter Wärmezufuhr gelöst (abhängig von der Menge an Seidenfasern) und anschließend in den Rundhalskolben überführt. Die entbasteten Seidenfasern (Abb. 2-2B) wurden hinzugefügt und unter Rühren, bei einer gleichbleibenden Temperatur von 105 °C, über fünf Stunden gelöst. Abbildung 2-3 stellt den experimentellen Aufbau dar.

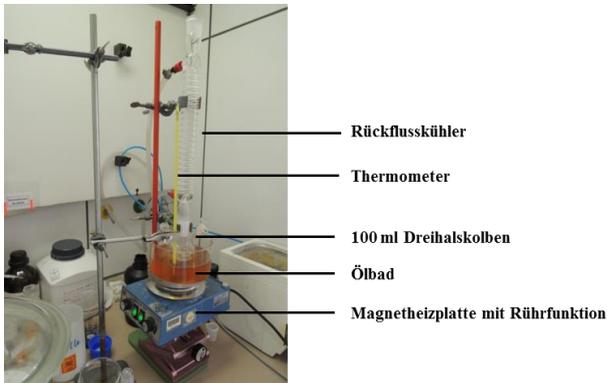


Abb. 2-3: Experimenteller Aufbau während der Seidenfibroinextraktion aus Seidenfasern von *A. pernyi*.

Nach der Extraktion des Fibroins aus den Seidenfasern von *B. mori* und *A. pernyi* verbleibt eine wässrige Lösung von reinem Seidenprotein, welche die Grundsubstanz für die Synthese verschiedener Trägermatrizes bildet. Die Lösung kann entweder bei 4 °C über mehrere Tage oder im gefrorenen Zustand über mehrere Wochen bis Monate gelagert werden. Alternativ kann die Lösung auch lyophilisiert werden, um diese für einen unbestimmten Zeitraum aufzubewahren.

2.2.2 Synthese unterschiedlicher Seidenfibroingerüste

Nachfolgend wird auf die Herstellung der einzelnen Seidengerüste eingegangen, welche sich in den grundlegenden Syntheseschritten gleichen. Ausgehend von einer vierprozentigen Seidenfibroinlösung (*B. mori*) wurden die verschiedenen Materialkombinationen angesetzt. Als strukturgebende Form dienen 48-Well-Platten, welche mit je 800 µl des Reaktionsgemisches befüllt wurden. Die Proben wurden bei -21 °C über Nacht eingefroren und anschließend für mindestens 24 h gefriertrocknet (Lyophilisator Alpha 1-4, Firma Christ). In Abhängigkeit von der Probenzusammensetzung und Anzahl der Well-Platten variierte die Trocknungszeit zwischen 24 und 48 Stunden.

Mit Hilfe eines Skalpells wurde anschließend die obere und untere Kante der Probe entfernt, sodass die zylindrische Form eine Höhe von 3 mm aufwies. Schließlich wurden die Seidenfibroingerüste für eine Stunde mit Ethanol behandelt, was zur Kristallisation (Bildung von β -Faltblattstrukturen) führte und die nötige Wasserstabilität sicherte (siehe Kapitel 1.4.1). Reine Seidenfibroingerüste dienten im Rahmen dieser Arbeit als Kontrolle gegenüber den zusammengesetzten Materialien.

Seidenfibroin-Kollagengerüste

Die Synthese von Fibroin und Kollagen nimmt Bezug auf die Protokolle von Lv *et al.* [Lv2005; Lv2009]. Eine vierprozentige Seidenfibroinlösung wurde in einem Verhältnis von 80:20 mit der bereits vorliegenden Kollagenlösung (3.37 mg/ml \cong 0.3 % w/v) vermischt. Nachdem ein homogenes Mischverhältnis erreicht wurde, erfolgte der Gefrier- und Trocknungsschritt.

Seidenfibroin-Gelatinegerüste

Angelehnt an die Arbeit von Yang *et al.* [Yan2012] erfolgte die Synthese der zusammengesetzten Gerüste aus Seidenfibroin und Gelatine. Zunächst wurde eine vierprozentige Gelatinelösung in bidest. Wasser angesetzt und unter beständigem Rühren vermischt. Nachdem sich der Anteil an Gelatine vollständig gelöst hatte, wurde GA im Verhältnis 1:32 zugefügt. Die nachfolgende Vermischung der Gelatinelösung mit Seidenfibroin (1:1) sollte zeitnah stattfinden, da die Quervernetzung der linearen Polymerketten unmittelbar nach Zugabe von GA erfolgt (siehe Kapitel 2.1).

Seidenfibroin-Chitosangerüste

Angeregt durch die Arbeiten von She *et al.* [She2008] wurden im Rahmen dieses Projektes zwei verschiedene Seidenfibroin-Chitosangerüste hergestellt. Als Ausgangslösung diente jeweils eine dreiprozentige Chitosanlösung, welche zuerst mit der Seidenfibroinlösung in einem Verhältnis 1:1 vermischt wurde. Unabhängig davon wurde für die Herstellung der Gerüste aus Seidenfibroin von *B.mori* und *A.pernyi* mit Chitosan je eine zweiprozentige Fibroinlösung benötigt, welche im Verhältnis 2:1:3 (*B.mori*: *A.pernyi*: Chitosan)

vermischt wurde. Im Fall der Seidenfibroin-Chitosangerüste Gerüste war eine Gefriertrocknungszeit von mindestens 48 h erforderlich.

Seidenfibroin -Spidroingerüste

Zur Herstellung der zusammengesetzten Gerüststruktur aus Seidenfibroin und dem Strukturprotein der Spinnenseide (hier: Dragline-Seide) wurde zunächst das rekombinante Seidenprotein Spidroin (SSP01, Firma AmSilk) in Ameisensäure gelöst. Basierend auf den Konzentrationsangaben des Herstellers konnte die Verdünnung auf zwei Prozent problemlos erfolgen. Anschließend wurde die Seidenfibroinlösung (gleiche Konzentration) mit der Spidroinlösung im Verhältnis 7: 3 vermischt.

2.3 Physikalische Charakterisierung der 3D Porensysteme

2.3.1 Messmethoden zur Beurteilung der porösen Eigenschaften

Für die Untersuchung der makroporösen Porensysteme der Cryogele und Seidenfibroingerüste steht eine Vielzahl verschiedener Messmethoden zur Verfügung. Porosität und Porengröße sind dabei wesentliche Messgrößen und können mit Hilfe von direkten oder indirekten Verfahren berechnet werden. Als dimensionslose Kennzahl stellt die Porosität das Verhältnis zwischen Hohlraumvolumen (entspricht Porenvolumen) zum Gesamtvolumen eines Stoffes oder Stoffgemisches dar und wird in der Regel in Prozent angegeben [Fie2001]. Das Porenvolumen wird durch Größe und Form der Poren bestimmt, welche wiederum durch Syntheseparameter, wie z.B. Gefriertemperatur und -zeit sowie Polymerkonzentration und Vernetzungsgrad beeinflusst werden [Oel2016]. Ausgehend davon können Porengrößen in verschiedene Klassen unterteilt werden (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Einteilung der Porengröße in Abhängigkeit vom Durchmesser (nach Fiedler et al. [Fie2001]).

| Art der Poren | Durchmesser [µm] |
|---------------|------------------|
| Makroporen | >2.000 |
| Grobporen | >50 (50-10) |
| Mittelporen | 10-0.2 |
| Feinporen | <0.2 |

Gravimetrie

Zur Berechnung der Gesamtporosität kann zwischen direkten oder indirekten Verfahren gewählt werden. Bei Anwendung der gravimetrischen Analyse-methode wird die Porosität mit Hilfe des Quotienten aus Roh- und Reindichte und deren Differenz zu 1 ermittelt (Gleichung 2-1, 2-2). Es ist ein sehr einfaches und schnelles Verfahren und dient der groben Abschätzung der tatsächlichen Porosität bevorzugt bei Materialien, welche für Methoden unter hohem Druck ungeeignet sind [Gha2007]. In ähnlicher Weise kann mit Hilfe der Verdrängungsmethode (Archimedisches Prinzip) die Porosität auf indi-rem Wege berechnet werden. Dazu werden die porösen Proben in ein bekanntes Lösungsmittel (z.B. Ethanol) getaucht, was in der Lage ist in das Porensystem einzudringen, ohne dieses strukturell zu beeinflussen. Die anschließende Berechnung basiert lediglich auf dem Volumina der bekannten Flüssigkeit, der zurückgebliebenen Flüssigkeitsmenge nach Entnahme der Probe und der Summe aus beiden (Gleichung 2-3) [Zha2001].

$$\text{Rohdichte (Gerüst)} = \frac{\text{Gewicht}}{\text{Höhe} \times \text{Fläche}} \quad (\text{Gleichung 2-1})$$

Rohdichte – Dichte eines porösen Festkörpers einschließlich des Volumens der Porenräume

$$\text{Gesamtporosität[\%]} = 1 - \frac{\rho_{\text{Gerüst}}}{\rho_{\text{Material}}} \times 100\% \quad (\text{Gleichung 2-2})$$

$$\text{Porosität (\%)} = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \quad (\text{Gleichung 2-3})$$

V_1 – Volumen der bekannten Flüssigkeit

V_2 – Volumen der bekannten Flüssigkeit (vor und nach der Probe)

V_3 – Volumen der Flüssigkeit nach Probenentnahme

Rasterelektronenmikroskopie

Unterschiedliche Computerprogramme, wie z.B. SemAfore oder ImageJ, können zur Auswertung von REM-Aufnahmen und der Berechnung von Porengröße, Porenwanddicke und Porosität verwendet werden. Bei dieser Mikroskopie-Methode rastert ein feingebündelter Elektronenstrahl über das Objekt und die aus der Probe austretenden Elektronen (entspricht Sekundärelektronen, SE) werden detektiert. Die Daten werden unmittelbar auf einem Monitor dargestellt, sodass der Bildaufbau in Echtzeit verfolgt werden kann. Je nach Beschaffenheit des Objektes werden unterschiedliche Signalintensitäten erfasst, was auf die Wechselwirkungen zwischen Primärelektronenstrahl und Atomen zurückzuführen ist. Infolge der niedrigen Energie, erreichen nur die SE aus dem obersten Nanometerbereichen den Detektor und bilden somit die Topografie des Objektes ab. Elektronen aus den tieferen Schichten werden somit nicht erfasst. Im Gegensatz zum Lichtmikroskop, können Aufnahmen mit sehr hoher Auflösung und Materialkontrast erzeugt werden. Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode ist die Vakuumstabilität der Proben sowie die Vorabbehandlung um Aufladungseffekte zu vermeiden. Diese können entweder durch zu wenige SE (negative Aufladung) oder durch einen zu starken Primärelektronenstrahl (positive Aufladung) entstehen. Beides kann durch eine Edelmetallbeschichtung (*engl.* Sputtern) mit Gold, Silber oder Platin reduziert oder gänzlich aufgehoben werden [Rei1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rasterelektronenmikroskopie zur visuellen Untersuchung der makroporösen Systeme und zur Erfassung der 3D Struktur verwendet (Abb. 2-4). Auf diese Weise konnte die Porenform und -größe sowie Porenwanddicke berechnet und untereinander verglichen werden. Vor Beginn der Messung wurden alle Proben bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Silberionen bestäubt. Aufgrund der Messung unter Hochvakuum können ausschließlich Proben im trockenen Zustand verwendet werden. Folglich sollte dies bei Betrachtung der porösen Struktur berücksichtigt werden, da diese während des Übergangs vom geschwollenen

zum trockenen Zustand stark schrumpft. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungsmethoden ist aufgrund der Vorgehensweise eine Weiterverwendung der Proben nicht möglich.

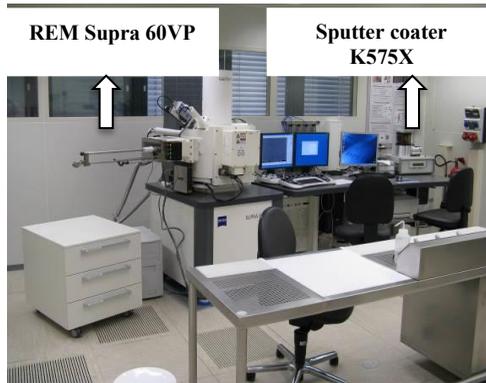


Abb. 2-4: Verwendetes REM und Sputteranlage im Reinraum des IMT. Die getrockneten Proben wurden zunächst mit Silberionen bestäubt und anschließend unter Vakuum im REM untersucht.

Quecksilberporosimetrie

Die Untersuchung der Poreneigenschaft eines Festkörpers kann unter anderem über die indirekte Methode der Quecksilberporosimetrie durchgeführt werden. Die Vorgehensweise basiert auf einer nicht-benetzenden Flüssigkeit (Quecksilber), welche nur dann in eine Pore oder Porensystem eindringen kann, wenn ein äußerer hydrostatischer Druck angewandt wird. Aufgrund der hohen Oberflächenspannung und der daraus resultierenden Nichtbenetzung des Materials, kann die Flüssigkeit nicht durch die Kapillarwirkung aufgenommen werden. Die Proben werden hierfür in ein spezielles Gefäß (Dilatometer oder Penetrometer) eingewogen und evakuiert, um die Luft aus den Poren zu entfernen. Das Probengefäß wird anschließend mit Quecksilber befüllt und an die Hochdruckstation angeschlossen. Der Druck wird nach und nach erhöht, wodurch das Quecksilber in die Poren gedrückt wird. Das aufgenommene Volumen wird in Abhängigkeit vom Druck erfasst, wobei der

Porenradius indirekt proportional zum aufgewandten Druck ist. Dieser Zusammenhang wird durch die Washburn-Gleichung wiedergegeben (Gleichung 2-4). Mit Hilfe dieser Untersuchung kann eine Porengrößenverteilung in einem Bereich zwischen 3.6 nm und 100 µm erstellt werden [Orr1969].

$$P = \frac{2\sigma \times \cos\theta}{R_p} \longrightarrow R_p = \frac{2\sigma}{P} \times \cos\theta \quad (\text{Gleichung 2-4})$$

P – Druck der Flüssigkeit
σ – Oberflächenspannung (480 N/m)
θ – Kontaktwinkel (135°-142°)
R_p - Porenradius

Gegenüber der Rasterelektronenmikroskopie ist keine Vorabpräparation der Proben notwendig, jedoch ist auch hier der getrocknete Zustand eine zwingende Voraussetzung. Weiterhin sei zu beachten, dass die Methode von der Annahme ausgeht das der analysierte Feststoff durchweg mit zylindrischen Poren versehen ist. Falls Poren für das Quecksilber nicht zugänglich sind (geschlossene Poren), wird dieser Volumenanteil nicht aufgezeichnet.

Röntgen-Mikro-Computertomographie

Die am ANKA befindliche Synchrotronstrahlungsquelle ist ein Elektron-Synchrotron, welcher zur Gruppe der Teilchenbeschleuniger zählt. Grundsätzlich dienen diese zur Beschleunigung von elektrisch geladenen Teilchen (z.B. Elementarteilchen, Atome und Moleküle) unter Vakuum in einem elektrischen Feld. Synchrotrone erzeugen Synchrotronstrahlung (elektromagnetische Strahlung), welche tangential zur Beschleunigungsrichtung geladener Teilchen (z.B. Elektronen) abgestrahlt wird, wenn diese bei einer bestimmten Geschwindigkeit aus einer geraden Bahn abgelenkt werden. Eine Besonderheit des Synchrotrons ist der Speicherring, welcher als Teilchenbahn fungiert und aus einzelnen Ablenkmagneten und angebrachten Beschleunigungsstrecken, in denen die Teilchenbahn gerade ist, besteht (Abb. 2-5). Im Gegensatz zur konventionellen elektromagnetischen Strahlung liefert eine Synchrotronstrahlungsquelle eine sehr viel höhere spektrale Bandbreite und Intensität mit Strahlungsbereichen von harter Röntgenstrahlung über ultraviolettem Licht bzw. sichtbaren Licht und Infrarotstrahlung

[Rac1988]. Auf diese Weise wird die Voraussetzung für eine Vielzahl an Bildgebenden Verfahren geschaffen.



Abb. 2-5: Aufbau des Elektron-Synchrotron Speicherring am ANKA. Die Synchrotronstrahlung entsteht bei der Ablenkung in den 16 Magneten, die die Elektronen auf der Ringbahn halten [Internetquelle: tpu.ru. Stand November 2016].

Am ANKA stehen dem Anwender mehr als zehn verschiedene Strahllinien (*engl.* Beamline) zur Verfügung, welche unterschiedlichen Zwecken dienen. Die Tomographieexperimente wurden an der TOPO-TOMO Beamline durchgeführt, welche mit einer Elektronenenergie von 2.5 GeV und Strahlensströme von 180 mA betrieben wurde. In Abbildung 2-6 wird die experimentelle Anordnung während der Tomographiescans dargestellt und zeigt die Cryogelprobe, welche auf einer Rotationsstufe (ABRT-150, Firma Aerotech) positioniert wurde. Für jedes Experiment wurden 3.000 Projektionen innerhalb von 40 s aufgenommen, wobei der Abstand zwischen Probe und Detektor (Ausbreitungsweg) 200 mm betrug. Die Röntgenprojektionen wurden mit einem indirekt umwandelnden Röntgenbereichsdetektor aus einem 200 μm dicken LuAG: Ce-Szintillator und einem Optique Peter Weißlichtmikroskop mit einer Vergrößerung von 3,6x und einer PCO.DIMAX-Kamera mit aufgenommen (Abb. 2-6) [Dou2012]. Die anschließende Volumenrekonstruktion erfolgte mit der PyHST-Software, welche an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) entwickelt wurde und die Segmentierung der rekonstruierten Scheiben wurde mit Hilfe von "Image Labeling" und "Labels Analysis" der AVIZO Fire 8.1 3D Software durchgeführt.

Mit Hilfe dieser mikrotomographischen Untersuchungen konnte die innere Porenstruktur der Gerüste zerstörungsfrei abgebildet werden. Unter Verwendung der Synchrotron-Lichtquelle können 3D Bilder mit hoher Auflösung bis in den Submikrometerbereich und mit einem hervorragenden Signal-Rausch-Verhältnis erzeugt werden. Basierend darauf können u.a. poröse Materialien und Gewebe aus der Biologie und Life Science charakterisiert und anschließend 3D Bildanalysen durchgeführt werden. Im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie und Quecksilberporosimetrie sind die Proben zwar auch im getrockneten Zustand, aber eine Möglichkeit zur anschließenden Weiterverarbeitung ist gegeben.

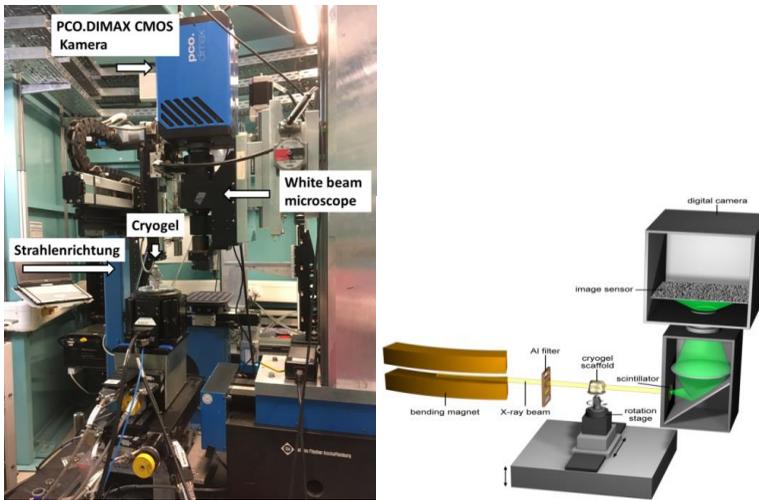


Abb. 2-6: Experimenteller Aufbau an der TOPO-TOMO Beamline.

Schwellverhalten

Poröse Materialien auf Polymerbasis vergrößern ihr Volumen in wässriger Umgebung durch Aufnahme und Bindung von Wassermolekülen mit gleichzeitiger Entfernung ihrer Polymerketten. Letzteres wird durch das Auftreten von Kapillarkräften ermöglicht, welche durch die Oberflächenspannung der

Flüssigkeit und der Grenzflächenspannung zwischen Flüssigkeit und fester Oberfläche hervorgerufen werden [Pop2009]. Auf diese Weise werden eine rasche Aufnahme der Zellsuspension und gleichzeitig eine effektive Verteilung der Zellen begünstigt. Porengröße und deren Vorkommen innerhalb der synthetisierten Gerüstträger ist für eine effiziente Versorgung der Zellen mit Nähr- und Sauerstoff von entscheidender Bedeutung. Neben einer ausreichenden Anheftungsfläche (Porenwänden) soll stets eine optimale Versorgung mit nötigen Nähr- und Zusatzstoffen aus dem Kulturmedium gewährleistet werden. Diese diffundieren im Zuge des Konzentrationsgefälles in das poröse System, während gleichzeitig für den Abtransport von Stoffwechselprodukten gesorgt wird.

Im Rahmen dieses Experimentes wurde das Schwellverhalten als Funktion der Zeit aufgenommen. Dazu wurden die trockenen Proben in zusatzfreiem Nährstoffmedium getränkt und zu definierten Zeitpunkten aus der Lösung genommen. Nachdem das überschüssige Medium mit Hilfe eines Filterpapiers sorgfältig entfernt wurde, konnte das Feuchtgewicht bestimmt werden. Anschließend kam die Probe zurück ins Becherglas und wurde zu einem späteren Zeitpunkt erneut verwendet. Zu Beginn des Versuchs wurde das Trockengewicht ermittelt, welches als Ausgangswert für die Berechnung der Schwell-/Quellrate und des Wassergehaltes diente (Gleichung 2-5,2-6; nach Saara *et al.* [Saa2012]).

$$\text{Schwellgrad} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (\text{Gleichung 2-5})$$

$$\text{Wassergehalt} = \frac{W_s - W_d}{W_s} \quad (\text{Gleichung 2-6})$$

W_s – Gewicht der geschwollenen Probe

W_d – Gewicht der trockenen Probe

Elastizitätsmodul

Die Bestimmung der gewebstypischen Eigenschaften erfolgte durch die experimentelle Erfassung des E-Moduls. Elastizität ist die Fähigkeit eines Stoffes bei einer Beanspruchung seine Ausgangsform zu verändern und in diese nach Wegnahme der Belastung zurückzukehren. Oberhalb des material-

spezifischen Grenzpunktes erscheinen plastische Verformungen oder der Körper bricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Gegensatz zu den üblichen Zugversuchen im Bereich der Werkstoffprüfung Druckversuche an der Zugprüfmaschine Z0.5 (Abb. 2-7A, Firma Zwick Roell) durchgeführt. Im Vergleich zu vielen anderen Werkstoffen zeigen Polymere bei mechanischer Beanspruchung ein stark ausgeprägtes viskos-elastisches (reversible Deformationen) und viskos-plastisches Verhalten (irreversible Deformation) [Eye2008].

Für den Druckversuch wurden die Proben, welche sich in einem feuchten (geschwollenen) Zustand befanden, auf den Probenhalter gelegt. Die Vermessung der Probe erfolgte einerseits manuell (Durchmesser) und zum anderen durch den senkrecht über der Probe befestigten Querkopf. Nach der automatischen Höhenabmessung wurde die Probe mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/min komprimiert. Beim Erreichen von 1 N wurde die Messung gestoppt und der bewegliche Querkopf fuhr in die Ausgangsposition zurück. Während des Versuches werden Wertepaare von Kraft und Eindrückweg erfasst und die zugehörige Kurve anschließend aufgezeichnet. Das Spannungs-Dehnungs-Diagramm ist probenabhängig und werkstoffspezifisch, aber kann dennoch in Verlaufsabschnitte unterteilt werden. Im geradlinigen Spannungsbereich (Hooke'sche Bereich) sind Spannung und Dehnung (*hier*: Stauchung) proportional und es gilt das Hooke'sche Gesetz. Der Elastizitätsmodul ergibt sich schließlich aus der Steigung des Graphen in Abhängigkeit von Spannung und Dehnung (Gleichung 2-7) [Läp2008].

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad (\text{Gleichung 2-7})$$

σ – mechanische Spannung mit F/A (Kraft zum Probenquerschnitt)

ε – Dehnung mit $\Delta L / L_0$ (Längen-/Höhenänderung zur ursprünglichen Länge/Höhe)

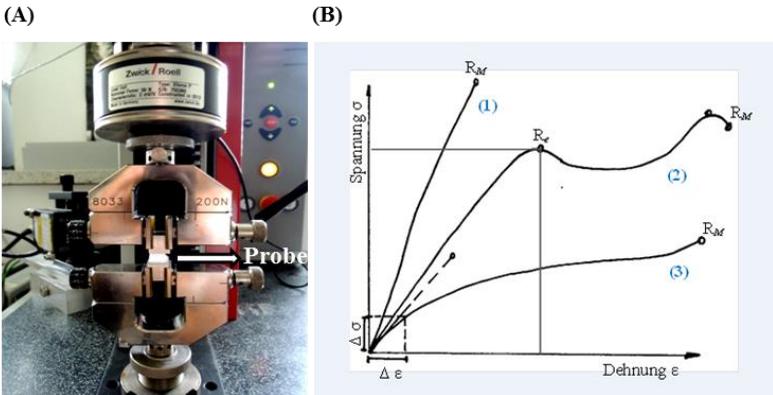


Abb. 2-7: Experimenteller Aufbau zum Druckversuch (RT). **(A)** Verwendete Zugprüfmaschine zur Durchführung der Druckversuche. Die Probe wird zwischen eine Halterung gelegt, wobei die untere fest verankert und die obere mit einer Kraftmessdose (max. 50 N) gekoppelt ist. Mit der Messung wird eine Kraft von 1 N auf die Probe ausgeübt und parallel dazu die Messdaten erfasst. **(B)** Spannungs-Dehnungs-Diagramm von verschiedenen polymeren Festkörpern. Je nach Verhalten bei mechanischer Beanspruchung, kann zwischen drei Grundtypen unterschieden werden. (1) Probe bricht plötzlich ohne sichtbares plastisches Verhalten (entspricht einem spröden Werkstoff). (2) Probe bricht nach starker plastischer Verformung (entspricht einem zäher/duktiler¹ Werkstoff). (3) Probe bricht nach vorangegangener elastischer, aber ohne plastische Verformung (entspricht einem weicher/elastischer Werkstoff) [Wei2007].

Verglichen mit Feststoffen (z.B. Metalle) ist der linearelastische Bereich bei Kunststoffen sehr klein und innerhalb dessen kann zwischen drei verschiedenen Verhaltensweisen unterschieden werden (Abb. 2-7B). Neben dem E-Modul lassen sich auch andere materialspezifische Kennwerte aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm entnehmen. R_e steht für die Streckgrenze und bezeichnet diejenige Spannung, bis zu der das Material keine plastische Verformung aufweist. Dagegen definiert R_M die Zugfestigkeit, d.h. die höchste ertragbare Belastung des Werkstoffes, bevor dieser bricht [Löp2008].

¹ .Duktilität, Eigenschaft eines Werkstoffes sich bei Belastung plastisch zu verformen.

2.4 Auswertung Zellkulturexperimente

2.4.1 Zellkultivierungsmethodik

Erst die Durchführung von biologischen Experimenten ermöglicht eine effiziente und gezielte Entwicklung und Optimierung eines 3D Modellsystems für die Zellkultur. Das entscheidende Kriterium ist hierbei die erfolgreiche Kultivierung der Prostatakrebszellen in einer *in vivo*-ähnlichen Umgebung und der Nachweis der biologischen Funktionalität. Für die Anpassung der polymeren Gerüststrukturen auf Basis verschiedener Ausgangsstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro*-Tests mit verschiedenen Zelllinien durchgeführt.

Zellwachstum und -aussaat

Für die *in vitro*-Tests wurden die adhärenzte Zelllinien LNCaP (Androgenrezeptor positiv, AR⁺) und PC3 (Androgenrezeptor negativ, AR⁻) verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um metastatische Prostatakrebszellen epithelialer Morphologie. Die Vorkultivierung erfolgte in Kulturschalen bei 37° C und 6 % CO₂-Atmosphäre im Inkubator (Firma Binder). Vor Benutzung der Petrischalen mussten diese im Fall beider Zelllinien mit Poly-L-Lysin beschichtet werden. Alle zwei Tage erfolgte ein kompletter Mediumwechsel und je nach Dichte der Zellen wurden diese entsprechend passagiert. Das verwendete Nährstoffmedium setzte sich wie folgt zusammen:

- RPMI 1640 + Phenolrot, L-Glutamin
- 10 Vol. % Fetales Kälberserum (FCS)
- 1 Vol. % L-Glutamin (200 mM)
- 1 Vol. % Antibiotic Antimycotic Solution (10.000 Einheiten Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 µg Amphotericin B pro ml)

Um die Zellen von den Kulturschalen zu lösen, wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Platte mit 10 ml Phosphatpuffer (PBS, ohne Calcium und

Magnesium) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Platten für ca. 2 min inkubiert. Trypsin ist ein Gemisch aus Verdauungsenzymen und zählt zu den Peptidasen. In der Zellkultur wird es zur Spaltung der extrazellulären Proteine verwendet, wodurch das Ablösen der adhären Zellen vom Boden der Kulturschale bewirkt wird. Die Reaktion der enzymatischen Lösung wurde durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen durch eine Glaspipette vereinzelt (Volumenangaben entsprechen dem Durchmesser einer Petrischale von 9.4 cm). Nachdem die Zellen zentrifugiert (1.200 rpm, 3 min) und in frischem Medium resuspendiert wurden, konnte diese in geringerer Konzentration wieder ausplattiert werden. Im Falle einer Zellzählung wurde die Zellsuspension verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Cryogelee eine Zellzahl von $2.5 \cdot 10^5$ und für die Seidenfibroingerüste eine Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ festgelegt. Vor der eigentlichen Zellaussaat musste sichergestellt werden, dass die Zellgerüstträger keine Kontaminationen aufwiesen, d.h. keine bakterielle Verunreinigung oder Pilzbefall. Aus diesem Grund wurden die Proben unmittelbar nach der Synthese in eine 24-Well-Platte mit sterilem Medium überführt und für mindestens 48 h inkubiert. Währenddessen erfolgte eine optische Kontrolle mit Hilfe eines einfachen Lichtmikroskops. Ehe die Zellen auf die porösen Gerüststrukturen gegeben wurden, musste das Medium entfernt, die Proben mit PBS gewaschen und für ca. 1 h unter der Sterilbank bei RT getrocknet werden. Auf diese Weise konnte eine geringe Menge an Flüssigkeit entweichen und dadurch die Saugfähigkeit der Gerüste erhöht werden. Anschließend wurde die Zellsuspension, entsprechend der benötigten Zellzahl und Probenmenge, angesetzt. Es wurden 20 μ l Zelllösung vorsichtig auf die Mitte der Gerüstoberfläche aufgetragen, welche sofort durch die Kapillarwirkung in die Probe gelangte. Die geringe Menge an Medium und eine sich anschließende Inkubationszeit von 2 h ermöglichte den Zellen tiefer in die poröse Struktur einzudringen und an den Porenwänden anzuhafte. Danach wurden die Proben in 6-Well-Platten überführt, welche mit je 5 ml frischem Medium befüllt wurden. Um eine ausreichende Nähr- und Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt.

Viabilitätstest

Zur Untersuchung der Zellzahlentwicklung innerhalb der verschiedenen Gerüstträger wurde der CellTiter-Glo® 3D Viabilitätstest von der Firma Promega verwendet. Eine speziell für 3D Modellsysteme entwickelte Methode bestimmt die Zahl der lebenden Zellen, basierend auf der quantitativen Menge an ATP. Letzteres repräsentiert die Stoffwechselaktivität der Zellen. Die gebrauchsfertige Lösung kann direkt zu den Proben gegeben werden und leitet dadurch die Zelllyse ein. Auf diese Weise wird ein Lumineszenzsignal erzeugt, welches mit dem Luminometer (Firma Perkin Elmer) gemessen wird. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt, die Proben in eine 24-Well-Platte überführt und unter der Sterilbank für mindestens 25 min getrocknet. Anschließend wurde frisches Medium und das fertige Reagenz in einem Verhältnis von 1:1 hinzugefügt. Nachdem die Proben für 5 min geschüttelt wurden, verblieben die Platten für weitere 30 – 60 min an einem dunklen Ort, was der Stabilisierung des Signals diente. Später wurden 20 µl der Probe (Triplikat) entnommen und in eine spezielle 96-Well-Platte überführt [Cell2014]. Am Tag 0 wurde der Referenzwert für die ausgesäten Zellen ermittelt, welcher später für die Berechnung der Zellzahl hinzugezogen wurde.

2.4.2 Proteinanalytik

Hormonbehandlung von LNCaP-Kulturen

Im Rahmen der Kultivierungsexperimente wurde die Prostatakrebszelllinie LNCaP (AR⁺) mit DHT behandelt und deren Auswirkung auf die Proliferationsrate untersucht. Wie bereits in Kapitel 1.6.1 ausführlicher beschrieben, löst die Bindung von DHT an den AR eine wachstumsstimulierende Wirkung aus, welche in herkömmlichen 2D Experimenten bestätigt werden konnte. Der Nachweis dieser Reaktion in porösen 3D Modellen korreliert gleichzeitig mit der möglichen Diffusion von gelösten Stoffen durch das Porennetzwerk.

Zunächst wurden die ausgesäten LNCaP-Zellen fünf Tage innerhalb der porösen Systeme kultiviert (siehe Kapitel 2.4.1). Verglichen mit vorangegan-

genen Proliferationsuntersuchungen konnte gewährleistet werden, dass eine ausreichende Zellausbreitung und Zellzahl innerhalb dieser Kultivierungsdauer vorhanden war. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität des mutierten ARs von LNCaP-Zellen wirken sich ebenso andere Steroidhormone (z.B. Östradiol und Progesteron) stimulierend auf das Wachstumsverhalten aus [Wil1989]. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf des Experimentes das Standardmedium gegen ein sogenanntes „Hungermedium“ ersetzt. Anstelle von FCS wurde das Medium mit 10 % *charcoal-stripped* FCS (CCS) angesetzt und ohne Phenolrot verwendet. Ersteres wurde durch eine spezielle Reinigungsmethode über Aktivkohle hergestellt, bei welcher dem herkömmlichen FCS die enthaltenen fettlöslichen Bestandteile (z.B. Steroidhormone) entzogen wurden. Phenolrot ist Bestandteil der meisten Kulturmedien und dient als sicherer pH-Indikator (stofflicher Anteil zwischen 15-45 μM). Im Fall einer pH-Wert-Änderung durch ein saures Milieu kommt es zu einem Farbumschlag von Rot auf Gelb, was mit einem Nährstoffmangel und einer hohen Konzentration an Stoffwechselmetaboliten einhergeht. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die strukturelle Ähnlichkeit mit Östradiol eine wachstumsfördernde Wirkung hervorruft [Ber1986]. Aus diesem Grund wurden FCS und Phenolrot als ungewollte Einflussfaktoren entfernt [Lee1995].

In den darauffolgenden drei Tagen wurde das Medium täglich gewechselt, damit eine vollständige Entfernung des alten Mediums (mit Phenolrot und FCS) garantiert werden konnte. Ab Tag neun wurde das Medium nicht mehr gewechselt und die Proben in Triplikaten mit DHT oder Ethanol behandelt. Dafür wurde jeweils 5 μl DHT (10 nM) und ein entsprechendes Volumen an Ethanol als Kontrolle in das Medium gegeben. Nach weiteren sechs Tagen wurde die Stoffwechselaktivität mit Hilfe des CellTiter-Glo® 3D bestimmt (siehe Kapitel 2.4.1).

Western Blot

Parallel zur Kultivierung der LNCaP-Zellen wurden Proben für die Western Blot-Analyse mitgeführt. Diese Methode ermöglicht die Identifizierung und/oder Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches (Abb. 2-8). Im Allgemeinen erfolgt der Proteinnachweis in zwei Schritten, weswegen auch von einer indirekten Markierung gesprochen wird. Nach Bindung eines antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörpers erfolgt die Detektion über einen zweiten, spezifisch markierten Antikörper, auch Sekundärantikörper genannt. An diesen können wahlweise Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder auch radioaktive Marker gekoppelt sein [Lut2014].

Tab. 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Probenvorbereitung für den Western Blot.

| Puffer | Zusammensetzung |
|-------------------------------|--|
| RIPA-Lysepuffer | 50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 1% NP-40 0.5 % NaDoc 0.5 % SDS 1% Inhibitor-Mix-G |
| Probenpuffer nach Lämmli (5x) | 5 % SDS 25% Glycerol 150 mM Tris pH 6.8 0.0025% Bromphenolblau 10% DTT |
| Laufpuffer nach Lämmli (10x) | 25 mM Tris 1920 mM Glycin 0.1 % SDS |

Während der Durchführung wird zwischen drei Teilarbeitsschritten unterschieden: Auftrennung des Proteingemisches mittels Gelelektrophorese, Transfer der Proteine auf eine Membran (eigentlicher Blot) und Proteindetektion. Nach zweiwöchiger Kultivierungszeit wurde das Medium der angesetzten Triplikate abgesaugt und jede Probe in ein Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe von 500 µl 1x RIPA-Puffer (Lysepuffer, Tab. 2-2) wurden die Proben bis zur vollständigen Auflösung homogenisiert und im Anschluss bei 8.000 rpm/4° C zentrifugiert. Von jedem Überstand wurde ein Volumen von mindestens 700 µl entnommen, in einem Verhältnis von 1:5 mit 5x Lämmli-Puffer (Tab. 2-2) verdünnt und bei 60° C für 5 min geschüttelt.

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, nach Lämmli *et al.* [Lae1970]) zählt zu den gängigsten Methoden, Proteine nach ihrer Molekularmasse aufzutrennen. Grundlage bilden das Sammel- und Trenngel, welche durch radikalische Polymerisation zwischen zwei Glasplatten mit entsprechendem Abstandshalter geformt werden. Für die Gellösung wurde eine gebrauchsfertige Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30) verwendet, welche lediglich durch Zugabe von Wasser, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Puffer), Natriumdodecylsulfat (SDS), APS und TEMED vervollständigt wird (Tab. 2-3). Das untere Gel (Trenngel) wird zuerst gegossen und mit wenigen Tropfen Isopropanol überschichtet. Letzteres wird nach Aushärtung des Gels abgekippt und die Reste mit Filterpapier entfernt. Nach Zugabe der Sammelgellösung wird der Probenkamm möglichst blasenfrei eingesetzt und nach der Polymerisation wieder herausgezogen.

Tab. 2-3: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele (entspricht dem Ansatz für ein Maxigel) zur Quantifizierung des AR mittels SDS-PAGE.

| Konzentration | H₂O [ml] | Roti-phorese Gel 30 [ml] | 1.5 M Tris pH 8.8 [ml] | 20 % SDS [µl] | 10% APS [µl] | TEMED [µl] |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Sammelgel 5% | 5.7 | 1.7 | 2.5 | 50 | 100 | 10 |
| Trenngel 8% | 14.1 | 8.1 | 7.5 | 50 | 300 | 30 |

Die Proben wurden mit jeweils 100 mM Dithiothreitol (DTT) versetzt, welches die Disulfidbrücken spaltet und bei 95° C für 5 min gekocht. Am Ende dieser Präparation wurde mit Hilfe einer Hamilton-Pipette 150 µl je Probe in die geformten Taschen (Probenkamm) aufgetragen. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde parallel ein geeigneter Proteinstandard (Größenmarker) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte mit Lämmli-Laufpuffer (Tab. 2-2) bei einer Spannung von 50 V im Sammelgel und anschließenden 100 V im Trenngel. Die weitmaschigeren Poren im Sammelgel bieten den Molekülen keinen Widerstand, sodass diese ungehindert in Richtung Anode wandern können. An der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel kommt es zur Konzentrierung der Proben, welche im weiteren Verlauf durch das engporige Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden (Siebeffekt). In Tabelle 2-3 wird die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels basierend auf dem Molekulargewicht des AR (110 – 114 kDa) aufgeführt [Spa1999].

Nachdem die Elektrophorese Kammern vorsichtig entfernt und das Sammelgel vom Trenngel abgelöst wurde, kam die Blotting-Membran (Immobilon-P Transfer Membran, Porengröße 0.45 µm; Firma Merck Millipore) zusammen mit dem Trenngel in ein Methanolbad. Für einen Elektrotransfer wird die Membran anodenseitig auf das Gel gelegt und

beidseitig mit Transferpuffer (Tab. 2-4) getränkten Filterpapieren bedeckt. Letztere sind wiederum von nassen Schwämmen umgeben, welche das Austrocknen der Membran verhindern. Die Sandwich-Kassette samt Halterung wird in den Blotting-Tank verankert, mit Transferpuffer befüllt und über Nacht bei 4° C und 35 V unter Rühren angeschlossen. Im Anschluss daran wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer (Tab. 2-4) geschwenkt, welcher die Bindung unerwünschter Proteine an die Membran verhindert. In der Zwischenzeit wurde die Primärantikörperlösung (anti-AR) in einem Verhältnis 1:1000 im Blockpuffer angesetzt und zusammen mit der Membran in einer Folie eingeschweißt (Inkubation über Nacht bei 4° C). Anschließend wurde die Membran mehrfach in TBS-Puffer gewaschen und zusammen mit der Sekundärantikörperlösung (anti-Maus-IgG-HRP, 400 ng/ml in Blockpuffer) in Folie verschweißt. Nach einer Behandlung von 1 h bei RT erfolgten Waschstschritte im TBS-Puffer und TBS-T-Puffer (Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für den Western Blot und anschließend Immunoblot gegen AR.

| Puffer | Zusammensetzung |
|--------------------|---|
| Transferpuffer | 25 mM Tris 200 mM Glycin 10 % Methanol |
| Blockpuffer | 5 % Milchpulver 5 % FCS 0.05 % Tween-20 > gelöst in TBS (1x) |
| TBS-Puffer (10x) | 500 mM Tris-Cl pH 7.6 1.5 M NaCl |
| TBS-T-Puffer (10x) | 500 mM Tris-Cl pH 7.6 1.5 M NaCl 0.5 % Tween-20 |

Die am Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (entspricht HRP) katalysiert nach Zugabe der Substratlösung eine Chemilumineszenzre-

aktion (ECL), bei welcher als Nebenprodukt Licht entsteht [Gec1998]. Zusammen mit einem Röntgenfilm (Super RX, Firma Fujifilm) wurde die Membran in eine Belichtungsbox gelegt und bei unterschiedlichen Inkubationszeiten das ECL Signal detektiert [Jan2012]. Abbildung 2-8 zeigt schematisch die Arbeitsschritte eines Western Blots vom Probenaufrag (SDS) bis zur Interpretation der Ergebnisse.

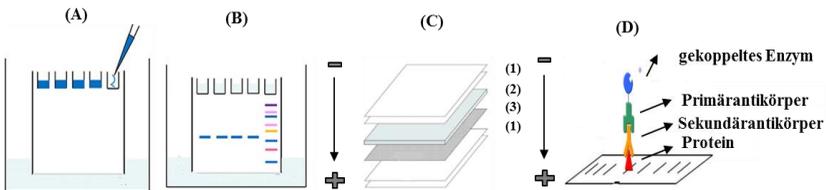


Abb. 2-8: Arbeitsschritte für den Proteinnachweis in einem Probengemisch nach der Western Blot-Methode. **(A)** SDS-PAGE. Auftrag der Proben und Proteinstandard in die Probenkammern. **(B)** Trennung in Gelelektrophorese. Laufrichtung der Proteine von der Katode (-) zur Anode (+). Kleinere Proteine wandern aufgrund ihres geringeren Molekulargewichtes schneller als größere Proteine. **(C)** Blotting. Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Membran (z.B. aus Nitrozellulose, Nylon oder PVDF). Das Polyacrylamidgel (2) liegt auf Trägermembran (3) und beide werden paarweise von Puffer-getränkten Filterpapieren und Schwämmen bedeckt (1). **(D)** Immunodetektion: Antikörperkonjugate sind mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert, welche für eine nachfolgende Farbreaktion entscheidend sind. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates kommt es zur Auslösung einer chemischen Reaktion.

PSA-Bestimmung

Die PSA-Sezernierung in das umliegende Medium wurde mit Hilfe eines Enzym-gebundenen Immuntests (*engl.* Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) bestimmt. Das ELISA-Verfahren zählt zu den Antikörper-basierten Nachweismethoden, deren gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und Detektion eines Analyten durch Bindung eines Antikörpers in einer flüssigen Phase ist. Gleich der Immundetektion eines Western Blots, ist die Markierung mit Enzymen die weit gebräuchlichste Methode zur quantitativen

Bestimmung des Analyten. Durch die Zugabe eines Substrats wird schließlich eine chemische Reaktion katalysiert, wodurch eine bestimmte Farbe entsteht oder Licht abgegeben wird. Dabei ist es möglich Proteine und Viren aber auch niedermolekulare Verbindungen, wie Hormone, Toxine und Pestizide, in einem Probengemisch nachzuweisen. Der PSA ELISA Kit stützt sich auf die bekannte Streptavidin/Biotin-Wechselwirkung, welche als stärkste kovalente Bindung gilt. Die beigegefügte Mikrotiterplatte wurde vom Hersteller mit einem Fänger-Antikörper (*engl.* Capture Antibody) kovalent gekoppelt, welcher spezifische Bindungsstellen für das gewünschte Antigen (*hier:* PSA) besitzt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten der LNCaP-Kultivierung wurden 300 μ l Medium pro Well in Triplikaten entnommen und in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Aliquots wurden zu einer Probe vermischt, diese im Duplikat (100 μ l) auf die Mikrotiterplatte aufgetragen und für 2.5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l des biotinylierten Detektion-Antikörpers (*engl.* Biotinylated Detection Antibody) hinzugefügt, welcher wiederum spezifische Andockstellen für PSA aufzeigt. Nach 1 h wurde die Lösung verworfen und alle ungebundenen Antikörper durch erneutes Waschen entfernt. Durch Zugabe des Enzym-gebundenen Proteins (HRP-Streptavidin, 100 μ l) entsteht eine nicht-kovalente Bindung zwischen Streptavidin und Biotin. Die nachfolgende Detektion des Antigens wird über das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) ausgelöst. TMB ist ein chromogenes Substrat, welches durch die gebundene Meerrettichperoxidase umgesetzt wird und somit ein Signal erzeugt (Abb. 2-9) [Lut2011]. Der Farbumschlag wird mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen und kann gleichzeitig als Kontrolle visuell wahrgenommen werden. Die Technik, bei der das nachzuweisende Antigen zwischen zwei Antikörpern (Fänger- und Detektions-Antikörper) gepackt ist, wird als Sandwich-ELISA bezeichnet.

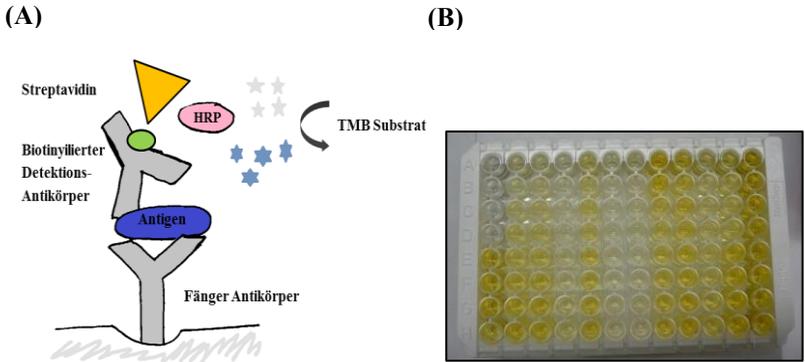


Abb. 2-9: Prinzip des ELISA-Nachweisverfahrens. **(A)** Sandwich-ELISA. Ausgangssituation ist eine beschichtete Mikrotiterplatte mit immobilisierten Fänger-Antikörper, welcher spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Im nächsten Schritt wird ein weiterer Antikörper, welcher ebenfalls gegen das Antigen gerichtet ist, hinzugegeben. Anschließend geht der biotinylierte Detektions-Antikörper eine starke Bindung mit dem HRP-gekoppelten Streptavidin ein. Durch Zugabe eines Substrates (TMB) wird die Enzymreaktion in Gang gesetzt, bei der ein farbloses Signal in ein farbiges Produkt überführt wird. Die entsprechenden Produkte werden kolorimetrisch gemessen. **(B)** Mikrotiterplatte nach ELISA-Test. Die Intensität des Farbsignals (Konzentration) lässt Rückschlüsse auf die ursprüngliche Konzentration des gesuchten Antigens zu.

2.4.3 Sphäroidformation- und verteilung

Histologische Färbemethoden

Histologie ist die Wissenschaft der biologischen Gewebe und gehört als Teilgebiet der Medizin und Biologie zu den unverzichtbaren Methoden. Anhand sehr dünner Gewebeproben und mit Hilfe entsprechender Färbetechniken kann dieses Verfahren zur Frühdiagnose und Klassifizierung von Tumoren, aber auch zum Nachweis von Stoffwechselerkrankungen und anschließender Therapieauswahl eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit die Sphäroidbildung und Verteilung im Gerüstträger näher analysiert werden. Bevor jedoch eine Probe untersucht werden kann, steht

eine umfassende Probenvorbereitung an. Diese setzt sich aus verschiedenen Einzelschritten zusammen [Lan2013]:

- Fixierung des Gewebes (*hier*: Fixierung der Zellen innerhalb des Gerüsts über 24 h mit einer 3.7 % Formalin-Lösung)
- Entwässerung und Imprägnierung mit flüssigem Paraffin (Gewebe-Prozessor, Abb. 2-10A)
- Einbetten in Paraffin (Paraffinquader, welcher die Probe beinhaltet, Abb. 2-10B)
- Herstellung von Schnitten am Mikrotom (*hier*: 7 μm dünne Schnitte, Abb. 2-10C)
- Aufziehen der Schnitte auf Glasobjektträger
- Durchführung der Färbetechnik (*hier*: Hämatoxylin-Eosin (HE) –Färbung, Abb. 2-10D)

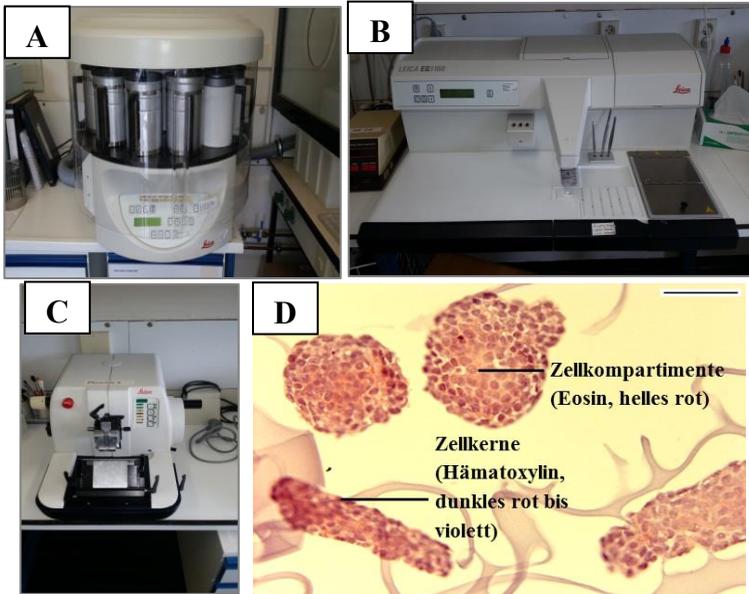


Abb. 2-10: Apparaturen zur HE-Färbung von fixierten Gerüststrukturen mit kultivierten Zellen. Zunächst erfolgt eine 24 h Fixierung mit 3.7% Formalin-Lösung, welches die Proteine vernetzt, lösliche Antigene immobilisiert und auf diese Weise die Zellen in ihrem momentanen Zustand „einfriert“. **(A)** Gewebe Prozessor. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe werden die Proben dehydriert, anschließend in Xylol getränkt und am Ende in erhitztes Paraffin überführt. **(B)** Die Paraffin getränkten Gele werden schließlich in Paraffin-Blöcke gegossen und bei -20 °C zum Auskühlen ruhen gelassen. **(C)** Mit Hilfe eines Mikrotoms (Schneidegerät) wurden 7 µm dünne Schnitte angefertigt, auf Glasobjektträger gezogen und 24 h bei RT getrocknet. **(D)** Im letzten Schritt werden die Probenschnitte mit Hämatoxylin (Färbung aller sauren Bestandteile rot bis dunkles violett/blau) und Eosin (Färbung aller basischen Bestandteile rot) gefärbt.

Neben der HE-Färbung, welche weltweit als Routine- und Übersichtsfärbung angewendet wird, existiert eine Vielzahl an histologischen Färbungen. Abbildung 2-10D zeigt eine HE-Aufnahme gewachsener LNCaP-Sphäroide innerhalb eines Cryogels. Zur morphologischen Unterscheidung der Strukturen werden zwei Einzelfärbungen vorgenommen. Hämatoxylin ist ein

natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum und färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau. In erster Linie gehört dazu der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA und das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin ist hingegen ein synthetischer Farbstoff und färbt alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot, wozu unter anderem Zellplasmaproteine, Mitochondrien sowie das glatte ER zählen. Ein entscheidender Schritt während der HE-Färbung ist das Spülen mit Wasser (*hier*: Leitungswasser), wodurch ein erhöhter pH-Wert erzeugt und das Bläuen (charakteristisches Blauviolett) der Hämatoxylin-Färbung hervorgerufen wird [Ram2013]. Anschließend erfolgen die Eosin-Färbung und zusätzliche Spülschritte in einer aufsteigenden Ethanolreihe. Letzteres ist verantwortlich für den Wasserentzug der Proben, welche am Ende nochmals in einem organischen LM (z.B. Xylol) getränkt werden. Die Objektgläser (Superfrost Plus, Firma Thermo Scientific) werden schließlich mit einem Eindeckmittel und Deckglas bedeckt, sodass eine Lagerung über einen sehr langen Zeitraum ohne Veränderung von Schnitt und Färbung möglich ist.

Immunfluoreszenzfärbungen

Zum visuellen Nachweis des AR wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewandt. Diese Immunmarkierung beruht auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, wobei die Detektion mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs (Fluorochrome) durch Anregung von Licht in bestimmten Wellenlängen erfolgt. Im Vergleich zur direkten Verfahrensweise wird bei der indirekten Immunfluoreszenz zunächst ein Primärantikörper auf das Substrat gegeben, welcher gezielt mit dem Antigen reagiert. Im nächsten Schritt bindet ein Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper an den Antigen-Antikörper-Komplex, dessen Fluoreszenz unter einem geeigneten Mikroskop sichtbar wird. Anhand der Färbung können Rückschlüsse auf die Verteilung und das Vorkommen des Antigens gezogen werden [Ren2009].

Zu Beginn wurden die Proben wie im oben beschriebenen Abschnitt vorbereitet, anschließend deparaffiniert und rehydriert (Xylol-Behandlung mit absteigender Ethanol-Reihe). Im Anschluss daran wurde die Antigendemas-
kierung (*engl.* Antigen-Retrieval) durchgeführt, sodass die verloren gegangene Immunreaktivität von formalinfixierten und paraffineingebetteten

Schnitten wieder hergestellt wird. Dafür stehen drei verschiedene Methoden zur Verfügung: Hitze-Behandlung bzw. Einsatz von Pepsin oder Saponin. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Objektträger in einem 0.01 M Natrium-Citrat Puffer (Tab. 2-5) für 20 min gekocht und weitere 20 min bei RT abgekühlt. Nach einem Waschschrift wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umrandet und für 1 h mit Blockpuffer (Tab. 2-5) in einer Feuchtekammer inkubiert. Das im Blockpuffer enthaltende Ziegen Serum blockiert alle unspezifischen Bindungsstellen und gleichzeitig sorgt Tween für die Permeabilisierung der Zellmembran.

Tab. 2-5: Zusammensetzung verwendeter Puffer bei der Immunfluoreszenzfärbung (IF).

| Puffer | Zusammensetzung |
|--|--|
| Natrium-Citrat Puffer (9 ml Lösung A und 41 ml Lösung B) | <p><i>Lösung A:</i> 0.1 M Citratsäure-Lösung (21 g Citratsäure-Monohydrat, 100 ml bidest. Wasser)</p> <p><i>Lösung B:</i> 0.1 M Natrium-Citrat-Lösung (29.4 g Trinatrium Citrat Dihydrat, 100 ml bidest. Wasser)</p> |
| Blockpuffer | 10 % Ziegen Serum (in PBS) 0.01 % Tween |

Im Anschluss daran wurden die Primärantikörperlösungen mit der entsprechenden Verdünnung in Blockpuffer aufgetragen und über Nacht bei 4° C in einer Feuchtekammer inkubiert. Während der Färbung muss stets darauf geachtet werden das ausreichend Flüssigkeit verwendet wird, damit die Schnitte nicht austrocknen. Nachdem die Proben erneut mit PBS gewaschen wurden, konnte der Auftrag der Sekundärantikörperlösung sowie die Co-Färbung des Zellkerns (DNA) mit DAPI (1:5000 in Blockpuffer) und

α -Tubulin (1:1000 in Blockpuffer) erfolgen (1 h bei RT in der Feuchtekammer). Am Ende wurden die Objektträger mit Mowiol 4-88 (versetzt mit DABCO 25 mg/ml) eingebettet und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zur Materialcharakterisierung der unterschiedlichen Cryogelstrukturen und Seidenfibroingerüste dargestellt und deren Eignung als Zellgerüstträger für etablierte humane Prostatakrebszellen untersucht. Die Protokolle zur Synthese der Cryogele und Seidenfibroingerüste wurden in den Kapiteln 2.1 und 2.2 ausführlich beschrieben. Veränderungen dort aufgeführter Parameter, wie z.B. Gefrierzeit, Temperatur, Konzentrationen eingesetzter Chemikalien, werden an den betreffenden Stellen genannt.

Im sich anschließenden Kapitel wird die Tauglichkeit der hergestellten Cryogelstrukturen und Seidenfibroingerüsten hinsichtlich der dreidimensionalen Kultivierung der epithelialen Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC3 untersucht. Dabei steht unter anderem die Zellwachstumsrate, die Sphäroidformation und -verteilung sowie die Reaktion im Zuge der Hormonbehandlung im Fokus.

3.1 Veränderung verschiedener Prozessparameter und Wirkung auf die Cryogelstruktur

Im ersten Teilabschnitt dieses Kapitels (3.1.1) wird der Fragestellung nachgegangen, ob unterschiedliche Konzentrationen der Ausgangskomponenten, Alginat (*hier*: Natriumalginat), Gelatine und Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), die charakteristischen Eigenschaften der Cryogele (Kapitel 2.3) verändern und auf diese Weise eine spezifische Kontrolle über die Gerüststruktur zulassen. Im Speziellen wird sich mit der Thematik auseinandergesetzt, in welchem Maße die einzelnen Reaktionskomponenten die spezifischen Merkmale, wie Porengröße und -form, mechanische Stabilität und Formbarkeit beeinflussen. Während der Synthesen blieben die in Kapitel 2.1 beschriebenen Prozessparameter (Gefrierzeit von 24 h bei einer Temperatur

von -21 °C) sowie die Menge des Cross-Linkers Polyethylenglycoldiacrylat (PEGda) und deren Polymerisationsinitiator Ammoniumperoxidsulfat (APS) und Katalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) konstant. Es wurde lediglich die Konzentration der Grundsubstanzen verändert.

Im darauffolgenden Kapitel (3.1.2) wird die Frage diskutiert, auf welche Weise die Reaktionszeit bzw. -temperatur und die Quervernetzung im Zuge der Polymerisation, die typischen Cryogeigenschaften formen. Die hierfür verwendete Materialzusammensetzung wird an gegebener Stelle erläutert.

3.1.1 Einfluss materialspezifischer Eigenschaften

In diesem Kapitel werden zwei unabhängige Experimente betrachtet, welche mit Hilfe der Kennziffern 1 und 2 unterschieden werden. Ausgehend von der Studie von Singh *et al.* [Sin2013] wurden im ersten Experiment Cryogele, basierend auf den natürlichen Substanzen Alginat und Gelatine sowie dem synthetischen Polymer HEMA, mit unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt. Ziel des zweiten Experimentes war die Untersuchung der einzelnen Reaktionskomponenten und deren Einfluss ihrer An- bzw. Abwesenheit auf die Cryogeigenschaften. Hierfür wurde die Cryogelvariante mit dem höchsten Anteil an Alginat und Gelatine (je 200 mg/ 10 ml) ausgewählt (Probe C3 aus Experiment 1), welche die Auswirkungen durch Fehlen dieser Substanzen eindeutiger aufzeigen kann.

Als Erstes werden die Ergebnisse zur physikalischen Charakterisierung der einzelnen Cryogele aufgeführt. Der Schwerpunkt liegt auf den strukturellen Merkmalen des Porensystems, wie z.B. Porengröße und -form sowie den daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften.

EXPERIMENT 1

Im nachfolgenden Experiment bilden vier unterschiedliche Cryogelzusammensetzungen den Ausgangspunkt zur Untersuchung der porösen Eigenschaften sowie des Schwell- und Elastizitätsverhaltens. Innerhalb dieser Cryogele, mit der Bezeichnung C1 bis C4, ändern sich die Mengenverhältnis-

se der Reaktionskomponenten. Letzteres wird in der Tabelle 3-1 aufgeführt. Dabei wird zunächst eine ansteigende Konzentration der natürlichen Bestandteile von 50 bis auf 200 mg je 10 ml untersucht (C1 bis C3) und anschließend die Menge an HEMA verdoppelt (C4). Entsprechend der Menge an Alginat und Gelatine wurde die Konzentration von Glutaraldehyd (GA) als Cross-Linker angepasst (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4 bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) und TEMED (0.1 % v/v) blieben in allen Variationen stets konstant. Die Konzentration von GA wurde entsprechend der Alginat- bzw. Gelatine-Konzentration angepasst. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kapitel 2.1 beschrieben.

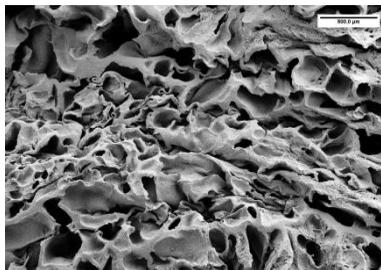
| Cryogel | Alginat | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|----------------|----------------|-----------------|-----------|-------------|--------------|
| C1 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 350 µl | 500 µl |
| C2 | 100 mg | 100 mg | 50 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C4 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 700 µl | 500 µl |

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie konnte ein visueller Eindruck der 3D Porenstruktur der synthetisierten Cryogele erstellt werden (Abb. 3-1). Diese Methode wurde stets als Kontrolle bei einer Neusynthese durchgeführt. Auf diese Weise kann die Beschaffenheit des Porensystems sowie die Porenmorphologie im trockenen Zustand untersucht werden. Es sollte jedoch bedacht werden, dass sich die Porenform durch den Wasserverlust während der Trocknung ändert und aus diesem Grund eine alleinige Interpretation der Mikroskopbilder nicht aussagekräftig ist. Dennoch ist zu erkennen, dass die Cryogelproben C1 und C2 sich bezüglich ihrer Porenstruktur nur unwesentlich voneinander unterscheiden, obwohl eine Verdopplung der Alginat- bzw. Gelatine-Menge von 50 mg auf 100 mg (bezogen auf 10 ml Gesamtvolumen) vorgenommen wurde. Die Porensysteme beider Cryogele wirken durch die unstrukturierte Anordnung kleinerer Poren sehr inhomogen und weisen bei

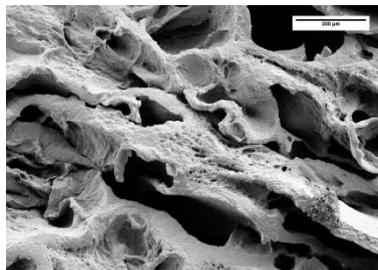
einer höheren Vergrößerung dicke Porenwände mit kleineren Einschlüssen auf, welche bei C2 etwas ausgeprägter sind (Abb. 3-1). Im Vergleich zu C1 und C2, weist C3 mit der höchsten Konzentration an natürlichen Komponenten (2 % w/v) sichtbar größere Poren auf, welche von glatten Porenwänden umgeben sind. Diese verlaufen nahezu parallel zueinander und bilden mit den senkrecht durchziehenden dünnen Porenwänden einen wabenähnlichen Aufbau. Im Gegensatz dazu zeigt C4, mit der höchsten Konzentration an HEMA (7 % v/v), eine sehr dichte und kleinporige Morphologie. Größere Abstände zwischen den Porenwänden werden ebenfalls durch fadenähnliche Strukturen zusammengehalten und erinnern an das charakteristische Merkmal der Porenstruktur von Probe C3 (Abb. 3-1). Erst mit einem Alginat bzw. Gelatine-Anteil von 200 mg/ 10 ml (C3) wurde ein signifikanter Unterschied zu den Cryogelproben mit reduzierter Konzentration der natürlichen Komponenten (0.5 % w/v (C1) bzw. 1 % w/v (C2)) erfasst.

C1

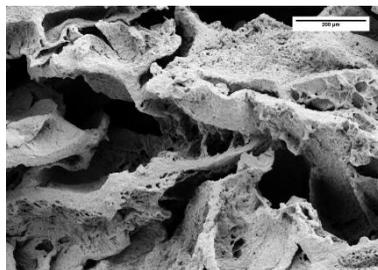
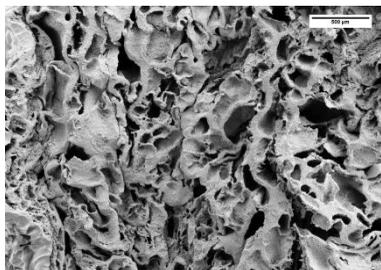
A



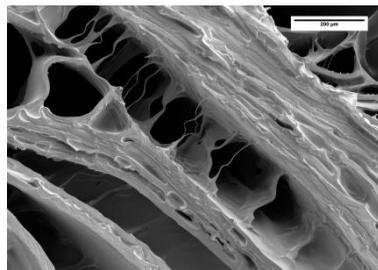
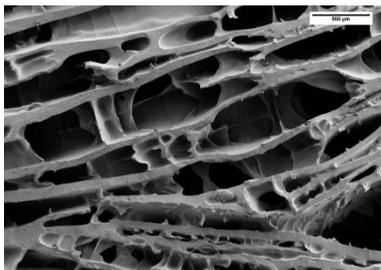
B



C2



C3



C4

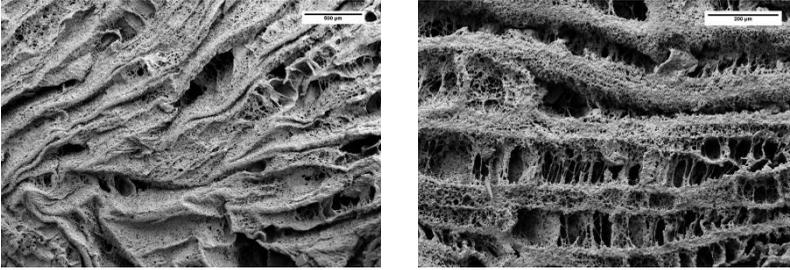


Abb. 3-1: Untersuchung der Porenstruktur auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen (Experiment 1). REM-Aufnahmen der Cryogele C1 bis C4 in 35facher (linke Spalte; Maßstabsbalken 500 µm) und 100facher (rechte Spalte; Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

Mit zunehmender Monomerkonzentration im Reaktionsgemisch (C1 bis C3) wird eine dichtere und kompaktere Porenwandstruktur erzeugt, welche jedoch gleichzeitig die Homogenität des Cryogelaufbaus verbessert. Letztgenanntes wird zusätzlich durch den Anteil der natürlichen Substanzen (Alginat & Gelatine) maßgeblich beeinflusst.

Mit Hilfe der Anströmquelle Karlsruhe wurde die innere Porenstruktur der Cryogelprobe C3 untersucht und die entstandenen Tomographie-Aufnahmen in Abbildung 3-2 dargestellt. Die Tomographieexperimente wurden an der TOPO-TOMO Beamline durchgeführt und dienen zum Nachweis der Poreninterkonnektivität. Letztere gewährleistet die Verteilung der Zellen innerhalb der gesamten Cryogelstruktur und sichert zudem die Versorgung mit Nähr- und Sauerstoffen. Erst die Bestätigung eines durchgehenden und verbundenen Porennetzwerkes erfüllt die Anforderungen an ein Modellsystem für die 3D Zellkultivierung.

Die Aufnahmen basieren auf 3.000 Projektionen (pro Tomographieexperiment) und wurden mit Hilfe verschiedener Software zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert. Der rechte Tomographiescan stellt einen Quer-

schnitt aus der Probenmitte dar, wodurch gezeigt wird, dass das Porensystem ohne Unterbrechungen durch den Probenkörper verläuft (Abb. 3-2). Auf diese Weise wird auch die charakteristische Porenform erkennbar, welche zuvor mittels Rasterelektronenmikroskopie aufgenommen werden konnte (vgl. Abb. 3-1). Im Zuge des Trocknungsvorganges kam es auch hier zu einer Formveränderung der Poren, wodurch die Gesamtstruktur inhomogener wirkte (Abb. 3-2). Generell spiegeln sich die REM-Aufnahmen aus Abbildung 3-1 in den erstellten Tomographie-Aufnahmen wieder und bekräftigen die morphologischen Merkmale, welche bisher nur oberflächlich charakterisiert werden konnten.

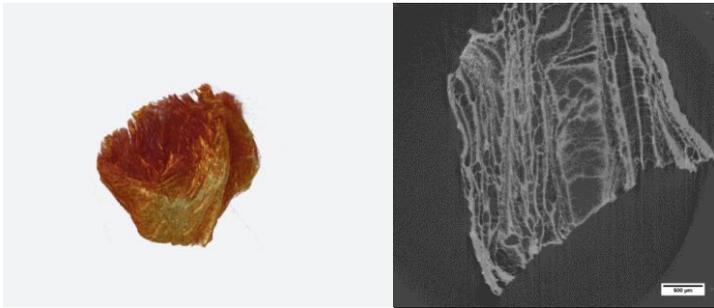


Abb. 3-2: Röntgen-Mikrocomputertomographie (Mikro-CT)-Aufnahmen der Porenstruktur von Cryogelprobe C3. Mit Hilfe der 3D-Röntgenbildgebung konnte die Interkonnektivität der Porenstruktur analysiert werden. Die Proben wurden vor der Messung getrocknet und zerstörungsfrei untersucht. (Maßstabsbalken 200 μm).

Die Ergebnisse zur quantitativen Analyse des Porensystems, welche sich auf die erhobenen Daten der Quecksilberporosimetrie beziehen, sind in Abbildung 3-3A und B dargestellt. Mit Hilfe dieser konventionellen Charakterisierungsmethode wird unter Verwendung der nichtbenetzenden Flüssigkeit Quecksilber, welche bei einem ansteigenden Druck in die getrockneten Cryogele gepresst wird, unter anderem die Gesamtporosität, der Porendurchmesser und das Porenvolumen berechnet. Das angewandte Verfahren bezieht sich dabei auf das in die Poren eindringende Quecksilbervolumen als Funktion des aufsteigenden Druckes (siehe Kapitel 2.3.1). Die Mischungen

C1 und C2 weisen ähnliche Porositätswerte (ca. 40 %) auf, woraus sich annähernd gleiche Werte zum Porendurchmesser (ca. 30 μm) und Porenvolumen (entspricht dem Gesamtintrusionsvolumen; ca. 500 mm^3/g) ergeben (Abb. 3-3A).

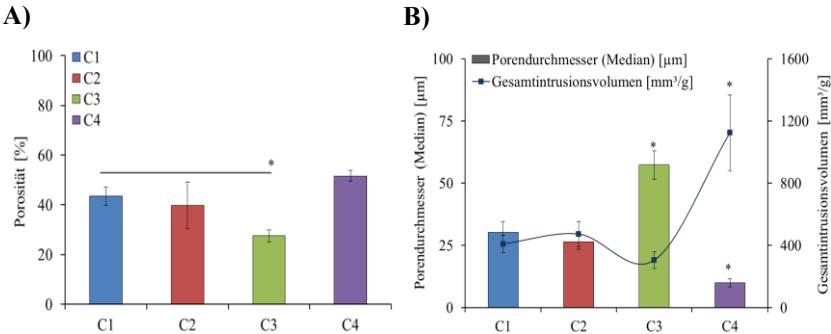


Abb. 3-3: Quantitative Charakterisierung des Porensystems mittels Quecksilberporosimetrie. **A)** Bestimmung der Gesamtporosität als Verhältnis zwischen Porenvolumen und Rohvolumen. **B)** Ermittlung des Medianes Porendurchmessers und Porenvolumen (Gesamtintrusionsvolumen) im Zuge der Porosimetrie-Messungen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Des Weiteren lassen sich Parallelen zwischen den REM-Aufnahmen von C4 und den Kalkulationen aus den Daten der morphologischen Untersuchung mittels Quecksilberporosimetrie ziehen. Auf Grund der kleinporigen Struktur wurde bei der Cryogelprobe C4 eine Porosität von 60 % gemessen, welche den höchsten Wert unter den Cryogelvarianten repräsentiert. Darüber hinaus wurde im Vergleich zu den Proben C1 und C2 bei C4 das Dreifache an Porenvolumen ($\sim 1.200 \text{ mm}^3/\text{g}$) sowie die Hälfte an Porendurchmesser ermittelt ($\sim 10 \mu\text{m}$). Die sichtbar größeren Poren der Cryogelprobe C3, mit dem höchsten Anteil an natürlichen Bestandteilen (Alginat & Gelatine), spiegeln sich auch in den Werten aus Abbildung 3-3B wider. Mit einem Porendurchmesser von $60 \mu\text{m}$ ist dieser im Verhältnis zu den übrigen Proben ($\sim 22 \mu\text{m}$) um ein vielfaches höher. Die hohe Monomerkonzentration der

Probe C3 und den daraus resultierenden glatten Porenwänden ohne zusätzliche Einschlüsse wirkt sich nachteilig auf die Gesamtporosität und dem entsprechenden Porenvolumen aus. Dennoch liegen auf diese Weisen Poren mit einer ausreichenden Größe zur Kultivierung von Zellsphäroiden vor.

Das untersuchte Schwellverhalten der Cryogelproben C1 bis C4 im Verlauf der ersten zehn Sekunden wird in Abbildung 3-4 dargestellt. Dabei wurde zunächst das Trockengewicht aller Proben ermittelt, welches anschließend als Bezugspunkt zum Feuchtgewicht diente. Die Prüfung des Verhaltens in flüssiger Umgebung ist eine notwendige Voraussetzung für zukünftige Zellkulturexperimente. Auf diese Weise kann die Aufnahme der Zellsuspension und die erforderlichen Nährstoffe aus dem Nährmedium sichergestellt werden. Ersteres ist besonders entscheidend, da die Zellsuspension auf die annähernd trockenen Proben aufgetragen wird und sich innerhalb weniger Sekunden im gesamten Cryogel verteilen soll. Zu diesem Zweck wurde nicht nur die Schwellrate untersucht, sondern auch der Flüssigkeitsgehalt (*hier*: Nährmedium) der Proben berechnet (Tab. 3-2). Dabei weisen in beiden Fällen die Cryogelproben C1 und C4 die höchsten Werte auf (Linienverlauf: blau und lila, Abb. 3-4). Bezogen auf ihr Trockengewicht wurde nach 10 s ein Flüssigkeitsgehalt im Bereich von 77 und 81 % gemessen (Tab. 3-2). Im Gegensatz dazu erreichten die Proben C2 und C3 nur eine Verdopplung ihres Gewichtes (Linienverlauf: rot und grün, Abb. 3-4). Das beschleunigte Quellverhalten der Cryogele in flüssiger Umgebung korreliert mit der hohen Porosität und dem daraus resultierenden Porenvolumen (Abb. 3-3A und B). Neben C1 und C2, zeigt C4 (höchster Anteil an HEMA) mit dem größten Porenvolumen von $1.200 \text{ mm}^3/\text{g}$ auch die höchste Gewichtssteigerung nach 10 s (Tab. 3-2). Letzteres kann auf die porösen Porenwände zurückgeführt werden, welche zusätzlichen Raum für die Diffusion von Wassermolekülen schaffen. Im Gegensatz dazu weist C3 mit dem größten Porendurchmesser ($\sim 60 \text{ }\mu\text{m}$), aber einem Porenvolumen von ca. $300 \text{ mm}^3/\text{g}$ die geringste Schwellrate mit einem Flüssigkeitsgehalt von ca. 53 % auf (Abb. 3-4, Tab. 3-2).

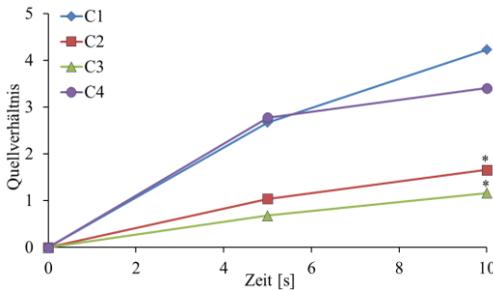


Abb. 3-4: Auswertung des Schwellverhaltens der Cryogele C1 bis C4 in Nährmedium. Es wurde das Feuchtgewicht zu den Zeitpunkten $t = 5, 10$ s ermittelt und zum Trockengewicht bezogen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tab. 3-2: Gewichtsentwicklung und Vergleich des Flüssigkeitsgehaltes nach 10 s. Das Ausgangstrockengewicht lag durchschnittlich bei einem Wert von 0.0221 ± 0.0031 g.

| Cryogel | Gewicht [g] | Flüssigkeitsgehalt [%] |
|---------|------------------|------------------------|
| C1 | 0.098 ± 0.01 | 80.87 ± 2.27 |
| C2 | 0.052 ± 0.01 | 62.34 ± 7.49 |
| C3 | 0.052 ± 0.01 | 53.80 ± 3.74 |
| C4 | 0.116 ± 0.01 | 77.29 ± 0.23 |

Trotz der hydrophilen Eigenschaften von Alginat bzw. Gelatine zeigt sich mit ansteigender Konzentration in den Cryogelproben C1 bis C3 keine entsprechende Reihenfolge der Schwelleigenschaften. Es konnte mit diesem Experiment beobachtet werden, dass der Aufbau des Porensystems bzw. die Porosität der Porenwände maßgeblich das Schwellverhalten in flüssiger Umgebung bestimmen.

Die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Cryogele wurden mit Hilfe von Druckversuchen ermittelt und sind in Abbildung 3-5A und B zusammengefasst. Zunächst wurden die Proben für mindestens 24 h in Nährmedium gelegt, wodurch die maximale Quellrate erreicht wurde. Die Messung des E-Moduls wurde ausschließlich im geschwollenen Zustand durchgeführt, da diese Werte ausschlaggebend für die nachfolgenden Zellexperimente sind. Mit Hilfe einer Zug-Druck Maschine der Firma ZwickRoell wurde schließlich eine maximale Kraft von 1 N auf die Probenoberfläche ausgeübt. Gleichzeitig wurden Eindrückweg und Eindrückkraft aufgenommen und später zur Berechnung des E-Moduls sowie der Darstellung des Spannungs-Dehnungs-Diagramms verwendet. Durch die Auswertung der Elastizitäten ist es möglich die gewebsähnlichen Eigenschaften der Cryogele nachzuweisen, zu bewerten und einzuordnen. Bei der Ausführung der Druckversuche konnten E-Module-Werte im Bereich von 25 bis 35 kPa erfasst werden. Die größte Differenz von 10 kPa wurde zwischen der Probe mit der geringsten Konzentration an natürlichen Bestandteilen (C1, 0,5 % w/v; 35 kPa) und der Probe mit dem höchsten Anteil an natürlichen Komponenten (C3, 2 % w/v; 25 kPa) erfasst (Abb. 3-5A). Dieser Unterschied ist auch im Spannungs-Dehnungs-Diagramm erkennbar (Abb. 3-5B). Mit zunehmend gestrecktem Kurvenverlauf nimmt der linear elastische Bereich zu, was auf ein Material mit erhöhten elastischen Eigenschaften hindeutet. Im Gegensatz zur Probe C3, zeigen die übrigen Cryogele einen annähernd identischen Kurvenverlauf mit geringerem elastischem Bereich auf, welcher mit dem erhöhten E-Modul von durchschnittlich 30 kPa korreliert (Abb. 3-5A/B). Trotz Ausbleiben von offensichtlichen Bruchstellen, wurden die Messungen vor Erreichen der maximalen Kraft (1 N) abgebrochen und ausgewertet.

Die variierenden Konzentrationen der Reaktionskomponenten innerhalb der Materialzusammensetzungen üben nur einen begrenzten Effekt auf die mechanischen Eigenschaften der Cryogele aus. Es wurde lediglich für die Probe C3 ein signifikanter Unterschied berechnet. Letzteres kann auf die Größe und annähernd gleichmäßige Verteilung der Poren zurückgeführt werden, welche während des Druckversuches einen Großteil der Energie aufnehmen und auf diese Weise eine hohe Elastizität des Materials hervorrufen.

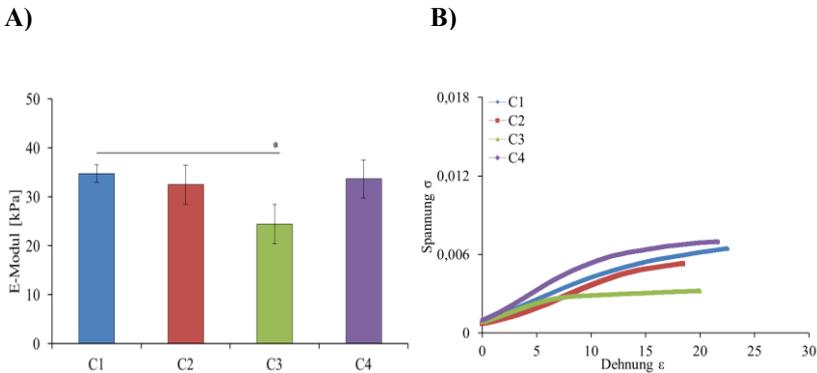


Abb. 3-5: Bestimmung des E-Moduls der Cryogele C1 bis C4. **A)** Messung des E-Moduls über Eindrückkraft (max. 1 N) und Eindrückweg (entspricht Längenänderung). **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Cryogele. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Der Zusammenhang zwischen der Streckgrenze und der zugehörigen Längenänderung, resultierend aus den Daten der Elastizitätsmessungen, wird in Abbildung 3-6 dargestellt. Die angegebene Streckgrenze bezeichnet diejenige Spannung, bis zu der die Probe keine dauerhafte plastische Verformung aufzeigt und nach Entlastung wieder in ihre ursprüngliche Form zurückkehrt. Dieser Punkt, auch als Yield Punkt bezeichnet, kann mit Hilfe des jeweiligen Spannungs-Dehnungs-Diagramms abgelesen werden. Neben der Spannung wurde auch die jeweilige Längenänderung erfasst, d.h. der gemessene Eindrückweg bezogen auf die Ausgangsmaße. Auf diese Weise wird eine umfangreichere Auswertung der elastischen Eigenschaften ermöglicht. Generell zeigen alle Proben bis zur Streckgrenze ein ähnliches Verformungsverhalten mit einer Längenänderung im Bereich zwischen 8 und 10 % (Abb. 3-6).

Bezüglich der dazugehörigen Spannungswerte traten größere Unterschiede auf. Im Gegensatz zu C1 und C4, weisen die Cryogelprobe C2 (Anteil von 100 mg/ 10 ml an Alginat und Gelatine) und C3 die geringsten Spannungswerte mit ca. 0.0020 N/mm^2 auf (Abb. 3-6).

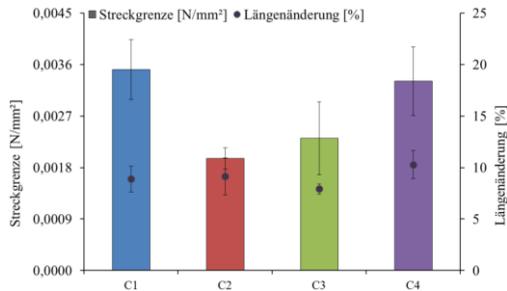


Abb. 3-6: Bewertung der Streckgrenze und zugehörigen Längenänderung der Cryogele C1 bis C4 im geschwollenen Zustand. Die Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5 \text{ mm}$). Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Trotz des minimalen Unterschieds bezüglich der berechneten E-Module zwischen C1 und C2, zeigt sich durch die Verdopplung des Mengenanteils an Alginat und Gelatine eine veränderte Formbarkeit. Verglichen dazu zeichnet sich von der Cryogelprobe C3 (200 mg/ 10 ml Alginat und Gelatine) zu C4 (500 μl HEMA) eine stärkere Eindrückkraft ab, welche zu einer erhöhten Spannung von ca. 0.0035 N/mm^2 führt (Abb. 3-6). Diese Tatsache korreliert schließlich mit dem erhöhten E-Modul der Probe C4 ($\sim 33 \text{ kPa}$) gegenüber der Cryogelprobe C3 ($\sim 24 \text{ kPa}$).

EXPERIMENT 2

Basierend auf den Ergebnissen des Experiments 1, wurde als Ausgangsstruktur für die nachfolgenden Untersuchungen die Materialzusammensetzung der Cryogelprobe C3, mit dem höchsten Anteil an Alginat und Gelatine (je 200 mg/ 10 ml) ausgewählt. Im Folgenden wurden die Hauptkomponenten, Alginat (-A), Gelatine (-G) und HEMA (-H), nacheinander aus der Cryogelsynthese entfernt und deren Fehlen und Einfluss auf die charakteristischen Porenmerkmale sowie mechanischen Eigenschaften untersucht. Die Zusammensetzung der neu ausgelegten Cryogele wird in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Tab. 3-3: Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C3_{-A} bis C3_{-H} bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. Die angepassten Konzentrationen basieren auf der Materialzusammensetzung von C3, welche in den Diagrammen als Referenz angegeben wird. Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) und TEMED (0.1 % v/v) blieben in allen Variationen stets konstant. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kap. 2.1 beschrieben. (-A (Alginat); -G (Gelatine); -H (HEMA)).

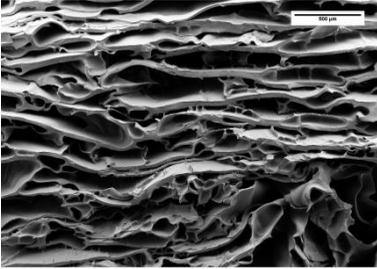
| Cryogel | Alginat | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|---------|---------|----------|---------|--------|--------|
| C3 | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3-A | - | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3-G | 200 mg | - | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3-AG | - | - | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3-H | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | - | 500 µl |

Die dreidimensionale Porenstruktur der veränderten Cryogele ohne Alginat (C3_{-A}), ohne Gelatine (C3_{-G}), ohne Alginat & Gelatine (C3_{-AG}) sowie ohne HEMA (C3_{-H}), wurden erneut mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht und in Abbildung 3-7 zusammengestellt. Ausgehend von der Zusammensetzung der Cryogelprobe C3 (Tab. 3-3) und deren charakteristischen Merkmalen wurden die neu-synthetisierten Proben beurteilt.

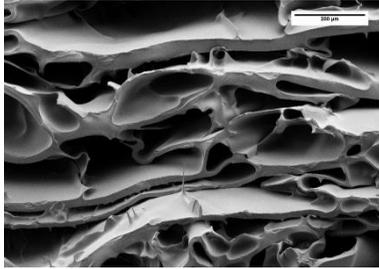
Durch die mikroskopischen Aufnahmen konnte zunächst der Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Porenstruktur und -beschaffenheit beurteilt werden. C3_{-A} weist sehr glatte Porenwände auf, welche teils parallel zueinander verlaufen und die gestreckten Poren einschließen. Zum Teil treten dünnere Porenwände auf, die die Poren nochmals unterteilen. Diese Struktur ähnelt stark dem Porensystem von C3 in seiner ursprünglichen Zusammensetzung. Demgegenüber weist die Cryogelprobe ohne Gelatine (C3_{-G}) einen inhomogeneren Porenaufbau auf, welcher durch poröse und dünnere Porenwände gekennzeichnet ist (Abb. 3-7). Im Gegensatz zu den Proben C3_{-A} und C3_{-G}, weisen die Cryogele ohne Alginat und Gelatine (C3_{-AG}) und ohne HEMA (C3_{-H}) einen ähnlichen porösen Aufbau auf. C3_{-AG} zeigt große und runde Poren, welche durch glatte Porenwände mit gleichmäßiger Festigkeit umgeben sind. Verglichen dazu sind für C3_{-H} kleinere Poren charakteristisch, welche von teils dicken Porenwänden umschlossen sind. Aufgrund der Porenanordnung und -form von C3_{-AG} und C3_{-H} wirken diese bereits weicher und elastischer.

C3-A

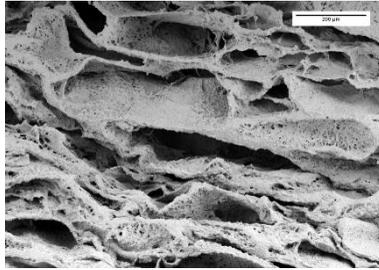
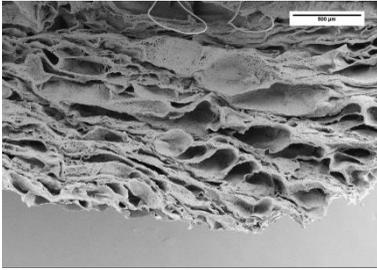
A



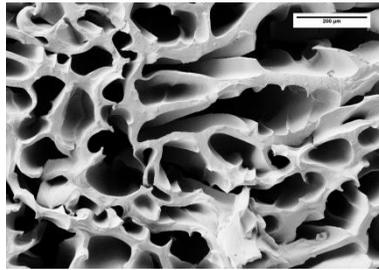
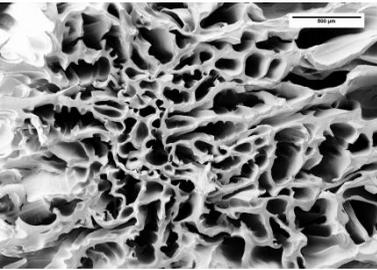
B



C3-G



C3-AG



C3_{-H}

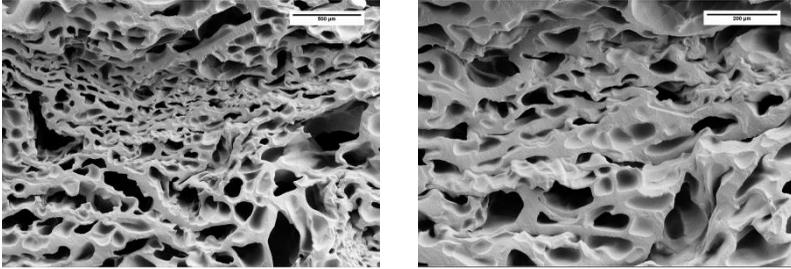
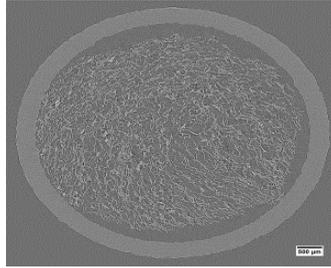


Abb. 3-7: Untersuchung der Porenstruktur auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen (Experiment 2). REM-Aufnahmen der Cryogele C3_{-A} bis C3_{-H} in 35facher (linke Spalte: Maßstabsbalken 500 µm) und 100facher (rechte Spalte: Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

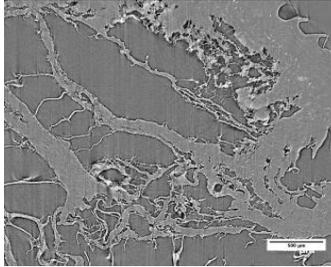
Zur Beurteilung der Poreninterkonnektivität wurde mit Hilfe der Röntgen-Mikro-CT am ANKA ein Abschnitt der Cryogelproben ohne Alginat (C3_{-A}), ohne Gelatine (C3_{-G}), ohne Alginat und Gelatine (C3_{-AG}) und ohne HEMA (C3_{-H}) gescannt und anschließend eine 3D Aufnahme des Probenkörpers konstruiert. Die dreidimensionale Aufnahme und der zugehörige zweidimensionale Tomographiescan sind in Abbildung 3-8 dargestellt.

Kenntnisse zur Porenvernetzung innerhalb der Gerüststruktur bieten die Möglichkeit potentielle Proben bereits vor der Zellkultivierung auszuschließen oder ein bestimmtes Zellverhalten bzw. Sphäroidverteilung und -größe darauf zurückzuführen. Die Tomographiescans der einzelnen Cryogelproben korrelieren sehr gut mit den zuvor erstellten REM-Aufnahmen in Abbildung 3-7.

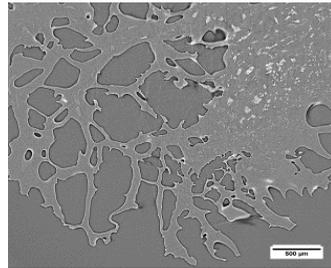
C3-A



C3-G



C3-AG



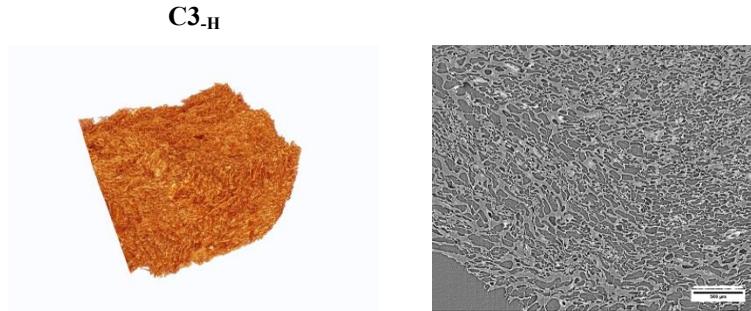


Abb. 3-8: Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen der Porenstruktur. Mit Hilfe der 3D-Röntgenbildgebung konnte die Interkonnektivität der Porenstruktur analysiert werden. Die Proben wurden vor der Messung getrocknet und zerstörungsfrei untersucht. (Maßstabsbalken 500 μm).

Im direkten Vergleich zeigen die Proben C3_A (ohne Alginat) und C3_H (ohne HEMA) den kleinporigsten und homogensten Aufbau, wohingegen die Cryogele C3_G (ohne Gelatine) und C3_{AG} (ohne Alginat & Gelatine) über größere Poren verfügen, welche von dickeren Porenwänden umgeben sind. Letzteres verursacht sehr dichte Probenbereiche, welche über wenige poröse Stellen verfügen (Abb. 3-8).

Grundsätzlich ist bei allen Cryogelen eine Vernetzung der Poren untereinander erkennbar, welche sich durch die gesamte Gerüststruktur hindurchzieht. Mittels der Untersuchungen zur Porenmorphologie konnten eindeutige Unterschiede zwischen den strukturellen Merkmalen der ursprünglichen Materialzusammensetzung der Cryogelprobe C3 (siehe Abb. 3-1/3-2) gegenüber den Proben mit veränderter Zusammensetzung (Tab. 3-3) aufgezeigt werden.

Basierend auf der quantitativen Charakterisierung des Porensystems mittels Quecksilberporosimetrie wird die Gesamtporosität mit zugehörigem Porenvolumen (Gesamtintrusionsvolumen) in Abbildung 3-9 dargestellt. Verglichen zu den REM- und Tomographie-Aufnahmen in Abbildung 3-7 und 3-8 erreicht die Cryogelprobe ohne Gelatine (C3_G) mit näherungsweise 60 % den höchsten Porositätswert (Abb. 3-9). Darüber hinaus verleihen die porösen

Porenwände der Struktur zusätzliches Hohlraumvolumen ($\sim 800 \text{ mm}^3/\text{g}$), welches gegenüber den anderen Cryogelproben (zwischen 400 und $600 \text{ mm}^3/\text{g}$) deutlich erhöht ist. Obendrein weist auch C3_{-A} (ohne Alginat), entgegen der ursprünglichen Zusammensetzung der Probe C3 ($\sim 30 \%$), eine erhöhte Porosität mit ca. 40% auf (Abb. 3-9).

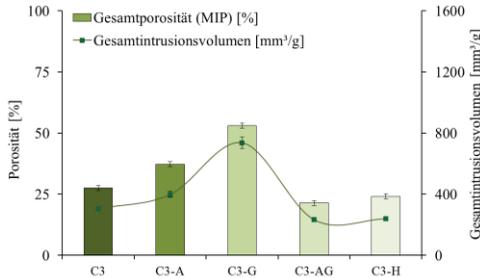


Abb. 3-9: Quantitative Charakterisierung des Porensystems mittels Quecksilberporosimetrie. Bestimmung der Gesamtporosität als Verhältnis zwischen Porenvolumen (Gesamtintrusionsvolumen) und Rohvolumen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im Gegensatz dazu verringern sich die Porositätswerte der Cryogele ohne Alginat & Gelatine (C3_{-AG}) sowie ohne HEMA (C3_{-H}) auf ca. 24% . Mit diesen Werten geht gleichzeitig ein geringeres Porenvolumen einher, welches eine Differenz von knapp $100 \text{ mm}^3/\text{g}$ zur Referenzprobe C3 aufweist.

Zum einen bewirkte die Abwesenheit von Alginat (C3_{-A}) und Gelatine (C3_{-G}) eine Erhöhung der Porosität und andererseits wurde durch das Fehlen von beiden Komponenten (C3_{-AG}) sowie HEMA (C3_{-H}) eine Verringerung der Porosität bzw. des Porenvolumens hervorgerufen. Letzteres wird jedoch als keine signifikante Veränderung aufgeführt.

Mit Hilfe der erfassten Schwellraten in einem Zeitraum von 10 s wurde der Einfluss der neu entwickelten Materialzusammensetzung inkl. veränderter

Porenstruktur auf die Absorption von Flüssigkeiten (*hier*: Nährmedium) untersucht und in Abbildung 3-10 dargestellt. Im Gegensatz zu C3, weisen die Proben C3-A (ohne Alginat) und C3-AG (ohne Alginat & Gelatine) signifikant erhöhte Schwellraten nach 10 s in Nährstoffmedium auf (2.5 bis 3.5fache gegenüber dem Trockengewicht). Folglich ist der Flüssigkeitsgehalt und das Feuchtgewicht annähernd doppelt so hoch wie zur Referenzprobe C3 (~ 54 % mit 0.052 g) (Tab. 3-4). Daneben ruft das Fehlen von Gelatine (C3-G) keine relevanten Veränderungen bzgl. des Schwellverhaltens und dem Flüssigkeitsgehalt hervor, wohingegen die Anwesenheit von HEMA (C3-H) zu einer Verschlechterung der Quelleigenschaften und somit zu einer geringfügigen Gewichtszunahme in wässriger Umgebung führte (Abb. 3-10, Tab. 3-4).

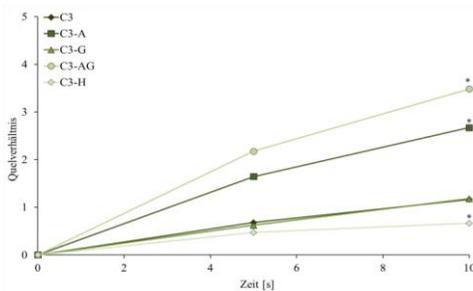


Abb. 3-10: Auswertung des Schwellverhalten der Cryogele C3-A, C3-G, C3-AG und C3-H in Nährmedium. Es wurde das Feuchtgewicht zu den Zeitpunkten $t = 5, 10$ s ermittelt und zum Ausgangstrockengewicht bezogen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tab. 3-4: Gewichtsentwicklung und Vergleich des Flüssigkeitsgehaltes nach 10 s.

| Cryogel | Gewicht [g] | Flüssigkeitsgehalt [%] |
|-------------------|--------------------|-------------------------------|
| C3 | 0.052 ± 0.01 | 53.80 ± 3.74 |
| C3 _{-A} | 0.085 ± 0.07 | 72.77 ± 2.98 |
| C3 _{-G} | 0.047 ± 0.009 | 54.12 ± 8.83 |
| C3 _{-AG} | 0.088 ± 0.016 | 77.69 ± 5.32 |
| C3 _{-H} | 0.030 ± 0.003 | 40.00 ± 4.63 |

Bezogen auf die Ergebnisse des Schwellverhaltens der veränderten Cryogelproben können nur begrenzt Zusammenhänge zu den ermittelten Porositäts- und Porenvolumenwerten gezogen werden. Die deutlich erhöhte Schwellrate von C3_{-A} kann mit den nun freigelegten funktionellen Gruppen (NH₂⁻ und COO⁻) von Gelatine in Verbindung gebracht werden, welche für eine gesteigerte Hydrophilie verantwortlich sind. Dagegen verursacht das Fehlen beider Bestandteile (C3_{-AG}) eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme gegenüber der Referenzprobe C3 mit einem Gehalt an Alginat bzw. Gelatine von jeweils 2 % w/v. Durch den Verlust von Alginat und Gelatine kann eine gesteigerte Flüssigkeitsabsorption über HEMA erfolgen, welches ebenfalls für hervorragende Quelleigenschaften bekannt ist. Dagegen wurde in Abwesenheit von Alginat (C3_{-G}) und im speziellen von HEMA (C3_{-H}) ein reduzierteres Schwellverhalten in Nährmedium festgestellt. Diese Beobachtung kann auf eine besondere Rolle von HEMA während der Flüssigkeitsaufnahme zurückgeführt werden, da durch die Abwesenheit beider natürlicher Komponenten (C3_{-AG}) bzw. HEMA (C3_{-H}) die bedeutendsten Veränderungen hinsichtlich des Schwellverhaltens bewirkt wurden.

Die Ergebnisse der Druckversuche zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften nach Veränderung der ursprünglichen Komponentenzusammensetzung wurden entsprechend der vorhergehenden Methoden ermittelt und sind in den Abbildungen 3-11A und B zusammengestellt. Angesichts der berechneten E-Module aus der Steigungsgeraden des linear elastischen Bereichs der Spannungs-Dehnungs-Kurve (Abb. 3-11B) können die unter-

schiedlichen Cryogele in zwei Gruppen unterteilt werden. Die E-Module der Cryogelproben ohne Alginat (C3_{-A}) und Gelatine (C3_{-G}) liegen im selben Wertebereich wie die Referenzprobe C3 in seiner Ausgangszusammensetzung (25 bis 30 kPa). Dagegen bewirkt das Fehlen der natürlichen Bestandteile (C3_{-AG}) und HEMA (C3_{-H}) eine Verringerung des E-Moduls um die Hälfte (~ 15 kPa) (Abb. 3-11A).

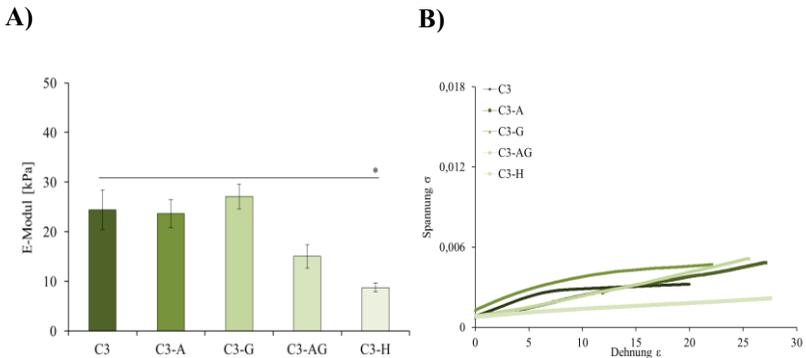


Abb. 3-11: Bestimmung des E-Moduls der Cryogele C3_{-A}, C3_{-G}, C3_{-AG} und C3_{-H}. **A)** Messung des E-Moduls über Eindrückkraft (max. 1 N) und Eindrückweg (entspricht Längenänderung). **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Cryogele. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die erhöhte Elastizität von C3_{-H} zeigt sich ebenfalls im Spannungs-Dehnungs-Diagramm, in welchem die Kurve nahezu parallel zur x-Achse verläuft und folglich einen großen linear elastischen Bereich repräsentiert (Abb. 3-11B). Unter Berücksichtigung der berechneten E-Modul-Werte lassen sich Verbindungen zur materialspezifischen Porosität erkennen. C3_{-A}

(ohne Alginat) und C3_G (ohne Gelatine) weisen aufgrund ihrer erhöhten Porosität (~ 60 %) und Porenvolumen (~ 800 mm²/g) eine verbesserte Stabilität auf, welche sich schließlich in einem größeren E-Modul (~ 30 kPa) äußert. Im Gegensatz dazu spiegelt sich die geringe Porosität (~ 25 %) von C3_{AG} (ohne Alginat & Gelatine) und C3_H (ohne HEMA) in einem weichen und elastischen Verhalten wider (Abb. 3-11A). Die Destabilisierung der Cryogelproben durch die Abwesenheit von Alginat & Gelatine sowie von HEMA repräsentiert die Rolle der Bestandteile für die mechanische Festigkeit der Gerüste. Letztgenanntes wird außerdem durch die Ergebnisse der Proben C3_A und C3_G bekräftigt. Dabei verweist die Verringerung des E-Moduls von HEMA auf die gesonderte Stellung innerhalb des Cryogelaufbaus, welcher allein durch die Komponenten Alginat und Gelatine nicht in seiner ursprünglichen Form aufrechterhalten werden kann.

Das mechanische Verhalten während der Druckversuche wird durch die Relation zwischen Streckgrenze, entspricht der Eindrückkraft, und Längenänderung, entspricht dem Eindrückweg, detaillierter beschrieben und in Abbildung 3-12 grafisch dargestellt. Auf diese Weise kann die Auswirkung der veränderten Materialzusammensetzung auf ihre Dehnbarkeit untersucht werden. Die Längenänderung bis zur Streckgrenze der Proben C3_A (ohne Alginat) und C3_G (ohne Gelatine) liegt zwischen 6 und 8 %, was dem Wertebereich von C3 in seiner ursprünglichen Zusammensetzung entspricht (Abb. 3-12). In diesem Bereich treten ausschließlich elastische Verformung ohne plastische Deformationen auf. Dagegen unterscheiden sich die jeweiligen Spannungen der Proben und nehmen von C3_A (0.0035 N/mm²) zu C3_G (ohne Gelatine, 0.0025 N/mm²) um 0.0010 N/mm² ab (Abb. 3-12).

Dieser Verlauf charakterisiert die materialspezifischen Elastizitätseigenschaften der Cryogelproben, d.h. das Erreichen der Streckgrenze bei erhöhter Eindrückkraft (vgl. C3_A bis C3_G, Abb. 3-12) weist auf eine Zunahme des E-Moduls hin (Abb. 3-11A). Im Gegensatz dazu zeigen die Proben ohne Alginat & Gelatine (C3_{AG}) und ohne HEMA (C3_H) eine umgekehrte Reaktion. Für die Streckgrenze wurde eine Spannung von 0.0018 N/mm² ermittelt, welche deutlich niedriger als die übrigen Proben ausfällt (Abb. 3-12). Gleichzeitig wurde eine höhere Stauchung (~ 15 %) bezogen auf

die Ausgangsmaße erreicht, was schließlich mit den niedrigen E-Modul-Werten von ca. 15 kPa korreliert (Abb. 3-11A).

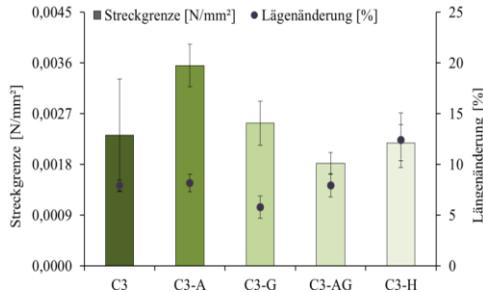


Abb. 3-12: Bewertung der Streckgrenze und zugehörigen Längenänderung der Cryogele C3_A, C3_G, C3_{AG} und C3_H im geschwollenen Zustand. Die Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5$ mm). Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.1.2 Einfluss von Syntheseparametern

In diesem Kapitel werden die Wirkung der Reaktionszeit und der Temperatur sowie der Einfluss der Quervernetzung der Polymerketten untersucht und in einen Kontext mit den spezifischen Struktureigenschaften gesetzt. Dabei wird zunächst die Gewichtung der Synthesetemperatur geprüft (Experiment 3), welche im Allgemeinen -21 °C beträgt (siehe Kapitel 2.1). Aufgrund der Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wird die Entstehung eines Zweiphasensystems ermöglicht, welches die Voraussetzung zur Bildung eines porösen 3D Netzwerkes darstellt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend neben der Gefriertemperatur auch die Gefrierzeit verändert (Experiment 4). Abgesehen von der Temperatur und Reaktionszeit, stellt die Verlinkung der Polymerketten während der Entwicklung der Porenstruktur

einen wichtigen Prozessschritt dar. Demzufolge wird dieser Effekt am Ende des Kapitels untersucht.

EXPERIMENT 3

In diesem Experiment wurden die Auswirkungen von verschiedenen Synthesetemperaturen (RT, +4 °C, -21 °C und -80 °C) bei konstanter Reaktionszeit von 24 h überprüft. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 wurden die Materialzusammensetzung und die jeweiligen Konzentrationsverhältnisse der Cryogelprobe C3 verwendet. Gleichzeitig vertritt diese als Referenzstruktur die Synthese bei -21 °C, welche der festgesetzten Gefrier-temperatur aus dem Standardprotokoll von Kapitel 2.1 entspricht. Die Synthese bei RT und +4 °C repräsentiert zudem die Hydrogelvariante bei gleicher Materialzusammensetzung und wurde an dieser Stelle ebenfalls detaillierter untersucht. Die grundsätzlichen Unterschiede zwischen Cryogelen und Hydrogelen wurden in Kapitel 1.3.2 beschrieben.

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden die Oberflächenstrukturen der bei RT und +4 °C sowie bei -80 °C hergestellten Proben untersucht und in Abbildung 3-13 dargestellt. Die REM-Aufnahmen der Synthesen bei RT und +4 °C zeigen die typischen Merkmale eines polymeren Gels, welches bei einer Temperatur oberhalb des Gefrierpunktes ($t = 0$ °C) hergestellt wurde (entspricht der Hydrogelvariante). Verglichen zur charakteristischen Porenstruktur der Cryogelprobe C3 bei -21 °C, sind bei den Hydrogelen (bei RT und bei +4 °C) keine Poren sichtbar und ausschließlich eine dichte homogene Oberfläche zu erkennen (Abb. 3-13).

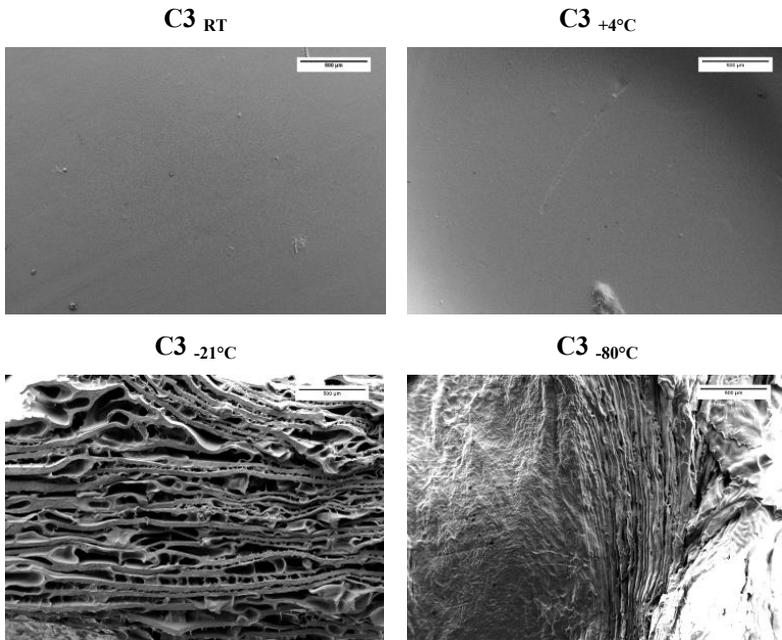


Abb. 3-13: Untersuchung der Porenstruktur auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen (Experiment 3). REM-Aufnahmen der Hydrogele (RT bzw. +4 °C) und Cryogele bei (-21 °C (C3) bzw. -80 °C) in 40facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 500 µm). Die in Kapitel 3.1.1 hergestellte Cryogelprobe C3 stellt die Referenzstruktur dar. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

Auf diese Weise konnte der visuelle Beweis erbracht werden, dass der Gefriervorgang während der Cryogelsynthese der entscheidende Schritt zur Erzeugung eines hochporösen Netzwerkes im Mikrometerbereich ist und gleichzeitig den wesentlichen Unterschied zwischen Hydrogel und Cryogel darstellt. Im Gegensatz zur Gefriertemperatur bei -21 °C (bei Probe C3_{-21°C}), werden die Porenwände mit abnehmender Gefriertemperatur (-80 °C) schmaler und sichtbar instabiler. Im Zuge der Trocknung bei RT kommt es zu einem signifikanten Strukturverlust und der Zusammenlagerung

einzelner Porenwände, sodass eine optische Trennung zwischen Porenwänden und Poren nicht mehr möglich ist (Abb. 3-13).

Die ermittelten Ergebnisse zur Porositätsuntersuchung mit Hilfe der Gewichtsanalyse (Gravimetrie) sind in Abbildung 3-14A dargestellt und werden durch Fotografien zu den einzelnen Gelvarianten ergänzt (Abb. 3-14B). Im Rahmen der gravimetrischen Messungen wurden aus den Abmaßen der Probe das Gesamtvolumen und aus der Feststoffdichte und Masse der Probe das Feststoffvolumen bestimmt. Nach 1 h in 100 % Ethanol wurde erneut das Gewicht der Probe gemessen und konnte nun zu den anderen Werten in Bezug genommen werden. Im Vergleich zu $C3_{-21^{\circ}\text{C}}$, liegen die Porositätswerte der Proben $C3_{\text{RT}}$ und $C3_{+4^{\circ}\text{C}}$ sowie bei $C3_{.80^{\circ}\text{C}}$ im Bereich von ca. 30 %, d.h. ein Drittel gegenüber dem ermittelten Wert (≈ 80 %) der Referenzprobe (Abb. 3-14A). Diese Berechnungen korrelieren mit den vorangegangenen REM-Aufnahmen und den Fotografien aus Abbildung 3-14B. Letzteres zeigt die verschiedenen Hydro- und Cryogele im vollständig aufgequollenen (ohne vorherige Trocknung) und getrockneten Zustand. Im Gegensatz zu den Proben bei RT bzw. $+4^{\circ}\text{C}$ (Hydrogele) und der Cryogelprobe $C3_{.80^{\circ}\text{C}}$ ist die poröse Struktur bei einer Synthesetemperatur von -21°C ($C3$) bereits optisch wahrnehmbar. Die Synthesetemperatur oberhalb des Gefrierpunktes (RT bzw. $+4^{\circ}\text{C}$) im Zusammenhang mit dem Ausbleiben der Eiskristallbildung bewirkte nicht nur optische Unterschiede, sondern führte außerdem zu einer deutlich reduzierten Gesamtporosität, wie sie bereits aus den REM-Aufnahmen vermutet werden konnte (Abb. 3-14A und B). Mit zunehmender Gefriertemperatur setzt die reaktionstypische Eiskristallformung ein und die Polymerisationsgeschwindigkeit verzögert sich, woraus ein Anstieg der Porositätswerte resultiert. Allerdings verursacht eine Gefriertemperatur oberhalb von -21°C eine deutliche Verringerung der Polymerisationsrate und somit einen unzureichenden Aufbau des polymeren Netzwerkes.

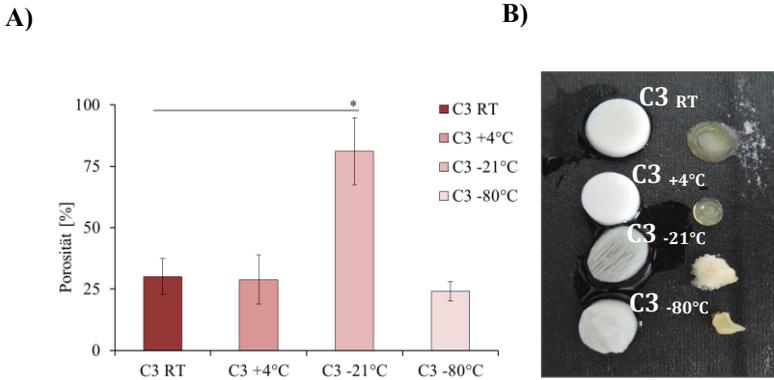
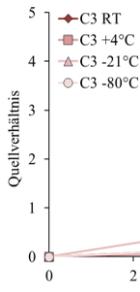


Abb. 3-14: Quantitative Charakterisierung des Porensystems mittels gravimetrischer Messmethode. **A)** Werte zur Gesamtporosität aus den gravimetrischen Messungen. Aufgrund des Strukturverlustes der Proben war eine Messung nach herkömmlichen Verfahren (Quecksilberporosimetrie) nicht möglich. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe bei RT, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **B)** Fotografien der Hydro- und Cryogele im vollständig geschwollenen (l.) und getrockneten Zustand (r.).

Die Ergebnisse zum Schwellverhalten in Nährstoffmedium werden in Abbildung 3-15A dargestellt und durch Fotografien der geschwollenen Gele nach 10 s und im trockenen Zustand ergänzt (Abb. 3-15B). Entsprechend der Porositätsmessungen der Cryogelprobe C3 (-21 °C, ~ 80 %) in Abbildung 3-14A, ist die Schwellrate ebenfalls um das Dreifache gegenüber den anderen Werten erhöht. Dagegen weisen die Schwellraten der Hydrogele bei RT und bei +4 °C annähernd identische Werte gegenüber den Proben C3_{-80°C} auf (Abb. 3-15A). Dieses Verhalten kann ebenfalls auf die niedrigen Porositätswerte, die zwischen 25 und 30 % liegen, zurückgeführt werden (Abb. 3-14A). Die im Quelldiagramm dargestellten Ergebnisse können durch die Fotografien in Abbildung 3-15B visuell bestätigt werden. Im Gegensatz zur Hydrogelsynthese bei RT und bei +4 °C, quellen die zuvor getrockneten Cryogele bei -21 °C (C3) und bei -80 °C sichtbar schneller auf. Nach 10 min

in Nährmedium ist die Ausgangsform der Cryogele wieder annähernd erreicht, wohingegen die maximale Quellrate der Hydrogele (RT bzw. +4 °C) um ein Vielfaches länger dauert. Aus diesem Grund ist der visuelle Unterschied zwischen den geschwollenen und getrockneten Hydrogelproben geringer (Abb. 3-15B).

A)



B)

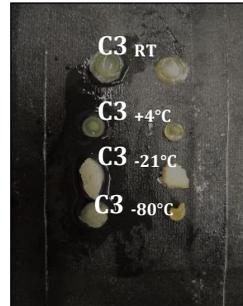


Abb. 3-15: Auswertung des Schwellverhalten in Nährmedium. **A)** Es wurde das Feuchtgewicht der Proben zu den Zeitpunkten $t = 5, 10$ s ermittelt und zum Trockengewicht bezogen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe bei RT, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **B)** Fotografien der Hydro- und Cryogelege im geschwollenen Zustand nach 10 s in Nährmedium (l.) und getrockneten Zustand (r.).

Die Ergebnisse zur Berechnung des E-Moduls auf Basis der Druckversuche werden durch die grafische Darstellung der Porenwandstärke ergänzt und in Abbildung 3-16A und B zusammengestellt. Ausgehend von der Hydrogelprobe bei RT ist deutlich zu erkennen, dass ein signifikanter Unterschied zur Synthese bei +4 °C sowie den Cryogelproben bei -21 °C (C3) und -80 °C besteht. Daraus ergibt sich eine maximale Differenz von über 20 kPa, welche den Unterschied zwischen der Probe C3 (-21 °C) mit ca. 25 kPa und der Cryogelvariante bei -80 °C mit ca. 2 kPa repräsentiert.

Die Werte der Porenwanddicke von C3_{-21°C} und C3_{-80°C} wurden mit Hilfe der REM-Aufnahmen ermittelt und als charakteristisches Merkmal zur Erklärung

des elastischen Verhaltens der Proben hinzugezogen. Die erhöhte mechanische Festigkeit der Referenzstruktur C3 (-21 °C) gegenüber den Hydrogelen wird neben der Porosität auch durch verstärkte Porenwände (~ 30 µm) hervorgerufen (Abb. 3-16A und B). Gleichzeitig verringern die dünneren Porenwände (~ 17 µm), resultierend aus der Synthese bei -80 °C, die Stabilität und Widerstandsfähigkeit der Probe, wodurch ein weiches Polymer entsteht (Abb. 3-16A). Der kompakte Aufbau und die minimal poröse Struktur der Hydrogele bei RT und bei +4 °C (Abb. 3-13), verhinderten eine entsprechende Messung der Porenwände im getrockneten Zustand.

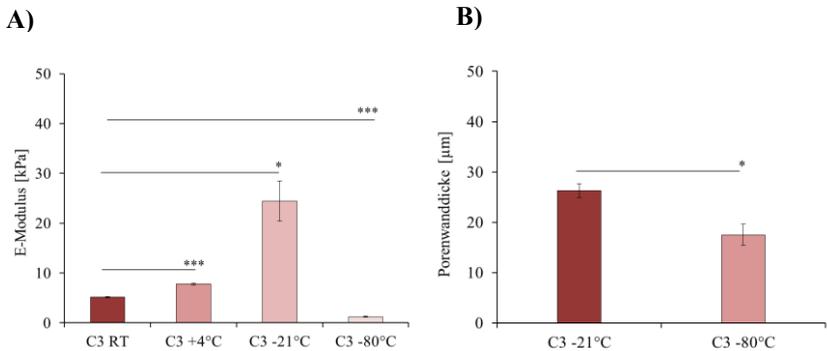


Abb. 3-16: Bestimmung des E-Moduls und der Porenwanddicke. **A)** Messung des E-Moduls über Eindrückkraft (max. 1 N) und Eindrückweg (entspricht Längenänderung). Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. **B)** Berechnung der Porenwanddicke mittels Auswertung der REM-Aufnahmen der Proben. Eine Messung der Porenwände war ausschließlich bei den Proben -21 °C (C3) und -80 °C möglich. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe bei RT, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Resultierend aus den durchgeführten Druckversuchen wird die berechnete Streckgrenze und zugehörige Längenänderung der Proben mit unterschiedlichen Gefriertemperaturen in Abbildung 3-17A dargestellt. Die bei RT und bei +4 °C hergestellten Hydrogele weisen annähernd identische Längenänderungen (~ 15 %) bei ungleichen Spannungen auf (0.0015 bis 0.0025 N/mm², Abb. 3-17A). Dagegen ähnelt sich das elastische Verhalten der Proben bei RT (Hydrogel) und bei -80 °C (Cryogel). Beide Materialien weisen einen großen linear elastischen Bereich (Längenänderung zwischen 15 und 20 %) bei kleinen Spannungen (~ 0.0015 N/mm²) auf, welche sich von dem Hydrogel (+4 °C) und noch signifikanter von der Cryogelprobe C3 (-21 °C) unterscheidet (Abb. 3-17A).

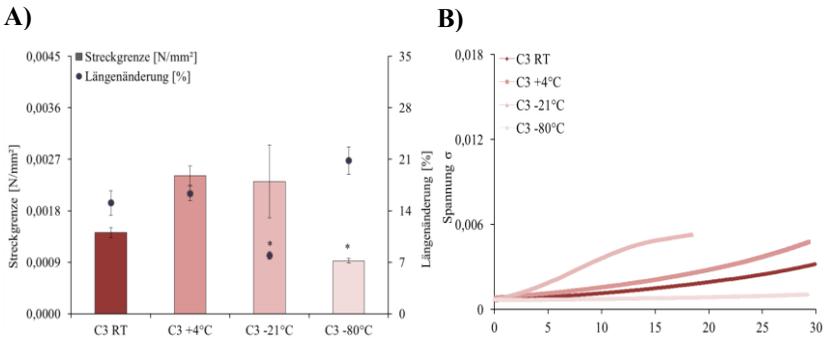


Abb. 3-17: Bewertung der Streckgrenze und zugehörigen Längenänderung im geschwollenen Zustand. **A)** Die Streckgrenze und dazugehörige Längenänderung der Hydrogele (RT, +4 °C) und Cryogele (bei -21 °C (C3), -80 °C). Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5$ mm). **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Proben. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nähmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, relativ zur Probe bei RT * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dieser Unterschied ist ebenfalls im Kurvenverlauf des Spannungs-Dehnungs-Diagramm in Abbildung 3-17B erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigen die Hydrogelprobe bei +4 °C und die Cryogelprobe C3 (-21 °C) einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der auftretenden Materialstauchungen (Abb. 3-17A). Die Streckgrenze liegt bei beiden Proben bei einer Spannung von ca. 0.0025 N/mm², allerdings wurde bei der Probe C3_{+4°C} eine Längenänderung von 15 % gemessen, wohingegen die Cryogelprobe C3_{-21°C} maximal die Hälfte erreichte (~ 8 %). Letzteres korreliert mit einem erhöhten Widerstand, die der ansteigenden Druckkraft entgegengesetzt wird und ist zudem durch einen kleineren linear elastischen Bereich gekennzeichnet (C3_{-21°C}, Abb. 3-17B).

Generell weist die bei -80 °C hergestellte Cryogelprobe die maximalste Längenänderung mit 20 % auf, was aus einer schnellen Verformung bei gering ansteigender Eindrückkraft resultiert (entspricht dem kleinsten E-Modul Wert in Abb. 3-16B). Dagegen lassen sich die Hydrogele, synthetisiert bei +4 °C, mit gleichzeitig ansteigender Druckkraft stark komprimieren (~ 15 %, Abb. 3-17A). Auf diese Weise konnte die maximale Spannung von 1 N erreicht werden, ohne dass die Probe zerbrach oder sichtbar plastische Verformungen auftraten (maximale Längenänderung bei 1N: 48.56 % ± 0.98). Die Temperaturabnahme auf +4 °C scheint keinen sichtbaren Einfluss auf die Porenmorphologie hervorzurufen, aber dennoch Auswirkungen auf die elastischen Eigenschaften auszuüben.

EXPERIMENT 4

In diesem Experiment wurde neben der Gefriertemperatur auch die Reaktionszeit verändert und deren Einfluss auf die charakteristische Porenstruktur sowie der elastischen Eigenschaften überprüft. Basierend auf den Ergebnissen aus Experiment 3, wurde die Syntheszeit von 24 h auf 1 und 5 h verringert und anschließend deren Wirkung an den Temperaturen -21 und -80 °C untersucht. Letzteres entspricht dem Temperaturbereich in welchem es zur Ausbildung der charakteristischen Porenstruktur von Cryogelen kommt (Experiment 3). Die Cryogelvariante C3 (24 h bei -21 °C) wurde erneut als Referenz verwendet.

Die qualitative Untersuchung des Porensystems der Cryogele synthetisiert für 1 und 5 h bei -21 und -80 °C wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt und in Abbildung 3-18 zusammengefasst. Unabhängig von der Gefrierzeit nimmt die mechanische Stabilität der Cryogelproben mit sinkender Gefrieretemperatur ab. Letzteres spiegelt sich in den REM-Aufnahmen der bei -80 °C hergestellten Proben in Abbildung 3-18 sowie in den Aufnahmen in Abbildung 3-13 (24 h bei -80 °C) wieder.

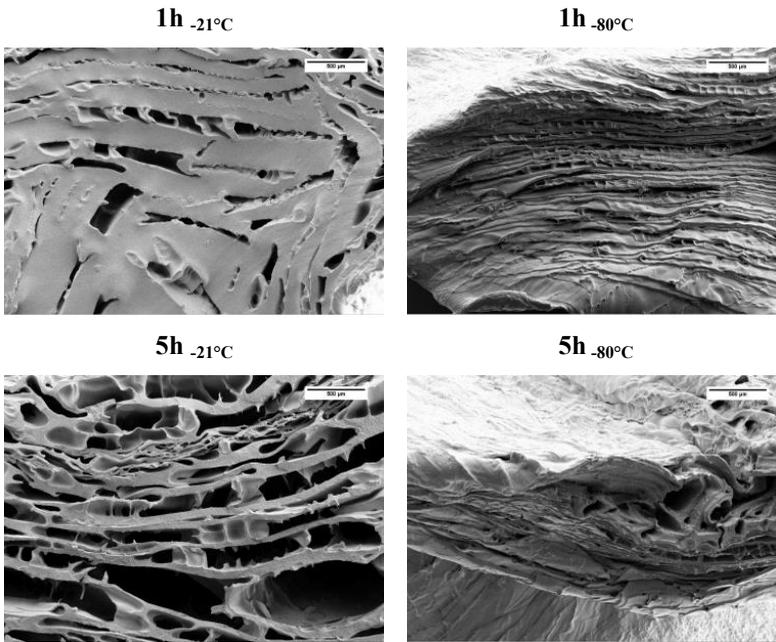


Abb. 3-18: Untersuchung der Porenstruktur auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen (Experiment 4). REM-Aufnahmen der Proben bei einer Synthese von 1 und 5 h bei jeweils -21 und -80 °C in 40facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 500 µm). Die in Kapitel 3.1.1 hergestellte Cryogelprobe C3 stellt die Referenzstruktur bei einer Synthese von 24h und -21 °C dar. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

Charakterisierend hierfür sind die sehr dünnen Porenwände, welche sich während des Trocknungsvorgangs aufeinanderlegen. Im Gegensatz dazu ist mit zunehmender Syntheszeit (1 bis 24 h) bei einer Gefrieretemperatur von $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ein sich entwickelndes Porensystem mit deutlicher Abgrenzung zwischen Poren und Porenwänden erkennbar (Abb. 3-13 und 3-18). Im Vergleich zu den stärkeren und stabilen Porenwänden nach einstündiger Synthese, scheinen die typischen Strukturmerkmale der Cryogelprobe C3 bei einer Gefrierzeit von 5 h bereits sichtbar (Abb. 3-18). Dieser Unterschied beschränkt sich nicht nur auf die visuellen Ergebnisse, sondern konnte auch mit Hilfe der Quecksilberporosimetrie aufgezeigt werden (Abb. 3-19). Dabei wurde zwischen dem Porendurchmesser der Synthese bei 1 zu 5 h eine Differenz von annähernd $70\text{ }\mu\text{m}$ gemessen, welche sich im jeweiligen Porenvolumen ($100\text{ zu }300\text{ mm}^3/\text{g}$) entsprechend wiederholte.

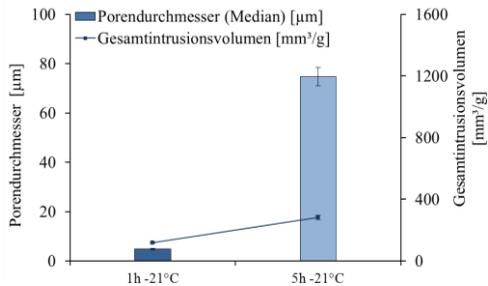
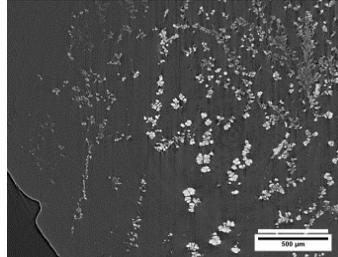


Abb. 3-19: Quantitative Charakterisierung des Porensystems mittels Quecksilberporosimetrie. Bestimmung des Porendurchmessers (Median) und dem dazugehörigen Porenvolumen (Gesamtintrusionsvolumen). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zur qualitativen Untersuchung der Porenstruktur wurden die getrockneten Cryogelproben, $1\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$ und $5\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$, mittels Elektron-Synchrotron-Strahlung analysiert und die Ergebnisse in Abbildung 3-20 dargestellt. Die Materialscans werden mit hoher Erfassungsgeschwindigkeit durchgeführt, während

die Proben dabei nicht beschädigt werden und im Anschluss erneut zur Verfügung stehen. Nach Auswertung der REM-Aufnahmen im getrockneten Zustands der Proben 1h_{-80°C} und 5h_{-80°C} wurde auf eine Analyse mittels der Röntgen-Mikro-CT verzichtet.

1h_{-21°C}



5h_{-21°C}

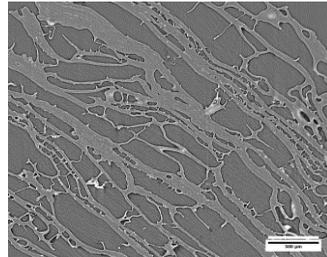


Abb. 3-20: Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen der Porenstruktur. Mit Hilfe der 3D-Röntgenbildgebung konnte die Interkonnektivität der Porenstruktur analysiert werden. Die Proben wurden vor der Messung getrocknet und zerstörungsfrei untersucht. Aufgrund des Formverlustes der Cryogelproben bei einer Gefrieretemperatur von -80 °C, wurde ausschließlich eine Messung der Proben bei 1h/5h_{-21°C} durchgeführt. (Maßstabsbalken 500 µm)

Mit Hilfe der Tomographiescans konnten die morphologischen Merkmale der Cryogelproben mit einer Gefrierzeit von 1 h bzw. 5 h bei -21 °C auch in tieferen Schichten nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Cryogelprobe 5h_{-21°C}, konnte bei der Probe 1h_{-21°C} auch im inneren des Gerüsts keine erhöhte Porosität erfasst werden. Die helleren Bereiche stellen lediglich die

wenigen Poren dar, welche von einem festeren Porenwandnetz umgeben sind (Abb. 3-20).

Dagegen weist die Cryogelprobe bei 5 h und $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine sichtbar offenere Struktur auf, welche bereits in den REM-Aufnahmen aus Abbildung 3-18 oberflächlich dargestellt werden konnten. Die verschiedenen Grautöne der Porenwände deuten auf unterschiedliche Dichteverhältnisse hin (Abb. 3-20). Je heller der Bereich dargestellt wird, desto höher ist die Dichte an dieser Stelle. Mit zunehmender Gefrierzeit erfolgte eine ausreichende Phasentrennung und steigende Konzentration der Reaktionskomponenten in der nicht-gefrorenen Flüssigkeitsphase. Diese erhöhte Konzentration korreliert schließlich mit einer dichteren Polymerstruktur. Auf diese Weise können die bisher erfassten Porenstrukturmerkmale nochmals gefestigt und bestätigt werden.

Der Zusammenhang zwischen dem ermittelten E-Modul und der gemessenen Porenwanddicke wird in den Diagrammen von Abbildung 3-21A und B dargestellt. Wie aus der Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie und den anschließenden Aufnahmen interpretiert werden konnte, verhalten sich die Cryogele bei einer Gefriertemperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mechanisch instabiler und elastischer als bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vgl. Abb. 3-16A). Mit zunehmender Gefrierdauer bei einer Temperatur von $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt das E-Modul signifikant von ca. 20 auf 30 kPa (Abb. 3-21A). Gleichzeitig verringert sich die Porenwanddicke von $100\text{ }\mu\text{m}$ (1 h) auf $60\text{ }\mu\text{m}$ (5 h) (Abb. 3-21B). Diese Tendenz wird durch die Ergebnisse in Abbildung 3-16B bestätigt, in welcher eine Porenwanddicke von ca. $30\text{ }\mu\text{m}$ nach einer Synthese von 24 h (C3) erreicht wurde. Dagegen bewirkt die Porenwanddicke von rund $20\text{ }\mu\text{m}$ bei einer Gefriertemperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eine deutlich verringerte mechanische Festigkeit mit einem E-Modul unter 2 kPa (Abb. 3-21A/B). Dennoch treten unabhängig von den gewählten Gefrierzeiten (1 h, 5 h und 24 h) bei einer Gefriertemperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nur mäßige Unterschiede zwischen den gemessenen Porenwandstärken und den berechneten E-Modulwerten auf (Abb. 3-21A/B und Abb. 3-16A/B). Im Gegensatz dazu rufen die verschiedenen Gefrierzeiten bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$ und $5\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$) weitaus signifikanterer Elastizitätsunterschiede (Differenz 10 kPa) auf.

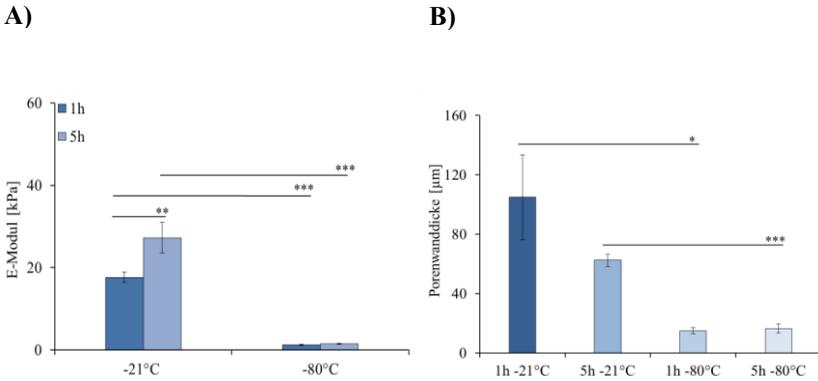


Abb. 3-21: Bestimmung E-Moduls und Porenwanddicke. **A)** Messung des E-Moduls über Eindrückkraft (max. 1 N) und Eindrückweg (entspricht Längenänderung). Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. **B)** Berechnung der Porenwanddicke aus den REM-Aufnahmen der Cryogele. Eine Messung der Porenwände war ausschließlich bei den Proben -21 und -80 °C möglich. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und den Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Anhand der berechneten Daten zur Streckgrenze und dazugehörigen Längenänderung in Abbildung 3-22A ist eine direkte Verbindung zu den E-Modul-Werten erkennbar. Im Gegensatz zu den Synthesen bei -80 °C, weisen die Cryogelproben bei -21 °C eine geringe Längenänderung (~ 10 %) im höheren Spannungsbereich auf, was gleichzeitig auf einen kleinen elastischen Bereich hindeutet (Abb. 3-22A). Diese Gegebenheit spiegelt sich auch im Spannungs-Dehnungs-Diagramm in Abbildung 3-22B wider.

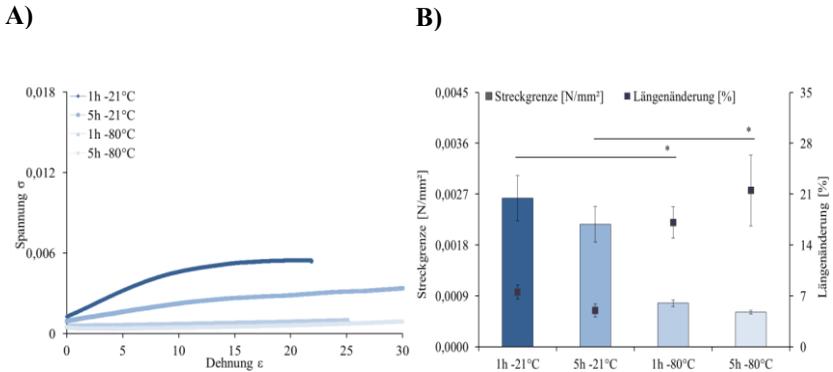


Abb. 3-22: Bewertung der Streckgrenze und zugehörigen Längenänderung. **A)** Die Streckgrenze und dazugehörige Längenänderung der Proben bei einer Synthese von 1 und 5 h mit -21 und -80 °C. Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5$ mm). **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Cryogele. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nähmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Mit zunehmendem Steigungswinkel der Verlaufskurve reduziert sich der lineare Bereich, d.h. eine verringerte Verformung der Probe tritt auf und resultiert in erhöhten E-Modul-Werten (Abb. 3-21A). Cryogelproben, welche bei einer Temperatur von -80 °C hergestellt wurden, erreichen mit zunehmender Gefrierdauer eine Längenänderung von maximal 20 % und Spannungswerte zwischen 5 und 10 N/mm² (Abb. 3-22A). Diese Reaktion konnte ebenfalls im Experiment 3 bei einer Synthesetemperatur von -80 °C und einer Synthesedauer von 24 h nachgewiesen werden (Abb. 3-17A/B). Wie bereits über die E-Modul-Werte und Porenwandstärken erkannt wurde, treten

auch hier nur geringfügige Unterschiede zwischen den Spannungen und zugehörigen Längenänderungen der Proben 1h_{-80°C} und 5h_{-80°C} auf (Abb. 3-23).

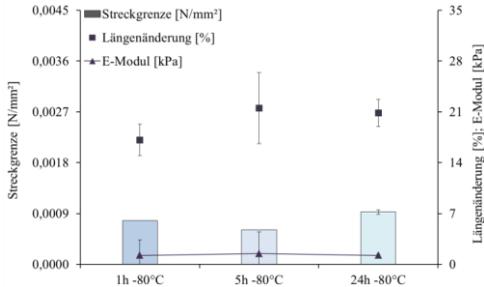


Abb. 3-23: Vergleich der Längenänderung zur Streckgrenze mit zugehörigen E-Modul. Verglichen werden die Streckgrenze und dazugehörige Längenänderung sowie die jeweiligen E-Module bei einer Synthese von 1 h, 5 h und 24 h mit -80 °C. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und den Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

EXPERIMENT 5

In diesem Experiment wurde der Fokus auf die Quervernetzung der Polymerketten während der Polymerisation gelegt. Durch den Prozess der Vernetzung verändern sich die strukturellen Merkmale der Proben. Im Allgemeinen beinhaltet dies eine Erhöhung der Festigkeit und Verminderung der Elastizität. Dabei nehmen die Veränderungen mit dem Vernetzungsgrad, d.h. dem Anteil an vernetzten Stellen bezogen auf die Gesamtpolymermenge, zu. Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln festgesetzt, dient die Cryogelprobe C3 mit einer PEGda-Konzentration von 5 % v/v als Referenz für die nachfolgenden Ergebnisse.

Im Zuge der Cryogelsynthese der Probe C3 erfolgt die radikalische Polymerisation von HEMA und PEGda durch die Initiation von freien Radikalen über APS. Gleichzeitig erfolgt die Vernetzung der Polymerketten über PEGda.

Zur Untersuchung des Einflusses von PEGda auf die charakteristischen Eigenschaften, wurde das Ausgangsvolumen (500 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$) im Verlauf des Experimentes auf 250 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ halbiert ($\text{C3}_{250\mu\text{l}}$) bzw. auf 1.000 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ (= 1 ml/10 ml, $\text{C3}_{1\text{ml}}$) verdoppelt (Tab. 3-5). Parallel dazu wurde das Fehlen von Gelatine und dessen Auswirkung auf die kommenden Zellkulturexperimente untersucht. Um jedoch sicherzustellen, dass durch die Abwesenheit von Gelatine keine strukturellen Veränderungen erzeugt werden, wurden diese Proben im Rahmen des Experimentes ebenfalls überprüft.

Tab. 3-5: Zusammensetzung der Cryogelproben $\text{C3}_{250\mu\text{l}}$ bis $\text{C3}_{1\text{ml}}$ bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. $\text{C3}_{250\mu\text{l}}$ und $\text{C3}_{250\mu\text{l},-G}$ bezeichnen die Proben mit halbiertes PEGda-Konzentration (250 μl) und dem Fehlen (-G). Entsprechend stehen die Proben $\text{C3}_{1\text{ml}}$ und $\text{C3}_{1\text{ml},-G}$ für die Proben mit doppelte PEGda-Menge (1 ml) und dem Fehlen von Gelatine (-G). Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) bzw. TEMED (0.1 % v/v) sowie von GA blieben in allen Variationen stets konstant. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kapitel 2.1 beschrieben.

| Cryogel | Alginate | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| $\text{C3}_{250\mu\text{l}}$ | 200 mg | 200 mg | 62.5 μl | 350 μl | 250 μl |
| $\text{C3}_{250\mu\text{l},-G}$ | 200 mg | - | 62.5 μl | 350 μl | 250 μl |
| $\text{C3}_{1\text{ml}}$ | 200 mg | 200 mg | 62.5 μl | 350 μl | 1.000 μl |
| $\text{C3}_{1\text{ml},-G}$ | 200 mg | - | 62.5 μl | 350 μl | 1.000 μl |

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zur qualitativen Untersuchung der porösen Struktur nach veränderter PEGda-Konzentration sind in Abbildung 3-24 zusammengestellt. Die Halbierung und Verdopplung der PEGda-Konzentration von 500 auf 250 μl bzw. auf 1 ml (bezogen auf 10 ml Gesamtvolumen) wirkte sich direkt auf das charakteristische Porensystem der Cryogele aus (Abb. 3-24). Mit reduziertem PEGda-Volumen werden die Cryogele instabiler und können im Zuge der Trocknung ihre Porenstruktur nicht aufrechterhalten. Es bildet sich eine flache Form aus, welche durch einen inhomogenen Aufbau gekennzeichnet ist (Abb. 3-23).

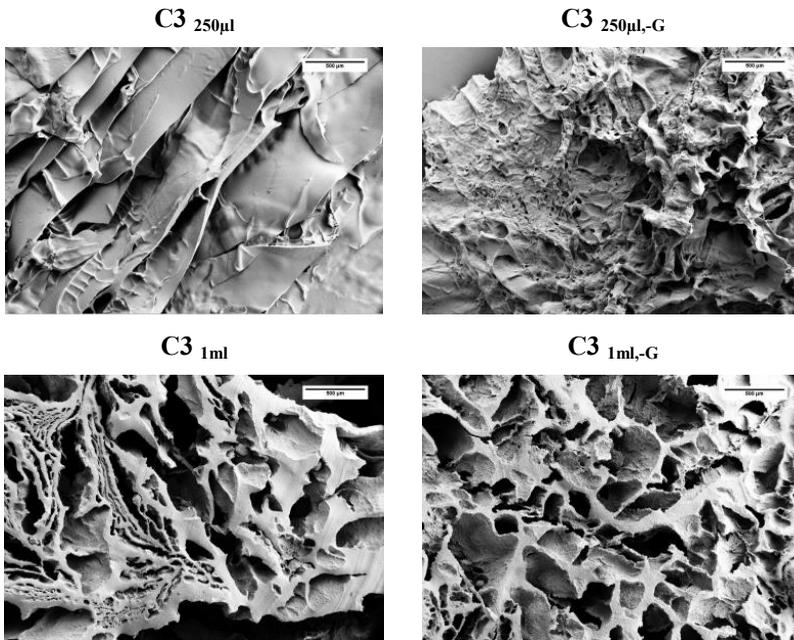


Abb. 3-24: Untersuchung der Porenstruktur auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen (Experiment 5). REM-Aufnahmen der Cryogelvarianten mit veränderter PEGda Konzentration (24 h/-21 °C) in 40facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 500 µm). Die in Kapitel 3.1.1 hergestellte Cryogelprobe C3 stellt die Referenzstruktur dar. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

Im Gegensatz dazu zeigen die Strukturen mit doppelter PEGda-Menge eine verbesserte mechanische Festigkeit, welche auch nach der Trocknung beibehalten werden kann. In diesem Fall ist ein ausgebildetes Porensystem deutlich erkennbar, welches aus größeren Poren umgeben von dicken Porenwänden aufgebaut ist. Dabei treten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Gelatine auf.

Die Schwellraten der Cryogelvarianten mit veränderter PEGda-Konzentration werden in Abbildung 3-25 dargestellt. Dabei wurde das Feuchtgewicht der

Proben zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 60 s aufgezeichnet und in Bezug zum entsprechenden Proben-Trockengewicht grafisch aufgetragen. Im Gegensatz zur Referenzprobe C3 (PEGda-Anteil: 500 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$) zeigen die Cryogele mit verringertem PEGda-Volumen (250 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$) ein vermindertes Schwellverhalten, welches ohne Gelatine vergleichbar ist (Abb. 3-25). Entgegen der Vermutungen weisen die Cryogele mit erhöhtem PEGda-Anteil (1 ml/10 ml) die schlechtesten Schwellraten auf, welche jedoch in keinem signifikanten Abstand zur Referenzprobe stehen (Abb. 3-25).

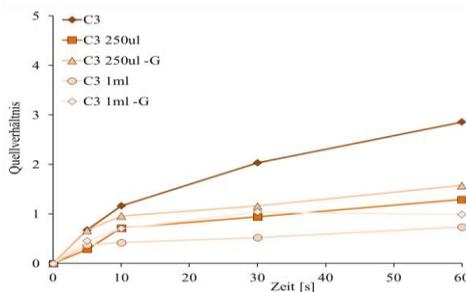


Abb. 3-25: Auswertung des Schwellverhalten in Nährmedium. Es wurde das Feuchtgewicht der Cryogelvarianten mit veränderter PEGda-Konzentration zu den Zeitpunkten $t = 5, 10, 30$ und 60 s ermittelt und zum Trockengewicht bezogen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Generell wirkt sich die veränderte Quervernetzung der Polymerketten im Zuge der abgewandelten PEGda-Konzentration negativ auf das Verhalten in flüssiger Umgebung aus. Die Schwellrate der Proben mit halbiertes PEGda-Menge ($C3_{250\mu\text{l}}/C3_{250\mu\text{l},-G}$) nimmt gegenüber der Cryogelprobe C3 um ca. 50 % und mit doppelter PEGda-Konzentration ($C3_{1\text{ml}}/C3_{1\text{ml},-G}$) um ca. 70 % ab. Darüber hinaus traten zwischen den einzelnen Cryogelproben in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Materialkomponente Gelatine Unterschiede auf. Beim direkten Vergleich zeigten die Cryogele ohne Gelatine ein besseres Schwellverhalten als die entsprechenden Proben mit Gelatine (Abb. 3-25).

Die berechneten E-Module der Druckversuche sind in Abbildung 3-26 grafisch dargestellt und repräsentieren die Auswirkungen der veränderten PEGda-Konzentration auf die mechanische Festigkeit der Cryogelproben. Mit Abwandlung der PEGda-Menge konnten signifikante Veränderungen bezüglich der Materialfestigkeit nachgewiesen werden. Verglichen zur Referenzprobe C3, sinkt das E-Modul bei verringerter PEGda-Konzentration ($C3_{250\mu l}$) um mehr als 90 % auf unter 5 kPa und steigt bei erhöhter Konzentration ($C3_{1ml}$) um mehr als das Doppelte auf über 50 kPa (Abb. 3-26).

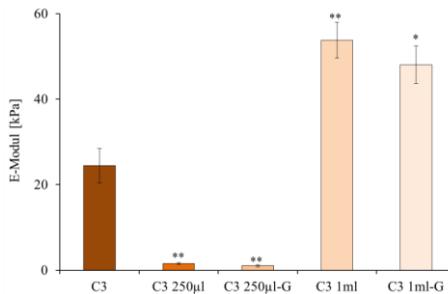


Abb. 3-26: Bestimmung des E-Moduls der Cryogele mit veränderter PEGda-Konzentration. Die Messung des E-Moduls erfolgte über die Eindrückkraft (max. 1 N) und den Eindrückweg (entspricht Längenänderung). Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und den Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Diese Verhaltensweise während der Druckbelastung korreliert mit den aufgezeichneten REM-Aufnahmen, welche eine eindeutig instabilere Struktur der Cryogele $C3_{250\mu l}/C3_{250\mu l,-G}$ und einen festeren Aufbau der Proben $C3_{1ml}/C3_{1ml,-G}$ zeigen (Abb. 3-24). Das zusätzliche Fehlen von Gelatine wirkt sich jedoch unwesentlich auf die Stabilität der Cryogelproben aus.

Aus den Ergebnissen der Druckversuche konnten die Werte für die Streckgrenze und dazugehörigen Längenänderung berechnet werden und sind in Abbildung 3-27A für die Cryogele mit veränderter PEGda-Konzentration grafisch zusammengestellt. Ergänzend hierzu werden die Kurvenverläufe der jeweiligen Cryogelvarianten im Spannungs-Dehnungs-Diagramm in Abbildung 3-27B dargestellt.

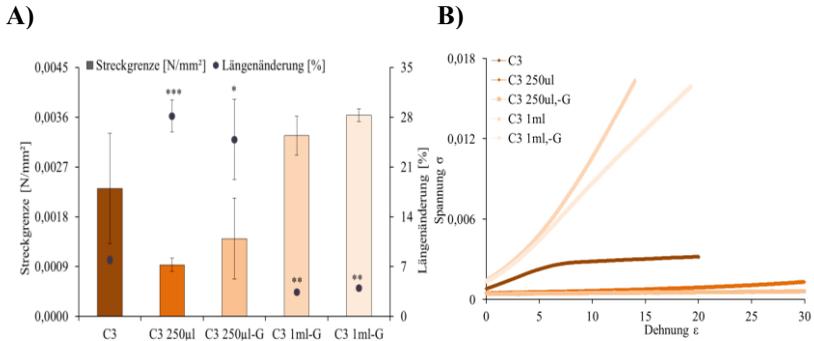


Abb. 3-27: Bewertung der Streckgrenze und zugehörigen Längenänderung. **A)** Die Streckgrenze und dazugehörige Längenänderung der Proben mit veränderter PEGda-Konzentration. Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5 \text{ mm}$). **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Cryogele. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die signifikanten Differenzen zwischen den E-Modulen konnten auch beim Verhältnis Längenänderung zur Streckgrenze nachgewiesen werden. Mit zunehmender PEGda-Menge (250 bis 1.000 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$) nimmt die Stauchung

bei steigender Eindrückkraft ab und belegt somit die verstärkte mechanische Festigkeit (Abb. 3-27A). Dabei nimmt die Längenänderung von ca. 30 % ($C3_{250\mu\text{l}}/C3_{250\mu\text{l},-G}$) über 10 % (C3) auf ca. 5 % ($C3_{1\text{ml}}/C3_{1\text{ml},-G}$) bei einer Spannung zwischen 0.0010 und 0.0035 N/mm² ab. Diese kennzeichnenden Unterschiede sind ebenfalls im Spannungs-Dehnungs-Diagramm in Abbildung 3-27B erkennbar. Das Stauchungsverhalten von sehr weichen Materialien wurde bereits in den Experimenten 3 und 4 gezeigt (Abb. 3-18/3-22B) und stellt auch in diesem Fall den charakteristisch vergrößerten linear elastischen Bereich dar. Im Gegensatz dazu verläuft die Kurve bei doppelter PEGda-Konzentration (10 % v/v) mit einem steileren Anstieg (< linear elastischer Bereich) und demonstriert auf diese Weise eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber den ausgeübten Druckkräften (Abb. 3-27B). Im Vergleich zur Referenzprobe (C3, PEGda-Anteil: 500 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$), wirkt sich die Halbierung des PEGda-Volumens auf 250 μl stärker auf die mechanische Verformbarkeit aus als eine Verdopplung der Konzentration auf 1 ml.

3.2 Eignung modifizierter Cryogelstrukturen zur Kultivierung von Prostatakrebszellen

In den vorangegangenen Kapiteln stand die physikalische Charakterisierung der synthetisierten Cryogelstrukturen im Fokus. Zunächst wurden die verwendeten Reaktionskomponenten, Alginat, Gelatine und HEMA, in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und deren Auswirkungen auf die materialspezifischen Eigenschaften untersucht (Experiment 1). Zu diesem Zwecke wurde mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie die poröse Oberflächenbeschaffenheit untersucht und diese in einen Kontext mit der daraus resultierenden Festigkeit und Elastizität sowie der Schwellfähigkeit in wässriger Umgebung gestellt. Daran anschließend erfolgte die Untersuchung der einzelnen Synthesekomponenten, im Speziellen der natürlichen (Alginat und Gelatine) und synthetischen (HEMA) Stoffe und deren Einfluss auf die charakteristische Cryogelstruktur (Experiment 2).

Im ersten Teilabschnitt dieses Kapitels wird nun der Fragestellung nachgegangen, inwieweit eine Kultivierung der etablierten Prostatakrebszelllinie

LNCaP innerhalb der verschiedenen Cryogelansätze realisierbar ist. Darüber hinaus sollen anhand des Zellverhaltens spezifische Unterschiede festgesetzt werden, die auf entsprechende Änderungen in der Cryogelstruktur zurückgeführt werden können.

3.2.1 Einfluss der Cryogelzusammensetzung auf das Verhalten der Prostatakrebszellen

Ziel des Experimentes 1 war die Synthese von vier unterschiedlichen Cryogelen, welche über eine abweichende Zusammensetzung bei Verwendung gleicher Materialien (Alginat, Gelatine und HEMA) verfügen. Während der Synthesen blieben die in Kapitel 2.1 beschriebenen Prozessparameter (Gefrierzeit von 24 h bei einer Temperatur von $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$) sowie die PEGdame Menge und deren Polymerisationsinitiator APS und Katalysator TEMED konstant. Ausgehend davon wurde im Experiment 2 das Herstellungsprotokoll der Probe C3 (aus Experiment 1) so abgewandelt, dass die Auswirkungen durch das Fehlen der Hauptkomponenten (Alginat, Gelatine und HEMA) auf die Materialkennwerte, wie Porosität, Elastizität und Schwellrate geprüft werden konnten.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zu den Zellkulturexperimenten und den daran anschließenden Untersuchungen zur Sphäroidformation und -verteilung aufgeführt. An gegebener Stelle werden die Experimente nochmals detaillierter beschrieben. Die generelle Vorgehensweise und Informationen zu den verwendeten Materialien sind in Kapitel 2.4.1 zu finden.

EXPERIMENT 1

Die in Kapitel 3.1.1 synthetisierten Cryogele dienen als Ausgangspunkt für die folgenden Zellkulturexperimente. Innerhalb dieser Cryogele, mit der Bezeichnung C1 bis C4, ändern sich die Mengenverhältnisse der Reaktionskomponenten, welche nochmals in Tabelle 3-6 aufgeführt sind. Basierend auf den bisherigen Erkenntnisstand, kann das Proliferationsverhalten der Zellen während der Kultivierung (mit und ohne Hormonbehandlung) sowie die

Bildung und Verteilung der Zellsphäroide umfangreicher untersucht und beurteilt werden.

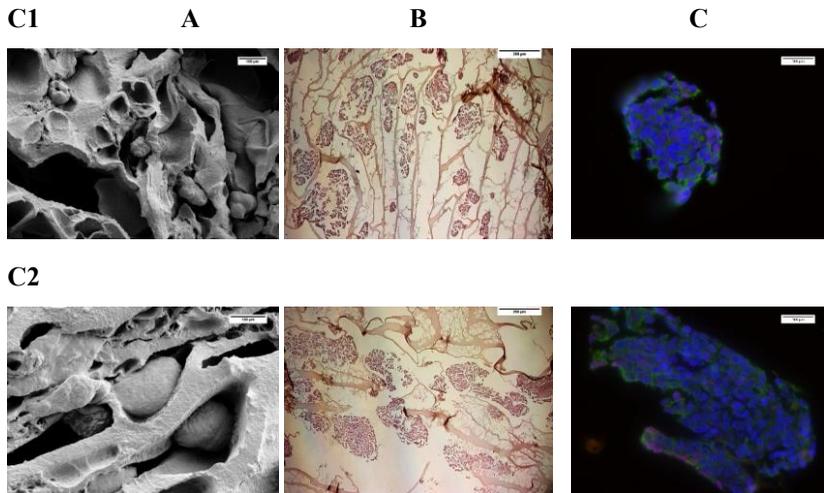
Tab. 3-6: Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4 bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) und TEMED (0.1 % v/v) blieben in allen Variationen stets konstant. Die Konzentration von GA wurde entsprechend der Alginat- bzw. Gelatine-Konzentration angepasst. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kapitel 2.1 beschrieben.

| Cryogel | Alginat | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|----------------|----------------|-----------------|-----------|-------------|--------------|
| C1 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 350 µl | 500 µl |
| C2 | 100 mg | 100 mg | 50 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C4 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 700 µl | 500 µl |

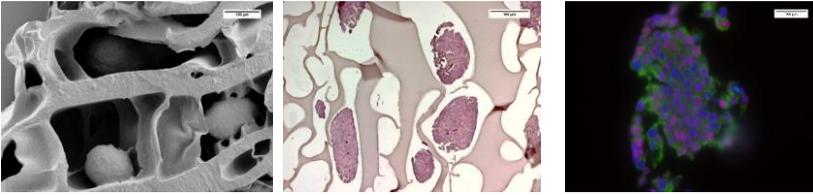
Zur Untersuchung der kultivierten LNCaP-Zellen innerhalb der verschiedenen Cryogelstrukturen (C1 bis C4) wurden unterschiedliche mikroskopische Nachweisverfahren verwendet, deren Ergebnisse von Tag 21 in Abbildung 3-28 zusammengestellt sind. Unter Abbildung 3-28A sind die REM-Aufnahmen der mit Glutaraldehyd fixierten Zellsphäroide zusammengeführt und durch die unter Abbildung 3-28B dargestellten Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbungen von Cryogel-Schnitten ergänzt. Überdies hinaus wurden zusätzlich einzelne Sphäroidstrukturen im Rahmen einer Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung in Abbildung 3-28C aufgeführt.

Durch eine 20minütige Fixierung mit GA wurden die Zellcluster innerhalb der verschiedenen Cryogelstrukturen verhärtet, während die Zellorganellen erhalten blieben. Auf diese Weise sind die Zellstrukturen auch nach der Trocknung bei RT und der Bestäubung mit Silber-Ionen gut erkennbar. Mit Hilfe der REM-Aufnahmen kann das Wachstumsverhalten und die Verteilung der Zellen in Form von Sphäroiden auf der Oberfläche der Cryogele untersucht werden. Die unterschiedlichen Cryogelproben (C1 bis C4) weisen

alle multizellulären Aggregate auf, welche sich deutlich von der Polymerstruktur unterscheiden. Je nach Porengröße und -form werden diese komplett oder nur zum Teil von den Sphäroiden ausgekleidet (Abb. 3-28A, C2 und C3). Bei der Cryogelprobe C3, mit dem höchsten Anteil an Alginat bzw. Gelatine (200 mg/10 ml), scheinen die gebildeten Sphäroide nur über einzelne Anhaftungsstellen entlang der Porenwände zu verfügen (Abb. 3-28A). Ausgehend davon entwickelt sich die Sphäroidstruktur in den Porenraum hinein. Letzteres wird nochmals in Abbildung 3-29A und B am Beispiel der Probe C3 hervorgehoben. In Abbildung 3-29C kann darüber hinaus zwischen den einzelnen Zellen innerhalb des Sphäroids unterschieden werden (Durchmesser $\sim 10 \mu\text{m}$), welche zusätzlich über Kontakte mit anderen Sphäroiden verfügen. Im Vergleich dazu weist die Cryogelprobe C4 auch flächige Zellstrukturen auf (Abb. 3-28A). Aufgrund des dichten Porensystems mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von ca. $10 \mu\text{m}$ (Abb. 3-3, siehe Kapitel 3.1.1), wird das Eindringen der Zellen und damit der Sphäroidbildung erschwert, wodurch ein Teil der ausgesäten Zellen auf der Oberfläche verbleiben.



C3



C4



Abb. 3-28: Mikroskopische Betrachtung der LNCaP-Sphäroidstrukturen nach 21 Tagen Kultivierung (in Cryogelen aus Experiment 1). **A)** REM-Aufnahmen der Cryogele C1 bis C4 mit fixierten LNCaP-Sphäroiden in 150facher (Maßstabsbalken 100 μm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung mit einer 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden. **B)** HE-Färbung fixierter LNCaP-Sphäroide in 10facher (Maßstabsbalken 200 μm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert. **C)** Nachweis und Lokalisation des AR innerhalb einzelner Zellsphäroide mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz in 63facher (Maßstabsbalken 100 μm) Vergrößerung. Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung: des Zellkerns (blau), alpha-Tubulin (grün) und des AR (rot). Die Proben wurden vor Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

Die kompakte Porenstruktur mit den charakteristischen Verzweigungen ist ebenfalls in den HE-Aufnahmen zu erkennen (Abb. 3-28B). Die Einfärbung des Gerüsts kann höchstwahrscheinlich auf die Wirkung des basischen Farbstoffes (Hämatoxylin) zurückgeführt werden, welcher alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau färbt (Verwendung von Glutaraldehyd als Polymerkettenvernetzer).

Mit Hilfe der gängigen Färbemethode „Hämatoxylin/Eosin“, unter Abbildung 3-28B dargestellt, kann eine direkte Unterscheidung zwischen der Polymerstruktur und dem Zellverband ermöglicht sowie eine entsprechende Untersuchung der Sphäroide auf zellulärer Ebene durchgeführt werden. Dazu wurden die Proben zunächst in einer Formalinlösung für 24 h fixiert, in Paraffinblöcke gegossen und die daraus angefertigten Schnitte gefärbt (siehe Kapitel 2.4.3). Auf diese Weise kann die Verteilung der geformten Sphäroide innerhalb der 3D Strukturen untersucht werden. Allerdings beeinflusste die Beschaffenheit der Cryogele die Anfertigung der histologischen Schnitte. Mit zunehmender Porenwandglätte (C1 zu C3, Abb. 3-1, siehe Kapitel 3.1.1) ließen sich die in Paraffin eingegossenen Proben einfacher schneiden.

Sowohl in den REM-Aufnahmen als auch in den HE-Färbungen konnte eine Anpassung der Sphäroidform an die Porengröße beobachtet werden. In Abbildung 3-28B der Cryogelproben C1 und C2 wird außerdem durch die Interkonnektivität der Poren eine Verbindung der Zellcluster untereinander sichtbar. Nach einer Kultivierungsdauer von 21 Tagen zeigen sich innerhalb der verschiedenen Cryogele unterschiedliche Sphäroidgrößen (C1 bis C4, Abb. 3-28B).

Angesichts der verwendeten Prostatakrebszelllinie LNCaP (AR⁺) wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (IF) zur spezifischen Markierung des AR durchgeführt. Ziel der indirekten IF ist der Nachweis von spezifischen Antigenen über fluoreszenzmarkierte Antikörper (siehe Kapitel 2.4.3). Neben der Markierung des AR (rot), wurde eine Co-Färbung des Zellkerns (blau) und der Proteingruppe α -Tubulin (grün), als Hauptbestandteil der Mikrotubuli (Cytoskelett), angesetzt. In Abhängigkeit von der Sphäroidgröße wurde eine veränderte Lokalisation des AR detektiert, welcher normalerweise bei metabolisch aktiven Zellen im Zellkern nachgewiesen wird. Die Cryogelprobe C3 zeigte im Gegensatz zu den übrigen Proben eine vermehrte Lokalisation des AR im Zellkern. In diesem Fall erscheint der Zellkern in einem hellen lila, was durch die Überlagerung des emittierten Lichtes des Zellkerns in blau und des AR in rot hervorgerufen wurde. Dagegen konnte der AR bei den Proben C1 und C2 sowie C4, mit einem geringeren Anteil an Alginate und Gelatine, lediglich an den Außenrändern der Sphäroide nachgewiesen werden

(Abb. 3-28C). Letzteres deutet auf wachstumsaktivere Zellen hin, welche sich vermehrt im äußeren Bereich befinden (siehe Kapitel 1.5).

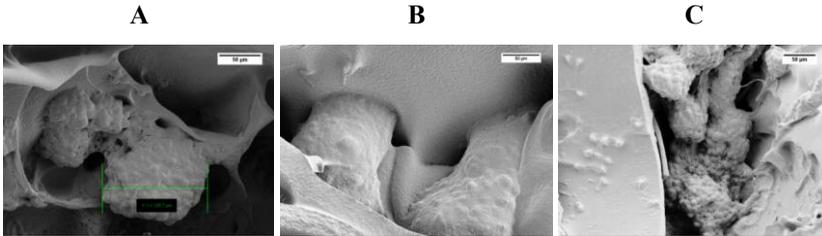


Abb. 3-29: REM-Aufnahmen kultivierter LNCaP-Sphäroiden der Cryogelprobe C3. **A)** Ermittelte Sphäroidgröße (Durchmesser $\sim 130 \mu\text{m}$) nach drei Kultivierungswochen [Bäc2016]. 350facher Vergrößerung (Maßstabsbalken $50 \mu\text{m}$) **B)** Vergrößerung der Zell-Matrix Interaktion in 300facher Vergrößerung (Maßstabsbalken $50 \mu\text{m}$). **C)** Größere Ansammlung an Sphäroiden, welcher untereinander in Verbindung stehen. 250facher Vergrößerung (Maßstabsbalken $50 \mu\text{m}$). Die Proben wurden vor der Messung mit einer 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden.

Der Wachstumsverlauf über einen Zeitraum von 21 Tagen wird zusammen mit der Zellwachstumsrate zu den jeweiligen Kultivierungstagen in Abbildung 3-30A und B dargestellt. Dabei wurde zum einen die Veränderung der Zellzahl bezogen auf die Ausgangszellzahl von $2.5 \cdot 10^5$ ausgewertet und zum anderen die momentane Wachstumsrate ermittelt, d.h. mit welcher Rate nimmt die Zellzahl am Tag 7, 14 oder 21 zum vorherigen Messtag zu (Abb. 3-30A und B). Anhand dieser Werte kann ein direkter Vergleich zwischen dem Wachstumsverhalten der Zellen innerhalb der unterschiedlichen Cryogelproben vorgenommen werden. Nach sieben Kultivierungstagen weisen C2 und C4 eine Verdopplung der ausgesäten Zellzahl auf, während C1 und C3 nur ein geringfügiges Wachstum vorzeigen. Zwischen Tag sieben und Tag 14 steigt die Zellzahl der Proben C2 und C4 nochmals um das Vierfache, wohingegen bei den Cryogelen C1 und C3 eine Zunahme um das Fünf- und Sechsfache gegenüber dem vorhergehenden Untersuchungstag nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-30A). Im Vergleich zu C1, mit der

geringsten Konzentration an Alginat und Gelatine (0.5 % w/v) und C3, mit der höchsten Konzentration an Alginat und Gelatine (2 % w/v), nimmt die Zellzahl der Proben C2 und C4 zwischen Tag 14 und 21 ab. Diese Entwicklung korreliert mit dem Kurvenverlauf der momentanen Wachstumsrate in Abbildung 3-30B. Die Zellwachstumsrate der Cryogele C1 und C3 liegt zwar unter den zuvor gemessenen Werten, dennoch blieb eine Stagnierung des Zellwachstums aus (Abb. 3-30B).

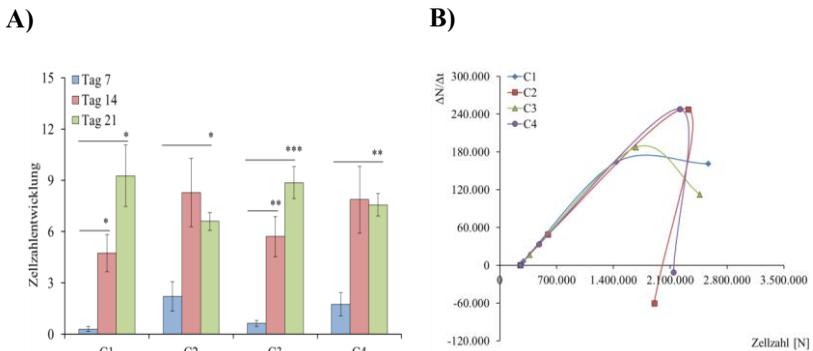


Abb. 3-30: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate im Verlauf von 21 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahlentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000 Zellen. **B)** Momentane Wachstumsrate bezieht sich jeweils auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7, 14 und 21). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Generell konnte zu Beginn der Kultivierung eine langsame Zunahme der Zellzahl beobachtet werden, welche jedoch erste Unterschiede zwischen den Proben aufzeigte (Zellzahlen von $2.9 \cdot 10^5$ bis $5.9 \cdot 10^5$). Zwischen der ersten und zweiten Kultivierungswoche ist ein deutlicher Sprung zu erkennen, welcher auch in der Wachstumskurve erkennbar ist (Abb. 3-30B). Nach einer Kultivierung von drei Wochen erreichten die Cryogelproben C3 und C1 eine Erhöhung um das Neunfache gegenüber der Ausgangszellzahl, allerdings lag die Standardabweichung von C1 mit $2.567.489 \pm 1.097.649$ Zellen

deutlich über der von Probe C3 mit $2.465.119 \pm 572.509$ Zellen (Abb. 3-30A).

Mit Hilfe der Visualisierungssoftware Amira 5.6 wurde unter Zuhilfenahme der eingefärbten Paraffinschnitte die Anzahl der Sphäroide (inklusive Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich) im Cryogeltyp C3 erfasst und deren Verteilung sowie Flächenwert in Abbildung 3-31A und B grafisch dargestellt. Über die Bestimmung der Sphäroidanzahl und -größe kann einerseits die Versorgung der Zellen in den unterschiedlichen Bereichen (oben, Mitte, unten) beurteilt und andererseits der Einfluss des zur Verfügung stehenden Porenraums untersucht werden. Mit zunehmender Sphäroidgröße ist eine Unterversorgung an Sauerstoff (Hypoxie) bei den im Kern befindlichen Zellen möglich, wodurch es zu einer Wachstumsstörung kommt oder fortschreitend Nekrose induziert wird. Durch die spezifische Färbung von Hämatoxylin und Eosin kann eine Bestimmung dieser Sphäroide erleichtert werden und verringert dadurch eine vermeintliche Verwechslung (Abb. 3-31C). Die ermittelten Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich wurden in das Diagramm von Abbildung 3-31A integriert.

Bei Betrachtung der Graphen aus Abbildung 3-31A und B ist deutlich zu erkennen, dass die Gesamtmenge und -fläche an erfassten Sphäroiden vom oberen bis zum unteren Bereich der Probe abnehmen. Dabei ist der Abstand zwischen der oberen und mittleren Schicht geringer als zum unteren Bereich (Abb. 3-31A und B). Dieser sprunghafte Unterschied resultiert aus der Auftragung der Zellsuspension, welche ausschließlich von einer Seite der Probe durchgeführt wird. Beim Vergleich der Maximal- und Minimalwerte der gemessenen Sphäroidflächen in Abbildung 3-31B fällt jedoch auf, dass diese sich nur geringfügig von Ebene zu Ebene unterscheiden und einen Flächenbereich zwischen 35.000 und $4.000 \mu\text{m}^2$ ($\triangleq 0.035$ und 0.004 mm^2) einnehmen. Diese Beobachtung lässt gleichmäßige Wachstumsbedingungen und eine homogene Verteilung der Sphäroide innerhalb der Cryogelprobe C3 vermuten. Des Weiteren wurde nur ein geringfügiger Anteil an Sphäroiden mit hypoxischen Zellbereich nachgewiesen, welche sich lediglich im oberen und mittleren Bereich vorkamen (16 %, d.h. max. 5 bei ~ 30 Proben) (Abb. 3-31A). Aufgrund der geringen Anzahl an hypoxischen Sphäroiden und einer

annähernd gleichmäßigen Größenverteilung kann eine generelle Unterversorgung der Zellen ausgeschlossen werden. Letzteres korreliert zudem mit dem Wachstumsverhalten der Zellen in Abbildung 3-30.

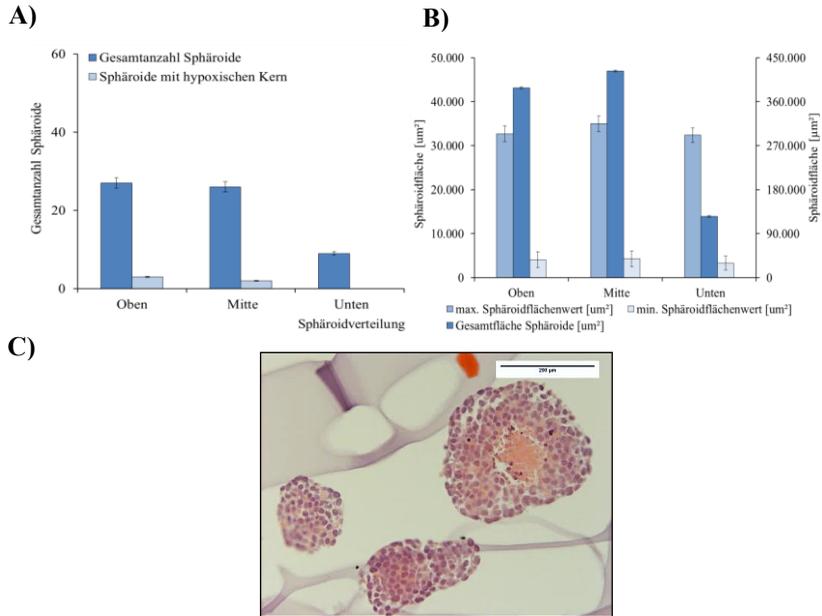


Abb. 3-31: Bestimmung der Sphäroidanzahl und -fläche innerhalb der Cryogelprobe C3 nach 21 Tagen. **A)** Nachweis und Verteilung von Sphäroiden mit hypoxischen Zellbereich über drei Ebenen (oben, Mitte, unten) **B)** Verhältnis zwischen der größten und der kleinsten Sphäroidfläche zur Gesamtfläche. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **C).** Lichtmikroskopische Beispiel-Aufnahmen (HE-Färbung) für Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich 20facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 200 µm).

In herkömmlichen 2D Zellkulturexperimenten wird in Gegenwart des Androgens DHT eine erhöhte Proliferation der Androgen-sensitiven Zelllinie LNCaP (siehe Kapitel 1.6.2) beobachtet. Parallel dazu wird die Produktion des PSA angeregt. Zur Beurteilung des Zellverhaltens bei Anwesenheit von

DHT in einer dreidimensionalen Umgebung, wurde die Hormonstimulation am Beispiel der Cryogelprobe C3 durchgeführt. Zusammen mit der Bestimmung der PSA-Konzentration sind die Ergebnisse in Abbildung 3-32A und B dargestellt.

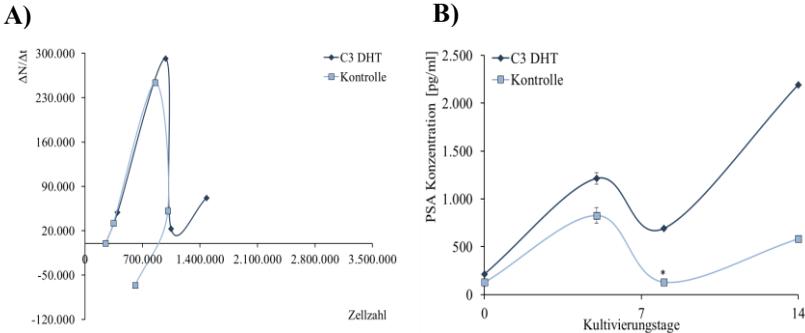


Abb. 3-32: Auswertung des DHT-Experiments und Bestimmung der PSA-Konzentration der Cryogelprobe C3. **A)** Experimentverlauf zur Hormonbehandlung der LNCaP-Kultur nach 14 Tagen. Zunächst erfolgte eine Wachstumsphase über 5 Tage (unter Vollmedium) mit anschließender Hungerperiode von 3 Tagen (unter Hungermedium) und einer Hormonbehandlungsphase über 6 Tage. **B)** Bestimmung der PSA-Konzentration während des Hormonexperimentes. Die Messung der PSA-Konzentration erfolgt mit Hilfe eines ELISA Testverfahren. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Das Hormonexperiment verlief über einen Zeitraum von 14 Tagen, innerhalb dessen drei Zeitabschnitte durchlaufen wurden. Unter gewöhnlichen Kultivierungsbedingungen erfolgte zunächst eine Zellwachstumsphase über fünf Tage, wobei alle zwei Tage das Vollmedium (siehe Kapitel 2.4.1) gewechselt wurde. Während dieses Zeitraumes stieg die Zellzahl um fast das Doppelte (Abb. 3-32A) und die PSA-Produktion wurde aktiviert (Abb. 3-32B). Ab dem sechsten Tag wurde das Vollmedium durch Hungermedium (ohne Phenolrot und FCS, siehe Kapitel 2.4.1) ersetzt und in den folgenden drei Tagen täglich gewechselt. Auf diese Weise wurde das Vollmedium vollständig aus der Gerüststruktur entfernt.

Daraufhin nahm die Wachstumsrate sprunghaft ab, d.h. die Zellzahl veränderte sich nur unwesentlich gegenüber der Zellzahl an Tag fünf (Änderung um den Faktor 0.1). Parallel dazu wirkte sich dieses Verhalten auf eine verringerte PSA-Konzentration aus (Abb. 3-32A und B). Anstelle eines Mediumwechsels wurden die Proben ab dem neunten Tag mit DHT und die entsprechenden Kontrollen mit Ethanol behandelt. Infolge der Hormonzugabe kam es innerhalb der nächsten sechs Tage zu einem erkennbaren Anstieg der Zellzahl und parallel dazu zu einer deutlichen Abnahme (entspricht der Ethanol-Behandlung) (Abb. 3-32A). Letzteres ging näherungsweise auf einen Wert von Tag drei zurück. Bezogen auf die PSA-Menge im Überstand konnte sowohl durch DHT- als auch durch Ethanolzugabe ein Konzentrationsanstieg erfasst werden. Dennoch wurde eine Differenz von 1.500 pg/ml zwischen den DHT-behandelten Proben und der Kontrolle errechnet (Abb. 3-32B), was auf die stimulierende Wirkung des Androgens (DHT) zurückgeführt werden kann.

EXPERIMENT 2

Basierend auf der Materialzusammensetzung der Cryogelprobe C3, wurde die Auswirkung der Hauptreaktionskomponenten (Alginat (A), Gelatine (G), HEMA (H)) auf die charakteristischen Porenmerkmale sowie mechanischen Eigenschaften untersucht. Als Folge dessen wurden vier Cryogele synthetisiert (Tab. 3-7), welche durch das Fehlen der natürlichen und/oder synthetischen Bestandteile gekennzeichnet sind. Anschließend wurde auf die veränderten Cryogelproben (C3-A, C3-G, C3-AG und C3-H) die entsprechende Zellzahl von $2.5 \cdot 10^5$ (Experiment 1) aufgebracht. Die Ergebnisse zum Wachstumsverhalten, zur Sphäroidbildung sowie DHT-Stimulation werden im Folgenden dargestellt.

Tab. 3-7: Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C3_A bis C3_H bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. Die angepassten Konzentrationen basieren auf der Materialzusammensetzung von C3, welche in den Diagrammen als Referenz angegeben wird. Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) und TEMED (0.1 % v/v) blieben in allen Variationen stets konstant. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kapitel 3.1 beschrieben. (-A (Alginat); -G (Gelatine); -H (HEMA))

| Cryogel | Alginat | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|------------------|----------------|-----------------|-----------|-------------|--------------|
| C3 | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 _A | - | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 _G | 200 mg | - | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 _{AG} | - | - | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 _H | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | - | 500 µl |

Die mikroskopischen Aufnahmen der Zellsphäroide in dreidimensionaler Darstellung (REM) und markiert über die HE-Färbung sind in Abbildung 3-33A und B zusammengestellt. Während der Zellkultivierung kann nur sehr mühsam das Wachstum der Zellen in Form von Sphäroiden visualisiert werden. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie kann zunächst der Nachweis eines dreidimensionalen Wachstums erbracht und folglich die Anordnung und Verteilung der Sphäroide im Porensystem beurteilt werden.

In den veränderten Cryogelproben (C3_A, C3_G, C3_{AG} und C3_H) konnte ebenfalls die Bildung von Sphäroidstrukturen nachgewiesen werden und wie bereits in Experiment 1 bestätigt wurde (Abb. 3-28A), nehmen auch diese je nach Porengröße und -form eine unterschiedliche Gestalt an (Abb. 3-33A). Im Vergleich zu der Referenzprobe C3, wirkte sich das Fehlen der einzelnen Reaktionskomponenten (Alginat, Gelatine und HEMA) nicht nachteilig auf die Bildung und Form der Sphäroide aus. Aufgrund einzelner Zell-Matrix-Kontaktpunkte ist auch hier eine direkte Trennung zwischen Polymergerüst und Sphäroid möglich (Abb. 3-33A). Durch die HE-Färbung wurde abermals

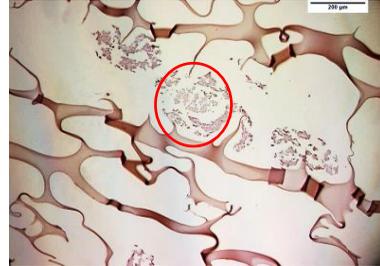
die Gerüststruktur eingefärbt, jedoch ist die Intensität aufgrund der gleichbleibenden GA-Konzentration annähernd identisch (Abb. 3-33B).

C3_{-A}

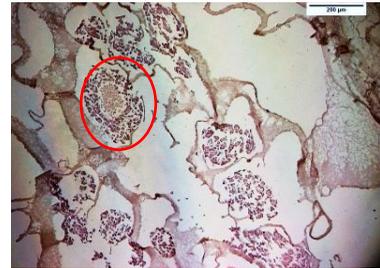
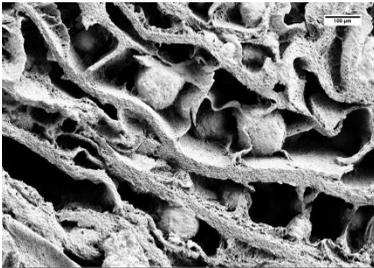
A



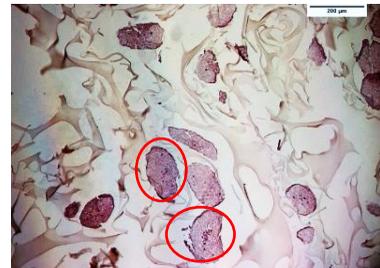
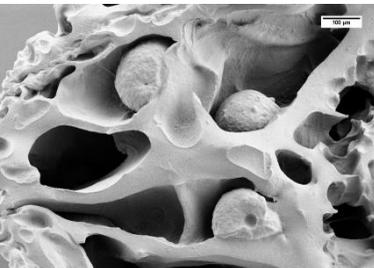
B



C3_{-G}



C3_{-AG}



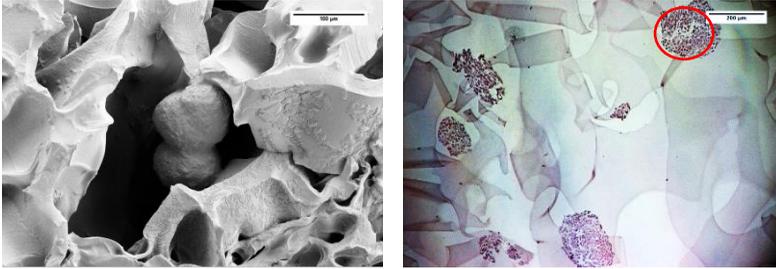
C3_{-H}

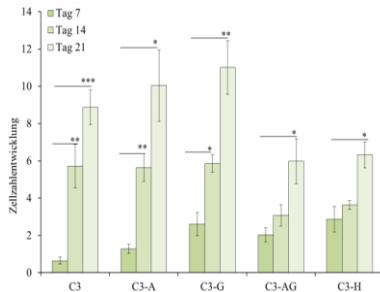
Abb. 3-33: Mikroskopische Betrachtung der LNCaP-Sphäroidstrukturen nach 21 Tagen Kultivierung (in den Cryogelen aus Experiment 2). **A)** REM-Aufnahmen der Cryogele C3_{-A}, C3_{-G}, C3_{-AG} und C3_{-H} mit fixierten LNCaP-Sphäroiden in 150facher (Maßstabsbalken 100 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung mit einer 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden. **B)** HE-Färbung fixierter LNCaP-Sphäroide in 10facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

Wie bereits in den REM-Aufnahmen zur allgemeinen Charakterisierung dargelegt werden konnte, ist eine eindeutige Differenzierung zwischen der Ausgangsprobe C3 und den veränderten Cryogelproben möglich (Abb. 3-28, siehe Kapitel 3.1.1). Letzteres bestätigt sich auch in den lichtmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3-33B. Aus visueller Sicht scheinen die größten Sphäroide in den Cryogelen C3_{-A} (ohne Alginate) und C3_{-G} (ohne Gelatine) zu existieren, während kleinere Strukturen in den Proben ohne Alginate bzw. Gelatine (C3_{-AG}) sowie ohne HEMA (C3_{-H}) vorkommen. Nichtsdestotrotz wurde in allen Cryogelproben Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich erfasst, welche in den HE-Aufnahmen rot gekennzeichnet sind (Abb. 3-33B).

Bezogen auf die Referenzprobe C3 wird das Wachstumsverhalten der Zellen im Laufe von 21 Kultivierungstagen in Abbildung 3-34A und B dargestellt. Im Vergleich zur Cryogelprobe C3, konnte sieben Tage nach Zellaussaat eine höhere Zellzahl innerhalb der Proben C3_{-A} (Doppelte) und C3_{-H} (Dreifache)

erfasst werden. Letzteres ist auch im Kurvenverlauf der Wachstumsrate beider Cryogele zu erkennen (Abb. 3-34A und B). Nach weiteren sieben Tagen nimmt die Zellzahl der Cryogelproben C3_{-A} und C3_{-G}, inklusive der Referenzprobe (C3), signifikant auf das Sechsfache gegenüber der Ausgangszellzahl (250.000 Zellen) zu. Dagegen zeigen die Proben ohne Alginate und Gelatine (C3_{-AG}) sowie ohne HEMA (C3_{-H}) nur eine geringfügige metabolische Aktivität der Zellen, was sich auch in einer abfallenden Wachstumsrate in Abbildung 3-34B zeigt. Im Gegensatz zur Probe C3, konnten die Cryogele ohne Alginate (C3_{-A}) und ohne Gelatine (C3_{-G}) die erreichte Zellzahl von Tag 14 nochmals verdoppeln und eine erhöhte Wachstumsrate aufweisen (Abb. 3-34A und B).

A)



B)

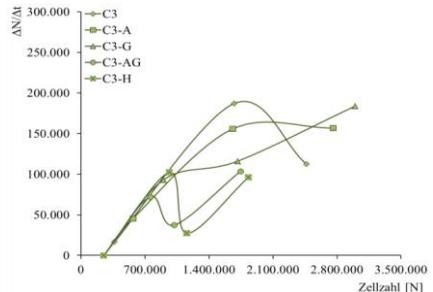


Abb. 3-34: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate im Verlauf von 21 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahlentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000 Zellen. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7, 14 und 21). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dabei verzeichnete die Cryogelprobe C3_{-G} den höchsten Messwert (siehe Zellzahl, Abb. 3-34A) sowie die am deutlichsten ansteigende Kurve. Im Vergleich dazu erreichen die Cryogele C3_{-AG} und C3_{-H} nur eine Zellzahl von rund $1.8 \cdot 10^6$ (Tag 21), welche lediglich den erfassten Werten von C3_{-A} ($1.6 \cdot 10^6$ Zellen) und C3_{-G} ($1.6 \cdot 10^6$ Zellen) an Tag 14 entspricht

(Abb. 3-34A und B). Trotz der Abwesenheit von Gelatine, welche aufgrund ihrer speziellen Aminosäuresequenz (RGD, Arg-Gly-Asp) einen positiven Effekt auf die Zellanheftung ausüben sollte, wurde keine störende Wirkung auf das Zellwachstumsverhalten erfasst. Zwar wurde durch das Fehlen von Gelatine und Alginat (C3_{-AG}) eine geringere Zellzahl gegenüber der Referenzprobe erreicht, allerdings muss diese Abweichung nicht allein auf das Fehlen von Gelatine zurückgeführt werden (Abb. 3-34A).

Das Wachstumsverhalten der LNCaP-Zellen während der Hormonbehandlung in den neu synthetisierten Cryogelvarianten wird in Abbildung 3-35 dargestellt. Die wachstumsstimulierende Wirkung von DHT konnte bereits erfolgreich an der Referenzprobe C3 geprüft werden (Abb. 3-32A).

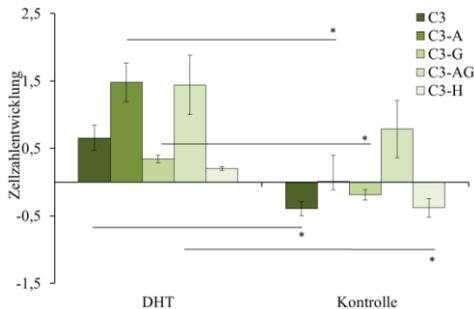


Abb. 3-35: Nachweis der DHT Sensitivität während der LNCaP-Kultivierung von 14 Tagen. Nach einer Wachstumsphase von 5 Tage (Vollmedium) und einer anschließenden Hungerperiode von 3 Tagen (Hungermedium), erfolgte ab dem 8. Tag die Hormonbehandlung (Zugabe von DHT ohne Mediumwechsel). Die parallele Behandlung mit Ethanol diente als Kontrolle. Die erfasste Zellzahl an Tag 14 stand im Verhältnis zur erreichten Zellzahl nach der Hungerperiode (Tag 8). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dagegen zeigten die neusynthetisierten Cryogelproben (C3_{-A}, C3_{-G}, C3_{-AG} und C3_{-H}) im Rahmen des Hormonexperimentes unterschiedliche Reaktionen auf die DHT- und Ethanol-Behandlung. Im Gegensatz zur Referenzprobe C3,

erhöhte sich die Zellzahl der Proben C3_{-A} (ohne Alginat) und C3_{-AG} (ohne Alginat & Gelatine) um fast das Doppelte, währenddessen sich die Ethanol-Behandlung hemmend auf das entsprechende Wachstumsverhalten auswirkte. Im Vergleich dazu weisen die Cryogele ohne Gelatine (C3_{-G}) und HEMA (C3_{-H}) nur geringfügige Veränderungen nach DHT-Zugabe auf (Abb. 3-35). Jedoch führte die Ethanol-Behandlung, wie auch bei Referenzprobe C3 (Abb. 3-28A), zu einer Verringerung der Zellzahl (unterhalb der Ausgangszellzahl) und somit zu einem rückläufigen Wachstumsverhalten. Generell konnte bei allen veränderten Cryogelzusammensetzungen (C3_{-A}, C3_{-G}, C3_{-AG} und C3_{-H}), einschließlich der Referenzprobe C3, ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten nach DHT- und Ethanol-Behandlung aufgezeigt werden.

Die Bestimmung der Sphäroidanzahl und deren Verteilung über drei Ebenen wurden mit Hilfe der zuvor eingefärbten Paraffin-Schnitte (HE-Färbung) durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 3-36 dargestellt sind. Im Vergleich zur Referenzprobe C3, wurden in den Cryogelen C3_{-G} (ohne Gelatine), C3_{-AG} (ohne Alginat & Gelatine) sowie C3_{-H} (ohne HEMA) mehr Sphäroide aufgezeichnet, deren Verteilung sich jedoch ausschließlich auf den oberen und mittleren Bereich erstreckt. Dabei nimmt die Anzahl an Sphäroiden nur unwesentlich von der oberen zum mittleren Ebene ab (Abb. 3-36). Die geringste Gesamtmenge an Sphäroiden wurden bei der Cryogelprobe C3_{-A} erfasst, welche sich allerdings gleichmäßig über alle drei Ebenen verteilt (Abb. 3-36).

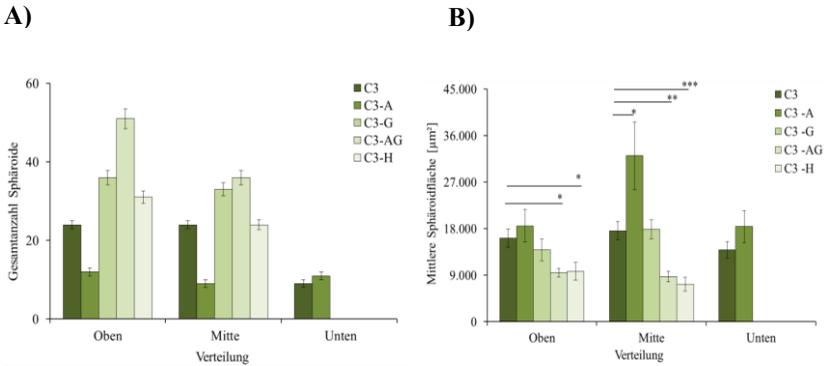
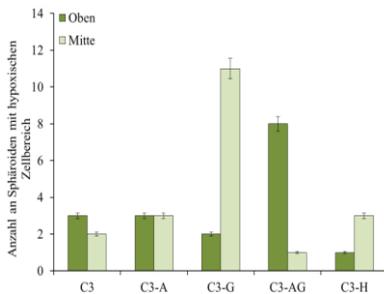


Abb. 3-36: Bestimmung der Sphäroidanzahl und mittleren Sphäroidfläche nach 21 Tagen Kultivierung. **A)** Verteilung der erfassten Sphäroide über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). LNCaP-Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich wurden aus dieser Berechnung ausgeschlossen. **B)** Mittlere Sphäroidfläche der einzelnen Cryogele C3_A, C3_G, C3_{AG}, C3_H und der Referenzprobe C3. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Mit der Probe ohne Alginat bzw. Gelatine (C3_{AG}) konnte die höchste Anzahl an Sphäroiden bestimmt werden, welche sich um das Doppelte von der Referenzprobe (C3) unterscheidet (Abb. 3-36). Die gleichmäßige Verteilung der Sphäroide über alle Ebenen ist ein Maß für die Poreninterkonnektivität und das Schwellvermögen der einzelnen Proben. Die Cryogelprobe C3_A wies gegenüber der Referenzprobe C3 ein sehr homogenes vernetztes Porensystem (Abb. 3-8, siehe Kapitel 3.1.1) sowie ein deutlich verbessertes Schwellverhalten (Abb. 3-10, siehe Kapitel 3.1.1) auf. Demnach wäre eine schnelle Aufnahme der Zellsuspension in die gesamte Probe gewährleistet, was zugleich die einheitliche Verteilung der Zellen garantiert. Im Vergleich dazu wurde auch über die Tomographiescans der Probe C3_H (ohne HEMA) ein homogenes Porennetzwerk nachgewiesen (Abb. 3-8, siehe Kapitel 3.1.1), welches allerdings über ein geringeres Hohlraumvolumen sowie Schwellverhalten verfügte (Abb. 3-9/3-10, siehe Kapitel 3.1.1) und auf diese Weise eine gleichmäßige Zellverteilung behindern würde.

Die Verteilung der Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich wird in den Abbildungen 3-37A und B dargestellt und resultiert aus den Ergebnissen von Abbildung 3-36. Verglichen zur Referenzprobe C3 wurde eine geringe Anzahl an Sphäroiden mit Anzeichen einer Hypoxie erfasst (durchschnittliche Anzahl an hypoxischen Sphäroiden bezogen auf die Gesamtzahl: 3.7).

A)



B)

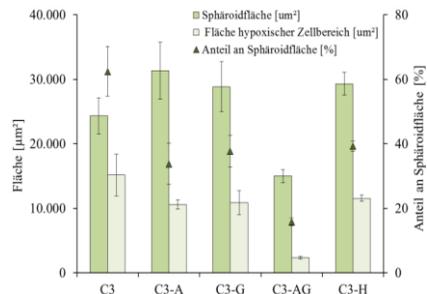


Abb. 3-37: Nachweis von Sphäroiden mit hypoxischer Kernstruktur nach 21 Tagen Kultivierung. **A)** Bestimmung der Anzahl an Sphäroiden mit hypoxischen Zellbereich über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). **B)** Verhältnis zwischen der Sphäroidfläche und dem dazugehörigen hypoxischen Bereich. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im Fall der Cryogelproben C3_G (ohne Gelatine) und C3_{AG} (ohne Alginat & Gelatine), welche die höchste Sphäroidanzahl mit hypoxischen Zellbereich besitzen, liegt der Anteil an der Gesamtzahl dennoch unter 20 % (Abb. 3-36; Abb. 3-37A). Mit Ausnahme von C3_G und C3_H (ohne HEMA), verteilt sich die Mehrzahl der hypoxischen Sphäroide auf den oberen Bereich, wobei C3_{AG} mit einem Anteil von acht den größten Messwert vorweist. In tieferen Bereichen wurden bei keiner Probe Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich beobachtet (Abb. 3-37A).

Der Flächenanteil des hypoxischen Zellbereiches an der Gesamtsphäroidfläche der jeweiligen Cryogele wird in Abbildung 3-37B detaillierter dargestellt. Im Vergleich zur Referenzprobe C3, liegt der durchschnittliche prozentuale Anteil an der Sphäroidfläche unter 50 %, was ungefähr einem Drittel entspricht (Abb. 3-37B). Dabei bildet die Cryogelprobe ohne Alginat bzw. Gelatine (C3-_{AG}) mit einem Anteil von ca. 20 % (hypoxischer Bereich) bei einer geringeren Sphäroidfläche die Ausnahme. Generell wurden innerhalb dieser Probe vermehrt kleinere Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich erfasst. Dagegen weist die Referenzprobe C3 Sphäroide mit annähernd 60 %igen Anteil des hypoxischen Zellbereiches auf, welche jedoch bei einem Verhältnis von 5:56 (Sphäroide ohne Hypoxie) vernachlässigbar erscheinen (Abb. 3-37A und B).

3.2.2 Einfluss von Syntheseparametern auf das Verhalten von Prostatakrebszellen

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.2, in welchem die Wirkung der Reaktionszeit und der Temperatur sowie der Einfluss der Quervernetzung der Polymerketten untersucht wurde, werden nun die verschiedenen Cryogele zur Kultivierung der epithelialen Prostatakrebszelllinie LNCaP verwendet. Ziel des Experiments 3 war die Untersuchung unterschiedlicher Synthesetemperaturen und deren Einfluss auf die strukturelle Beschaffenheit der polymeren Gele. Auf diese Weise konnte eine eindeutige Unterscheidung zwischen den Hydrogelen, welche bei RT bzw. +4 °C hergestellt wurden und den Cryogelen, synthetisiert bei -21 °C (entspricht C3, Experiment 1) bzw. -80 °C, belegt werden (siehe Kapitel 3.1.2). Weitere Untersuchungen der Hydrogelstrukturen waren im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

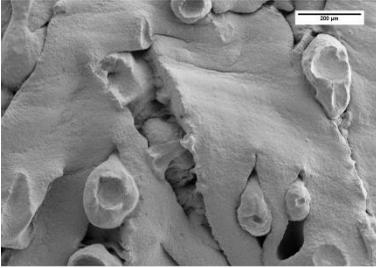
Im Folgenden werden nun die Ergebnisse zu den Zellkulturexperimenten und den daran anschließenden Untersuchungen zur Sphäroidformation und -verteilung aufgeführt. Dabei wurde die Wirkung der veränderten Cryogelstrukturen, aufgrund abweichender Gefriertemperatur und Gefrierzeit (Experiment 4) sowie umgewandelter Polymerkettenverzweigungen (Experiment 5), auf die kultivierten Zellen analysiert.

EXPERIMENT 4

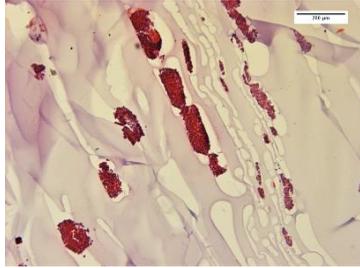
In diesem Experiment wurde zunächst der Einfluss unterschiedlicher Gefrier-temperaturen und Reaktionszeiten auf die charakteristische Porenstruktur überprüft. Dazu wurde die Syntheszeit von 24 h auf 1 und 5 h verringert und anschließend deren Wirkung bei einer Synthesetemperatur von -21 und -80 °C untersucht. Die Cryogel Variante C3 (-21 °C) diente erneut als Ausgangsstruktur bzw. Referenz. Vergleichbar zu den Ergebnissen aus den durchgeführten Experimenten in Kapitel 3.2.1, liegt auch hier der Schwerpunkt auf dem Wachstumsverhalten der Zellen sowie der Entwicklung und Verteilung von Sphäroiden innerhalb der Gerüste.

In den Abbildungen 3-38A und B sind die mikroskopischen Aufnahmen zusammengestellt, welche unter Anwendung der Rasterelektronen- und Lichtmikroskopie entstanden sind. Korrelierend mit den REM-Aufnahmen aus Abbildung 3-18 in Kapitel 3.1.2, erscheinen die Cryogele auch nach dreiwöchiger Zellkultivierung in ihrem charakteristischen Aufbau. Verglichen zu den Mikroskopaufnahmen des vorherigen Ergebnisabschnittes, wirken sich die strukturellen Cryogeleigenschaften deutlich auf die Form und Verteilung der Zellsphäroide aus (Abb. 3-38A und B). Im Gegensatz zu den Proben mit einer Gefriertemperatur von -21 °C, scheinen die Sphäroide der Cryogele 1h -80°C und 5h -80°C primär auf der Außenfläche lokalisiert zu sein und bilden aus diesem Grund vermehrt flächige Strukturen aus. Sphäroide die im Inneren des Porensystems gebildet wurden, werden während der Trocknung durch das Zusammenschieben der Porenwände verdeckt (Abb. 3-38A). Mittels HE-Färbung der Paraffinschnitte (7 μm) können jedoch deutliche Unterschiede zwischen den fadenförmigen Sphäroiden der Proben bei -80 °C und der Cryogele 1h -21°C und 5h -21°C aufgezeigt werden (Abb. 3-38B). Letztere weisen sowohl in den REM-Aufnahmen als auch in den histologischen Farbergebnissen runde und dichtere Sphäroidstrukturen auf. Dabei steigt mit zunehmender Gefrierzeit bei -21 °C nicht nur die Offenporigkeit der Cryogele (vgl. Abb. 3-18, siehe Kapitel 3.1.2), sondern auch der zur Verfügung stehende Porenbereich zur Sphäroidwachstum und -versorgung (Abb. 3-38A und B).

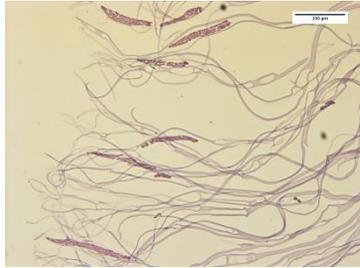
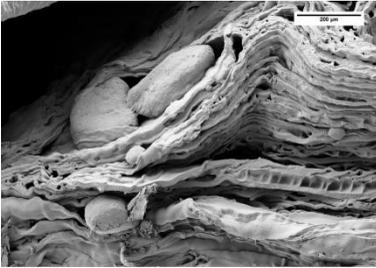
1h -21°C **A**



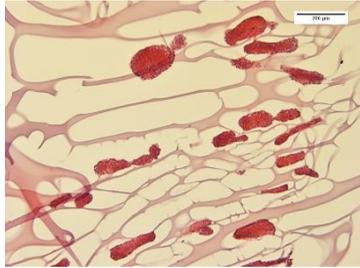
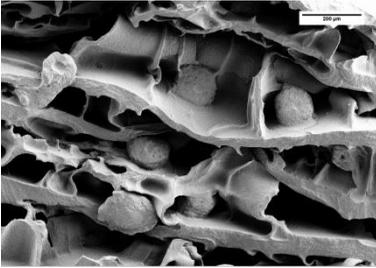
B



1h -80°C



5h -21°C



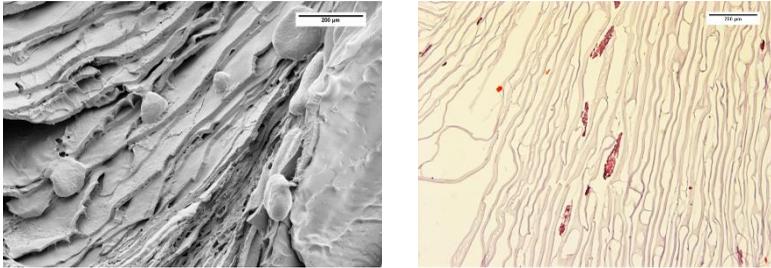
5h -80°C

Abb. 3-38: Mikroskopische Betrachtung der Sphäroidstrukturen nach 21 Tagen Kultivierung (in den Cryogelen aus Experiment 4). **A)** REM-Aufnahmen der Cryogele bei einer Synthese von 1 und 5 h bei jeweils -21 und -80 °C mit fixierten LNCaP-Sphäroiden in 100facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung mit einer 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden [Bäc2016]. **B)** HE-Färbung fixierter LNCaP-Sphäroiden in 10facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

Dennoch zeigen die REM-Aufnahmen der Proben mit einer Gefrierzeit von 1 h (-21 °C) Sphäroide, welche während des Trocknungsvorgangs aus den Poren herausgedrückt wurden. Weiterhin weisen die oberflächlichen Vertiefungen einzelner Sphäroide auf hypoxische Zellbereiche hin, welche auf einen möglichen Platzmangel und Sauerstoffunterversorgung zurückgeführt werden können (Abb. 3-38A). Grundsätzlich konnte mit Hilfe der REM- und HE-Aufnahmen bildhaft demonstriert werden wie die Form und Ausrichtung der Poren inklusive Porenwände die Struktur der Sphäroide beeinflusst (Abb. 3-38A und B).

Das Wachstumsverhalten der Zellen innerhalb der Cryogele mit unterschiedlichen Gefrierzeiten (1 und 5 h) sowie Gefriertemperaturen (-21 und -80 °C) wird durch die Abbildungen 3-39A und B repräsentiert. Innerhalb der ersten Kultivierungstage zeigt sich mit zunehmender Gefrierzeit und -temperatur eine ansteigende Zellzahl um das Vierfache ihrer Ausgangszellzahl (Abb. 3-39A). Letzteres liegt, zusammen mit der Referenzprobe

C3 (24 h, -21 °C) über den bisher erfassten Werten (Abb. 3-30A und 3-34 A, siehe Kapitel 3.2.1). Nach einer weiteren Woche erhöhte sich die Zellzahl bei allen Proben, wobei die Cryogele 1h_{-21°C} und 1h_{-80°C} eine stabilere Wachstumsrate aufweisen konnten (Abb. 3-39B). Generell zeigte sich bei einer Gefriertemperatur von -80 °C eine höhere Zellzahl nach 14tägiger Kultivierungszeit, welche jedoch mit den in Abbildung 3-38A dargestellten flächigen Zellanhäufungen auf den Porenwänden korrelieren könnte.

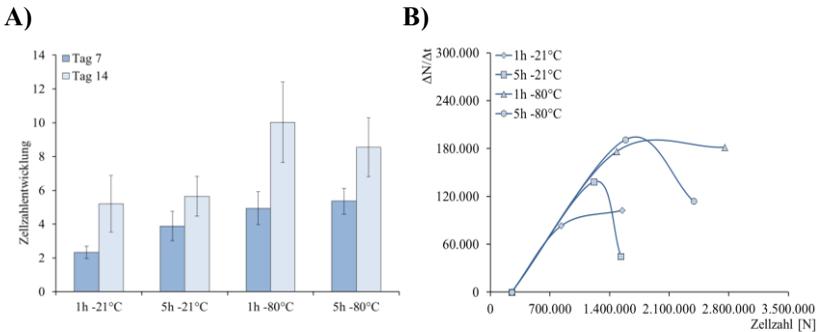


Abb. 3-39: Auswertung der Zellzahleentwicklung und momentanen Wachstumsrate im Verlauf von 14 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahleentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7 und 14). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den unpaired T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Ergebnisse in Abbildung 3-40A und B stellen den quantitativen Nachweis des AR im Rahmen des Proteinnachweises mittels Western Blot-Verfahren dar. Letzteres repräsentiert eine ergänzende Methode zur qualitativen Detektion mittels Immunfluoreszenz (Abb. 3-28C, siehe Kapitel 3.2.1). Zunächst wurde das Proteingemisch aus dem Zelllysat entsprechend der Proteingröße in einzelne Proteinbanden aufgetrennt (SDS-Page), anschließend auf eine Träger-Membran transferiert und schließlich für die Immundetektion vorbereitet. Die Protein-Identifizierung wurde über eine Lumineszenz-Reaktion beendet und durch einen Molekulargewichtsmarker konnte eine definierte Zuordnung erfolgen (siehe Kapitel 2.4.2).

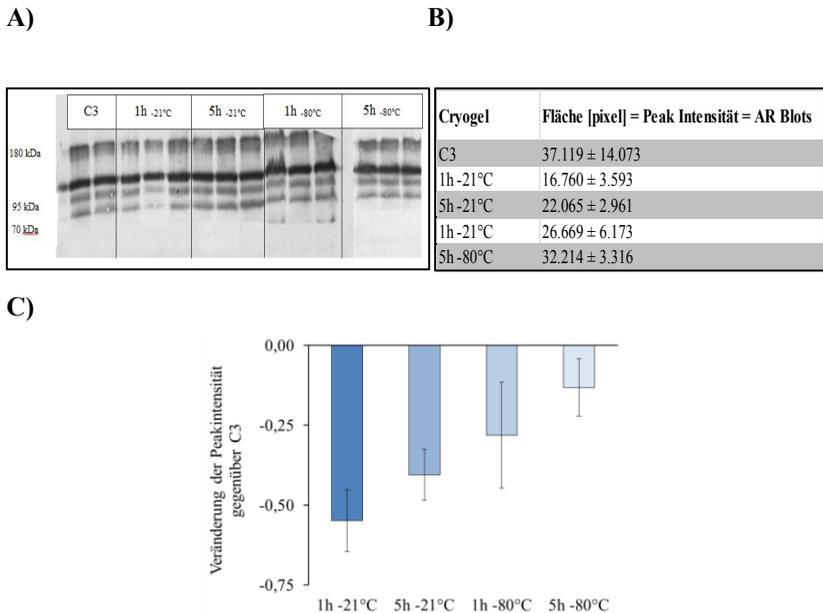


Abb. 3-40: Auswertung der Western Blot-Analyse zum Nachweis des AR nach 14 Kultivierungstagen. **A)** Proteinbanden des AR im Bereich von 117 kDa resultierend aus Zelllysaten der Cryogele 1h_{-21°C}, 5h_{-21°C}, 1h_{-80°C} und 5h_{-80°C}. **B)** Auswertung der Blot-Intensität mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. **C)** Veränderung der Peak-Intensität gegenüber der Referenzprobe C3. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je zwei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ erfolgte die graphische Auswertung der Blot-Intensität aus Abbildung 3-40A. Nach Markierung der Blots wurde anschließend ein Dichteverteilungs-Diagramm erstellt, dessen einzelnen Flächeninhalte (gemessen in Pixel) die Peak-Intensität und schlussfolgernd die Blot-Intensität widerspiegeln. In Abbildung 3-40B wird der Mittelwert der einzelnen Cryogele 1h_{-21°C} und 5h_{-21°C} sowie 1h_{-80°C} und 5h_{-80°C} tabellarisch aufgeführt und nochmals graphisch als Veränderung gegenüber der Referenzprobe C3 in Abbildung 3-40C dargestellt.

Die Western Blot-Analyse zeigt, dass mit zunehmender Gefrierzeit und abnehmender Gefriertemperatur die Peak-Intensität (entspricht Blot-Intensität) gegenüber der Cryogelprobe C3 zunimmt. Dabei wurde mit mehr als 50 % der messbar größte Unterschied zwischen der Referenzprobe C3 und der Probe 1h_{-21°C} ermittelt. Je höher die Blot-Intensität, desto stärker ausgeprägt erscheint die Bande nach der Immunodetektion, d.h. das gesuchte Protein konnte in einer höheren Konzentration nachgewiesen werden. Die zunehmende Konzentration des AR im Zelllysate der Cryogele weist auf eine gesteigerte Wachstumsbereitschaft der Zellen hin. Letztgenanntes korreliert mit dem Diagramm zur Zellzahlentwicklung der Cryogele mit 1 und 5 h Gefrierzeit bei -21 bzw. -80 °C Gefriertemperatur in Abbildung 3-39A. Auch hier konnte eine wachsende Zellzahl mit zunehmender Gefrierzeit und abnehmender Gefriertemperatur festgestellt werden. Dabei weist die Cryogelprobe 5h_{-80°C} ein vergleichbares Wachstumsverhalten zur Referenzprobe C3 auf (Abb. 3-30A, siehe Kapitel 3.2.1), welches aus der Auswertung des Western Blots abzuleiten ist (Abb. 3-40B und C).

Mit Hilfe der eingefärbten Paraffin-Schnitte und der Visualisierungssoftware Amira 5.6 konnte wie zuvor die Anzahl und Verteilung der Sphäroide inklusive der ermittelten Fläche über drei Ebene (oben, Mitte, unten) untersucht werden. Die Ergebnisse hierzu werden in der Abbildung 3-41A und B graphisch zusammengefasst. Auffallend ist zunächst der Unterschied zwischen der Sphäroidanzahl der Cryogelproben bei -21 °C und den Proben bei -80 °C. Letztere weisen unabhängig von der Gefrierzeit eine deutliche höhere Gesamtzahl an Sphäroiden auf, welche vom oberen zum unteren Bereich jeweils um die Hälfte abnimmt (Abb. 3-41A). Dagegen verteilen sich die Sphäroide der Probe 1h_{-21°C} annähernd gleichmäßig über alle drei Ebenen. Die Cryogelvariante bei 5h_{-21°C} weist als einzige mehr Sphäroide im mittleren Bereich auf, während in der unteren Ebene keine detektiert wurden (Abb. 3-41A). Diese Tatsache korreliert mit dem in Abbildung 3-19 (siehe Kapitel 3.1.2) berechneten Porendurchmesser, welcher sich durchschnittlich auf einen Wert von 80 µm einstellte. Bei Betrachtung der gemessenen Sphäroidflächen aus Abbildung 3-41B zeigen sich gegenüber den vorherigen Ergebnissen vermehrt kleinere Flächenwerte auf, welche in einem Bereich zwischen 5.000 und maximal 15.000 µm² liegen. Tendenziell weicht der Durchschnittsflä-

chenwert sowohl unter den jeweiligen Cryogelproben als auch zwischen den einzelnen Ebenen nur unwesentlich voneinander ab. Eine Ausnahme bildet dabei die Probe bei 1 h Gefrierzeit und $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$, deren Mittelwert im oberen Bereich sich signifikant unterscheidet ($> 15.000\text{ }\mu\text{m}^2$, Abb. 3-41B). Hervorzuheben sind ebenfalls die Proben bei einer Gefriertemperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1\text{h}_{-80^{\circ}\text{C}}/5\text{h}_{-80^{\circ}\text{C}}$), welche aufgrund struktureller Ähnlichkeiten auch annähernd identische Sphäroidformen erreichen ($\sim 7.000\text{ }\mu\text{m}^2$). Letzteres konnte auch durch die HE-Aufnahmen in Abbildung 3-38B dargestellt werden.

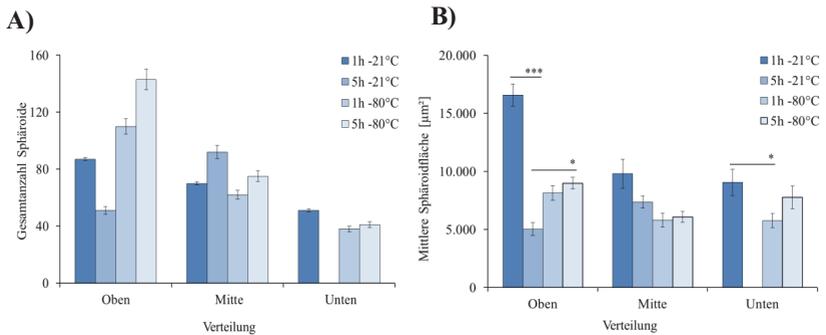


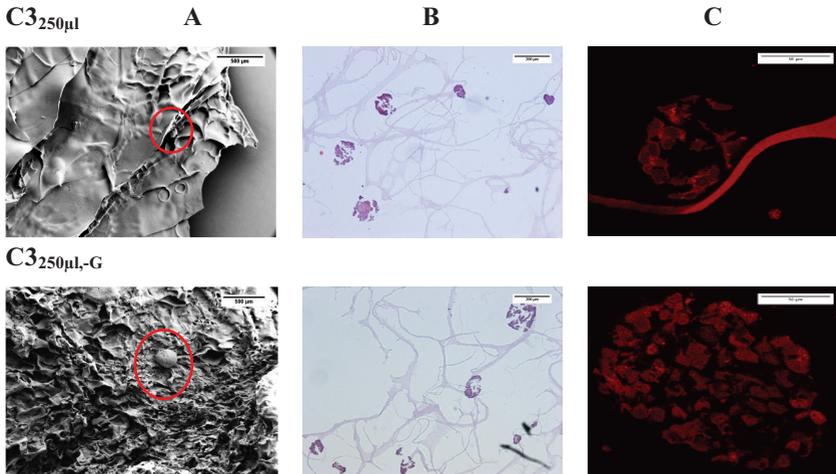
Abb. 3-41: Bestimmung der Sphäroidanzahl und mittleren Sphäroidfläche nach 14 Tagen Kultivierung. **A)** Verteilung der erfassten Sphäroide über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). **B)** Mittlere Sphäroidfläche der einzelnen Cryogelen $1\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$, $5\text{h}_{-21^{\circ}\text{C}}$, $1\text{h}_{-80^{\circ}\text{C}}$ und $5\text{h}_{-80^{\circ}\text{C}}$ verteilt über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

EXPERIMENT 5

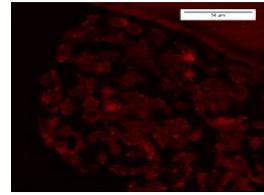
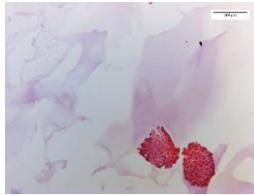
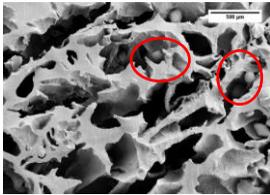
In diesem Experiment wurde der Fokus auf die Quervernetzung der Polymerketten während der Polymerisation gelegt. Dabei wurde die Ausgangskonzentration von PEGda, eingesetzt als Cross-Linker, von 5 % v/v ($500\text{ }\mu\text{l}/10\text{ ml}$) auf 10 % v/v verdoppelt sowie auf 2.5 % v/v ($250\text{ }\mu\text{l}/10\text{ ml}$) gesenkt um auf diese Weise eine Umwandlung der strukturellen Eigenschaften hervorzurufen. Zum einen soll die Wirkung der veränderten Vernetzungseigenschaften und zum anderen das Fehlen des zelladhäsiven Markers (RGD)

durch die natürliche Komponente Gelatine untersucht werden. Letzteres löste keine relevanten Änderungen bezüglich der mechanischen Merkmale aus (siehe Kapitel 3.1.2). Ausgehend von den gleichen Cryogelproben $C3_{250\mu\text{l}}/C3_{250\mu\text{l},-G}$ und $C3_{1\text{ml}}/C3_{1\text{ml},-G}$ sowie der Referenzstruktur C3, werden in diesem Abschnitt die Zellkulturexperimente inklusive des Zellwachstumsverhaltens, der Sphäroidbildung, -struktur und -verteilung in den jeweiligen Cryogelen ausgewertet.

Die 3D Porenstruktur nach dreiwöchiger Zellkultivierung wurde mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops und eines gängigen histologischen Färbenaachweis untersucht und in Abbildung 3-42A und B zusammengefasst. Ergänzt werden die Aufnahmen durch Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz (IF), bei welcher der Fokus auf die Markierung des AR gelegt wurde (Abb. 3-42C). Wie schon bereits in den REM-Aufnahmen der Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abb. 3-18, siehe Kapitel 3.1.2), konnte auch bei den Cryogelen mit verringerter PEGda-Konzentration (von 500 auf $250\text{ }\mu\text{l}$) eine Instabilität der Gerüste erkannt werden (Abb. 3-24; siehe Kapitel 3.1.2).



C3_{1ml}



C3_{1ml,-G}

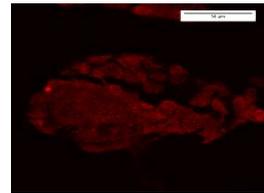
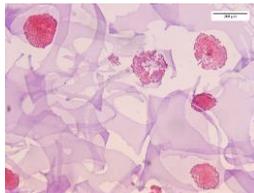
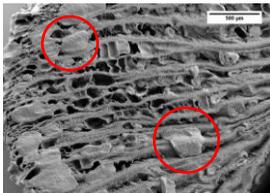


Abb. 3-42: Mikroskopische Betrachtung der Sphäroidstrukturen nach 21 Tagen Kultivierung (in den Cryogelen aus Experiment 5). **A)** REM-Aufnahmen mit fixierten LNCaP-Sphäroiden der Cryogele mit veränderter PEGda Konzentration (24 h/-21 °C) in 35facher (Maßstabsbalken 500 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung mit einer 2.5%igen Glutaraldehydlösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden. **B)** HE-Färbung fixierter LNCaP-Sphäroiden in 10facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert. **C)** Nachweis und Lokalisation des AR einzelner Zellsphäroide mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz in 63facher (Maßstabsbalken 100 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

Die Zellsphäroide verteilen sich vermehrt auf den Porenwänden der Außen-seiten (rot markiert) und weisen eine flächige Struktur auf (Abb. 3-42A, C3_{250µl}/ C3_{250µl,-G}). Infolge des Trocknungsvorganges wurden zudem einzelne Zellaggregate eingeschlossen, was die anschließende Detektion erschwerte. Der feine Aufbau des Porennetzes mit verringerter PEGda-Konzentration (250 µl) wird durch die gefärbten Paraffin-Schnitte (HE-Färbung) sichtbar und zeigt auch vereinzelt Sphäroide (Abb. 3-42B). Im Gegensatz dazu ist die Cryogelstruktur der Proben mit doppelter Konzentration (500 µl auf

10 ml) fester und stabiler, was eine Beurteilung der Sphäroidformen und -verteilung erleichtert (Abb. 3-42A).

Auch die lichtmikroskopischen Aufnahmen weisen kompaktere Sphäroide eingebettet in eine dichtere Porenstruktur mit dickeren Porenwänden auf (Abb. 3-42B). Zum Teil treten flächige Zellschichten auf ($C3_{1ml,-G}$), welche jedoch vorrangig an den Probenrändern auftauchen (Abb. 3-42A, rot markiert). Basierend auf den Ergebnissen in Abbildung 3-42A und B, wirkt sich das Fehlen von Gelatine ($C3_{250\mu l,-G}$ / $C3_{1ml,-G}$) nicht ausschlaggebend auf die Sphäroidbildung und -verteilung aus. Dagegen wurde bei der Immunfluoreszenzmarkierung des AR (rot) Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Gelatine erkannt. Im Gegensatz zu den Cryogelen $C3_{250\mu l}$ und $C3_{1ml}$ ohne Gelatine, wurde der AR in den Zellen der Proben mit Gelatine vermehrt im Zellkern erfasst, was auf metabolisch aktivere Zellen hinweist.

Das Wachstumsverhalten der Prostatakrebszelllinie LNCaP innerhalb der Cryogele mit veränderter PEGda-Konzentration wird in Abbildung 3-43A und B dargestellt und zusätzlich mit den Cryogelen gleicher Zusammensetzung ohne Gelatine verglichen. Gegenüber der Zellzahlentwicklung der Referenzprobe C3 mit einer PEGda-Konzentration von 5 % v/v wurde bei allen Proben ein deutlich schwächeres Wachstum festgestellt (Abb. 3-43A). Dabei konnte nach einer Kultivierungswoche die Zellzahl annähernd verdoppelt werden, jedoch zeichnet sich bereits nach weiteren sieben Tagen eine rückläufige Wachstumsrate ab (Abb. 3-43B).

Grundsätzlich liegen nach 14 Tagen die Zellzahlen der Proben in einem Bereich zwischen $6 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen, wobei sich ein minimaler Unterschied zwischen den Cryogelen mit und ohne Gelatine eingestellt hat (Abb. 3-43A). Nach zweiwöchiger Kultivierung wurde zwischen den $C3_{250\mu l}$ und $C3_{250\mu l,-G}$ sowie $C3_{1ml}$ und $C3_{1ml,-G}$ eine Differenz von 0.3 berechnet (Änderung gegenüber der Ausgangszellzahl 250.000 am Tag 0).

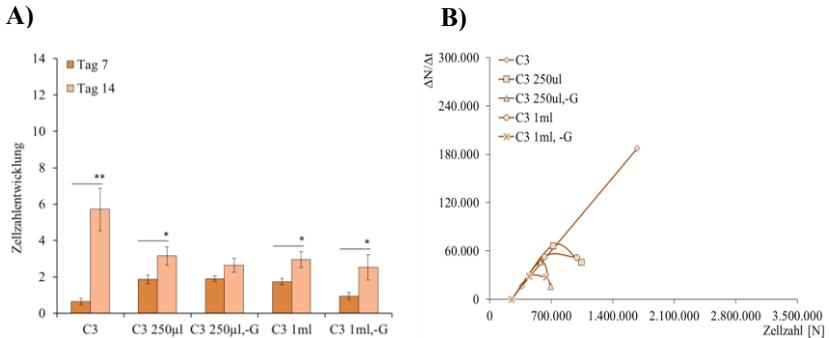


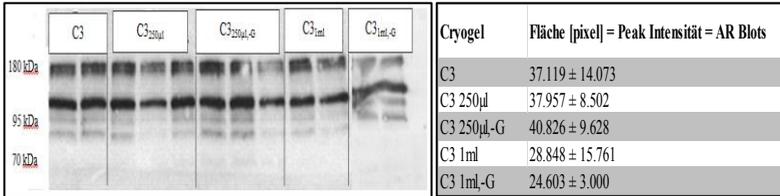
Abb. 3-43: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate nach 14 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahlentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7 und 14). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die Auswertung des Western Blots zum spezifischen Nachweis des AR wurde nach dem gleichen Verfahren, wie bereits in Experiment 4 beschrieben (Abb. 3-40), durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-44A bis C dargestellt und repräsentieren die Intensität des markierten Proteins (AR) gegenüber der Referenzprobe C3.

Im Vergleich zum Cryogel C3, mit einer PEGda-Konzentration von 5 % v/v und einem Gelatine Anteil von 2 % w/v, erreichten die Proben mit verringerter PEGda-Konzentration (2.5 % v/v) eine um fast 10 % erhöhte Blot-Intensität. Dagegen verringerte sich die Intensität der Cryogele mit doppelter Konzentration (10 % v/v) um mehr als 20 % (Abb. 3-44B und C). Unabhängig vom gemessenen Proteingrad, korrelierte dieser nicht mit dem Wachstumsverhalten während der Zellkultivierung. In Anbetracht der ermittelten Werte aus dem Western Blot, hätten diese gegenüber der Referenzprobe C3 zu einem gesteigerten Zellwachstum im Fall der Proben C3_{250µl} und C3_{250µl,-G} sowie zu einem geringeren Wachstum der Cryogele C3_{1ml} und C3_{1ml,-G} führen müssen.

A)

B)



C)

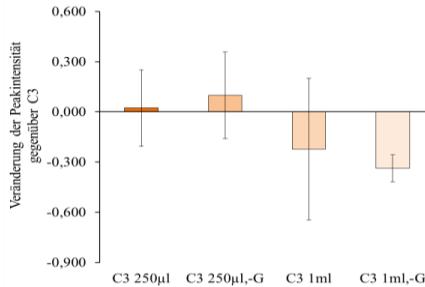


Abb. 3-44: Auswertung der Western Blot-Analyse zum Nachweis des AR nach 14 Kultivierungstagen. **A)** Proteinbanden des AR im Bereich von 117 kDa resultierend aus Zelllysaten der Cryogele mit veränderter PEGda-Konzentration. **B)** Auswertung der Blot-Intensität mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramm ImageJ. **C)** Veränderung der Peak-Intensität gegenüber der Referenzprobe C3. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je zwei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im Zuge der HE-Färbung wurde neben der allgemeinen Untersuchung zur Sphäroidbildung und -struktur auch die Verteilung der Sphäroide über drei Probenabschnitte erfasst. Die Ergebnisse hierzu werden in Abbildung 3-45A dargestellt. In einem separaten Diagramm, Abbildung 3-45B, werden zusätzlich die kalkulierten Sphäroidflächen durch Aufzeichnung des maximalen und minimalen Wertes zusammengefasst.

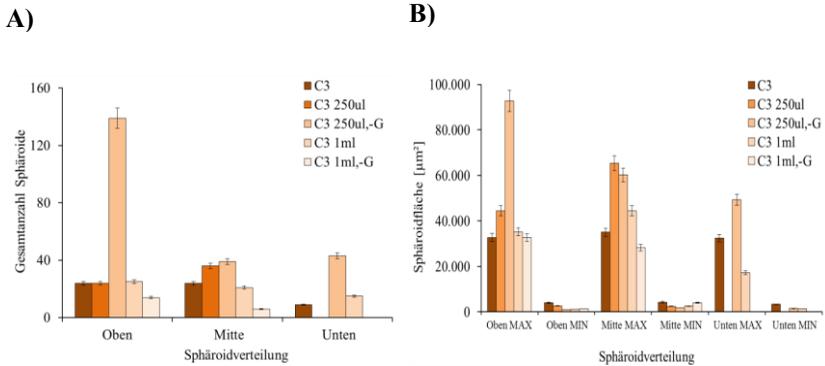


Abb. 3-45: Bestimmung der LNCaP-Sphäroidanzahl und -fläche nach 14 Tagen Kultivierung. **A)** Verteilung der erfassten Sphäroide über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). **B)** Verteilung des maximalen und minimalen Sphäroidflächenwertes der einzelnen Cryogelen C3, C3_{250µl}, C3_{250µl,-G}, C3_{1ml} und C3_{1ml,-G} über drei Ebenen (oben, Mitte, unten). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Referenzprobe C3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im Vergleich zur Referenzprobe C3 (PEGda-Konzentration: 5% v/v) wurden, mit Ausnahme der Probe mit verringerter PEG-Menge und ohne Gelatine (C3_{250µl,-G}), Sphäroidzahlen zwischen 20 und 40 ermittelt. Allerdings verteilen sich davon nur die Sphäroide der Probe C3_{250µl} und C3_{1ml} auf alle drei Bereiche (Abb. 3-45A). Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass gegenüber der Referenzprobe C3 die Sphäroidfläche bezogen auf den maximalsten Wert zur Mitte zunimmt (Bsp. C3_{250µl,-G} und C3_{1ml}), während die Minimalwerte kaum Veränderungen aufweisen (Abb. 3-45B). Im Verhältnis zur Cryogelprobe C3 wurden abgesehen von einer erhöhten Anzahl auch größere Sphäroden erfasst, welche jedoch in keinem direkten Zusammenhang zum aufgezeichneten Wachstumsverlauf der Zellen stehen (Abb. 3-45A und B, Abb. 3-43A und B).

3.2.3 Verhalten unterschiedlicher Prostatakrebszellen innerhalb ausgewählter Cryogele

Basierend auf den Ergebnissen zur Charakterisierung der unterschiedlichen Cryogelstrukturen, wurden in den vorherigen Kapiteln 3.2.1 bzw. 3.2.2 die Untersuchungen zur Kultivierung der Prostatakrebszelllinie LNCaP durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurden zunächst die verschiedenen Cryogelproben mit variierenden Konzentrationsverhältnissen der Reaktionskomponenten, Alginat, Gelatine und HEMA, für erste Zellkultivierungsexperimente verwendet (Experiment 1). Dabei wurde zum einen das Wachstumsverhalten der LNCaP-Zellen an zuvor festgesetzten Messtagen aufgezeichnet und zum anderen die Sphäroidbildung und -verteilung innerhalb der Cryogelproben (C1 bis C4) mit Hilfe unterschiedlicher Farb- und Mikroskopmethoden untersucht. Ausgehend von diesem Experiment wurden weitere Parameter bezüglich ihres Einflussbereiches gegenüber der strukturellen Beschaffenheit der Cryogele verändert, wie z.B. der Materialkomposition, der Gefriertemperatur sowie der Gefrierzeit (siehe Kapitel 3.1.1/3.2.1) und deren Auswirkung auf das zelluläre Verhalten untersucht.

Bezogen auf bisherige Ergebnisse erfolgt in diesem Abschnitt die Kultivierung der Prostatakrebszelllinie PC3, welche im Gegensatz zur Zelllinie LNCaP aus der Knochenmetastase eines Mannes isoliert wurde. In Anlehnung an die bisherigen Experimente wurden die Cryogele C1 bis C4 aus dem Experiment 1 sowie die Cryogelproben aus dem Experiment 5 (C3_{250µl}/C3_{250µl,-G} und C3_{1ml}/C3_{1ml,-G}) zur Kultivierung der Zelllinie PC3 ausgewählt. Dabei wurde der Einfluss von verschiedenartigen Porenstrukturen, hervorgerufen durch variierte Mischungsverhältnisse (Experiment 1), unterschiedlichen Elastizitäten (Experiment 5) sowie veränderten Oberflächenmarkierungen (RGD) untersucht.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Zellexperimente bezogen auf die metabolische Aktivität der Zellen sowie der Sphäroidbildung und -verteilung innerhalb der Cryogelproben aufgeführt. Hierzu wurden sowohl qualitative als auch quantitative Verfahren angewendet.

EXPERIMENT 1

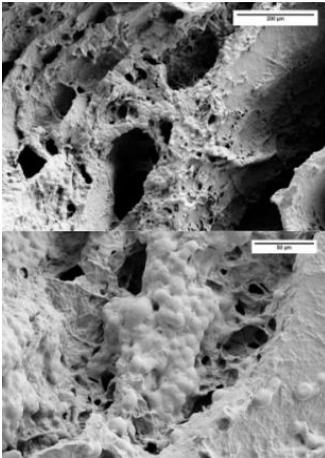
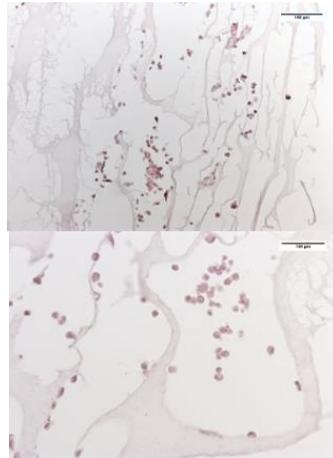
Im Rahmen dieses Experimentes dienen die synthetisierten Cryogele von Experiment 1 aus dem Kapitel 3.1.1 als Ausgangspunkt für die nachfolgenden Zellkulturexperimente. Charakteristisch für diese Cryogele, mit der Bezeichnung C1 bis C4, sind die veränderten Mengenverhältnisse der Hauptkomponenten (Alginat, Gelatine bzw. HEMA), welche nochmals in Tabelle 3-8 aufgeführt sind. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde für die Aussaat der PC3-Zelllinie die gleiche Ausgangszellzahl von 250.000 angesetzt. Die Ergebnisse der Cryogelprobe C3 mit kultivierten LNCaP-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1) wurden zum direkten Vergleich in diesem Kapitel mit aufgeführt.

Tab. 3-8: Zusammensetzung der Cryogelstrukturen C1 bis C4 bezogen auf ein Ausgangsvolumen von 10 ml. Die Konzentrationen für APS (0.5 % w/v) und TEMED (0.1 % v/v) blieben in allen Variationen stets konstant. Die Konzentration von GA wurde entsprechend der Alginat- bzw. Gelatine-Konzentration angepasst. Der zugehörige Syntheseprozess wird in Kapitel 2.1 beschrieben.

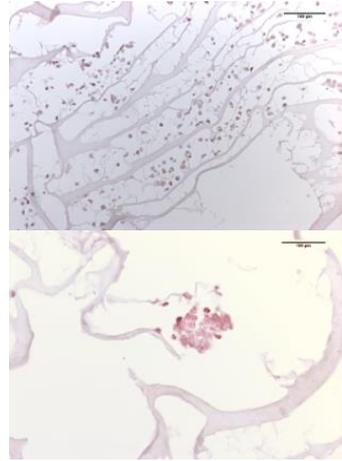
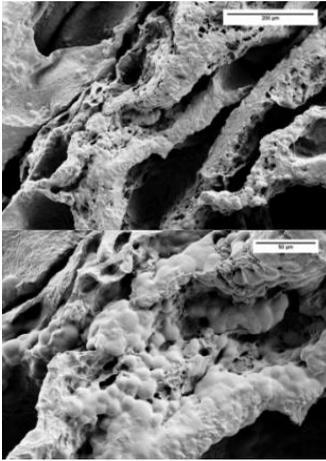
| Cryogel | Alginat | Gelatine | GA | HEMA | PEGda |
|---------|---------|----------|---------|--------|--------|
| C1 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 350 µl | 500 µl |
| C2 | 100 mg | 100 mg | 50 µl | 350 µl | 500 µl |
| C3 | 200 mg | 200 mg | 62.5 µl | 350 µl | 500 µl |
| C4 | 50 mg | 50 mg | 25 µl | 700 µl | 500 µl |

Die REM-Aufnahmen zur Untersuchung der Sphäroidbildung und deren Verbindung mit dem porösen Netzwerk werden in Abbildung 3-46A dargestellt. Ergänzend hierzu wurden in Abbildung 3-46B die HE-Färbungen der Paraffinschnitte (7 µm) zur zellulären Differenzierung hinzugefügt. Generell konnte in keiner der vier Cryogelproben (C1 bis C4) Sphäroide oder Ansätze einer Clusterstruktur nachgewiesen werden. Nach einer 14tägigen Kultivierung der Prostatakrebszelllinie PC3 wurden lediglich flächige Zellstrukturen

detektiert, welche sich über die gesamte Probenoberfläche ausbreiten (Abb. 3-46A). Im Fall der Cryogelprobe C3, mit dem höchsten Anteil an Alginat bzw. Gelatine (2 % w/v), zeigen die REM-Aufnahmen sehr anschaulich wie die PC3-Zellen entlang der Porenwände einzelne Poren auskleiden. Der visuelle Unterschied zwischen den gebildeten Formen der verwendeten Zelllinien, wird am Beispiel der Cryogelprobe C3 in Abbildung 3-47 nochmals veranschaulicht. Im Vergleich zu den LNCaP-Zellen, welche innerhalb der ersten 14 Tage nach Zellaussaat bereits typische Sphäroide gebildet haben, bleibt diese Beobachtung bei den PC3-Zellen aus. Im Gegensatz zu den REM-Aufnahmen konnten in den HE-Aufnahmen der Cryogelproben C2 und C3 vereinzelte Zellansammlungen erfasst werden (Durchmesser ca. 100 μm , Abb. 3-46B). Diese Aufnahmen bildeten jedoch nach zweiwöchiger Zellkultivierung die Ausnahme. Vielmehr konnten die durchgeführten Färbungen die Verteilung der PC3-Zellen innerhalb des Porennetzwerkes in Form von einzelnen Zellen entlang der Porenwände bis hin zu kleineren Zellgruppen durch Übereinanderlagerung bestätigen (Abb. 3-46B).

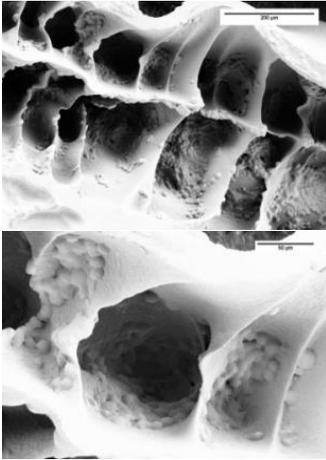
C1**A****B**

C2

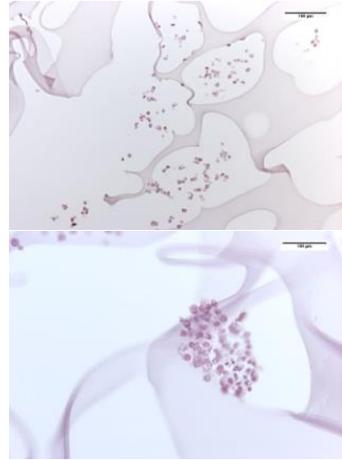


C3

A



B



C4

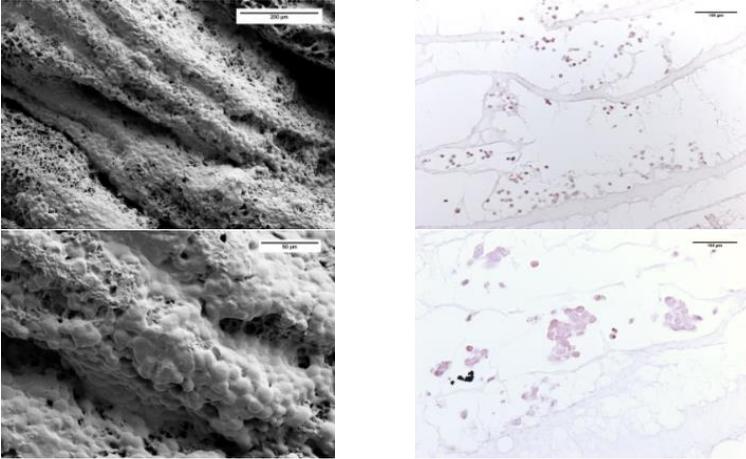


Abb. 3-46: Untersuchung der Sphäroidstruktur auf Basis unterschiedlicher Mikroskopaufnahmen (in den Cryogelen von Experiment 1). **A)** REM-Aufnahmen der PC3-Zellen nach 14tägiger Kultivierung in 150fache (Abb. oben; Maßstabsbalken 200 μm) und 400fache (Abb. unten; Maßstabsbalken 50 μm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden. **B)** HE-Färbung fixierter PC3-Zellen in 10facher (Abb. oben; Maßstabsbalken 100 μm) und 20fache (Abb. unten; Maßstabsbalken 100 μm) Vergrößerung. Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

C3

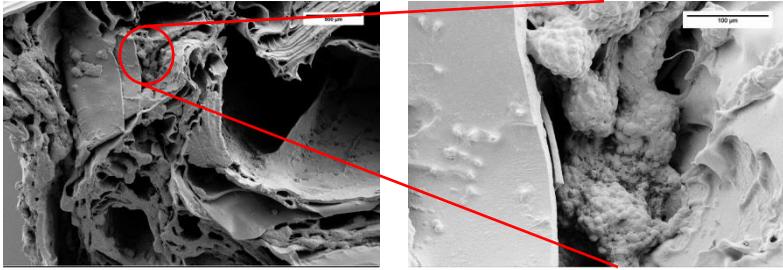


Abb. 3-47: REM-Aufnahme fixierter LNCaP-Zellen nach 14tägiger Kultivierung (Cryogelprobe C3 (Experiment 1)). Bereits 14 Tage nach Zellaussaat bildeten sich Zelllinien typische Sphäroide aus, welche sich deutlich von der Polymerstruktur abheben. 35fache Vergrößerung (Aufnahme links; Maßstabsbalken 500 µm) und 250fache Vergrößerung (Aufnahme rechts; Maßstabsbalken 100 µm).

Die Zellzahlentwicklung und die momentanen Wachstumsrate während der 14tägigen Kultivierung werden in Abbildung 3-48A und B dargestellt und beschreiben das Wachstumsverhalten der PC3-Zellen innerhalb der Cryogele C1 bis C4. Zum direkten Vergleich wurden die Ergebnisse der Cryogelprobe C3 mit kultivierten LNCaP-Zellen in die jeweiligen Diagramme integriert. Gegenüber den erreichten LNCaP-Zellzahlen in den vorhergehenden Experimenten (siehe Kapitel 3.2.1/3.2.2) wurde nach sieben Tagen eine Verdoppelung (C3) bis achtfache Erhöhung (C2) der PC3-Zellzahl erreicht. Zwischen Tag sieben und Tag 14 trat ein signifikanter Einbruch der Zellzahl mit gleichzeitiger Abnahme der Wachstumsrate auf (Abb. 3-48A und B). Die Messwerte verringerten sich durchschnittlich um mehr als 50 % gegenüber den erfassten Zahlen an Tag sieben, was zu einer negativen Wachstumsrate führte. Im Vergleich dazu verzeichnete die Cryogelprobe C3 mit kultivierten LNCaP-Zellen nach 14 Tagen eine positive Wachstumsrate (Abb. 3-48B).

Generell wurde das höchste Wachstumspotential trotz Zellzahlrückgang bei den Proben C2 und C4 festgestellt (Abb. 3-48A). Letzteres könnte jedoch auf die ausgedehnte Oberflächenkultivierung zurückgeführt werden, welche mit Hilfe der REM-Aufnahmen gezeigt wurde (Abb. 3-46).

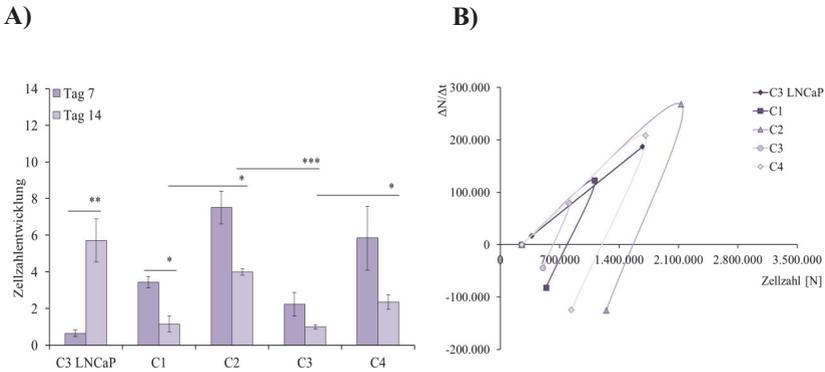


Abb. 3-48: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate im Verlauf von 14 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahlentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000 Zellen. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7 und 14). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

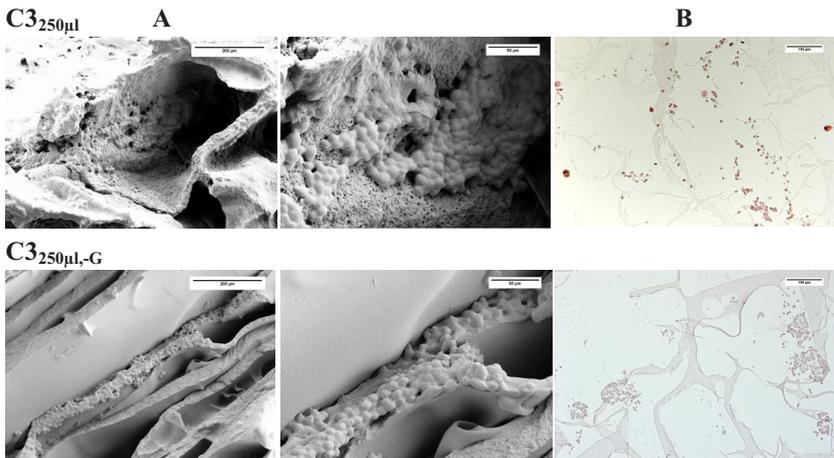
EXPERIMENT 5

Im Folgenden Experiment lag der Schwerpunkt auf der Vernetzung der Polymerketten während der Polymerisation de Gels. Dabei wurde die Konzentration des verwendeten Cross-Linkers, PEGda, von 5 % v/v (500 μ l/10 ml) auf 10 % v/v verdoppelt bzw. auf 2.5 % v/v (250 μ l/10 ml) verringert (siehe Tab. 3-5 Kapitel 3.1.2). Durch die abgewandelte PEGda-Konzentration wurde eine strukturelle Veränderung des Porensystems und daraus resultierend eine Erhöhung sowie Verminderung des E-Moduls hervorgerufen (siehe Kapitel 3.1.2). Der Einfluss dieser abweichenden mechanischen Festigkeit auf die Kultivierung der Prostatakrebszelllinie LNCaP wurde bereits in Kapitel 3.2.2 untersucht und wird nun im Rahmen dieses Abschnittes durch die Zelllinie PC3 erweitert. In Anbetracht der zellulären Herkunft der Prostatakarzinomzelllinie PC3 (Knochenmetastase) wurde sowohl die Wirkung der veränderten Elastizitätseigenschaften als auch das Fehlen der natürlichen

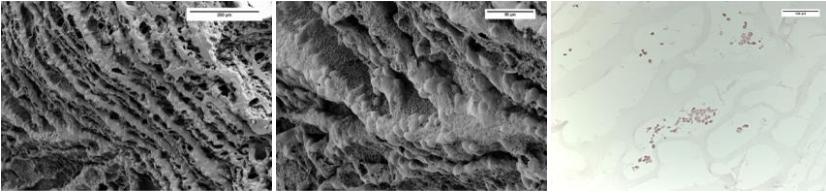
Komponente Gelatine, inklusive der spezifischen Aminosäuresequenz RGD, überprüft.

Ausgehend von den Cryogelproben mit veränderter PEGda-Konzentration, C3_{250µl}/ C3_{250µl,-G} und C3_{1ml}/ C3_{1ml,-G}, sowie der Referenzprobe C3 (mit LNCaP Zellen), werden im Folgenden die Zellkulturexperimente inklusive des Wachstumsverhaltens der Zellen, der Sphäroidbildung, -struktur und -verteilung in den jeweiligen Cryogelen ausgewertet.

Das Aussehen und die Verteilung der PC3-Zellen innerhalb der Cryogelproben mit veränderter PEGda-Konzentration werden durch die REM-Aufnahmen und HE-Färbungen in Abbildung 3-49A und B dargestellt. Verglichen zu den Ergebnissen aus Experiment 1 (siehe Kapitel 3.2.1), konnten auch innerhalb der Proben mit reduzierter (2.5 % v/v) bzw. doppelter PEGda-Konzentration (10 % v/v) und unabhängig von der Anwesenheit der natürlichen Komponente Gelatine keine Zellsphäroide festgestellt werden. Wie schon zuvor gezeigt (Abb. 3-46A und B), wurden lediglich flächige Zellstrukturen, welche sich vorrangig entlang der Porenwandränder befanden, detektiert (Abb. 3-49A). Diese Erscheinung wurde gehäuft bei den Cryogelproben C3_{250µl,-G} (ohne Gelatine) und C3_{1ml} beobachtet.



C3_{1ml}



C3_{1ml,-G}

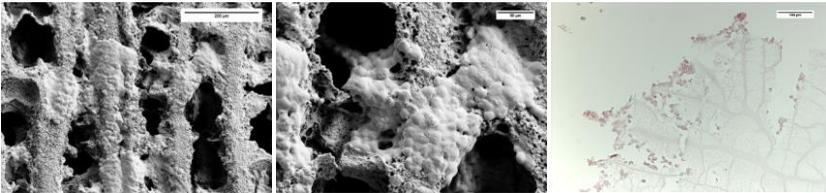


Abb. 3-49: Untersuchung der Sphäroidstruktur auf Basis unterschiedlicher Mikroskopaufnahmen (Experiment 5). **A)** REM-Aufnahmen der PC3-Zellen nach 14tägiger Kultivierung in 150fache (Abb. links; Maßstabsbalken 200 μm) und 400fache (Abb. rechts; Maßstabsbalken 50 μm) Vergrößerung: Die Proben wurden vor der Messung bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. Auf diese Weise können Aufladungseffekte vermieden werden. **B)** HE-Färbung fixierter PC3-Zellen in 10facher (Abb. oben; Maßstabsbalken 100 μm) Vergrößerung: Die Proben wurden vor der histologischen Präparation für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert.

Verglichen zu den REM-Aufnahmen, weisen die HE-Aufnahmen von gefärbten Schnitten aus dem Inneren der Cryogelstruktur mit verringertem PEGda-Volumen (250 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$) und ohne Gelatine erste Anzeichen einer Sphäroidbildung auf (Abb. 3-49B). Generell dominierte jedoch die Verteilung der PC3-Zellen in Form einzelner Zellen oder eines schichtweisen Aufbaus (Abb. 3-46A und B). Dabei traten nur geringfügige Unterschiede zwischen den Cryogelproben mit doppelter und verringerter PEGda-Konzentration sowie mit und ohne Gelatine auf.

Das Wachstumsverhalten der PC3-Zellen innerhalb der Cryogele mit veränderter PEGda-Konzentration wird mit Hilfe der Diagramme in Abbildung 3-50A und B dargestellt. Im Vergleich zum Wachstumsverlauf der Zellen in den Cryogelproben C1 bis C3, wird nach einer Kultivierungs-

woche die Zellzahl maximal um das Dreifache erhöht (Abb. 3-50A, Abb. 3-48A). Dabei wurde die höchste Zellzahl in den Cryogelproben mit erhöhter PEGda-Konzentration ermittelt ($C3_{1ml}$; $C3_{1ml,-G}$), welche fast das Doppelte gegenüber den Proben $C3_{250\mu l}$ und $C3_{250\mu l,-G}$ ausmacht (Abb. 3-50A).

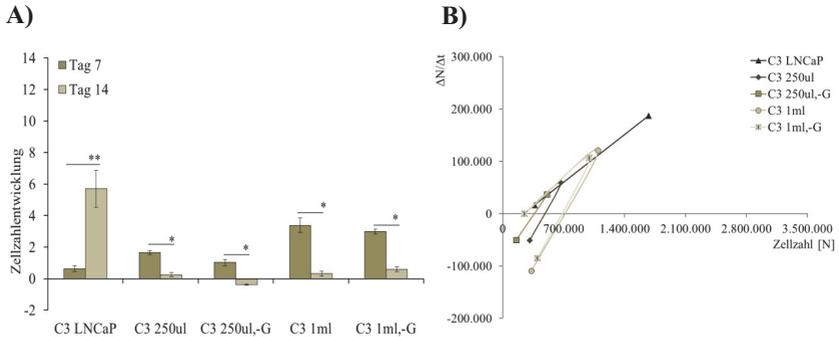


Abb. 3-50: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate im Verlauf von 14 Kultivierungstagen. **A)** Zellzahlentwicklung bezogen auf eine Ausgangszellzahl von 250.000 Zellen. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7 und 14). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je vier unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Zwischen der ersten und zweiten Kultivierungswoche wurde erneut, wie schon im Experiment 1 beobachtet, eine Verringerung der Zellzahl festgestellt. Dabei sank die Anzahl an PC3-Zellen zwischen 30 und 45 % gegenüber den erreichten Messwerten an Tag sieben. Im Fall der Cryogelprobe $C3_{250\mu l,-G}$ wurde zudem ein Rückgang unterhalb der Ausgangszellzahl erfasst (Abb. 3-50A). Dieser abnehmende Wachstumstrend wird durch die negativen Wachstumsraten in Abbildung 3-50B nochmals veranschaulicht und bildet einen auffälligen Kontrast zum Verhalten der LNCaP-Zellen in der Cryogelprobe C3. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des LNCaP-Zellwachstums innerhalb der Cryogelproben mit verändertem PEGda-Anteil (Abb. 3-43A, siehe Kapitel 3.2.2), besteht im Fall der PC3-Zellen ein offensichtlicherer

Unterschied zwischen den Proben mit geringerer und erhöhter PEGDa-Konzentration sowie mit bzw. ohne Gelatine.

3.3 Charakterisierung und Vergleich von Seidenfibroingerüsten

Im ersten Abschnitt dieses Kapitels wird die physikalische Charakterisierung unterschiedlicher Seidenfibroingerüste diskutiert. In diesem Zusammenhang wird auf die gleichen Untersuchungsmethoden wie in den vorhergehenden Kapiteln zurückgegriffen, um einen direkten Vergleich zu den Cryogelen zu ermöglichen (siehe Kapitel 3.1). Des Weiteren wird die Eignung der Seidenfibroingerüste bezogen auf die durchgeführten Zellkulturexperimente überprüft und diskutiert.

3.3.1 Einfluss verschiedener Mischungskomponenten auf die Matrixeigenschaften von Seidenfibroingerüsten

In diesem Kapitel werden unter Beurteilung verschiedener Ausgangskompositionen die Struktur und das mechanische Verhalten von Seidenfibroingerüsten untersucht und in einen Kontext mit den charakteristischen Merkmalen der Cryogele gestellt. Basierend auf dem extrahierten Seidenfibroin des Seidenraupenspinners *B.mori* wurden unterschiedlich zusammengesetzte Gerüststrukturen hergestellt. Zu den Bestandteilen zählen Kollagen, Gelatine, Chitosan, das Seidenfibroinextrakt aus *A.pernyi* und das rekombinante Strukturprotein (Spidroin) der Spinnenseide von *Araneus diadematus* (gewöhnliche Gartenkreuzspinne) bzw. *Nephila clavipes* (Goldene Seiden spinne, siehe Kapitel 1.4.3). Die in Kapitel 2.2 beschriebenen Fertigungsschritte setzen sich grundsätzlich aus dem Entbasten der Seidenkokons, der Extraktion des Seidenproteins Fibroin sowie dem anschließenden Einfrieren (24 h bei -21 °C) und Gefriertrocknen für 24 bis 48 h zusammen. Mit Hilfe der darauffolgenden Ethanol-Behandlung kann die Wasserlöslichkeit redu-

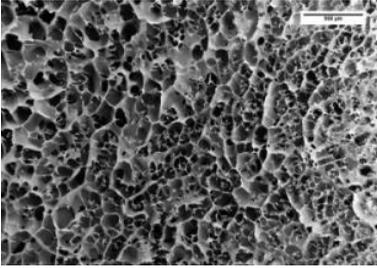
ziert und die Gerüststruktur stabilisiert werden. Letzteres ist ein wesentlicher Schritt um die Zellkultivierung in Nährstoffmedium durchführen zu können.

Nachfolgend werden nun die Ergebnisse zu den Untersuchungen der Porenstruktur, der mechanischen Eigenschaften und dem Verhalten in flüssiger Umgebung dargestellt.

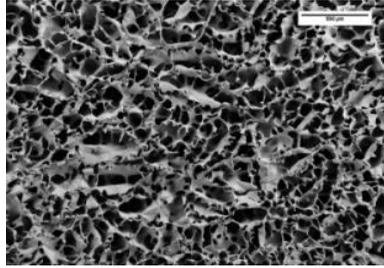
Die REM-Aufnahmen zur qualitativen Untersuchung der porösen Eigenschaften der Seidenfibroingerüste werden in Abbildung 3-51A und B dargestellt. Gleichzeitig dienen die Aufnahmen dem direkten Vergleich zwischen den Ethanol unbehandelten (Abb. 3-51A) und behandelten Proben (Abb. 3-51B). Basierend auf dem extrahierten Seidenfibroin des Seidenraupenspinners *B.mori* wurden fünf unterschiedliche Zellgerüstträger hergestellt, welche aus verschiedenen natürlichen Komponenten (Kollagen, Gelatine, Chitosan, Seidenfibroin von *A.pernyi* und Spidroin) aufgebaut sind. Reine Seidenfibroingerüste aus *B.mori* dienen dabei als unfunktionalisierte Referenzstruktur. Mit Ausnahme des zusammengesetzten Gerüsts aus dem Seidenfibroin von *A.pernyi*, *B.mori* und Chitosan (AP-BM-chi), zeigen alle Proben im unbehandelten Zustand eine sichtbare Porenstruktur. Ein besonderes Merkmal dafür sind die dünnen Porenwände, welche eine blattähnliche Struktur mit dünnen Ausläufern an den Porenwandrändern aufweisen (Abb. 3-51A). Diese materialspezifische Eigenschaft wird am Beispiel von REM-Aufnahmen reiner Seidenfibroingerüste in Abbildung 3-52A ergänzend dargestellt. Im Fall der zusammengesetzten Gerüste mit Kollagen (BM-coll) und Gelatine (BM-gel) dient eine vierprozentige Fibroinlösung als Ausgangsgemisch, welche zu einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Proben führt. Zusammen mit dem Seidenfibroingerüst aus Chitosan (BM-chi), welches auf einer dreiprozentigen Fibroin-Lösung basiert, weisen diese Proben größere Poren in einer länglichen Form auf. Letzteres differenziert sich von der kleinporigeren Struktur der reinen Fibroingerüste sowie in Verbindung mit dem rekombinanten Seidenspidroin (BM-SSP) (Abb. 3-51A).

BM

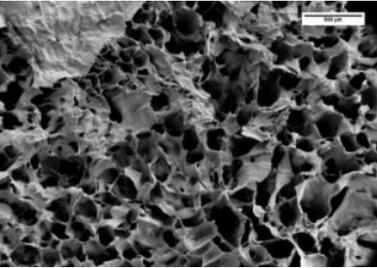
A



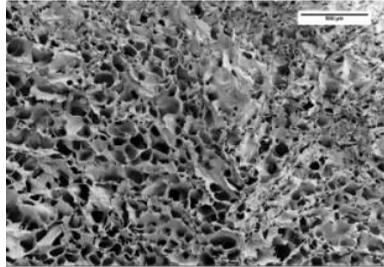
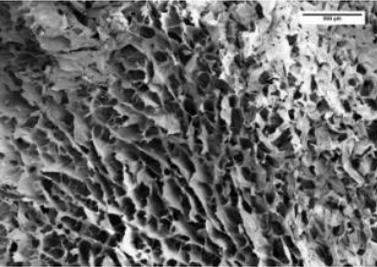
B



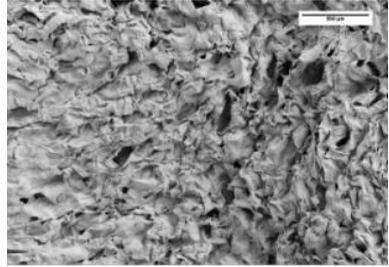
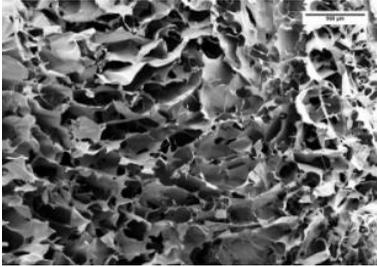
BM-coll



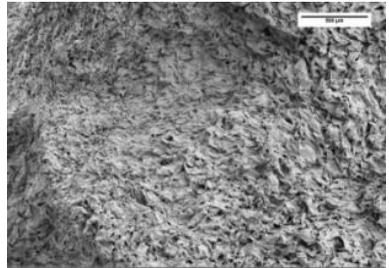
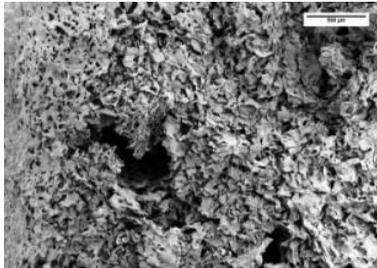
BM-gel



BM-chi



AP-BM-chi



BM-SSP

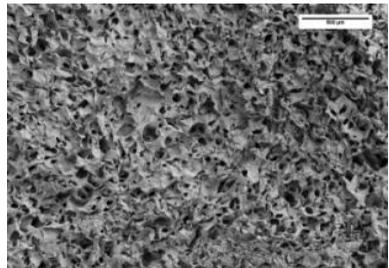
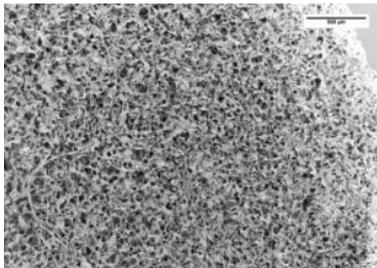


Abb. 3-51: Untersuchung der Porenstruktur der Seidenfibröngerüste auf Basis hochauflösender Mikroskopaufnahmen. **A)** REM-Aufnahmen der Seidenfibröngerüste ohne Ethanol-Behandlung in 40facher (linke Spalte; Maßstabsbalken 500µm) Vergrößerung. **B)** REM-Aufnahmen der Seidenfibröngerüste mit Ethanol-Behandlung in 40facher (rechte Spalte; Maßstabsbalken 500µm) Vergrößerung. Nach der Fibröin Extraktion und Herstellung der Gerüste werden diese für 1 h mit 100 % Ethanol behandelt. Auf diese Weise wird die Löslichkeit herabgesetzt und die Stabilität in Flüssigkeit erhöht.

Als Folge der Ethanol-Behandlung kommt es teilweise zu einer strukturellen Veränderung des Porensystems. Dabei weisen BM-coll und BM-gel vermehrt kleinere Poren mit dickeren Porenwänden auf, welche auch poröse Stellen verdecken (Abb. 3-51B). Verglichen dazu wirken die Poren von BM-SSP größer und heterogener verteilt, während im Fall von BM-chi und AP-BM-chi kaum noch Poren zu erkennen sind (Abb. 3-51B). Letztere scheinen außerdem nach der Alkohol-Behandlung mechanisch fester und grober zu sein. Die geringfügigsten Veränderungen sind bei den reinen Fibroingerüsten zu erkennen. Es konnte lediglich eine Verfestigung der charakteristischen Ausläufer der Porenwände festgestellt werden (Abb. 3-52B).

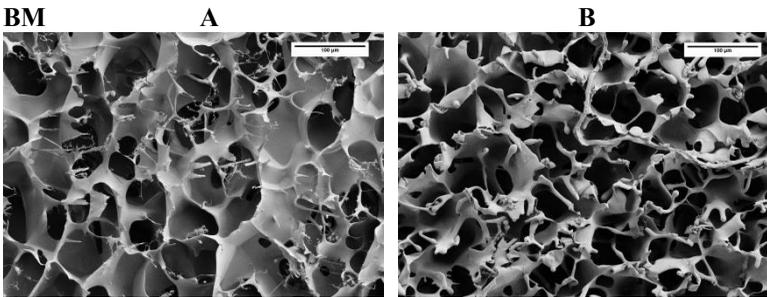


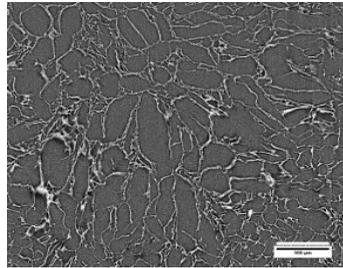
Abb. 3-52: REM-Aufnahmen der blättrigen Porenstruktur am Beispiel reiner Seidenfibroingerüste. **A)** REM-Aufnahmen von Ethanol unethanolbehandelten BM-Gerüsten zeigen eine blattartige Porenwandstruktur mit astähnlichen Ausläufern in 100facher (Maßstabsbalken 100 µm) Vergrößerung. **B)** Nach Ethanol-Behandlung zeigen die BM-Gerüste Verfestigungen innerhalb der charakteristischen Ausläufer in 100facher (Maßstabsbalken 100 µm) Vergrößerung [Bäc2017].

Zur Erweiterung der visuellen Strukturuntersuchung wurde mit Hilfe der Elektron-Synchrotron-Strahlung das gesamte Porensystem gescannt, um dadurch die Poreninterkonnektivität nachzuweisen. Die rekonstruierten 3D Aufnahmen und Tomographiescans aus der Probenmitte werden in Abbildung 3-53 zusammengefasst. Durch die Bestätigung der Porenverbundenheit werden die strukturellen Voraussetzungen geschaffen, welche für eine erfolgreiche Zellkultivierung notwendig sind. Dabei gewährleistet die vernetzte

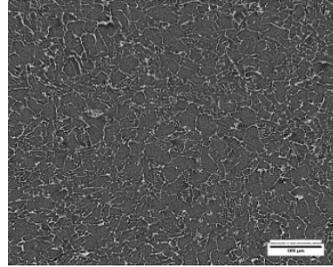
Struktur die Versorgung der Zellen mit Nähr- und Sauerstoffen und sichert zugleich den Abtransport von Stoffwechselendprodukten.

Mit Hilfe der Tomographiescans wird hervorragend veranschaulicht in wie weit sich die Porenstruktur reiner Seidenfibroingerüste von den zusammengesetzten Proben unterscheidet. Im Gegensatz zu den übrigen Fibroingerüsten erscheinen die Poren sehr viel größer und nehmen in Folge der Verbindung mit Kollagen (BM-coll) und Gelatine (BM-gel) deutlich an Größe ab (Abb. 3-53). Verglichen dazu weisen die Chitosan-basierten Seidenfibroingerüste (BM-chi, AP-BM-chi) strukturelle Ähnlichkeiten auf, welche in den REM-Aufnahmen weniger auffallend waren (Abb. 3-51). Gegenüber den reinen Fibroingerüsten verringerte sich die Porengröße nicht und scheint an manchen Stellen sogar größer. Durch die Verbindung mit Spidroin (BM-SSP) wurde eine sehr homogene Porenstruktur erzeugt, welche auch über die REM-Aufnahmen im Ethanol-behandelten und -unbehandelten Zustand bestätigt wurde (Abb.3-51/3-53).

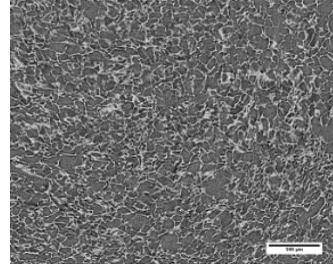
BM



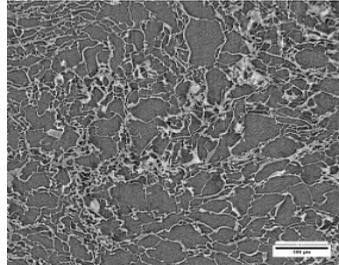
BM-coll



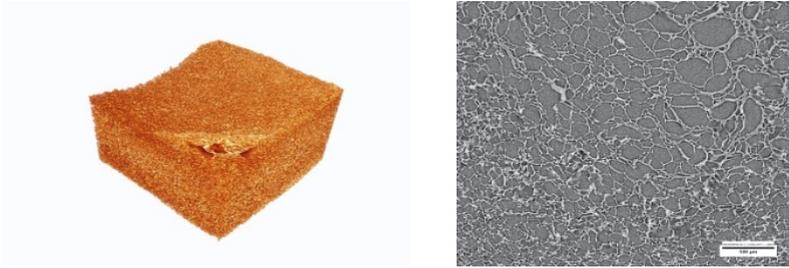
BM-gel



BM-chi



AP-BM-chi



BM-SSP

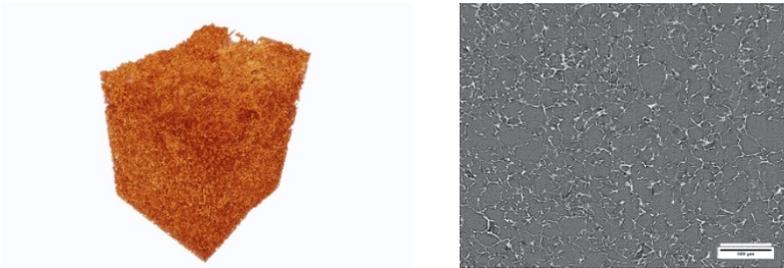


Abb.3-53: Röntgen-Mikro-CT-Aufnahmen der Porenstruktur. Mit Hilfe der 3D-Röntgenbildgebung konnte die Interkonnektivität der Porenstruktur analysiert werden. Die untersuchten Seidenfibroingerüste wurden vorab mit Ethanol behandelt und bei RT getrocknet. (Maßstabsbalken 500 µm).

Generell konnte bei allen Seidenfibroingerüsten eine vernetzte Porenstruktur in allen gescannten Ebenen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den gemessenen Cryogelproben sind die Poren kleiner und Porenwände auffallend dünner. Es sollte jedoch beachtet werden, dass dieser Ausschnitt nicht der gesamten Probengröße entspricht, sondern nur einen kleinen Teil wiedergibt. Dementsprechend müssen die qualitativen und quantitativen Messergebnisse zusammen betrachtet und ausgewertet werden.

Die Untersuchung der Porensysteme erfolgte mit Hilfe der Quecksilberporosimetrie und wird in Abbildung 3-54A und B dargestellt. Quecksilber wird mit ansteigendem Druck in die Poren gepresst, wonach ein Zusammenhang zwischen dem angewandten Druck und in dem aufgenommenen Volumen der Poren entsteht (siehe Kapitel 2.3.1, Washburn-Gleichung). Aufgrund der Verwendung von Quecksilber, als nicht benetzende Flüssigkeit, konnte die Ermittlung der Gesamtporosität und dem dazugehörigen Porenvolumen vor der Ethanol-Behandlung erfolgen. Die gemessene Porosität nimmt einen Bereich zwischen 65 und 95 % ein, wobei der Maximalwert bei BM-chi (~95 %) sowie der Minimalwert bei BM-gel (~65 %) liegt. Korrelierend dazu fällt das Porenvolumen entsprechend hoch aus (2.200 bis 13.000 mm³/g), welches sich deutlich von den zuvor gemessenen Werten der Cryogelproben unterscheidet (100 bis 1.000 mm³/g bei einer maximalen Porosität von 50 % (Experiment 1 bis 5, siehe Kapitel 3.1.1/3.1.2)).

Verglichen zu den reinen Fibroingerüsten, zeigt BM-chi ein erhöhtes Porenvolumen (~ 13.000 mm³/g) trotz geringer Differenz zwischen den Porositäten (~10 %). Dagegen weisen BM-coll, BM-gel und AP-BM-chi Porenvolumenwerte in einem Bereich zwischen 2.200 und 2.800 mm³/g auf (Abb. 3-54A).

Der Zusammenhang zwischen Porengröße (ermittelt durch Quecksilberporosimetrie) und der Gesamtporenoberfläche wird in Abbildung 3-54B dargestellt. Mit Hilfe der Visualisierungssoftware Avizo wurde die Porenoberfläche von gefärbten Paraffinschnitten (h=7 µm, Abb. 3-55A, links) bestimmt und anschließend ausgewertet (Abb. 3-55A, rechts). Auf diese Weise konnte die quantitative Beurteilung der inneren Porenstruktur von annähernd feuchten Probenschnitten durchgeführt werden.

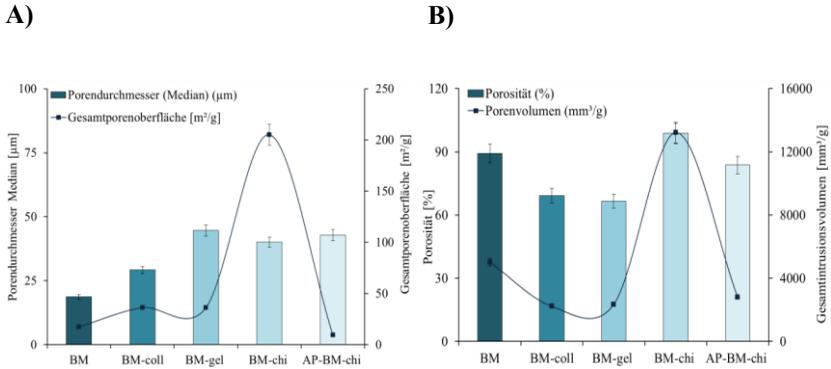
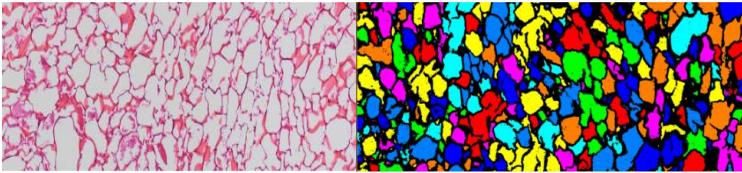


Abb. 3-54: Quantitative Charakterisierung des Porensystems mittels Quecksilberporosimetrie. **A)** Bestimmung der Gesamtporosität als Verhältnis zwischen Porenvolumen (Gesamtintrusionsvolumen) und Rohvolumen. **B)** Ermittlung des Median Porendurchmessers und der Gesamtporenoberfläche im Zuge der Porosimetrie-Messungen. Die dargestellten Messungen fanden vor der Ethanol-Behandlung statt. Aufgrund der weichen Struktur von BM-SSP, konnte keine Messung mit dem Quecksilberporosimeter durchgeführt werden. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe BM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Die größten Porendurchmesser (Median) wurden bei den zusammengesetzten Seidenfibröngerüsten aus Gelatine, Chitosan bzw. *A.pernyi* und Chitosan nachgewiesen ($\sim 45 \mu\text{m}$), wohingegen reine Fibröngerüste nur eine Größe von $\sim 20 \mu\text{m}$ aufzeigen. Gleichzeitig weist BM-chi die größte Gesamtporenoberfläche auf (Abb. 3-54B).

Aufgrund der annähernd identischen Porendurchmesser wird die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Porenoberflächen von BM-gel, BM-chi und AP-BM-chi in Abbildung 3-55B zusammengefasst. Im Gegensatz zu BM-gel und AP-BM-chi wird deutlich, dass BM-chi vermehrt größere Porenoberflächen aufweist, was sich wiederum in den Messwerten der Gesamtporenoberfläche in Abbildung 3-54B widerspiegelt.

A)



B)

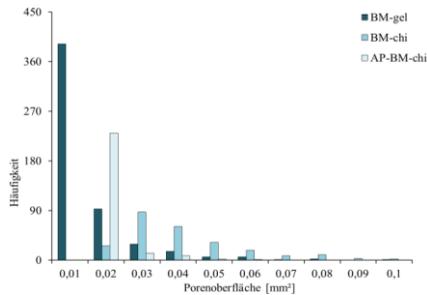


Abb. 3-55: Auswertung und Häufigkeitsverteilung der ermittelten Porenoberflächen. **A)** Mit Hilfe der Analyse Software Avizo konnte die Porenoberfläche der Seidenfibringewebe (BM-gel, BM-chi bzw. AP-BM-chi) untersucht werden. Hierfür wurden histologische Schnitte ($h=7\ \mu\text{m}$) aus Paraffinblöcken angefertigt, welche anschließend mit Hämatoxylin eingefärbt wurden (Beispielaufnahme: BM-gel). Die Tatsache, dass die Gerüststruktur einen signifikanten Anteil an Farbe aufnehmen (Bild links), ermöglichte die Unterscheidung zwischen Porenwand und Poren (Bild rechts). **B)** Häufigkeitsverteilung der gemessenen Porenoberflächen von BM-gel, BM-chi und AP-BM-chi.

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Schwellverhaltens in Nährmedium, welche eine ergänzende Messmethode zur Charakterisierung des Porensystems darstellt, werden in Abbildung 3-56 und Tabelle 3-9 zusammengefasst. Auf diese Weise kann der Einfluss der Porenstruktur auf die notwendige Flüssigkeitsaufnahme überprüft werden, was ein entscheidender Punkt bei der Aufnahme der Zellsuspension im Zuge der Kultivierungsexperimente ist. Aufgrund der experimentellen Bedingungen erfolgte die Untersuchung erst nach der Ethanol-Behandlung. Bei Betrachtung der Schwellraten wird deut-

lich, dass sich die zusammengesetzten Seidenfibringerüste BM-SSP (Spidroin) und BM-coll (Kollagen) von den übrigen Gerüsten abgrenzen (oberen zwei Kurven). Bezogen auf ihr Ausgangsgewicht nimmt BM-SSP um das Siebenfache und BM-coll um das Fünffache zu, während die anderen Seidenfibringerüste ihr Gewicht nur verdoppeln können (Abb. 3-56A). Diese Beobachtung spiegelt sich ebenfalls im Diagramm in Abbildung 3-56B wider.

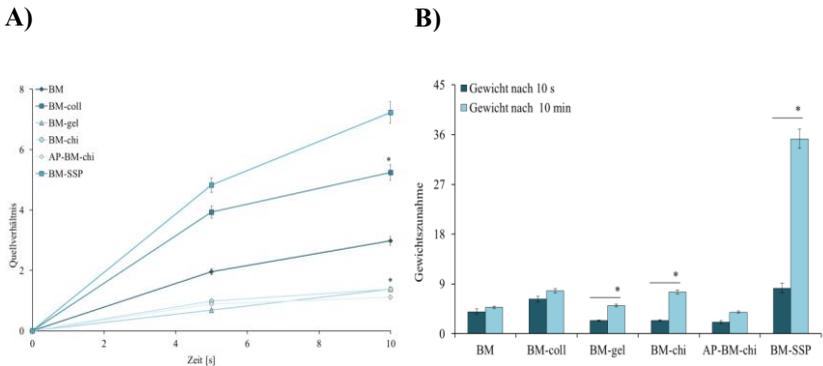


Abb. 3-56: Nachweis des Schwellverhaltens in Nährstoffmedium. **A)** Es wurde das Feuchtgewicht zu den Zeitpunkten $t = 5, 10$ s ermittelt und zum Ausgangstrockengewicht bezogen [Bäc2017]. **B)** Gewichtszunahme der Seidenfibringerüsten in Nährstoffmedium. Aufgetragen und verglichen wurden die Gewichte der verschiedenen Seidenfibringerüste nach 10 s und 10 min (bezogen auf das Ausgangsgewicht). Das durchschnittliche Ausgangsgewicht betrug 0.01484 ± 0.006 g. **C)** Flüssigkeitsgehalt der Seidenfibringerüste nach 10 min in Nährmedium. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe BM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nach zehn Minuten konnte das zusammengesetzte Seidenfibringerüst aus Spidroin sein Gewicht um das 35fache mit einem Flüssigkeitsgehalt von ca. 95 % steigern (Abb. 3-56B und Tab. 3-9). Innerhalb dieser Zeit erhöhten auch BM-gel und BM-chi ihr Gewicht und konnten am Ende einen Flüssigkeitsgehalt von mehr als 80 % aufweisen (Tab. 3-9). Im Gegensatz dazu

konnten reine Seidenfibroingerüste und BM-coll ihr Gewicht nur geringfügig durch die Flüssigkeitsaufnahme erhöhen (Abb. 3-56A und B). Grundsätzlich zeigt BM-SSP die höchste Schwellrate mit hervorragender Fähigkeit das umgebende Nährmedium aufzunehmen. Verglichen zum Schwellverhalten der Cryogelproben aus Experiment 1 bis 5 (siehe Kapitel 3.1), konnten im Rahmen dieser Untersuchung um ein Vielfaches höhere Schwellraten ermittelt werden.

Tab. 3-9 Gewichtsentwicklung und Vergleich des Flüssigkeitsgehaltes nach 10 s.

| Seidenfibroingerüst | Flüssigkeitsgehalt [%] |
|---------------------|------------------------|
| BM | 79.10 ± 4.14 |
| BM-coll | 87.33 ± 1.96 |
| BM-gel | 81.02 ± 4.18 |
| BM-chi | 86.99 ± 2.27 |
| AP-BM-chi | 76.68 ± 0.01 |
| BM-SSP | 97.16 ± 0.16 |

Die Ergebnisse zum elastischen Verhalten der einzelnen Seidenfibroingerüste werden in Abbildung 3-57 dargestellt. Hierbei wurde eine Druckkraft von maximal 1 N auf die Proben ausgeübt und deren Auswirkungen auf die Materialien, Eindrückweg zu Eindrückkraft, aufgezeichnet. Mit Hilfe dessen konnte anschließend das Spannungs-Dehnungs-Diagramm der einzelnen Strukturen erstellt werden. Im linear-elastischen Bereich der Verlaufskurve (Hook'sche Gerade) ist das E-Modul definiert als Quotient aus Spannung und Dehnung und konnte auf diese Weise berechnet werden. In Abbildung 3-57A ist eine eindeutige Abnahme des E-Moduls von reinen Fibroingerüsten und BM-coll mit ca. 30 kPa bis hin zu BM-SSP mit ca. 5 kPa erkennbar. Zwischen diesem maximalen und minimalen Wert liegen die zusammengesetzten Seidenfibroingerüste aus Gelatine, Chitosan bzw. der Kombination aus *A. pernyi* und Chitosan in einem Bereich von 20 bis 10 kPa (Abb. 3-57A).

BM-coll und reines BM weisen dabei ähnliche elastische Eigenschaften wie die Cryogelprobe C3 mit einem E-Modul von rund 30 kPa auf (Abb. 3-5A, siehe Kapitel 3.1.1). Die signifikanten Differenzen zwischen den Seidenfibröingerüsten sind ebenfalls im Spannungs-Dehnungs-Diagramm zu erkennen (Abb. 3-5B). Mit kleiner werdenden E-Modul reduziert sich die Fläche unterhalb der Verlaufskurve, was auf eine Zunahme des linear elastischen Bereichs hinweist. Im Fall der Verbindung von Seidenfibröin und Spidroidin (BM-SSP) verläuft die Kurve in einem näherungsweise getreckten Winkel, wodurch der Zusammenhang zu dem niedrigen E-Modul von 5 kPa gegeben ist (Abb. 3-5B). Letzteres ähnelt zugleich dem Kurvenverlauf der Cryogel-synthesen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei verringerter PEGda-Konzentration (siehe Kapitel 3.1, Experiment 3 bis 5).

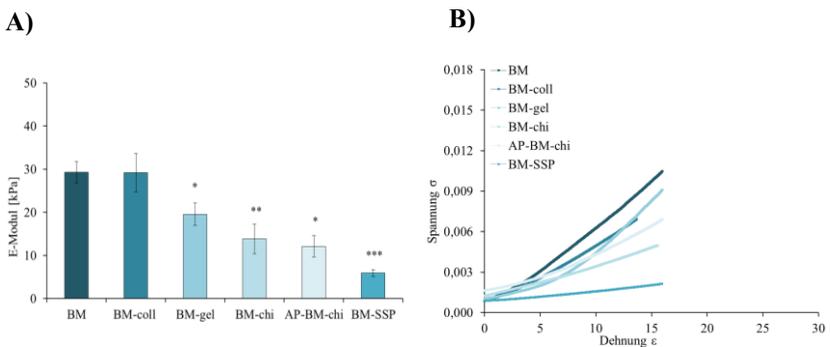


Abb. 3-57: Bestimmung des E-Moduls der Seidenfibröingerüste. **A)** Messung des E-Moduls durch Druckausübung über Eindröckkraft (max. 1 N) und Eindröckweg (entspricht Längenänderung) [Bäc2017]. **B)** Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm während der Komprimierung der Seidenfibröingerüste. Unter Erhöhung der Kraft wird diese über der verursachten Längenänderung (*hier*: Höhenänderung) grafisch dargestellt. Dabei wird die Längenänderung auf die Anfangslänge und die Kraft auf den Querschnitt des Körpers im nicht-deformierten Zustand bezogen. Vor Messbeginn wurden die Proben für 24 h in Nährmedium getränkt um die maximale Quellrate zu erreichen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe BM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im Gegensatz dazu weisen die Seidenfibroingerüste BM und BM-coll den kleinsten linear elastischen Bereich auf, welcher mit dem erhöhten E-Modul Werten (~ 30 kPa) zusammenhängt. Die elastischen Eigenschaften des reinen Seidenfibroingerüstes konnten durch die Zusammensetzung mit Gelatine, Chitosan, Seidenfibroin aus *A. pernyi* und Chitosan bzw. durch das rekombinante Protein Spidroin deutlich verbessert werden. Die Verbindung mit Kollagen scheint den geringsten Einfluss auf die mechanischen Merkmale auszuüben, was wiederum auf die geringere Konzentration von Kollagen (0.3 % w/v) zurückzuführen wäre.

Die Korrelation zwischen der Streckgrenze und der zugehörigen Längenänderung der verschiedenen Seidenfibroingerüsten wird in Abbildung 3-58 beschrieben. Mit Hilfe des jeweiligen Spannungs-Dehnungs-Diagramms kann die Streckgrenze direkt aus dem Graphen abgelesen und durch Division mit dem Querschnitt der Probe berechnet werden. Die zugehörige Längenänderung ergibt sich aus dem Quotienten des Eindrückweges und der Ausgangshöhe der Probe. Auf diese Weise ist es möglich die materialspezifischen Komprimierungseigenschaften genauer zu untersuchen. Die Streckgrenze der Seidenfibroingerüste liegt in einem Spannungsbereich zwischen 0.0014 N/mm² (BM-SSP) und 0.0025 N/mm² (AP-BM-chi) (Abb. 3-58). Außerhalb des Bereiches, spezifisch für jede Probe, treten plastische Verformungen auf, welche nach Entlastung des Materials zu einer dauerhaften Veränderung führen.

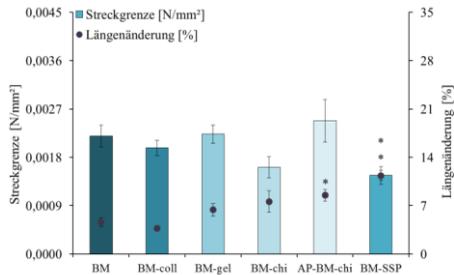


Abb. 3-58: Nachweis der Streckgrenze und zugehöriger Längenänderung der Seidenfibringerüste im geschwollenen Zustand. Die Streckgrenze oder Yield Punkt wird als Übergang vom linear elastischen Verhalten zum Auftreten erster plastischer Verformungen betrachtet. Die prozentuale Angabe der Längenänderung entspricht der Formveränderung gegenüber der Ausgangshöhe ($d = 3.5 \text{ mm}$). Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2 relativ zur Probe BM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Das Stauchungsverhalten der verschiedenen Seidenfibringerüste variiert stärker und verhält sich umgekehrt proportional zu den E-Modul-Werten (Abb. 3-57A). Reine Fibringerüste und BM-coll weisen aufgrund ihrer ähnlichen E-Modul-Werte auch ein gleichartiges Dehnungsverhalten ($\sim 4 \%$) bei einer Spannung von 0.0020 N/mm^2 auf (Abb. 3-58). Ausgehend davon nimmt die Längenänderung der zusammengesetzten Gerüststrukturen zu und erreicht sein Maximum mit 12% bei BM-SSP. Letzteres zeigt im Vergleich zu den übrigen Seidenfibringerüsten eine erhöhte Verformung bei einer geringeren Spannung (0.0140 N/mm^2) (Abb. 3-58). Die erfasste Längenänderung des zusammengesetzten Gerüsts aus Spidroin (BM-SSP) korreliert mit dem niedrigen E-Modul ($\sim 5 \text{ kPa}$; Abb. 3-57A) und liegt näherungsweise im Bereich der Cryogelsynthesen bei -80° C (Experiment 3 und 4) bzw. verringerter PEGda-Konzentration (Experiment 5, siehe Kapitel 3.1).

3.3.2 Eignung unterschiedlicher Seidenfibroingerüste zur Kultivierung von Prostatakrebszellen

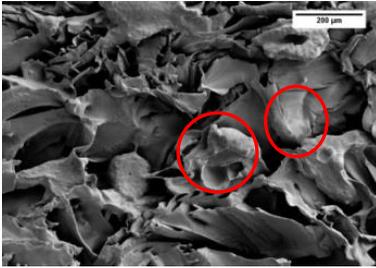
Die in Kapitel 3.3.1 erworbenen Kenntnisse hinsichtlich der charakteristischen Eigenschaften der Seidenfibroingerüste bilden die Grundlage für die nachfolgenden Ergebnisse der Zellkulturrexperimente. Basierend auf dem extrahierten Fibroin des Seidenspinners *B.mori* und unter Verwendung verschiedener natürlicher Komponenten (Kollagen, Gelatine, Chitosan, Seidenfibroin aus *A.pernyi* und rekombinantes Seidenspidroin; Protokolle siehe Kapitel 2.2) wurde die Struktur und die mechanischen Merkmale der Seidenfibroingerüste untersucht und in einen Kontext mit den spezifischen Eigenschaften der Cryogelen gestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Zellkultivierung der Prostatakrebszelllinie LNCaP innerhalb der einzelnen Seidenfibroingerüste aufgeführt und bezüglich des Wachstumsverhaltens, ausgehend von einer Zellzahl von 100.000, der Sphäroidbildung und deren Verteilung bewertet. Dabei steht die Verwendung von qualitativen (z.B. Rasterelektronenmikroskopie) und quantitativen Untersuchungsmethoden (z.B. Viabilitätsassay) im Fokus.

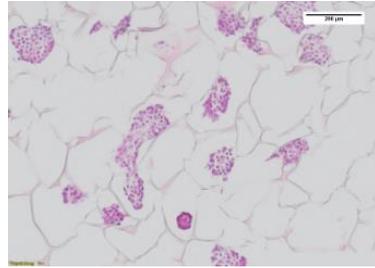
Die mikroskopische Auswertung der gebildeten Sphäroide sowie deren strukturellen Beschaffenheit auf zellulärer Ebene wird in den Abbildungen 3-59A und B aufgeführt. Die teils dichte und ungleichmäßige Oberflächenstruktur erschwerte die Detektion der Zellsphäroide, wodurch die Auswahl der zur Verfügung stehenden Abbildungen begrenzt wurde. Mit Hilfe der REM- und HE-Aufnahmen konnten sowohl Sphäroide, eingebettet im Porensystem (BM-coll und BM-gel), als auch flächige Zellausläufer (BM) beobachtet werden (Abb. 3-59A). Im Gegensatz dazu weisen die zusammengesetzte Seidenfibroingerüste aus Chitosan (BM-chi) sowie aus dem Seidenfibroin *A.pernyi* und Chitosan (AP-BM-chi) gleichmäßigere Sphäroidstrukturen auf (Abb. 3-59A). Letzteres kann mit den ermittelten Werten zur Porosität und Porendurchmesser in Zusammenhang gebracht werden (Abb. 3-54A und B, siehe Kapitel 3.3.1).

BM

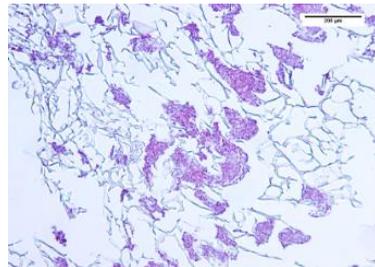
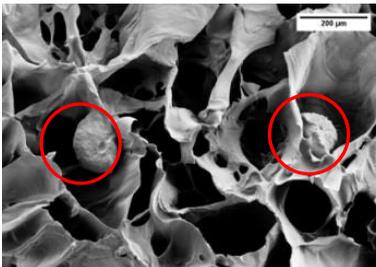
A



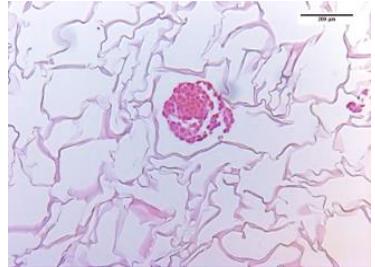
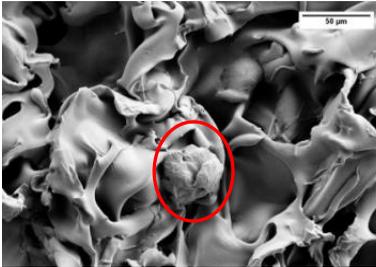
B



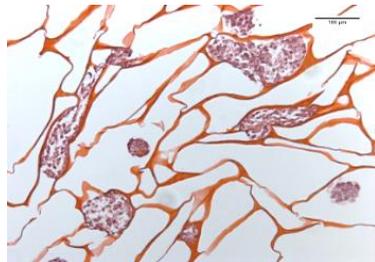
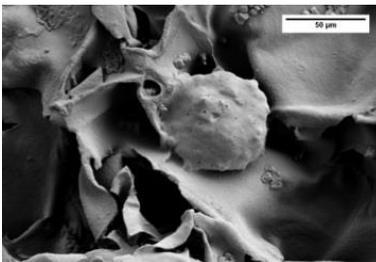
BM-coll



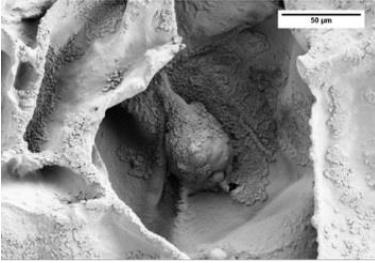
BM-gel



BM-chi



AP-BM-chi



BM-SSP

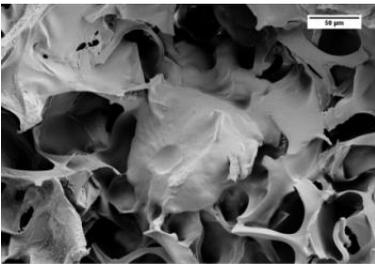
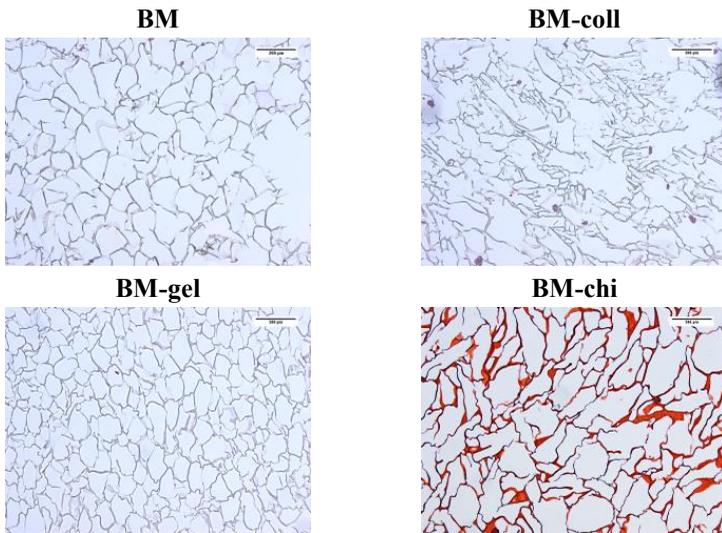


Abb. 3-59: Mikroskopische Betrachtung der Sphäroidstrukturen nach 14 Tagen Kultivierung. **A)** REM-Aufnahmen der SF-Gerüste mit fixierten LNCaP-Sphäroiden. BM, BM-coll in 100facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung, BM-gel, BM-chi, AP-BM-chi, BM-SSP in 300facher (Maßstabsbalken 50 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden mit einer 2.5%igen GA-Lösung für 20 min fixiert, bei RT getrocknet und anschließend mit Silber-Ionen bestäubt. **B)** HE-Färbung fixierter LNCaP-Sphäroide. BM, BM-coll, BM-gel in 10facher (Maßstabsbalken 200 µm) Vergrößerung, BM-chi, AP-BM-chi, BM-SSP in 10facher (Maßstabsbalken 100 µm) Vergrößerung. Die Proben wurden für 24 h mit einer 3.7%igen Formalinlösung fixiert [Bäc2017].

Verglichen zu den REM-Aufnahmen, verschaffen die mit Hämatoxylin und Eosin eingefärbten histologischen Schnitte (Schnittdicke 7 µm) einen detaillierteren Eindruck zur Verteilung und Zusammensetzung der Sphäroidstrukturen (Abb. 3-59B). Entsprechend der Cryogelstrukturen in Kapitel 3.2, passen sich die Sphäroide der Seidenfibroingerüste ebenfalls an die Porenformen an und kleiden diese fast vollständig aus (BM-chi, Abb. 3-79B). Im

Fall der Proben mit Chitosan-Anteil nimmt das Porengerüst besonders stark die Färbung mit Eosin an (Abb. 3-59B).

Im Vergleich zu den Tomographiescans aus Kapitel 3.3.1 (Abb. 3-53) werden in Abbildung 3-60 HE-gefärbte Probenschnitte von Seidenfibroingerüsten im annähernd feuchten Zustand gezeigt. Im Gegensatz zu den gefärbten Cryogelschnitten aus Kapitel 3.2, erscheinen die Seidenfibroingerüste gleichmäßiger, was auch über die morphologische Charakterisierung gezeigt werden konnte (Abb. 3-51/3-53, siehe Kapitel 3.3.1). Bei Betrachtung der Probenschnitte können eindeutige Parallelen zwischen der inneren Porenstruktur reiner Seidenfibroingerüste (BM), zusammengesetzt mit Gelatine (BM-gel) und mit Spidroin (BM-SSP) gezogen werden. Wobei die Porenform und charakteristische Färbung der auf Chitosan basierten Gerüste eine Ausnahme darstellt.



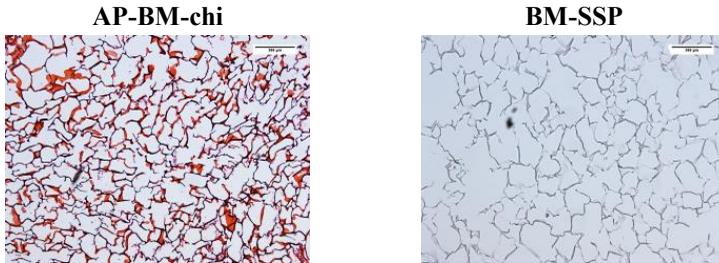


Abb. 3-60: HE-Färbungen der Seidenfibroingerüste ohne Zellen. Die histologischen Schnitte wurden als Kontrolle zu den Zellkulturexperimenten mitgeführt und auf die gleiche Weise behandelt sowie anschließend gefärbt. In 5facher Vergrößerung (Maßstabsbalken 200 μm).

Das Wachstumsverhalten der LNCaP-Zellen während der 14tägigen Kultivierung wird in den beiden Abbildungen 3-61A und B zusammengefasst. Auffallend ist zunächst das nach sieben Kultivierungstagen bereits eine starke Zellzahlzunahme stattfand, welche von den gemessenen Werten der Cryogelproben deutlich abweicht (siehe Kapitel 3.2.1/3.2.2). Dabei weisen die reinen Seidenfibroingerüste (BM) sowie in Verbindung mit Chitosan (BM-chi) die höchsten Messwerte auf (\sim Zehnfaches Zellwachstum), während AP-BM-chi die geringste Zellzahl aufzeigt (Abb. 3-61A).

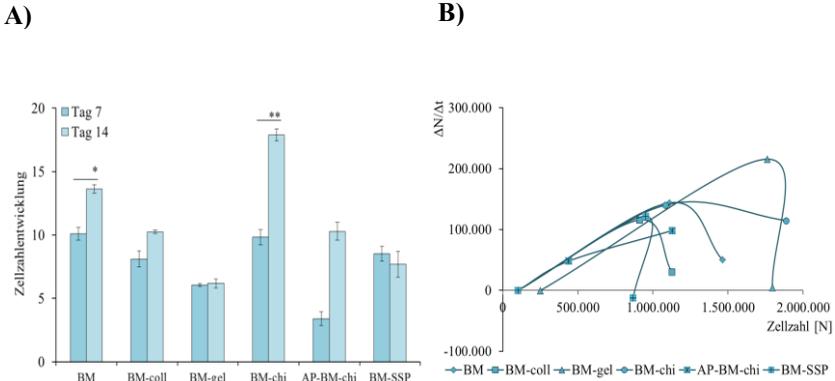


Abb. 3-61: Auswertung der Zellzahlentwicklung und momentanen Wachstumsrate innerhalb von 14 Kultivierungstagen. **A)** Die Zellzahlentwicklung bezieht sich auf eine Ausgangszellzahl von 100.000 (Ausnahme BM-gel mit einer Ausgangszellzahl von 250.000) [Bäc2017]. **B)** Momentane Wachstumsrate bezogen auf die Zellzahl, welche sich zu einem bestimmten Zeitpunkt einstellt (Tag 7 und 14). Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Im weiteren Verlauf des Experimentes setzte bei allen Seidenfibröngerüsten eine abfallende Wachstumsrate ein, welche im Fall der Fibröinzusammensetzung mit Spidroin (BM-SSP) zu einer verringerten Zellzahl um das 0.1fache gegenüber Tag sieben führte (Abb. 3-61A und B). Dagegen konnten die Proben BM, BM-coll (Kollagen) und BM-gel (Gelatine) trotz einer rückläufigen Wachstumsrate eine Zellzunahme verzeichnen. Bei den Seidenfibröngerüsten mit Chitosan-Anteil (BM-chi und AP-BM-chi) wurde der stetigste Wachstumsverlauf beobachtet, welcher im Fall von AP-BM-chi sogar eine Verdopplung der Zellzahl von Tag sieben auf Tag 14 zur Folge hatte (Abb. 3-61A und B).

Die erfasste Gesamtanzahl an Sphäroiden und deren Gesamtfläche verteilt über zwei Ebenen wird in den Abbildungen 3-62A und B dargestellt. Im Vergleich zu den ermittelten Sphäroidmengen der Cryogelproben im Rahmen der vorhergehenden Analysen, wurde eine deutlich höhere Anzahl innerhalb

der Seidenfibroingerüste erfasst (Abb. 3-62A). Der größte Anteil an Sphäroiden verteilt sich allerdings im oberen Bereich der Proben, was insbesondere die reinen Seidenfibroingerüste BM ($\cong 89\%$ der Gesamtmenge), BM-coll ($\cong 80\%$ der Gesamtmenge) und BM-chi ($\cong 87\%$ der Gesamtmenge) betrifft.

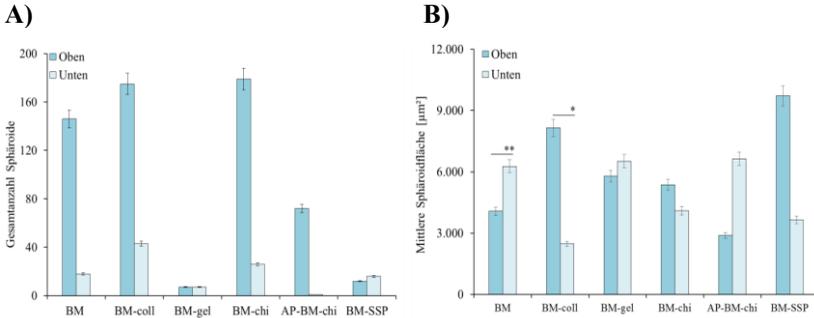


Abb. 3-62: Bestimmung der LNCaP-Sphäroidanzahl und -fläche nach 14 Tagen Kultivierung. **A)** Verteilung der erfassten Sphäroide über drei Ebenen (oben und unten). **B)** Vergleich der mittleren Sphäroidflächen über zwei Ebenen (oben und unten) [Bäc2017]. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus je drei unabhängigen Messungen und die Fehlerbalken dem Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte über den ungepaarten T-Test Typ 2, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dagegen wurde die geringste Anzahl mit 28 gemessenen Sphäroiden bei BM-SSP (Seidenfibroin und Spidroin) und mit 14 Sphäroiden bei BM-gel (Seidenfibroin und Gelatine) bestimmt (Abb. 3-62A). Gegenüber den durchschnittlichen Sphäroidflächen der Cryogelproben (zwischen 7.000 und 18.000 μm^2 , Kapitel 3.2.1 und 3.2.2), fallen die Werte der Seidenfibroingerüste sehr viel geringer aus und nehmen lediglich einen Bereich von 2.500 bis 10.000 μm^2 ein (Abb. 3-62B). Die größten Werte im oberen Bereich wurden bei den zusammengesetzten Gerüsten aus Kollagen (BM-coll) und Spidroin (BM-SSP) mit ca. 10.000 μm^2 ermittelt. Im Gegensatz zu den reinen Seidenfibroingerüsten und AP-BM-chi ($\sim 6.000 \mu\text{m}^2$), nimmt die durchschnittliche Sphäroidfläche vom oberen zum unteren Probenbereich ab, wobei BM-coll und BM-SSP die kleinsten Werte aufweisen ($\sim 3.000 \mu\text{m}^2$, Abb. 3-62B). Letztgenanntes stellt eine Verringerung der durchschnittlichen Sphäroidflä-

che von ca. 70 % dar. Generell konnten im Rahmen der Messungen keine Sphäroide mit hypoxischen Zellbereich detektiert werden, was höchstwahrscheinlich aus der durchschnittlichen Größe von $5.500 \mu\text{m}^2$ resultiert (Cryogele mit hypoxischen Zellbereich ab $15.000 \mu\text{m}^2$, Abb. 3-37B, siehe Kapitel 3.2.1).

4 Diskussion

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung eines dreidimensionalen Zellgerüstträgers auf Cryogelbasis, welcher als Alternativmethode bzw. ergänzendes Verfahren in der Prostatakrebsforschung zur Bearbeitung biologischer Fragestellungen geeignet ist. Im Verlauf der Etablierungsarbeit wurde an konkreten Beispielen die Variabilität der charakteristischen Porenstruktur einschließlich der mechanischen Eigenschaften veranschaulicht und deren Einfluss auf die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 aufgezeigt. So konnten in der vorliegenden Arbeit die Anforderungen und auch Auswirkungen des 3D Modellsystems anhand spezifischer Analysen belegt werden.

4.1 Einfluss der Porenstruktur

Zur Kultivierung multizellulärer Sphäroide kann im Allgemeinen zwischen einer Gerüst-freien bzw. Suspensionskultur und einer Matrix-basierten Kultivierung unterschieden werden (siehe Kapitel 1.5.1). Dabei bildet das dreidimensionale, interkonnektive Porensystem eines auf Cryogelierung basierten polymeren Gels die Grundlage für ein Tumorsphäroidmodell. Die miteinander verbundenen Poren agieren wie ein kapillares Netzwerk und schaffen so die Voraussetzung für eine beständige Zufuhr an Nährstoffen bei gleichzeitiger Entfernung von Stoffwechselmetaboliten bzw. Abfallprodukten. Auf diese Weise wird die Lebensfähigkeit der Zellen innerhalb der Gerüststruktur gewährleistet. Das makroporöse Porennetzwerk der Cryogele kann durch eine Vielzahl an Parametern, wie z.B. die Monomerkonzentration, beeinflusst werden und repräsentiert damit selbst eine entscheidende Einflussgröße [Sav2016].

In der vorliegenden Arbeit wurde über die Materialzusammensetzung der Cryogele, der Syntheszeit sowie der Temperatur die Porenform, -größe und -verteilung signifikant verändert. Auf Basis dieser Untersuchungen werden im Folgenden die jeweils erzielten Ergebnisse näher diskutiert.

4.1.1 Monomerkonzentration und Synthesetemperatur

Die Zusammenstellung der Reaktionskomponenten für den Aufbau der Cryogele wurde bereits in den Arbeiten von Singh und Kollegen aus dem Jahr 2013 angewandt [Sin2013]. Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Experimenten wurde im Rahmen dieser Studie die dreidimensionale Cryogelumgebung zur Nachahmung des nativen Lungengewebes einschließlich der Kultivierung von Lungenepithelzellen zur Bildung spezifischer EZM-Komponenten eingesetzt. Neben *in vitro*-Studien, innerhalb derer die Gerüststrukturen Mäusen implantiert wurden, konnte im Rahmen der *in vitro*-Experimente nach ca. 14 Tagen ein Wachstumsrückgang der humanen Lungenepithelzellen beobachtet werden. Letzteres wurde mit einer reduzierten Oberfläche gegenüber herkömmlichen Kultivierungsbedingungen begründet.

Die verwendete Polymerkombination besteht aus den natürlichen Bestandteilen Alginate (*hier*: Natriumalginate) und Gelatine sowie der synthetischen Substanz Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), welche untereinander über die Cross-Linker Glutaraldehyd bzw. PEGda vernetzt sind (siehe Kapitel 2.1). Im Fokus der Untersuchungen stand die Manipulation der Porenstruktur hervorgerufen durch eine direkte Veränderung der Monomer- oder Cross-Linkerkonzentration sowie der Abwandlung der Reaktionszeit/-temperatur und der anschließenden Überprüfung als geeigneter Zellgerüstträger.

In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass durch die Auswahl der Komponenten und angesetzten Konzentrationsverhältnisse die Herstellung stabiler 3D Cryogelgerüste mit einem ausgebildeten Porensystem möglich ist. Mit zunehmender Monomerkonzentration der natürlichen Bestandteile konnte die Homogenität der Porenstruktur wesentlich verbessert werden. Bei einer Konzentration von 2 % w/v (Alginate bzw. Gelatine) wurde näherungsweise eine einheitliche Porenform und -größe ($\sim 30 \mu\text{m}$) erzeugt, deren Reproduzierbarkeit im Rahmen anschließender Versuche ebenfalls bestätigt werden konnte. Der poröse Aufbau kann auf folgende Gründe zurückgeführt werden. Zum einen wird während der Cryogelsynthese durch die Erhöhung der Komponentenkonzentration in der nicht-gefrorenen Flüssigkeit

sigkeitsphase die Polymerreaktion beschleunigt, welche die Bildung von festeren und stabileren Porenwänden verursacht. Zum anderen ruft die Anwesenheit von Alginat bzw. Gelatine zu gleichen Anteilen eine typische Faserstruktur mit wabenähnlichen Porenformen hervor (Abb. 3-1, siehe Kapitel 3.1.2) [Cho1999]. Im Gegensatz dazu konnte durch die Verdopplung der HEMA-Konzentration kein Porensystem geschaffen werden, welches den zuvor gesetzten Anforderungen entsprach. Zwar wurden durch die physikalischen Untersuchungen sehr gute Werte hinsichtlich der Gesamtporosität und dem Porenvolumen erzielt, aber die dichtere Porenstruktur ließ ein Sphäroidwachstum nur geringfügig zu (siehe Kapitel 3.2.1). Es kann also angenommen werden, dass ohne direkte Zelleinschließung (*engl.* Cell encapsulation, siehe Kapitel 1.2.1) eine ausreichende Porengröße für die Zellaufnahme vorhanden sein muss.

Mit einer Ausgangszellzahl von $2.5 \cdot 10^5$ konnten Zellkultivierungsexperimente bis zu drei Wochen durchgeführt werden. Währenddessen wurde eine stetige Wachstumszunahme beobachtet. Angesichts der ansteigenden Zellzahl konnte eine ausreichende Versorgung über das Porennetzwerk vorausgesetzt werden. Auf Basis der Cryogelzusammensetzung mit einer Alginat- bzw. Gelatine-Konzentration von 2 % w/v und einem HEMA-Anteil von 3.5 % v/v wurde untersucht, inwiefern eine Stimulation der Androgen-sensitiven Zelllinie LNCaP mit DHT möglich war. Parallel dazu wurde die PSA-Konzentration im Medium bestimmt, welche ebenfalls ein charakteristisches Merkmal der verwendeten Prostatakarzinomzelllinie ist. Es konnte gezeigt werden, dass in Folge der Hormonbehandlung ein positiver Effekt auf das Proliferationsverhalten ausgeübt wurde und dieses mit einer erhöhten PSA-Konzentration, freigesetzt in das umliegende Medium, korrelierte (Abb. 3-32B, siehe Kapitel 3.2.1). Die erfassten Ergebnisse stimmten demnach mit den Beobachtungen der 2D Zellkultur überein und bestätigten gleichzeitig die Durchlässigkeit des Porensystems für gelöste Stoffe. Auf diese Weise wurde anhand der ausgewählten Materialzusammensetzung belegt, dass neben der Kultivierung der Zellen auch eine Behandlung mit Boten- bzw. Signalstoffen möglich ist und die Freisetzung dergleichen nachgewiesen werden kann.

Des Weiteren konnte die Abhängigkeit des Porensystems von der Reaktionszeit und -temperatur experimentell ermittelt werden. Nicht nur die Materialzusammensetzung bestimmt den grundlegenden Aufbau des Cryogelgerüsts, sondern auch die Gelbildung bei einer spezifischen Temperatur. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Herstellungsverfahren beruht auf vorangegangene Versuchsreihen [Bäc2013], in welchen eine Gefrierzeit von 24 h bei einer Gefriertemperatur von -21 °C als ideale Syntheseparameter festgelegt wurde. Dennoch sollte die Bedeutung der Konstanten für den strukturellen Aufbau veranschaulicht werden um gleichzeitig den Einfluss auf die kultivierenden Zellen untersuchen zu können. Generell verursacht das Einfrieren des Reaktionsgemisches die Entstehung eines Zweiphasensystems, in welchem die gelösten Monomere durch die Eiskristallbildung in eine nicht-gefrorene Flüssigkeitsphase verdrängt werden. Dort erfolgt die Polymerisation zum Gel, welches von einem verzweigten Kristallnetz umgeben ist. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass bei einer Temperatur oberhalb des Gefrierpunktes (bei RT und bei $+4\text{ °C}$) ein Hydrogel gebildet wird, dessen strukturelle Merkmale sich grundlegend von denen des Cryogels unterscheiden (siehe Kapitel 3.1.2). Unabhängig von der Reaktionszeit (zwischen 1 und 24 h) wurde bei einer Gefriertemperatur weit unterhalb des Gefrierpunktes (-80 °C) ein poröses Netzwerk gebildet, dessen Polymerisationsgeschwindigkeit deutlich durch die gewählte Temperatur beeinflusst wurde. Folglich entstanden Cryogele mit verringertem Porendurchmesser umgeben von sehr schmalen Porenwänden ($\sim 15\text{ }\mu\text{m}$, siehe Kapitel 3.1.2). Dieser Effekt resultiert zum einen aus der beschleunigten Erstarrung des Lösungsmittels (Wasser), was vermehrt zur Bildung kleinerer Eiskristalle führt und zum anderen aus der verzögerten Reaktionskinetik, bedingt durch eine geringere Energie der reagierenden Monomere [Oel2016]. Letztgenanntes führte zwangsläufig zu einer instabileren Polymerstruktur, welche sich nicht nur negativ auf die Festigkeit der Probe, sondern auch auf das Verhalten der Zellen (LNCaP) auswirkte. Die so entstandenen Kultivierungsvoraussetzungen ermöglichten keine verbesserten Wachstumsbedingungen und zwangen die Zellen zu einer deutlich abweichenden Sphäroidform (siehe Kapitel 3.2.2). Diesem unerwünschten Effekt wurde durch die Festlegung von -21 °C als Gefriertemperatur entgegengewirkt. In der Annahme, dass die Reaktionszeit bei einer Synthese von -21 °C eine bedeutendere Rolle spielt, wurde die Gefrierzeit

von 24 h auf 1 bzw. 5 h reduziert. Es zeigte sich auch an dieser Stelle, dass für die Herstellung der Cryogele ein Zeitraum von mindestens 12 bis 24 h einzuplanen ist. Je kürzer die Gefrierzeit gewählt wurde, desto weniger Eiskristalle konnten sich bilden und zu einem Netzwerk heranwachsen. Folglich traten verstärkte Porenwände bis zu 120 μm sowie kleinere Porendurchmesser ($\sim 5 \mu\text{m}$) auf, welche den wachsenden Sphäroiden nicht genügend Hohlraum zur Verfügung stellen konnten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass sowohl die eingesetzten Reaktionskomponenten als auch die Syntheseparameter (Gefrierzeit und -temperatur) die Möglichkeit bieten, die charakteristische Porenstruktur der Cryogele signifikant zu verändern. In diesem Zusammenhang wurde eine anwendungsspezifische Materialzusammensetzung für eine Cryogelstruktur erarbeitet, welche am Beispiel der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP die aussagekräftigsten Ergebnisse lieferte und damit den Anforderungen eines einsetzbaren 3D Zellkultursystems gerecht wurde.

4.2 Einfluss der Elastizität

Gerüst-basierte Modellsysteme besitzen im Allgemeinen den Vorzug, die Porenstruktur auf Grundlage der Polymerkonzentration sowie der Syntheseparameter zu variieren. Sowohl der poröse Aufbau als auch die mechanische Festigkeit der Cryogele kann nicht losgelöst voneinander betrachtet werden. Beides agiert im Einklang, d.h. wird auf die oben beschriebene Art und Weise das Porensystem verändert, führt dies zwangsläufig zu einer Umwandlung der elastischen Merkmale. Wie so viele etablierte Karzinomzelllinien wurde auch die Prostatakrebszelllinie LNCaP unter herkömmlichen 2D Kultivierungsbedingungen untersucht, wodurch ein grundlegendes Verständnis bezüglich der Krebsbiologie gesammelt werden konnte. Allerdings sind Zellen im nativen Gewebe in einer dreidimensionalen Struktur eingebettet, von welcher nicht nur struktureller Halt sondern auch chemische und mechanische Signale ausgehen [Cuk2002]. *In vitro*- und *in vivo*-Studien konnten bestätigen, dass die Festigkeit des umliegenden Gerüsts einen wesentlichen Einfluss auf das Zellverhalten ausübt [Til2012; Ban2009].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die elastischen Eigenschaften der Cryogele neben der Porenstruktur, hervorgerufen durch veränderte Synthesebedingungen, auch mit Hilfe abgewandelter Cross-Linker-Konzentration beeinflusst. Letzteres hat gegenüber der Gefrierzeit und -temperatur wesentlich signifikantere Auswirkungen auf die Elastizität der Gerüste. Vorab wurde hierfür die Auswahl der geeigneten Quervernetzer getroffen. In einer separaten Versuchsreihe wurde auf Basis der oben beschriebenen Materialzusammensetzung die Auswirkung von PEGda, als Cross-Linker der HEMA-Polymerketten im Zuge der radikalische Co-Polymerisation, untersucht. Gemäß der Fülle an Experimenten wurde auf zusätzliche Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Glutaraldehyd, als Vernetzer zwischen Gelatine und Alginat, verzichtet. Wenngleich auch in den Arbeiten von Tripathi und Kollegen die Wirkung von Glutaraldehyd, als ein möglicher Vernetzer zwischen Gelatine und Alginat, in Bezug auf die Cryogelstruktur sowie auf die kultivierenden Zellen, aufgezeigt werden konnte [Tri2013].

Anhand konkreter Beispiele konnte die Abhängigkeit der mechanischen Festigkeit von der porösen Gerüststruktur über die Bestimmung des Elastizitätsmoduls im nassen Zustand veranschaulicht werden. Im Allgemeinen gilt, dass mit zunehmender Netzwerkdicke, d.h. eine Verringerung der Durchschnittporengröße und Zunahme der Porenwanddicke, die mechanische Festigkeit der Cryogele zunimmt ($E\text{-Modul} \gg 0$) [Bäc2016]. Letzteres schließt dabei eine Reduzierung der Elastizität ein. Im Gegensatz dazu bewirkt eine erhöhte Porosität inklusive größerer Poren eine verbesserte Flüssigkeitsadsorption, was gleichzeitig die elastischen Fähigkeiten fördert. Die radikale Polymerisation einzelner PEGda-Monomere zum Polymer wird durch die Zugabe von APS als Polymerisationsinitiator und TEMED als Polymerisationskatalysator eingeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass sich die E-Modul-Werte durch die Verdopplung bzw. Halbierung der ursprünglichen PEGda-Konzentration (5 % v/v) entsprechend erhöhten bzw. verringerten. Ersteres kann auf die beschleunigte Polymerisation gegenüber der Eis-Nukleation zurückgeführt werden, welche zu einer Verdichtung des Porensystems und Verfestigung der Cryogelstruktur führt. Umgekehrt verursachte eine geringe PEGda-Konzentration die Verzögerung der Polymerisation und hemmte zugleich die Vernetzung der PHEMA-Ketten, was zu annähernd

identischen Elastizitätseigenschaften wie bei geringer Gefriertemperatur (-80 °C) zur Folge hatte. Auf Grundlage dieses Wissens kann die mechanische Festigkeit der Cryogele anwendungs- bzw. zellspezifisch angepasst werden.

Im Fokus der Untersuchungen stand weiterhin die Überprüfung des Zellverhaltens infolge veränderter Elastizitätseigenschaften. In diesem Zusammenhang wurden die Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 miteinander verglichen. Unter Berücksichtigung der zellulären Abstammung (PC3 aus Knochenmetastase, LNCaP aus Lymphknotenmetastase) wurde angenommen, dass eine Veränderung der Cryogelsteifigkeit das Wachstumsverhalten bzw. die Sphäroidformation und -größe beeinflusst. In zahlreichen Studien wurde sich mit den Auswirkungen der Materialsteifigkeit auf die Zellmorphologie sowie dem Proliferationsverhalten auseinandergesetzt. Allerdings beruht die Mehrzahl auf dem Prinzip der Zelleinschließung in Hydrogelbasierten Modellsystemen bzw. Basalmembranartigen Matrices (z.B. Matrigel, Alvetex und Cultrex BME) sowie der Zellaussaat auf dünnen Polymer-schichten [Sie2014; Edm2016; Win2012]. Angesichts der abweichenden Kultivierungsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit ist es nahezu unmöglich einen direkten Vergleich der Ergebnisse durchzuführen. So konnte im Fall der LNCaP-Zellen festgestellt werden, dass unabhängig von der Materialzusammensetzung in einem E-Modul-Bereich zwischen 20 und 40 kPa ein vergleichbares Proliferationsverhalten und Sphäroidgrößenverteilung auftrat. Dagegen wurden bei einer erhöhten Elastizität (E-Modul zwischen 1 und 20 kPa) bzw. Festigkeit (E-Modul > 40 kPa) vermehrt kleine Sphäroide nachgewiesen (siehe Kapitel 3.2.1/3.2.2). Es ist zu vermuten, dass durch die instabile Struktur der Cryogele die Zellaussaat teils missglückt war bzw. die Zellanheftung durch die verringerte Festigkeit erschwert wurde. Wohingegen die mechanisch festeren Gerüste ein reduziertes Hohlraumvolumen aufgrund ihrer Porenstruktur aufwiesen und demzufolge das Wachstum der Sphäroide hemmten. Diese Beobachtungen stehen jedoch im Gegensatz zu der Arbeit von Sieh *et al.*, in welcher eingeschlossene LNCaP-Zellen in PEGda-Hydrogelen die höchste Proliferationsrate unterhalb von 10 kPa aufzeigten [Sie2012].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten wurde im Rahmen dieser Untersuchungen widersprüchliche Reaktionen der PC3-Zelllinie festgestellt [Win2012]. Unter der Annahme, dass die Bildung von Sphäroiden und deren Häufigkeit eher in mechanisch festeren Cryogelen auftreten müsste, zeigte sich ein „Steifigkeits-unabhängiges“ Zellverhalten. Unabhängig von der Materialzusammensetzung konnte weder in weicheren (E-Modul < 2 kPa) noch in steiferen Cryogelproben (E-Modul zwischen 25 und 60 kPa) Zellanhäufungen, entsprechend der kompakten LNCaP-Sphäroide, nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.3). Es wurden lediglich Zellschichten entlang der Porenwände bis Trauben-ähnlichen Zellansammlungen erfasst. Vergleichbare Ergebnisse zeigt die Arbeit von Fitzgerald und Kollegen, wobei in diesem Fall sowohl LNCaP- als auch PC3-Zellen keine Sphäroide innerhalb eines auf Kollagen-basiertem Gerüst bildeten [Fit2015]. Neben der abweichenden Zellmorphologie konnte auch ein verändertes Proliferationsverhalten erfasst werden. Angesichts der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit ein Cryogelgerüst bestehend aus drei Komponenten verwendet wird, können die auftretenden Reaktionen auf folgende Gründe zurückgeführt werden. Zum einen könnten die neuen Wachstumsbedingungen, ausgelöst durch die Cryogele, eine verzögerte Anpassung der PC3-Zellen hervorrufen, welche höchstwahrscheinlich bei einer längeren Kultivierungsdauer vernachlässigbar wäre. Letztgenanntes resultiert aus der verlangsamten Wachstumsgeschwindigkeit der LNCaP-Zellen während der ersten Kultivierungswoche (siehe Kapitel 3.2). Auch in der Publikation von Wang und Kollegen zeigte sich erst nach einer 14tägigen Kultivierung die Ausbildung von sphäroidalen Strukturen [Wan2015]. Zum anderen ist es möglich, dass die unterschiedlichen Cryogelfestigkeiten im Zusammenhang mit der offenporigen Struktur einen negativen Einfluss auf die Zellmorphologie ausüben. Im Gegensatz zur Zellaussaat auf einer flachen Hydrogelstruktur oder eingeschlossen in ein polymeres Gel, beeinflusst die mechanische Festigkeit der Cryogele die Zellen auf eine andere Art und Weise. Letzteres sollte durch ergänzende Experimente untersucht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die elastischen Eigenschaften der Cryogelstrukturen sowohl vom Aufbau des Porensystems und somit von den eingestellten Synthesebedingungen als auch von der festgelegten Materi-

alzusammensetzung abhängen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Auswahl und Konzentration des Cross-Linkers. Im Vergleich zur Gefrierzeit und -temperatur, wirken sich bereits geringfügige Veränderungen des Cross-Linker-Anteils signifikant auf die Porenstruktur aus. Es konnte weiterhin dargelegt werden, dass die Sensitivität von LNCaP-Zellen gegenüber veränderten Elastizitäten sehr geringfügig ist und die veränderten Sphäroidformen vorwiegend ein Resultat der verschiedenen Porenstrukturen sind. Das Verhalten von Krebszellen sich in einer dreidimensionalen Umgebung zu Aggregaten zusammenzuschließen, konnte im Fall der PC3-Zellen nicht nachgewiesen werden und beruht womöglich auf einer zu geringen mechanischen Festigkeit der Cryogele.

4.3 Einfluss der RGD-Sequenz

Bei der Verwendung verschiedener Monomere/Polymere spielen die Eigenschaften der einzelnen Komponenten eine entscheidende Rolle. Unter anderem beeinflussen die freien funktionellen Gruppen bzw. spezifische Adhäsionsmotive die Zellanheftung während der Zellaussaat, was schließlich den Erfolg des entwickelten Gerüsts ausmacht. Die Oligopeptidsequenz RGD, welche für die Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure steht, zählt zu den bekanntesten Zelladhäsionsmotiven. Über Oberflächenrezeptoren und/oder Integrine, welche in der Zellmembran verankert sind, können diese mit der umliegenden Umgebung in Wechselwirkung treten. Auf diese Weise kann der Zellkontakt mit der Gerüststruktur begünstigt werden. In unterschiedlichsten Studien konnte der positive Einfluss der RGD-Sequenz, entweder chemisch an ein Polymer (z.B. PEGda oder Alginat) gekoppelt oder in Form von Gelatine in einer zusammengesetzten Gerüststruktur verwendet, nachgewiesen werden [Zho2016; Dum2016]. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der RGD-Sequenz, als Teil der Proteinstruktur von Gelatine, auf das Zellverhalten der LNCaP- bzw. PC3-Zellen untersucht werden. Im Fall der verwendeten Cryogele wurden die freien Aminogruppen von Gelatine über Glutaraldehyd verlinkt, wodurch gleichzeitig die Polymerketten von Alginat eingeschlossen werden. Es war anzunehmen, dass mit steigender Konzentration der natürlichen Bestandteile ebenfalls die Zellwachstumsrate

zunimmt. Allerdings traten unabhängig von der Gelatine-Konzentration keine signifikanten Veränderungen bezüglich des Wachstumsverhaltens oder der Späroidmorphologie auf. Dieser unvorhergesehene Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Materialzusammensetzung bzw. der Art und Weise der Gelatine-Alginat-Kopplung zurückzuführen. Zum einen könnte es sein dass die Cryogelzusammensetzung die Adhäsionsmotive verdecken und somit eine optimale Zellanheftung behindern. Eine Möglichkeit dem entgegenzuwirken wäre ein Austausch des verwendeten Cross-Linkers (Glutaraldehyd) gegen Ethylcarbodiimid (EDC)/Hydroxysuccinimid (NHS). Im Gegensatz zu Glutaraldehyd kann die Kombination aus EDC/NHS Amidbindungen zwischen den freien Carboxygruppen von Alginat und den Amingruppen von Gelatine bzw. zwischen den Carboxy- und Amingruppen von Gelatine bilden. Des Weiteren können Esterbindungen zwischen den freien Carboxygruppen von Alginat, Gelatine bzw. Alginat und Gelatine geschaffen werden. Zum anderen gäbe es die Option Gelatine erst nach der Cryogelherstellung an Alginat zu binden. Dieses Verfahren führte auch in den Arbeiten von Petrenko und Kollegen zu einer Verbesserung der Zellanheftung [Pet2011]. Dennoch sollte auch in Betracht gezogen werden, dass zur Kultivierung der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP keine zusätzliche Funktionalisierung nötig ist, was wiederum mit den Arbeiten von Göppert *et al.* übereinstimmen würde [Göp2016]. In diesem Fall wurde ein rein auf synthetischem Material (PEGda) basierte Cryogelstruktur zur Kultivierung von LNCaP-Zellen verwendet. Obwohl PEGda bekannt für seine schwachen Zellanhaftungseigenschaften ist, war eine Funktionalisierung mit RGD-Motiven nicht notwendig.

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass sowohl die unterschiedlichen Gelatine-Konzentrationen im Laufe der Protokollentwicklung als auch die Abwesenheit des Proteins keine signifikanten Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der Zellen ausübte. Lediglich die Verbindung aus Alginat und Gelatine und deren gemeinsames Fehlen in der Materialzusammensetzung konnte ein verringertes Wachstum auslösen. Dennoch wären weitere Experimente nötig um eine eindeutige Aussage zu treffen.

4.4 Einfluss der Materialzusammensetzung

Neben der Etablierung eines geeigneten Cryogelgerüsts zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen, wurde eine Vergleichsstudie mit einem Modellsystem, welches auf rein natürlichen Materialien basiert, durchgeführt. Auf Grundlage von Seidenfibroin des Seidenspinners *B.mori* wurden unterschiedliche Gerüststrukturen entwickelt, welche aus den natürlichen Bestandteilen Kollagen, Gelatine, Chitosan, Seidenfibroin des Seidenspinners *A.pernyi* oder dem rekombinanten Protein Spidroin (Spinnenseide) zusammengesetzt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Cryogel-Technologie zur Herstellung der verschiedenen Seidenfibroingerüste verwendet und durch einen anschließenden Gefriertrocknungsschritt ergänzt. Ziel war es, die Auswirkungen der einzelnen Materialkomponenten auf die Struktur des reinen Seidenfibroingerüsts bzw. deren Eignung als Zellgerüsträger für die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP zu untersuchen.

Im Allgemeinen gelten die mechanischen Eigenschaften der Gele aus reinem Kollagen, Gelatine bzw. Chitosan als sehr schwach und instabil im feuchten sowie trockenen Zustand, was eine Verwendung im Bereich der Langzeitkultivierung, Hochdurchsatz-Screening (*engl.* High Throughput Screening, HTS) oder Tissue Engineering erschwert [She2008; Lu2009]. Demgegenüber stehen jedoch exzellente biokompatible Eigenschaften und das Potenzial als 3D Zellgerüstmaterial. Durch die Verbindung mit Seidenfibroin sollen die Schwächen der einzelnen Bestandteile (z.B. mechanische Eigenschaften) verringert werden und gleichzeitig deren Vorzüge positiv auf das Gerüst einwirken.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass durch die Gefriertrocknung ein homogeneres Porensystem gegenüber dem der Cryogele erzeugt werden konnte. Im Zuge der Gefriertrocknung wird der Zwischenschritt, in welchem das gefrorene Wasser bei Raumtemperatur schmilzt, vermieden (Sublimation). Ob die Cryogelgerüste für die Gefriertrocknung geeignet wären, könnte in weiteren Versuchsreihen untersucht werden. Generell ist jedoch die Herstellung der Seidenfibroingerüste, vom Entbasten der Seide bis zur Extraktion des Proteins, zeit- und arbeitsaufwendiger als die der Cryogele. Mit Hilfe der

durchgeführten Experimente konnte dargestellt werden, dass reine Seidenfibroingerüste eine blattähnliche Struktur mit knospenartigen Fasern bilden, welche auch nach der Ethanol-Behandlung bestehen bleibt. Während der Gelierung kommt es zur spontanen Selbstaggregation, wobei eine Umformung der Random Coil-Struktur zur β -Faltblatt-Konformation stattfindet. Letzteres wird durch den hohen Anteil an Glycin-Alanin-Wiederholungen begünstigt (siehe Kapitel 1.4). Bevor es jedoch zur Gelierung der Lösung kam, wurde dem extrahierten Seidenfibroin verschiedenen Proteine (Kollagen, Gelatine, Fibroin (*A.pernyi*) & Spidroin) und Polysaccharide (Chitosan) beigemischt. Folglich traten zwischen den Molekülen intermolekulare Wechselwirkungen auf. Dabei kann zwischen Wasserstoffbrückenbindungen, bevorzugt zwischen Seidenfibroin und Chitosan, und kovalenten Bindungen unterschieden werden. Kovalente Bindungen können wiederum in An- und Abwesenheit eines Cross-Linkers geformt werden. Im Fall der verwendeten Proteine wurde lediglich für die Zusammensetzung mit Gelatine der Cross-Linker Glutaraldehyd verwendet.

Durch die Verbindung mit den natürlichen Bestandteilen konnte sowohl die Porosität als auch die Durchschnittsporengröße erhöht werden (Abb. 3-54, siehe Kapitel 3.3.1). Im Fall von Chitosan wurde dies ebenfalls in den Arbeiten von Bhardwaj *et al.* nachgewiesen [Bha2011]. Mit Ausnahme von Seidenfibroin-Kollagen kam es in Folge der vergrößerten Poren zu einer Verbesserung der elastischen Eigenschaften, infolgedessen verringerte E-Modul-Werte aufgezeichnet wurden (Abb. 3-57, siehe Kapitel 3.3.1). Dieser Effekt kann auf die verstärkten Porenwände zurückgeführt werden, welche im Gegensatz zu den übrigen Gerüststrukturen bei der Verbindung mit Kollagen bereits vor der Ethanol-Behandlung fester erschienen. Auf diese Weise blieb die mechanische Festigkeit der Gerüste erhalten und wurde zu alledem minimal erhöht. Im Allgemeinen konnte während der Experimente festgestellt werden, dass gegenüber der Cryogelee die Seidenfibroingerüste über einen robusteren Aufbau verfügen. Dieser äußerte sich in erster Linie beim Übergang vom geschwollenen zum trockenen Zustand, wobei eine ausgeprägte Formstabilität nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren wurde vermutet, dass sowohl Chitosan als auch Kollagen und Gelatine infolge ihrer hydrophilen Eigenschaften das Schwellverhalten der reinen Fibroingerüste maßgeblich beeinflussen und auf diese Weise steigern können. Allerdings konnte allein bei der Kombination aus Seidenfibroin (*B.mori*) und Kollagen sowie in Verbindung mit dem rekombinanten Protein Spidroin eine deutliche Erhöhung der Wasseraufnahmefähigkeit beobachtet werden. Im speziellen Fall von Spidroin lagen diese Werte um das Vierfache höher (Abb. 3-56 und Tab. 3-9, siehe Kapitel 3.3.1). Dies widersprach den Arbeiten von Lu und Gobin *et al.*, in welchen die Zusammensetzung aus Seidenfibroin und Gelatine bzw. Chitosan die Schwellrate in flüssiger Umgebung steigerte [Gob2005; Lu2010]. Dagegen wurden in den Untersuchungen von Sun und Kollegen vergleichbare Ergebnisse erzielt [Sun2014].

Mit Hilfe von Gelatine und dem Seidenfibroin des Seidenspinners *A.pernyi* sollte zusätzlich die Zellanheftung und in dem Zusammenhang die Wachstumsrate der Zellen begünstigt werden. Im Gegensatz zu *B.mori* wurde in der Proteinstruktur des Fibroins von *A.pernyi* ebenfalls die zellanheftungsfördernde Tripeptidsequenz RGD nachgewiesen. Wie zuvor zeigte sich auch in den Zellkulturexperimenten keine wesentliche Verbesserung des Zellwachstums aufgrund der Anwesenheit von RGD gegenüber den reinen Fibroingerüsten. Dessen ungeachtet wurde generell bei allen Seidenfibroingerüsten eine sehr hohe Proliferationsrate gemessen, welche zunächst auf die dichten Zellstrukturen auf der Oberfläche der Gerüste zurückgeführt werden konnte. Im Vergleich zu den Cryogelen musste angesichts vorangegangener Untersuchungen die Vorgehensweise zur Sterilisation der Fibroingerüste verändert werden. Anfänglich diente als Sterilisationsmethode die Autoklavierung, welche jedoch zu einer Verdichtung der Oberflächenstruktur und Abnahme der Quellfähigkeit aufgrund der hohen Temperaturen führte. Infolgedessen bildete sich anstelle der gewünschten Sphäroide eine Monolayer-ähnliche Zellschicht aus, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führte. Dieser unerwünschte Effekt konnte durch die Behandlung mit UV-Licht (24 h) anstelle der Heißsterilisation und der Reduzierung der Ausgangszellzahl von $2.5 \cdot 10^5$ auf $1 \cdot 10^5$ minimiert werden. Im Gegensatz zu den Cryogelstrukturen erfolgte die Aufnahme der Zellsuspension trotz erhöhter Schwellrate der Seidenfibroingerüste, im Speziellen in Verbindung mit Kollagen und

Spidroin, verzögerter. Diese Beobachtung konnte später durch die Messung der Sphäroidanzahl bestätigt werden, in welcher eine erhöhte Anzahl an Sphäroiden im oberen Bereich erfasst wurde, die wiederum deutlich in den tieferen Arealen abnahm (Abb. 3-62, siehe Kapitel 3.3.2)

Prinzipiell konnte festgestellt werden, dass die Zusammensetzung von Seidenfibroin mit den natürlichen Substanzen Kollagen, Gelatine und Chitosan zu morphologischen Veränderungen der Gerüststruktur führte. Am auffälligsten waren diese Beobachtungen bei der Kombination aus Fibroin mit dem rekombinanten Protein Spidroin. Die Verwendung von Spidroin als Gerüstbestandteil sowie die Kultivierung von Prostatakrebszellen innerhalb dieser Proben stellt eine Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten des Strukturproteins dar. Normalerweise erfolgt die Herstellung von Spidroin-basierten Gerüsten über die Salt Leaching-Methode, Elektrosponnen oder Selbstgelierung zu flachen Hydrogelen oder Filmen [Sch2016; Zha2016; Sch2011]. Zusammen mit Fibroin des Seidenspinners *B.mori* wurde eine 3D Matrix erzeugt, welche durch ein interkonnektives Porensystem mit einer erstaunlichen Quellfähigkeit in flüssiger Umgebung und ausgeprägten elastischen Eigenschaften überzeugt. Zur weiteren Entwicklung sollte die Synthese und Untersuchung von unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Fibroin und Spidroin) sowie die Einführung weiterer Komponenten, z.B. Gelatine als Träger der RGD-Sequenz, eingeführt werden.

Im Gegensatz zur Herstellung der Cryogelgerüste, erwies sich die Etablierungsarbeit zur Synthese der Seidenfibroinstrukturen als herausfordernd. Neben der Entbastung der Seide und der anschließenden Proteinextraktion wurde bis zuletzt an einer geeigneten Probenform für die Gefriertrocknung gearbeitet. Mit dem Einsatz der 48-Well-Platte traten hin und wieder Schwierigkeiten auf, welche sich hauptsächlich auf die Homogenität der Gefriertrocknung beziehen. Aus diesem Grund war es mitunter notwendig die Gefriertrocknungszeit auf 48 h zu erhöhen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung einer geeigneten Cryogelstruktur aus unterschiedlichsten Materialien, welche als 3D Zellgerüstträger zur Kultivierung von Prostatakarzinomzelllinien eingesetzt werden kann und auf diese Weise herkömmliche Kultivierungsmethoden ergänzen bzw. ersetzen könnte. Parallel dazu wurde ebenfalls der Fokus auf die Entwicklung einer rein natürlichen Gerüststruktur gelegt, welche auf der Basis des Seidenstrukturproteins Fibroin des Seidenspinners *B.mori* aufgebaut wurde.

Schon seit einigen Jahren widmen sich die unterschiedlichsten Fachrichtungen der Entwicklung von 3D Modellsystemen, welche die gängigen aber Organismen-fernen Kultivierungsmethoden in einer zweidimensionalen Umgebung, z.B. auf einer Kulturschale aus fester Plastik, ablösen können. Dabei beruhen die unterschiedlichen Systeme auf einer künstlichen Umgebung, welche die natürlichen Bedingungen annähernd nachahmen können. Ein Teil dieser Entwicklungsarbeit kann bereits käuflich erworben werden und bietet dem Anwender eine kostenintensive Möglichkeit der 3D Zellkultur. Im Bereich der Krebszellforschung dienen multizelluläre Sphäroide (Zellaggregate) als geeignetes Modell zur Untersuchung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Diese dreidimensionale Struktur wird von Tumorzellen in Gerüst-freien aber auch in poröser Umgebung angenommen und stellt auf diese Weise *in vivo*-ähnliches Verhalten fester Tumore dar. Dabei spielt besonders die Interaktion mit der umgebenen Matrix eine entscheidende Rolle. Angesichts dieser morphologischen Veränderung treten gegenüber der 2D Kultivierung auch abweichende Verhaltensweisen der Zellen auf, welche die Proliferationsrate, das Auftreten von Nekrose und eine veränderte Genexpression betreffen können. Ein Großteil der bisher entworfenen Modelle basiert auf der Bildung von Sphäroiden in Gerüst-freier Umgebung oder eingebettet in einer Matrix, d.h. über direkte Zelleinschließung oder Zellaussaat. Zu den bekanntesten Beispiele zählen das Hanging-Drop-Modell, in welchem Sphäroide in einem hängenden Tropfen generiert

und anschließend in eine 96-Well-Platte überführt werden oder die Liquid Overlay-Technik, bei welcher Well-Platten mit einem nicht-adhäsivem Polymer (z.B. Agarose) beschichtet werden und die darauf ausgesäten Zellen Sphäroide bilden. Dagegen gehören Basalmembranartige Matrices, wie Matrigel bzw. Alvetex, sowie Gerüststrukturen auf Basis technischer Herstellungsmethoden (z.B. Elektrosponnen, 3D-Drucken) zu den Modellsystemen, welche den Einfluss der umgebenen Struktur berücksichtigen.

Im Fokus der Arbeit lag die Entwicklung einer geeigneten Materialzusammensetzung zur Herstellung von Cryogelen, welche zunächst zur Kultivierung der epithelialen Prostatakarzinomzelllinien LNCaP und PC3 diente. Dabei wurde dem charakteristischen Porensystem sowie den elastischen Eigenschaften eine besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Bevor die eigentliche Kultivierung innerhalb der 3D Strukturen stattfinden konnte, wurde mit Hilfe unterschiedlicher Ausgangskonzentrationen der Monomere (Alginat, Gelatine und HEMA) die Auswirkungen auf die Porenstruktur inklusive Porenform und -größe demonstriert und auf diese Weise die optimalste Zusammensetzung ermittelt. Ein entscheidendes Kriterium hierfür war ein nahezu homogenes Netzwerk, welches den Zellen eine hervorragende Umgebung zum Wachstum in sphäroidaler Form ermöglicht. Basierend auf diesem optimierten Herstellungsprotokoll konnte außerdem der Einfluss der Syntheseparameter, der Gefrierzeit und -temperatur, sehr ausführlich belegt werden. So wurde gezeigt, dass in Verbindung mit der entwickelten Komponentenzusammenstellung eine Gefrierzeit von mindestens 12 h, im Idealfall von 24 h, bei einer Gefriertemperatur von $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ die mechanisch stabilste Cryogelstruktur erzeugt. Unter diesen Voraussetzungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Eis-Nukleation des Lösungsmittels (*hier*: Wasser) bzw. der Bildung eines kristallinen Netzwerkes und der Polymerisation des Gels. Dies vermeidet sowohl die Entstehung zu dünner Porenwände und folglich einem sehr elastischen bzw. instabilen Cryogel (Gefriertemperatur $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) als auch zu dicker Porenwände und dem daraus resultierenden Verlust an Hohlraumvolumen (Gefrierzeiten unter 5 h bei $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Aufgrund des Zusammenspiels zwischen Porenstruktur und Elastizität des Gerüsts bewirkten die veränderten Syntheseparameter ebenfalls eine Modifikation der Cryogelfestigkeit. Letztere konnte jedoch mit der Cross-Linker-Konzentration gravierender beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass je höher die PEGda-Konzentration gewählt wird, sich die elastischen Eigenschaften der Cryogele verringerten und mechanisch festere Strukturen gebildet wurden. Dies beruht auf einer verstärkten Vernetzung der Polymerketten, infolgedessen die Porosität inklusive Porengröße abnahmen. Umgekehrt resultierte eine erhöhte Elastizität aus der geringeren Kopplung zwischen den Polymerketten, wodurch die Porengröße einschließlich des Porenvolumens zunahm. Infolge der Variabilität der Porenstruktur ist es möglich, die elastischen Merkmale verschiedenster Gewebe nachzuahmen und diese mit Hilfe der Cross-Linker-Konzentration exakt einzustellen. Angesichts dieser Beobachtung konnte belegt werden, dass die entwickelten Cryogelstrukturen hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften nicht auf das Anwendungsgebiet der Prostatakrebsforschung beschränkt sind, sondern auch Elastizitäten anderer Gewebe nachahmen können.

Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Seidenfibroingerüste zeigten zudem, dass allein durch die Kombination aus zwei verschiedenen Materialien, bei gleichbleibenden Syntheseparametern und ohne Cross-Linker-Anteil (ausgenommen Seidenfibroin-Gelatine), eine Veränderung der Porenstruktur hervorgerufen werden kann. So war es möglich die schwachen elastischen Eigenschaften der reinen Fibroingerüste zu verbessern und ebenso die Variabilität der auf Fibroin basierten Strukturen darzustellen. Im Vergleich zu den übrigen Seidenfibroinverbindungen, führte die Zusammensetzung mit dem rekombinanten Protein Spidroin zu den auffallendsten morphologischen und mechanischen Veränderungen. Gegenüber der Cryogelgerüste ist das Herstellungsverfahren zwar zeitaufwendiger, nichtsdestotrotz sind durch die Verarbeitung des Strukturproteins Fibroin (*B.mori*) ähnliche Anwendungsbereiche erkennbar. Mit Hilfe der Röntgenmikrocomputertomographie konnte zudem veranschaulicht werden, dass unter anderem der Gefriertrocknungsschritt für die Erzeugung eines sehr homogenen Porennetzwerkes verantwortlich ist.

Während der Kultivierung der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP konnte sowohl in den entwickelten Cryogelen als auch in den zusammengesetzten Seidenfibringerüsten ein stetiges Zellwachstum über mehr als 14 Tage beobachtet werden. Bereits nach wenigen Tagen wurden erste Sphäroide detektiert und bestätigten auf diese Weise die Richtigkeit der ausgewählten Ausgangszellzahl. Während der Kultivierungszeit wuchsen die Zellen zu Sphäroiden unterschiedlicher Größe heran und passten sich der umliegenden Porenstruktur, im speziellen der Porenform und -größe, an. In Abhängigkeit von der Porengröße bildeten sich auch hypoxische Zellbereiche (zentrale Nekrose), welche auf eine zunehmende Sphäroidgröße und der damit verbundenen mangelnden Nähr- und Sauerstoffversorgung zurückzuführen waren. Dieser strukturelle Aufbau ahmt die natürlich vorkommenden Tumorgradienten nach, womit die Wirksamkeit und das Eindringen von Medikamenten sowie Boten- und Signalstoffen untersucht werden könnten. Letzteres wurde mit Hilfe der Hormonexperimente (Behandlung mit DHT) erfolgreich demonstriert. Durch die Zugabe von DHT in das umliegende Medium und der detektierten Proliferationssteigerung konnte die Durchlässigkeit des Porensystems für gelöste Stoffe bestätigt werden.

Mit der Wahl von Gelatine als Cryogelbestandteil sollte zusätzlich die Möglichkeit geboten werden den positiven Einfluss der RGD-Sequenz auf die kultivierten Zellen zu demonstrieren. In Anbetracht der Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit konnte keine Abhängigkeit der Prostatakarzinomzellen gegenüber der RGD-Sequenz bewiesen werden. Generell wurde in diesem Fall über die physikalischen Charakteristika der Cryogele ein signifikanterer Effekt auf die Zellen nachgewiesen.

Grundsätzlich konnten im Rahmen dieser Arbeit die Vorteile des Cryogelverfahrens gegenüber ähnlichen Modellsystemen (z.B. Hydrogele) verdeutlicht werden. Allein die Verwendung von Wasser als mögliches Lösungsmittel, die Vielfalt an Reaktionskomponenten natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs, die unkomplizierte bzw. zügige Synthese sowie die Variation der charakteristischen Eigenschaften belegen die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten als 3D Zellgerüstträger. Über mehrere Arbeitsschritte ist es gelungen ein Protokoll zu erstellen, mit dessen Hilfe homogene Cryogelstrukturen erzeugt

werden können, innerhalb dessen ein Wachstum von Prostatakarzinomzellen möglich ist. So verfügt der Anwender über die Kontrolle des gesamten Prozesses, von der Synthese der Cryogele über die Zellaussaat bis hin zur spezifischen Ergebnisauswertung. Darüber hinaus wurde durch die Verwendung des Seidenstrukturproteins Fibroin die Zuverlässigkeit einer rein natürlichen Komponente und deren Kompatibilität gegenüber anderen natürlichen Substanzen demonstriert. Somit kann abschließend festgestellt werden, dass die etablierten Cryogele eine ausgezeichnete Grundlage für weitere experimentelle Fragestellungen im Bereich der Prostatakrebsforschung bilden und als Alternativmethode für die Zellkultivierung eingesetzt werden könnte.

6 Offene Fragen und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine geeignete Materialzusammensetzung vereint in einer Cryogelstruktur zur Kultivierung von Prostatakrebszellen entwickelt werden. Darüber hinaus wurde diese Arbeit durch rein natürliche Gerüststrukturen ergänzt, welche auf einer komplett unterschiedlichen Grundsubstanz basieren. In beiden Fällen bleiben dennoch einige Fragen ungeklärt, welche in weiteren Experimenten bearbeitet werden sollten.

Funktionalisierung

Trotz der erfolgreichen Zellkultivierung innerhalb der Cryogelstrukturen bleibt die Überlegung in wie weit Gelatine einen Einfluss auf das Zellverhalten hat. Aufgrund zahlreicher Veröffentlichungen, welche die Wirkung von Gelatine einschließlich der RGD-Sequenz bestätigen, bleibt zu diskutieren, ob weitere Versuchsreihen dazu angesetzt werden sollten. Sowohl durch die Untersuchungen von Fu *et al.* als auch Dumbleton *et al.* konnte durch die Kopplung von Gelatine als Träger der RGD-Sequenz und der direkten Bindung von RGD-Peptiden eine verstärkte Zellanheftung und Wachstum beobachtet werden [Fu2013; Dum2016]. So wäre eine Kopplung der RGD-Sequenz an Alginat bzw. PEGda vorstellbar. Darüber hinaus sollte ebenfalls die Kopplung von RGD-Peptiden an die Fibroingerüste erfolgen bzw. die Herstellung von zusammengesetzten Gerüsten auf Basis von Fibroin des Seidenspinners *A.pernyi* untersucht werden. Eine Verbesserung der Zellanheftung wäre für den weiteren Einsatz als 3D Zellgerüstmatrix förderlich und konnte zum Teil in der Arbeit von Morgan und Kollegen am Beispiel einer Osteoblasten-Zelllinie (MC3T3-E1) demonstriert werden [Mor2008]. Zur Beurteilung der Funktionalisierungsmethode könnten Analysen mit Hilfe des FTIR-Spektrometers oder der Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) durchgeführt werden.

Zelllinien

Die Kultivierung der PC3-Zelllinie erwies sich als weniger zufriedenstellend und sollte aus diesem Grund weiter untersucht werden. Dies schließt auch die Verwendung der Seidenfibroingerüste als mögliche Zellgerüstträger ein. In Anbetracht der zellulären Herkunft (Knochenmetastasen) wurde vermutet, dass eine erhöhte Elastizität (geringe mechanische Festigkeit) das Verhalten der Zellen beeinflusst und im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen, welche einer Lymphknotenmetastase entstammen, das Wachstum hemmt. Zur Erklärung der erzielten Ergebnisse könnten weitere Variationen der Elastizität/mechanischen Festigkeit vorgenommen werden und eventuell ein Vergleich zu anderen etablierten Prostatakarzinomzellen, wie z. B. DU145 (Gehirnmetastase), denkbar sein.

Ko-Kultivierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die Kultivierung einer einzelnen Zelllinie untersucht. In Anbetracht der zellulären Umgebung, erfolgt die Nachahmung des Prostatagewebes basierend auf einer Monokultur sehr vereinfacht. Aus diesem Grund sollte angesichts bisheriger Ergebnisse die Arbeit an einer Ko-Kultur fortgesetzt werden. Auf diese Weise können unter anderem Zell-Zell-Kontakte sowie Wechselwirkungen zwischen malignen und benignen Prostatakrebszellen untersucht werden. Darüber hinaus bieten die erarbeiteten Protokolle, angefangen von der Herstellung der Cryogele über spezifische Charakterisierungsverfahren bis hin zu gängigen Färbemethoden (z.B. Hämatoxylin/Eosin-Färbung), eine ausgezeichnete Basis zur Kultivierung von Primärzellen.

Reproduzierbarkeit

Im Gegensatz zu den Cryogelen, konnte die Etablierung der Seidenfibroingerüste noch nicht 100%ig abgeschlossen werden. Zwar konnten in mehrfachen Versuchsreihen die Protokolle zum Entbasten der Seidenfasern, sowohl von *B.mori* als auch von *A.pernyi*, und der Proteinextraktion festgesetzt werden, so wurde dennoch die Reproduzierbarkeit der Gerüstsynthesen durch die Probenform (48-Well-Platte) gestört. In Abhängigkeit von der Belegung

innerhalb einer Well-Platte traten unterschiedliche Porenstrukturen auf. Je geringer der Abstand der Proben in der Trocknungskammer zum Kühlsystem war, desto schneller erfolgte die Gefriertrocknung. Dagegen waren die mittig gelegenen Proben noch feucht. Infolgedessen wurde die Gefriertrocknungszeit zum Teil auf 48 h erhöht. Um einen reibungslosen Ablauf zu garantieren, sollte an einer verbesserten Probenform gearbeitet werden.

Einfluss Spidroin

Aufgrund einer geringen Menge an Spidroin konnte nur eine kleine Anzahl an Experimenten durchgeführt werden. Im Gegensatz zur Fibroingewinnung aus den Seidenkokons von *B.mori* und *A.pernyi* stellt die Proteinextraktion aus Spinnenseide eine größere Herausforderung dar. Zum einen können Spinnen nur unter gewissen Umständen gezüchtet werden und produzieren zum anderen nur eine geringfügige Menge an Spinnenseide. Aus diesem Grund musste auf die zeitaufwändigere und kostenintensivere Herstellung rekombinanter Proteine zurückgegriffen werden. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen könnten weitere zusammengesetzte Gerüste mit Spidroin entwickelt werden. Interessant wäre eine Verbindung mit dem Seidenfibroin aus *A.pernyi* bzw. einer Kombination aus dem aktuellen Seidenfibroin-Gelatine-Gerüst mit Spidroin.

Sphäroid-Darstellung

Bisheriger Schwachpunkt stellt eine überzeugende Methode zur Visualisierung der Sphäroidstrukturen innerhalb der 3D Systeme dar. Dabei sollte neben der statischen Beobachtung mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie und der 2D Darstellung nach Paraffineinbettung, auch eine Echtzeitbeobachtung möglich sein. Um eine exakte Einschätzung der Zellanordnung und Verteilung innerhalb der Cryogele und Seidenfibroingerüste zu gewährleisten ist es notwendig eine komplexe und kontrastreiche Veranschaulichung erstellen zu können. Mit Hilfe der Röntgen-Mikro-Computertomographie am ANKA konnten erste Erfolge in dieser Richtung erzielt werden. Neben der 3D Darstellung des Porensystems zum Nachweis der Poreninterkonnektivität, konnten auch Zellsphäroide visualisiert werden [Cec2016]. Darüber hinaus kann auf Basis der Tomographiescans zusammen mit einer entsprechenden

Software die Gesamtporosität und Porengröße sowie das Porenvolumen bestimmt werden. Eine weitere Variante wäre die Magnetresonanztomographie (MRT), welche ebenfalls eine nicht-destruktive Methode zur Erzeugung von 3D Aufnahmen darstellt.

7 Materialien und Geräte

Tab. 7-1: Übersicht verwendeter Materialien für die Cryogelherstellung und Gerüsten auf Seidenproteinbasis.

| Material | Hersteller | CAS- Nummer |
|---|------------------------------------|------------------------|
| Ammoniumperoxidsulfat | Merck, Darmstadt | 7727-54-0 |
| Antheraea pernyi (Kokons) | The World of Butterflies and Moths | - |
| Bombyx mori (Kokons) | Patchworkshop | - |
| Calciumnitrat Tetrahydrat | Merck, Darmstadt | 13477-34-4 |
| Chitosan (from shrimp shells) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 9012-76-4 |
| Collagen Typ I (Rat tail tendon) | Corning | 9007-34-5 |
| Dialysekassetten (2,000 MWCO) | Thermo Scientific | - |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt | 64-19-7 |
| Ethanol | Merck, Darmstadt | 64-17-5 |
| Gelatine (from cold water fish skin) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 9000-70-8 |
| Glutaraldehyd | Calbiochem | 111-30-8 |
| 2-Hydroxyethylmethacrylat | Alfa Aesar, Karlsruhe | 868-77-9 |
| Lithiumbromid | Merck, Darmstadt | 7550-35-8 |
| Natrium Alginat (from brown algae) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 9005-38-3 |
| Natriumcarbonat | Merck, Darmstadt | 497-19-8 |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt | 144-55-8 |
| Polyethylenglycoldiacrylat ($M_n = 700$) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 26570-48-9 |

| | | |
|--|------------------|----------|
| Rekombinant Spider Silk Protein Spidroin (SSP01) | AMSilk | - |
| Tetramethylethylendiamin | Merck, Darmstadt | 110-18-9 |

Tab. 7-2: Verwendete Materialien für die Zellkulturrexperimente.

| Material | Hersteller | CAS- Nummer |
|---|--------------------------------------|------------------------|
| Antibiotic Antimycotic Solution (100×) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | - |
| Bromphenolblau | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 115-39-9 |
| CellTiter-Glo® 3D Viability Assay | Promega | - |
| Dithiothreitol | Roche, Mannheim | 3483-12-3 |
| DABCO | Roth, Karlsruhe | 280-57-9 |
| ECL-Western Blot Substrat | Thermo Scientific | - |
| Eosin | Roth, Karlsruhe | - |
| Ethylendiamintetraessigsäure | Roth, Karlsruhe | 60-00-4 |
| Eukitt | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 25608-33-7 |
| Fetales Kälber Serum/ Charcoal Kälber Serum | Sigma Aldrich, Taufkirchen | - |
| Formaldehyd, 37 % Lösung | Merck, Darmstadt | 50-00-0 |
| Glycin | Roth, Karlsruhe | 56-40-6 |
| Glycerol, 86 % Lösung | Roth, Karlsruhe | 56-81-5 |
| Human PSA-total ELISA Kit | Sigma Aldrich, Taufkirchen | - |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe | 67-63-0 |
| L-Glutamin | Gibco by Life Technologies, Carlsbad | - |
| Magermilchpulver | Carlsbad | - |

| | | |
|-------------------------------------|---|------------|
| Mayer's Hämatoxylin | Sigma Aldrich, Taufkirchen | - |
| Methanol | Merck, Darmstadt | 67-56-1 |
| Mowiol | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 9002-89-5 |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe | 7647-14-5 |
| Natriumdeoxycholat | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 302-95-4 |
| Natriumdodecylsulfat | Roth, Karlsruhe | 151-21-3 |
| NP-40 (Ipegal) | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 9016-45-9 |
| Page-Ruler-Plus Proteinstandard | Thermo Scientific, Karlsruhe | - |
| Protease-Inhibitor-Mix-G | Serva, Heidelberg | - |
| Proteinase K | Sigma Aldrich, Taufkirchen | - |
| Rotiphorese ® Gel 30 | Roth, Karlsruhe | - |
| RPMI-1640 (mit Phenolrot) | Gibco by Life Tech- nologies, Carlsbad | - |
| RPMI 1640 (ohne Phenolrot) | Gibco by Life Tech- nologies, Carlsbad | - |
| Poly-L-Lysin | Sigma Aldrich, Taufkirchen | 25988-63-0 |
| Tris(hydroxymethyl)- aminomethan | Roth, Karlsruhe | 77-86-1 |
| TRIS-CL | Roth, Karlsruhe | 1185-53-1 |
| Trypsin + EDTA (0.25 %) | Gibco by Life Tech- nologies, Carlsbad | - |
| Tween-20 | Roth, Karlsruhe | 9005-64-5 |
| Xylol | VWR Chemicals, Darmstadt | 1330-20-7 |

Tab. 7-3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot (WB) und die Immunfluoreszenzfärbungen (IF).

| Antigen | Wirts- spezies | Iso- typ | Anwen- dung | Verdünnung (in Block- puffer) | Hersteller |
|----------------------|---------------------------|---------------------|------------------------|--|---------------------|
| Alpha-Tubulin | Hase | IgG | IF | 1:1000 | Abcam, Cambridge |
| AR | Maus | IgG ₁ | IF WB | 1:25 1:1000 | Dianova, Hamburg |
| Anti-Maus IgG-HRP | Ziege | IgG | WB | 1:10000 | Agrisera, Vännäs |
| Cy2 | Ziege | IgG _{2a} | IF | 1:200 | Dianova, Hamburg |
| Cy3 | Ziege | IgG _{2a} | IF | 1:200 | Dianova, Hamburg |

Tab. 7-4: Überblick verwendeter Geräte und deren Anwendungsbereich während der physikalischen Charakterisierung der makroporösen Gerüststrukturen sowie der biologischen Experimente.

| Gerät | Anwendung | Hersteller |
|--|---|--------------------------------|
| ELISA Reader | PSANachweis/ Konzentrationsbe- stimmung | Thermo Scientific |
| Fluoreszenzmikroskop DM5500B | Immunfluoreszenzfär- bungen | Leica, Wetzlar |
| Fluoreszenzspektrometer FLUOStar Optima | Immunfluoreszenzfär- bungen | BMG, Ortenberg |
| Gewebe Prozessor TP1020 | Probenvorbereitung für Histologie | Leica, Wetzlar |
| Homogenisator T25 basic | Homogenisieren | IKA Labortechni- k, Staufen |

| | | |
|---|---|--|
| Inverses Lichtmikroskop DM5000 | Histologische Färbun- gen | Leica, Wetzlar |
| Luminometer | Viabilitätsassay | Perkin Elmer, Rodgau |
| Mikrotom RM2155 | Anfertigung von Gewebeschnitten | Leica, Wetzlar |
| Nanodrop ND1000 | Bestimmung Protein- konzentration | peQLab |
| Paraffinausgießstation EG1160 | Paraffineinbettung | Leica, Wetzlar |
| Quecksilberporosimeter Macropore Mot.140 | Porositätsbestimmung | Porotec Pascal 440 Series |
| Rasterelektronenmikroskop Supra 60 VP | Untersuchung Morpho- logie/Porenstruktur | Zeiss, Jena |
| Sputter coater K575X | Sputtern, Vermeidung von Aufladungseffek- ten | GaLa Instru- ments, Bad Schwalbach |
| Zugprüfmaschine Z0.5 | Elastizitätsversuche | Zwick Roell, Ulm |
| TOPO-TOMO | Röntgen-Mikro-CT | ANKA |

Pubikationen

Zeitschriften

A. Bäcker; B. Göppert; S. Sturm; P. Abaffy; T. Sollich; F.J. Gruhl, *Impact of adjustable Cryogel properties on the performance of prostate cancer cells in 3D*, SpringerPlus, 5(902), 2016, 1-12.

A. Bäcker; O. Erhardt; L. Wietbrock; N. Schel; B. Göppert; P. Abaffy; T. Sollich; A. Cecilia; F.J. Gruhl, *Silk scaffolds connected with different naturally occurring biomaterials for prostate cancer cell cultivation in 3D*, Biopolymers, 2016, 2-17.

A. Cecilia; **A. Bäcker**; E. Hamann; A. Rack; T. van de Kamp; F.J. Gruhl; R. Hofmann; J. Moosmann; S. Hahn; J. Kashef; S. Bauer; T. Farago; L. Helfen; T. Baumbach, *Optimizing structural and mechanical properties of cryogel scaffolds for use in prostate cancer cell culturing*, Material Science and Engineering C, 2016.

B. Göppert; T. Sollich; P. Abaffy; A. Cecilia; J. Heckmann, A. Neeb, **A. Bäcker**; F.J. Gruhl; A. Cato, *Superporous Poly(ethylene glycol) Diacrylate Cryogel with a Defined Elastic Modulus for Prostate Cancer Cell Research*, SMALL, 2016, 12(29), 3985-94.

Konferenzbeiträge

2015

A. Bäcker, F.J. Gruhl, *Adjustable Cryogel structures for the 3D cultivation of prostate cancer cells*, 4th International Conference Strategies in Tissue Engineering, Würzburg 10.06.-12.06.2015.

A. Bäcker, T. Sollich, P. Abaffy, O. Fominov, A. Cecilia, F.J. Gruhl, *Silk-Fibroin-Cryogels as 3D culture model system in the field of cancer research*, International Conference on Biofabrication, Utrecht (NL) 07.11.-09.11.2015

2014

A. Bäcker, J. Oberle, F.J. Gruhl, *Properties of Cryogels as requirements for highly specialized cell culture model system of prostate cancer cells*, 3D Cell Culture 2014 Advanced Model Systems, Applications & Enabling Technologies (DECHEMA), Konzerthaus Freiburg 25-27.06.2014.

A. Bäcker, F.J. Gruhl, *Different cryogel architectures as basis for 3D cell culture of prostate cancer cells*, 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Liverpool 31.-03.09.2014.

A. Bäcker, F.J. Gruhl, *Anpassungsfähige Biomaterialien für onkologische Grundlagenforschung*, Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM), Dresden 06.-08.11.2014.

2013

A. Bäcker, P. Abaffy, F. J. Gruhl, *Micro- and macroporous cryogels for three dimensional cell culture of prostate cancer cells*, 3rd Heidelberg Forum for Young Life Scientists.

A. Bäcker, P. Abaffy, F. J. Gruhl, *Micro- and macroporous cryogels for three dimensional cell culture of prostate cancer cells*, Mikro- and Nanostructured Interfaces for Biological and Medical Research, Wilhelm und Else Heraeus-Stiftung, Bad Honnef.

Betreute Studentische Arbeiten am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT, KIT)

Fominov, Olga (IMT) (Bachelorarbeit zum Thema: „*Seidenproteine als natürliche 3D-Zellgerüstträger*“); Zeitraum April bis November 2015.

Benn, Saskia (IMT) (Praktikum zum Thema: „*Entwicklung dreidimensionaler Zellgerüstträger aus Biomaterialien und deren Einsatz in der onkologischen Zellbiologie*.“); Zeitraum 01.09.2014 -27.02.2015.

Schel, Natalia (IMT) (Bachelorarbeit zum Thema: „*Einsatz polymerer dreidimensionaler Scaffolds auf Cryogelbasis für onkologische Zellstudien*“); Zeitraum 15.05.-15.08.2014.

Ngombo, Maliki Yasin Samuel (IMT) (Bachelorarbeit zum Thema: „*Zellgerüstträger aus Fibroin des Seidenspinners Bombyx Mori*“); Zeitraum: 07.01.2014 bis 31.03.2014.

Oberle, Julian (IMT) (Bachelorarbeit zum Thema „*Entwicklung co-polymerer Gele für die dreidimensionale Zellkultur*“); Zeitraum: 2.04.2013 bis 30.09.2013.

Literaturverzeichnis

- [Ach2012] Achilli et al., *Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids*, Expert Opinion on Biological Therapy, Vol. 12(10), 2012, 1347-1360.
- [Ahm2015] Ahmed, *Hydrogel Preparation, characterization, and applications A review*, Journal of Advance Research, Vol.6, 2015, 105-121.
- [Ala2000] Akam et al., *Arthropods: Developmental diversity within a (super) phylum*, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 97, 2000, 4438.
- [Ali2006] Alimirah et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: Implications for the androgen receptor functions and regulation*, FEBS Letters, Vol. 580, 2006, 2294-2300
- [Ama2014] Amann et al., *Development of a three-dimensional primary prostate cancer cell culture model*, PLOS ONE, Vol. 9(3), 2014, 1-13.
- [Aok2013] Aoki et al., *Culture of chondrocytes in fibroin–hydrogel sponge*, Biomed Mater Eng, Vol. 13(4), 2003, 309-316.
- [Att2004] Attardi et al., *Steroid hormonal regulation of growth, prostate specific antigen secretion, and transcription mediated by the mutated androgen receptor in CWR22Rv1 human prostate carcinoma cells*, Molecular and Cellular Endocrinology, Vol. 222, 2004, 121–132.
- [Arv2003] Arvidsson et al., *Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent*, J Chromatography A, Vol. 986 (2), 2003, 275-290.

- [Ayt2014] Aytemiz et al., *Application of Bombyx mori Silk Fibroin as a Biomaterial for Vascular Grafts*, Biotechnology of Silk, Biol. Inspired Syst., Vol. 5, 2014, 69-85.
- [Bak2012] Baker et al., *Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues*, Journal of Cell Science, Vol. 125 (13), 2012, 3015-3024.
- [Bal1999] Ballangrud et al., *Growth and Characterization of LNCaP Prostate Cancer Cell Spheroids*, Clinical Cancer Research, 1999, Vol. 5(212), 3171s-3176s.
- [Ban2009] Banerjee et al., *The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells*, Biomaterials, Vol. 30(27), 2009, 4695-4699.
- [Bar2012] Barron et al., *The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression*, Endocrine-Related Cancer, Vol. 19(6), 2012, 187-204
- [Bas1996] Basland et al., *Recent advances in the development of animal and cell culture models for prostate cancer research*, Urologic Oncology, Vol. 2(99), 1996.
- [Ben2015] Benn, *Entwicklung dreidimensionaler Zellgerüstträger aus Biomaterialien und deren Einsatz in der onkologischen Zellbiologie*, Praktikumsarbeit, 01.09.-27.02.2015 (IMT, KIT)
- [Ber2008] Bertout et al., *The impact of O₂ availability on human cancer*, Nat Rev Cancer, Vol. 8(12), 2008, 967-975.
- [Ber1986] Berthois et al., *Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 83, 1986, 2496-2500.

- [Bha2015] Bhardwaj et al., *Milled non-mulberry silk fibroin micro-particles as biomaterial for biomedical applications*, International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 81, 2015, 31- 40
- [Bha2011] Bhardwaj et al., *Silk fibroin protein and chitosan poly-electrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering applications*, Carbohydrate Polymers, Vol. 85(2), 2011, 325-333.
- [Bha2011] Bhat et al., *Supermacroporous chitosan-agarose-gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering*, J. R. Soc. Interface, Vol.8(57), 2011, 540-554.
- [Boa2009] Boah et al., *Polymerchemie kompakt*, S.Hirzel Verlag, 2. Auflage, 2009, Kap. 1 ff.
- [Bon1993] Bonkhoff et al., *Differential expression of alpha 6 and alpha 2 very late antigen integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic prostate: simultaneous demonstration of cell surface receptors and their extracellular ligands*, Hum. Pathol., Vol. 24(3), 1993, 243–248.
- [Bra2009] Brandon et al., *Hydrogels in Regeneratie Medicine*, Advanced Materials, Vol.21, 2009, 3307-3329.
- [Bres2013] Breslin et al., *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*, Drug Discovery Today, Vol.18, No. 5/6, 2013, 240-249.
- [Bro2005] Brooks et al., *An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from *Nephila clavipes* and *Argiope aurantia**, Biomacromolecules, Vol.6, 2005, 3095-3099.
- [Bru1964] Bruice et al., *Catalysis in water and ice*, Am. Chem. Soc., Vol.86, 1964, 4104-4108.

- [Bäc2017] Bäcker et al., *Silk scaffolds connected with different naturally occurring biomaterials for prostate cancer cell cultivation in 3D*, Biopolymers, Vol. 107(2), 2017, 70-79.
- [Bäc2016] Bäcker et al., *Impact of adjustable cryogel properties on the performance of prostate cancer cells in 3D*, SpringerPlus, 2016, 2-12.
- [Bäc2013] Bäcker, Diplomarbeit am Institut für Mikrostrukturtechnik, am Karlsruher Institut für Technologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, „*Verwendung verschiedener Cryogelstrukturen für die dreidimensionale Zellkultur*“, 2013.
- [Cai2010] Cai et al., *Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications*, Int J Mol Sci, Vol.11, 2010, 3529-3539.
- [Can1989] Canetti et al., *CD and Small-Angle X-Ray Scattering of Silk Fibroin in Solution*, Biopolymers, Vol. 28, 1989, 1613-1624.
- [Cay2006] Ceylan et al., *Swelling–Deswelling Kinetics of Ionic Poly(acrylamide) Hydrogels and Cryogels*, Journal of Applied Polymer Science, Vol.99, 2006, 319–325.
- [Cel2014] *CellTiter-Glo® 3D Viability Assay; Instructions for Use of products* | Technical Manual, Promega Com., p. 18, 2014
- [Cha2014] Chambers et al., *3D cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer*, PloS ONE, 2014, Vol. 9(11), 1-10.
- [Cec2016] Cecilia et al., *Optimizing structural and mechanical properties of cryogel scaffolds for use in prostate cancer cell culturing*, Materials Science and Engineering C, Vol.71, 2017, 465-472.

- [Che2014] Cheng et al., *On the strength of β -sheet crystallites of Bombyx mori silk fibroin*, J. R. Soc. Interface, Vol.11, 2014, 1-8.
- [Che2012] Chen et al., *Morphology and structure of silkworm cocoon*, Materials Science and Engineering C, Vol.32, 2012, 772-778.
- [Che2010] Chen et al., *Silkworm cocoons inspire models for random fiber and particulate composites*, Physical Review, Vol.82, 2010, 1-6.
- [Che2001] Chen et al., *Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR*, Polymer, Vol. 42, 2001, 9969-9974.
- [Cho1999] Choi et al., *Study on gelatin-containing artificial skin: I. Preparation and characteristics of novel gelatin-alginate sponge*, Biomaterials, Vol.20, 1999, 409-417.
- [Chu2013] Chutipakdeevong et al., *Process optimization of electro-spun silk fibroin fiber mat for accelerated wound healing*, Journal of Applied Polymer Science, 2013, 3634-3644.
- [Cul1993] Culig et al., *DNA Sequence of the Androgen Receptor in Prostatic Tumor Cell Lines and Tissue Specimens Assessed by Means of the Polymerase Chain Reaction*, The Prostate, Vol. 22, 1993, 11-22.
- [Cuk2002] Cukierman et al., *Cell interactions with three-dimensional matrices*, Current Opinion in Cell Biology, Vol. 14(5), 2002, 633-639.
- [Dai2007] Dainiak et al., *Chromatography of living cells using supermacroporous hydrogels, cryogels*, Adv. Biochem Eng Biotechnol., Vol.106, 2007, 101-127.
- [Dec1987] Decker et al., *UV-curing chemistry: past, present, and future*, J Coat Technol. Vol.59, 1987, 97-106.

- [Dou2012] Douissard et al., *A versatile indirect detector for hard X-ray microimaging*, JINST, 2012, Vol.7, 1-26.
- [Dum2016] Dumbleton et al., *The Effect of RGD Peptide on 2D and Miniaturized 3D Culture of HEPM Cells, and ADSCs with Alginate Hydrogel*, Cellular and Molecular Bioengineering, Vol. 9(2), 2016, 277-287.
- [Dut2009] Dutta et al., *Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications*, Biotechnology Advances, Vol.27, 2009, 334-339.
- [Edm2016] Edmonson et al., *Influence of matrices on 3D-cultured prostate cancer cells' drug response and expression of drug-action associated proteins*, PloS ONE, Vol. 11(6), 2016, 1-23.
- [Edw2015] Edwards et al., *Preclinical target validation using patient-derived cells*, Nature-Drug Discovery, Vol. 14, 2015, 149-150.
- [Els1972] Elsdale et al., *Collagen substrate for studies on cell behavior*, J Cell Biol, 1972, Vol. 54, 626-637.
- [Eye2008] Eyerer et al., *Polymer Engineering – Technologien und Praxis*, Springer, 2008, Kap. 3.2.4, 7.1.3, S. 78ff, 556ff.
- [Fen2013] Fennema et al., *Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues*, Trends Biotechnol., Vol. 31, 2013, 108-115.
- [Fie2001] Fiedler, *Böden und Bodenfunktion in Ökosystemen, Landschaften und Ballungsgebieten*, Expert Verlag, Band 7, 2001, Kap. 6.1.3.3., Seite 195ff.
- [Fit2015] Fitzgerald et al., *The use of collagen-based scaffolds to simulate prostate cancer bone metastases with potential for evaluating delivery of nanoparticulate gene therapeutics*, Biomaterials, Vol. 66, 2015,53-66.

- [Fom2015] Fominov, *Seidenproteine als natürliche 3D-Zellgerüstträger*, Bachelorarbeit, 2015 (IMT, KIT).
- [Fra2013] Frank et al., *Disruption of prostate epithelial differentiation pathways and prostate cancer development*, *Frontiers in Oncology*, Vol. 3(273), 2013, 1-23.
- [Fu2013] Fu et al., *3D cell entrapment in crosslinked thiolated gelatin-poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels*, *Biomaterials*, Vol. 33(1), 2013, 48-58.
- [Fuc2006] Fuchs et al., *Out-growth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials*, *Biomaterials*, 2006, Vol. 27(31), 5399-5408.
- [Gha2007] Ghasemi-Mobarakeh et al., *A Novel Method for Porosity Measurement of Various Surface Layers of Nanofibers Mat Using Image Analysis for Tissue Engineering Applications*, *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, Vol. 106, 2536-2542.
- [Gec1998] Geckeler et al., *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*, Springer Fachmedien Wiesbaden GmbH, 1998, Kap. 5.3.2, S. 465 ff.
- [Gob2005] Gobin e al., *Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration*, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 74(3), 2005, 465-473.
- [Gos1999] Gosline et al., *The Mechanical Design of Spider Silks: From Fibroin Sequence to Mechanical Function*, *The Journal of Experimental Biology*, Vol. 202, 1999, 3295-3303.
- [Gre2012] Greiner et al., *Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell Culture Studies*, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 12, 2012, 1301-1314.

- [Gre2007] Greiner et al., *Elektrospinnen: eine faszinierende Methode zur Präparation ultradünner Fasern*, *Angewandte Chemie*, Vol.119, 2007, 5770-5805
- [Gre1982] Gregg et al., *Adsorption, Surface Area and Porosity*, 2nd edn. San Diego, Academic Press, 1982.
- [Gun2012] Gun'ko et al., *Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterization*, *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 187-188, 2012, 1-46.
- [Göp2016] Göppert et al., *Superporous Poly(ethylene glycol) Diacrylate Cryogel with a Defined Elastic Modulus for Prostate Cancer Cell Research*, *Small*, Vol. 12(9), 2016, 3985-3994.
- [Har2009] Hardy et al., *Production and Processing of Spider Silk Proteins*, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol.47, 2009, 3957-3963.
- [Hei2004] Heinlein et al., *Androgen receptor in prostate cancer*, *Endocrine Reviews*, Vol. 25(2), 2004, 276-308.
- [Hel1998] Helpap et al., *Prostatakarzinom – Pathologie, Praxis und Klinik*, Sonderpublikation, Springer, 1998, Kap. 1 S. 4
- [Hsi2010] Hsiao et al., *Microfluidic system for formation of PC-3 prostate cancer co-culture spheroids*, *Biomaterials*, 2010, Vol. 30(16), 3020-3027.
- [Hor1983] Horoszewicz et al., *LNCaP model of a human prostatic carcinoma*, *Cancer Res*, Vol. 43, 1983, 1809-1818.
- [Hoy2008] Hoyt et al., *Tissue elasticity properties as biomarkers for prostate cancer*, *Cancer Biomark.*, Vol. 4(4-5), 2008, 213-225.
- [Hsi2011] Hsia et al., *Spider silk composites and applications, Metal, ceramic and polymeric composites for various uses*, *InTech*, Rijeka, Vol.488, 2011, 303-324.

- [Hu2006] Hu et al., *Biocompatible fibroin blended films with recombinant human-like collagen for hepatic tissue engineering*, J Bioactive Compatible Polym, Vol.21(1), 2006, 23-37.
- [Hu2006] Hu et al., *Molecular mechanisms of spider silk*, Cell Mol Life Sci, Vol. 63, 2006, 1986-1999.
- [Hug2010] Hughes et al., *Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*, Proteomics, Vol.10, 2010, 1886-1890.
- [Hwa2010] Hwang et al., *Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering*, Biofabrication, Vol. 2(3), 2010, 1-12.
- [Hwa2010] Hwang et al., *Poly(ethylene glycol) cryogels as potential cell scaffolds: effect of polymerization conditions on cryogel microstructure and properties*, Journal of Materials Chemistry, Vol.20(2), 2010, 345-351.
- [Jam2012] Jansohn et al., *Gentechnische Methoden, eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage, 2012, Kap. 10.1.7, S. 298 ff.
- [Kai1978] Kaighn et al., *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*, Investigative Urology, Vol.17, 1978, 16-23.
- [Kat2016] Katt et al., *In vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform*, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol. 4(12), 2016, 1-14.
- [Kes2009] Keskar et al., *In Vitro Evaluation of Macroporous Hydrogels to Facilitate Stem Cell Infiltration, Growth, and Mineralization*, Tissue Engineering: Part A, Vol.15, No.7, 2009, 1695-1707.

- [Kim2013] Kimlin et al., *In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: An update*, Molecular Carcinogenesi, Vol. 52, 2013, 167-182.
- [Kim2005] Kim et al., *Biological efficacy of silk fibroin nanofiber mem-branes for guided bone regeneration*, J Biotechnol, Vol. 120(3), 2005, 327-339
- [Kim2005] Kim et al., *Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells*, Biomaterials, Vol. 26(21), 2005, 4442-4452.
- [Kim2004] Kim et al., *Structure and properties of silk hydrogels*, Biomacromolecules, Vol.5(3), 2004, 786-792.
- [Kin2006] Kino et al., *Deposition of bone-like apatite on modified silk fibroin films from simulated body fluid*, J Appl Polym Sci, Vol. 99(5), 2006, 2822-2830.
- [Kir2011] Kirsebom et al., *Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer material*, Polymer Chemistry, Vol.2, 2011, 1059-1062.
- [Kir2009] Kirsebom et al., *Mechanism of Cryopolymerization: Diffusion-Controlled Polymerization in a Nonfrozen Microphase. An NMR Study*, Macromolecules, Vol. 42, 2009, 5208-5214.
- [Kle1982] Kleinami et al., *Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma*, Biochemistry, Vol.21, 1982, 6188-6193.
- [Kno1994] Knox et al., *Differential expression of extracellular matrix molecules and the alpha 6-integrins in the normal and neoplastic prostate*, Am. J. Pathol., Vol. 145(1), 1994, 167-174.
- [Koh2015] Koh et al., *Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials*, Progress in Polymer Science, Vol. 46, 2015, 86-110.

- [Kol2013] Koltzenburg et al., *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Springer-Verlag, 2013, Kap. 1 ff.
- [Kor2001] Korenschuk et al., *VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer*, In *Vivo*, Vol. 15, 2001, 163-168.
- [Kun2014] Kunde et al., *Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives*, *Progress in Polymer Science*, Vol. 39(2), 2014, 251-267.
- [Kun2006] Kung, *Practices and Pitfalls of Mouse Cancer Models in Drug Discovery*, *Advances in Cancer Research*, Vol. 96, 2006, 191-212.
- [Lae1970] Laemmli et al., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, Vol. 227, 1970, 680-685.
- [Lan2013] Lang et al., *Histotechnik*, Springer Verlag, 2. Auflage, 2013.
- [Lan2002] Lang et al., *Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma*, *Prostate*, Vol. 52(4), 2002, 253-263.
- [Lee2001] Lee et al., *Establishment and characterization of a new human prostatic cancer cell line: DuCaP*, In *Vivo*, Vol. 15, 2001, 157-162.
- [Lee1995] Lee et al., *Regulation of Proliferation and Production of Prostate -Specific Antigen in Androgen-sensitive Prostatic Cancer Cells, LNCaP, by Dihydrotestosterone*, *Endocrinology*, Vol. 136(2), 1995, 796-803.
- [Loh2013] Loh et al., *Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size*, *Tissue Engineering: Part B*, Vol.19, No.6, 2013, 485-502.

- [Loz2003] Lozinsky et al., *Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*, Trends in Biotechnology, Vol.21(10), 2003, 445-451.
- [Loz2002] Lozinsky et al., *The potential of polymeric cryogels in bioseparation*, Bioseparation, Vol.10, 2002, 163-188.
- [Loz1989a] Lozinsky et al., *Study of cryostruc-turization of polymer systems. VIII. Characteristic features of the formation of cross-linked poly(acrylamide) cryogels under different thermal conditions*, Acta Polymerica, 1989a, Vol.40, 8-15.
- [Loz1982] Lozinsky et al., *Study of cryostructurization of polymer systems. II. The influence of freezing of reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gel*, Colloid Polym. Sci., 1982, Vol.260, 776-780.
- [Lu2010] Lu et al., *Green process to prepare silk fibroin/gelatin biomaterial scaffolds*, Macromolecular Bioscience, Vol. 10(3), 2010, 289-298.
- [Lu2009] Lu et al., *Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold*, Materials Science and Engineering C, Vol. 29(7), 2009, 2239-2245.
- [Lut2014] Luttmann et al., *Der Experimentator: Immunologie*, Springer Spektrum, 4. Auflage, 2014, Kap. 5, S. 133ff.
- [Lut2011] Luttmann et al., *Der Experimentator-Immunologie*, Springer Spektrum, 4. Auflage, 2011, Kap. 4, S. 110 ff.
- [Lv2009] Lv et al., *Growth of fibroblast and vascular smooth muscle cells in fibroin/collagen scaffold*, Materials Science and Engineering C, Vol. 29(7), 2009, 2239-2245.
- [Lv2005] Lv et al., *Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture*, Polymer, Vol. 46(26), 2005, 12662-12669.

- [Läp2008] Läßle, *Einführung in die Festigkeitslehre*, Vieweg und Teubner, 2. Auflage, 2008, Kap. 2.1.2.1, S. 4ff.
- [Ma2004] Ma et al., *Scaffolds for tissue fabrication*, Materials today, 2004, 30-40.
- [Maf1994] Maffezzoli et al., *Photopolymerization of dental composite matrices*, Biomaterials, Vol.15, 1994, 1221-1228.
- [Mar2006] Marques et al., *The human PC346 xenograft and cell line panel: a model system for prostate cancer progression*, European Urology, Vol. 49, 2006, 245-257.
- [Mat2006] Matsumoto et al., *Mechanisms of Silk Fibroin Sol-Gel Transitions*, J. Phys. Chem., Vol. 110, 2006, 21630-21638.
- [McN1988] McNeal et al., *Normal histology of the prostate*, Vol. 12, 1988, Am J Surg Pathol, 619-633.
- [Min1995] Minoura et al., *Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin*, J Biochem Biophys, Vol. 208(2), 1995, 511-516.
- [Moi2010] Moisevich et al., *Tissue regeneration in vivo within recombinant spidroin 1 scaffolds*, Biomaterials, Vol. 33(15), 2010, 3887-3898.
- [Mor2008] Morgan et al., *Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation*, Biomaterials, Vol. 29(16), 2008, 2556-2563.
- [Mot2004] Motta et al., *Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and in vitro cell culture studies*, J Biomater Sci Poly Ed, Vol. 15(7), 2004, 851-864.
- [Mot2002] Motta et al., *Regenerated Silk Fibroin Films: Thermal and Dynamic Mechanical Analysis*, Macromol. Chem. Phys., Vol.203, 2002, 1658-1665.

- [Mur1997] Murant et al., *Co-ordinated changes in expression of cell adhesion molecules in prostate cancer*, Eur. J. Cancer; Vol. 33 (2), 1997, 263–271.
- [Nam2012] Namiki et al., *Role of hormonal therapy for prostate cancer: Perspective from Japanese experiences*, Translational Andrology and Urology, Vol. 1(3), 2012, 160-172.
- [Nam1999] Nam et al., *Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation*. J Biomed Mater Res, Vol.47, No.1, 1999, 8-17.
- [Nav1997] Navone et al., *Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis*, Clinical Cancer Research, Vol. 3, 1997, 2493-2500.
- [Naz2004] Nazarov et al., *Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin*, Biomacromolecules, Vol.5, 2004, 718-726
- [Ngo2014] Ngombo, *Zellgerüstträger aus Fibroin des Seidenspinners Bombyx Mori*, Bachelorarbeit, 2014 (IMT, KIT).
- [Ngu2002] Nguyen et al., *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering application*, Biomaterials, Vol.23, 2002, 4307-4314.
- [Nic2008] Nicodemus et al., *Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications*, Tissue Engineering Part B, Vol. 14(2), 2008, 149-165.
- [Nie2009] Nieschlag et al., *Andrologie*, Springer Medizin Verlag, 3. Auflage, 2009, Kap. 2.6, S. 42-46.
- [Oel2016] Oelschlaeger et al., *Synthesis, Structural and Micromechanical Properties of 3D Hyaluronic Acid-Based Cryogel Scaffolds*, Biomacromolecules, Vol. 17, 2016, 580-589.

- [Oku2010] Okuyama et al., *Preparation of arrays of cell spheroids and spheroid- monolayer cocultures within a microfluidic device*, J Biosci Bioeng., Vol. 1105, 2010, 572-576.
- [Ork1977] Orkan et al., *A murine tumor producing a matrix of basement membrane*, J. Exp. Med., Vol.145, 1977, 204-220.
- [Orr1969] Orr et al., *Application of Mercury Penetration to Materials Analysis*, Power Technology, Vol. 3(1), 1969, 117-123.
- [P2011] P, *Epigenetic changes in tumor microenvironment*, Indian Journal of Cancer, Vol. 48(4), 2011, 507-5012.
- [Par2012] Parker et al., *Ultrasonic study of the gelation of gelatin: Phase diagram, hysteresis and kinetics*, Food Hydrocolloids, Vol. 26, 2012, 99-107.
- [Par2006] Paramonov et al., *Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing*, J AM Chem Soc, Vol.128, 2006, 7291-7298.
- [Pet2011] Petrenko et al., *Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol.22, 2011, 1529-1540.
- [Pha2006] Pham e. al., *Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review*, Tissue Engineering, Vol. 12, No.5, 2006, 1197-1211.
- [Pli2008] Plieva et al., *Macroporous gel particles as robust macroporous matrices for cell immobilization*, Biotechnol J., 2008, Vol. 3(3), 410-417.
- [Pin1969] Pincock et al., *Reactions in frozen systems*, Acc. Chem. Res., Vol.2, 1969, 97-103.

- [Pli2011] Plieva et al., *Preparation of macroporous cryostructured gel monoliths, their characterization and main application*, J. Sep. Sci., Vol. 34, 2011, 2164-2172.
- [Pop2009] Popov, *Kontaktmechanik und Reibung*, Springer, 2009, Kap. 4, S. 41ff.
- [Pul2005] Pulukuri et al., *RNA Interference-Directed Knockdown of Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Inhibits Prostate Cancer Cell Invasion, Survival and Tumorigenicity In vivo*, J Biol. Chem., Vol. 280(43), 2005, 36529–36540.
- [Rac1988] Rack et al., *The micro-imaging station of the TOPO-TOMO beamline at the ANKA synchrotron light source*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, SectionB: Beam Interactions with Materials and Atoms, 2009, Vol. 267, 1978-1988.
- [Rah2011] Rahaman et al., *Bioactive glass in tissue engineering*, Acta Biomaterials, Vol. 7(6), 2011, 2355-2373.
- [Ram2013] Ramulu et al., *Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections*, Journal of oral and maxillofacial pathology, Vol. 17(1), 2013, 23-30.
- [Rat2013] Rath, *Lehrbuch der Textilchemie: einschließlich der textilchemischen Technologie*, Springer-Verlag, Ausgabe 3, 2013, 302ff.
- [Rav2012] Ravi et al., *Discovery tools for solid tumor research*, Journal of Solid Tumors, Vol.2, No.1, 2012, 34-42.
- [Rei1999] Reimer et al., *Raster – Elektronenmikroskopie*, Springer, Berlin, 2. erw. Auflage, 1999.

- [Ren2009] Renz, *Praktische Labordiagnostik – Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Hämatologie*, Verlag: Walter de Gruyter, 2009, Kap. 18.12, S. 531 ff.
- [Rob2015] Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten, Stand: 17.12. 2015
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.htm (abgerufen am 26. Mai 2016).
- [Roc2011] Rockwood et al., *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*, Nat Protoc., Vol. 6(10), 2011, 1612-1631.
- [Röm2008] Römer et al., *The elaborate structure of spider silk*, Prion, Vol. 2(4), 2008, 154-161.
- [Saa2012] Saarai et al., *On the Characterization of Sodium Alginate / Gelatine-Based Hydrogels for Wound Dressing*, J. of Applied Polymers Science, Vol. 113, 2012, 1763-1772.
- [Sam2013] Sampson et al., *In vitro model systems to study androgen receptor signaling in prostate cancer*, Society for Endocrinology, Vol. 20(2), 2013, 49-64.
- [Sar2006] Saravanan et al., *Spider Silk - Structure, Properties and Spinning*, Journal of Textile and Apparel, Technology and Management, Vol. 5(1), 2006, 1-20.
- [Sav2016] Savina et al., *A simple method for the production of large volume 3D macroporous hydrogels for advanced biotechnological, medical and environmental applications*, Scientific Reports, Vol. 6, 2016, 1-9.
- [Sav2011] Savina et al., *Porous structure and water state in cross-linked polymer and protein cryo-hydrogels*, Soft Matter, Vol. 7, 2011, 4276-4283.

- [Sav2007] Savina et al., *Cryogels from poly(2-hydroxyethyl methacrylate): macroporous, interconnected materials with potential as cell scaffolds*, *Soft Matter*, Vol.3, 2007, 1176-1184.
- [Sep2008] Sepeur et al., *Nanotechnologie, Grundlagen und Anwendungen*, Vincentz Network, 2008, S. 27.
- [Sch2016] Schacht et al., *Foams Made of Engineered Recombinant Spider Silk Proteins as 3D Scaffolds for Cell Growth*, *ACS Biomaterial Science and Engineering*, Vol. 2, 2016, 517-525.
- [Sch2014] Schel, *Einsatz polymerer dreidimensionaler Scaffolds auf Cryogelbasis für onkologische Zellstudien*, Bachelorarbeit, 2014 (IMT, KIT).
- [Sch2012] Schweizer et al., *Abiraterone and other novel androgen-directed strategies for the treatment of prostate cancer: a new era of hormonal therapies is born*, *Therapeutic Advances in Urology*, Vol. 4, 2012, 167-178
- [Sch2011] Schacht et al., *Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein*, *Biomacromolecules*, Vol. 12(7), 2011, 2488-2495.
- [Sch2008] Schlemmer et al., *Der Radiologe*, Springer Medizin Verlag, Vol. 48 (1), 2008, 45-51.
- [Sch1996] Schugens et al., *Poly lactide macroporous biodegradable im-plants for cell transplantation. II. Preparation of poly lactide foams by liquid-liquid phase separation.*, *J Biomed Mater Res*, Vol.30, 1996, 449-461.
- [Sch1996] Schugens et al., *Biodegradable and macroporous poly lactide implants for cell trans-plantation: 1. Preparation of macroporous poly lactide supports by solid-liquid phase separation.*, *Polymer*, Vol.37, No. 1027, 1996, 10257-1038.

- [She2008] She et al., *Preparation and in vitro degradation of porous three-dimensional silk fibroin/chitosan scaffold*, Polymer Degradation and Stability, Vol. 93(7), 2008, 1316-1322.
- [Sie2014] Sieh et al., *Paracrine interactions between LNCaP prostate cancer cells and bioengineered bone in 3D in vitro culture reflect molecular changes during bone metastasis*, Bone, Vol.63, 2014, 121-131.
- [Sie2012] Sieh et al., *Phenotypic Characterization of Prostate Cancer LNCaP Cells Cultured within a Bioengineered Microenvironment*, PloS ONE, Vol. 7(9), 2012, 1-16.
- [Sin2013] Singh et al., *Engineering three-dimensional macroporous hydroxyethyl methacrylate-alginate-gelatin cryogel for growth and proliferation of lung epithelial cells*, Journal of Biomaterial Science, Vol.24 (11), 2013, 1343-1359.
- [Sin2010] Singh et al., *Proliferation of Myoblast Skeletal Cells on Three-Dimensional Supermacroporous Cryogels*, International Journal of Biological Science, Vol. 6(4), 2010, 371-381.
- [Slo2012] Slotta et al., *Synthetic Spider Silk Proteins and Threads*, Society of Biological Engineering, Vol. 108(5), 2012, 43-49.
- [Spa1999] Spathelf, *Bestimmung von androgenen und antiandrogenen Substanzen in wässrigen Umweltproben mit biologischen und chemischen Methoden*, Diplomica Verlag GmbH, 1999, Kap. 2 S. 3ff.
- [Sta2015] Stanton et al., *Bioprinting of 3D Hydrogels*, Royal Society of Chemistry, Vol.15, 2015, 3111-3115.
- [Sto1978] Stone et al., *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*, International Journal of Cancer, Vol. 21, 1978, 274-281.

- [Sri2007] Srivastava et al., *The physical characterization of supermacroporous poly (N -isopropylacrylamide) cryogel: Mechanical strength and swelling/de-swelling kinetics*, Materials Science and Engineering A, Vol.464, 2007, 93-100.
- [Sug2000] Sugihara et al., *Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds*, Proc Soc Exp Biol Med, Vol. 225(1), 2000, 58-64
- [Sun2014] Sun et al., *Silk fibroin/collagen and silk fibroin/chitosan blended three-dimensional scaffolds for tissue engineering*, European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology, Vol. 25(2), 2014, 243-249.
- [Tak2007] Takagi et al., *Three-dimensional Cellular Spheroid Formation Provides Human Prostate Tumor Cells with Tissue-like Features*, Anticancer Research, Vol. 27, 2007, 45-54.
- [Tam2012] Tamburrino et al., *Androgen receptor (AR) expression in prostate cancer and progression of the tumor: lessons from cell lines, animal models and human specimens*, Steroids, Vol. 18(13), 2012, 3532–3540.
- [Tan2015] Tan et al., *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery*, Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 3618(10), 2015, 3-23.
- [Tei2015] Teimouriet al., *Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application*, Polymer Degradation and Stability, Vol. 121, 2015, 18-29.
- [Tho2014] Thoma et al., *3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery*, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 69-70, 2014, 299-41.

- [Til2012] Tilghman et al., *Matrix rigidity regulates cancer cell growth by modulating cellular metabolism and protein synthesis*, PLoS one, Vol. 7(5), 2012, 1-11.
- [Til2010] Tilghman et al., *Matrix rigidity regulates cancer cell growth and cellular phenotype*, PLoS ONE, Vol. 5(9), 2010, 1-13.
- [Tri2013] Tripathi et al., *Modulated Crosslinking of Macroporous Polymeric Cryogel Affects In Vitro Cell Adhesion and Growth*, Macromolecular Bioscience, Vol. 13, 2013, 838-850.
- [Tux2001] Tuxhorn et al., *Reactive stroma in prostate cancer progression*, J Urol, Vol. 166(24), 2001, 472-483.
- [Ulu2000] Uludag et al., *Technology of mammalian cell encapsulation*, Advanced Drug and Delivery Review, Vol.42, 2000, 29-64
- [Ung2004] Unger et al., *Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells*, Biomaterials, Vol. 25(21), 2004, 5137-5146.
- [Vel1990] Veldscholte et al., *Unusual specificity of the androgen receptor in the human prostate tumor cell line LNCaP: high affinity for progestagenic and estrogenic steroids*, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1052, 1990, 187-194.
- [Vep2007] Vepari et al., *Silk as Biomaterial*, Progress in Polymer Science, Vol. 32(8-9), 2007, 991-1007.
- [Vin2012] Vinci et al., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*, BMC Biology, Vol. 10, 2012, 1-20.

- [Vli2011] Vlierberghe et al., *Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review*, *Biomacromolecules*, Vol. 12(5), 2011, 1387-1408.
- [Wan2015] Wang et al., *3D Porous Chitosan-Alginate Scaffolds as an in Vitro Model for Evaluating Nanoparticle-Mediated Tumor Targeting and Gene Delivery to Prostate Cancer*, *Biomacromolecules*, Vol. 16, 2015, 3362-3372.
- [Wan2014] Wang et al., *Three-dimensional in vitro cancer models: a short review*, *Biofabrication*, Vol. 6(2), 2014, 1-9.
- [Wan2012] Wang et al., *Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask*, *Regen. Med.*, Vol. 7, 2012, 71-84.
- [Wan2005] Wang et al., *Three-dimensional co-culture models to study prostate cancer growth, progression, and metastasis to bone*, *Seminars in cancer biology*, 2005, Vol. 15(5), 353-364.
- [Wan2006] Wang et al., *Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes*, *Biomaterials*, Vol. 27(25), 2006, 4434-4442.
- [Wan2006] Wang et al., *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*, *Biomaterials*, Vol.27, 2006, 6064-6082 (Table 1).
- [Wan2000] Wang et al., *Expression of cadherins and catenins in paired tumor and non-neoplastic primary prostate cultures and corresponding prostatectomy specimens*, *Urol. Res.*, Vol. 28(5), 2000, 308–315.
- [Web2013] Weber et al., *Die neuzeitlichen Textilveredlungs-Verfahren der Kunstfasern*, Springer-Verlag, 2013, ISBN 978-3-7091-2424-6.

- [Web2013] Webster et al., *Tunable Thermo-Responsive Poly(N - vinylcaprolactam) Cellulose Nanofibers: Synthesis, Characterization, and Fabrication*, *Macromolecular Materials and Engineering*, Vol.298(4), 2013, 447-453.
- [Wei2007] Weißbach, *Werkstoffkunde – Strukturen, Eigenschaften, Prüfung*, Vieweg und Teubner, 17. Auflage, 2007, Kap. 15, S. 378ff.
- [Wel2012] Welzel et al., *Macroporous StarPEG-Heparin Cryogels*, *Biomolecules*, Vol.13, 2012, 2349-2358.
- [Wid2010] Widhe et al., *Recombinant spider silk as matrices for cell culture*, *Biomaterials*, Vol.31, 2010, 9575-9585.
- [Wil1989] Wilding et al., *Aberrant Response In Vitro of Hormone-Responsive Prostate Cancer Cells to Antiandrogens*, *The Prostate*, Vol. 14, 1989, 103-115.
- [Win2012] Windus et al., *In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer*, *Experimental Cell Research*, Vol. 318(19), 2012, 2507-2519.
- [Wu2008] Wu et al., *Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery*, *Biomed. Microdevices*, Vol. 10, 2008, 197-202.
- [Xia2008] Xia et al., *Fabrication and properties of conductive conjugated polymers/silk fibroin composite fibers*, *Compos Sci Technol*, Vol.68, 2008, 1471-1479.
- [Yam2007] Yamada et al., *Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D*, *Cell*, Vol. 130(4), 2007, 601-610.
- [Yan2012] Yang et al., *In vitro and in vivo characterization of silk fibroin/gelatin composite scaffolds for liver tissue engineering*, *Journal of Digestive Diseases*, Vol. 13(3), 2012, 168-178.

- [Yan2012] Yang et al., *Preparation of Porous Scaffolds from Silk Fibroin Extracted from the Silk Gland of Bombyx mori (B. mori)*, Int. J. Mol. Sci., Vol.13, 2012, 7762-7775.
- [Yeo2000] Yeo et al., *The effects of Pva/chitosan/fibroin (PCF)-blended spongy sheets on wound healing in rats*, Biol Pharm Bull, Vol. 23(10), 2000, 1220-1223.
- [Zan2016] Zanoni et al., *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained*, Nature, 2016, 1-11.
- [Zha2016] Zhang et al., *A bilayered scaffold based on RGD recombinant spider silk protein for small diameter tissue engineering*, Polymer Composites, 2016, 2553-2565.
- [Zha2015] Zhang et al., *Silk fibroin composite membranes for application in corneal regeneration*, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 132(32), 2015, 1-8
- [Zha2013] Zhang et al., *Mechanical properties and structure of silkworm cocoons: A comparative study of Bombyx mori, Antheraea assamensis, Antheraea pernyi and Antheraea mylitta silkworm cocoons*, Materials Science and Engineering C, Vol.33, 2013, 3206-3213.
- [Zha2001] Zhang et al., *Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 55(3), 2001, 304-312.
- [Zho2016] Zhou et al., *Promotion of adhesion and proliferation of endothelial progenitor cells on decellularized valves by covalent incorporation of RGD peptide and VEGF*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol. 27, 2016, 1-13.7
- [Zhu2013] Zhu et al., *Biofabrication of Tissue Scaffolds*, INTECH, Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications, Chapter 12, 2013, 316-328.

ISSN 1869-5183

Herausgeber: Institut für Mikrostrukturtechnik

- Band 1** Georg Obermaier
Research-to-Business Beziehungen: Technologietransfer
durch Kommunikation von Werten (Barrieren, Erfolgs-
faktoren und Strategien). 2009
ISBN 978-3-86644-448-5
- Band 2** Thomas Grund
Entwicklung von Kunststoff-Mikroventilen im
Batch-Verfahren. 2010
ISBN 978-3-86644-496-6
- Band 3** Sven Schüle
Modular adaptive mikrooptische Systeme in Kombination
mit Mikroaktoren. 2010
ISBN 978-3-86644-529-1
- Band 4** Markus Simon
Röntgenlinsen mit großer Apertur. 2010
ISBN 978-3-86644-530-7
- Band 5** K. Phillip Schierjott
Miniaturisierte Kapillarelektrophorese zur kontinuierlichen
Überwachung von Kationen und Anionen in Prozess-
strömen. 2010
ISBN 978-3-86644-523-9
- Band 6** Stephanie Kißling
Chemische und elektrochemische Methoden zur
Oberflächenbearbeitung von galvanogeformten
Nickel-Mikrostrukturen. 2010
ISBN 978-3-86644-548-2

- Band 7** **Friederike J. Gruhl**
Oberflächenmodifikation von Surface Acoustic Wave (SAW)
Biosensoren für biomedizinische Anwendungen. 2010
ISBN 978-3-86644-543-7
- Band 8** **Laura Zimmermann**
Dreidimensional nanostrukturierte und superhydrophobe
mikrofluidische Systeme zur Tröpfchengenerierung und
-handhabung. 2011
ISBN 978-3-86644-634-2
- Band 9** **Martina Reinhardt**
Funktionalisierte, polymere Mikrostrukturen für die
dreidimensionale Zellkultur. 2011
ISBN 978-3-86644-616-8
- Band 10** **Mauno Schelb**
Integrierte Sensoren mit photonischen Kristallen auf
Polymerbasis. 2012
ISBN 978-3-86644-813-1
- Band 11** **Daniel Auernhammer**
Integrierte Lagesensorik für ein adaptives mikrooptisches
Ablensystem. 2012
ISBN 978-3-86644-829-2
- Band 12** **Nils Z. Danckwardt**
Pumpfreier Magnetpartikeltransport in einem
Mikroreaktionssystem: Konzeption, Simulation
und Machbarkeitsnachweis. 2012
ISBN 978-3-86644-846-9
- Band 13** **Alexander Kolew**
Heißprägen von Verbundfolien für mikrofluidische
Anwendungen. 2012
ISBN 978-3-86644-888-9

- Band 14 Marko Brammer**
Modulare Optoelektronische Mikrofluidische
Backplane. 2012
ISBN 978-3-86644-920-6
- Band 15 Christiane Neumann**
Entwicklung einer Plattform zur individuellen Ansteuerung
von Mikroventilen und Aktoren auf der Grundlage eines
Phasenüberganges zum Einsatz in der Mikrofluidik. 2013
ISBN 978-3-86644-975-6
- Band 16 Julian Hartbaum**
Magnetisches Nanoaktorsystem. 2013
ISBN 978-3-86644-981-7
- Band 17 Johannes Kenntner**
Herstellung von Gitterstrukturen mit Aspektverhältnis 100 für die
Phasenkontrastbildgebung in einem Talbot-Interferometer. 2013
ISBN 978-3-7315-0016-2
- Band 18 Kristina Kreppenhofer**
Modular Biomicrofluidics - Mikrofluidikchips im Baukasten-
system für Anwendungen aus der Zellbiologie. 2013
ISBN 978-3-7315-0036-0
- Band 19 Ansgar Waldbaur**
Entwicklung eines maskenlosen Fotolithographiesystems
zum Einsatz im Rapid Prototyping in der Mikrofluidik und
zur gezielten Oberflächenfunktionalisierung. 2013
ISBN 978-3-7315-0119-0
- Band 20 Christof Megnin**
Formgedächtnis-Mikroventile für eine fluidische Plattform. 2013
ISBN 978-3-7315-0121-3
- Band 21 Srinivasa Reddy Yeduru**
Development of Microactuators Based on
the Magnetic Shape Memory Effect. 2013
ISBN 978-3-7315-0125-1

- Band 22 Michael Röhrig**
Fabrication and Analysis of Bio-Inspired Smart Surfaces. 2014
ISBN 978-3-7315-0163-3
- Band 23 Taleieh Rajabi**
Entwicklung eines mikrofluidischen Zweikammer-Chipsystems mit integrierter Sensorik für die Anwendung in der Tumorforschung. 2014
ISBN 978-3-7315-0220-3
- Band 24 Frieder Märkle**
Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter Peptidarrays. 2014
ISBN 978-3-7315-0222-7
- Band 25 Tobias Meier**
Magnetoresistive and Thermoresistive Scanning Probe Microscopy with Applications in Micro- and Nanotechnology. 2014
ISBN 978-3-7315-0253-1
- Band 26 Felix Marschall**
Entwicklung eines Röntgenmikroskops für Photonenenergien von 15 keV bis 30 keV. 2014
ISBN 978-3-7315-0263-0
- Band 27 Leonardo Pires Carneiro**
Development of an Electrochemical Biosensor Platform and a Suitable Low-Impedance Surface Modification Strategy. 2014
ISBN 978-3-7315-0272-2
- Band 28 Sebastian Mathias Schillo**
Prozessentwicklung für die Automatisierung der Herstellung und Anwendung von hochdichten Peptidmicroarrays. 2014
ISBN 978-3-7315-0274-6

- Band 29 Nicole E. Steidle**
Micro- and Nanostructured Microfluidic Devices
for Localized Protein Immobilization and Other
Biomedical Applications. 2014
ISBN 978-3-7315-0297-5
- Band 30 Jochen Heneka**
Prozessentwicklung eines industrietauglichen Verfahrens
zur Fertigung von vereinzelt LIGA-Mikrobauteilen. 2015
ISBN 978-3-7315-0326-2
- Band 31 Seoung-Eun Kim**
Konzeption und prototypische Fertigung einer
nicht-invasiven mikrofluidischen Plattform für die
Elektrophysiologie (NIMEP) zur Zellenanalyse. 2015
ISBN 978-3-7315-0378-1
- Band 32 Elisabeth Wilhelm**
Entwicklung eines mikrofluidischen Brailledisplays. 2015
ISBN 978-3-7315-0385-9
- Band 33 Viktor Pinneker**
Entwicklung miniaturisierter Aktorsysteme basierend
auf magnetischen Formgedächtnislegierungen. 2017
ISBN 978-3-7315-0500-6
- Band 34 Ali Caglar Özen**
Novel MRI Technologies for Structural and Functional
Imaging of Tissues with Ultra-short T_2 Values. 2017
ISBN 978-3-7315-0657-7
- Band 35 Anne Bäcker**
Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Cryogelbasis
zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen. 2017
ISBN 978-3-7315-0676-8

ANNE BÄCKER

Veränderliche 3D Zellgerüstträger auf Cryogelbasis
zur Kultivierung von Prostatakarzinomzellen

Grundlage eines 3D Zellkulturmodells gegenüber herkömmlichen Kultivierungsbedingungen ist eine Organismen-ähnliche Umgebung, in welcher die Zellen ein in vivo-nahes Verhalten inklusive zelltypischer Merkmale aufweisen. Cryogele bieten gegenüber der konventionellen Verfahrensweise eine elastisch poröse und mechanisch feste Struktur, welche hinsichtlich ihrer Variabilität vielseitige Verwendungsmöglichkeiten aufweist. Im Bereich der Krebsforschung spielt die Bildung von multizellulären Aggregaten, (Sphäroiden), welche bezüglich ihrer Eigenschaften und Aussehen dem eines festen Tumors in vivo nahe kommen, eine besondere Rolle. Kernpunkt der Arbeit war die Synthese verschiedener Cryogelstrukturen, welche aus den natürlichen Polymeren Natriumalginat und Gelatine sowie dem synthetischen Polymer Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) bei unterschiedlichen Konzentrationen sowie Gefrierzeiten und -temperaturen hervorgingen. Anschließend wurde der Einfluss des porösen Aufbaus und Festigkeit der Cryogele auf das Verhalten der humanen Prostatakrebszellen LNCaP und PC3 untersucht.

Auf Grundlage der Cryogeltechnik konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass allein die Kombination verschiedener Materialien eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung strukturspezifischer Merkmale spielt. Darüber hinaus stellten die erzeugten Gerüststrukturen eine optimale Kultivierungsbedingung für die Prostatakrebszelllinie LNCaP dar, welche generell ein positives Wachstumsverhalten aufzeigte.

ISSN 1869-5183

ISBN 978-3-7315-0676-8

Gedruckt auf FSC-zertifiziertem Papier

